



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE



---

FRANCYS ANDREINA AVENDAÑO RANGEL

DELEÇÃO DIRECIONADA DE CENTRINA EM *LEISHMANIA*  
*BRAZILIENSIS* UTILIZANDO CRISPR-CAS9: GERAÇÃO DE UMA LINHAGEM  
ATENUADA PARA IMUNOPROFILAXIA

TESE DE DOUTORADO

Salvador – Bahia  
2023



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



---

**FRANCYS ANDREINA AVENDAÑO RANGEL**

**DELEÇÃO DIRECIONADA DE CENTRINA EM *LEISHMANIA*  
*BRAZILIENSIS* UTILIZANDO CRISPR-CAS9: GERAÇÃO DE UMA LINHAGEM  
ATENUADA PARA IMUNOPROFILAXIA**

**TESE DE DOUTORADO**

**Salvador – Bahia  
2023**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA DA BAHIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
CIÊNCIAS DA SAÚDE**



---

**DELEÇÃO DIRECIONADA DE CENTRINA EM *LEISHMANIA*  
*BRAZILIENSIS* UTILIZANDO CRISPR-CAS9: GERAÇÃO DE UMA LINHAGEM  
ATENUADA PARA IMUNOPROFILAXIA**

**Discente:** Francys Andreina Avendaño Rangel

**Orientadora:** Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do grau de Doutora em Ciências da Saúde – área de concentração Imunologia das Doenças Tropicais.

**Salvador – Bahia  
2023**

Ficha catalográfica  
Biblioteca Gonçalo Muniz  
Sistema Universitário de Bibliotecas  
Universidade Federal da Bahia

**R196** Rangel, Francys Andreina Avendaño

Deleção direcionada de centrina em *Leishmania Braziliensis* utilizando CRISPR-Cas9: Geração de uma linhagem atenuada para imunoprofilaxia. / Francys Andreina Avendaño Rangel. – Salvador, 2023.

91 f.

Orientador: Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira  
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, 2023.

1. Leishmaniose. 2. Leishmaniose cutânea. 3. Vacina atenuada. 4. *Leishmania braziliensis*. 5. imunização. Título.

CDU (2007): 616.928.5

Elaboração (Resolução CFB nº 184/2017: Solange Mattos  
CRB-5/758





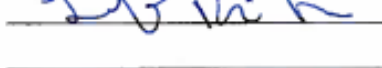


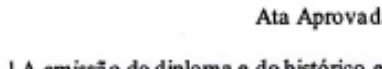
UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
 Faculdade de Medicina da Bahia  
 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde  
 Largo do Terreiro de Jesus, s/n. Centro Histórico  
 40.026-010 Salvador, Bahia, Brasil.  
 Tel.: 55 71 3283.5582 | Fax: 55 71 3283.5567  
 www.possaude.ufba.br | pos.saude@ufba.br



## ATA DE SESSÃO PÚBLICA DE ARGUIÇÃO E DEFESA DE TESE PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE DOUTOR EM CIÊNCIAS DA SAÚDE.

1 Ao décimo primeiro dia do mês de julho de 2023, no horário das 09:00 horas, nas dependências do  
 2 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia da Universidade  
 3 Federal da Bahia, de forma remota pela Plataforma ZOOM, deu-se início à sessão pública para arguição e  
 4 defesa da tese intitulada "Deleção direcionada de Centrina em *Leishmania braziliensis* utilizando  
 5 CRISPR-Cas9: Geração de uma linhagem atenuada para imunoprofilaxia", apresentada pela pós-  
 6 graduanda **Francys Andreina Avendano Rangel**. A Comissão Examinadora aprovada pelo  
 7 Colegiado do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, conforme o que estabelecem o  
 8 Regulamento Geral dos Cursos de Pós-Graduação da Universidade Federal da Bahia e o Regimento do  
 9 Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Bahia, foi composta por:  
 10 Profa. Dra. Camila Indiani de Oliveira, Doutora em Ciências/ USP, Professor Permanente  
 11 PPgCS/ UFBA, Professora Adjunta EBMSP (Orientador/Presidente); Prof. Dr. Lucas Pedreira de  
 12 Carvalho, Doutorado em Patologia Humana/UFBA, Professor Adjunto de Imunologia/UFBA;  
 13 Prof. Dr. Leonardo Paiva Farias, Doutorado em Biotecnologia/ USP, Pesquisador/ FIOCRUZ;  
 14 Prof. Dr. Rubens Lima do Monte Neto, Doutorado em Ciências Biológicas/ UFMG, Pesquisador/  
 15 FIOCRUZ e Profa. Dra. Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo, Doutorado em Bioquímica e  
 16 Imunologia/ UFMG, Professor Adjunto/ UFBA e Profa. Dra. Claudia Ida Brodskyn de Assis,  
 17 Doutora em Imunologia/ USP, Professor Adjunto/ UFBA(Suplente). Após a apresentação da tese, a  
 18 Comissão Examinadora realizou a arguição que foi respondida satisfatoriamente  
 19 (satisfatoriamente ou insatisfatoriamente) pela doutoranda. A tese apresentada foi considerada  
 20 aprovada (aprovada ou reprovada). E, para constar do processo de conclusão de curso e de  
 21 colação de grau<sup>1</sup>, a Comissão Examinadora lavrou a presente Ata que é assinada por todos os seus  
 22 membros. A Comissão Examinadora aprova a tese:  
 23  Com recomendações que devem ser incorporadas à versão final da tese.  
 24 ( ) Sem recomendações de modificações da versão final.  
 25 Será dado prazo máximo de 60 (sessenta) dias para entrega da versão final de modo a ser concluído o  
 26 processo de outorga do título de doutor.

27 Assinaturas dos Membros da Banca Examinadora:

28  
 29  Camila Indiani de Oliveira (Presidente/orientador)  
 30  Lucas Pedreira de Carvalho  
 31  Leonardo Paiva Farias  
 32  Rubens Lima do Monte Neto  
 33  Bárbara de Castro Pimentel Figueiredo  
 34  Claudia Ida Brodskyn de Assis (Suplente)

35  
 36 Ata Aprovada na Sessão do dia 11/07/2023  
 37

38 <sup>1</sup> A emissão do diploma e do histórico escolar está condicionada à entrega, na Secretaria Acadêmica do Programa de  
 39 Pós-graduação em Ciências da Saúde, via e-mail, do PDF da versão final da tese, com aprovação do orientador e  
 40 dos metadados (formato pdf), no prazo máximo de 60 dias.

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES**

Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz Bahia.  
Laboratório de Entomologia e Doenças Infecciosas Transmitidas por Vetores.  
Universidade Federal de Bahia  
Universidade Federal de Minas Gerais

## **EQUIPE**

Dra. Camila Indiani de Oliveira, Tecnologista IGM-FIOCRUZ, Professora do PPgCS-UFBA.

Dr. Rohit Sharma

Dra. Daniela Bartolomeu, Professora Adjunta, UFMG.

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ).



**Dedico este trabalho a:**

*Os portadores de doenças negligenciadas e àqueles pesquisadores que lutam e acreditam que a ciência é o caminho para encontrarmos as soluções aos nossos problemas.*

*Os migrantes e refugiados que lutam diariamente para realizar seus sonhos fora de seus países!*

## AGRADECIMENTOS

Ao Universo, a vida, a Deus! Pela oportunidade de vir nesse lindo país e ter essa maravilhosa experiência profissional e pessoal.

À minha orientadora Dra. Camila Indiani, por ter me aceitado e acolhido no laboratório, por me guiar e aconselhar nos experimentos e tudo o relacionado ao projeto e vida profissional. Obrigada por ter acreditado em mim e me abrir as portas a tantas oportunidades. Você é uma fonte de inspiração e um exemplo de mulher na ciência.

Ao Dr. Rohit Sharma, pelo treinamento e conhecimento transmitido para mim. Por todo o trabalho colaborativo, discussões e coautorias neste e outros projetos.

À Dra. Aldina Barral, chefe do LEITV, por ter me recebido em seu laboratório.

Ao Dr. Lucas Carvalho, coordenador do programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, e à Cibele Barbosa, secretária do programa, por todo o suporte que me deram desde antes de eu chegar no Brasil.

A Organização de Estados Americanos (OEA) e o Programa de Alianças para a Educação e a Capacitação (Bolsas Brasil - PAEC OEA-GCUB) pela bolsa de Doutorado que me deu a oportunidade de me formar no Brasil.

Ao Dr. Claudio Figueira, Valdomiro Moitinho, Dra. Daniella Bartollomeu, Dr. Hira Nakhasi, Dr. Sreenivas Gannavaram e todos os colaboradores pela ajuda, discussões e colaboração neste projeto.

À Andrezza, Verena e Rita e todo o pessoal administrativo do LEITV, sempre me ajudando em todo o que puderem.

Aos amigos e colegas da equipe, Pedro Borba, Sayonara Melo, Taise Queiroz, Laíse Brandão, Vinicius Costa, Leslye Torres e Gabriela Agra pelas conversas, ajuda nos experimentos e companhia na Fiocruz.

Aos demais colegas do LEITV e LIB pelas conversas e agradável convivência.

À Universidade Federal da Bahia e ao Instituto Gonçalo Muniz, Fiocruz-Bahia, por me dar a oportunidade de aprender com excelentes mestres.

À Universidad de Los Andes, por me formar, me dar a oportunidade de ser parte dessa casa e representá-la no Brasil.

Ao José Antonio, meu parceiro de lutas ganhas e perdidas. Agradeço por se aventurar a vir comigo para o Brasil e viver esse sonho comigo, pelo amor e apoio todos esses anos. Te amo!

Ao meu filho André, o ser mais importante na minha vida. Levanto e me esforço cada dia por você, para te dar sempre o melhor de mim. Obrigada por chegar na minha vida, pela sua ternura e amor. Te amo meu baby açai!

Aos meus pais, Fany e Tony, por todo o apoio que vocês sempre me deram para estudar e conquistar meus sonhos. Sempre do meu lado, dando-me amor e conselhos. Obrigada pela ajuda com meu bebê durante a pandemia, vocês fizeram tudo mais leve. Los amo!

Ao meu Pai Hermes e sua esposa Maritza, por sempre terem acompanhado minhas lutas e me apoiado. Agradeço muito ter vocês no meu caminhar na academia e na vida.

Aos meus irmãos e sobrinhos, obrigada sempre pelo apoio. Espero ser fonte de inspiração para vocês.

À minha família Rangel e em especial a Tio Arnold! As pessoas mais lindas, com os melhores conselhos e o amor mais bonito sempre são todos vocês. De perto ou de longe sempre juntos em nossas lutas, vitórias e derrotas. Saudade de todos.

A Maria Eumelia, Mariana, Luca e Mateo, ter vocês por perto tem feito tudo um pouco mais leve e nos fazer sentir em companhia dos nossos. Obrigada por ter vindo nessa terra maravilhosa e fazer parte da nossa família no Brasil.

Aos meus amigos migrantes, bolsistas do programa PAEC-OEA, vindos todos da América Latina buscando crescer e nos aperfeiçoar no Brasil. Em especial a Yaimar, Roger, Marcela, Mónica, Juan e Taryn, todos vocês são exemplos de esforço e perseverança para crescer profissionalmente fora de nossos países. Obrigada por ser parte da minha jornada no Brasil.

Aos meus amigos de sempre, agradeço por continuar sendo parte da minha vida ainda na distância.

A todos aqueles que de alguma forma colaboraram neste trabalho. Muito obrigada!

RANGEL, Francys Andreina Avendaño. **Deleção direcionada de centrina em *Leishmania braziliensis* utilizando CRISPR-Cas9: Geração de uma linhagem atenuada para imunoprofilaxia.** 2023. 91 f. Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, 2023.

## RESUMO

As Leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas e não existem vacinas para uso humano. Na América Latina, a *Leishmania braziliensis* é o principal agente causador da leishmaniose tegumentar. Aqui, visando o desenvolvimento de uma cepa atenuada de *L. braziliensis* com fins de imunoprofilaxia, nós empregamos a tecnologia CRISPR/Cas9 com sucesso. Geramos uma linhagem de parasitas transgênicos expressando Cas9 e T7 RNA polimerase, a qual foi empregada para a deleção direcionada de centrina, uma proteína do citoesqueleto envolvida na duplicação do centríolo em eucariotos. O sequenciamento do genoma completo de *L. braziliensis* deficiente em centrina (*LbCen*<sup>-/-</sup>) não indicou a presença de mutações fora do alvo. *In vitro*, as taxas de crescimento de promastigotas de *LbCen*<sup>-/-</sup> e de tipo selvagem foram semelhantes, mas os amastigotas axênicos e intracelulares de *LbCen*<sup>-/-</sup> mostraram um fenótipo multinucleado, com sobrevivência diminuída em macrófagos infectados. Após a inoculação experimental em camundongos BALB/c, a *LbCen*<sup>-/-</sup> não induziu o desenvolvimento de lesões e os parasitas foram eliminados rapidamente. Porém, a imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> não conferiu proteção contra um desafio subsequente, diferentemente de outras linhagens com esta mesma deficiência. A resposta imune induzida pela inoculação com *LbCen*<sup>-/-</sup> foi caracterizada por níveis significativamente mais elevados de IL-4 e IL-10, não observados em camundongos leishmanizados com *LbWT*. Portanto, a imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> não é capaz de induzir uma resposta imune do tipo Th1, tornando os camundongos suscetíveis a desafios e a *LbCen*<sup>-/-</sup> não pode reproduzir a imunidade observada na leishmanização. Em conclusão, a deficiência da centrina em *L. braziliensis* causa atenuação do parasita, interrompe a capacidade de causar doença, mas não é capaz de estimular uma resposta imune protetora

**Palavras-chave:** *Leishmania braziliensis*, CRISPR-Cas9, Leishmaniose cutânea, vacina atenuada, imunização.

RANGEL, Francys Andreina Avendaño. **Targeted deletion of centrin in *Leishmania braziliensis* using CRISPR-Cas9: Generation of an attenuated lineage for immunoprophylaxis.** 2023. 91 f. Tese (Doutorado em Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina, Salvador, 2023.

### ABSTRACT

Leishmaniasis are neglected tropical diseases and there are no vaccines for human use. In Latin America, *Leishmania braziliensis* is the main causative agent of tegumentary leishmaniasis. Here, aiming at the development of an attenuated strain of *L. braziliensis* for immunoprophylaxis purposes, we successfully employed the CRISPR/Cas9 technology. We generated a line of transgenic parasites expressing Cas9 and T7 RNA polymerase, which was employed for the targeted deletion of centrin, a cytoskeletal calcium-binding protein involved in centrosome duplication in eukaryotes. Whole genome sequencing of centrin deficient *L. braziliensis* (*LbCen*<sup>-/-</sup>) did not indicate the presence of off-target mutations. In vitro, growth rates of *LbCen*<sup>-/-</sup> and wild-type promastigotes were similar, but axenic and intracellular *LbCen*<sup>-/-</sup> amastigotes showed a multinucleated phenotype with impaired survival in infected macrophages. After experimental inoculation in BALB/c mice, *LbCen*<sup>-/-</sup> failed to induce lesion development and the parasites were rapidly eliminated. Furthermore, immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> did not confer protection against subsequent challenges, unlike other centrin-deficient leishmanias. The immune response induced by inoculation with *LbCen*<sup>-/-</sup> was characterized by significantly higher levels of IL-4 and IL-10, not observed in mice leishmanized with *LbWT*. Therefore, immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> is not capable of inducing a Th1-type immune response, making mice susceptible to challenges, and *LbCen*<sup>-/-</sup> cannot reproduce the immunity observed in leishmanization. In conclusion, centrin deficiency in *L. braziliensis* causes parasite attenuation, interrupts the ability to cause disease, but otherwise cannot stimulate a protective immune response.

**Keywords:** *Leishmania braziliensis*, CRISPR-Cas9, Cutaneous Leishmaniasis, attenuated vaccine, immunization.

## SUMÁRIO

1	<b>INTRODUÇÃO</b>	15
2	<b>OBJETIVOS</b>	17
2.1	OBJETIVO GERAL	17
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	17
3	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b>	18
3.1	OS PARASITAS DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	18
3.2	AS LEISHMANIOSES	18
3.3	FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE	19
3.4	RESPOSTA IMUNE CONTRA <i>LEISHMANIA</i>	21
3.5	VACINAS CONTRA A LEISHMANIOSE	23
3.6	MANIPULAÇÃO GENÉTICA DA <i>L. BRAZILIENSIS</i>	26
3.7	<i>LEISHMANIA</i> DEFICIENTE EM CENTRINA	28
4	<b>CAPÍTULO 1 - Deleção direccionada de Centrina em <i>Leishmania braziliensis</i> usando edição baseada em CRISPR-Cas9</b>	31
5	<b>CAPÍTULO 2 - Imunização com <i>Leishmania braziliensis</i> deficiente em centrina não confere proteção contra infecção subsequente</b>	48
6	<b>DISCUSSÃO</b>	74
7	<b>CONCLUSÕES</b>	82
	<b>REFERÊNCIAS</b>	83

## 1 INTRODUÇÃO

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), causada pelas parasitas intracelulares do gênero *Leishmania sp.*, é um espectro de doenças transmitidas por insetos vetores, que tem uma incidência de 1 milhão de novos casos por ano e 350 milhões de indivíduos vivendo sob risco de infecção (REV. em Burza et al., 2018). A *Leishmania (Viannia) braziliensis* é o mais importante agente causal da LTA, doença que afeta pele e mucosa. A forma clínica mais comum da LTA é chamada leishmaniose cutânea localizada (LCL), cujas maiores taxas de prevalência têm sido relatadas no Afeganistão, Irã, Síria, Argélia, Brasil e Colômbia (Alvar et al., 2012). Nas Américas, a LCL no Novo Mundo é causada principalmente por *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. mexicana* (REV. em Grimaldi Jr et al., 1989). A LTA pode ainda se apresentar sob outras formas: a leishmaniose cutânea difusa (LCD), na qual o paciente é acometido por múltiplos nódulos múltiplos não ulcerativos e a leishmaniose mucosa (LM), caracterizada por uma inflamação exacerbada e destrutiva das mucosas. No entanto, a LCL é a manifestação mais frequente e é caracterizada por lesões cutâneas crônicas simples ou múltiplas, desenvolvidas no local da inoculação dos parasitas (REV. em Reithinger et al., 2007). Na região Nordeste do Brasil, LCL e LM são predominantemente causados por *L. braziliensis* (Rosa et al., 1988) enquanto a LCD é mais comumente causada por *L. amazonensis* (Bittencourt et al., 1989).

Atualmente, não existem vacinas para prevenção a leishmaniose, assim o controle dos vetores e os tratamentos com quimioterápicos são os métodos usados para controlar a doença. No entanto, formas resistentes aos medicamentos têm-se desenvolvido (Sundar et al., 2000) e a necessidade de medidas de imunoprofilaxia continua sendo urgente. A indução de proteção duradoura em pacientes curados indica que o desenvolvimento de imunidade contra a *Leishmania* é possível (REV. em Modabber, 1995), mas até o momento, uma vacina baseada em parasitas vivos (leishmanização) foi a única intervenção bem-sucedida contra a leishmaniose (Kamesipour et al., 2005; Nadim et al., 1983). No entanto, esta alternativa não é mais viável por questões de segurança. Diante da eficácia da leishmanização na indução de imunidade protetora, uma abordagem que vem sendo elaborada é o desenvolvimento de linhagens de parasitas atenuados para uso vacinal. Neste caso, os parasitas são igualmente capazes de infectar as células hospedeiras, permitindo ao sistema imune interagir com todo o repertório de antígenos dos parasitas, mas sem causar lesão ou doença (REV. em Saljoughian et al., 2014; REV. em Selvapandiyar et al., 2006).

Diante desta perspectiva, diferentes técnicas têm sido utilizadas para geração de parasitas atenuados. Dentre as técnicas mais importantes ressaltamos a manipulação genética da *Leishmania* para geração de fenótipos atenuados (Selvapandiyan et al., 2001; REV. em Selvapandiyan et al., 2006; Zhang et al., 2020; Volpedo et al., 2022a). Esta manipulação visa produzi/r fenótipos atenuados, os quais podem ser utilizados como candidatos vacinais, como, por exemplo, a *L. donovani* deficiente no gene que codifica uma Centrina (*LdCen*<sup>-/-</sup>). O produto do gene da centrina é uma das proteínas regulatórias requeridas para duplicação ou segregação dos centrossomas em eucariotas superiores e dos corpos basais em eucariotas inferiores (Wiech et al., 1996) e a centrina é descrita como um dos fatores essenciais na divisão celular na *Leishmania* (Selvapandiyan et al., 2001). Assim, a deleção da centrina na *L. donovani* não afeta o crescimento dos promastigotas *in vitro*, porém a duplicação das formas amastigotas dos parasitos é afetada. Os amastigotas mostram falhas na duplicação de corpos basais e na citocinese, resultando em grandes células multinucleadas *in vitro* e em macrófagos humanos *ex vivo* (Selvapandiyan et al., 2004; Selvapandiyan et al., 2009). A *LdCen*<sup>-/-</sup> tem sido testada como candidato vacinal em diferentes modelos pré-clínicos de leishmaniose. A imunização com *LdCen*<sup>-/-</sup> induz a diferenciação de células Th1 polifuncionais, secretoras de citocinas (INF- $\gamma$ , IL-2 e TNF), uma resposta indicativa de proteção. Além disso, a proteção induzida por *LdCen*<sup>-/-</sup> é de longa duração, o que sugere uma forte indução da resposta das células T de memória (Selvapandiyan et al., 2009; Fiuza et al., 2013; Avishek et al., 2016).

Mais recentemente, o desenvolvimento de técnicas de manipulação genética mais modernas, que não envolvem recombinação homóloga como CRISPR-Cas9 permitiu se avançar na geração de novas linhagens de leishmania modificadas. A técnica de CRISPR-Cas9 tem permitido a deleção de diversos genes na *Leishmania sp*, incluindo, BTN1 (Ishemgulova et al., 2018) e LeishlF4E-3 (Shrivastava et al., 2019), genes que codificam proteínas quinase (Baker et al., 2021) e proteínas flagelares (Beneke et al., 2019), assim como LPG2 (Jesus-Santos et al., 2020), RAD (Damasceno et al., 2020), centrina (Zhang et al., 2020; Volpedo et al., 2022a) etc. A partir desta ferramenta, neste trabalho, nós utilizamos CRISPR-Cas9 para modificar geneticamente *L. braziliensis*, gerando uma linhagem deficiente em centrina. Esta linhagem foi então caracterizada quanto à sua virulência e, posteriormente, investigada como candidato vacinal para a LCL causada por *L. braziliensis*.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a capacidade protetora de uma linhagem de *L. braziliensis* deficiente em centrina, empregando um modelo pré-clínico de LCL.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Gerar uma cepa geneticamente modificada de *L. braziliensis*, deficiente em centrina (*LbCen*<sup>-/-</sup>);
- Caracterizar a capacidade de infecção e a resposta imune inata de *LbCen*<sup>-/-</sup> *in vitro*;
- Avaliar o resultado da infecção de camundongos com *LbCen*<sup>-/-</sup> quanto ao desenvolvimento de lesão e carga parasitária bem como a resposta imune induzida após a infecção;
- Avaliar a capacidade protetora de *LbCen*<sup>-/-</sup>, em comparação com a proteção induzida por leishmanização.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 OS PARASITAS DO GÊNERO *LEISHMANIA*

O gênero *Leishmania* pertence à classe Kinetoplastea (Kinetoplastida) e à ordem Trypanosomatida. Os kinetoplastídeos possuem uma grande mitocôndria contendo DNA, chamada de kinetoplasto. Até o momento, tem sido descritas mais de 50 espécies de *Leishmania*, as quais podem infectar mamíferos e répteis, as quais são transmitidas por insetos hematófagos da família Psychodidae, comumente chamados flebotomíneos. Destas, 31 espécies infectam mamíferos e 20 são consideradas patogênicas para o homem (AKHOUNDI et al., 2016).

As *Leishmanias* são parasitas protozoários intracelulares e cada espécie possui características individuais no ciclo de vida, do qual participam de hospedeiros vertebrados e vetores flebotomíneos (BURZA et al., 2018; LAINSON, 2010). Estes parasitas podem causar diferentes formas da doença, tanto afetando a pele e as mucosas, quanto atingindo órgãos como fígado e baço, chegando a ser fatais em alguns casos (BURZA et al., 2018). O ciclo de vida das diferentes espécies de *Leishmania* é mantido pela transmissão entre um inseto flebotomíneo e um hospedeiro mamífero, apresentando duas formas principais: a forma amastigota aflagelada, encontrada nos hospedeiros vertebrados, e a forma promastigota flagelada, encontrada nos flebotomíneos. Na classificação taxonômica das diferentes espécies de *Leishmania*, as mesmas foram agrupadas em dois subgêneros principais denominados *Leishmania* e *Viannia*, segundo o local onde acontece a fase de desenvolvimento no intestino do vetor (LAINSON, 2010). Em 2018 foi criado o subgênero *Mundinia*, o qual abriga espécies de *Leishmania* que causam doença no homem e em animais, tal como *L. (Mundinia) martiniquensis* e *L. (Mundinia) orientalis* (SERENO, 2019).

#### 3.2 AS LEISHMANIOSES

As leishmanioses são doenças de caráter zoonótico e antroponótico, não contagiosas, causadas pela infecção com parasitas protozoários do gênero *Leishmania*, que ocorre pela picada de insetos flebotomíneos (KAYE; SCOTT, 2011; AKHOUNDI et al., 2016). Estas doenças, apresentam-se principalmente em áreas de pobreza e escassez de recursos humanos e econômicos para controle, sendo consideradas como doenças tropicais negligenciadas (DTN). Os países em desenvolvimento são os mais afetados e cerca de 12 milhões de pessoas,

encontram-se infectadas. As leishmanioses são endêmicas na América do Sul e Central, África do Norte, Oriente Médio e algumas partes da Ásia (ALVAR et al., 2012).

As leishmanioses podem se apresentar de diferentes formas, sendo o resultado de vários fatores, como a espécie de *Leishmania*, a quantidade de parasitas inoculados, a virulência da cepa, o perfil genético do hospedeiro e a resposta imunológica desenvolvida. As leishmanioses recebem duas classificações clínicas básicas: leishmaniose visceral (LV), que é uma forma clínica potencialmente fatal caso não seja tratada de forma adequada, e a leishmaniose tegumentar (LT) que varia desde lesões cutâneas localizadas a lesões difusas e disseminadas ou mucocutâneas (PACE, 2014).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um sério problema de saúde pública, tendo uma incidência anual entre 1 e 2 milhões de novos casos (SCOTT; NOVAIS, 2016) e incidência crescente na última década (ALVAR et al., 2012). A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma clínica mais comum da LTA e é causada por diferentes espécies de *Leishmania*, tanto do subgênero *Leishmania* quanto *Viannia*. Os seguintes países abrangem entre o 70% a 75% da incidência global de LCL estimada no mundo: Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (ALVAR et al., 2012; AKHOUNDI et al., 2016). No Brasil, a LTA é causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. amazonensis* (GONTIJO; CARVALHO, 2003). Durante o ano de 2021, o Brasil reportou 15.023 casos de Leishmaniose Cutânea/Mucosa (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION, 2022), sendo que a maior parte deles foi causada por *L. braziliensis*. Esta espécie tem uma ampla distribuição geográfica, ocupando desde a América Central até o norte de Argentina. No Brasil, a *L. braziliensis* já foi isolada de diferentes vertebrados como roedores silvestres, felídeos, marmotas, canídeos e equídeos, porém o papel desses animais no ciclo de transmissão não está bem descrito (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994; BRASIL, 2017).

### 3.3 FORMAS CLÍNICAS DA LEISHMANIOSE

Distintas espécies de *Leishmania* podem causar diferentes manifestações clínicas, variando na severidade, desde lesões cutâneas auto curativas até doença visceral com risco de vida.

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como kala-azar, é caracterizada pela visceralização dos parasitas, podendo ser causada pelas espécies *L. infantum* e *L. donovani*. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), houve quase 13.000 casos de LV em 2020 (RUIZ-POSTIGO et al., 2021). A doença é endêmica em mais de 70 países, afetando uma

população estimada em 200 milhões de pessoas (BURZA et al., 2018). Nesta doença, uma vez que os parasitas infectam a pele, após a transmissão pelo inseto vetor, eles são fagocitados por células do sistema retículo endotelial e infectam principalmente macrófagos do fígado, baço e a medula óssea. Após uma proliferação rápida dos parasitas nestes órgãos, os indivíduos afetados podem apresentar hepatoesplenomegalia e supressão das funções da medula (EVANS; KEDZIERSKI, 2012). O período de incubação pode variar de 2 a 6 meses e uma vez que os parasitas se estabelecem nos órgãos e nódulos linfáticos, os sintomas da LV aparecem. As manifestações clínicas se caracterizam por uma infecção sistêmica, apresentando febre prolongada, perda de peso e apetite, fadiga, tosse, dor abdominal, edema e diarreia, assim como também aumento do baço, fígado e nódulos linfáticos, pancitopenia, anemia e hipergamaglobulinemia (CHAPPUIS et al., 2007). A LV pode existir de forma assintomática ou subclínica, mas se a imunidade do indivíduo for comprometida, a doença pode surgir (CHAPPUIS et al., 2007). Se a doença não for tratada, a taxa de mortalidade pode chegar a 100% em 2 anos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022). O risco de morte é maior em crianças, indivíduos desnutridos e pessoas com sistema imunológico enfraquecido, incluindo HIV/AIDS e outras co-infecções (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2022).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é um sério problema de saúde pública, tendo uma incidência anual entre 1 e 2 milhões de novos casos (ALVAR et al., 2012; SCOTT; NOVAIS, 2016) e vem apresentando uma incidência crescente na última década (ALVAR et al., 2012). A LTA pode se apresentar em três formas clínicas principais: A leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD) e leishmaniose cutânea difusa (LCD) (MARZOCHI; MARZOCHI, 1994b). A leishmaniose cutânea localizada (LCL), a forma mais comum da LTA, é causada por várias espécies de *Leishmania* tanto do subgênero *Leishmania* quanto *Viannia*. Uma vez que os parasitas podem causar diferentes tipos de lesões crônicas na pele que curam lentamente (SCOTT; NOVAIS, 2016), pacientes com LCL correm o risco de apresentar deformidades na pele e estigmatização, levando-a a ser considerada como uma doença ocupacional (BURZA et al., 2018; BRASIL, 2016).

A *L. braziliensis* é o mais comum agente causal da LCL na América do Sul. Diferencia-se de outras leishmanioses por sua cronicidade, latência e tendência a metástase no hospedeiro humano (OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). A patologia desenvolvida pela infecção por *L. braziliensis* é causada principalmente pela resposta inflamatória associada à infecção, ao invés do crescimento descontrolado do parasita (SCOTT; NOVAIS, 2016) e há duas formas subclínicas diferentes: a Leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a leishmaniose mucosa (LM), quando ocorre disseminação do parasita para o trato nasofaríngeo (BURZA et al., 2018).

Logo após a infecção por *L. braziliensis*, ocorre um grande aumento do linfonodo que drena o local da infecção, e depois se desenvolve uma pápula no local da picada do flebotomíneo, que se transformará numa úlcera após 1-4 semanas (BARRAL et al., 1992; BARRAL et al., 1995). A formação de pápula eritematosa é seguida de um nódulo e depois o surgimento de úlceras múltiplas na pele, com formato redondo ou ovalado, bordas proeminentes, eritematosas e de fundo granuloso (GUIMARÃES et al., 2005), localizadas nas áreas expostas à picada do vetor flebotomíneo. A cura ocorre ao longo de meses ou anos, podendo ocasionar cicatrizes e alterações na pigmentação da pele. Nos locais endêmicos para *L. braziliensis*, 1 a 10% dos casos progridem para LM, caracterizada por lesões altamente inflamatórias, sendo descrita como uma complicação metastática da LCL (Amato et al., 2008). Menos prevalente, a LD é também uma forma metastática da LCL. Esta apresenta na forma de numerosas lesões acneiformes/papulares em duas ou mais regiões não contíguas (TURETZ et al., 2002).

Atualmente, as opções de tratamentos para a leishmaniose tegumentar continuam sendo os antimoniais pentavalentes. A terapia local, com os antimoniais pentavalentes, é preferida em pacientes com menos de 5 lesões, enquanto um tratamento sistêmico é considerado para pacientes com múltiplas lesões. Este tratamento possui importantes limitações como alta toxicidade e efeitos secundários além de crescentes relatos relacionados à resistência (VRIES; SCHALLING, 2022).

### 3.4 RESPOSTA IMUNE CONTRA *LEISHMANIA*

De maneira geral durante uma infecção experimental com *Leishmania*, a resposta imune inata é mediada por células fagocíticas e o principal mecanismo efetor é a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (SCOTT; NOVAIS, 2016). No início da infecção, os parasitas são fagocitados pelas células locais, nas quais é formado o fagolisossomo, de interior ácido. Dentro destas organelas, as formas promastigotas se transformam em formas amastigotas, resistentes (CECÍLIO et al., 2014). Como mencionado acima, a produção de ROS, decorrente da explosão respiratória, e a produção de óxido nítrico (NO), decorrente da ativação da NO sintase induzível por IFN- $\gamma$ , são os dois principais mecanismos de controle da *Leishmania*. Durante o início da resposta imune, as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF atuam sinergicamente para promover a ativação de macrófagos e assim eliminar as *Leishmanias*. No entanto, embora o NO seja o principal mediador da morte de *Leishmania* em camundongos, os papéis relativos de ROS e NO para o controle da leishmaniose humana permanecem desconhecidos (SCOTT; NOVAIS, 2016).

De acordo com a literatura, tanto os camundongos C57BL/6 quanto BALB/c são resistentes à infecção por *L. braziliensis*, pois as lesões cutâneas apresentadas são autolimitadas e curam de forma espontânea (CHILDS et al., 1984). Também, sabe-se que o controle da *L. braziliensis* em camundongos BALB/c depende do IFN- $\gamma$ , mas precisa-se de um equilíbrio nas respostas Th1/Th2, com a presença de células secretoras de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10 (DE MOURA et al., 2005). Além disso, várias citocinas inflamatórias têm sido associadas à gravidade da doença, incluindo interleucina 17, interleucina 1B e fator de necrose tumoral (TNF) (VORONOV et al., 2010; GONZALEZ-LOMBANA et al. 2011). Rocha et al. (2007) demonstraram o papel essencial de algumas moléculas na infecção experimental com *L. braziliensis*, tais como IL-12, STAT4, iNOS e TNF, as quais são necessárias para a cura. IL-12 e STAT4 são importantes para prevenir a visceralização do parasita, enquanto iNOS exerce um efeito anti-leishmania na pele e no linfonodo de drenagem. Por outro lado, diferente de *L. major* e *L. mexicana*, a NADPH não é importante na infecção por *L. braziliensis*. Observou-se também a presença de *L. braziliensis* nos linfonodos de drenagem em camundongos curados, demonstrando falha na eliminação completa dos parasitas após resolução das lesões (ROCHA et al., 2007).

Na LC humana, a resposta imune inata envolve principalmente aos neutrófilos infectados que produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) e secretam altos níveis de citocinas e quimiocinas inflamatórias que estimulam o recrutamento de macrófagos, neutrófilos e linfócitos T pro-inflamatórios para o local da infecção (CONCEIÇÃO et al., 2016; CARVALHO et al., 2022). Já os macrófagos podem fagocitar neutrófilos apoptóticos que abrigam parasitos viáveis, o que permite a entrada silenciosa do parasito sem ativação do fagócito, estimulando assim a produção de citocinas moduladoras pelos macrófagos, como TGF- $\beta$  e IL-10, e favorecendo o estabelecimento da infecção (VAN ZANDBERGEN, et. al., 2004; REGLI et al., 2017). Os parasitos presentes no fagolisossomo dos macrófagos são resistentes e se multiplicam mesmo nesse ambiente hostil. Para a eliminação dos parasitas, ocorre uma produção exagerada de NO que pode contribuir para o dano tecidual, observado principalmente na leishmaniose mucocutânea (LM) (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Na LC, a formação da úlcera é resultado da exacerbada ativação do sistema imunológico e do recrutamento de células inflamatórias. A ativação dessas células induz uma resposta inflamatória crônica que contribui para a necrose do tecido (MONTROYA et al., 2018). Durante a infecção primária, as células T CD8<sup>+</sup> nos linfonodos produzem IFN- $\gamma$ , crítico para o desenvolvimento das células Th1 CD4<sup>+</sup> e para a ativação de macrófagos para eliminar o parasita. Por outro lado, as células T CD8<sup>+</sup> que migram para as lesões produzem pouco IFN- $\gamma$

e exibem um perfil citotóxico, levando a uma resposta inflamatória exagerada que promove danos tecidual. Vacinas que induzam células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  podem ser protetoras, enquanto as imunoterapias que diminuem a citotoxicidade das células T CD8<sup>+</sup> ou seus mediadores são uma estratégia promissora para reduzir a patologia. (NOVAIS; SCOTT., 2015; CARVALHO et al., 2022). Sendo assim, o equilíbrio entre as respostas do tipo 1 e tipo 2 é determinante para o desenvolvimento da doença, podendo evoluir para formas mais graves ou autolimitadas (NOVAIS; SCOTT., 2015).

### 3.5 VACINAS CONTRA A LEISHMANIOSE

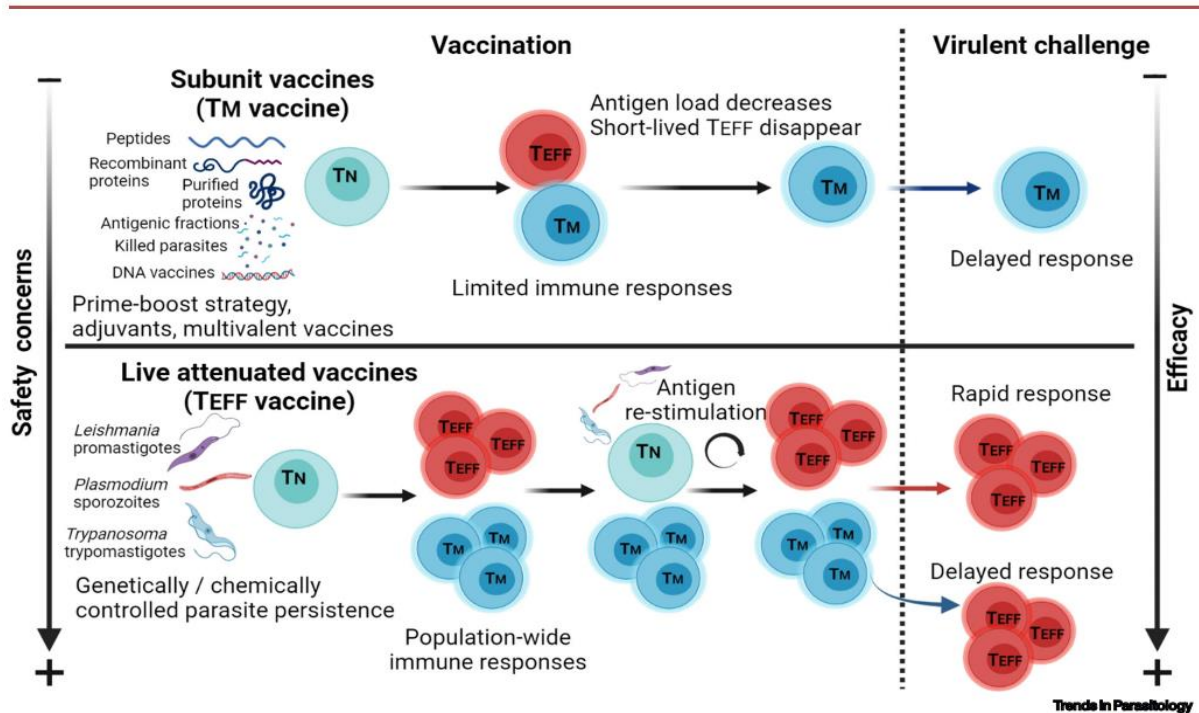
Na leishmaniose humana, os indivíduos infectados por *Leishmania* desenvolvem imunidade à reinfecção ao longo da vida, após a cura espontânea ou quimioterapêutica, mostrando que é possível induzir imunidade específica. Isto foi experimentalmente demonstrado na leishmanização, a qual provou ser eficaz para prevenir a doença. A técnica foi utilizada como uma vacina profilática em Israel e no Irã nas décadas de 1970 e 1980, empregando parasitas derivados de lesões ativas e crescidos *in vitro* (KHAMESIPOUR et al., 2006). Entretanto, o fato de o parasita perder virulência após seguidas subculturas *in vitro* comprometeu sua capacidade de causar lesões e, conseqüentemente, a eficácia da leishmanização como estratégia profilática. Outros problemas relatados foram o desenvolvimento de lesões crônicas (KHAMESIPOUR et al., 2012), a falta de padronização e controle de qualidade, além do risco de desenvolvimento de leishmaniose disseminada em indivíduos imunocomprometidos (GILLESPIE et al., 2016). Essas dificuldades inviabilizaram o uso da leishmanização com método de imunoprofilaxia e o foco do desenvolvimento de vacinas voltou-se para o uso de vacinas de subunidades, parasitas mortos ou de parasitas atenuados.

As vacinas que utilizam o parasita completo expõem o indivíduo a todo o repertório antigênico do mesmo, incluindo os padrões moleculares, os quais são necessários para a ativação adequada do sistema imunológico. A alternativa mais segura para esse tipo de vacinação seria a utilização de parasitas mantidos *in vitro* e mortos por meio de métodos químicos (MARZOCHI et al., 1998) ou submetidos ao aquecimento e autoclavagem (ARMIJOS et al., 2004; DE LUCA et al., 1999; VELEZ et al., 2000). Estudos pioneiros conduzidos no Brasil mostraram que a imunização com promastigotas mortas levou à conversão do teste de Montenegro para positivo (indicador de geração de hipersensibilidade do tipo tardia, DTH) em pelo menos 74% dos voluntários (MAYRINK et al., 1985; MENDONCA et al.,

1995). Entretanto, a imunização rendeu baixa eficácia protetora (50%) nos estudos clínicos de fase II, o que foi atribuído à baixa incidência de leishmaniose na área estudada, naquele período (MAYRINK et al., 1985). Além disso, a imunização com parasitas mortos ou autoclavados induziu a geração de resposta imunológica majoritariamente composta por células T CD8<sup>+</sup> (DE LUCA Et al., 1999; MENDONCA et al., 1995), enquanto indivíduos com infecção ativa apresentam resposta predominante de células T CD4<sup>+</sup>. Esse achado evidencia que a imunização com parasitas mortos induz uma resposta imunológica muito diferente daquela induzida por infecção ativa, o que também pode estar relacionado à baixa eficácia observada nos ensaios clínicos. Desta maneira, adjuvantes como BCG (MOMENI et al., 1999), hidróxido de alumínio (alum) (KENNEY et al., 1999) ou oligonucleotídeos de CpG (CpG-ODN) (VERTHELYI et al., 2002) passaram a ser incorporados à formulação de vacinas mortas, de forma a compensar sua baixa imunogenicidade. Em um estudo clínico realizado no Equador, a imunização com três cepas locais de *Leishmania* preservadas com fenol, acrescido de BCG, utilizado como adjuvante, conferiu alta proteção (72,9%) em crianças (ARMIJOS et al., 1998). No entanto, resultados diferentes foram observados em dois estudos realizados com populações naturalmente expostas a leishmania, nos quais a imunização com *L. major* autoclavada + BCG (MOMENI et al., 1999) ou *L. amazonensis* morta por timerosal + BCG (VÉLEZ et al., 2005) não induziu proteção maior que a observada no grupo que recebeu apenas BCG. Além dos resultados contraditórios obtidos em ensaios clínicos, existem dificuldades para a produção de vacinas mortas respeitando bons padrões de fabricação clínica, reforçando a necessidade de busca por alternativas.

Um outro tipo de abordagem que vem sendo utilizado é o uso de parasitas vivos atenuados por deleção de genes. Esse tipo de vacina também pode mimetizar o curso natural da infecção pelo parasita (Figura 1), podendo assim gerar respostas imunes similares (MOREIRA et al., 2023, SOLANA et al., 2021). Tais vacinas têm a vantagem de expor o hospedeiro a uma grande gama de proteínas e antígenos do parasita, sem que haja desenvolvimento da doença (SELVAPANDIYAN et al., 2006; SELVAPANDIYAN et al., 2009).





**Figura 1-** Proteção conferida por vacinas vivas atenuadas.

Fonte: (Solana., et al. 2021).

Dey et al. (2013) deletaram o gene que codifica a proteína p27 em *L. donovani* (*Ldp27*<sup>-/-</sup>) e, mais recentemente em *L. major* (*Lmp27*<sup>-/-</sup>) (ELIKAEE et al., 2018), gerando linhagens atenuadas. A p27 faz parte do complexo mitocondrial do citocromo c oxidase, envolvida na síntese de ATP. Na infecção experimental com essas linhagens ocorre um aumento nos níveis de NO, citoninas pro- e anti-inflamatórias e na produção de IFN- $\gamma$  por células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup>, gerando diminuição na carga parasitária. A vacinação com *Ldp27*<sup>-/-</sup> ou *Lmp27*<sup>-/-</sup> se mostrou segura pois não causou lesão e conferiu proteção duradoura contra um desafio virulento, tanto homólogo quanto heterólogo (ELIKAEE et al., 2018; ELIKAEE et al., 2019; ELIKAEE et al., 2022). Outros genes que têm sido deletados do genoma da *L. donovani*, gerando linhagens atenuadas e com capacidade de induzir proteção contra desafios virulentos incluem arabinolactona oxidase (ALO), Fructosa-1-6-bisfosfatase (FBP), transportador de folato/biopterina (BT1), componente não catalítico do complexo GPI-manosiltransferase (GPI-MTI). Também o gene que codifica a proteína de choque térmico 70 (HSP70) e a Proteína 1 relacionada ao Regulador de Informação Silenciosa 2 (SIR2) foram deletados do genoma da *L. infantum*, gerando linhagens atenuadas que, quando usadas como candidatos vacinais, conferem proteção contra infecção virulenta (MOREIRA et al., 2023).

Até o momento, a LEISH- F2, uma vacina composta de uma proteína artificial codificada por três genes: O tiol-específico antioxidante (TSA) homólogo da *L. major*, a proteína 1 de estresse induzível da *L. major* (LmSTI1) e o fator de alongamento e de iniciação (LeIF) da *L. braziliensis* encontra-se em ensaio clínico fase I. A vacina ChAd63- KH, a qual emprega o adenovírus de símios ChAd63 codificando o gene KH, composto por dois antígenos de *L. donovani*, KMP-11 e HASPB (MOAFI et al., 2019) também se encontra em ensaio clínico. Para esta, os resultados mostraram que a vacina ChAd63-KH apresentou reações adversas mínimas em pacientes leishmaniose visceral e induziu forte resposta imune (YOUNIS et al., 2021).

### 3.6 MANIPULAÇÃO GENÉTICA DA *L. BRAZILIENSIS*

A manipulação genética dos parasitas do gênero *Leishmania* tem se mostrado desafiadora desde as primeiras tentativas, devido à sua extensa plasticidade genômica (YAGOUBAT et al., 2020; STERKERS et al., 2014) e à presença de genes multicópias e polissomias, por exemplo (ROGERS et al., 2011; LAFFITTE et al., 2016). Embora exista uma alta sintenia entre os genomas de diferentes espécies de leishmania, a *L. braziliensis* possui características únicas, como elementos transponíveis, genes que codificam a maquinaria para RNA de interferência e pseudogenes (PEACOCK et al., 2007; LYE et al., 2010; LLANES et al., 2015). No entanto, apesar de ser responsável pela maioria dos casos de leishmaniose cutânea nas Américas, a *L. braziliensis* tem sido uma espécie negligenciada em termos de desenvolvimento de ferramentas/métodos moleculares ou mesmo de estudos mais aprofundados. Neste sentido, a adaptação recente da edição de genes baseada em CRISPR-Cas9 para leishmania tem permitido uma mudança neste cenário. O método CRISPR-Cas9 mostrou-se mais eficiente do que a recombinação homóloga tradicional para modificar genes em *Leishmania*, permitindo a exclusão ou interrupção de genes, a introdução de mutações específicas e marcar genes endógenos com ou se adição de marcadores de seleção. Além disso, os sistemas CRISPR estáveis conseguiram deletar genes presentes em várias cópias e em cromossomos múltiplos, identificar genes essenciais e criar rearranjos cromossômicos específicos em *Leishmania* (ZHANG; LYPACZEWSKI; MATLASHEWSKI, 2020).

Foram relatados cinco sistemas CRISPR para uso em *Leishmania* até o momento, sendo dois de expressão estável e três transitórios. Nos sistemas de expressão estável, a nuclease Cas9 e o RNA guia (gRNA) são expressos continuamente nos parasitas por meio de vetores de expressão, com o gRNA transcrito a partir do promotor U6 ou do promotor do RNA

ribossômico. No sistema transitório baseado na RNA polimerase T7, os genes da nuclease Cas9 e da polimerase T7 RNA são integrados ao genoma do parasita e expressos continuamente. A edição de genes é realizada por meio da co-transfecção transitória de promastigotas expressando Cas9 e T7 RNA com modelos de gRNA e DNA doador contendo marcadores de seleção de antibióticos ou etiquetas de proteínas fluorescentes. Outro sistema transitório envolve a transfeção direta de células de *Leishmania* expressando Cas9 com gRNA sintetizado in vitro e um doador de marcador de seleção de antibiótico. O terceiro sistema utiliza uma proteína recombinante purificada Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) complexada com gRNA sintetizado in vitro para formar um complexo ribonucleoproteico (RNP). A edição de genes é alcançada pela transfeção dos parasitas com o RNP (ZHANG; LYPACZEWSKI; MATLASHEWSKI, 2020).

O uso de CRISPR-Cas9 em *L. mexicana* está bem documentado na caracterização de genes essenciais necessários para ubiquitinação/ desubiquitinação (DAMIANOU et al., 2020); validação de fatores de virulência, LeishIF4E-3 e LmxM.22.0010, os quais codificam a proteína cap-binding e BTN,1 respectivamente (ISHEMGULOVA et al., 2018; SRIVASTAVA et al., 2019) e para a criação de uma biblioteca de mutantes deficientes para proteínas flagelares (BENEKE et al., 2019). Curiosamente, a edição do CRISPR-Cas9 foi usada para provar a resistência à paromomicina em *L. infantum* (BHATTACHARYA et al., 2020) e para determinar vias de deficiência imunológica no flebotomíneo *Phlebotomus papatasi*, vetor para *L. major* (LOURADOUR et al., 2020).

Baseado nesses achados, nós usamos o toolbox LeishGEdit CRISPR (BENEKE et al., 2017; BENEKE; GLUENZ, 2019) para gerar uma cepa de *L. braziliensis* deficiente em centrina. O toolbox LeishGEdit CRISPR é uma tecnologia CRISPR-Cas9 baseada em PCR, livre de clonagem, que abrange a expressão de sgRNAs in vivo, com base na transcrição T7-RNAP (Beneke et al., 2017). Este método permite a manipulação rápida e escalável do genoma de *Leishmania*, uma grande vantagem especialmente para *L. braziliensis*, uma espécie associada a manifestações clínicas graves, como a leishmaniose mucosa e disseminada, responsável pela maioria dos casos de CL nas Américas (DAVID; CRAFT, 2009).

O LeishGEdit CRISPR foi aplicado pela primeira vez para gerar uma *L. mexicana* imóvel, deficiente em PF16 (BENEKE et al., 2017). Recentemente, Adai et al. utilizaram esta ferramenta para gerar uma linha de *L. braziliensis* (PER005) deficiente em HSP-23 e HSP-100, recapitulando o fenótipo observado em mutantes nulos de *L. donovani* HPS23 e mostrando a viabilidade do CRISPR para a manipulação genética de *L. braziliensis* (ADAUI et al., 2020). Espada e colaboradores (2021), também utilizaram a tecnologia CRISPR/Cas9 para modificar

geneticamente *L. braziliensis*. Para isso, eles modificaram o plasmídeo pTB007 para permitir a integração no locus da  $\beta$ -tubulina no genoma da *L. braziliensis* (M2903) e assim alcançar a expressão estável e constitutiva de Cas9 e T7 RNA polimerase, sem a necessidade de seleção de droga para manutenção do plasmídeo. Não foram encontradas diferenças no crescimento dos parasitas *Lb Cas9/T7* comparado com a *LbWT*. A funcionalidade da linha *Lb Cas9/T7* foi comprovada usando o gene da proteína flagelar PF16 como alvo para deleção, gerando uma linha celular imóvel (ESPADA et al., 2021).

### 3.7 LEISHMANIA DEFICIENTE EM CENTRINA

Trabalhos iniciais demonstraram que a deleção do gene da centrina 1, por meio de recombinação homóloga, substituindo o gene da centrina por genes de resistência a antibióticos, resultou numa cepa de *L. donovani* atenuada (SELVAPANDIYAN et al., 2001; SELVAPANDIYAN et al., 2004). A centrina é uma proteína do citoesqueleto importante para a divisão celular, a qual é requerida somente na fase de replicação intracelular do parasito. Embora a deleção da centrina na *L. donovani* não afete o crescimento dos promastigotas, essa deficiência bloqueia o crescimento das formas amastigotas. Assim, os amastigotas apresentam falhas na duplicação de corpos basais e na citocinese, formando grandes células multinucleadas, tanto *in vitro* como *ex vivo* e resultando na morte apoptótica do parasita, o qual passa a ser facilmente eliminado pelo sistema imune (SELVAPANDIYAN et al., 2009). A partir destas observações, a *LdCen*<sup>-/-</sup> passou a ser estudada com um candidato vacinal, exatamente por mostrar um crescimento atenuado *in vitro*. Em camundongos, a imunização com *LdCen*<sup>-/-</sup> induziu proteção duradoura contra o desafio homólogo ou heterólogo usando cepas virulentas de *L. donovani*, *L. braziliensis* e *L. mexicana*. A proteção foi observada pela redução da carga parasitária no baço e no fígado, em comparação com camundongos não vacinados (SELVAPANDIYAN et al., 2009; DEY et al., 2014). Dessa forma, camundongos imunizados com *LdCen*<sup>-/-</sup> mostraram uma eliminação rápida dos parasitas virulentos, contidos no desafio. Os camundongos imunizados apresentaram um aumento significativo na população de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de citocinas (INF- $\gamma$ , IL-2 e TNF) e na proporção IFN- $\gamma$ /IL-10 (SELVAPANDIYAN et al., 2009). No caso do desafio com *L. mexicana*, foi demonstrado um aumento no número de células produtoras de IFN- $\gamma$  e uma redução na produção de IL-4 e IL-13, sendo esse um perfil de resposta protetora, nesse modelo (DEY et al., 2014). Em hamsters, a vacinação intradérmica com *LdCen*<sup>-/-</sup>, junto com a proteína LJM19 como adjuvante, gerou proteção duradoura contra o desafio com *L. donovani* e a resposta imune foi caracterizada por

alta produção de anticorpos, redução na carga parasitária no baço e fígado e maior expressão de citocinas pró-inflamatórias (FIUZA et al., 2016). Em modelo canino, a vacinação com *LdCen*<sup>-/-</sup> gerou uma resposta imune protetora com diminuição de carga parasitária. Nesses animais, observou-se proteção após um desafio virulento com *L. infantum*, a qual foi caracterizada por uma alta produção de anticorpos, ativação de células T, alta produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-12/IL-23p40 e diminuição na produção de IL-4 (FIUZA et al., 2015). De acordo com esses resultados, a *LdCen*<sup>-/-</sup> mantém uma ampla gama de antígenos, os quais estimulam uma resposta imune protetora em diferentes modelos animais. Além disso, a imunização com esta linhagem atenuada é capaz de gerar também proteção cruzada contra diferentes espécies, causadoras de diferentes manifestações da leishmaniose (VOLPEDO et al., 2022b).

Apesar da demonstração da segurança e eficácia (proteção) após a imunização com *LdCen*<sup>-/-</sup> em diferentes modelos animais, existe a preocupação quanto à presença de genes de resistência a antibióticos nessa linhagem. Pensando na aplicação clínica, uma linhagem atenuada não pode conter estes marcadores e, devido aos possíveis riscos de visceralização, a *LdCen*<sup>-/-</sup>, esta não pode avançar para ensaios clínicos em humanos (VOLPEDO et al., 2022b), por questões regulatórias. Para contornar estas limitações, a tecnologia de CRISPR/Cas9 foi utilizada para deletar o gene da centrina em *L. major* (*LmCen*<sup>-/-</sup>), sem incorporar marcadores de resistência, sendo está uma espécie que não visceraliza (ZHANG et al., 2020). A imunização de camundongos com *LmCen*<sup>-/-</sup> se mostrou segura pois não causou desenvolvimento de lesões e a vacinação induziu proteção contra desafio virulento com *L. major*, tanto em modelo de infecção por agulha ou quanto de transmissão natural, utilizando flebotomíneos infectados, comparável com a leishmanização. Especificamente, camundongos imunizados com *LmCen*<sup>-/-</sup> ou curados após uma primeira infecção com *L. major* (leishmanização) apresentaram uma resposta imune caracterizada por células T efetoras produtoras de IFN- $\gamma$  e presença de células T de memória residentes no tecido (TRM) (ZHANG et al., 2020), corroborando os resultados obtidos com *LdCen*<sup>-/-</sup>. Recentemente, foi demonstrada a segurança da imunização com *LmCen*<sup>-/-</sup> empregando hamsters imunocomprometidos e observou-se proteção a longo prazo contra o desafio com flebotomíneos infectados com *L. donovani* (KARMAKAR et al., 2022). Nesse estudo, os hamsters imunizados e desafiados apresentaram uma maior expressão de IFN- $\gamma$  e TNF e resposta Th2 diminuída, em comparação com hamsters não imunizados (KARMAKAR et al., 2022).

Mais recentemente, o mesmo grupo também gerou uma linhagem de *L. mexicana* deficiente em centrina (*LmexCen*<sup>-/-</sup>), que similar a *L. donovani* e *L. major*, é atenuada, apresenta defeitos na duplicação na forma amastigota, não causa patologia e confere proteção contra

infecção virulenta homóloga e heteróloga em camundongos (VOLPEDO et al., 2022a, KARMAKAR et al., 2022) e em hamsters (VOLPEDO et al., 2022b). Curiosamente, foi observado que os camundongos BALB/c imunizados com *LmexCen*<sup>-/-</sup> apresentaram uma redução na resposta Th2, enquanto, nos camundongos C57BL/6, foi observado um aumento das respostas Th1 (VOLPEDO et al., 2022b). Em conjunto, esses resultados demonstram que a deficiência em centrina gera linhagens de leishmania atenuadas, as quais se mostraram candidatos vacinais seguros e eficazes contra infecções virulentas. Em particular a *LmCen*<sup>-/-</sup> é uma vacina igualmente eficaz contra CL e VL, com possibilidades de avançar para ensaios clínicos de fase I.

**Tabela 1** - Resumo dos estudos referentes às Leishmanias com deficiência em Centrina

<b>Organismo</b>	<b>Modelo</b>	<b>Fenótipo</b>	<b>Proteção cruzada</b>	<b>Referências</b>
<i>Leishmania donovani</i>	BALB/c Hamster Dogs	Incapaz de sustentar a infecção in vivo. ↓ Parasitemia ↑ Células CD4+ Th1 secretoras de IFN $\gamma$ + e TNF $\alpha$ . ↓ Células CD4 Th2 secretoras de IL-10 e IL-4. ↑ Células CD4+ Th17 secretoras de IL-1 $\beta$ , IL-6-, TGF- $\beta$ - e IL-23, células citotóxicas CD8+ ↑ IgG2a	<i>L. infantum</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. mexicana</i>	Selvapandiyan et al., 2004. Dey et al., 2014. Fiuza et al., 2015. Fiuza et al., 2016. Volpedo et al., 2022b.
<i>Leishmania major</i>	BALB/c C57BL/6 Hamster	Não causa lesão. ↓ Parasitemia ↑ Células T efetoras produtoras de IFN- $\gamma$ +. ↑ Células T de memória residentes nos tecidos. ↑ Th1 ↓ Th2	<i>L. donovani</i>	Zhang et al., 2020. Karmakar et al., 2022. Volpedo et al., 2022b.
<i>Leishmania mexicana</i>	BALB/c C57BL/6 Hamster	Não causa lesão. ↓ Parasitemia ↑ Th1 ↑ Células T de Memória Central ↓ Th2	<i>L. donovani</i>	Volpedo et al., 2022a. Karmakar et al., 2022. Volpedo et al., 2022b.

**Fonte:** Elaborado pela autora

Neste trabalho, nós usamos a tecnologia CRISPR/Cas9 para a geração de uma linhagem atenuada de *L. braziliensis* deficiente em centrina (SHARMA et al., 2022), com o objetivo de desenvolver uma ferramenta de imunoprofilaxia contra a LTA.

## 4 CAPÍTULO I

### **Deleção direcionada de Centrina em *Leishmania braziliensis* usando edição baseada em CRISPR-Cas9**

*Leishmania braziliensis* é o principal agente causador da Leishmaniose Tegumentar nas Américas. No entanto, dificuldades relacionadas à manipulação do genoma, infecção experimental e crescimento do parasita limitaram até agora os estudos com esta espécie. A tecnologia baseada em CRISPR-Cas9 tornou a edição do genoma mais acessível, e aqui empregamos com sucesso a abordagem LeishGEdit para atenuar *L. braziliensis*. Geramos uma linhagem celular transgênica expressando Cas9 e T7 RNA polimerase, que foi empregada para a deleção direcionada de centrina, uma proteína do citoesqueleto de ligação ao cálcio envolvida na duplicação do centrossomo em eucariotos. A *Leishmania* deficiente em centrina apresenta interrupção do crescimento no estágio amastigota. O sequenciamento completo do genoma de *L. braziliensis* deficiente em centrina (*LbCen*<sup>-/-</sup>) não indicou a presença de mutações fora do alvo. *In vitro*, as taxas de crescimento de *LbCen*<sup>-/-</sup> e promastigotas de tipo selvagem foram semelhantes, mas amastigotas *LbCen*<sup>-/-</sup> axênicas e intracelulares mostraram um fenótipo multinucleado com sobrevivência prejudicada após infecção por macrófagos. Após a inoculação em camundongos BALB/c, *LbCen*<sup>-/-</sup> foram detectados precocemente, mas falharam em induzir a formação de lesões, ao contrário dos animais controle, infectados com *L. braziliensis* do tipo selvagem. Uma carga parasitária significativamente menor também foi observada em camundongos inoculados com *LbCen*<sup>-/-</sup>, diferentemente dos camundongos controle. Dado que *Leishmania* sp. tornaram-se candidatos para o desenvolvimento de vacinas, propomos que o *LbCen*<sup>-/-</sup> possa ser mais explorado para fins de imunoprofilaxia contra a leishmaniose tegumentar americana.





# Targeted Deletion of Centrin in *Leishmania braziliensis* Using CRISPR-Cas9-Based Editing

Rohit Sharma<sup>1†</sup>, Francys Avendaño Rangel<sup>1,2†</sup>, João Luís Reis-Cunha<sup>3</sup>, Larissa Pinheiro Marques<sup>4</sup>, Cláudio P. Figueira<sup>1</sup>, Pedro B. Borba<sup>1</sup>, Sayonara M. Viana<sup>1,2</sup>, Tom Beneke<sup>5</sup>, Daniella C. Bartholomeu<sup>4</sup> and Camila I. de Oliveira<sup>1,2,6\*</sup>

<sup>1</sup>Instituto Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador, Brazil, <sup>2</sup>Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil, <sup>3</sup>Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>4</sup>Departamento de Parasitologia, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil, <sup>5</sup>Sir William Dunn School of Pathology, University of Oxford, Oxford, United Kingdom, <sup>6</sup>INCT—Instituto de Investigação em Doenças Tropicais, Salvador, Brazil

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Albert Descoteaux,  
Université du Québec, Canada

### Reviewed by:

Daniela Ciccone Miguel,  
State University of Campinas, Brazil  
Gabriel Hovel-Miner,  
George Washington University,  
United States

### \*Correspondence:

Camila I. de Oliveira  
camila.indiani@fiocruz.br

<sup>†</sup>These authors share first authorship

### Specialty section:

This article was submitted to  
Parasite and Host,  
a section of the journal  
Frontiers in Cellular and  
Infection Microbiology

Received: 06 October 2021

Accepted: 22 December 2021

Published: 17 February 2022

### Citation:

Sharma R, Avendaño Rangel F, Reis-Cunha JL, Marques LP, Figueira CP, Borba PB, Viana SM, Beneke T, Bartholomeu DC and de Oliveira CI (2022) Targeted Deletion of Centrin in *Leishmania braziliensis* Using CRISPR-Cas9-Based Editing. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:790418. doi: 10.3389/fcimb.2021.790418

*Leishmania braziliensis* is the main causative agent of Tegumentary Leishmaniasis in the Americas. However, difficulties related to genome manipulation, experimental infection, and parasite growth have so far limited studies with this species. CRISPR-Cas9-based technology has made genome editing more accessible, and here we have successfully employed the LeishGEdit approach to attenuate *L. braziliensis*. We generated a transgenic cell line expressing Cas9 and T7 RNA polymerase, which was employed for the targeted deletion of centrin, a calcium-binding cytoskeletal protein involved in the centrosome duplication in eukaryotes. Centrin-deficient *Leishmania* exhibit growth arrest at the amastigote stage. Whole-genome sequencing of centrin-deficient *L. braziliensis* (*LbCen*<sup>-/-</sup>) did not indicate the presence of off-target mutations. *In vitro*, the growth rates of *LbCen*<sup>-/-</sup> and wild-type promastigotes were similar, but axenic and intracellular *LbCen*<sup>-/-</sup> amastigotes showed a multinucleated phenotype with impaired survival following macrophage infection. Upon inoculation into BALB/c mice, *LbCen*<sup>-/-</sup> were detected at an early time point but failed to induce lesion formation, contrary to control animals, infected with wild-type *L. braziliensis*. A significantly lower parasite burden was also observed in mice inoculated with *LbCen*<sup>-/-</sup>, differently from control mice. Given that centrin-deficient *Leishmania* sp. have become candidates for vaccine development, we propose that *LbCen*<sup>-/-</sup> can be further explored for the purposes of immunoprophylaxis against American Tegumentary Leishmaniasis.

**Keywords:** LeishGEdit, leishmaniasis, genetic manipulation, attenuation, vaccine development

## INTRODUCTION

Human leishmaniasis results in mortality and morbidity worldwide, contributing to ~1 million new cases each year and placing 350 million individuals at risk of infection (Burza et al., 2018). Brazil alone reported 15,498 cases of Cutaneous/Mucosal Leishmaniasis in 2019 (<https://www.paho.org/data/index.php/es/mnu-topics/leish-es/555-art-leish-es.html>), the majority of which were caused by



*Leishmania braziliensis*. Protection against *Leishmania* infection is dependent on the generation of IFN- $\gamma$ -producing CD4<sup>+</sup> T cells, leading to macrophage activation and parasite killing. Although infection with live parasites generates immunity, no vaccine against human leishmaniasis is yet available (Sundar and Singh, 2014). To this end, numerous attempts have been undertaken including but not limited to immunization with (i) live whole parasites, (ii) killed whole parasites, (iii) *Leishmania*-specific antigen and (iv) parasites attenuated by genetic modification [reviewed in (Zutshi et al., 2019)].

Following the first successful attempt of gene replacement in *L. major* (Cruz et al., 1993), genetic manipulation has now been achieved in different leishmania species. Since the recent introduction of CRISPR-Cas9-based methodologies, a significant advance has been made in this field: CRISPR-Cas9 enabled the deletion of hundreds of genes, including, BTN1 (Ishemgulova et al., 2018) and LeishIF4E-3 (Shrivastava et al., 2019), genes encoding protein kinases (Baker et al., 2021) and flagellar proteins (Beneke et al., 2019) in *L. mexicana*, as well as LPG2 in *L. infantum* (Jesus-Santos et al., 2020), RAD51 in *L. major* (Damasceno et al., 2020) and Ros3 in *L. braziliensis* (Espada et al., 2021). Herein, we have used the LeishGEdit tool box (Beneke et al., 2017; Beneke and Gluenz, 2019) to manipulate the *L. braziliensis* genome. Parasites were initially engineered to express the Cas9 nuclease and the T7 RNA polymerase episomally. Thereafter, linear sgRNA and donor DNA constructs encoding resistance markers were transfected in parallel, allowing for single guide (sg) RNA transcription *in vivo* and, thus, integration of donor DNA cassettes within homology flanks, identical to the target locus. The advantages of the LeishGEdit approach are that cloning procedures, PCR purifications or *in vitro* transcription before transfection are unnecessary with the advantage that it can also be used for high throughput screening of mutants (Beneke et al., 2019; Damianou et al., 2020; Baker et al., 2021).

The centrin gene product is one of the several regulatory proteins required for duplication or segregation of the centrosome in higher eukaryotes and of basal bodies in lower eukaryotes (Wiech et al., 1996). Centrin is described as one of the essential factors in cell division in *Leishmania* (Selvapandiyar et al., 2001) and, thus, a centrin-deficient (*centrin*<sup>-/-</sup>) *L. donovani* mutant displays abnormal cytokinesis due to impaired centrosome function, leading to cell cycle arrest in the G2/M phase and the formation of multinucleated cells in axenic and intracellular amastigotes (Selvapandiyar et al., 2004). Importantly, immunization with *centrin*<sup>-/-</sup> *L. donovani* provided strong protection against challenge with live parasites and immunized mice developed a multifunctional T cell response accompanied by a significant reduction in parasite load (Selvapandiyar et al., 2009). Recently, these findings have been expanded to show that immunization with centrin-deficient *L. major* confers protection against infected sand flies (Zhang et al., 2020b; Karmakar et al., 2021).

Based on the potential of centrin-deficient *Leishmania* to be developed as a vaccine leishmaniasis, we employed the LeishGEdit toolbox for targeted centrin deletion in

*L. braziliensis*. Centrin deletion was precise without apparent off target effects and amastigotes from *L. braziliensis* lacking centrin amastigotes were multinucleated, akin to *L. donovani centrin*<sup>-/-</sup> (Selvapandiyar et al., 2004). *L. braziliensis* amastigotes lacking centrin displayed impaired *in vitro* survival and, *in vivo*, they failed to induce lesion development *in vivo*. These results show that centrin-deficient *L. braziliensis* displays an attenuated behavior opening the possibility of immunoprophylaxis against New World Tegumentary Leishmaniasis.

## MATERIALS AND METHODS

### Ethics Statement

Female BALB/c mice aged 6–8 weeks were obtained from the IGM/FIOCRUZ animal facility where they were maintained under pathogen-free conditions. All animal experimentation was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation established by the Brazilian Council on Animal Experimentation (CONCEA). The local institutional review board (CEUA) approved all procedures involving animals (CEUA-015/2019-IGM/FIOCRUZ).

### Parasite Culture

*L. braziliensis* promastigotes (MHOM/BR/01/BA788) (De Moura et al., 2005) were maintained in Medium 199 (Sigma-Aldrich) supplemented with 20% heat-inactivated fetal calf serum (FCS), HEPES (40 mM), adenine (0.1 mM), Hemin (5  $\mu$ g/ml), biotin (1  $\mu$ g/ml) and antibiotics (penicillin 100 IU/ml and streptomycin 100  $\mu$ g/ml) (all from Thermo Scientific) at 26°C. *L. braziliensis* transfectants expressing Cas9 and T7 RNA polymerase (*LbCas9T7*) or *centrin*<sup>-/-</sup> mutants (*LbCen*<sup>-/-</sup>) were maintained in medium supplemented with hygromycin (100  $\mu$ g/ml), or neomycin (50  $\mu$ g/ml) and puromycin (10  $\mu$ g/ml), respectively. Prior to *in vitro* and *in vivo* infection assays, parasites were incubated in Schneider's insect medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% FCS, 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (100  $\mu$ l/ml) (Thermo Scientific). In *LbCas9T7*, *LbCen*<sup>-/-</sup> and wild-type *L. braziliensis* (*LbWT*) promastigotes, *in vitro* parasite growth was determined by inoculating  $5 \times 10^5$  parasites/ml in supplemented Schneider's medium at 26°C for 6 days. Parasite numbers were counted daily using a hemocytometer. *LbCas9T7*, *LbCen*<sup>-/-</sup> and wild-type *L. braziliensis* (*LbWT*) axenic amastigotes were prepared transferring late promastigotes to a modified culture medium (20% FBS; pH 5.5) at 34°C, according to Teixeira et al. (2002). *In vitro* parasite growth was determined by inoculating  $1 \times 10^6$  parasites/ml in supplemented Schneider's medium at 34°C for 5 days. Amastigote aggregates were disrupted by passing through a 25-gauge needle before counting in a hemocytometer.

### In Silico Identification of Putative *L. braziliensis* Centrin

The sequence of the putative *L. braziliensis* centrin gene (*LbrM.22.1290*) (*L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2903) including flanking regions (3' and 5' FRs) was retrieved from



TriTrypDB (<http://tritrypdb.org>) and this sequence was chosen because it presented the highest homology with previously characterized *L. donovani* centrin gene (GenBank—AF406767). The derived amino acid sequences from *L. donovani* and *L. braziliensis* centrin were aligned using the ClustalW program in the BioEdit software package (Version 7.0.4.1) and Geneious version 9.0 (<https://www.geneious.com>). The three-dimensional structure of putative centrin was predicted by the Phyre2 server using all default parameters. This server predicts 3D models using a single submitted protein sequence by gathering homolog sequences from a large non-redundant database, followed by secondary protein structure prediction [Hidden Markov Model (HMM)] (Kelley et al., 2015). The predicted 3D structure was visualized using the UCSF Chimera program (Pettersen et al., 2004). The quality of the predicted model was validated by Ramachandran Plot, generated using the PROCHECK server (Laskowski et al., 1996).

### Generation of *L. braziliensis* Overexpressing Cas9 and T7 (LbCas9T7)

Wild-type *L. braziliensis* promastigotes (*LbWT*) in mid-log phase ( $10^8$  cells/ml) were placed in Tb-BSF electroporation buffer (Schumann Burkard et al., 2011) and mixed with plasmid pTB007 (Beneke et al., 2017) (~5 µg) carrying the humanized *Streptococcus pyogenes* Cas9 nuclease gene (hSPCas9) and T7 RNA Polymerase (T7 RNAP) in a pre-chilled 2 mm electroporation cuvette (SIGMA). Electroporation was performed using a Bio-Rad Gene Pulser Xcell System followed by subsequent clonal selection in M199 medium supplemented with hygromycin (50 µg/ml) in 96-well cell culture plates. Cultures were monitored for 2–4 weeks and emerging transfectants were further expanded in selective medium at 100 µg/ml hygromycin.

To confirm Cas9 expression, cell lysates were prepared with  $1 \times 10^7$  mid-log parasites using NuPAGE sample reducing agent and LDS Buffer (Invitrogen) following manufacturer's protocol. *LbWT* and *LbCas9T7* cell lysates were separated on NuPAGE mini protein gel (4–12%) (Invitrogen) and subsequently transferred onto a nitrocellulose membrane using the iBLOT system (Invitrogen). Membranes were blocked in 10% non-fat milk in PBS-T (Tween 20—0.1%) at 4°C, overnight. Following PBS-T washes, membranes were probed with mouse anti-Cas9 antibody (Clone 7A9, BioLegend); washed and probed with goat anti-mouse IgG-HRP (Clone Poly4053, BioLegend). Bound conjugates were detected by ECL western blotting reagents (Thermo Scientific) visualized under ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).

### Generation of Centrin-Deficient *L. braziliensis* (LbCen<sup>-/-</sup>)

Gene deletion was performed as previously described (Beneke et al., 2017; Beneke and Gluenz, 2019). Briefly, commercially synthesized oligonucleotides were used to generate the DNA templates for target-specific single guide (sg) RNA (3' and 5') containing the T7 promoter, the 20nt sgRNA target sequence and a sequence complementary to the sgRNA scaffold. Primers

for the amplification of donor DNA containing the neomycin phosphotransferase II (NEO) and puromycin N-acetyltransferase (PAC) genes with target-specific 30nt homology flanks and G00 primer (sgRNA scaffold) were designed using LeishGEdit ([www.leishgedit.net](http://www.leishgedit.net)) (Beneke et al., 2017) (**Supplemental Table 1**) and commercially synthesized. To amplify the sgRNA template DNA, a mixture containing G00 primer (100 µM), high fidelity polymerase (Invitrogen), dNTPs and MgCl<sub>2</sub> was prepared, then added to the diluted sgRNA primers (4 µM) and placed in separate tubes containing 5' sg RNA and 3' sg RNA primers (pre-frozen at -80°C for 10 min). PCR was performed on a preheated block under the following cycling conditions: 98°C for 30 s (1 cycle), 98°C for 10 s, 60°C for 30 s, 72°C for 15 s (35 cycle), 72°C for 10 min (1 cycle).

PAC and NEO donor DNA were amplified using the pTPuro or Neo plasmid templates, respectively (Beneke et al., 2017). Briefly, 0.5 µl (30 ng/µl stock) of each template was mixed with 8 µl of diluted forward and reverse primers (10 µM) and frozen at -80°C for at least 10 min. A master mix containing high-fidelity polymerase (Invitrogen), DMSO, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, and nuclease-free water was prepared and added to the primer template mix. PCR was performed on a preheated block under the following cycle conditions: 98°C for 5 min (1 cycle), 98°C for 30 s, 65°C for 30 s, 72°C for 2 min (40 cycles), 72°C for 7 min (1 cycle). The amplification products of sgRNA templates and donor DNA were further confirmed by running samples on 2 and 1% agarose gel, respectively.

To generate *LbCen<sup>-/-</sup>*, transfection of Cas9 and T7 RNAP-expressing *L. braziliensis* (*LbCas9T7*) was performed as previously described (Beneke and Gluenz, 2019), with minor modifications. A mixture containing sgRNA templates and donor DNA was heated at 94°C for 5 min prior to transfection, mixed with 150 µl mid-log Cas9 T7-expressing *L. braziliensis* resuspended in transfection buffer (Tb-BSF;  $10^8$  cells/ml) and transferred to a prechilled 2 mm cuvette. Transfection was performed using two pulses and the X-001 program on a Nucleofector™ 2b Device (Lonza Biosciences, USA). Transfectants were transferred to 5 ml M199 medium in a 25 cm<sup>2</sup> flask and incubated for 24 h at 26°C. *LbCen<sup>-/-</sup>* clones were selected from plates containing M199 supplemented with 50 µg/ml of neomycin (PROMEGA) and 10 µg/ml of puromycin (SIGMA).

Following transfection and clonal selection, total genomic DNA from *LbWT*, *LbCas9T7* and *LbCen<sup>-/-</sup>* was isolated using PureLink Genomic DNA Mini Kit, according to manufacturer's instructions (Invitrogen). Centrin deletion and integration of antibiotic resistance markers was confirmed by PCR using specific primers, designed using Geneious software (Biomatters) (**Supplemental Table 1**). PCR conditions employed were: (i) Centrin ORF detection: 94°C for 3 min (1 cycle), 94°C for 30 s, 53°C for 30 s, 72°C for 1 min (40 cycle), 72°C for 7 min (1 cycle). (ii) Neomycin and (iii) puromycin resistance cassettes: 94°C for 3 min (1 cycle), 94°C for 30 s, 55°C for 30 s, 72°C for 1 min (40 cycles), 72°C for 7 min (1 cycle). Amplicons were separated on 2% agarose gel and visualized using ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare).



## Genome Wide Analysis of *L. braziliensis* Overexpressing Cas9 and T7 (LbCas9T7) and of Centrin-Deficient *L. braziliensis* (LbCen<sup>-/-</sup>)

To confirm Cas9-mediated centrin deletion, whole genome sequencing (WGS) was performed in the LbCas9T7 and LbCen<sup>-/-</sup> clones using an Illumina HiSeq2000 sequencer, with ~60× coverage, paired-end read libraries with a 100 bp read size and 350 bp insert size. FastQC (Andrews, 2010) and Trimmomatic (Bolger et al., 2014) were used for read quality control and adapter sequence removal, respectively. BWA-mem (Li and Durbin, 2009) was used to map the processed reads to the *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 v45 reference genome, obtained from TriTrypDB (Aslett et al., 2010). Reads with a mapping quality score <30 were discarded using SAMtools (Li et al., 2009). Confirmation of centrin deletion was performed based on read depth estimations and visualized via the Integrative Genomics Viewer (IGV) tool (Robinson et al., 2011) using bam files containing the aligned reads and the *L. braziliensis* MHOMBR75M2904 v45 General Feature Format (GFF), available at TriTrypDB (Aslett et al., 2010). The raw Illumina sequencing reads were deposited under the Bioproject accession number PRJNA763382.

To further confirm LbrM.22.1290 deletion and estimate the potential for off-target genomic alterations, the read depth of each *L. braziliensis* gene was estimated and normalized in the LbCas9T7 and LbCen<sup>-/-</sup> read libraries by the genome coverage using BedTools (Quinlan and Hall, 2010), and in-house Perl scripts. The absolute LbCas9T7 and LbCen<sup>-/-</sup> read depth difference of each gene was estimated using the R program (<https://www.R-project.org/>) and visualized using ggplot2 (Wickham, 2016). All genes with an absolute difference higher than 0.5 genome coverage, which corresponds to approximately one copy per haploid genome, were reported.

## Microscopy

Axenic LbWT, LbCas9T7 and LbCen<sup>-/-</sup> amastigotes were generated as described elsewhere (Teixeira et al., 2002). After 96 h in culture, axenic amastigote aggregates were disrupted and the cells then washed in PBS, fixed in 4% paraformaldehyde, washed again in PBS and resuspended in DAPI solution (1 µg/ml, Molecular Probes) for 30 min. Parasites were washed twice in PBS and resuspended in 100 µl of PBS. Parasites were centrifuged, stained and visualized under a TCS SP8 scanning laser confocal system (Leica). Alternatively, axenic amastigotes (48 h of culture) were fixed in Karnovsky fixative (2% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4), washed in cacodylate buffer and then post-fixed with 1% osmium tetroxide (OsO<sub>4</sub>) in 0.1 M sodium cacodylate buffer. Samples were mounted on poly-Lysine-coated coverslips, and then dehydrated in an ascending ethanol series (30, 50, 70, 90, and 100%). Finally, samples were critical-point dried in CO<sub>2</sub>, mounted on stubs, coated with gold (20–30 nm) and visualized by scanning electron microscopy (SEM). Axenic amastigotes were also evaluated by Transmission Electron Microscopy (TEM). After 48 h, axenic amastigotes (LbWT, LbCas9T7, and LbCen<sup>-/-</sup>) were washed in PBS, fixed and then post-fixed as described above.

Samples were dehydrated in an acetone series (30, 50, 70, 90, and 100%) and embedded in Poly/Bed<sup>®</sup> 812 resin. Ultrathin sections were obtained and mounted on 300-mesh grids, then stained in 5% uranyl acetate and lead citrate. Cells were analyzed at Jeol JEM 1230 transmission electron microscope and Jeol JSM 6390LV scanning electron microscope.

## In Vitro Infection

Primary macrophages obtained from mouse bone marrow were suspended in RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 10% FBS, 2.5% HEPES, 100 IU/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (all from Invitrogen) and seeded at 3 × 10<sup>5</sup> cells/500 µl/coverslip per well on 24-well plates. Monolayers of adherent macrophages formed on the coverslips were washed to remove any non-adherent cells and then exposed to stationary phase LbWT and LbCen<sup>-/-</sup> at a 10:1 parasite/host cell ratio (clone #4), i.e., 3 × 10<sup>6</sup>/500 µl in RPMI 1640 + 10% FBS/well. The plates were incubated at 35°C under 5% CO<sub>2</sub> for 24 h, and then coverslips were extensively washed to remove any non-internalized *Leishmania*. At different time periods after parasite exposure, coverslips were methanol-fixed and stained with hematoxylin and eosin (H&E). *Leishmania* loading or macrophage infection was assessed by scanning 200 macrophages in each sample for the enumeration of cells with and without *Leishmania*; the total number of intracellular parasites was counted by optical microscopy.

## In Vivo Infection

BALB/c mice (n = 10) were inoculated with 2 × 10<sup>5</sup> LbWT or LbCen<sup>-/-</sup>. Parasites were inoculated into the left ear dermis in 10 µl PBS using a 27G needle. Parasite loads were determined at different time points by limiting dilution analysis in samples obtained from mouse ears, draining lymph nodes and spleen as previously described (Novais et al., 2013). Lesion development was monitored weekly by measuring the thickness of the ear using a digital caliper (Thermo).

## Statistical Analysis

Comparisons between two groups were performed using Mann-Whitney (non-parametric t-test), and among three or more groups using the Kruskal-Wallis test. Analyses were conducted using Prism software (V.8.0, GraphPad) and p-values ≤0.05 were considered significant. Data are presented as mean ± standard deviation.

## RESULTS

### In Silico Characterization of *L. braziliensis* Putative Centrin Gene (LbrM.22.1290)

A BLASTP search in the TriTrypDB database revealed the presence of a putative centrin gene in *L. braziliensis* (LbrM.22.1290) showing homology to previously characterized *L. donovani* centrin [GenBank—AF406767; (Selvapandiyan et al., 2001)]. The putative *L. braziliensis* centrin is 450 nucleotides (nt) long (including stop codon; *orf* -447 bp) and encodes a protein containing 149 amino acids (AAs) (Supplemental Figure 1A). Pairwise amino acid alignment between LbrM.22.1290 and *L. donovani* centrin indicated high identity (94.63%) and high



degree of conservation among the calcium binding sites (EF-hand 1 and 4; alpha helical stretch) (Supplemental Figure 1B).

The amino acid sequence of *LbrM.22.1290* was used to predict the *in silico* three-dimensional structure using the solved structure of *Trypanosoma brucei* centrin 4 (*Tb927.7.3410*). Again, the amino acid sequences in *LbrM.22.1290* and *Tb927.7.3410* showed high sequence homology (Figure 1A). Molecular modeling using 100% of *LbrM.22.1290* (149 AAs) allowed prediction of the protein structure with 99.9% confidence (Figure 1B). The stereochemical quality of the modeled structure was validated by Ramachandran plot analysis, revealing that 93.1 and 6.9% of the residues were in the most favored and additionally allowed regions, with no residues in disallowed regions (Figure 1C). These *in silico* analyses suggest that the putative centrin gene in *L. braziliensis* is a structural homolog of *T. brucei* centrin 4 and centrin 4 is highly conserved across *Leishmania* and *Trypanosoma* spp.

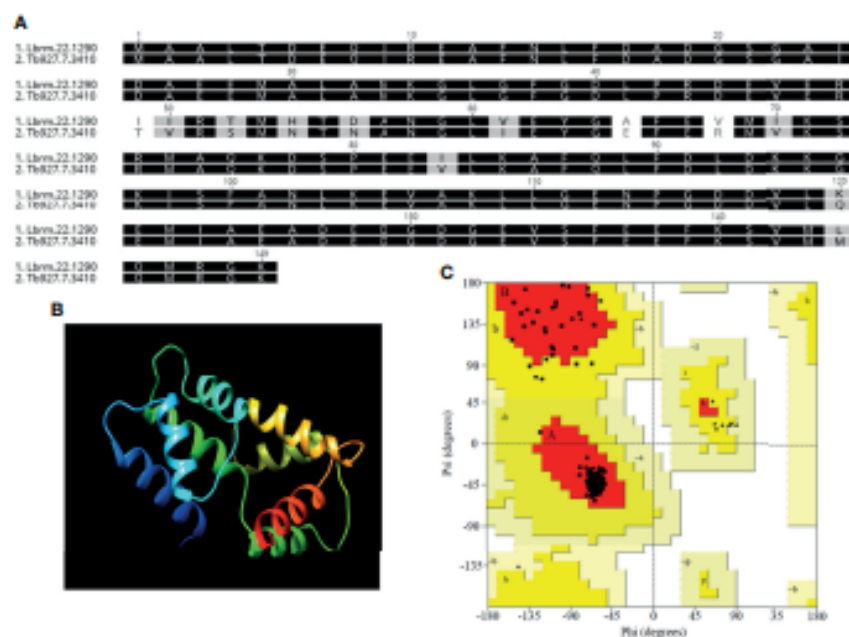
### CRISPR Cas9-Mediated Deletion of Centrin in *L. braziliensis*

Our strategy consisted in first generating an *L. braziliensis* line to co-express Cas9 and T7 RNAP (*LbCas9T7*). Following transfection of mid-log *LbWT* promastigotes with pTB007, carrying genes for Cas9 and T7 RNAP, transfectants were selected under antibiotic pressure (HYG) and resulting clones were grown in selective medium. Western blot analysis confirmed successful expression of the Cas9 protein (162 kDa) (Figure 2A). One resulting clone (*LbCas9T7*) was selected for deletion of

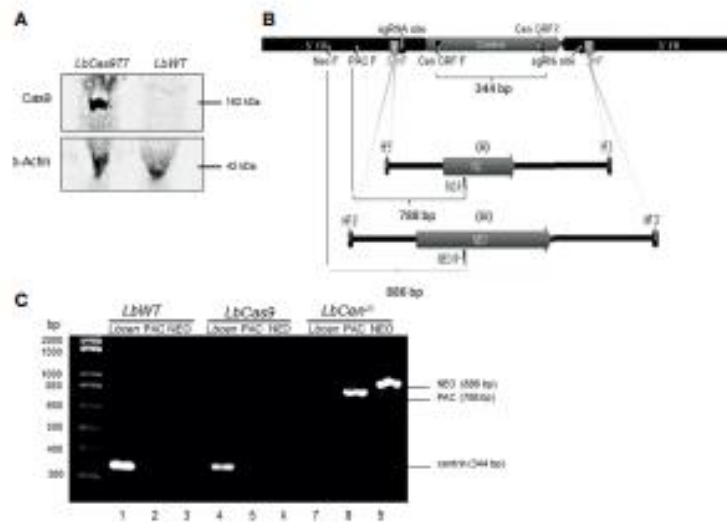
centrin ORF. Next, *L. braziliensis* centrin alleles were targeted with PAC and NEO donor DNA cassettes, each flanked by 30 nt homologous sequences. Primers were designed for the identification of centrin<sup>-/-</sup> *L. braziliensis* (*LbCen*<sup>-/-</sup>) line by PCR (Figure 2B and Supplemental Table 1). *LbCas9T7* parasites were first transfected with the two donor DNA constructs (PAC and NEO) plus two sgRNAs (DNA) templates targeting the 5' and 3' FRs of the centrin ORF. Following transfection and serial limiting dilution, clonal selection under antibiotic pressure (puromycin and neomycin) yielded six clones, which were further expanded. Centrin deletion was confirmed by PCR as shown by the absence of the centrin amplicon (344 bp *orf* fragment) paralleled by presence of amplicons specific for PAC (788 bp) and NEO (886 bp), indicating the successful integration of both donor cassettes (Figure 2C). Additionally, PCR products spanning the integration sites were Sanger-sequenced, confirming integration of both donor cassettes (Supplemental Figure 2). These data confirm the successful use of the LeishGEdit for deletion of the putative centrin gene (*LbrM.22.1290*) in *L. braziliensis*.

### Genome Wide Analysis of Centrin<sup>-/-</sup> and Cas9-T7-Overexpressing *L. braziliensis*

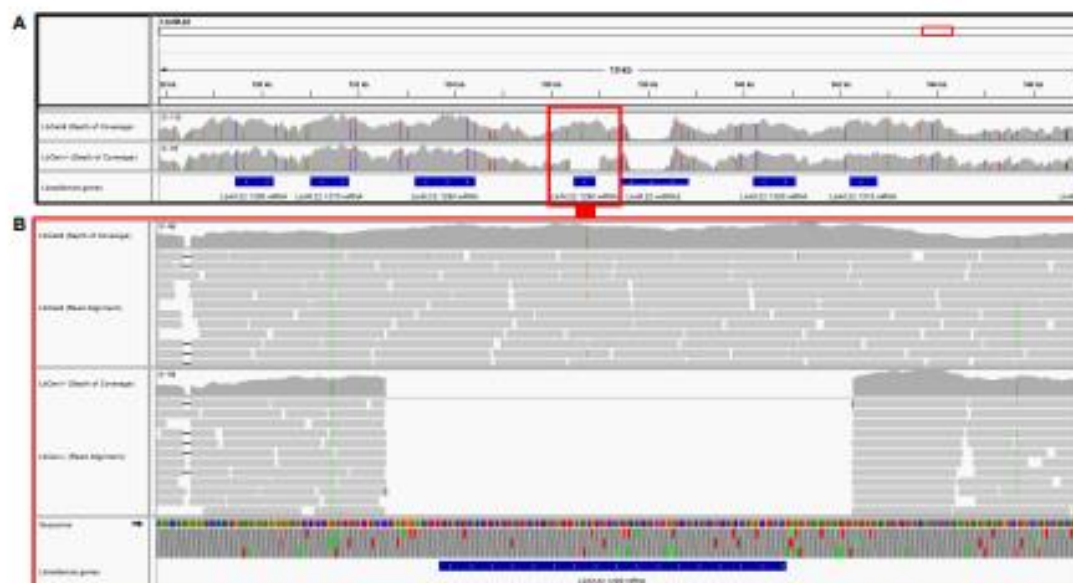
Next, we performed whole genome sequencing of *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> to verify the targeted deletion of *L. braziliensis* centrin in *LbCen*<sup>-/-</sup>. Initially, the read depth across the genome of *LbrM.22.1290* in both *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> was estimated and the only relevant alteration was the expected absence of coverage in the centrin gene region in *LbCen*<sup>-/-</sup> (Figure 3).



**FIGURE 1** | Homology modeling of the derived protein sequence from putative *L. braziliensis* centrin (*LbrM.22.1290*). **(A)** Amino-acid sequence alignment of *L. braziliensis* (*LbrM.22.1290*) and *Trypanosoma brucei* (*Tb927.7.3410*) centrin used as the template for the structure prediction with 99.9% confidence and 100% sequence coverage. **(B)** Three-dimensional structure of the predicted protein and **(C)** Ramachandran analysis of the predicted *L. braziliensis* centrin: Red: most favored regions, Yellow: additional allowed, generously allowed regions and Light Yellow- disallowed regions.



**FIGURE 2 |** Generation of *centrin*<sup>-/-</sup> *L. braziliensis*. **(A)** Western blot of whole cell lysates probed with anti-Cas9 antibody and anti- $\beta$ -Actin. *LbWT*, parental cell line, *LbCas9T7*, *L. braziliensis* expressing Cas9 and T7. **(B)** *In silico* representation of the CRISPR-Cas9 based deletion of the *L. braziliensis* putative centrin gene (i) centrin genomic locus indicating sgRNA (guide RNA) binding sites at both 5' and 3' UTRs, 3' & 5' HF (homology flank) or flanking regions (30 bp) and primers for the correct integration (flag). PAC and NEO forward primers (PAC F and NEO F), Cen ORF forward and reverse (CEN ORF F and CEN ORF R) diagnostic primers for detection of centrin gene (amplification of 344 bp fragment). (ii) & (iii) Donor cassettes containing PAC and NEO antibiotics markers, indicating diagnostic reverse primers (PAC R and NEO R) and size of expected amplicons for the confirmation of correct integration of the cassettes (788 and 888 bp, respectively). **(C)** PCR analysis of generated cell lines: test for the presence of the Centrin in *Lb WT* parental line and in *LbCas9T7*; test for the integration of the PAC and NEO-resistance genes in *LbCen*<sup>-/-</sup>. PCR products were analyzed on a 1% agarose gel.



**FIGURE 3 |** Deletion of the *LbrM.22.1290* centrin gene as confirmed by whole genome sequencing. **(A)** MHOM/BR/75/M2904 *L. braziliensis* chromosome 22 encompassing the 527,855–647,147 region covered by *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> genomic read libraries. Blue boxes represent *L. braziliensis* genes, drawn in scale; *LbrM.22.1290* centrin gene region is highlighted by red box. Gray histograms above the genes represent the read depth in each genomic position for each genomic library, where colored markings denote SNPs in the reads when compared to the reference genome. **(B)** Read mapping in the genomic region encompassing the *LbrM.22.1290* gene. Mapping of individual reads is represented by gray boxes. An expected number of reads mapped into the *LbrM.22.1290* centrin gene region in the *LbCas9T7* isolate, whereas no read from *LbCen*<sup>-/-</sup> library mapped into this gene.

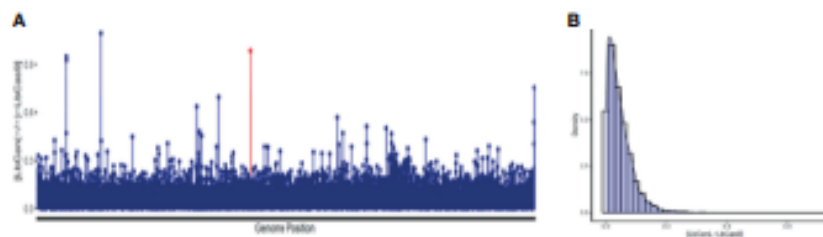


These data show targeted centrin deletion and do not indicate translocation to another genomic locus. Also, allele frequency analysis of heterozygous SNPs revealed that, different from the *L. braziliensis* M2904 reference genome which essentially triploid (Rogers et al., 2011), the *L. braziliensis* BA788 genome is overall diploid, with chromosome 22 that harbors centrin gene having two copies (data not shown). Therefore, the successful generation of centrin knockout was achieved with two resistance markers. To evaluate the potential occurrence of Cas9-induced deletions or duplications in other genomic regions that could have an impact on phenotype, the read depth of all *L. braziliensis* MHOMBR75M2904 genes normalized by the genome coverage was estimated and compared, for both *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> (Figure 4). Most differences in read depth ranged from “0” to “0.3”, suggesting minimal fluctuations in the read libraries that are unlikely to result in a mutant-specific phenotype (Figures 4A, B). Read depth differences larger than 0.5 were only observed in 12 genes, all of which were multicopy genes. These 12 occurrences corresponded to five multicopy genes with a basal coverage higher than “3”, such as amastins, zinc-transporters and

metallopeptidases. In addition, five were multi-copy structural RNAs, e.g., snoRNA and snRNA. One was a 40S ribosomal protein (LbrM.30.0750), and the other the expected centrin gene, *LbrM.22.1290* (Table 1). Taken together, these results do not indicate the presence of off-target deletions or duplications in the genome of the newly generated *LbCen*<sup>-/-</sup>.

### Phenotypic Characterization of Centrin-Deficient *L. braziliensis*

Next, we evaluated the phenotype of *LbWT*, *LbCas9T7*, and *LbCen*<sup>-/-</sup>. Comparative promastigote growth curves showed similar proliferation rates over a 7-day time course (Figure 5A). Promastigotes (96 h cultures) were stained with DAPI and examined by confocal microscopy. *LbWT*, *LbCas9T7*, and *LbCen*<sup>-/-</sup> promastigotes did not exhibit any morphological changes differences and all three lines presented mostly single nuclei (Figure 5B). *LbCen*<sup>-/-</sup> axenic amastigotes, however, exhibited a significantly deficient growth, starting at 24 h and persisting over a 5-day time course, when compared to *LbWT* and *LbCas9T7* axenic amastigotes (Figure 5C). As expected, *LbCen*<sup>-/-</sup> amastigotes had multiple nuclei and kinetoplasts

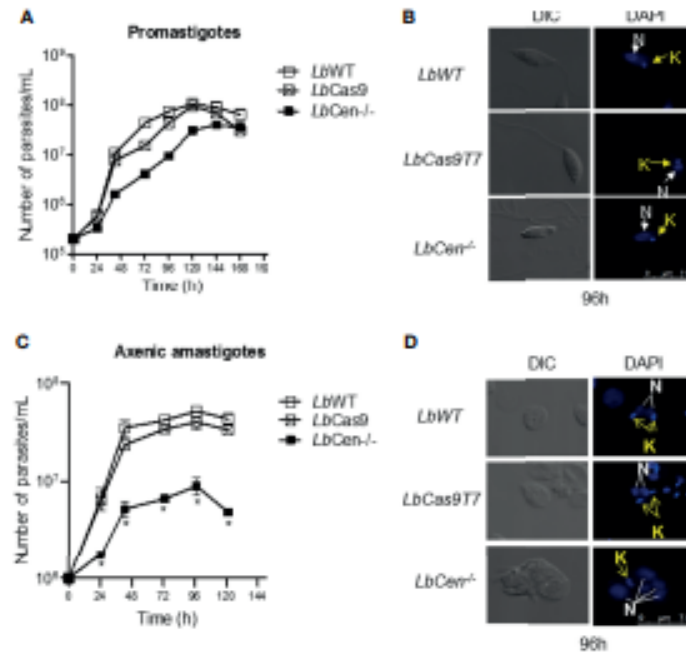


**FIGURE 4** | Read depth coverage (RDC) alterations in *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup>. **(A)** Absolute values of the RDC difference from *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> genomic libraries in each *L. braziliensis* gene normalized by genome coverage. Each line of the X axis corresponds to a gene, ordered by its genome position from the smallest to the largest chromosome. The Y axis represents the difference of RDC absolute values for each gene from *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> lines. The *LbrM.22.1290* centrin gene is highlighted in red. **(B)** Density plot of the RDC differences in *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> lines. The X axis corresponds to the difference of RDC absolute values of each gene from *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> lines, the Y axis represents the distribution of occurrence of these values. Most of the differences are below 0.3.

**TABLE 1** | RDC differences between *LbCas9T7* - *LbCen*<sup>-/-</sup>. For a total of 12 genes, *LbCas9*-*LbCen*<sup>-/-</sup> RDC difference is higher than 0.5. From these, eleven correspond to multigene families or structural RNAs, and only one, the centrin *LbrM.22.1290* gene, has the expected read depth coverage of a single copy gene in *LbCas9* line, with RDC value of zero for *LbCen*<sup>-/-</sup> line.

Genes	<i>LbCas9T7</i>	<i>LbCen</i> <sup>-/-</sup>	RDC [ <i>LbCen</i> <sup>-/-</sup> - <i>LbCas9T7</i> ]	Annotation
<i>LbrM.05.snoRNA2</i>	5.3	6.2	0.9	LM5Cs1H1
<i>LbrM.05.snRNA1</i>	5.3	6.2	0.9	spliced_leader_associated_RNA%2C_SLA_RNA
<i>LbrM.10.0480</i>	7.8	6.7	1.0	metallo-peptidase%2C_Clan_MA(M)%2C_Family_MB
<i>LbrM.20.0790</i>	6.4	5.8	0.6	amastin-like_surface_protein%2C_putative
<i>LbrM.20.4290</i>	3.7	4.4	0.7	amastin-like_surface_protein%2C_putative
<i>LbrM.22.1290</i>	0.9	0	0.9	centrin-4%2C_putative
<i>LbrM.28.2110</i>	6.2	5.7	0.6	Zinc_transporter_3%2C_putative
<i>LbrM.30.0750</i>	1.0	1.6	0.5	40S_ribosomal_protein_S30%2C_putative
<i>LbrM.31.0160</i>	3.5	4.0	0.5	parafagellar_rod_protein_1D
<i>LbrM.35.snoRNA2</i>	5.2	5.8	0.5	LM38Cs2H1
<i>LbrM.35.snoRNA5</i>	4.8	5.4	0.5	LM38C2C2
<i>LbrM.35.snoRNA6</i>	5.6	4.9	0.8	LM38C1C1

For a total of 12 genes, difference is higher than 0.5. From these, eleven correspond to multigene families or structural RNAs, and only one, the centrin *LbrM.22.1290* gene, has the expected read depth coverage of a single copy gene in *LbCas9T7* parasite, and RDC value of zero for *LbCen*<sup>-/-</sup> parasite.



**FIGURE 5** | Kinetics of *LbCas9T7* and *LbCen<sup>-/-</sup>* promastigote growth in vitro. **(A)** Promastigote cultures were started at  $5 \times 10^5$  parasites/ml and were maintained at 26 °C for 7 days in supplemented Schneider media. Parasite numbers were determined daily by counting using a hemocytometer. Data is plotted as mean  $\pm$  SEM and is from a representative experiment, performed in triplicate. **(B)** DIC and fluorescent (DAPI) representative micrographs of *LbWT*, *LbCas9T7*, and *LbCen<sup>-/-</sup>* promastigotes after 96 h of culture. **(C)** Axenic amastigote cultures were started at  $1 \times 10^6$  parasites/ml and were maintained at 34 °C for 5 days in supplemented Schneider media, pH 5.5. Parasite numbers were determined daily by counting using a hemocytometer. Data is plotted as mean  $\pm$  SEM, and is from a representative experiment, performed in quadruplicate, \* $p < 0.05$ . **(D)** DIC and fluorescent (DAPI) representative micrographs of *LbWT*, *LbCas9T7*, and *LbCen<sup>-/-</sup>* amastigotes after 96 h of culture.

(Figure 5D). CRISPR-mediated deletion of centrin in *L. braziliensis* yielded a cell line that displayed slower growth at the amastigote stage, with similar morphological changes as those described in *L. donovani* centrin<sup>-/-</sup> mutants (Selvapandiyar et al., 2004).

*LbCen<sup>-/-</sup>* axenic amastigotes (48 h culture) were subjected to morphological analyses by SEM and TEM. SEM results showed the presence of abnormally large cells compared to the normal morphology observed in *LbWT* and *LbCas9T7* (Figure 6A). *LbCen<sup>-/-</sup>* axenic amastigotes (48 h culture) observed under TEM showed prominently large cells with multiple nuclei and/or kinetoplasts, suggesting a defective cytokinesis whereas both *LbWT* and *LbCas9T7* axenic amastigotes did not (Figure 6B). Thus, *LbCen<sup>-/-</sup>* exhibited similar morphology to that described for centrin<sup>-/-</sup> *L. donovani* (Selvapandiyar et al., 2001; Selvapandiyar et al., 2004).

### In Vitro and In Vivo Infectivity of Centrin-Deficient *L. braziliensis*

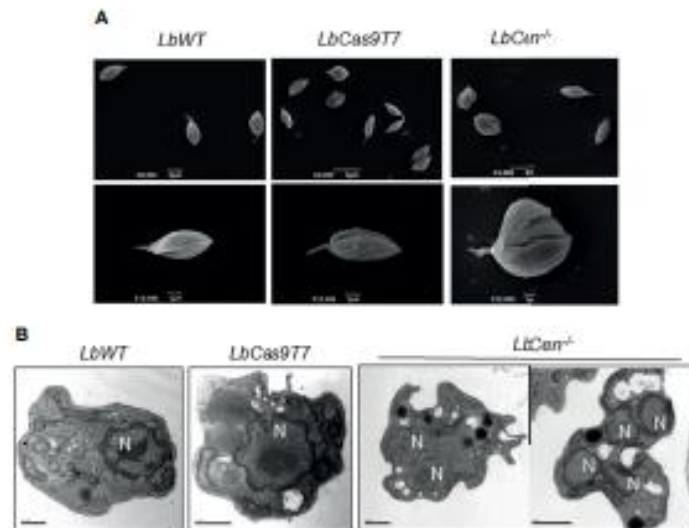
Given the growth arrest (Figure 5C) and the prominent structural alterations (Figure 6) observed in axenic amastigotes, we predicted that *LbCen<sup>-/-</sup>* would also exhibit reduced infectivity in the host cell. A time course analysis of macrophage infection revealed a significant reduction in the percentage of cells infected with *LbCen<sup>-/-</sup>* compared to cells

infected with *LbWT*, as early as 72 h after parasite exposure (Figure 7A). This result was paralleled by a significantly reduced number of amastigotes detected within macrophages at the same time point (Figure 7B). H&E staining of infected cells also confirmed the presence of multiple nuclei in cells infected with *LbCen<sup>-/-</sup>* compared to *LbWT* (Figure 7C). Therefore, CRISPR-Cas9-mediated deletion of centrin impairs the *in vitro* growth of *L. braziliensis*.

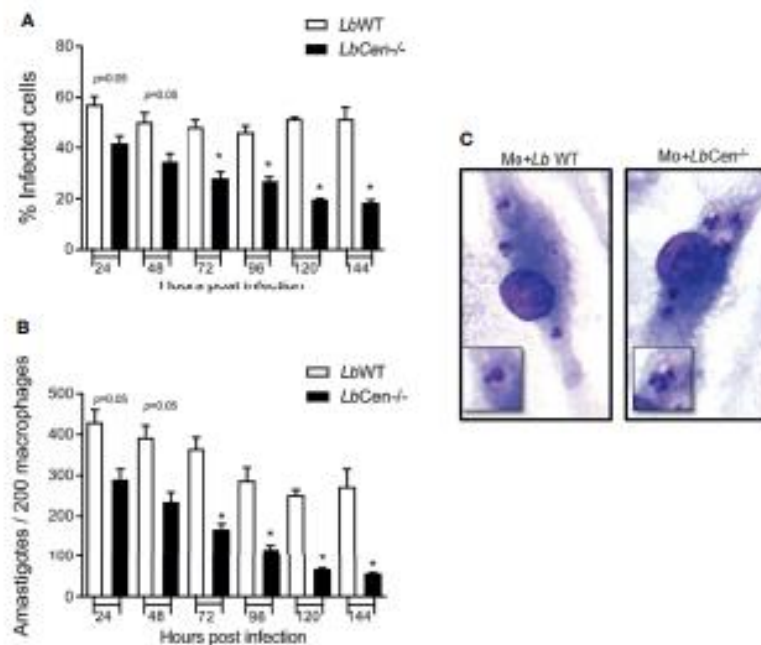
Upon inoculation of *LbCen<sup>-/-</sup>* promastigotes in the ear dermis of BALB/c mice, parasites were detected after four days, at both the inoculation site and in dLNs (Figures 8A and B, respectively). However, *LbCen<sup>-/-</sup>* failed to induce lesion development, differently from mice inoculated with *LbWT*, in which lesions peaked at 4 weeks, then gradually subsided by 10 weeks (Figures 8C). Also, in mice infected with *LbCen<sup>-/-</sup>* promastigotes, parasites were not detected at the inoculation site, dLNs or in the spleen, 6 or 12 weeks post-inoculation (Figures 8D and E, respectively), indicating that *LbCen<sup>-/-</sup>* the impaired *in vitro* growth capacity (Figure 7) is recapitulated *in vivo*.

## DISCUSSION

Since the first report of gene replacement in *Leishmania*, genetic manipulation has proven challenging due to its extensive



**FIGURE 6 |** Ultrastructural analysis of *LbCen*<sup>-/-</sup> axenic amastigotes. *LbWT*, *LbCas9T7*, and *LbCen*<sup>-/-</sup> axenic amastigotes were harvested, fixed and prepared for scanning (A) or transmission electron microscopy (B). Transmission electron micrographs of axenic amastigotes showing the presence of a single nucleus (N) in *LbWT* and in *LbCas9T7* and the presence of multi nuclei in *LbCen*<sup>-/-</sup>. Scale bars, 0.5  $\mu$ m (*LbWT* and *LbCas9T7*); 1  $\mu$ m (*LbCen*<sup>-/-</sup>).

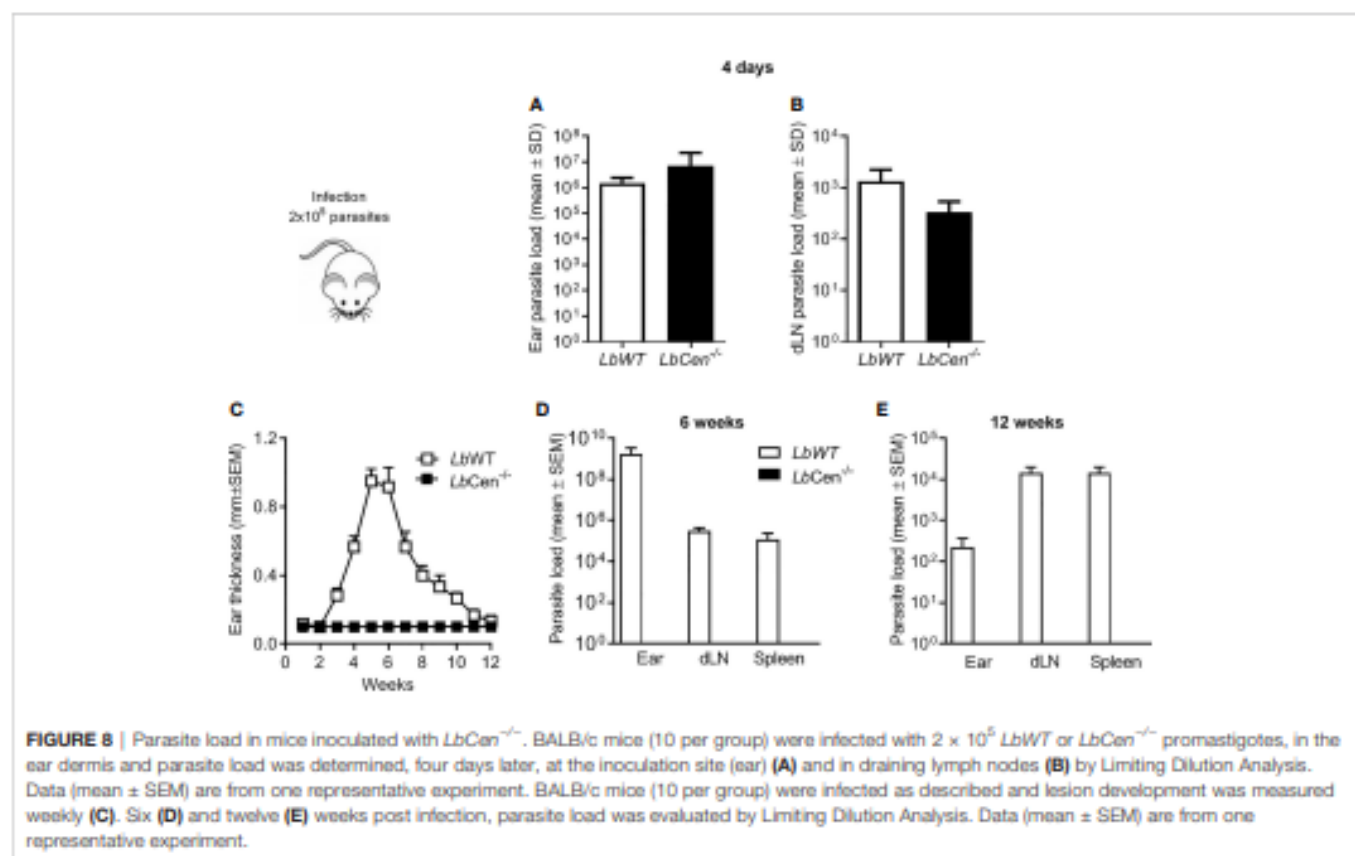


**FIGURE 7 |** Macrophage infection with *LbCen*<sup>-/-</sup>. BMDM were infected with *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup> (10:1, parasite/macrophage ratio) promastigotes for 24 h. Cells were extensively washed and further cultured for 48, 72, 96, 120 or 144 h. Cells were stained with H&E and evaluated for the percentage of infection (A) and the number of amastigotes per 200 macrophages (B) by optical microscopy. (C) Photomicrographs showing infected macrophages at 96 h. Data (mean  $\pm$  SEM) are pooled from four independent experiments, each performed in quadruplicate. \**p* < 0.05.

genomic plasticity (Sterkers et al., 2014; Yagoubat et al., 2020), the presence of multicopy genes and polysomies (Rogers et al., 2011; Laffitte et al., 2016). The use of the functional *L. braziliensis* RNA interference (RNAi) machinery (Peacock et al., 2007; Lye

et al., 2010) also showed off-target effects (Jackson et al., 2003), reinforcing that alternative approaches were necessary to achieve specific gene manipulation in this species. Herein, we used the LeishGedit CRISPR toolbox (Beneke et al., 2017; Beneke and





Gluezn, 2019) to generate a centrin-deficient *L. braziliensis*. Centriins play a fundamental role in centrosome duplication (Wiech et al., 1996) and centrin-deficient *leishmania* display abnormal cytokinesis, leading to the formation of multinucleated cells in axenic and intracellular amastigotes (Selvapandiyan et al., 2004). Centrin-deficient *leishmania* sp. are capable of inducing protection against leishmaniasis (Selvapandiyan et al., 2009; Bhattacharya et al., 2016; Zhang et al., 2020a) and are considered promising candidates for vaccine development.

The LeishGEdit CRISPR toolbox is a cloning-free, PCR-based CRISPR-Cas9 technology, involving the expression of sgRNAs *in vivo* based on T7-RNAP transcription (Beneke et al., 2017). This method allows for rapid and scalable manipulation of the *Leishmania* genome. The LeishGEdit CRISPR toolbox was first applied to *Leishmania* to generate immotile *L. mexicana*, deficient in PF16 (Beneke et al., 2017). Recently, Adai et al. used this tool to generate a *L. braziliensis* cell line deficient in HSP-23 and HSP-100 (Adai et al., 2020), recapitulating the phenotype observed in *L. donovani* HPS23 null mutants and showing the feasibility of CRISPR for the genetic manipulation of *L. braziliensis*. We build on these studies by using the LeishGEdit CRISPR toolbox for the generation of attenuated line of *L. braziliensis*, with the goal of developing an immunoprophylaxis tool against American Tegumentary Leishmaniasis. *L. braziliensis* is known for its genome plasticity (S L. Figueiredo de Sá et al., 2019; Van Den Broeck et al., 2020). It is also the most biologically divergent *Leishmania* species (Peacock et al., 2007),

causing a spectrum of clinical manifestations (Burza et al., 2018), that include mucosal and disseminated leishmaniasis, and accounting for the majority of CL cases in the Americas (David and Craft, 2009).

Centriins are calcium-binding cytoskeletal proteins involved in the centrosome duplication in eukaryotes (Salisbury, 1995; Salisbury et al., 2002). Centrin deletion using the LeishGEdit CRISPR toolbox was performed in a *L. braziliensis* clinical isolate (MHOM/BR/00/BA788) (De Moura et al., 2005) that does not harbor *Leishmania* RNA Virus (LRV1) (F. Novais, personal communication). After generating an *L. braziliensis* line expressing Cas9 and T7 RNAP, we performed deletion of both centrin alleles which were replaced by the neomycin and puromycin selectable markers. This was a different approach than that initially used to delete centrin in *L. donovani*, in which the mutant was generated by homologous recombination of centrin alleles (Selvapandiyan et al., 2001). Whole genome sequencing of *L. donovani* centrin<sup>-/-</sup> parasites revealed off-target deletions encompassing up to 6,900 bp in non-contiguous loci on several chromosomes, and also coding sequences (Gannavaram et al., 2017). Herein, whole genome sequencing of *LbCas9T7* and *LbCen*<sup>-/-</sup> confirmed the specific deletion of *LbM22.1290* centrin locus in *LbCen*<sup>-/-</sup> mutant and no sign of translocation to other genomic location. Our analysis also does not suggest off-target effects.

Centrin-deficient *L. donovani* mutants do not replicate at the intracellular amastigote stage and parasites are selectively

arrested, resulting in multinucleated parasites (Selvapandiyan et al., 2004). We corroborate these findings as *LbCen*<sup>-/-</sup> axenic amastigotes grow at a slower rate compared *LbWT* and, similar to *L. donovani*, present multi-nuclei (Selvapandiyan et al., 2004; Selvapandiyan et al., 2007). Further ultrastructural analyses confirmed that the morphological changes observed in *LbCen*<sup>-/-</sup> amastigotes were not present in WT counterparts or in *LbCas9T7*. As in centrin<sup>-/-</sup> *L. donovani*, *LbCen*<sup>-/-</sup> presents pleomorphic and abnormally large cells, failed cytokinesis which, collectively, result in cell death (Selvapandiyan et al., 2004). With regards to survival in the host cell, a time course analysis showed that the parasite load of *LbCen*<sup>-/-</sup>-infected macrophages is significantly lower compared to cells infected with wild type *L. braziliensis*. The number of parasites internalized comparing *LbCen*<sup>-/-</sup> and *LbWT*, was similar indicating that centrin-deficiency does not alter entry capacity into the host cell (data not shown). Overall, we confirm that centrin deficiency in *L. braziliensis* also impairs survival in the host cell.

Centrin<sup>-/-</sup> *L. donovani* has been largely explored as an immunoprophylaxis tool. Upon *in vivo* infection, centrin<sup>-/-</sup> *L. donovani* was rapidly and completely cleared from the spleen and liver of mice (Selvapandiyan et al., 2009). In hamsters, parasite burden was also lower in the spleen and undetectable in the liver, indicating safety of this attenuated line (Selvapandiyan et al., 2009). Centrin<sup>-/-</sup> *L. braziliensis* recapitulates these findings as parasites are detected at an early time point (4 days) after inoculation into the ear dermis of mice but, later on, parasites are cleared. Thus, the impaired survival of *LbCen*<sup>-/-</sup> reported *in vitro* is also observed *in vivo*, confirming the attenuated infection profile. Indeed, BALB/c mice inoculated *LbCen*<sup>-/-</sup> failed to develop lesions throughout the course of experimentation, indicating that safety of this attenuated cell line, at least in an immunocompetent host.

Development of an effective prophylactic vaccine is of utmost importance to control leishmaniasis. Comparatively to *L. major*, however, *L. braziliensis* remains largely unexplored with regards to vaccine candidates, despite its importance as causative agent of mucosal and disseminated leishmaniasis. Although, centrin-deficient *L. donovani* protected against *L. braziliensis* in a mouse model (Selvapandiyan et al., 2009), whether this extends to the clinical spectrum of diseases caused by *L. braziliensis* remains to be determined. Moreover, vaccination with soluble *L. major* promastigote exogenous antigens did not protect against *L. braziliensis* infection (Tonui and Titus, 2007) nor did immunization with highly conserved leishmanial antigens (Salay et al., 2007). These results indicate that alternative strategies for inducing protection against *L. braziliensis* remain to be pursued. We build on existing literature by developing a centrin-deficient *L. braziliensis* cell line that shows attenuated behavior *in vitro* and *in vivo*. Future studies will address the capability of this cell line to confer protection against CL caused by *L. braziliensis*, namely, its ability to induce a poly-functional Th1 cellular response (Zhang et al., 2020a).

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repository and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, PRJNA763382.

## ETHICS STATEMENT

All animal experimentation was conducted in accordance with Guidelines for Animal Experimentation established by the Brazilian Council on Animal Experimentation (CONCEA). The local institutional review board (CEUA) approved all procedures involving animals (CEUA-015/2019-IGM/FIOCRUZ).

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

RS, FA-R, CF, JR-C, LM, PB, and SV performed experiments and analyzed data. RS, FA-R, DB, TB and CO drafted the manuscript. All authors listed have made a substantial, direct, and intellectual contribution to the work and approved it for publication.

## FUNDING

This work was supported by grants from the IGM-Fiocruz Bahia and the Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB). RS was supported by a travel grant from the Global Challenge Research Fund (GCRF), UK to participate at the 2nd Advanced School in Genetic Manipulation of Parasitic Protozoa, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil. DB and CO are senior researchers at CNPq. LM received a fellowship from the CNPq. RS, FA-R, PB, and SV received a fellowship from the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. TB was supported by an MRC PhD studentship (15/16\_MSD\_836338).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Gabriela Duarte for the Technical Assistance. We thank Rede de Plataformas Tecnológicas FIOCRUZ—P05-011 for image acquisition. We also thank Dr. Eva Gluenz, University of Glasgow, for generously providing plasmids and for comments and suggestions on the manuscript.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.790418/full#supplementary-material>



## REFERENCES

- Adaui, V., Kröber-Boncardo, C., Brinker, C., Zirpel, H., Sellau, J., Arévalo, J., et al. (2020). Application of Crispr/Cas9-Based Reverse Genetics in *Leishmania Braziliensis*: Conserved Roles for Hsp100 and Hsp23. *Genes* 11, 1–24. doi: 10.3390/genes11101159
- Andrews, S. (2010). FASTQC. A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data, 2010.
- Aslett, M., Aurrecochea, C., Berriman, M., Brestelli, J., Brunk, B. P., Carrington, M., et al. (2010). TriTrypDB: A Functional Genomic Resource for the Trypanosomatidae. *Nucleic Acids Res.* 38, D457–D462. doi: 10.1093/nar/gkp851
- Baker, N., Catta-Preta, C. M. C., Neish, R., Sadlova, J., Powell, B., Alves-Ferreira, E. V. C., et al. (2021). Systematic Functional Analysis of *Leishmania* Protein Kinases Identifies Regulators of Differentiation or Survival. *Nat. Commun.* 12, 1244. doi: 10.1038/s41467-021-21360-8
- Beneke, T., Demay, F., Hookway, E., Ashman, N., Jeffery, H., Smith, J., et al. (2019). Genetic Dissection of a *Leishmania* Flagellar Proteome Demonstrates Requirement for Directional Motility in Sand Fly Infections. *PLoS Pathog.* 15, e1007828. doi: 10.1371/journal.ppat.1007828
- Beneke, T., and Gluenz, E. (2019). LeishGEdit: A Method for Rapid Gene Knockout and Tagging Using CRISPR-Cas9. *Methods Mol. Biol.* 1971, 189–210. doi: 10.1007/978-1-4939-9210-2\_9
- Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J., and Gluenz, E. (2017). A CRISPR Cas9 High-Throughput Genome Editing Toolkit for Kinetoplastids. *R. Soc. Open Sci.* 4, 170095. doi: 10.1098/rsos.170095
- Bhattacharya, P., Dey, R., Dagur, P. K., Joshi, A. B., Ismail, N., Gannavaram, S., et al. (2016). Live Attenuated *Leishmania Donovanii* Centrin Knock Out Parasites Generate Non-Inferior Protective Immune Response in Aged Mice Against Visceral Leishmaniasis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 10, e0004963. doi: 10.1371/journal.pntd.0004963
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A Flexible Trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi: 10.1093/bioinformatics/btu170
- Burza, S., Croft, S. L., and Boelaert, M. (2018). Leishmaniasis. *Lancet* 392, 951–970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2
- Cruz, A. K., Titus, R., and Beverley, S. M. (1993). Plasticity in Chromosome Number and Testing of Essential Genes in *Leishmania* by Targeting. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 1599–1603. doi: 10.1073/pnas.90.4.1599
- Damasceno, J. D., Reis-Cunha, J., Crouch, K., Beraldi, D., Lapsley, C., Tosi, L. R. O., et al. (2020). Conditional Knockout of RAD51-Related Genes in *Leishmania Major* Reveals a Critical Role for Homologous Recombination During Genome Replication. *PLoS Genet.* 16, e1008828. doi: 10.1371/journal.pgen.1008828
- Damianou, A., Burge, R. J., Catta-Preta, C. M. C., Geoghegan, V., Nieves, Y. R., Newling, K., et al. (2020). Essential Roles for Deubiquitination in *Leishmania* Life Cycle Progression. *PLoS Pathog.* 16, e1008455. doi: 10.1371/journal.ppat.1008455
- David, C. V., and Craft, N. (2009). Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Dermatol. Ther.* 22, 491–502. doi: 10.1111/j.1529-8019.2009.01272.x
- De Moura, T. R., Novais, F. O., Oliveira, F., Clarencio, J., Noronha, A., Barral, A., et al. (2005). Toward a Novel Experimental Model of Infection to Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania Braziliensis*. *Infect. Immun.* 73, 5827–5834. doi: 10.1128/IAI.73.9.5827-5834.2005
- Espada, C. R., Albuquerque-Wendt, A., Hornillos, V., Gluenz, E., Coelho, A. C., and Uliana, S. R. B. (2021). Ros3 (Lem3p/CDC50) Gene Dosage Is Implicated in Miltefosine Susceptibility in *Leishmania (Viannia) Braziliensis* Clinical Isolates and in *Leishmania (Leishmania) Major*. *ACS Infect. Dis.* 7, 849–858. doi: 10.1021/acinfed.1c00857
- Gannavaram, S., Torcivia, J., Gasparyan, L., Kaul, A., Ismail, N., Simonyan, V., et al. (2017). Whole Genome Sequencing of Live Attenuated *Leishmania Donovanii* Parasites Reveals Novel Biomarkers of Attenuation and Enables Product Characterization. *Sci. Rep.* 7, 4718. doi: 10.1038/s41598-017-05088-4
- Ishemgulova, A., Hlavacova, J., Majerova, K., Butenko, A., Lukes, J., Votycka, J., et al. (2018). CRISPR/Cas9 in *Leishmania Mexicana*: A Case Study of Lmxhbn1. *PLoS One* 13, e0192723. doi: 10.1371/journal.pone.0192723
- Jackson, A. L., Bartz, S. R., Schelker, J., Kobayashi, S. V., Burchard, J., Mao, M., et al. (2003). Expression Profiling Reveals Off-Target Gene Regulation by RNAi. *Nat. Biotechnol.* 21, 635–637. doi: 10.1038/nbt831
- Jesus-Santos, F. H., Lobo-Silva, J., Ramos, P. I. P., Descoteaux, A., Lima, J. B., Borges, V. M., et al. (2020). LPG2 Gene Duplication in *Leishmania Infantum*: A Case for CRISPR-Cas9 Gene Editing. *Front. Cell Infect. Microbiol.* 10, 408. doi: 10.3389/fcimb.2020.00408
- Karmakar, S., Ismail, N., Oliveira, F., Oristian, J., Zhang, W. W., Kaviraj, S., et al. (2021). Preclinical Validation of a Live Attenuated Dermotropic *Leishmania* Vaccine Against Vector Transmitted Fatal Visceral Leishmaniasis. *Commun. Biol.* 4, 929. doi: 10.1038/s42003-021-02446-x
- Kelley, L. A., Mezulis, S., Yates, C. M., Wass, M. N., and Sternberg, M. J. (2015). The PyMol Web Portal for Protein Modeling, Prediction and Analysis. *Nat. Protoc.* 10, 845–858. doi: 10.1038/nprot.2015.053
- Laffitte, M. N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2016). Plasticity of the *Leishmania* Genome Leading to Gene Copy Number Variations and Drug Resistance. *F1000Res* 5, 2350. doi: 10.12688/f1000research.9218.1
- Laskowski, R. A., Rullmann, J. A., MacArthur, M. W., Kaptein, R., and Thornton, J. M. (1996). AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for Checking the Quality of Protein Structures Solved by NMR. *J. Biomol. NMR* 8, 477–486. doi: 10.1007/BF00228148
- Li, H., and Durbin, R. (2009). Fast and Accurate Short Read Alignment With Burrows-Wheeler Transform. *Bioinformatics* 25, 1754–1760. doi: 10.1093/bioinformatics/btp324
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., et al. (2009). The Sequence Alignment/Map Format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079. doi: 10.1093/bioinformatics/btp352
- Lye, L. F., Owens, K., Shi, H., Murta, S. M., Vieira, A. C., Turco, S. J., et al. (2010). Retention and Loss of RNA Interference Pathways in Trypanosomatid Protozoans. *PLoS Pathog.* 6, e1001161. doi: 10.1371/journal.ppat.1001161
- Novais, F. O., Carvalho, L. P., Graff, J. W., Beiting, D. P., Ruthel, G., Roos, D. S., et al. (2013). Cytotoxic T Cells Mediate Pathology and Metastasis in Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Pathog.* 9, e1003504. doi: 10.1371/journal.ppat.1003504
- Peacock, C. S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J. C., Quail, M. A., et al. (2007). Comparative Genomic Analysis of Three *Leishmania* Species That Cause Diverse Human Disease. *Nat. Genet.* 39, 839–847. doi: 10.1038/ng2053
- Petersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., et al. (2004). UCSF Chimera—a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. *J. Comput. Chem.* 25, 1605–1612. doi: 10.1002/jcc.20084
- Quinlan, A. R., and Hall, I. M. (2010). BEDTools: A Flexible Suite of Utilities for Comparing Genomic Features. *Bioinformatics* 26, 841–842. doi: 10.1093/bioinformatics/btq033
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G., et al. (2011). Integrative Genomics Viewer. *Nat. Biotechnol.* 29, 24–26. doi: 10.1038/nbt.1754
- Rogers, M. B., Hilley, J. D., Dickens, N. J., Wilkes, J., Bates, P. A., Depledge, D. P., et al. (2011). Chromosome and Gene Copy Number Variation Allow Major Structural Change Between Species and Strains of *Leishmania*. *Genome Res.* 21, 2129–2142. doi: 10.1101/gr.122945.111
- Salay, G., Dorta, M. L., Santos, N. M., Mortara, R. A., Brodskyn, C., Oliveira, C. L., et al. (2007). Testing of Four *Leishmania* Vaccine Candidates in a Mouse Model of Infection With *Leishmania (Viannia) Braziliensis*, the Main Causative Agent of Cutaneous Leishmaniasis in the New World. *Clin. Vaccine Immunol.* 14, 1173–1181. doi: 10.1128/CVI.00060-07
- Salisbury, J. L. (1995). Centrin, Centrosomes, and Mitotic Spindle Poles. *Curr. Opin. Cell Biol.* 7, 39–45. doi: 10.1016/0955-0674(95)80043-3
- Salisbury, J. L., Sulino, K. M., Busby, R., and Springett, M. (2002). Centrin-2 Is Required for Centriole Duplication in Mammalian Cells. *Curr. Biol.* 12, 1287–1292. doi: 10.1016/S0960-9822(02)01019-9
- Schumann Burkard, G., Jutz, P., and Roditi, I. (2011). Genome-Wide RNAi Screens in Bloodstream Form Trypanosomes Identify Drug Transporters. *Mol. Biochem. Parasitol.* 175, 91–94. doi: 10.1016/j.molbiopara.2010.09.002
- Selvapandiyani, A., Debabant, A., Duncan, R., Muller, J., Salotra, P., Sreenivas, G., et al. (2004). Centrin Gene Disruption Impairs Stage-Specific Basal Body Duplication and Cell Cycle Progression in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 279, 25703–25710. doi: 10.1074/jbc.M402794200
- Selvapandiyani, A., Dey, R., Nylén, S., Duncan, R., Sacks, D., and Nakhsh, H. L. (2009). Intracellular Replication-Deficient *Leishmania Donovanii* Induces Long Lasting Protective Immunity Against Visceral Leishmaniasis. *J. Immunol.* 183, 1813–1820. doi: 10.4049/jimmunol.0900276

- Selvapandiyar, A., Duncan, R., Debrabant, A., Bertholet, S., Sreenivas, G., Negi, N. S., et al. (2001). Expression of a Mutant Form of *Leishmania* *Donovani* Centrin Reduces the Growth of the Parasite. *J. Biol. Chem.* 276, 43253–43261. doi: 10.1074/jbc.M106806200
- Selvapandiyar, A., Kumar, P., Morris, J. C., Salisbury, J. L., Wang, C. C., and Nakhasi, H. L. (2007). Centrin1 Is Required for Organelle Segregation and Cytokinesis in *Trypanosoma Brucei*. *Mol. Biol. Cell* 18, 3290–3301. doi: 10.1091/mbc.e07-01-0022
- Shrivastava, R., Tupperwar, N., Drory-Retwitzer, M., and Shapira, M. (2019). Deletion of a Single LeishF4E-3 Allele by the CRISPR-Cas9 System Alters Cell Morphology and Infectivity of *Leishmania*. *mSphere* 4 (5), e00450-19. doi: 10.1128/mSphere.00450-19
- S I Figueiredo de Sá, B., Rezende, A. M., Melo Neto, O. P., Brito, M. E. F., and Brandao Filho, S. P. (2019). Identification of Divergent *Leishmania* (*Viannia*) *Braziliensis* Ecotypes Derived From a Geographically Restricted Area Through Whole Genome Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0007382. doi: 10.1371/journal.pntd.0007382
- Sterkers, Y., Crobu, L., Lachaud, L., Pages, M., and Bastien, P. (2014). Parasexuality and Mosaic Aneuploidy in *Leishmania*: Alternative Genetics. *Trends Parasitol.* 30, 429–435. doi: 10.1016/j.pt.2014.07.002
- Sundar, S., and Singh, B. (2014). Identifying Vaccine Targets for Anti-Leishmanial Vaccine Development. *Expert Rev. Vaccines* 13, 489–505. doi: 10.1586/14760584.2014.894467
- Teixeira, M. C., De Jesus Santos, R., Sampaio, R. B., Pontes-De-Carvalho, L., and Dos-Santos, W. L. (2002). A Simple and Reproducible Method to Obtain Large Numbers of Axenic Amastigotes of Different *Leishmania* Species. *Parasitol. Res.* 88, 963–968. doi: 10.1007/s00436-002-0695-3
- Tonui, W. K., and Titus, R. G. (2007). Cross-Protection Against *Leishmania* *Donovani* But Not *L. Braziliensis* Caused by Vaccination With *L.* Major Soluble Promastigote Exogenous Antigens in BALB/c Mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 76, 579–584. doi: 10.4269/ajtmh.2007.76.579
- Van Den Broeck, F., Savill, N. J., Imamura, H., Sanders, M., Maes, L., Cooper, S., et al. (2020). Ecological Divergence and Hybridization of Neotropical *Leishmania* Parasites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 117, 25159–25168. doi: 10.1073/pnas.1920136117
- Wickham, H. (2016). Ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *J. R. Stat. Soc.: Ser. A. (Stat. Soc.)* doi: 10.1007/978-3-319-24277-4
- Wiech, H., Geier, B. M., Paschke, T., Spang, A., Grein, K., Steinkotter, J., et al. (1996). Characterization of Green Alga, Yeast, and Human Centrin. Specific Subdomain Features Determine Functional Diversity. *J. Biol. Chem.* 271, 22453–22461. doi: 10.1074/jbc.271.37.22453
- Yagoubat, A., Corrales, R. M., Bastien, P., Leveque, M. F., and Sterkers, Y. (2020). Gene Editing in Trypanosomatids: Tips and Tricks in the CRISPR-Cas9 Era. *Trends Parasitol.* 36, 745–760. doi: 10.1016/j.pt.2020.06.005
- Zhang, W. W., Karmakar, S., Gannavaram, S., Dey, R., Lypaczewski, P., Ismail, N., et al. (2020a). A Second Generation *Leishmania* Vaccination Vaccine With a Markerless Attenuated *Leishmania* Major Strain Using CRISPR Gene Editing. *Nat. Commun.* 11, 3461. doi: 10.1038/s41467-020-17154-z
- Zhang, W. W., Lypaczewski, P., and Matlashewski, G. (2020b). Application of CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania*. *Methods Mol. Biol.* 2116, 199–224. doi: 10.1007/978-1-0716-0294-2\_14
- Zutshi, S., Kumar, S., Chauhan, P., Bansode, Y., Nair, A., Roy, S., et al. (2019). Anti-Leishmanial Vaccines: Assumptions, Approaches, and Annulments. *Vaccines (Basel)* 7 (4), 156. doi: 10.3390/vaccines7040156

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

**Publisher's Note:** All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Copyright © 2022 Sharma, Avendaño Rangel, Reis-Cunha, Marques, Figueira, Borba, Viana, Beneke, Bartholomeu and de Oliveira. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

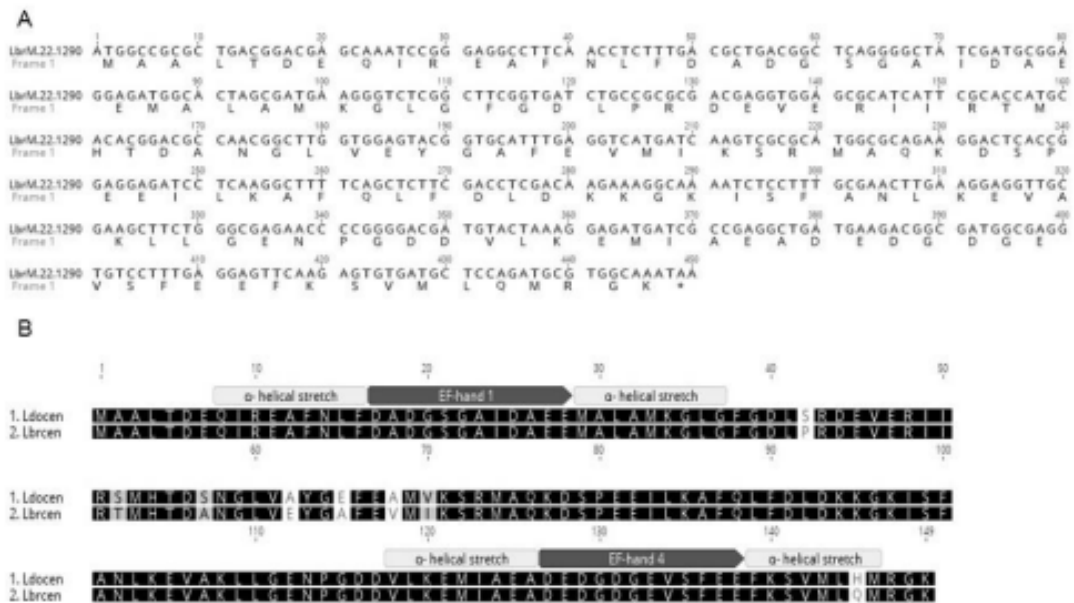


## Targeted deletion of Centrin in *Leishmania braziliensis* using CRISPR-Cas9-based editing

Rohit Sharma<sup>1,¶</sup>, Francys Avendaño-Rangel<sup>1,2,¶</sup>, Claudio Figueira<sup>1</sup>, João Luís Reis-Cunha<sup>3</sup>, Larissa Pinheiro Marques<sup>4</sup>, Pedro B. Borba<sup>1</sup>, Sayonara M. Viana<sup>1,2</sup>, Tom Beneke<sup>5</sup>, Daniella C. Bartholomeu<sup>4</sup>, Camila I. de Oliveira<sup>1,2,6\*</sup>

**Supplemental Table 1.** Primers used for centrin gene deletion and PCR based confirmation of KO in *Leishmania braziliensis*

Primers	Sequences
Upstream F	'5- TTGCACTTATCGACAGCACTTTGCATACCAGTATAATG CAGACCTGCTGC-3'
Downstream R	'5- CTTCTCGGGCTTGACCATCGCCGCCGCCCCCAATTT GAGAGACCTGTGC-3'
5' sgRNA	GAAATTAATACGACTCACTATAGGGTCTATGACGCTGG CTTAAGGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
3' sgRNA	GAAATTAATACGACTCACTATAGGCCTTCACCCTGCAG GAGTGAGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
G00	AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAA CGGACTAGCCTTATTTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAA AAC
ORF F Cen-/-	5' - GAG GCC TTC AAC CTC TTT GA - 3'
ORF R Cen-/-	5' - TCG GCG ATC ATC TCC TTT AG - 3'
NEO-F	5' - GTG CAA CCG TTC TAC AGT TC - 3'
NEO-R	5' - AAT AGC AGC CAG TCC CTT C - 3'
PAC-F	5' - TTC TCT CTT TTG TCC GTG ACT G - 3'
PAC-R	5' - TAC CAA TGT CCA AGC CCA CC - 3'



**Supplemental Figure 1. *In silico* characterization of the *Leishmania braziliensis* centrin gene.** (A) Nucleotide sequence (450 bp) and deduced amino acid sequence (149 aa) of the putative centrin gene in *L. braziliensis* LbrM22.190. (B) Amino acid sequence alignment *L. donovani* centrin (*Ldocen*; Genbank accession number- AF406767) and putative *L. braziliensis* centrin (*Lbrcen*). Boxes indicate high conservation at the calcium binding sites (EF-hand 1 and 4; alpha helical stretch).

**A** >NEO.CENKO. F

30 nt Homology Flank (HF) {

TKGGGSGTYKRRRKGCTTGGTCGTCGTGTGATACACTCGCGCATGATGGAGCCGCCACGCAGAGATATTTCCC } *L. braziliensis* genomic sequence

TGTTGTACC **TGCACTTATCGACAGCACTTTGCATACCA**GTATAATGCAGACCTGCTGCTGACCTACGCAGCCTTTT

GCGCACTTGGATCTCCTTTTGTACGCTTGAGCAAAACGCTGCACCTCAAGCCGAGCATTCCCTTTGTACGACAGG

AACAGCCGGGTGGTGGTGGTAGGGGGAATGGTGTGATGATCAGATGCTCCGAGATGCTGAACCTCTCCCTCTC

GTACATCTCTGCTTACCCTCTCCTTTTTCTTCTCCATCGGCTGCATTGCTTTCTCCACAACGCCTTGGCGTG

ACAAGAGCTCAGTCGCACCTGGCTCCTCTCTCGCCTCTGAAAAGTCTAGCTCTCTTCTGTTTTTTTTTTGTA AAAA

GCAGCTCATACTCGAAGGCTATGGGATCGGCCATTGAACAAATGGATTGCACGCAGGTTCTCCGGCCGCTTGGGT

GGAAAGACTATTCGGCTATGACTGGGCAACAACAACATCGGCTGCTCTGATGCCGCCGTGTTCCGGCTGTCAGCG

CAGGGGCGCCCGGTTCTTTTTGTCAAGACCGACCTGTCGGTGCCTGAATGAAGTGCAGGACGAGGCAGCGCGG

CTATCGTGGCTGGCCACAACGGGCGTTCCTTGCAGCTGTGCT } NEO gene sequence

**B** >PURO.PAC.F

30 nt Homology Flank (HF) {

TSYSGSSGYCKGMMTGSCTTCGTCGTCGTGTGATACACTCGCGCATGATGGAGCCGCCACGCAGAGATATTTCCC } *L. braziliensis* genomic sequence

TGTTGTACC **TGCACTTATCGACAGCACTTTGCATACCA**GTATAATGCAGACCTGCTGACCCGTTGCATTGGTGGTCTG

CTCTGCCGCTGCCCCCCCCCCCTTCCCGGCTAAACCKGGKACCTTCGGGGGGGGGTATCCC GGCTTCCCAACC

CTTGGTTGGGGAAAAGGTTGGGGCCCTTCCACCGTCAAAAACCGGGGAAAAGGGGCAGCCCGCCCCCAAGG

GGCCCCAAATATTACGAGGGGAATCCATCCCCACGAAGGGGCCAAAAAATAATTTTTTTTTTGGCGAACCCCCCCC

CCTTTTTTTTTGGTTTTAAATGGGCCCCCCCCCCCTACCGGTTTTTCTCCAAAATTTAAACAAAAACCAATTTACCCDCC

CAACTAACTCCCAATCCTCCCGGGGCGAACAATCCATTTCGCCTTCCCCTTTGAACAAAAACCCCCCATTTCCCCAT

TTTTTTTTGCGGTCTCCATAATGACYGGATACAACCAACCGGTCCTCTTGCTACCCGGAYATGGGCCGGGCGWCCGA

CCTGGTGGTTGCTTCTGATATCCGGCACC GACTACCGTGAACAATAAGACATTGACCAGTCAGAACTTCCAAGTATCTA

ACCGTGGCTGACMTTGTA } PAC gene sequence

**Supplemental Figure 2.** Confirmation of the correct integration of antibiotic donor DNA within the Centrin locus. (A) and (B) annotation of the sequences obtained from the Neo and PAC sequenced amplicons (respectively), derived from the diagnostic PCR.

## 5 CAPITULO 2

### **Imunização com *Leishmania braziliensis* deficiente em centrina não confere proteção contra infecção subsequente**

Uma infecção anterior por *Leishmania* induz imunidade protetora contra a doença subsequente, indicando que a vacinação é atingível. De fato, a imunização com *Leishmania* sem Centrin-1 induz imunidade robusta contra um desafio virulento subsequente. A centrina é uma proteína do citoesqueleto de ligação ao cálcio envolvida na duplicação do centrosomo e a deficiência da centrina leva à atenuação do parasita, indicada por uma incapacidade de causar doença *in vivo*. Aqui, usamos CRISPR/Cas9 para desenvolver uma *Leishmania braziliensis* deficiente em Centrina (*LbCen*<sup>-/-</sup>), o agente causador da leishmaniose mucosa e disseminada. Os promastigotas *LbCen*<sup>-/-</sup> exibiram crescimento normal *in vitro*, enquanto os amastigotas axênicos e intracelulares *LbCen*<sup>-/-</sup> mostraram sobrevivência prejudicada após fagocitose por macrófagos. Após inoculação experimental em camundongos BALB/c, *LbCen*<sup>-/-</sup> falhou em induzir o desenvolvimento de lesões e os parasitas tiveram vida curta. No entanto, a imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> não conferiu proteção contra o desafio subsequente, diferentemente de outros homólogos de leishmania deficientes em centrina. De fato, a resposta imune induzida pela inoculação com *LbCen*<sup>-/-</sup> foi caracterizada por níveis significativamente mais altos de IL-4 e IL-10, aos observados em camundongos inoculados com *LbWT*. Portanto, a imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> é incapaz de induzir uma resposta imune Th1, tornando os camundongos suscetíveis ao desafio, e *LbCen*<sup>-/-</sup> não pode recapitular a imunidade observada na leishmanização com *LbWT*. Em conclusão, a deficiência de centrina em *L. braziliensis* causa atenuação do parasita, interrompe a capacidade de causar doenças, mas, em contraste, não pode estimular uma resposta imune protetora.



**Title Page****IMMUNIZATION WITH CENTRIN-DEFICIENT *LEISHMANIA BRAZILIENSIS* DOES NOT CONFER PROTECTION AGAINST SUBSEQUENT INFECTION**

Francys Avendaño-Rangel<sup>1,2</sup>, Rohit Sharma<sup>1</sup>, Leslye T. Avila<sup>1</sup>, Gabriela Agra- Duarte<sup>1</sup>, Pedro B. Borba<sup>1</sup>, Sayonara M. Viana<sup>1</sup>, Camila I. de Oliveira<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto Gonçalo Moniz, FIOCRUZ, BA, Brazil

<sup>2</sup> Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Faculdade de Medicina da Bahia, Universidade Federal da Bahia, BA, Brazil.

<sup>3</sup> Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Doenças Tropicais (INCT-DT), Salvador, Bahia Brazil

\*Corresponding author: [camila.indiani@fiocruz.br](mailto:camila.indiani@fiocruz.br)

IGM-FIOCRUZ

Rua Waldemar Falcão, 121

Candeal- Salvador –BA

Brazil – 40196-710

Tel.: +55- 71- 3176 2211

Fax: +55- 71- 3176 2279

E-mail: [camila.indiani@fiocruz.br](mailto:camila.indiani@fiocruz.br)

**ABSTRACT**

A previous infection by *Leishmania* induces protective immunity against subsequent disease, indicating that vaccination is attainable. Indeed, immunization with *Leishmania* lacking *Centrin-1* induces robust immunity against a subsequent virulent challenge. *Centrin* is a calcium-binding cytoskeletal protein involved in centrosome duplication and centrin deficiency leads to parasite attenuation, indicated by an inability to cause disease in vivo. Herein, we used CRISPR/Cas9 to develop a Centrin-deficient *Leishmania braziliensis* (*LbCen*<sup>-/-</sup>), the causative agent of mucosal and disseminated leishmaniasis. *LbCen*<sup>-/-</sup> promastigotes exhibited normal *in vitro* growth whereas axenic and intracellular *LbCen*<sup>-/-</sup> amastigotes showed impaired survival following phagocytosis by macrophages. Upon experimental inoculation into BALB/c mice, *LbCen*<sup>-/-</sup> failed to induce lesion development and parasites were short lived. Immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup>, however, did not confer protection against subsequent challenge, differently from other centrin-deficient leishmania counterparts. Indeed, the immune response induced upon inoculation with *LbCen*<sup>-/-</sup> was characterized by significantly higher levels of IL-4 and IL-10, not observed in mice inoculated with *LbWT*. Therefore, immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> is unable

to induce a Th1-biased immune response, thus rendering mice susceptible to challenge, and *LbCen*<sup>-/-</sup> cannot recapitulate immunity observed upon leishmanization. In conclusion, *Centrin* deficiency in *L. braziliensis* causes parasite attenuation, disrupts the ability to cause disease but, in contrast, cannot stimulate a protective immune response.

**Key words:** cutaneous leishmaniasis, CRISPR-Cas9, live-attenuated vaccine, immunization, protection.

## INTRODUCTION

Leishmania protozoa are spread by bites of female sand flies, causing the leishmaniasis. Several forms of leishmaniasis exist and they vary according to the parasite species. The leishmaniasis cause high morbidity and mortality worldwide and are an important public health problem (Burza et al., 2018). In 2021, Brazil reported 15,023 cases of Cutaneous/Mucosal Leishmaniasis (PAHO, 2022) caused mainly by *Leishmania braziliensis*. To this date, there are no vaccines approved for human use and vector control is the only strategy to prevent this neglected tropical disease. Although different vaccine formulations against *Leishmania sp.* have conferred protection in animal models, no protection was achieved in primates or humans (Sundar and Singh, 2014). Leishmania infection can stimulate a protective response which depends upon the generation of IFN- $\gamma$  producing CD4<sup>+</sup> T cells, leading to macrophage activation and subsequent parasite killing (Mauël et al., 1991). On the other hand, experimental disease development is mainly driven by the production of non-protective IL-4-driven Th2-associated cytokines IL-4, IL-10, IL-13 and TGF-B (Cummings et al., 2010; Ikeogu et al., 2020).

In terms of vaccine development, diverse strategies have been tested in the field of leishmaniasis and the possibility of using genetically modified parasites has been expanded given the possibilities of large-scale and cost-effective production (Velez et al., 2020). In particular, research towards the deletion of genes related to parasite survival and/or virulence is attractive as these modifications maintain the antigenic repertoire or wild type counterparts and, thus, the ability of inducing an immune response but revokes the danger associated with infection (Saljoughian et al., 2014; Selvapandiyan et al., 2006). In this regard, *Centrin-1* deletion in *L. donovani* (Selvapandiyan et al., 2004), *L. major* (Zhang et al., 2020) and *L. mexicana* (Volpedo et al., 2022a) has been shown to lead to parasite attenuation, impairing disease development in experimental models. Centrin is a calcium-binding protein that plays a fundamental role in centrosome duplication (Wiech et al., 1996) and initially characterized in

*L. donovani* as homolog of human Centrin 2 (Selvapandiyan et al., 2001). Centrin-deficient *L. donovani* (*LdCen*<sup>-/-</sup>) undergo abnormal cytokinesis due to impaired centrosome division and parasites arrest at G2/M stage of the cell cycle yielding large, multinucleated cells amastigotes (Selvapandiyan et al., 2004). Immunization with *LdCen*<sup>-/-</sup>, however, confers strong protection against a virulent challenge, as seen by a significant reduction in parasite load paralleled by the development of a multifunctional T cell response (Selvapandiyan et al., 2009). More recently, CRISPR/Cas9 manipulation of *L. major* (Zhang et al., 2020) and *L. mexicana* (Volpedo et al., 2022a) recapitulated this protective capacity.

*L. braziliensis*, the main species causing Tegumentary Leishmaniasis in the Americas, has been insufficiently explored in terms of vaccine development despite its importance as the causative agent of mucosal and disseminated leishmaniasis, it. To overcome this gap and given the extensive evidence showing the possibility of vaccination genetically-modified attenuated leishmania, we employed CRISPR/Cas9 to generate a Centrin 1-deficient *L. braziliensis* cell line (*LbCen*<sup>-/-</sup>) (Sharma et al., 2022). Previously, we showed that deletion of Centrin 1 did not cause off-target mutations and *LbCen*<sup>-/-</sup> is incapable of division at the amastigote stage, forming multinucleated cells with impaired survival in macrophages and *LbCen*<sup>-/-</sup> also failed to induce lesions in BALB/c mice (Sharma et al., 2022). Herein, we explored *LbCen*<sup>-/-</sup> as a vaccine candidate in against Cutaneous Leishmaniasis caused by *L. braziliensis*. As demonstrated here, *LbCen*<sup>-/-</sup> is safe for immunization but, contrary of its counterparts, is incapable to confer protection against infection by live *L. braziliensis*, differently from mice that heal a primary infection. Our results point out differences in the ability of attenuated leishmania to induce protective immune responses and highlight the hurdles of vaccine development against New World leishmaniasis.

## **METHODS**

### ***Ethics Statements***

Six- to eight-week-old female BALB/c mice were obtained from the IGM-FIOCRUZ animal facility where they were maintained under pathogen-free conditions. All animal experimentation was conducted in accordance with the Guidelines for Animal Experimentation established by the Brazilian Council for Animal Experimentation Control (CONCEA). All procedures involving animals were approved by the local Institutional Review Board for Animal Care and Experimentation (CEUA-015/2019-IGM/FIOCRUZ).

### ***Parasite Culture***

*L. braziliensis* wild type (*LbWT*) parasites (strain MHOM/BR/01/BA788) ([De Moura et al., 2005](#)) were grown in Schneider's insect medium (GIBCO) supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 mg/ml streptomycin (all from Thermo Scientific) at 26°C. *L. braziliensis* centrin knockout (*LbCen*<sup>-/-</sup>) were generated as previously reported ([Sharma et al., 2022](#)) and were maintained in Schneider's insect medium (GIBCO) supplemented with 20% heat-inactivated FBS, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 mg/ml streptomycin (all from Thermo Scientific) and supplemented with neomycin (50 µg/ml) (Promega) and puromycin (10 µg/ml) (Sigma).

### ***BMDM Culture and In Vitro Exposure to Lbcen*<sup>-/-</sup>**

Bone marrow cells were isolated from femurs and tibias of BALB/c mice and cultured with RPMI 1640 medium (Sigma-Aldrich) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 100 U/ml penicillin, 100 mg/ml streptomycin, 2.5% HEPES (all from Invitrogen) and further complemented with conditioned media from L-929. After differentiation, Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM) were seeded at  $3 \times 10^5$  cells/500 µl/coverlip per well on 24-well plates. BMDM monolayers were washed to remove any non-adherent cells and infected with stationary-phase promastigotes *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup> at a 10:1 parasite/host cell ratio,  $3 \times 10^6/500$  µl in supplemented RPMI 1640 /well. Plates were incubated at 37°C under 5% CO<sub>2</sub> for 6h or 24 h. Coverslips were extensively washed to remove any non-internalized *Leishmania* and were methanol-fixed and stained with hematoxylin and eosin (H&E). *Leishmania* uptake and macrophage infection was assessed by scanning 200 macrophages in each sample for the enumeration of cells with and without *Leishmania*; the total number of intracellular parasites were counted by optical microscopy. Alternatively, coverslips were washed after 24h of infection and further cultured in 500 µl in supplemented RPMI 1640 /well at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for a total of 72 hours. Then, cells were washed and cultured in supplemented Schneider's insect medium for 5 days at 26°C. Promastigote numbers were determined at days 3 and 5, counting in a hemocytometer.

### ***Nitric Oxide and Cytokine Quantification***

BMDM were primed or not with LPS (100 ng/mL) (Invitrogen) and infected with *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup> at a 10:1 parasite/host cell ratio,  $5 \times 10^5/500$  µl in supplemented RPMI 1640 /well for 24h with. Cell culture supernatants were collected after 24 hours for nitric oxide quantification

using Griess reagent (Ding et al., 1988). Cytokine levels (IL-10, TNF- $\alpha$ , IL-12p70 and IL-1 $\beta$ ) were determined by sandwich ELISA, following manufacturer's instructions (Invitrogen).

***In Vivo Infection with *LbCen*<sup>-/-</sup>***

**Safety:** BALB/c mice (n=10) were inoculated in the left ear with  $3 \times 10^6$  *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup> stationary-phase promastigotes, using a 27G needle. Ear thickness was measured weekly using a digital caliper (Thermo Scientific). Parasite load was determined in mice infected with *LbCen*<sup>-/-</sup> at 2- and 5-weeks post infection, by limiting dilution analysis, as previously described (Novais et al., 2013), at the inoculation site (ear) and in draining lymph nodes (dLNs). In addition, cells from dLNs were seeded ( $1 \times 10^6$  cells in 700  $\mu$ l supplemented RPMI 1640 and stimulated with *L. braziliensis* SLA (10 $\mu$ g/ml) or ConA (1 $\mu$ g/ml) (Invitrogen) or were left unstimulated, in supplemented RPMI. Culture supernatants were collected after 48h and cytokine levels (TNF, IFN- $\gamma$  and IL-10) were determined by sandwich ELISA, as described above.

**Leishmanization:** BALB/c mice (n=12) were inoculated in the right ear dermis with *LbWT* ( $3 \times 10^6$  stationary-phase promastigotes), using a 27G needle. Ear thickness was measured weekly using a digital caliper (Thermo Scientific). Ten weeks after infection, Delayed-Type Hypersensitivity (DTH) was evaluated (n=3 mice) by inoculation of *L. braziliensis* SLA (50  $\mu$ g/10 $\mu$ l of PBS), prepared as described in (Reed et al., 1986), in the left ear dermis. Ear induration was measured 24, 48 and 72 hours later using a digital caliper (Thermo Scientific). Alternatively, healed (leishmanized) mice (n=6) were challenged after 10 weeks of the initial infection by inoculation of  $2 \times 10^5$  stationary-phase *LbWT* promastigotes in the left ear dermis. Ear thickness was measured weekly, as described above. Controls consisted of age-matched naïve mice (n=6) inoculated with stationary-phase *LbWT* promastigotes. Six weeks after challenge, leishmanized and control mice (n=5) were euthanized. Blood was collected and IgG1 and IgG2 responses to *L. braziliensis* SLA were evaluated by ELISA. Briefly, MaxiSorp 96-plates were coated with SLA (10  $\mu$ g/ml) and incubated overnight at 4°C. Plates were washed with PBS 1X + 0,05% Tween 20 (PBS-T) and blocked with 5% non-fat milk in PBS-T for 2h at RT. Serum samples (1/100 in PBS-T + 5% non-fat milk) were added to and plate were incubated overnight at 4°C. Following washing, plates were incubated with IgG1 or IgG2a HRP-conjugated antibodies, diluted 1/1000 in PBS-T + 5% non-fat milk for 2h at RT. Following a final round of washing, plates were developed with TMB solution (Invitrogen). Reaction was stopped with H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N and plates were read at 450 nm using a FilterMax F3 Multi-mode Microplate Reader (Molecular Devices). SoftMax Pro Software was used to obtain

an indirect measure of antibody titers in serum samples. All reagents for ELISA were purchased from Invitrogen. Parasite load was determined at the inoculation site and in draining lymph nodes (dLNs) by limiting-dilution analysis, as described above. Alternatively,  $1 \times 10^6$  dLN cells were seeded on 24 wells-plates and stimulated with *L. braziliensis* SLA (10ug/ml) or ConA (1ug/ml) or left unstimulated, in supplemented RPMI. Cells were incubated at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> for 48 hours. Cytokine production was assayed in culture supernatants by Luminex Assay (MILLIPLEXMAP Mouse Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Merck Millipore, Cat#MCYTOMAG-70K), following manufacturer's instructions. Data acquisition was performed with the Luminex LX200 (Merck Millipore). Mean Fluorescent Intensity was calculated against standards using Milliplex Analyst software.

**Immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> and challenge with *LbWT*:** BALB/c mice (n=13) were inoculated in the right ear dermis with  $3 \times 10^6$  stationary-phase *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup>. The DTH response was evaluated (n=3 mice) ten weeks after *LbWT* inoculation or five weeks after *LbCen*<sup>-/-</sup> inoculation, as described above. Blood was collected and IgG1 and IgG2 responses to *L. braziliensis* SLA were evaluated by ELISA. Cytokine production by dLN was determined as described above. Ten weeks after *LbWT* inoculation or five weeks after *LbCen*<sup>-/-</sup> inoculation, mice (n=10) were challenged with *LbWT* ( $10^5$  stationary-phase promastigotes) in the contralateral ear. Controls consisted of age-matched naïve mice (n=6). Ear thickness was measured weekly using a digital caliper (Thermo Scientific). Six-weeks post challenge, mice (n=6) were euthanized, and parasite load was determined at the challenge site and in dLNs by limiting-dilution analysis, as described above. Cytokine production by dLN was determined as described above. Lastly, challenged ears were excised and fixed in 10% formalin. Tissues were embedded in paraffin, cut and stained with hematoxylin and eosin (H&E). Slides were examined under a light microscope and images were obtained using a Slide scanner Olympus VS110 system and photographs were obtained using OlyVIA Software (version 3.8).

**Prime/Boost:** BALB/c mice (n= 12) were inoculated in the right ear dermis with  $10^5$  stationary-phase *LbCen*<sup>-/-</sup> and two weeks later, mice were boosted at the same site with  $5 \times 10^6$  *LbCen*<sup>-/-</sup>. Two and five-weeks post boost, DTH to *L. braziliensis* SLA, and cytokine response following in vitro stimulation of dLN cells were determined as described above. The frequency of Central Memory T cells (TCM) was determined by flow cytometry. Briefly, *LbWT*-immunized (n=5), *LbCen*<sup>-/-</sup>-immunized (n=5) and age matched control, naïve (n=2) mice were euthanized at two and five weeks after boost immunization. dLN ( $5 \times 10^5$ ) cells were incubated with Fc Block (BD

Biosciences, clone 2.4G2) for 5 min at 4°C and then stained with CD4 (eBioscience, clone GK1.5), CD44 (BD Pharmingen) and CD62L (BD Pharmingen) antibodies, in dark for 20 min at 4°C. Cells were washed in PBS and resuspended in PBS containing Hoechst 33258 at 5 ug/ml. Acquisition was performed using a LSRFortessa™ flow cytometer (BD) and analyzed using FlowJo Software version 10. Isotype controls for each Ab used under similar conditions indicated specific binding of the test Ab. Electronic compensation was performed with single-stained cells with individual mAbs used in the test samples.

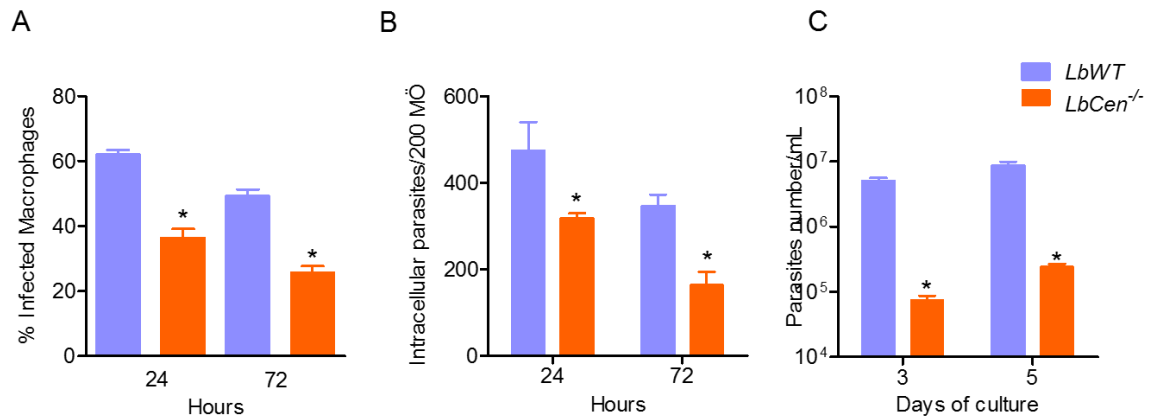
### **Statistical Analysis**

The course of disease was plotted individually for mice in all experimental and control groups. Comparisons between two groups were performed by Mann–Whitney (non-parametric t-test) and comparisons among more than two groups were performed by Kruskal–Wallis. Data are presented as mean ± error of the mean. Analyses were conducted using Prism (V.8.0, GraphPad) and a p-value ≤ 0.05 was considered significant.

## **RESULTS**

### ***LbCen*<sup>-/-</sup> parasites exhibit impaired growth and survival in BMDM**

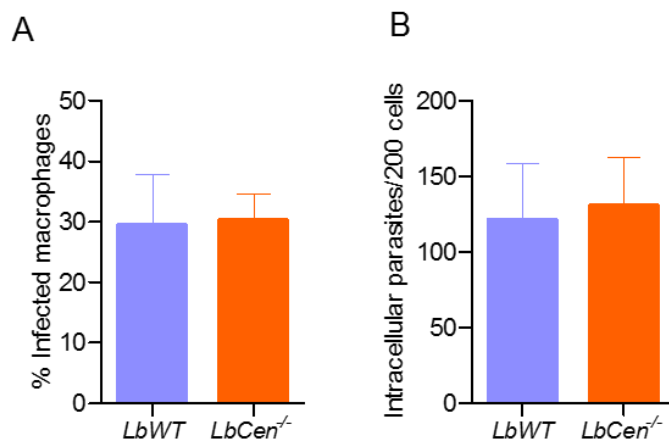
BMDM were infected with *LbCen*<sup>-/-</sup> or *LbWT* and after 24h and 72h, the number of infected macrophages and intracellular parasites was determined. Exposure to *LbCen*<sup>-/-</sup> led to significantly reduced survival (p<0.05) compared to *LbWT*, both at 24h and 72h (Fig. 1A and Fig.1B). After 72h, BMDM were washed and cultured in supplemented Schneider medium to determine the number of recovered parasites. At both time points, we observed a significantly decreased (p<0.05) presence of *LbCen*<sup>-/-</sup> compared to *LbWT* (Fig. 1C).



**Figure 1. Impaired growth of *LbCen<sup>-/-</sup>* in murine macrophages.** Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were infected with *LbWT* or *LbCen<sup>-/-</sup>* (10:1, parasite/macrophage ratio) promastigotes for 24h. Cells were extensively washed and stained with H&E or further cultured for 72 hours. Cells were evaluated for the percentage of infection (A) and the number of amastigotes per 200 macrophages (B) by optical microscopy. Alternatively, after 72h, infected macrophage were washed and cultured in Schneider medium. Monolayers were cultured for an additional 3 or 5 days, and the number of promastigotes was determined by use of a hemocytometer (C). Results are presented as means  $\pm$  SEM and are pooled from two independent experiments, each performed in quadruplicate. \* $p < 0.05$ .

This outcome was not due to impaired uptake by the host cell as the number of BMDM harboring *LbCen<sup>-/-</sup>* or *LbWT* was similar after 6h of exposure (Supplemental Fig. 1A and Fig.1B) as was the number of intracellular amastigotes. These results confirm that CRISPR-Cas9-mediated deletion of Centrin 1 in *L. braziliensis* negatively affects survival and replication within BMDM.

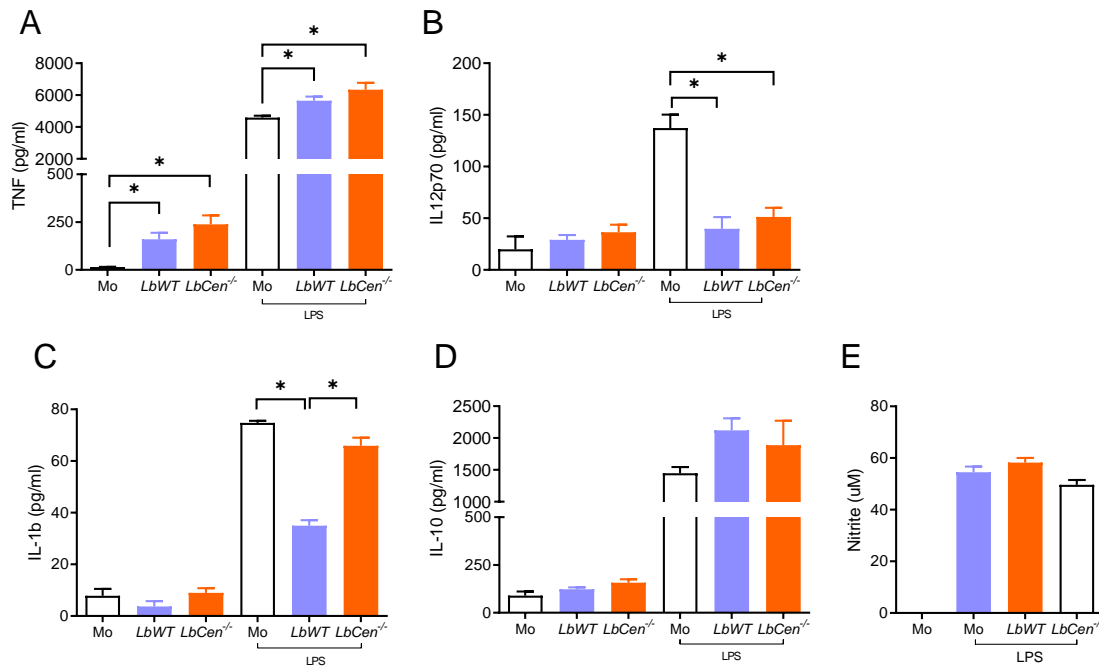




**Supplemental Figure 1. *Leishmania* uptake by BMDM.** BMDM were exposed to *LbWT* or *LbCen<sup>-/-</sup>* (10;1, parasite/cell ratio) promastigotes for 6h. Cells were stained H&E and evaluated for the percentage of infection (A) and the number of amastigotes per 200 macrophages (B) by optical microscopy. Results are presented as means ± SEM and are pooled from two independent experiments, each performed in quadruplicate. \* $p < 0.05$ .

#### **BMDM exposed to *LbCen<sup>-/-</sup>* or *LbWT* show similar innate responses**

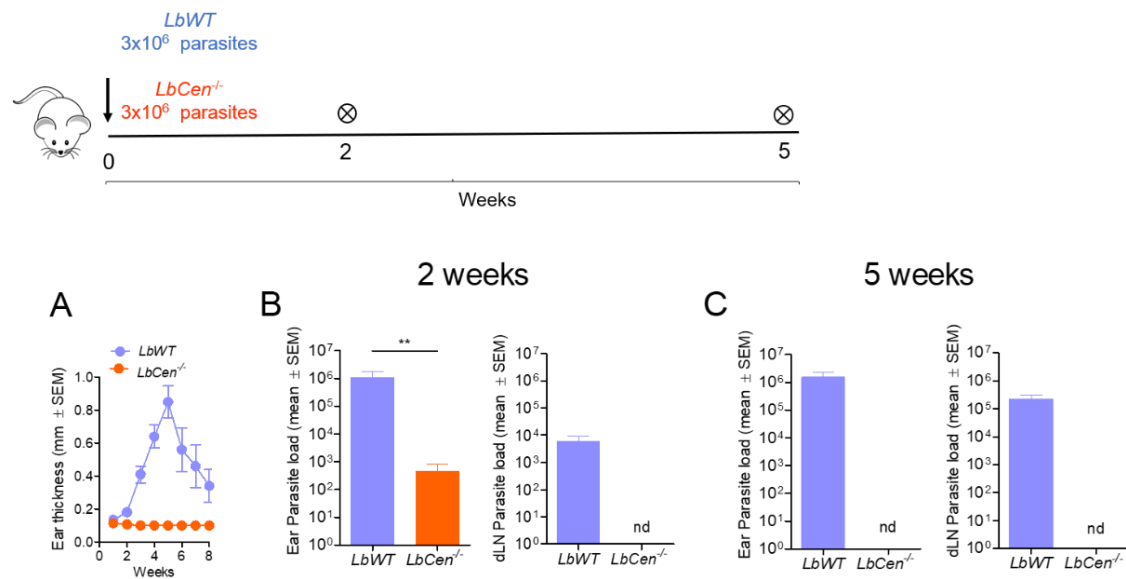
BMDM were exposed to *LbCen<sup>-/-</sup>* or *LbWT* in the presence or not of LPS and cytokine production was evaluated after 24h. Levels of TNF were similar comparing *LbCen<sup>-/-</sup>* and *LbWT* and significantly higher ( $p < 0.05$ ) compared to controls (Figure 2A). Levels of IL-12p70 were also similar for *LbCen<sup>-/-</sup>* and *LbWT* and significantly lower ( $p < 0.05$ ) compared to controls stimulated with LPS (Figure 2B). Exposure to *LbWT* impaired IL-1 $\beta$  secretion whereas *LbCen<sup>-/-</sup>* did not (Figure 2C). IL-10 levels (Figure 2D) and NO production were not changed in comparison to controls (Figure 2E). Taken together these results showed that the stimulation of the innate response by *LbCen<sup>-/-</sup>* is similar to that observed with *LbWT*.



**Figure 2. Innate immune response in murine macrophages infected with *LbCen*<sup>-/-</sup>.** Bone marrow-derived macrophages (BMDM) were infected with *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup> (10:1, parasite/macrophage ratio) promastigotes for 24h. Alternatively, BMDM were infected and primed with LPS (100ug). The presence of TNF (A), IL-10 (B), IL-1B (C) and IL-10 (D) in culture supernatants was determined by ELISA and, Nitrite (E) concentration was evaluated by Griess Reaction. Results are presented as mean ± SEM and are from a representative experiment, performed in quadruplicate.

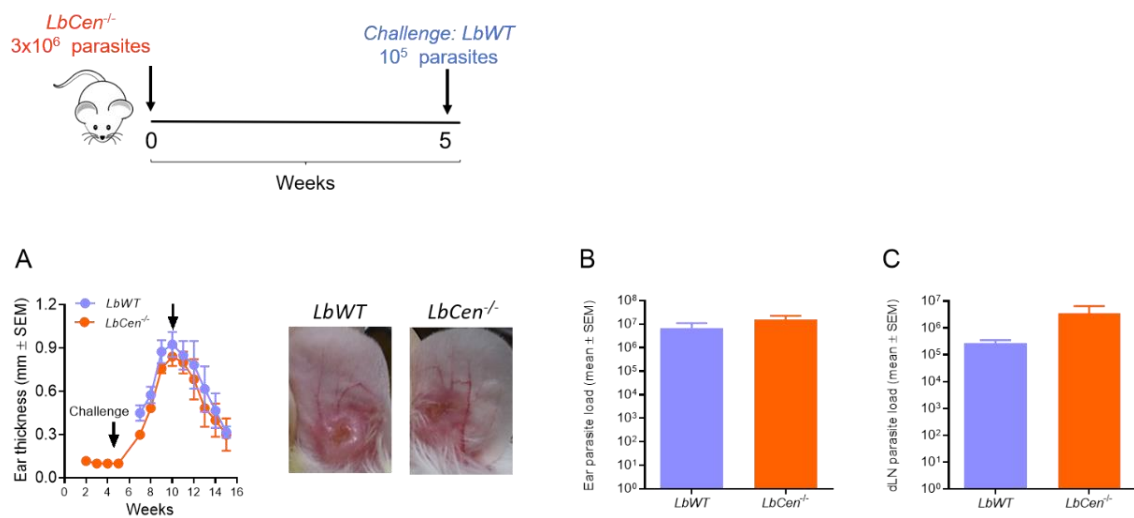
### **Immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> does not confer protection against a challenge with *LbWT***

Deletion of Centrin 1 impairs amastigote growth and mice inoculated with Centrin-deficient *Leishmania* do not develop disease (Selvapandiyar et al., 2004; Zhang et al., 2020; Volpedo et al., 2022a). Accordingly, deletion of the Centrin 1 gene in *L. braziliensis* induced a similar outcome as BALB/c inoculated with *LbCen*<sup>-/-</sup> failed to develop cutaneous lesion (Figure 3A) whereas *LbWT* induced lesions that peaked at 5 weeks and spontaneously healed by 10 weeks post infection (De Moura et al., 2005). Two weeks after infection, parasite load at the inoculation site was significantly lower ( $p < 0.05$ ) in mice inoculated with *LbCen*<sup>-/-</sup> compared to *LbWT* (Fig. 3B) whereas only *LbWT* were detected in dLN (Fig. 3B). Five weeks post inoculation, we did not detect *LbCen*<sup>-/-</sup> at the inoculation site or in dLN (Fig. 3C), in contrast to *LbWT*.



**Figure 3 - *LbCen*<sup>-/-</sup> parasites are safe and do not cause lesion development in BALB/c mice.** BALB/c mice (10 per group) were inoculated with  $3 \times 10^6$  *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup> stationary promastigotes, in the ear dermis, and lesion development was measured weekly (A). Parasite load was determined, at 2 (B) and 5 (C) weeks post infection, at the inoculation site (ear) and in draining lymph nodes by Limiting Dilution Analysis. Results are expressed as means  $\pm$  SEM and are from one representative experiment.

Next, we immunized BALB/c mice with *LbCen*<sup>-/-</sup> and 5 weeks later, mice were challenged with LbWT. Control, naïve were mice infected with *LbWT*. Surprisingly, mice immunized with *LbCen*<sup>-/-</sup> were not protected against infection and developed lesions that were comparable to those observed in controls (Figure 4A). Parasite load, determined at this same time point, was similar comparing the two groups, both at the inoculation site and in dLNs (Fig. 4B and 4C, respectively). These data show that *Centrin 1* deficiency in *L. braziliensis* renders parasites unable to cause pathology but, at the same time, incapable of conferring protection against wild-type *L. braziliensis*.

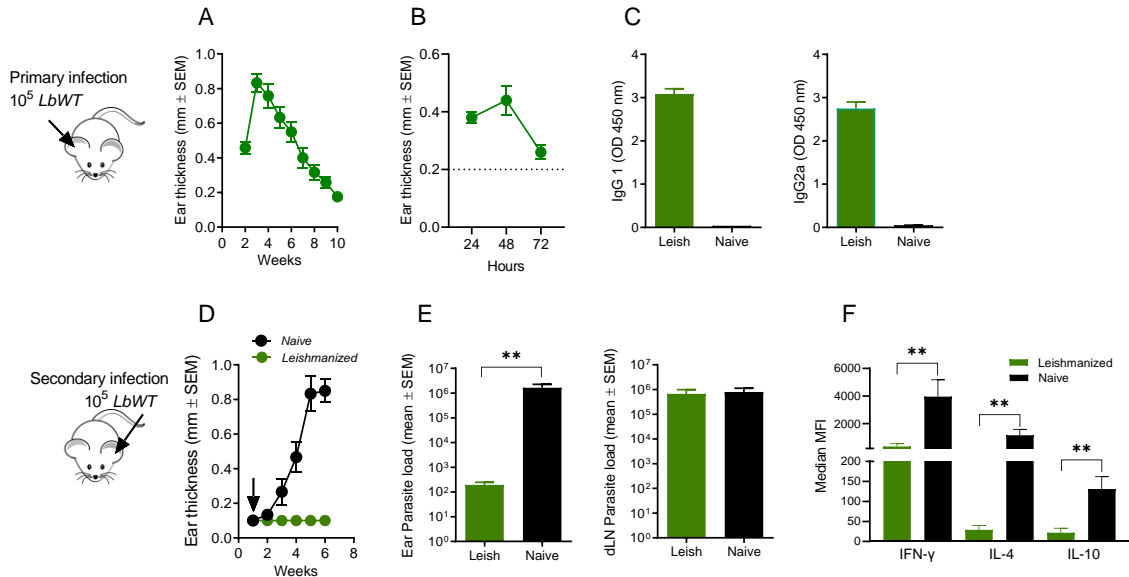


**Figure 4 - Immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> does not confer protection against a challenge with *LbWT*.** BALB/c mice (n=10) were inoculated with 3x10<sup>6</sup> *LbCen*<sup>-/-</sup> stationary promastigotes, in the ear dermis. After 5 weeks mice were challenged in the opposite ear with 2x10<sup>5</sup> *LbWT* stationary promastigotes and, lesion development was measured weekly (A). Parasite load was determined 5 weeks post infection, at the inoculation site (ear) (B) and in draining lymph nodes (C) by Limiting Dilution Analysis. Results are expressed as means ± SEM and are from one representative experiment.

#### **Mice immunized with *LbCen*<sup>-/-</sup> do not recapitulate the immune response observed in leishmanized mice**

The inoculation of *Leishmania* parasites as a mean of inducing protection against leishmaniasis (leishmanization) is known to be effective and has been successfully tested in humans (Mohebbi et al., 2019). This effect is recapitulated in pre-clinical animal models (Zaph et al., 2004; Peters et al., 2009). Mice inoculated with *LbWT* develop lesions that peak at ~5wks post infection and heal spontaneously 10 weeks later (De Moura et al., 2005, Figure 5A). Healed (leishmanized) mice mount a DTH response (Figure 5B) and produce both IgG1 and IgG2a (Figure 1C) to *L. braziliensis* SLA, indicative of cellular immunity to *Lb*. Following a subsequent challenge with live *LbWT*, leishmanized mice do not develop lesions (Figure 5D), in contrast to control (naïve) mice. Absence of lesions is accompanied by a significant decrease (p<0.01) in parasite load at the inoculation site but not in dLN (Figure 5E). Lastly, dLN cells from leishmanized mice produced significantly less IFN- $\gamma$  (p<0.01), IL-4 (p<0.01) and IL-10 (p<0.01) (Figure 5F) compared to naïve mice. These results show that leishmanization with

*LbWT* mediates protection against challenge indicated by absence of pathology and lower parasite load.

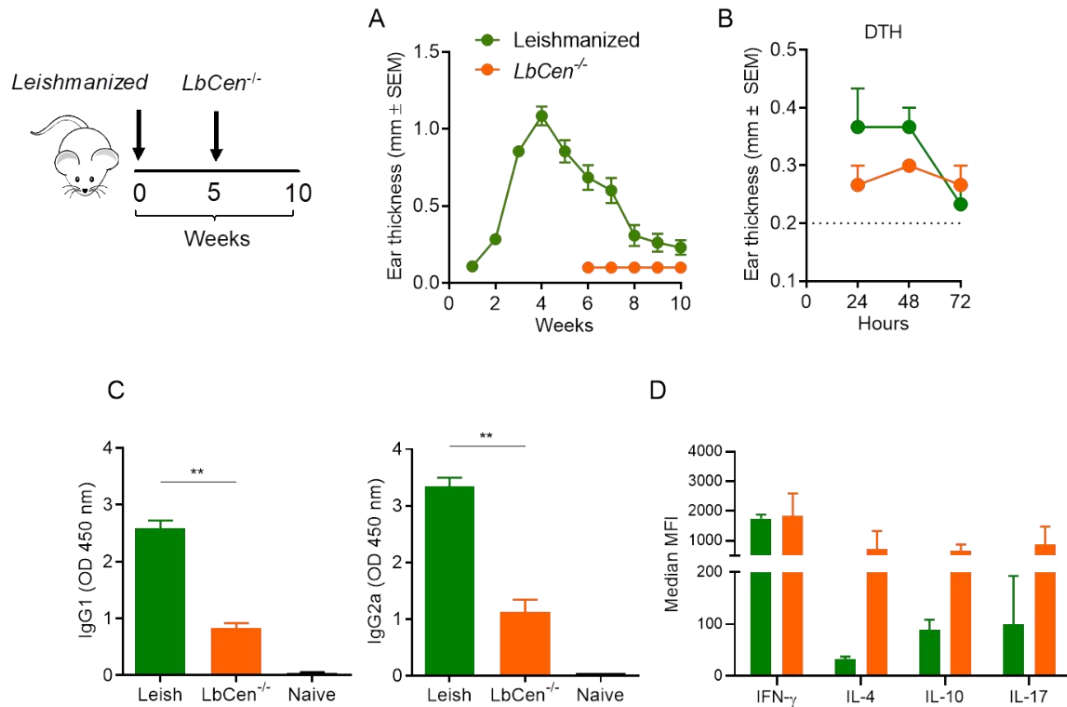


**Figure 5. A primary infection with *L. braziliensis* protects against subsequent challenge.**

Mice (n=10) were inoculated with *LbWT* and, lesion healing was followed (A). After 10 weeks a DTH response (B), IgG1 and IgG2a (C) presence was evaluated by ELISA. Then, healed mice (n=5) were challenged in the opposite ear dermis and lesion development was monitored in parallel with a control group (D). Parasites load in ears and draining lymph nodes after challenge (E) was determined by limiting dilution. Recall responses in draining lymph nodes after re-stimulation with SLA (F) was determined using Luminex assay. Results are expressed as means  $\pm$  SEM and are from one representative experiment. \*\*: p<0,01.

Since the outcome of leishmanization and immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> differed, we compared the immune response induced by these two strategies. Mice infected with *LbWT* developed lesions that healed spontaneously whereas mice inoculated with *LbCen*<sup>-/-</sup> did not show pathology (Figure 6A). The DTH response to *L. braziliensis* SLA, measured at the end of the observation period (10 weeks) was higher in leishmanized mice compared to mice inoculated with *LbCen*<sup>-/-</sup> (Figure 6B). Sera collected at the same time were probed for the presence of IgG1 and IgG2a and leishmanized mice showed a significantly (p<0.01) higher production of both subclasses (Figure 6C) compared to mice inoculated with *LbCen*<sup>-/-</sup>. The recall response evaluated by restimulation of dLN cells showed that although leishmanized and *LbCen*<sup>-/-</sup>

immunized mice produce similar levels of IFN- $\gamma$ , the latter produce more IL-4, IL-10 and IL-17 (Figure 6D).

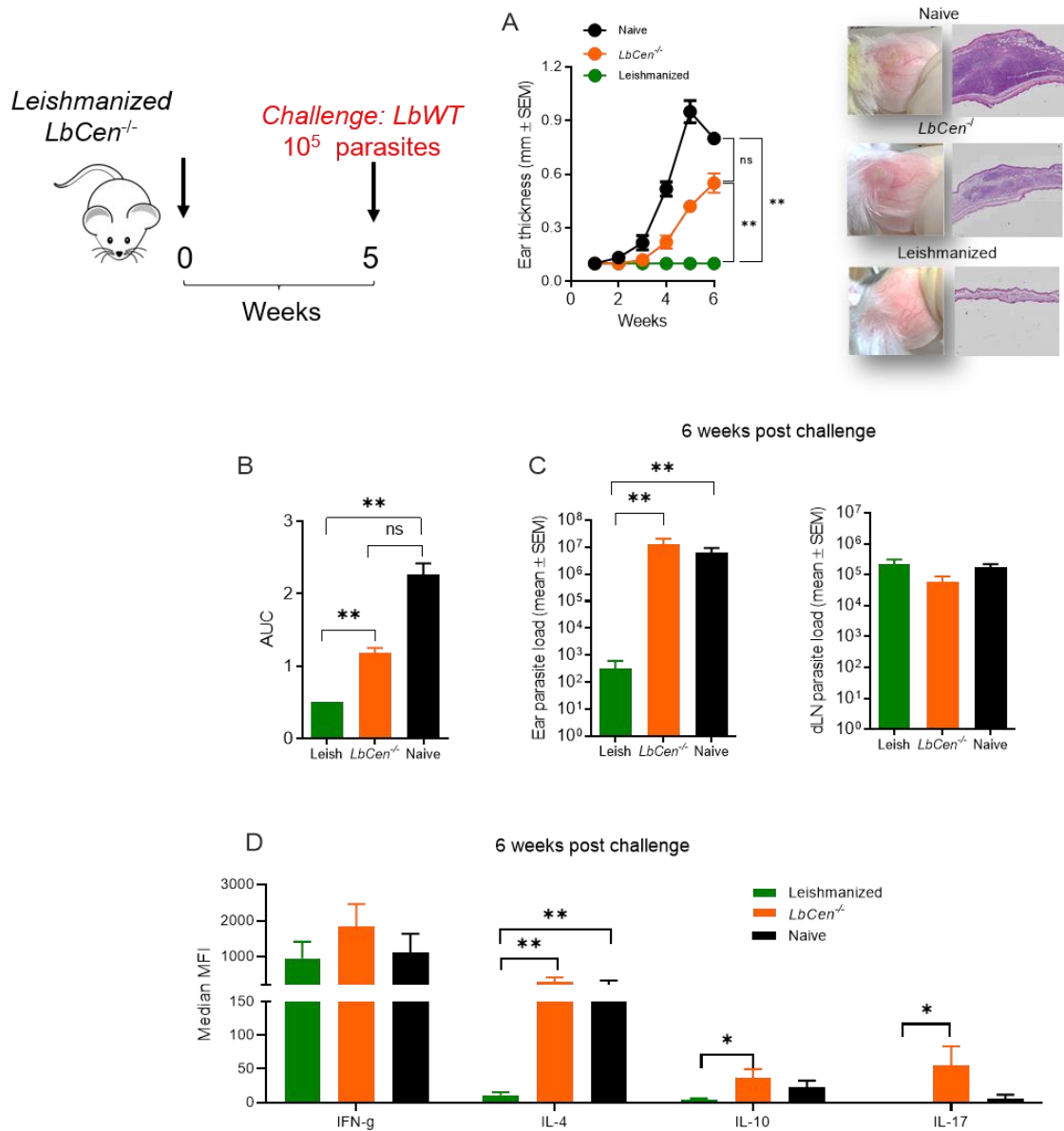


**Figure 6 - Mice immunized with *LbCen*<sup>-/-</sup> do not recapitulate the immune response observed in leishmanized mice.** Mice were inoculated with *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup>. (A) Lesion development after parasite inoculation. (B) DTH response. (C) IgG1 and (D) IgG2a presence was determined by ELISA. (E) Recall responses in draining lymph nodes after re-stimulation with SLA was determined using Luminex assay. Results are expressed as means  $\pm$  SEM and are from one representative experiment.

Next, we compared the outcome of a challenge with *LbWT* in leishmanized vs. *LbCen*<sup>-/-</sup> immunized mice. Again, inoculation with *LbCen*<sup>-/-</sup> does not preclude a productive infection with *LbWT* whereas leishmanization is fully capable of doing so (Figure 7A). Tissue sections obtained 6 weeks after challenge showed signs of chronic inflammation and numerous amastigotes as well as presence of macrophages and neutrophils in *LbCen*<sup>-/-</sup> immunized mice (Figure 7A). On the contrary, leishmanized mice showed only mild signs of inflammation. Following challenge, leishmanized mice also showed a significantly lower ( $p < 0.01$ ) disease burden (AUC) compared to mice inoculated with *LbCen*<sup>-/-</sup> or control (naïve) mice (Figure 7B). These findings were paralleled by a significantly lower ( $p < 0.01$ ) parasite load at the inoculation

site in leishmanized mice compared to *LbCen*<sup>-/-</sup>-inoculated or control (naïve) mice (Figure 7C). Parasite load was similar at the dLN for the three groups evaluated.

As for the recall response, levels of IFN- $\gamma$  detected upon stimulation of dLN cells were similar for the three groups (Figure 7D), as seen before challenge (Figure 6D). However, levels of IL-4, IL-10 and IL-17 were significantly higher in mice inoculated with *LbCen*<sup>-/-</sup> compared to leishmanized mice (Figure 7D), paralleling the development of lesions observed in the former group. Taken together these results demonstrate that inoculation with *LbCen*<sup>-/-</sup> cannot recapitulate the immune profile induced by leishmanization and, as such, is incapable of conferring protection against challenge with *L. braziliensis*.



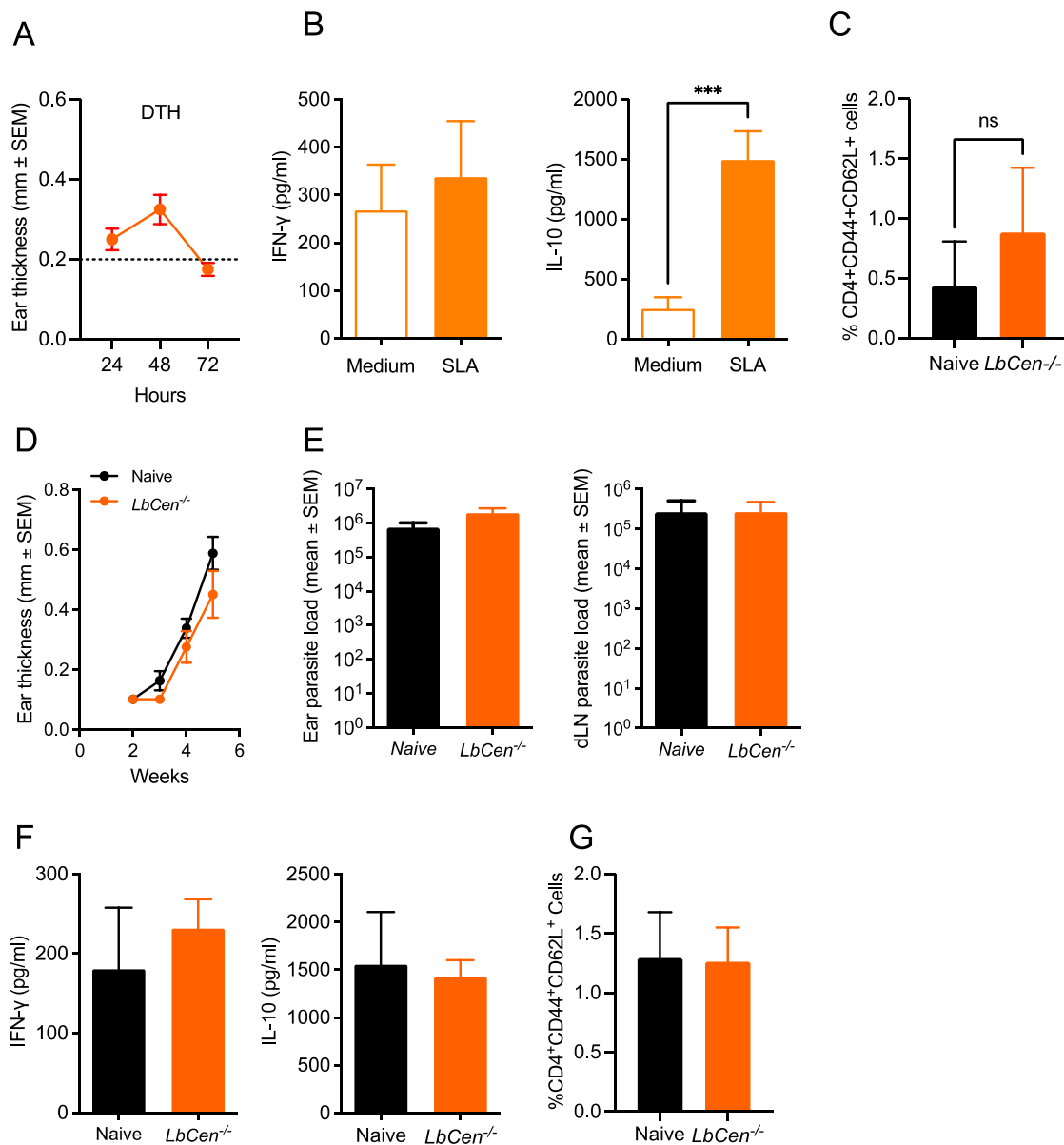
**Figure 7 - Lack of protection against a live challenge in mice immunized with *LbCen*<sup>-/-</sup>.** Mice were inoculated with *LbWT* or *LbCen*<sup>-/-</sup>. Then, mice were challenge with live *LbWT*. (A) Lesion development following challenge was measured and histopathological analysis of ears was performed. (B) Area under the curve (AUC) of ear thickness was determined. (C) Parasite load was evaluated in ears and draining lymph nodes by limiting dilution analysis. (D) Cytokine response in draining lymph nodes following re-stimulation with SLA was determined by Luminex Assay. Results are expressed as means  $\pm$  SEM and are from one representative experiment. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ .

### **Priming/Boosting induces prolonged parasite persistence**

In the field of vaccination, multiple immunization are required for optimal protection, including live attenuated vaccines (Lu S., 2009). Although current studies have shown that a single immunization with centrin-deficient leishmania confers robust protection against challenge (Selvapandiyan et al., 2004; Zhang et al., 2020; Volpedo et al., 2022), we investigated whether a second immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> could boost the immune response induced upon priming and, hence, alter the outcome of challenge. Priming and boosting with *LbCen*<sup>-/-</sup> parasites continued to be safe as mice did not develop lesions (data not shown). The cellular response, using DTH as a proxy (Figure 8A), was similar to that observed with a single immunization (Figure 6B) and while IFN- $\gamma$  was unchanged, IL-10 levels detected upon restimulation of dLN was significantly higher (Figure 6D). Two immunizations also failed to increase the frequency CD4<sup>+</sup> T central memory cells (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) as seen upon immunization with *LmexCen*<sup>-/-</sup> (Volpedo et al., 2022a).

Following challenge with *LbWT*, lesions developed in mice that received two inoculations with *LbCen*<sup>-/-</sup>, was similar to those observed in naïve controls (Figure 8D). No changes were observed in parasite load, both at the inoculation site and in dLNs (Figure 8E). Lastly, cytokine production (Figure 8F) and the frequency of CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup> T cells (Figure 8G) was similar in naïve controls and in mice immunized twice with *LbCen*<sup>-/-</sup>. Collectively, our results show that immunization with Centrin-deficient in *L. braziliensis* cannot confer protection against homologous challenge and that a booster shot cannot alter this outcome.





**Figure 8- Priming/Boosting induces prolonged parasite persistence.** BALB/c mice (n=10) were inoculated with  $3 \times 10^6$  *LbCen*<sup>-/-</sup> stationary promastigotes, in the ear dermis and after 5 weeks mice were boosted with  $3 \times 10^6$  *LbCen*<sup>-/-</sup> stationary promastigotes inoculated in the same ear. After 5 weeks, a DTH response (A) was measured and, (B) IFN $\gamma$  and IL-10 production was determined by ELISA, (C) Presence of CD4<sup>+</sup> T central memory cells (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) was determined by flow cytometry. Ear thickness after. Five weeks post-boost, naive and immunized mice were challenge with  $10^5$  *LbWT* and lesion development was measured (D). (E) Parasite load was evaluated in ears and draining lymph nodes by limiting dilution analysis. (F) IFN $\gamma$  and IL-10 production was determined by ELISA and, (C) Presence of CD4<sup>+</sup> T central memory cells (CD4<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD62L<sup>+</sup>) was determined by flow cytometry. Results are expressed as means  $\pm$  SEM and are from one representative experiment.

## DISCUSSION

Current therapeutic options for leishmaniasis remain limited because of toxicity, drug administration challenges, treatment fails and drug resistance (McGwire and Satoskar, 2014). It is established that protection against leishmaniasis can be achieved through the inoculation of virulent *L. major* (leishmanization) (Khamesipour et al, 2005). However, leishmanization is unsafe and, thus, attenuated leishmania cell lines are an attractive alternative to overcome safety issues while permitting vaccine development. Indeed, the deletion of the Centrin 1 gene, explored in *L. donovani* (*LdCen*<sup>-/-</sup>) (Selvapandiyan et al., 2009), *L. major* (*LmCen*<sup>-/-</sup>) (Zhang et al., 2020) and *L. mexicana* (*LmexCen*<sup>-/-</sup>) (Volpedo et al., 2022), yielded parasite attenuation and, in parallel, outstanding possibilities regarding protection against challenge. Herein, we explored this possibility by using a Centrin-1-deficient *L. braziliensis* (*LbCen*<sup>-/-</sup>) (Sharma et al., 2022), aiming at the development of a vaccine against New World Tegumentary Leishmaniasis.

The Centrin-1 deficient *L. braziliensis* (*LbCen*<sup>-/-</sup>) line used in the present study was developed using CRISPR/cas9 editing technology (Sharma et al., 2022;) and recapitulated the phenotype observed in other Centrin-1-deficient leishmania sp. *LbCen*<sup>-/-</sup> displayed abnormal cytokinesis and impaired growth at the amastigote state, resulting in multinucleated cells and cell death (Selvapandiyan et al., 2004; Zhang et al., 2020, Volpedo et al., 2022). While Centrin 1 gene deletion in *L. braziliensis* did not alter the ability of promastigotes to successfully enter the host cell, intracellular *LbCen*<sup>-/-</sup> proliferation was significantly reduced. In addition, exposure of macrophages to either *LbCen*<sup>-/-</sup> or *LbWT* led to similar outcome regarding the production of innate mediators such as TNF, IL-12, IL-10 or NO. Interestingly, IL-1 $\beta$  was significantly increased upon infection with *LbCen*<sup>-/-</sup> compared to *LbWT*. IL-1 $\beta$  is produced following activation of the NLRP3 inflammasome and is associated with augmented pathology in murine models of cutaneous leishmaniasis (Charmoy et al 2016; Novais et al., 2018). Also, IL-1 $\beta$  production by intermediate monocytes has been associated with immunopathology in human CL caused by *L. braziliensis* (Santos et al., 2018).

Inoculation of BALB/c mice with *LbCen*<sup>-/-</sup> was deemed safe as parasites did not induce lesion development, corroborating results obtained with Centrin- 1 -deficient leishmania sp. (Selvapandiyan et al., 2009; Zhang et al., 2020, Volpedo et al., 2022). Given the attenuated profile of *LbCen*<sup>-/-</sup> regarding lesion development, we next evaluated its ability to confer immunity. To our surprise, immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> failed to inhibit lesion development

following challenge with live *LbWT*, contrary to reports with other Centrin-deficient leishmania sp (Selvapandiyan et al., 2009; Zhang et al., 2020, Volpedo et al., 2022a). In these reports, the attenuated leishmania succeeded in precluding disease development, both in cutaneous form (Zhang et al., 2020; Volpedo et al., 2022a) as well as in visceral form (Selvapandiyan et al., 2009). Importantly, this was also observed in the context of sand fly transmitted leishmanial (Zhang et al., 2020) considered the gold standard of challenge models in leishmaniasis. The literature shows that protective immunity against leishmaniasis requires low levels of persisting parasites (Uzonna et al., 2004a; Uzonna et al., 2004b; Kébaïer et al., 2006) and complete parasite clearance leads to loss of immunity (Uzonna et al., 2001). Herein, *LbCen*<sup>-/-</sup> parasites were detected early on (2 weeks later) but were rapidly cleared as parasites could not be retrieved from the inoculation site or dLNs 5 weeks later. These results differ from those reported for *LdCen*<sup>-/-</sup> (Selvapandiyan et al., 2009), *LmCen*<sup>-/-</sup> (Zhang et al., 2020) and *LmexCen*<sup>-/-</sup> (Volpedo et al., 2022) as for these two cell lines, parasites were detected at 5 weeks post inoculation, indicating their enhanced ability to survive in the vertebrate host, compared to *LbCen*<sup>-/-</sup>. Thus, we can suggest that the lower ability of *LbCen*<sup>-/-</sup> to survive following in vivo inoculation may explain the lack of a protective immune response, as seen with other centrin-deficient leishmania. Of note, immunization with *LdCen*<sup>-/-</sup> was able to cross protect against *L. braziliensis* (Selvapandiyan et al., 2009), again suggesting that parasite persistence is key and, importantly, *LdCen*<sup>-/-</sup> parasites were found up to five weeks following inoculation (Selvapandiyan et al., 2009).

We also compared the immune responses generated by immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup> versus that induced by leishmanization. A previous exposure to *L. braziliensis*, followed by spontaneous healing of lesions conferred protection against a subsequent virulent challenge. This protective response was associated with cellular immune response, elevated IFN- $\gamma$  production during recall responses paralleled by a significantly decreased parasite load. Upon comparison of this response to that induced by inoculation of *LbCen*<sup>-/-</sup>, we observed that the latter mounted a Th2-biased immune response, with elevated levels IL-4, IL-10 and IL-17 and lower levels of IgG1 and IgG2a antibodies. Although IFN- $\gamma$  production was similar comparing *LbCen*<sup>-/-</sup> immunized and leishmanized mice, IL-4 and IL-10 were both upregulated after immunization with *LbCen*<sup>-/-</sup>, compared to leishmanized mice. IL-10 has been associated with parasite persistence during *L. major* infection of BALB/c mice (Belkaid et al., 2001). In comparison to what we observed here, BALB/c mice immunized with *LmexCen*<sup>-/-</sup> produced significantly lower levels of IL-10 and IL-4, responses that are characteristically induced by *L. mexicana* (Volpedo et al., 2022).

This immune modulation induced by Centrin-deficient *L. mexicana* resulted in protection against a virulent challenge. We thus show that, contrary to other species, immunization with Centrin-deficient *L. braziliensis* induced an immune response that is prone to disease development rather than protection against infection.

In *L. major* infection, early IL-4 production does not promote susceptibility to disease (Scott et al., 1996), as an initial IL-4 expansion early after infection does not preclude Th1 responses, even in resistant mice. Authors showed that, rather than IL-4, IL-12 is critical in determining susceptibility to infection. Another factor associated with susceptibility is parasite load at the inoculation. Low dose infection with *L. major* does not cause progressive infection, rather, induced a cellular response and control of disease (Bretscher et al., 1992). Lastly, during low dose immunization with *L. major*, it has been shown that IFN- $\gamma$ -producing CD8<sup>+</sup> T cells are also activated, promoting a switch from a Th2 to a protective Th1 response (Uzonna et al., 2004b). Herein, we have not evaluated whether lower doses of *LbCen*<sup>-/-</sup> might induce a different response regarding protection, however, we were unable to detect IL-12 following immunization with this cell line.

Exposing mice to two inoculations of *LbCen*<sup>-/-</sup> was unable to change the outcome of a challenge infection. As observed with a single immunization, priming and boosting did not result in enhancement of the immune response, capable of precluding lesion development. We thus confirm that centrin deficient *L. braziliensis* is an extremely attenuated strain, and that even a booster shot cannot sustain parasite persistence towards generation of a protective immune response. In conclusion, this study demonstrated that deletion of the Centrin 1 gene from *L. braziliensis* results in a highly attenuated strain that is safe for immunization but different from other centrin-deficient *Leishmania* species, it is not able to generate a protective immune response. We highlight that vaccination with soluble *L. major* promastigote exogenous antigens did not protect against *L. braziliensis* infection (Tonui and Titus, 2007) nor did immunization with highly conserved leishmania antigens (Salay et al., 2007). Thus, future studies are required to better understand the properties that attenuated *L. braziliensis* shall display in order to induce protective immune responses for pre-clinical development of vaccines.

### **Acknowledgements**

This work was supported by grants from IGM-Fiocruz Bahia. C.I.O is senior researcher CNPq. F.A.R and P.B.B received a fellowship from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de

Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001. L.T.A received a fellowship from CNPq. We thank Dr. Hira Nakashi for recommendations about protocols and results.

## References

- Alexander J, Satoskar AR, Russell DG. Leishmania species: models of intracellular parasitism. *J Cell Sci.* 1999 Sep;112 Pt 18:2993-3002. doi: 10.1242/jcs.112.18.2993.
- Belkaid Y, Hoffmann KF, Mendez S, Kamhawi S, Udey MC, Wynn TA, Sacks DL. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med.* 2001 Nov 19;194(10):1497-506. doi: 10.1084/jem.194.10.1497.
- Bretscher PA, Wei G, Menon JN, Bielefeldt-Ohmann H. Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science.* 1992 Jul 24;257(5069):539-42. doi: 10.1126/science.1636090.
- Burza S, Croft SL, Boelaert M. Leishmaniasis. *Lancet.* 2018 Sep 15;392(10151):951-970. doi: 10.1016/S0140-6736(18)31204-2
- Chatelain R, Varkila K, Coffman RL. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J Immunol.* 1992 Feb 15;148(4):1182-7.
- Charmoy M, Hurrell BP, Romano A, Lee SH, Ribeiro-Gomes F, Riteau N, Mayer-Barber K, Tacchini-Cottier F, Sacks DL. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 $\beta$ , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *Eur J Immunol.* 2016 Apr;46(4):897-911. doi: 10.1002/eji.201546015.
- Cummings HE, Tuladhar R, Satoskar AR. Cytokines and their STATs in cutaneous and visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:294389. doi: 10.1155/2010/294389.
- de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun.* 2005 Sep;73(9):5827-34. doi: 10.1128/IAI.73.9.5827-5834.2005.
- Dinc R. Leishmania Vaccines: the Current Situation with Its Promising Aspect for the Future. *Korean J Parasitol.* 2022 Dec;60(6):379-391. doi: 10.3347/kjp.2022.60.6.379.
- Ding AH, Nathan CF, Stuehr DJ. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *J Immunol.* 1988 Oct 1;141(7):2407-12.
- Ikeogu NM, Akaluka GN, Edechi CA, Salako ES, Onyilagha C, Barazandeh AF, Uzonna JE. *Leishmania* Immunity: Advancing Immunotherapy and Vaccine Development. *Microorganisms.* 2020 Aug 7;8(8):1201. doi: 10.3390/microorganisms8081201.
- Karmakar S, Ismail N, Oliveira F, Oristian J, Zhang WW, Kaviraj S, Singh KP, Mondal A, Das S, Pandey K, Bhattacharya P, Volpedo G, Gannavaram S, Satoskar M, Satoskar S, Sastry RM,

Oljuskin T, Sepahpour T, Meneses C, Hamano S, Das P, Matlashewski G, Singh S, Kamhawi S, Dey R, Valenzuela JG, Satoskar A, Nakhasi HL. Preclinical validation of a live attenuated dermatropic *Leishmania* vaccine against vector transmitted fatal visceral leishmaniasis. *Commun Biol*. 2021 Jul 30;4(1):929. doi: 10.1038/s42003-021-02446-x.

Kébaïer C, Uzonna JE, Beverley SM, Scott P. Immunization with persistent attenuated Delta lpg2 *Leishmania major* parasites requires adjuvant to provide protective immunity in C57BL/6 mice. *Infect Immun*. 2006 Jan;74(1):777-80. doi: 10.1128/IAI.74.1.777-780.2006.

Khamesipour A, Rafati S, Davoudi N, Maboudi F, Modabber F. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):423-38.

Khamesipour A, Dowlati Y, Asilian A, Hashemi-Fesharki R, Javadi A, Noazin S, Modabber F. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine*. 2005 May 25;23(28):3642-8. doi: 10.1016/j.vaccine.2005.02.015.

Kopf M, Brombacher F, Köhler G, Kienzle G, Widmann KH, Lefrang K, Humborg C, Ledermann B, Solbach W. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J Exp Med*. 1996 Sep 1;184(3):1127-36. doi: 10.1084/jem.184.3.1127.

Liew FY, Wei XQ, Proudfoot L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 1997 Sep 29;352(1359):1311-5. doi: 10.1098/rstb.1997.0115.

Lu S. Heterologous prime-boost vaccination. *Curr Opin Immunol*. 2009 Jun;21(3):346-51. doi: 10.1016/j.coi.2009.05.016.

Mauël J, Ransijn A, Buchmüller-Rouiller Y. Killing of *Leishmania* parasites in activated murine macrophages is based on an L-arginine-dependent process that produces nitrogen derivatives. *J Leukoc Biol*. 1991 Jan;49(1):73-82. doi: 10.1002/jlb.49.1.73.

Mayrink W, Williams P, da Costa CA, Magalhães PA, Melo MN, Dias M, Oliveira Lima A, Michalick MS, Ferreira Carvalho E, Barros GC, et al. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 1985 Jun;79(3):259-69. doi: 10.1080/00034983.1985.11811917.

McGwire B. S., and Satoskar A. R. (2014). Leishmaniasis: Clinical Syndromes and Treatment. *QJM* 107 (1), 7–14. doi: 10.1093/qjmed/hct116

Ministério da Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, Brasília. 2010: 29-30.

Mohebbali M, Nadim A, Khamesipour A. An overview of leishmanization experience: A successful control measure and a tool to evaluate candidate vaccines. *Acta Trop* 2019; 200: 105173. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105173>

Novais FO, Carvalho LP, Graff JW, Beiting DP, Ruthel G, Roos DS, Betts MR, Goldschmidt MH, Wilson ME, de Oliveira CI, Scott P. Cytotoxic T cells mediate pathology and metastasis in cutaneous leishmaniasis. *PLoS Pathog*. 2013;9(7):e1003504.

Novais FO, Wong AC, Villareal DO, Beiting DP, Scott P. CD8+ T Cells Lack Local Signals to Produce IFN- $\gamma$  in the Skin during Leishmania Infection. *J Immunol*. 2018 Mar 1;200(5):1737-1745. doi: 10.4049/jimmunol.1701597.

Pan American Health Organization. LEISHMANIASES Epidemiological Report on the Region of the Americas. 2022. [Accessed 05/02/2023]  
[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56831/PAHOCDEVT220021\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56831/PAHOCDEVT220021_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y)

Pandey SC, Kumar A, Samant M. Genetically modified live attenuated vaccine: A potential strategy to combat visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol*. 2020 Sep;42(9):e12732. doi: 10.1111/pim.12732.

Peters NC, Kimblin N, Secundino N, Kamhawi S, Lawyer P, et al. (2009) Vector Transmission of Leishmania Abrogates Vaccine-Induced Protective Immunity. *PLOS Pathogens* 5(6): e1000484. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000484>

Reed SG, Badaró R, Masur H, Carvalho EM, Lorenco R, Lisboa A, Teixeira R, Johnson WD Jr, Jones TC. Selection of a skin test antigen for American visceral leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 1986 Jan;35(1):79-85. doi: 10.4269/ajtmh.1986.35.79.

Santos D, Campos TM, Saldanha M, Oliveira SC, Nascimento M, Zamboni DS, Machado PR, Arruda S, Scott P, Carvalho EM, Carvalho LP. IL-1 $\beta$  Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol*. 2018 May;138(5):1107-1115. doi: 10.1016/j.jid.2017.11.029.

Saljoughian N, Taheri T, Rafati S. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. *Front Immunol*. 2014 Mar 31;5:134. doi: 10.3389/fimmu.2014.00134.  
Scott P, Eaton A, Gause WC, di Zhou X, Hondowicz B. Early IL-4 production does not predict susceptibility to Leishmania major. *Exp Parasitol*. 1996 Nov;84(2):178-87. doi: 10.1006/expr.1996.0103.

Selvapandiyan A, Duncan R, Debrabant A, Bertholet S, Sreenivas G, Negi NS, Salotra P, Nakhasi HL. Expression of a mutant form of Leishmania donovani centrin reduces the growth of the parasite. *J Biol Chem*. 2001 Nov 16;276(46):43253-61. doi: 10.1074/jbc.M106806200.

Selvapandiyan A, Duncan R, Debrabant A, Lee N, Sreenivas G, Salotra P, Nakhasi HL. Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):455-66.

Selvapandiyan A, Debrabant A, Duncan R, Muller J, Salotra P, Sreenivas G, Salisbury JL, Nakhasi HL. Centrin gene disruption impairs stage-specific basal body duplication and cell cycle progression in Leishmania. *J Biol Chem*. 2004 Jun 11;279(24):25703-10. doi: 10.1074/jbc.M402794200.

Selvapandiyan A, Dey R, Nylen S, Duncan R, Sacks D, Nakhasi HL. Intracellular replication-deficient Leishmania donovani induces long lasting protective immunity against visceral leishmaniasis. *J Immunol*. 2009 Aug 1;183(3):1813-20. doi: 10.4049/jimmunol.0900276.

Sharma R, Avendaño Rangel F, Reis-Cunha JL, Marques LP, Figueira CP, Borba PB, Viana SM, Beneke T, Bartholomeu DC, de Oliveira CI. Targeted Deletion of Centrin in *Leishmania braziliensis* Using CRISPR-Cas9-Based Editing. *Front Cell Infect Microbiol*. 2022 Feb 17;11:790418. doi: 10.3389/fcimb.2021.790418.

Sharples CE, Shaw MA, Castes M, Convit J, Blackwell JM. Immune response in healthy volunteers vaccinated with BCG plus killed leishmanial promastigotes: antibody responses to mycobacterial and leishmanial antigens. *Vaccine*. 1994 Nov;12(15):1402-12. doi: 10.1016/0264-410x(94)90149-x.

Silvestre R, Cordeiro-da-Silva A, Ouaiissi A. Live attenuated *Leishmania* vaccines: a potential strategic alternative. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*. 2008 Mar-Apr;56(2):123-6. doi: 10.1007/s00005-008-0010-9.

Sundar S, Singh B. Identifying vaccine targets for anti-leishmanial vaccine development. *Expert Rev Vaccines*. 2014 Apr;13(4):489-505. doi: 10.1586/14760584.2014.894467.

Uzonna JE, Wei G, Yurkowski D, Bretscher P. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *J Immunol*. 2001 Dec 15;167(12):6967-74. doi: 10.4049/jimmunol.167.12.6967.

Uzonna JE, Späth GF, Beverley SM, 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. doi: 10.4049/jimmunol.172.6.3793.

Uzonna JE, Joyce KL, Scott P. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med*. 2004 Jun 7;199(11):1559-66. doi: 10.1084/jem.20040172.

Vélez, I. D. et al. 2005. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. 99:593–598.

Velez R, Gállego M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. *Trop Med Int Health* 2020; 25: 540-557. <https://doi.org/10.1111/tmi.13382>

Volpedo G, Pacheco-Fernandez T, Holcomb EA, Zhang WW, Lypaczewski P, Cox B, Fultz R, Mishan C, Verma C, Huston RH, Wharton AR, Dey R, Karmakar S, Oghumu S, Hamano S, Gannavaram S, Nakhasi HL, Matlashewski G, Satoskar AR. Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against New World cutaneous leishmaniasis. *NPJ Vaccines*. 2022a Mar 2;7(1):32. doi: 10.1038/s41541-022-00449-1.

Volpedo G, Bhattacharya P, Gannavaram S, Pacheco-Fernandez T, Oljuskin T, Dey R, Satoskar AR, Nakhasi HL. The History of Live Attenuated *Centrin* Gene-Deleted *Leishmania* Vaccine Candidates. *Pathogens*. 2022b Apr 2;11(4):431. doi: 10.3390/pathogens11040431.

Wanderley JL, Barcinski MA. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. *Cell Mol Life Sci*. 2010 May;67(10):1653-9. doi: 10.1007/s00018-010-0291-0.



Wiech H, Geier BM, Paschke T, Spang A, Grein K, Steinkötter J, Melkonian M, Schiebel E. Characterization of green alga, yeast, and human centrin. Specific subdomain features determine functional diversity. *J Biol Chem.* 1996 Sep 13;271(37):22453-61. doi: 10.1074/jbc.271.37.22453.

Zaph C, Uzonna J, Beverley SM, Scott P. Central memory T cells mediate long-term immunity to *Leishmania major* in the absence of persistent parasites. *Nat Med.* 2004 Oct;10(10):1104-10. doi: 10.1038/nm1108.Epub2004Sep26.PMID:1544868.

Zhang WW, Karmakar S, Gannavaram S, Dey R, Lypaczewski P, Ismail N, Siddiqui A, Simonyan V, Oliveira F, Coutinho-Abreu IV, DeSouza-Vieira T, Meneses C, Oristian J, Serafim TD, Musa A, Nakamura R, Saljoughian N, Volpedo G, Satoskar M, Satoskar S, Dagur PK, McCoy JP, Kamhawi S, Valenzuela JG, Hamano S, Satoskar AR, Matlashewski G, Nakhasi HL. A second generation leishmanization vaccine with a markerless attenuated *Leishmania major* strain using CRISPR gene editing. *Nat Commun.* 2020 Jul 10;11(1):3461. doi: 10.1038/s41467-020-17154-z.

## 6 DISCUSSÃO

As leishmanioses abrangem um espectro de infecções tropicais negligenciadas, afetando principalmente países em desenvolvimento e regiões pobres, sendo um problema global de saúde pública. No controle da disseminação e erradicação da infecção por *Leishmania*, o diagnóstico precoce e o tratamento adequado são etapas essenciais (KUMARI et al., 2022). As opções terapêuticas atuais para a leishmaniose permanecem limitadas devido à toxicidade, desafios na administração de medicamentos, falhas no tratamento e resistência aos medicamentos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Sendo assim, se faz necessário encontrar alternativas eficazes para a prevenção das leishmanioses. Está estabelecido que a cura após uma infecção primária se associa com proteção de longa duração contra a reinfeção, indicando que é possível o desenvolvimento de uma vacina (COUTINHO DE OLIVEIRA et al., 2020).

De forma simplificada, a composição de uma vacina consiste em antígenos associados a um adjuvante, que, juntamente, irão induzir a resposta imunológica protetora desejada. Na prevenção da leishmaniose, vacinas de primeira, segunda e terceira geração vem sendo propostas. As vacinas de primeira geração utilizam misturas brutas de antígenos do parasita, não necessitando de adjuvante por essas misturas serem capazes de estimular a resposta imune. As vacinas de segunda geração usam antígenos recombinantes e adjuvantes específicos enquanto as vacinas de terceira geração utilizam DNA ou RNA específicos do patógeno ou uma plataforma/carreador que contenha componentes genéticos do patógeno para direcionar a resposta imunológica (COUTINHO DE OLIVEIRA et al., 2020).

A maioria das tentativas de desenvolver uma vacina contra a LC tem sido baseada em espécies de *Leishmania* do Velho Mundo. No entanto, essas espécies induzem um padrão de resposta que difere daquele induzido por espécies das Américas, especialmente *L. braziliensis*. Além disso, o entendimento da imunidade contra infecções por *Leishmania* em humanos é incompleto e diferentes espécies induzem respostas imunológicas distintas. A identificação de antígenos que direcionem a resposta antiparasita adequadamente é fundamental para se desenvolver uma vacina eficaz. Porém a maioria dos potenciais candidatos a vacina ainda está em estágio de pesquisa, sem nem terem avançado para teste em diferentes modelos pré-clínicos, mostrando o quanto este tema é negligenciado (COUTINHO DE OLIVEIRA et al., 2020).

Avanços no desenvolvimento de vacinas incluem a descoberta de fatores essenciais para a sobrevivência do parasito assim como seus fatores de virulência, os quais podem ser alvos/candidatos vacinais. Dentre os fatores de virulência mais explorados como candidatos a vacina temos a proteína A2 da *L. donovani*, responsável pela visceralização de *L. donovani* e

*L. infantum*. A LeishTec®, vacina aprovada no Brasil, contra a leishmaniose visceral canina é formulada com o antígeno recombinante A2 (KUMARI et al., 2022). Além disso, uma única dose de *L. tarentolae* expressando A2 protegeu contra a infecção por *L. infantum* em camundongos BALB/c. A proteção foi demonstrada pela diminuição da carga parasitária no fígado e no baço e promoveu uma resposta Th1. A administração intravenosa resultou em proteção parcial com resposta imunológica do tipo Th2 (MIZBANI et al., 2011). Já com relação a fatores essenciais para a sobrevivência do parasita e candidatos vacinais, destacamos o gene da centrina. A deleção do gene Centrina 1, explorada em *L. donovani* (*LdCen*<sup>-/-</sup>) (SELVAPANDIYAN et al., 2009), *L. major* (*LmCen*<sup>-/-</sup>) (ZHANG et al., 2020) e *L. mexicana* (*LmexCen*<sup>-/-</sup>) (Volpedo et al., 2022a), proporcionou atenuação do parasita e, paralelamente, excelentes possibilidades de proteção contra o desafio. Portanto, a utilização de linhagens celulares de Leishmania atenuadas, como a *LdCen*<sup>-/-</sup>, *LmCen*<sup>-/-</sup> e *LmexCen*<sup>-/-</sup>, têm o potencial de se tornarem candidatos a vacinas para a leishmaniose, uma vez que induzem resposta imune protetora sem apresentar os efeitos colaterais da leishmanização, tais como reações localizadas exacerbadas e hipersensibilidade.

Recentemente, a tecnologia CRISPR-Cas9 tem permitido a manipulação rápida e escalável do genoma de Leishmania (BENEKE et al., 2017; BENEKE; GLUENZ, 2019; ZHANG; LYPACZEWSKI; MATLASHEWSKI, 2020), uma grande vantagem especialmente para *L. braziliensis*, uma espécie conhecida pela plasticidade do seu genoma (PEACOCK et al., 2007), e associada a manifestações clínicas graves, como mucosa e leishmaniose disseminada, responsável pela maioria dos casos de CL nas Américas (DAVID; CRAFT, 2009; BURZA et al., 2018). Esta tecnologia foi aplicada pela primeira vez em Leishmania para gerar uma *L. mexicana* imóvel, deficiente em PF16 (BENEKE et al., 2017). Recentemente, Adaiu e colaboradores usaram esta ferramenta para gerar uma linha celular da *L. braziliensis* deficiente em HSP-23 e HSP-100 (ADAUI et al., 2020), recapitulando o fenótipo observado na *L. donovani* nocaute para HSP23 e mostrando a viabilidade do CRISPR para a manipulação genética de *L. braziliensis*. Uma vez que o uso dessa tecnologia já demonstrou sucesso na geração de linhagens celulares deficientes em genes específicos, permitindo melhor entendimento da biologia do parasita e potenciais alvos para ferramentas imunoproláticas, nós usamos a mesma abordagem para gerar uma ferramenta imunoprolática contra a LTA.

Neste contexto, utilizamos a técnica de CRISPR/Cas9 para realizar a deleção direcionada da centrina em um isolado clínico de *L. braziliensis* (MHOM/BR/00/BA788) que não contém o Vírus de RNA de Leishmania (LRV1) (F. Novais, comunicação pessoal). A centrina é uma proteína do citoesqueleto que se liga ao cálcio e está envolvida na duplicação

do centrissoma em eucariotos (SALISBURY, 1995; SALISBURY et al., 2002). Para a deleção dos dois alelos da centrina, foi gerada uma linha celular de *L. braziliensis* expressando Cas9 e T7-RNAP. Os alelos foram substituídos por marcadores de seleção de neomicina e puromicina, em uma abordagem diferente da utilizada em *L. donovani*, onde o mutante foi gerado por recombinação homóloga de alelos de centrina pelos marcadores selecionáveis higromicina e neomicina (SELVAPANDIYAN et al., 2001).

O sequenciamento do genoma completo dos parasitas *L. donovani* deficientes em centrina, revelou deleções fora do alvo abrangendo até 6.900 bp em loci não contíguos em vários cromossomos, incluindo sequências codificantes (GANNAVARAM et al., 2017). Enquanto no nosso trabalho, conseguimos deletar com sucesso apenas o gene da centrina do genoma da *L. braziliensis* usando a tecnologia de edição CRISPR/Cas9 (SHARMA et al., 2022). Os mutantes da *L. braziliensis* deficientes em centrina apresentaram atenuação de crescimento *in vitro* e *in vivo*, com o fenótipo multinucleado característico observado em amastigotas da *L. donovani* (SELVAPANDIYAN et al., 2004). Além disso, foi realizado o sequenciamento do genoma completo de *LbCas9T7* e *LbCen<sup>-/-</sup>*, que confirmou a deleção específica do locus da centrina LbM22.1290 no mutante *LbCen<sup>-/-</sup>*, sem nenhum sinal de translocação para outro local genômico. Nossa análise também não sugere efeitos fora do alvo.

Mutantes de *L. donovani* com deficiência de centrina são incapazes de se replicar no estágio intracelular do amastigota, e seu crescimento é seletivamente interrompido, resultando em parasitas multinucleados (SELVAPANDIYAN et al., 2004). Nossos resultados corroboram que a deficiência de centrina afeta o crescimento da *L. braziliensis*, já que amastigotas *LbCen<sup>-/-</sup>* axênicos crescem mais lentamente em comparação com *LbWT* e apresentam múltiplos núcleos, como observado anteriormente em mutantes deficientes de centrina de *L. donovani* (SELVAPANDIYAN et al., 2004). Por outro lado, o crescimento *in vitro* de promastigotas *LbCen<sup>-/-</sup>* não foi alterado, e a morfologia celular foi semelhante quando comparados com *LbWT* e *LbCas9T7*. Outras análises ultraestruturais confirmaram que as alterações morfológicas observadas em amastigotas *LbCen<sup>-/-</sup>* não estavam presentes em *LbWT* nem *LbCas9T7*. Como na *L. donovani* deficiente em centrina, *LbCen<sup>-/-</sup>* apresenta células pleomórficas e anormalmente grandes, citocinese falhada que, coletivamente, resulta em morte celular (SELVAPANDIYAN et al., 2004). Com relação à sobrevivência na célula hospedeira, uma análise de curso de tempo mostrou que a carga parasitária de macrófagos infectados com *LbCen<sup>-/-</sup>* é significativamente menor em comparação com células infectadas com *LbWT*, confirmando que a deficiência da centrina em *L. braziliensis* também prejudica a sobrevivência dentro da célula hospedeira.

Considerando o crescimento menos eficiente dos amastigotas *LdCen*<sup>-/-</sup> (Selvapandiyan et al., 2004), foi proposto o uso desta linha atenuada como uma estratégia de profilaxia imunológica contra a leishmaniose visceral. Com base em experimentos *in vitro* e *in vivo*, onde os mutantes vivos não conseguiram se replicar em macrófagos humanos diferenciados e não foram detectados parasitas no baço ou fígado de camundongos infectados, confirmou-se que a atenuação foi mantida, garantindo a segurança da abordagem (SELVAPANDIYAN et al., 2009). É importante destacar que após desafio com parasitas vivos, camundongos previamente inoculados com *LdCen*<sup>-/-</sup> mostraram uma redução significativa na carga parasitária. Este resultado foi correlacionado com o desenvolvimento de uma resposta celular Th1, caracterizada pela presença de células T CD4<sup>+</sup> secretoras de IFN- $\gamma$  / IL-2 / TNF- $\alpha$  (SELVAPANDIYAN et al., 2009).

Nosso estudo avaliou a capacidade de *LbCen*<sup>-/-</sup> de infectar macrófagos murinos, demonstrando que, embora seja capaz de infectá-los, a porcentagem de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares são significativamente menores em comparação com a cepa selvagem de *L. braziliensis*. Estes resultados corroboram os observados com *L. donovani* (SELVAPANDIYAN et al., 2009), indicando que a deleção da centrina em *L. braziliensis* recapitula o fenótipo atenuado. Além disso, a exposição de macrófagos a *LbCen*<sup>-/-</sup> ou *LbWT* levou a um resultado semelhante em relação à produção de mediadores inatos, como TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-10 ou NO. No entanto, a infecção com *LbCen*<sup>-/-</sup> resultou em um aumento significativo na produção de IL-1 $\beta$  em comparação com *LbWT*. A IL-1 $\beta$  é produzida após a ativação do inflamossoma NLRP3 e está associada à patologia aumentada em modelos murinos de leishmaniose cutânea (CHARMOY et al., 2016; NOVAIS et al., 2018). Além disso, a produção de IL-1 $\beta$  por monócitos intermediários tem sido associada à imunopatologia na leishmaniose cutânea humana causada por *L. braziliensis* (Santos et al., 2018).

A *LdCen*<sup>-/-</sup> tem sido amplamente estudada como uma ferramenta de imunoprofilaxia. Após a infecção *in vivo*, observou-se rápida e completa eliminação da *LdCen*<sup>-/-</sup> no baço e no fígado de camundongos, bem como redução da carga parasitária em hamsters, sendo indetectável no fígado, indicando a segurança dessa linhagem atenuada (SELVAPANDIYAN et al., 2009). A *LbCen*<sup>-/-</sup> reproduz esses achados, com a detecção dos parasitas ocorrendo em um ponto inicial de tempo (4 dias) após a inoculação na derme da orelha de camundongos, e posteriormente sendo completamente eliminados e não mais detectados. Assim, a dificuldade de sobrevivência da *LbCen*<sup>-/-</sup> *in vitro* também foi observada *in vivo*, confirmando seu perfil de infecção atenuado.

Sabe-se que uma infecção anterior por *Leishmania* induz imunidade robusta, conforme demonstrado no início pela prática de leishmanização (KHAMESIPOUR et al., 2005; PACHECO-FERNANDEZ et al., 2021), indicando que a imunoprofilaxia para leishmaniose é um objetivo alcançável. Conseqüentemente, uma cepa mutante de segunda geração da *L. major*, com deficiência da centrina (*LmCen*<sup>-/-</sup>), mostrou um fenótipo atenuado após inoculação em camundongos (ZHANG et al., 2020). A imunização com esta linha celular, livre de marcadores de resistência a antibióticos, resultou em proteção contra o desafio com flebotômíneos infectados, mostrando, pela primeira vez, que a edição do genoma mediada por CRISPR pode ser usada para o desenvolvimento de *Leishmania* atenuada que não causa doença e, em paralelo, induz o desenvolvimento de uma resposta protetora, semelhante à leishmanização. Recentemente, essa cepa *LmCen*<sup>-/-</sup> teve uma validação pré-clínica como vacina contra leishmaniose visceral, causada por *L. donovani*, transmitida por flebotômíneos. Os autores demonstraram que uma única injeção intradérmica confere proteção robusta e durável contra LV letal transmitida naturalmente por picadas de flebotômíneos infectados com *L. donovani* e previne a mortalidade. Este estudo demonstrou que os parasitas *LmCen*<sup>-/-</sup> são seguros e eficazes contra a VL e é uma forte candidata a ser testada em um ensaio clínico em humanos (KARMAKAR et al., 2021). Recentemente, também foi desenvolvida uma cepa de *L. mexicana* deficiente em centrina (*LmexCen*<sup>-/-</sup>) usando CRISPR/Cas9, a qual foi testada como candidato vacinal em modelo murino contra a leishmaniose cutânea do Novo Mundo causada por *L. mexicana* (VOLPEDO et al., 2022a) e contra a leishmaniose visceral do Velho Mundo causada por *L. donovani* (KARMAKAR et al., 2022), mostrando segurança e conferindo proteção contra a infecção virulenta.

Neste sentido, a inoculação de camundongos BALB/c com *LbCen*<sup>-/-</sup> foi considerada segura, pois os parasitas não induziram o desenvolvimento de lesões, corroborando os resultados obtidos em outras pesquisas envolvendo *Leishmania sp* deficiente em Centrin-1. (SELVAPANDIYAN et al., 2009; ZHANG et al., 2020, VOLPEDO et al., 2022a). Considerando o perfil atenuado de *LbCen*<sup>-/-</sup> em relação ao desenvolvimento da lesão, avaliamos sua capacidade de conferir imunidade. Contudo, para nossa surpresa, a imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> não conseguiu inibir o desenvolvimento da lesão após o desafio com *LbWT*, diferentemente dos relatos com outras *Leishmania sp* deficientes em centrina (SELVAPANDIYAN et al., 2009; ZHANG et al., 2020, VOLPEDO et al., 2022a), em que a leishmania atenuada foi capaz de prevenir o desenvolvimento da doença, tanto na forma cutânea (ZHANG et al., 2020; VOLPEDO et al., 2022a) quanto na forma visceral (SELVAPANDIYAN et al., 2009; KARMAKAR et al., 2022), inclusive em modelos de desafio em leishmaniose transmitida por



flebotomíneos (ZHANG et al., 2020), considerado como padrão-ouro de desafios na leishmaniose.

A literatura mostra que a imunidade protetora contra a leishmaniose requer baixos níveis de parasitas persistentes (UZONNA et al., 2004a; UZONNA et al., 2004b; KÉBAÏER et al., 2006) e a eliminação completa do parasita leva à perda de imunidade (UZONNA et al., 2001). No presente estudo, os parasitas *LbCen*<sup>-/-</sup> foram detectados no início (2 semanas depois), mas foram rapidamente eliminados, uma vez que não puderam ser recuperados do local de inoculação ou nos linfonodos de drenagem cinco semanas depois da imunização. Esses resultados diferem dos relatados para *LdCen*<sup>-/-</sup> (SELVAPANDIYAN et al., 2009), *LmCen*<sup>-/-</sup> (ZHANG et al., 2020) e *LmexCen*<sup>-/-</sup> (VOLPEDO et al., 2022a), em que os parasitas foram detectados cinco semanas após a inoculação, indicando uma maior capacidade de sobrevivência no hospedeiro vertebrado, em comparação com *LbCen*<sup>-/-</sup>. Desta forma, podemos sugerir que a menor capacidade de *LbCen*<sup>-/-</sup> sobreviver após a inoculação in vivo pode explicar a falta de uma resposta imune protetora, como observado em outras leishmanias deficientes em centrina. Importante mencionar que a imunização com *LdCen*<sup>-/-</sup> foi capaz de proteger contra *L. braziliensis* (SELVAPANDIYAN et al., 2009), o que sugere que a persistência do parasita é fundamental para a geração de uma resposta imune protetora eficaz. Essa informação reforça a importância de compreender os mecanismos que regulam a sobrevivência e a persistência do parasita no hospedeiro, a fim de desenvolver estratégias mais eficazes de prevenção e tratamento da leishmaniose. Contrário à imunização com *LdCen*<sup>-/-</sup>, a vacinação com antígenos exógenos promastigotas solúveis de *L. major* e antígenos de leishmania altamente conservados, não protege contra a infecção por *L. braziliensis* (TONUI; TITUS, 2007; SALAY et al., 2007). Portanto, estudos futuros são necessários para melhor compreender melhor as propriedades que uma cepa de *L. braziliensis* atenuada deverá apresentar para induzir respostas imunes protetoras, visando ao desenvolvimento pré-clínico de vacinas.

Por outro lado, neste trabalho também comparamos as respostas imunes geradas pela imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> versus a induzida pela leishmanização. Uma exposição prévia a *L. braziliensis*, seguida de cicatrização espontânea das lesões conferiu proteção contra um desafio virulento subsequente. A proteção conferida pela leishmanização foi associada à resposta imune celular, produção elevada de IFN- $\gamma$  durante as respostas de memória imunológica, juntamente com uma carga parasitária significativamente reduzida. Por outro lado, a imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> resultou numa resposta imune mais voltada para Th2, com níveis elevados de IL-4, IL-10 e IL-17 e níveis mais baixos de anticorpos IgG1 e IgG2a. Embora a produção de IFN- $\gamma$  tenha sido semelhante em camundongos imunizados com *LbCen*<sup>-/-</sup> e naqueles submetidos à

leishmanização, IL-4 e IL-10 foram ambas reguladas positivamente após a imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup>, em comparação com camundongos leishmanizados. Isso sugere que a imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> induziu uma resposta imune mais propensa ao desenvolvimento da doença do que à proteção contra a infecção, diferentemente do que foi observado em outras espécies de *Leishmania* deficientes em centrina. É importante destacar que durante a infecção de camundongos BALB/c por *L. major* a IL-10 foi associada à persistência do parasita (BELKAID et al., 2001), também o tratamento com anticorpo monoclonal anti-IL-4 (CHATELAIN et al., 1992; KOPF et al., 1996) ou o emprego de camundongos deficientes em IL-4 mostrou que a produção precoce de IL-4 conduz uma resposta Th2 e, portanto, suscetibilidade à doença. Em comparação com o que observamos aqui, camundongos BALB/c imunizados com *LmexCen*<sup>-/-</sup> produziram níveis significativamente mais baixos de IL-10 e IL-4, respostas caracteristicamente induzidas por *L. mexicana* (VOLPEDO et al., 2022a). Essa modulação imune induzida por *L. mexicana* deficiente em centrina resultou em proteção contra um desafio virulento.

Em anos recentes, a literatura tem mostrado que a IL-4 pode contribuir para a patologia da infecção de duas maneiras: 1) A IL-4 suporta a produção de uma resposta imune Th2, caracterizada pela produção de IL-4 por células T CD4<sup>+</sup>; 2) A IL-4 promove a produção de IFN- $\gamma$  patogênico por células T CD8<sup>+</sup> (POUDEL et al., 2020). Esse estudo sugere que a IL-4 desempenha um papel importante na ativação das respostas de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> durante a infecção por *L. major*, o que pode contribuir para a patologia observada em camundongos BALB/c (POUDEL et al., 2020). Outro fator associado à suscetibilidade é a carga parasitária na inoculação. A infecção de baixa dose com *L. major* não causa infecção progressiva, ao contrário, induziu uma resposta celular e controle da doença (BRETSCHER et al., 1992). Por último, durante a imunização de baixa dose com *L. major*, foi demonstrado que as células T CD8<sup>+</sup> produtoras de IFN- $\gamma$  também são ativadas, promovendo uma mudança de uma resposta Th2 para uma resposta protetora Th1 (UZONNA et al., 2004b). Aqui, não avaliamos se doses menores de *LbCen*<sup>-/-</sup> poderiam induzir uma resposta diferente em relação à proteção, no entanto, não fomos capazes de detectar IL-12, a citocina que impulsiona as respostas imunes anti-leishmaniose do tipo T helper 1.

A exposição de camundongos a duas inoculações de *LbCen*<sup>-/-</sup> não resultou em alteração do resultado da infecção de desafio. Como observado com uma única imunização, o priming e o boosting não resultaram em aumento da resposta imune capaz de impedir o desenvolvimento de lesões. Assim, confirmamos que a cepa de *L. braziliensis* com deficiência de centrina é

extremamente atenuada e que mesmo uma injeção de reforço não pode sustentar a persistência do parasita em direção à geração de uma resposta imune protetora.

Visando o entendimento da resposta imune gerada após imunização no contexto de vacinação contra a leishmaniose, novos enfoques têm começado a ser estudados, por exemplo o papel emergente de mediadores metabólicos, como microRNAs e reprogramação epigenética, na infecção por *Leishmania*. Um trabalho recente, estudou os impulsadores metabólicos de diferenças imunológicas entre a infecção com cepas selvagens e deficientes em centrina de *L. mexicana*. Os resultados sugerem que a imunização com *LmexCen*<sup>-/-</sup> resulta em alterações metabólicas únicas, incluindo a regulação positiva do metabolismo de aspartato e a via da pentose fosfato (PPP) no local da inoculação (VOLPEDO et al., 2022c). Essas vias são conhecidas por induzir um fenótipo protetor pró-inflamatório em macrófagos, que é crucial para montar uma resposta imunológica protetora contra CL (VOLPEDO et al., 2022c). Assim, este tipo de estudos pode ser utilizado para entender mecanismos regulatórios imunológicos que podem ser críticos para a indução de imunidade protetora.

Também, outra abordagem que está sendo desenvolvida com o objetivo de acelerar o desenvolvimento de vacinas contra as leishmanioses é o uso de modelos de infecção humana controlada (*Controlled human infection model* -CHIM). Esses estudos visam expor, de maneira controlada, seres humanos a patógenos, com o propósito de avaliar a eficácia de vacinas em desenvolvimento ou para se estudar os mecanismos de patogênese da doença (PARKASH et al., 2021). Nesses estudos, é necessário que seja utilizado um agente infeccioso bem caracterizado e produzido de acordo com as Boas Práticas de Fabricação. No caso da leishmaniose, os estudos têm prosseguido nesse sentido, com a produção de *L. major* nestas condições para a realização de protocolos de CHIM. Estudos deste tipo devem acelerar a avaliação de candidatos vacinais em ensaios clínicos (PARKASH et al., 2021).

## 7 CONCLUSÕES

- A deleção do gene Centrina 1 do genoma de *L. braziliensis* resulta em uma cepa atenuada, com o fenótipo multinuclear característico observado em *LdCen*<sup>-/-</sup>, *LmCen*<sup>-/-</sup> e *LmexCen*<sup>-/-</sup>.
- A imunização com *LbCen*<sup>-/-</sup> não é capaz de gerar uma resposta imune robusta e protetora contra infecção virulenta com *L. braziliensis* WT.
- Novos estudos serão necessários para entender as características que uma cepa atenuada de *L. braziliensis* deve possuir a fim gerar respostas imunes protetoras contra um desafio virulento.

## REFERÊNCIAS

- ADAUI et al., Application of crispr/cas9-based reverse genetics in leishmania braziliensis: Conserved roles for hsp100 and hsp23. *Genes*. 11: 1-24, 2020.
- AKHOUNDI et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl Trop Dis*. 10: e0004349, 2016.
- AMATO, V. S et al. Mucosal leishmaniasis: Current scenario and prospects for treatment. *Acta Trop*.105:1-9, 2008.
- ALVAR et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS One* 7, e35671., 2012.
- ARMIJOS et al. Field trial of a vaccine against New World cutaneous leishmaniasis in an at-risk child population: safety, immunogenicity, and efficacy during the first 12 months of follow-up. *J. Infect. Dis*. 177: 1352–7, 1998.
- ARMIJOS et al. Safety, immunogenicity, and efficacy of an autoclaved *Leishmania amazonensis* vaccine plus BCG adjuvant against New World cutaneous leishmaniasis. *Vaccine*. 22: 1320–1326, 2004..
- AVISHEK et al. Gene deleted live attenuated *Leishmania* vaccine candidates against visceral leishmaniasis elicit pro-inflammatory cytokines response in human PBMCs. *Sci. Rep*. 6: 330592016.
- BAKER et al., Systematic functional analysis of *Leishmania* protein kinases identifies regulators of differentiation or survival. *Nat. Commun*. 12, 1244, 2021.
- BARRAL et al. Lymphadenopathy associated with *Leishmania braziliensis* cutaneous infection. *Am J Trop Med Hyg*. 47:587–92, 1992.
- BARRAL et al. Lymphadenopathy as the first sign of human cutaneous infection by *Leishmania braziliensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 53:256–9, 1995.
- BHATTACHARYA et al. Of Drugs and Trypanosomatids: New Tools and Knowledge to Reduce Bottlenecks in Drug Discovery. *Genes*. 11: 722, 2020.
- BELKAID, Y et al. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. *J Exp Med*. 194: 1497-506, 2001.
- BENEKE et al. Genetic dissection of a *Leishmania* flagellar proteome demonstrates requirement for directional motility in sand fly infections. *PLoS Pathog*. 15: e1007828, 2019.
- BENEKE; GLUENZ. LeishGEdit: A Method for Rapid Gene Knockout and Tagging Using CRISPR-Cas9. *Methods Mol Biol*. 1971: 189-210, 2019.

- BENEKE et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci.* 4: 170095, 2017.
- BITTENCOURT et al. In-situ identification of *Leishmania amazonensis* associated with diffuse cutaneous leishmaniasis in Bahia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 84: 585-586, 1989.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar americana.** Brasília: MS, 2017.
- BRETSCHER, P.A. A strategy to improve the efficacy of vaccination against tuberculosis and leprosy. *Immunol Today.* 13: 342-5, 1992..
- BURZA et al. Leishmaniasis. *Lancet.* 392, 951-970, 2018.
- CARVALHO, A. M et al.. Protection and Pathology in *Leishmania braziliensis* Infection. *Pathogens.*1: 466, 2022.
- CECÍLIO et al. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. *Front Immunol.* 5: 480, 2014..
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 5: 873-82, 2007.
- CHARMOY M. et al. The Nlrp3 inflammasome, IL-1 $\beta$ , and neutrophil recruitment are required for susceptibility to a nonhealing strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. *Eur J Immunol.* 46: 897-911, 2016.
- CHATELAIN, R, et al. IL-4 induces a Th2 response in *Leishmania major*-infected mice. *J Immunol.* 148: 1182-7, 1992.
- CHILDS, et al. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. *Ann Trop Med Parasitol.* 78: 25–34, 1984.
- CONCEIÇÃO, J. et al. Characterization of Neutrophil Function in Human Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. *PLoS Negl Trop Dis.* 10: e0004715, 2016.
- COUTINHO DE OLIVEIRA, B. et al. Vaccines for leishmaniasis and the implications of their development for American tegumentary leishmaniasis. *Hum Vaccin Immunother.* 16: 919-930, 2020.
- DAMASCENO et al. Conditional knockout of RAD51-related genes in *Leishmania major* reveals a critical role for homologous recombination during genome replication. *PLoS Genet.* 16: e1008828, 2020.
- DAMIANOU et al. Essential roles for deubiquitination in *Leishmania* life cycle progression. *PLoS Pathog.* 16: e1008455, 2020.
- DAVID; CRAFT. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Therapy.* 22: 491-502, 2009.



DE MOURA et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect. Immun.* 73, 5827–5834, 2005.

DE LUCA et al. Evaluation of the stability and immunogenicity of autoclaved and nonautoclaved preparations of a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Vaccine.* 17: 1179–85, 1999.

DE OLIVEIRA; BRODSKYN. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immunol.* 3, 145, 2012.

DE VRIES, H. J. C; SCHALLIG, H. D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. *Am J Clin Dermatol.* 23:823-840, 2022.

DEY, R. et al. Live attenuated *Leishmania donovani* p27 gene knockout parasites are nonpathogenic and elicit long-term protective immunity in BALB/c mice. *J Immunol.* 190: 2138-49, 2013.

DEY, R. et al. Characterization of cross-protection by genetically modified live-attenuated *Leishmania donovani* parasites against *Leishmania mexicana*. *J Immunol.* 193: 3513-27, 2014.

ELIKAEE, S et al. Development of a new live attenuated *Leishmania major* p27 gene knockout: Safety and immunogenicity evaluation in BALB/c mice. *Cell Immunol.* 332: 24-31, 2018.

ELIKAEE, S et al. *Leishmania major* p27 gene knockout as a novel live attenuated vaccine candidate: Protective immunity and efficacy evaluation against cutaneous and visceral leishmaniasis in BALB/c mice. *Vaccine.* 37: 3221-3228, 2019.

ELIKAEE, S et al. Live attenuated *Leishmania major* p27 gene knockout as a novel vaccine candidate: A study on safety, protective immunity and efficacy against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *Acta Trop.* 225: 106153, 2022.

ESPADA et al., Ros3 (Lem3p/CDC50) Gene Dosage Is Implicated in Miltefosine Susceptibility in *Leishmania (Viannia) braziliensis* Clinical Isolates and in *Leishmania (Leishmania) major*. *ACS Infect Dis.* 7: 849-858, 2021.

EVANS, K. J; KEDZIERSKI, L. Development of Vaccines against Visceral Leishmaniasis. *J Trop Med.* 2012: 89281, 2012.

FIUZA et al. Induction of immunogenicity by live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites in dogs. *Vaccine.* 31:1785-92, 2013.

FIUZA et al. Vaccination using live attenuated *Leishmania donovani* centrin deleted parasites induces protection in dogs against *Leishmania infantum*. *Vaccine.* 33:280-8, 2015.

FIUZA et al. Intradermal Immunization of *Leishmania donovani* Centrin Knock-Out Parasites in Combination with Salivary Protein LJM19 from Sand Fly Vector Induces a Durable Protective Immune Response in Hamsters. *PLoS Negl Trop Dis.* 10: 1-17, 2016.

- GANNAVARAM et al. Whole genome sequencing of live attenuated *Leishmania donovani* parasites reveals novel biomarkers of attenuation and enables product characterization. *Sci Rep.* 7: 4718, 2017.
- GILLESPIE, P. M et al. Status of vaccine research and development of vaccines for leishmaniasis. *Vaccine.* 34: 2992-2995, 2016.
- GONTIJO; CARVALHO. American cutaneous leishmaniasis. *Rev Soc Bras Trop.* 36: 71–80.  
Gonzalez-Lombana C et al. 2011. IL-17 mediates immunopathology in the absence of IL-10 following *Leishmania major* infection. *PLoS Pathog.* 9: e1003243, 2003.
- GRIMALDI JR, G. et al. A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am J Trop Med Hyg.* 41: 687-725, 1989.
- GUIMARÃES et al. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar. *Gazeta Médica da Bahia.* 75: 66-74, 2005.
- ISHEMGULOVA, A. et al. CRISPR/Cas9 in *Leishmania mexicana*: A case study of LmxBTN1. *PLoS One.* 13: e0192723, 2018.
- JESUS-SANTOS, F. H., et al. LPG2 Gene Duplication in *Leishmania infantum*: A Case for CRISPR-Cas9 Gene Editing. *Front Cell Infect Microbiol.* 10: 408, 2020.
- KARMAKAR, S. et al. Preclinical validation of a live attenuated dermatropic *Leishmania* vaccine against vector transmitted fatal visceral leishmaniasis. *Commun Biol.* 4: 929, 2021.
- KARMAKAR, S. et al., 2022. Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against Old World visceral leishmaniasis. *NPJ Vaccines.* 7: 157, 2022.
- KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. *Nat Rev Microbiol.* 9: 604-15, 2011.
- KÉBAÏER, C. et al. Immunization with persistent attenuated Delta lpg2 *Leishmania major* parasites requires adjuvant to provide protective immunity in C57BL/6 mice. *Infect Immun.* 74: 777-80, 2006.
- KENNEY, R. T. et al. Protective immunity using recombinant human IL-12 and alum as adjuvants in a primate model of cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 163: 4481–4488, 1999.
- KHAMESIPOUR, A. et al. Leishmanization: use of an old method for evaluation of candidate vaccines against leishmaniasis. *Vaccine.* 23: 3642–3648, 2005.
- KHAMESIPOUR, A. et al. Leishmaniasis vaccine candidates for development: a global overview. *Indian J Med Res.* 123:423–438.
- Khamesipour, A. et al. Treatment of cutaneous lesion of 20 years' duration caused by leishmanization. *Indian J Dermatol.* 57:123–125, 2012.
- KUMARI, D. et al. Virulence factors of *Leishmania* parasite: Their paramount importance in unraveling novel vaccine candidates and therapeutic targets. *Life Sci.* 306: 120829, 2022.

- KOPF, M. et al. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with *Leishmania major*. *J Exp Med*. 184: 1127-36, 1996.
- LAFFITTE, M. N. et al. Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Res*. 5: 2350, 2016.
- LAINSON, R. Espécies neotropicais de *Leishmania*: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. *Rev Pan-Amazônica de Saúde*. 1: 13-32, 2010.
- LLANES, A. et al. The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L. (Viannia)* subgenus. *Sci Rep*. 5:8550, 2015.
- LOURADOUR, I. et al. In Vitro Generation of *Leishmania* Hybrids. *Cell Reports*. 31: 2211-1247, 2020.
- LYE, L. F. et al., Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog*. 6: e1001161.
- MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM*. 107: 7-14.
- MARZOCHI, M. C ; MARZOCHI, K. B. F. Tegumentary and Visceral Leishmaniasis in Brazil - Emerging Anthroponosis and Possibilities for Their Control. *Cad Saúde Públ*. 10: 359-375, 1994.
- MARZOCHI, M. C ; MARZOCHI, K. B. F. Proposta de uma classificação clínica simplificada para as leishmanioses tegumentares do novo mundo. *Rev Soc Bras Med Trop*. 27: 91, 1994b.
- MARZOCHI, K. B et al. Phase 1 Study of an Inactivated Vaccine against American Tegumentary Leishmaniasis in Normal Volunteers in Brazil. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. 93: 205–212, 1998.
- MAYRINK, W. et al. An experimental vaccine against American dermal leishmaniasis: experience in the State of Espírito Santo, Brazil. *Ann Trop Med Parasitol*. 79: 259–269, 1985.
- MENDONÇA, S. C et al. Characterization of human T lymphocyte-mediated immune responses induced by a vaccine against American tegumentary leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*. 53:195–201, 1995.
- MIZBANI, A. et al. Effect of A2 gene on infectivity of the nonpathogenic parasite *Leishmania tarentolae*. *Parasitol Res*. 109: 793-9, 2011.
- MOAFI, M. et al. *Leishmania* Vaccines Entered in Clinical Trials: A Review of Literature. *Int J Prev Med*. 10: 95, 2019.
- MODABBER, F. Vaccines against leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol*. 89: 83–88, 1995.
- MOMENI, A. Z et al. A randomised, double-blind, controlled trial of a killed *L. major* vaccine plus BCG against zoonotic cutaneous leishmaniasis in Iran. *Vaccine*. 17: 466–472, 1999.

- MONTOYA, A. et al. Transforming Growth Factor Beta (TGF $\beta$ 1) and Epidermal Growth Factor (EGF) as Biomarkers of *Leishmania (V) braziliensis* Infection and Early Therapeutic Response in Cutaneous Leishmaniasis: Studies in Hamsters. *Front Cell Infect Microbiol.* 8: 350, 2018.
- MOREIRA, P. O. L et al. Next-Generation Leishmanization: Revisiting Molecular Targets for Selecting Genetically Engineered Live-Attenuated *Leishmania*. *Microorganisms.* 11: 1043, 2023.
- NADIM, A. et al. Effectiveness of leishmanization in the control of cutaneous leishmaniasis. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 76: 377–383, 1983.
- NOVAIS, F. O; SCOTT, P. CD8+ T cells in cutaneous leishmaniasis: the good, the bad, and the ugly. *Semin Immunopathol.* 37:251-9, 2015.
- Novais, F. O. et al. CD8+ T Cells Lack Local Signals to Produce IFN- $\gamma$  in the Skin during *Leishmania* Infection. *J Immunol.* 200: 1737-1745, 2018.
- Pacheco-Fernandez, T., et al. 2021. Revival of Leishmanization and Leishmanin. *Front Cell Infect Microbiol* 11, 639801.
- PACE, D. Leishmaniasis. *J Infect.* 69: S10-8, 2014.
- PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniases epidemiological report on the Region of the Americas**, Washington, DC: PAHO, 2022. Disponible in: <[https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56831/PAHOCDEVT220021\\_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y,%20acessado%20em%2011/04/2022](https://iris.paho.org/bitstream/handle/10665.2/56831/PAHOCDEVT220021_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y,%20acessado%20em%2011/04/2022)>. Access in 13 abr. 2022.
- PARKASH, V. et al. Vaccines against leishmaniasis: using controlled human infection models to accelerate development. *Expert Rev Vaccines.* 20: 1407-1418, 2021.
- PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet.* 39: 839-847, 2007.
- POUDEL, B. et al. Acute IL-4 Governs Pathogenic T Cell Responses during *Leishmania* major Infection. *Immunohorizons.*4: 546-560, 2020.
- REGLI, I. B. et al. Survival Mechanisms Used by Some *Leishmania* Species to Escape Neutrophil Killing. *Front Immunol.* 8:1558, 2017.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis.* 7: 581-596, 2007.
- ROCHA, F. J. et al. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. *Infect Immun.* 75:3823-32, 2007.
- ROSA, A. C. et al. Predominance of *Leishmania braziliensis* in the regions of Três Braços and Corte de Pedra, Bahia, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82: 409-410, 1988.
- RUIZ-POSTIGO, J. A. et al. Global leishmaniasis surveillance: 2019-2020, a baseline for the 2030 roadmap. *Weekly epidemiological record.* 96: 401-420, 2021.

- SALAY, G. et al., Testing of four *Leishmania* vaccine candidates in a mouse model of infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the New World. *Clin Vaccine Immunol.* 14: 1173-81, 2007.
- SALISBURY, J. L. Centrin, centrosomes, and mitotic spindle poles. *Curr Opin Cell Biol.* 7: 39-45, 1995.
- SANTOS, D. et al. IL-1 $\beta$  Production by Intermediate Monocytes Is Associated with Immunopathology in Cutaneous Leishmaniasis. *J Invest Dermatol.* 138: 1107-1115.
- SALISBURY, J. L. et al. Centrin-2 is required for centriole duplication in mammalian cells. *Curr Biol.* 12: 1287-1292, 2002.
- SALJOUGHIAN, N. et al. Live vaccination tactics: possible approaches for controlling visceral leishmaniasis. *Front Immunol.* 5:e134, 2014.
- SCOTT, P.; NOVAIS F. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nat Rev Immunol.* 16: 581–592, 2016.
- SELVAPANDIYAN, A. et al. Expression of a mutant form of *Leishmania donovani* centrin reduces the growth of the parasite. *J.Biol. Chem.* 276: 43253-43261.
- SELVAPANDIYAN, A. et al. Centrin gene disruption impairs stage specific basal body duplication and cell cycle progression in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.* 279: 25703–25710, 2004.
- SELVAPANDIYAN, A. et al. Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123:455-466, 2006.
- SELVAPANDIYAN, A. et al. Intracellular Replication-Deficient *Leishmania donovani* Induces Long Lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. *J. Immunol.* 183: 1813-182, 2009.
- SERENO, D. *Leishmania (Mundinia) spp.*: from description to emergence as new human and animal *Leishmania* pathogens. *New Microbes New Infect.* 30:100540, 2019.
- SHARMA, R. et al. Targeted Deletion of Centrin in *Leishmania braziliensis* Using CRISPR-Cas9-Based Editing. *Front Cell Infect Microbiol.* 11: 790418, 2022.
- SHRIVASTAVA, R. et al., 2019. Deletion of a Single LeishIF4E-3 Allele by the CRISPR-Cas9 System Alters Cell Morphology and Infectivity of *Leishmania*. *mSphere* 4: 00450-19, 2019.
- STERKERS, Y. et al. Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics. *Trends Parasitol.* 30: 429-435, 2014.
- SUNDAR, S. et al. 2000. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. *Clin Infect Dis.* 31: 1104–1107, 2000.

TONUI, W.K; TITUS, R. G. Cross-protection against *Leishmania donovani* but not *L. braziliensis* caused by vaccination with *L. major* soluble promastigote exogenous antigens in BALB/c mice. *Am J Trop Med Hyg.* 76: 579-584, 2007.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 186:1829-34, 2002.

VAN ZANDBERGEN, G. et al. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol.* 173: 6521-5, 2004.

UZONNA, J. E. et al. Immune elimination of *Leishmania major* in mice: implications for immune memory, vaccination, and reactivation disease. *J Immunol.* 167: 6967-74, 2001.

UZONNA, J. E. et al. Low dose *Leishmania major* promotes a transient T helper cell type 2 response that is down-regulated by interferon gamma-producing CD8+ T cells. *J Exp Med.* 199: 1559-66, 2004a.

UZONNA, J. E. et al. Vaccination with phosphoglycan-deficient *Leishmania major* protects highly susceptible mice from virulent challenge without inducing a strong Th1 response. *J Immunol.* 172: 3793-7, 2004b.

VÉLEZ, I. D. et al. Safety and immunogenicity of a killed *Leishmania (L.) amazonensis* vaccine against cutaneous leishmaniasis in Colombia: a randomized controlled trial. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 94: 698–703, 2000.

VELEZ, I. D. et al. Failure of a killed *Leishmania amazonensis* vaccine against American cutaneous leishmaniasis in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 99: 593–598, 2005.

VERTHELYI, D. et al., 2CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates. *J Immunol.* 168:1659–1663.

VOLPEDO, G. et al. Centrin-deficient *Leishmania mexicana* confers protection against New World cutaneous leishmaniasis. *npj Vaccines.* 7: 32, 2022a.

VOLPEDO, G. et al. The History of Live Attenuated Centrin Gene-Deleted *Leishmania* Vaccine Candidates. *Pathogens.* 11: 431, 2022b.

VOLPEDO et al. *Leishmania mexicana* Centrin Knock out Parasites Promote M1-polarizing Metabolic Changes. *bioRxiv.* 508215, 2022c.

Voronov, E. et al. IL-1-induced inflammation promotes development of leishmaniasis in susceptible BALB/c mice. *Int Immunol.* 22:245–57, 2010.

WIECH, H. et al. Characterization of green alga, yeast, and human centrins. Specific subdomain features determine functional diversity. *J Biol Chem.* 37: 22453-22461, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Geneva. WHO, 2023. Disponible in: <[https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab\\_2](https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_2)>. Access in 13 abr. 2022.



YAGOUBAT, A. et al. Gene Editing in Trypanosomatids: Tips and Tricks in the CRISPR-Cas9 Era. *Trends Parasitol.* 36: 745-760, 2020.

YOUNIS, B. M. et al.. Safety and immunogenicity of ChAd63-KH vaccine in post-kala-azar dermal leishmaniasis patients in Sudan. *Mol Ther.* 29: 2366-2377, 2021.

ZHANG, W. W.; LYPACZEWSKI P; MATLASHEWSKI G. Application of CRISPR/Cas9-Mediated Genome Editing in Leishmania. *Methods Mol Biol.* 2116:199-224. doi: 10.1007/978-1-0716-0294-2\_14, 2020 .

ZHANG, W. W et al. A second generation leishmanization vaccine with a markerless attenuated *Leishmania major* strain using CRISPR gene editing. *Nat Commun.* 11: 3461, 2020.