

Universidade Federal de Minas Gerais

Faculdade de Farmácia

Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

Carlos Rodolpho Ferreira Brasil

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EDIÇÃO GÊNICA PELA
METODOLOGIA CRISPR/CAS9 EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Belo Horizonte

2020

Carlos Rodolpho Ferreira Brasil

**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EDIÇÃO GÊNICA PELA
METODOLOGIA CRISPR/CAS9 EM *LEISHMANIA AMAZONENSIS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia da UFMG como requisito parcial para obtenção do grau de mestre em ciências farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Ana Paula Salles Moura Fernandes

Belo Horizonte

2020

Brasil, Carlos Rodolpho Ferreira.
B823a Avaliação de diferentes protocolos para edição gênica pela metodologia CRISPR/Cas9 em *Leishmania Amazonensis* / Carlos Rodolpho Ferreira Brasil. – 2020.
100 f. : il.
Orientadora: Ana Paula Salles Moura Fernandes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Leishmania – Teses. 2. Leishmania amazonensis – Teses. 3. Nocaute gênico – Teses. 4. Transportador de miltefosina – Teses. I. Fernandes, Ana Paula Salles Moura. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 616.9364

Elaborado por Aline Guimarães Amorim – CRB-6/2292



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS



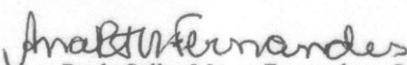
FOLHA DE APROVAÇÃO

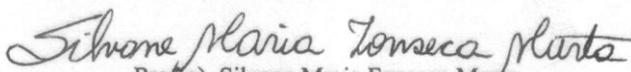
**AVALIAÇÃO DE DIFERENTES PROTOCOLOS PARA EDIÇÃO GÊNICA PELA
METODOLOGIA CRISPR/CAS9 EM LEISHMANIA AMAZONENSIS**

CARLOS RODOLPHO FERREIRA BRASIL

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, como requisito para obtenção do grau de Mestre em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS, área de concentração CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS.

Aprovada em 28 de fevereiro de 2020, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Ana Paula Salles Moura Fernandes - Orientador
UFMG


Prof(a). Silvane Maria Fonseca Murta
FIOCRUZ


Prof(a). Erich Birelli Tahara
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 28 de fevereiro de 2020.

AGRADECIMENTOS

À Deus pela força e proteção conferidas ao longo do caminho.

À Professora Doutora Ana Paula Fernandes, por sempre ter acreditado em mim dando-me a oportunidade de realizar este projeto. Muito obrigado pela liberdade e confiança conferidas, pelos aprendizados, discussões produtivas e crescimento imensurável.

Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular, pela convivência e auxílio durante a confecção do trabalho. Agradecimento especial ao mestrando Tiago Ricotta, pelos auxílios de todos os dias, especialmente com os experimentos de infecção de macrófagos; à doutoranda Tatiane Souto, pelos ensinamentos e trabalho conjunto nos projetos de CRISPR e ao graduando Mateus Cosso por nunca hesitar em ajudar. Um agradecimento mais que especial à graduanda Júlia Reis, por todos os dias de ajuda, pelos cuidados com as “crianças”, pela companhia durante as incontáveis PCRs e géis, pelo bom humor por toda a duração dos intermináveis experimentos, pelas inesquecíveis risadas e, principalmente, pelo estímulo diário de continuar com o trabalho, sempre aprendendo mais e compartilhando o conhecimento.

Aos antigos membros do laboratório, que estiveram presentes durante parte do projeto e sempre auxiliaram, cada um à sua maneira. Em especial, um agradecimento ao graduando Breno Goston e ao mestrando Mateus Sá, pelas discussões sempre produtivas, força conferida para continuidade do trabalho e incontáveis momentos de descontração. Um muito obrigado à Mestre Jéssica Gardone, pelos ensinamentos, principalmente no início do projeto, e por sempre estar disposta a ajudar. Um obrigado especial à Mestre Suellen Martins, por todo o auxílio e descontração durante os preparos das aulas práticas.

À Professora Doutora Santuza Teixeira, por todos os ensinamentos, visão crítica, sugestões ao longo do trabalho, discussões construtivas e por sempre abrir as portas. Um agradecimento especial aos membros do laboratório de Biologia molecular de tripanosomatídeos, em especial às Doutoradas Gabriela Burle e Viviane Grazielle, por

toda a paciência e ensinamentos sobre biologia molecular e ao Doutor Edson Oliveira, pelos ensinamentos em Bioinformática.

Ao INCTV, pelas contribuições ao trabalho, em especial pelo sequenciamento do genoma de *Leishmania amazonensis* PH8, em andamento. Aos membros do CT vacinas, por sempre terem sido receptivos e dispostos a ajudar durante as minhas visitas ao longo do projeto, em especial à Dra. Natália Salazar, pelos ensinamentos sobre purificação de proteínas recombinantes e principalmente pelo auxílio com a indução e purificação de SaCas9.

A todos os meus amigos, pelos diversos momentos de descontração, divertimento e extravasamento, contribuindo indiretamente para o bom rendimento do trabalho.

A todos os mestres que me marcaram ao longo dessa jornada além de me estimular cada vez mais a seguir o caminho da docência. Em especial aos Professores Odilon Rosa, Ricardo André, Juliano Zapparoli, Evandro Ferreira e José Luís dos Reis.

Aos meus familiares, pelo apoio incondicional. Em especial ao meu pai Nelson, minha mãe Andréa, minha irmã Amanda e minha avó Ângela que sempre acreditaram que em mim, sendo compreensivos e pacientes nos momentos difíceis além de nunca deixarem de me incentivar.

Um agradecimento em especial aos ausentes, minha avó Leda Prados, meu avô Nelson Brasil e meu padrinho Carlos Abdala, que infelizmente não puderam ver o final desse trabalho, mas sempre se sentiram orgulhosos pelo meu empenho para a realização do mesmo. Vocês sempre foram modelos a serem seguidos por mim.

RESUMO

O sistema CRISPR/Cas9 tem sido considerado uma ferramenta revolucionária para edição gênica em vários organismos. Os *knockouts* e *knock-ins* gerados por CRISPR/Cas9 permitem melhor entendimento dos impactos celulares, metabólicos e estruturais causados pela adição ou remoção de algum componente, podendo resultar em avanços no desenvolvimento de vacinas, diagnóstico ou intervenções terapêuticas. CRISPR/Cas9 já foi aplicado para diferentes espécies de parasitos do gênero *Leishmania*, mas não para *Leishmania amazonensis*, um dos agentes etiológicos mais importantes de leishmaniose tegumentar. No presente trabalho, testamos diferentes protocolos de CRISPR/Cas9 para induzir o *knockout* no Transportador de Miltefosina (TM) de *L. amazonensis* como prova de conceito. A expressão da Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) com a transfecção de dois plasmídeos: pLDCN, um vetor episomal e pRM006, que possui braços de homologia com sequências de UTR de genes de beta-tubulina, promovendo recombinação homóloga e integração no genoma. Uma sequência doadora contendo três códons de terminação *in tandem*, um sítio de restrição para HindIII e braços de homologia de 30pb foram, também, dados às células transfectadas para guiar o reparo da quebra da dupla fita de DNA por homologia. Alternativamente, expressamos em *Escherichia coli* a Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9) e confirmamos sua atividade *in vitro*. Formas promastigotas foram transfectadas com o complexo ribonucleoproteico SaCas9 recombinante e um SgRNA. Foi constatada edição gênica de TM em parasitos transfectados com pLDCN e RNA guia transcrito *in vitro*, delineado para essa espécie, apesar das limitações associadas ao genoma de *L. amazonensis* disponível, assim como para SaCas9 recombinante. Parasitos transfectados com pRM006 perderam a resistência à higromicina e não foram editados. A cepa gerada com SaCas9 recombinante se mostrou aproximadamente 6 vezes mais resistente que os parasitos selvagens à miltefosina. Avaliamos ainda a infectividade de parasitos mutantes para macrófagos da medula óssea de camundongos. No entanto, não foi observada diferença significativa nas taxas de infecção, quando comparados aos parasitos *wild type*. Em conjunto, nossos resultados demonstraram a possibilidade de edição do genoma de *L. amazonensis* por diferentes protocolos de CRISPR/Cas9, que podem ainda ser otimizados. Os parasitos resistentes a miltefosina podem agora ser melhor caracterizados em relação a alterações fenotípicas decorrentes da edição do gene TM.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9; *Leishmania*; *Leishmania amazonensis*; *knockout* gênico; transportador de miltefosina.

ABSTRACT

The CRISPR/Cas9 system has been considered as a revolutionary tool to promote gene edition in a wide array of organisms. The knockouts and knock-ins generated by CRISPR/Cas9 allow better understanding of cellular, metabolic or structural impacts caused by addition or removal of some component, which may result in advances related to vaccine development, diagnostic or therapeutic interventions. CRISPR/Cas9 has already been applied in different studies for different *Leishmania* species, but not to *Leishmania amazonensis*, one of the most important etiologic agents of tegumentary leishmaniasis. In the present work, we tested different CRISPR/Cas9 protocols to introduce knockout on *L. amazonensis* Miltefosine Transporter (MT) as a proof of concept. The expression of *Streptococcus pyogenes* Cas9 (SpCas9) was obtained by transfection with two plasmids: pLDCN, which is an episomal vector and pRM006, which contains homology arms with beta-tubulin UTR sequences, promoting homologous recombination, and integration to the genome. A Donor sequence containing three stop codons *in tandem* as well as a restriction site for HindIII and 30bp homology arms was also given to the transfected cells to guide the double strand break repair through homology. Alternatively, we expressed *Staphylococcus aureus* Cas9 (SaCas9) on *Escherichia coli* and assayed its activity *in vitro*. Promastigotes were transfected with a ribonucleoprotein complex of the recombinant SaCas9 and a SgRNA. MT edition was confirmed on parasites transfected with pLDCN and an *in vitro* transcribed SgRNA, designed to this species, despite the limitations associated with the current *L. amazonensis* genome sequence available, and as well as with recombinant SaCas9. Parasites previously transfected with pRM006 lost their resistance to hygromycin and weren't edited. The cell line generated using recombinant SaCas9 showed to be approximately 6 times more resistant to miltefosine than its wild type counterpart. We evaluated the infectivity of this mutant cell line to bone marrow derived macrophages. However, no significant difference was observed when comparing it to wild types. Together, our results showed the possibility of genome editing in *L. amazonensis* with different protocols of CRISPR/Cas9, which may still be optimized. The miltefosine resistant parasites may now be better characterized regarding the phenotypic changes related to the MT gene edition.

Keywords: CRISPR/Cas9; *Leishmania*; *Leishmania amazonensis*; genetic knockout; miltefosine transporter.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Endemicidade das formas cutânea e visceral da leishmaniose pelo mundo - OMS, 2017..... | 15 |
| Figura 2: Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp..... | 17 |
| Figura 3: Leishmaniose cutânea difusa causada por <i>Leishmania amazonensis</i> | 19 |
| Figura 4: Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes..... | 22 |
| Figura 5: Estrutura química da miltefosina | 23 |
| Figura 6: Mecanismos de ação propostos para miltefosina..... | 24 |
| Figura 7: Estrutura das ATPases tipo P..... | 26 |
| Figura 8: Funcionamento do sistema CRISPR/Cas9 em bactérias..... | 29 |
| Figura 9: Tipos de reparo de DNA..... | 31 |
| Figura 10 Estratégias para fornecimento de proteína Cas9 às células alvo..... | 33 |
| Figura 11: Possibilidades de uso do sistema CRISPR..... | 34 |
| Figura 12: Plasmídeo pRM006, para expressão constitutiva de SpCas9 em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> | 40 |
| Figura 13: Plasmídeo pLDCN, para expressão transiente de SpCas9 em diferentes espécies de <i>Leishmania</i> | 41 |
| Figura 14: Representação esquemática do protocolo de diluição seriada de drogas para avaliação de viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT..... | 44 |
| Figura 15: Plasmídeo pAc-SgRNA-Cas9, utilizado como <i>template</i> para a síntese dos SgRNAs..... | 48 |
| Figura 16: Determinação da IC50 de geneticina para <i>L. amazonensis</i> PH8 por ensaio de MTT..... | 56 |

| | |
|--|----|
| Figura 17: Avaliação da expressão de Cas9 por <i>L. amazonensis</i> tranfectada com o plasmídeo pLDCN..... | 57 |
| Figura 18: Determinação da IC50 de higromicina para <i>L. amazonensis</i> PH8 por ensaio de MTT..... | 58 |
| Figura 19: Digestão do plasmídeo pRM006 com enzima PacI..... | 59 |
| Figura 20: Avaliação da expressão de Cas9 por <i>L. amazonensis</i> tranfectada com o plasmídeo pRM006..... | 61 |
| Figura 21: Representação da estratégia de <i>knockout</i> do TM para <i>L. amazonensis</i> | 63 |
| Figura 22: Síntese dos <i>templates</i> para produção dos SgRNAs a partir de PCR..... | 64 |
| Figura 23: Determinação da IC50 de miltefosina para <i>L. amazonensis</i> PH8 por ensaio de MTT..... | 65 |
| Figura 24: Confirmação da geração de mutantes do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina por PCR, em parasitos com expressão transiente de SpCas9..... | 67 |
| Figura 25: Indução e purificação de SaCas9 recombinante..... | 68 |
| Figura 26: Ensaio de atividade <i>in vitro</i> para proteína SaCas9..... | 69 |
| Figura 27: Análise de viabilidade de utilização do SgRNA desenhado para promover <i>knockout</i> em <i>L. infantum</i> em <i>L. amazonensis</i> | 71 |
| Figura 28: Utilização de SgRNA desenhado para <i>L. infantum</i> para induzir alteração genética em <i>L. amazonensis</i> | 72 |
| Figura 29: Confirmação da geração de mutantes para o gene codificador da proteína transportadora de miltefosina gerado por proteína SaCas9 recombinante e SgRNA específico para o gene do transportador de miltefosina | 73 |

Figura 30: Determinação da IC50 de miltefosina para *L. amazonensis* PH8 KO, induzido por SaCas9 com SgRNA específico para o transportador de miltefosina, por ensaio de MTT.....74

Figura 31: Avaliação do potencial infectivo de *L. amazonensis* mutante para o TM...75

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Espécies de <i>Leishmania</i> presentes no Brasil e suas formas clínicas associadas..... | 18 |
| Tabela 2: Estratégias para fornecimento de proteína Cas9 às células alvo..... | 33 |
| Tabela 3: Condições de PCR para geração de <i>templates</i> de DNA para transcrição <i>in vitro</i> dos SgRNAs..... | 47 |
| Tabela 4: Condições de PCR para amplificação de fragmento contido no gene do TM..... | 50 |

LISTA DE ABREVIACOES

| | |
|-----------------------|--|
| ATP | Adenosina Tri Fosfato |
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BOD | <i>Biochemical Oxygen Demand</i> |
| Cas9 | <i>CRISPR associated protein 9</i> |
| CDS | <i>Coding Sequence</i> |
| CRISPR | <i>Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats</i> |
| crRNA | RNA CRISPR |
| dCas9 | <i>dead Cas9</i> |
| DMSO | Dimetilsulfoxido |
| DNA | cido desoxirribonucleico |
| dNTPs | Desoxirribonucleotideos Fosfatados |
| eGFP | <i>Green Fluorescent Protein</i> |
| FISH | <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i> |
| IC50 | <i>The half maximal Inhibitory Concentration</i> |
| IDT | Integrated DNA Technologies |
| KO | <i>Knockout</i> |
| <i>L. amazonensis</i> | <i>Leishmania amazonensis</i> |
| <i>L. donovani</i> | <i>Leishmania donovani</i> |
| LdMT | <i>Leishmania donovani</i> Miltefosine Transporter |
| <i>L. infantum</i> | <i>Leishmania infantum</i> |
| <i>L. major</i> | <i>Leishmania major</i> |

| | |
|--------------------|--|
| <i>L. mexicana</i> | <i>Leishmania mexicana</i> |
| Log | Logaritmica/Logaritmo |
| MMEJ | <i>Microhomology Mediated End Joining</i> |
| mRNA | RNA mensageiro |
| MT/TM | Miltefosine Transporter/Transportador de Miltefosina |
| MTT | brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) -2,5-difeniltetrazolio |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PAM | <i>Protospacer Adjacent Motifs</i> |
| PB | Pares de Base |
| PCR | <i>Polimerase Chain Reaction</i> |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| RPM | Rotações Por Minuto |
| SaCas9 | Cas9 de <i>Staphylococcus aureus</i> |
| SDS | Duodecil Sulfato de Sódio |
| SFB | Soro Fetal Bovino |
| SgRNA | <i>Single guide RNA</i> |
| SL | Splice Leader |
| SpCas9 | Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| tracrRNA | RNA CRISPR de transativação |
| UTR | <i>Untranslated Region</i> |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.1 Leishmanioses | 15 |
| 1.1.1 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> | 16 |
| 1.1.2 <i>Leishmania amazonensis</i> | 18 |
| 1.1.3 Profilaxia e tratamento | 20 |
| 1.1.4 Miltefosina e seu transportador | 22 |
| 1.1.5 Aspectos moleculares e expressão gênica em <i>Leishmania</i> | 27 |
| 1.2 Sistema CRISPR/Cas9 | 28 |
| 1.2.1 CRISPR/Cas9 em tripanosomatídeos..... | 35 |
| JUSTIFICATIVA | 36 |
| OBJETIVOS | 37 |
| MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| Culturas celulares | 39 |
| Plasmídeos, RNAs guias, sequências doadoras e primers | 39 |
| Transfecção de <i>Leishmania amazonensis</i> com o plasmídeo pRM006 para expressão constitutiva de Cas9 | 41 |
| Transfecção de parasitos expressando Cas9 transientemente via plasmídeo pLDCN com SgRNA e sequência doadora | 42 |
| Análise da expressão de proteína Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i> por parasitos <i>L. amazonensis</i> transfectados com plasmídeos pLDCN e pRM006 | 43 |
| Ensaio de viabilidade celular via MTT para determinação de metade da concentração inibitória máxima (IC50) | 44 |
| Análises bioinformáticas | 45 |
| Desenho dos SgRNAs e sequências doadoras | 46 |
| Síntese dos SgRNAs | 47 |

| | |
|---|-----------|
| Extração de DNA plasmidial | 49 |
| Extração de DNA genômico | 49 |
| Reações de PCR para amplificação de fragmento contemplando região de corte do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina induzido por proteína SaCas9 | 50 |
| Digestão dos produtos de PCR para confirmação da edição genética | 50 |
| Indução e purificação de SaCas9 | 51 |
| Teste de atividade de SaCas9 <i>in vitro</i> | 52 |
| Transfecção de <i>L. amazonensis Wild type</i> com complexo ribonucleoproteico composto por proteína SaCas9 recombinante e SgRNA específico para o transportador de Miltefosina | 53 |
| Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM-Bone marrow derivated macrophages) e infecção por <i>L. amazonensis</i> | 54 |
| RESULTADOS | 55 |
| Avaliação da expressão de SpCas9 por <i>Leishmania amazonensis</i> PH8 transfectada com plasmídeo episomal pLDCN | 55 |
| Geração de parasitos capazes de expressar Cas9 de <i>Streptococcus pyogenes</i> a partir de um plasmídeo integrativo (pRM006) | 57 |
| Análise bioinformática da sequência do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina e desenho das sequências de RNA guia | 61 |
| Síntese dos SgRNAs para geração de mutantes do TM por parasitos expressando Spcas9 | 63 |
| Geração de mutantes do transportador de miltefosina em parasitos expressando SpCas9 transientemente | 64 |
| Indução e purificação de SaCas9 recombinante | 67 |
| Teste de atividade endonuclease de SaCas9 recombinante <i>in vitro</i> | 68 |
| Geração de mutantes do transportador de miltefosina utilizando proteína SaCas9 recombinante e SgRNA desenhado para <i>L. infantum</i> em <i>L. amazonensis</i> | 69 |

| | |
|--|-----------|
| Determinação de IC50 para miltefosina em parasitos <i>knockout</i> no TM induzido por SaCas9 recombinante | 72 |
| Avaliação da infecção de macrófagos derivados de medula óssea por parasitos mutantes para o TM | 73 |
| DISCUSSÃO | 75 |
| CONCLUSÕES | 85 |
| REFERÊNCIAS..... | 86 |
| ANEXO A: Iniciadores utilizados no trabalho | 92 |
| ANEXO B: Géis teste para avaliação da qualidade dos extratos proteicos | 93 |
| ANEXO C: Gene do transportador de miltefosina de <i>L. amazonensis</i> | 94 |
| ANEXO D: Alinhamento dos genes TM de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> | 95 |

INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), as leishmanioses são um grupo de doenças causadas por parasitas protozoários de mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* (Ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae). Esse grupo de enfermidades pode ser classificado como um grave problema de saúde pública no âmbito mundial, dada a sua ampla distribuição, como ilustrado na **Figura 1**, elevada mortalidade e morbidade em suas diferentes formas clínicas.

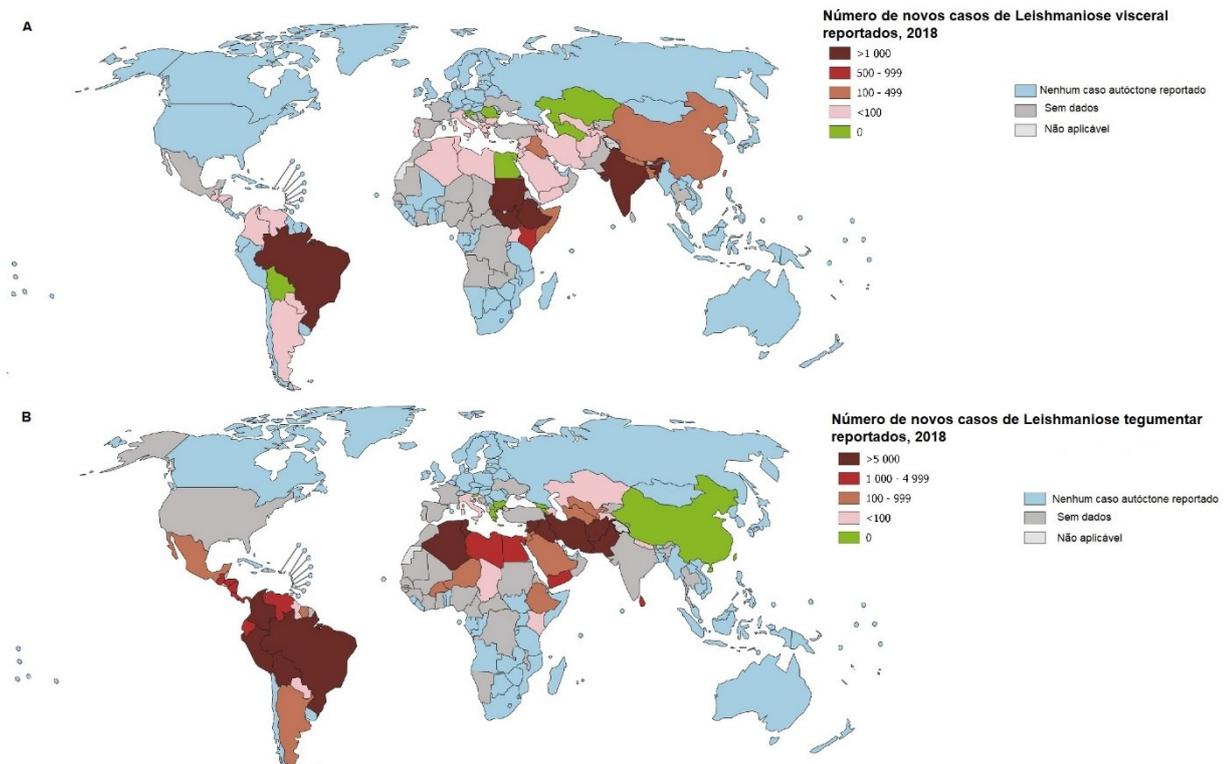


Figura 1: Endemicidade das formas visceral (A) e tegumentar (B) da Leishmaniose pelo mundo – Adaptado de OMS, 2018

Segundo a OMS, em 2014, mais de 90% dos novos casos reportados foram oriundos de seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão e Sudão do Sul. Na

américa latina, uma das principais regiões endêmicas de leishmaniose, o Brasil ganha ainda mais destaque. O 6º informe de leishmanioses publicado pela organização pan-americana de saúde em fevereiro de 2018 revela que 96% dos casos de leishmaniose visceral na região, ocorreram no Brasil e que, desde 2012, o número de óbitos por essa enfermidade vem aumentando. A taxa de letalidade da doença é de 7,9%, no continente sul americano, sendo a mais elevada do mundo.

Apesar dos números ainda alarmantes, é demonstrada uma tendência à melhoria da situação no continente: O número de casos de leishmaniose cutânea e mucosa reduziu significativamente em 2016 (50000 casos) em comparação ao seu pico em 2005 (70000 casos) assim como os casos de leishmaniose visceral (principalmente representados pelos casos em território brasileiro) que reduziram para 3500 casos em 2016 quando comparados aos 4000 casos em 2011.

Ainda assim, cada vez mais atenção tem sido dada a essa enfermidade devido a incidência diferenciada que essa têm apresentado. Diversos novos casos vêm sendo reportados em regiões consideradas não endêmicas, e esses têm sido associados, juntamente às melhorias a termos de diagnóstico e cobertura, ao aparecimento de parasitos resistentes aos tratamentos disponíveis, alterações em fluxos migratórios e adaptações dos vetores às áreas urbanizadas (ANVERSA *et al*, 2017).

1.1.1 Ciclo de vida de *Leishmania*

A infecção pelo parasito se dá, na grande maioria dos casos, a partir do repasto sanguíneo de fêmeas dos hospedeiros invertebrados (Ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gêneros *Phlebotomus*, no velho mundo e *Lutzomyia*, no novo mundo) infectadas. As leishmanias, em forma promastigota metacíclica, são regurgitadas na pele do hospedeiro vertebrado e invadem ou são fagocitadas por neutrófilos e macrófagos do mesmo. Dentro dessas células, os parasitos são capazes de se transformar em suas formas amastigotas progredindo à replicação e infecção de novas células. Macrófagos parasitados podem ser ingeridos por outros flebotomíneos em novo repasto sanguíneo, e no inseto vetor retornam à forma promastigota dando continuidade ao ciclo do parasita (**Figura 2**). Algumas outras formas de transmissão já foram reportadas em casos de leishmaniose visceral,

incluindo transmissão congênita e associada a transfusão sanguínea e compartilhamento de seringas (ANVERSA *et al*, 2017).

Segundo Murray, 2005; A sintomatologia apresentada pelo paciente depende de inúmeros fatores, incluindo aqueles inerentes ao parasita (infectividade, patogenicidade, virulência) ou ao paciente (idade, estado nutricional, susceptibilidade à infecção, estado imunológico). As variações ainda se dão regionalmente, já que as espécies de *Leishmania* assim como de insetos vetores são variáveis nas regiões endêmicas. Segundo Anversa, 2017; mais de 50 espécies de *Leishmania* já foram identificadas, sendo 21 de relevância médica. Os hospedeiros vertebrados podem ser diversos grupos de mamíferos: Marsupiais, roedores, primatas e canídeos. Dessa forma, os cães mostram-se como principal reservatório da doença dada sua grande abundância em ambientes urbanos. Na **tabela 1** estão descritas as principais espécies de *Leishmania* encontradas no Brasil, assim como as formas clínicas normalmente associadas a elas.

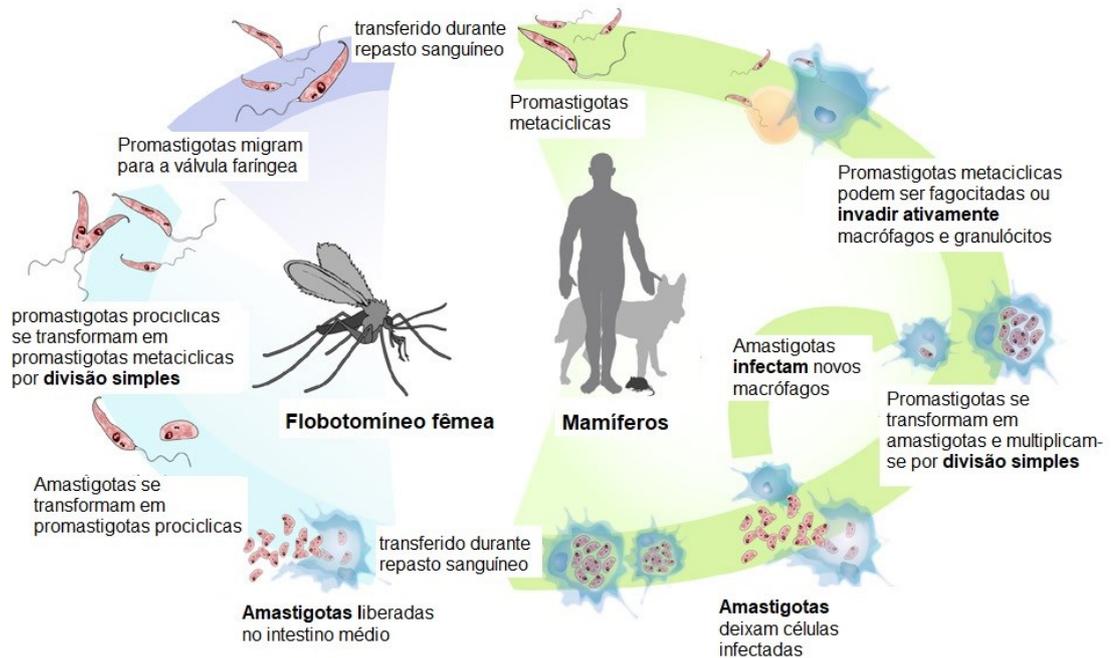


Figura 2: Ciclo de vida de *Leishmania* sp. Adaptado de Anversa *et al* 2017.

Tabela 1: Espécies de *Leishmania* presentes no Brasil e suas formas clínicas associadas. *

| Leishmaniose tegumentar | | | | Leishmaniose visceral |
|-----------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|---------------------------------|
| Cutânea localizada | Cutânea disseminada | Mucosa | Cutânea Difusa | |
| L.(V) <i>brasiliensis</i> | L.(V) <i>brasiliensis</i> | L.(V) <i>brasiliensis</i> | L.(L) <i>amazonensis</i> | L.(L) <i>infantum (chagasi)</i> |
| L.(V) <i>guyanensis</i> | L.(L) <i>amazonensis</i> | L.(L) <i>amazonensis</i> | | |
| L.(L) <i>amazonensis</i> | | L.(V) <i>guyanensis</i> | | |
| L.(V) <i>lainsoni</i> ** | | | | |
| L.(V) <i>naiffi</i> ** | | | | |
| L.(V) <i>shawj</i> ** | | | | |
| L.(V) <i>lindenbergi</i> ** | | | | |

Adaptado de Anversa *et al* 2017* Espécies menos frequentes **

As principais formas de leishmaniose descritas são as formas tegumentar e visceral (Kala-azar), que são assim caracterizadas pelos sinais e sintomas apresentados pelo indivíduo infectado. As leishmanioses tegumentares podem ser divididas em formas cutâneas e mucosas, levando-se em consideração, principalmente, a região onde o repasto sanguíneo ocorreu e o conseqüente desenvolvimento de sintomas. Indivíduos acometidos pela forma cutânea da doença apresentam lesão patognomônica, normalmente no local onde foi realizado o repasto sanguíneo pelo inseto vetor. A forma mucosa ocorre com mais frequência devido à disseminação do parasito e seu tropismo pelas regiões de mucosas. Essa forma da doença cursa com grande inflamação na região mucosa levando em vários casos a ulcerações e desfigurações das regiões acometidas. A Leishmaniose visceral é considerada a manifestação mais grave da enfermidade, podendo a mesma ser mortal para o paciente se não for tratada. Sua sintomatologia associada consiste de febre intensa, palidez, hepatoesplenomegalia com conseqüentes anemia, trombocitopenia e leucopenia.

1.1.2 *Leishmania amazonensis*

As espécies de *Leishmania* dividem-se em dois subgêneros principais: *Leishmania* e *Viannia*. O primeiro, com representantes tanto no novo mundo como no velho mundo tem seu desenvolvimento no inseto vetor principalmente na porção anterior do trato digestório do mesmo. O segundo, limitado ao novo mundo,

desenvolve-se na porção posterior do trato digestório dos flebotomíneos (LAINSON *et al*, 1987; TORRES-GUERRERO *et al*, 2017).

A espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* apresenta grande importância epidemiológica no continente sul-americano, em especial no Brasil, sendo responsável por mais de 8% dos casos de leishmanioses reportados nas regiões norte e nordeste do país (VALDIVIA *et al*, 2017). As infecções por essa espécie estão normalmente associadas ao vetor *Bichromomyia flaviscutellata*, (ANDRADE *et al*, 2009). As manifestações clínicas causadas por *L. amazonensis* são variáveis, podendo se apresentar, na forma cutânea localizada e, principalmente, na forma cutânea difusa, caracterizada por diversas lesões não ulceradas, de bordas altas, repletas de parasitos, por todo o tegumento do indivíduo acometido (**Figura 3**) que em geral, não responde ao tratamento (OLIVEIRA, L. G. 2018; SILVEIRA *et al*, 2004). Há ainda a sugestão de que essa espécie possa causar a forma mais grave e fatal da doença, a leishmaniose visceral (BARRAL *et al*, 1991; TORRES-GUERRERO *et al*, 2017).



Figura 3: Leishmaniose cutânea difusa causada por *Leishmania amazonensis*. Adaptado de Torres-Guerrero 2017.

1.1.3 Profilaxia e tratamento

As medidas profiláticas recomendadas para o controle das leishmanioses são simples e relativamente limitadas. Devido a inexistência até o momento de uma vacina efetiva para uso humano, as medidas concentram-se no controle de vetores, com conscientização da população principalmente nas regiões endêmicas, uso de inseticidas e roupas longas, quando aplicável. Outras medidas importantes são o tratamento precoce de pacientes infectados e reservatórios animais, como forma de minimizar a disseminação dos agentes etiológicos e assim evitar continuação do ciclo de vida dos mesmos.

O tratamento das leishmanioses mostra-se como um grande desafio há décadas. Isso se deve a diversos fatores já que a natureza das manifestações desse grupo de enfermidades é muito variável. O sucesso do tratamento depende de diversos fatores, sendo esses relacionados tanto ao paciente (resposta imunológica, imunocompetência, fatores genéticos), quanto aos parasitos (espécie infectante, manifestação clínica, resistência e susceptibilidade às drogas disponíveis) (ANVERSA *et al*, 2017; WHO, 2019; CDC 2019).

Devido a esses fatores, existem diversos protocolos para o tratamento das leishmanioses. Esses, variam quanto às drogas envolvidas, em regime de monoterapia e/ou associadas e posologia. Nesse sentido, é importante ainda levar em consideração que nem todos esses regimes são aplicáveis a todos os casos, e os tratamentos acabam por variar entre regiões. Dessa forma, as Leishmanioses são doenças tratáveis e curáveis, respeitando-se a espécie envolvida, região geográfica e características do paciente acometido.

De uma forma geral, os medicamentos mais utilizados são os antimoniais pentavalentes. Esse grupo de drogas é a primeira escolha no tratamento das leishmanioses, demonstrando em diversos estudos efetividade próxima a 90% (ANVERSA *et al*, 2017; MURRAY *et al*, 2005; TORRES-GUERRERO *et al*, 2017). Os principais problemas relacionados ao uso dessas medicações associam-se aos diversos efeitos adversos desencadeados pelo seu uso, destacando-se alterações hepáticas e cardíacas, que em determinados casos culminam com a interrupção do tratamento (ANVERSA *et al*, 2017; TORRES-GUERRERO *et al*, 2017). Os principais representantes dessa classe são o stiboglucanato de sódio (Pentosan®) e o

antimoniato de N-metilgucamina (Glucantime®), sendo esse distribuído no Brasil apenas pelo ministério da saúde (ANVERSA *et al*, 2017).

Apesar de serem utilizados há décadas, o mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda é desconhecido. São propostos, principalmente, dois modelos explicativos para essa ação (**figura 4**). Esses baseiam-se na possibilidade de que os antimoniais tanto possam ter efeitos leishmanicidas em sua estrutura pentavalente, que estaria associada a alterações no metabolismo de purinas, ou que os mesmos sejam reduzidos à forma trivalente, que seria potencialmente mais tóxica para os parasitos, podendo estar relacionado a maior susceptibilidade das leishmanias a stress oxidativo ou alterações a nível de expressão gênica. Diferentes efeitos são associados a cada forma, e não se descarta a hipótese de que os efeitos desse fármaco se deem por mais de uma via de ação (FREZARD *et al*, 2009).

A segunda linha de tratamento é composta da anfotericina B e pentamidina. O primeiro, normalmente utilizado para tratamento de infecções fúngicas, demonstra atividade leishmanicida comparável a dos agentes antimoniais. Entretanto, dispõe também de ampla gama de efeitos adversos e um fator complicador atrelado a sua via de administração, intravenosa, que restringe a aplicação do mesmo ao âmbito hospitalar. Em 1997, uma nova formulação lipossomal foi disponibilizada, demonstrando significativa diminuição dos efeitos adversos, dada melhor distribuição no organismo. Seu alto custo, e via de administração também intravenosa acabam por limitar a utilização dessa forma farmacêutica (ANVERSA *et al*, 2017; MURRAY *et al*, 2005). A pentamidina, por sua vez, apresenta-se como outra alternativa efetiva ao uso dos antimoniais, porém, assim como a anfotericina B, apresenta uma série de efeitos adversos, limitando seu uso baseado no histórico e resposta do paciente. Reporta-se ainda a rápida emergência de resistência parasítica a essa droga, restringindo ainda mais sua utilização (ANVERSA *et al*, 2017; SAMPAIO, G. 2013).

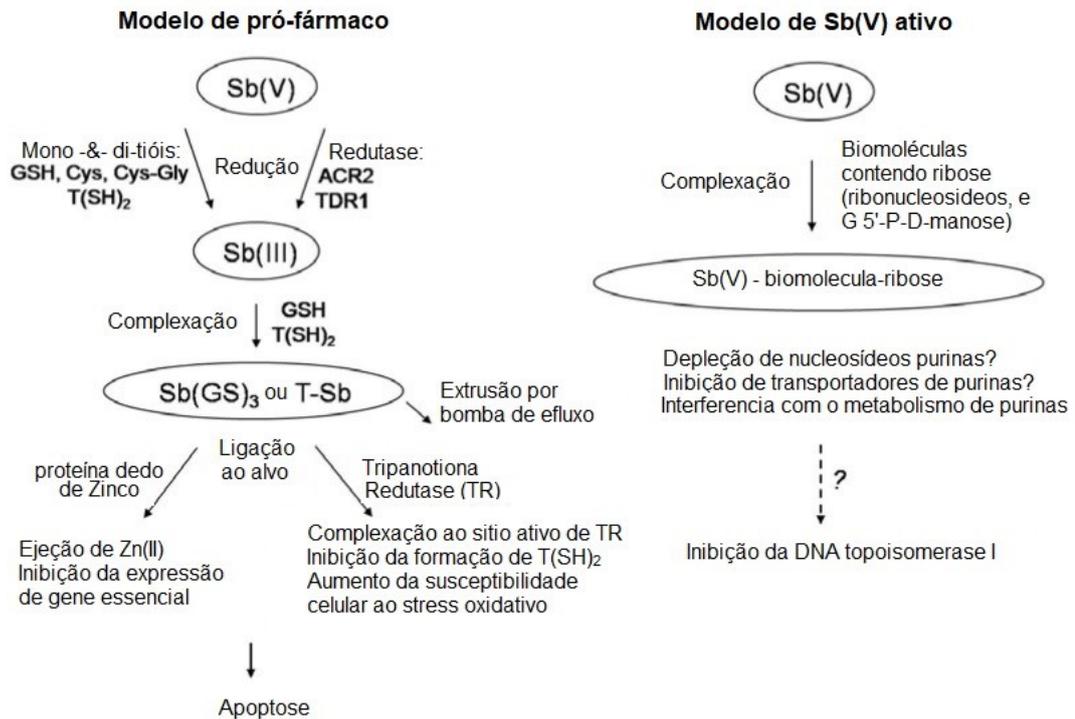


Figura 4: Mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes. Adaptado de Frezard *et al* 2009.

Diversas outras drogas podem ser utilizadas como alternativas para tratamentos pontuais: cetoconazol, rifampicina, paramomicina. Em 2002, a miltefosina, uma droga originalmente utilizada como quimioterápico, começou a ser utilizada na Índia para o tratamento de leishmaniose visceral. Essa, demonstrou-se eficaz, prática, dada sua administração oral e demonstrou significativa menor ocorrência de efeitos adversos, limitando-se a vômito e diarreia.

1.1.4 Miltefosina e seu transportador

Miltefosina (hexadecilfosfolina) é um fármaco, originalmente utilizado como agente antitumoral, utilizado de forma oral para o tratamento de leishmaniose visceral desde 2002 e para leishmaniose cutânea desde 2005 (SUNDAR, S *et al*, 2012; SEIFERT, K *et al*, 2007, DEEP *et al*, 2018). A farmacoterapia com miltefosina é considerada bem tolerada, devido a reduzida quantidade de efeitos adversos observados, o que é bastante vantajoso quando comparado às demais alternativas para o tratamento de leishmanioses, além da praticidade inerente à administração da mesma (DORLO *et al*, 2012).

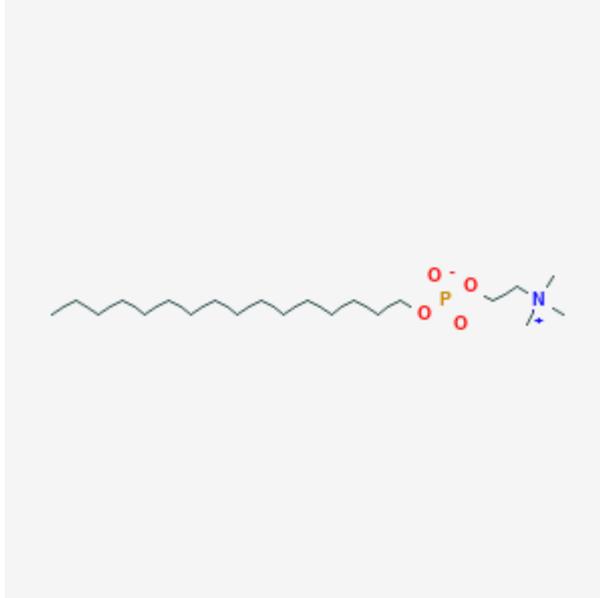


Figura 5: Estrutura química da miltefosina. Adaptado de PubChem.

No Brasil, o uso de miltefosina foi aprovado para tratamento de leishmaniose visceral canina, a partir da norma técnica 11/2016, onde o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento permitiu o registro do medicamento Milteforan®. Essa medida, juntamente com o descrito na portaria interministerial nº 1426 de 11 de julho de 2008, que define a possibilidade de utilização de fármacos para tratamento de leishmaniose canina desde que os mesmos não sejam utilizados para tratamento humano, legaliza, pela primeira vez, a utilização da miltefosina no território nacional. A partir da portaria nº 56, de 30 de outubro de 2018, a miltefosina foi incorporada a primeira linha de tratamento para a leishmaniose tegumentar no sistema único de saúde. Apesar de se tratar do mesmo princípio ativo, e, portanto, ir contra a portaria nº 1426, o relatório de recomendação da comissão nacional de incorporação de tecnologias no sus (nº 365, de outubro/2018) relata não haver nenhuma restrição quanto ao uso do Milteforan® para o tratamento de leishmaniose visceral canina. Isso se dá por não haver risco da geração de cepas resistentes a miltefosina dado que as espécies de *Leishmania spp.* são diferentes entre a leishmaniose tegumentar humana e a leishmaniose visceral canina.

Seu mecanismo de ação ainda não é totalmente elucidado, porém, é proposto que a mesma possa exercer efeito citotóxico nas células, principalmente por meio de dois modos de ação: Inibição da atividade da citocromo-c oxidase mitocondrial, levando as células a um estado similar ao de apoptose e inibição da proteína cinase

b, relacionada a sinalizações intracelulares envolvidas na regulação da multiplicação celular (DRUGBANK, acesso em novembro 2019; DORLO *et al*, 2012). Outros mecanismos de ação para a miltefosina foram propostos, sugerindo ainda a possibilidade de que os efeitos da droga se manifestem por mais de uma via (**Figura 6**).

Alguns estudos demonstraram diferenças de susceptibilidade desse fármaco em diferentes espécies de leishmania, sobretudo quando comparadas as espécies do velho mundo (mais sensíveis) com as do novo mundo (mais resistentes) (MORAIS-TEIXEIRA *et al*, 2011). Dessa forma, a avaliação de eficácia para as espécies locais assim como a determinação do melhor regime terapêutico, dadas as variações interespecíficas, são fundamentais para o sucesso do tratamento em cada região.

Apesar das vantagens associadas à utilização desse fármaco, alguns trabalhos vêm demonstrando o declínio da efetividade do uso de miltefosina no tratamento da leishmaniose, culminando com recidivas clínicas e o aparecimento de cepas de parasitos resistentes a ela (DEEP *et al*, 2017; SUNDAR *et al*, 2012).

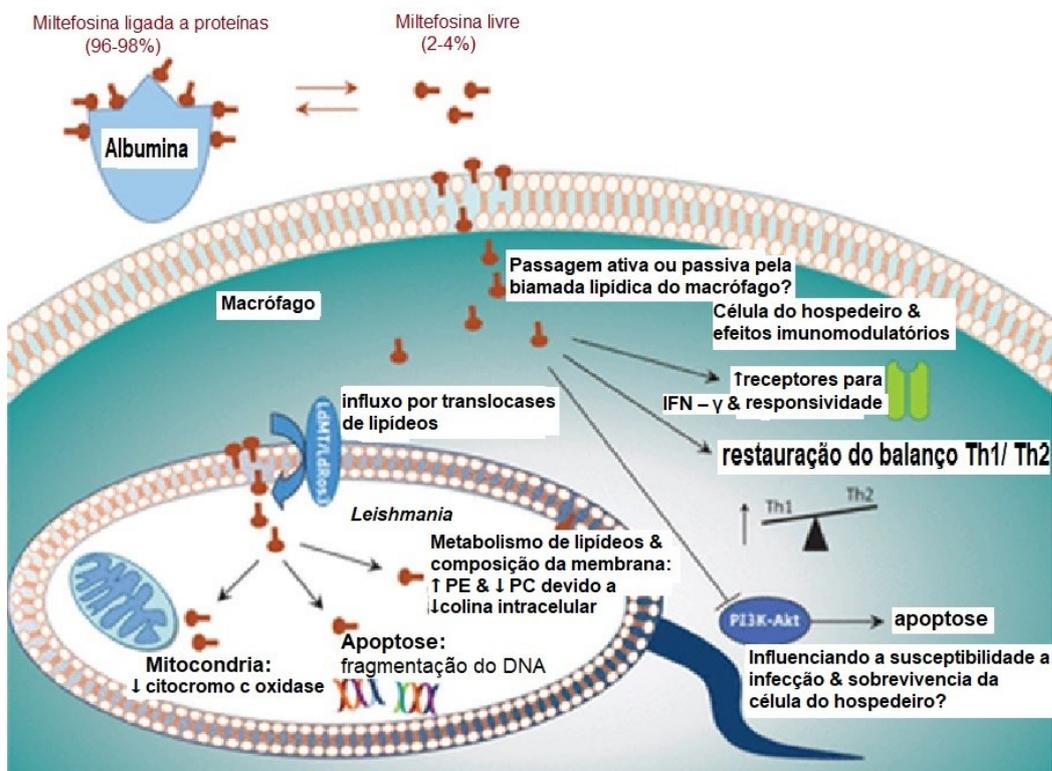


Figura 6: Mecanismos de ação propostos para miltefosina, adaptado de Dorlo *et al*, 2012. PC: Fosfatidilcolina; PE: Fosfatidiletanolamina.

O transportador de miltefosina é uma proteína transmembrana que possui um domínio ATPase, de modo que sua atividade de transporte de fosfolípidios está acoplada a atividade catalítica de moléculas de ATP. É classificado como uma ATPase tipo P, possuindo a característica de se auto-fosforilar em uma região com um resíduo de aspartato conservado, promovendo mudanças conformacionais em sua estrutura. Dessa forma, ATPases tipo P interconvertem-se em duas estruturas, denominadas E1 e E2 (**Figura 7**).

Em 2003, Pérez-Victoria *et al* demonstraram que uma cepa de *L. donovani* 15 vezes mais resistente a miltefosina apresentava menor capacidade de internalizar a droga quando comparado ao grupo selvagem. A ligação do composto à membrana plasmática e o efluxo da droga se mostram similares entre ambas as cepas. Foi também observado que a linhagem resistente não se mostrava receptiva a outros compostos fosfolípidicos de cadeia curta, com estrutura similar à miltefosina. O somatório desses achados sugere de que a entrada dessa substância se dê por uma proteína transportadora responsável pelo influxo de fosfolípidios e que esse processo seja dependente de ATP. Em 2006, o mesmo grupo demonstrou que essa proteína, que passou a ser denominada Transportador de Miltefosina de *Leishmania donovani* (LdMT no inglês), atuaria em conjunto com uma subunidade denominada LdRos3, e que ambas as proteínas são dependentes entre si tanto para correta localização na membrana plasmática do parasito como para sua atividade de flipase para translocação de fosfolípidios. Achados similares foram descritos em 2016 para *L. infantum* por Mondelaers *et al*. Fernandez-Prada *et al* em 2016 demonstraram ainda a possibilidade da emergência de resistência cruzada ao tratamento conjunto de miltefosina e anfotericina B, uma combinação frequentemente usada para o tratamento de leishmaniose visceral. O trabalho apresenta resultados que sugerem que ambas as drogas podem levar a alterações no transportador de miltefosina, e assim, por mecanismos diferentes, podem induzir resistência a ambas as drogas.

Em 2017, Deep *et al* compararam cepas pré-tratamento, recidivas clínicas pós tratamento com miltefosina e cepas com resistência adquirida à droga pela metodologia de *stepwise*. O trabalho revelou que os parasitos resistentes à miltefosina demonstraram um perfil mais infectivo, revelado pelos ensaios de metaciclogênese, infecção de macrófagos e resistência a stress oxidativo. Em 2018, os autores demonstraram que a super-expressão de uma proteína precursora de lipase foi capaz

de promover resistência à miltefosina e gerar um fenótipo parecido com as cepas do trabalho anterior, se mostrando mais infectivas.

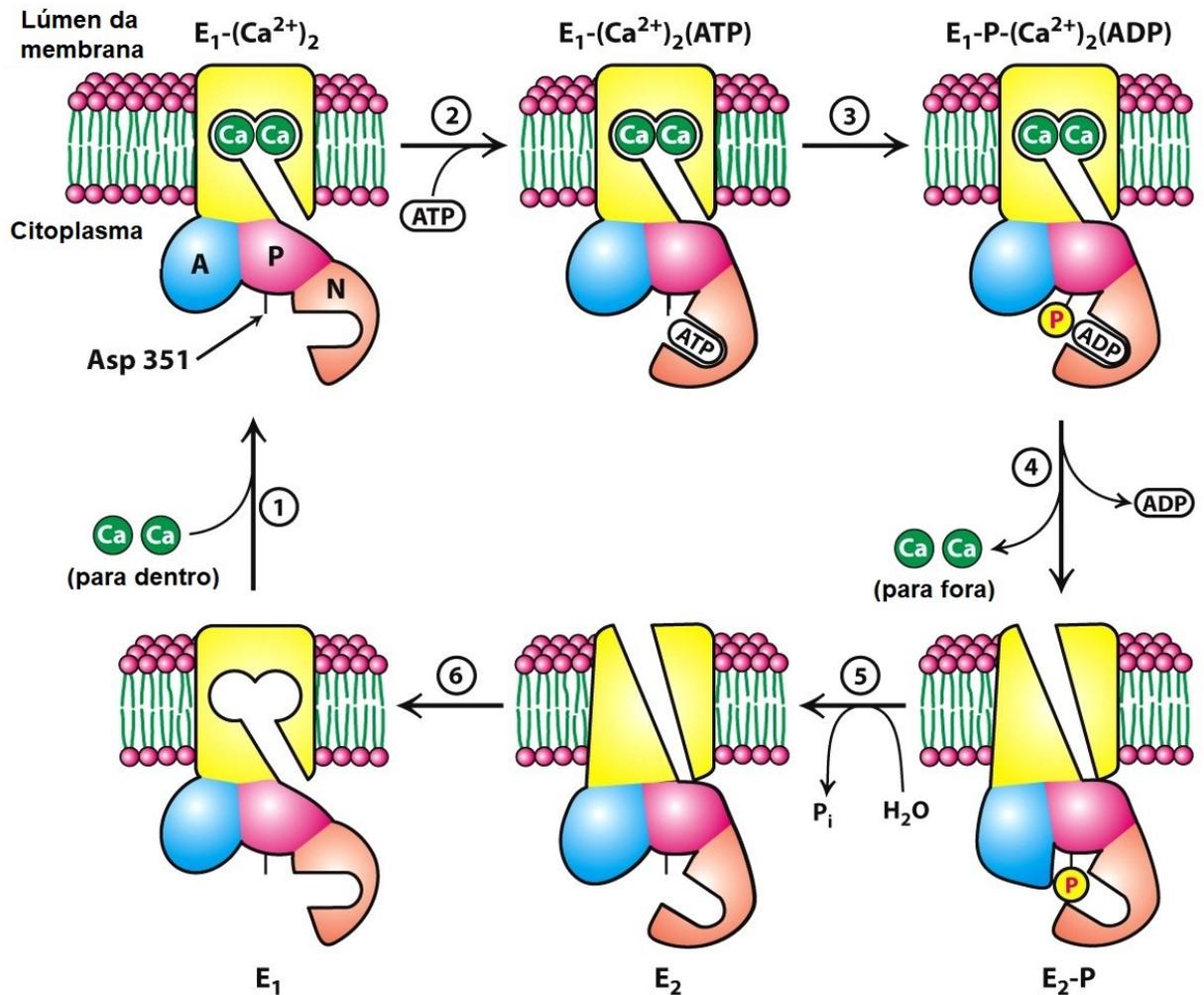


Figura 7: Estrutura das ATPases tipo P. As ATPases tipo P são transportadores transmembrana cujo transporte encontra-se associado a hidrólise de moléculas de ATP. A partir dessa interação, a estrutura do transportador altera-se, possibilitando o transporte. Adaptado de Berg. *et al*, 2012.

Os trabalhos de Zhang e Mathlshewski (2015, 2017) utilizaram da metodologia de CRISPR/Cas9 para induzir *knockout* gênico no transportador de miltefosina de *L. donovani*. Os autores puderam observar a aquisição de resistência pelos parasitos, sem aparentes implicações no desenvolvimento ou morfologia dos mesmos. Não foram avaliadas, entretanto, outras alterações fenotípicas decorrentes da alteração genômica.

1.1.5 Aspectos moleculares e expressão gênica em *Leishmania*

O controle da expressão gênica em parasitos da família trypanosomatidae diferencia-se dos demais eucariotos, dado a distância evolutiva entre os mesmos (TEIXEIRA, 1998).

Os RNAs mensageiros (mRNAs) de eucariotos superiores são transcritos individualmente em unidades imaturas individuais, a partir de cada gene, classificadas, portanto, como monocistrônicas. Essas possuem porções codificadoras, exons, e porções não codificadoras, introns, e sofrem processamentos pós transcricionais, do tipo “cis-splicing” para dar origem à molécula de mRNA madura.

Para tripanosomatídeos, entretanto, há diferenças marcantes nesse processo. Os genes são transcritos em conjuntos, estando sujeitos a um único promotor para todos (transcrição policistrônica). Esses são posteriormente processados em mRNAs individuais, porém não existem regiões intrônicas nos mesmos, de modo que as reações de processamento do mesmo não ocorrem por cis-splicing, mas sim por trans-splicing. (TEIXEIRA, 1998; CLAYTON, 2007). Esse mecanismo ocorre a partir da adição de uma estrutura de 39 nucleotídeos, contendo uma guanidina metilada na extremidade, chamado Splice Leader (SL) ou mini-exon, a partir de uma reação de transesterificação à extremidade 5' no mRNA. A região intergênica presente entre cada unidade de RNA monocistrônico a ser formada coordena essa reação, a partir de sinalizações presentes na mesma. Um par Dinucleotídeo “AG” posterior a uma região de polipirimidina *upstream* da região codificadora é utilizada pelo SL como sítio acceptor, promovendo a inserção da mesma, com estrutura “cap” fundamental para tradução na ponta, e conseqüentemente formação de unidade monocistrônica.

De maneira coordenada, há a poliadenilação da porção 3' do mRNA. Essa também é dependente do sítio acceptor do SL, estando localizada 100-300pb *upstream* do sítio referente ao gene localizado *downstream* no pré-mRNA. Dessa forma, a formação do mRNA monocistrônico maduro é um processo de adições concomitantes em ambas as extremidades, coordenado e dependente das estruturas adjacentes (TEIXEIRA, 1998; CLAYTON, 2007).

Tripanosomatídeos são caracterizados por possuírem diferentes formas de vida, e, dessa forma, a expressão gênica necessita ser diferenciada para adaptação de cada uma dessas. Aceita-se que de forma geral, as formas não replicativas possuem transcrição diminuída de maneira global, e não há evidências de regulação

diferencial de genes individuais ou conjuntos de genes. Somando-se ao fato da existência de poucos fatores regulatórios de transcrição no genoma desses seres, sugere-se que a regulação da expressão dos mesmos se dê a nível pós transcricional. (CLAYTON 2007).

1.2 Sistema CRISPR/Cas9

O sistema CRISPR (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) foi originalmente descrito como uma forma primitiva de sistema imune adaptativo bacteriano em resposta a ácidos nucleicos invasores, geralmente associados a vírus. Em 1987, Ishino *et al*, ao estudar a funcionalidade do gene *iap* (codificador de uma protease capaz de converter isoenzimas de fosfatase alcalina) em *Escherichia coli*, observaram um agrupamento incomum de pares de bases na região 3' flanqueadora desse gene. Essa região, composta por cinco sequências de 29 pares de bases com grande homologia entre si espaçadas por sequências de 32 pares de bases variáveis, não teve função biológica atribuída pelos autores. Entretanto, esta foi a primeira descrição do *locus* CRISPR em bactérias.

O sistema CRISPR é altamente adaptável e herdável, demonstrando-se uma importante forma de proteção de bactérias contra a ação de bacteriófagos (HRYHOROWICZ, M *et al*, 2017). Para correto funcionamento desse sistema, três elementos são considerados primordiais: A proteína associada ao CRISPR 9 (Cas9), que possui dois domínios responsáveis por ação nuclease, o RNA CRISPR (crRNA), oriundo das sequências de DNA adquiridas do material genético que previamente entrou em contato com a bactéria, e o RNA de transativação (tracrRNA), responsável pela maturação do crRNA e ancoramento do complexo proteico (HRYHOROWICZ, M *et al*, 2017; CUI, Y., YU, L., 2016).

O mecanismo de ação do sistema bacteriano é composto por três etapas: Aquisição, biogênese e interferência (**Figura 8**). A etapa de aquisição ocorre no primeiro contato da bactéria com o material genético desconhecido. Esse DNA é identificado a partir de sequências PAM (*Protospacer Adjacent Motifs*) (compreendem pequenas sequências predeterminada de nucleotídeos que variam de acordo com a espécie bacteriana), processado por nucleases associadas ao CRISPR (culminando em sequências menores), e posterior incorporação dessas sequências no *locus* CRISPR do DNA da bactéria. Esses fragmentos de DNA são chamados

protoespaçadores, e são alocados no *locus* alternadamente a pequenas sequências palindrômicas repetidas.

Para a etapa de biogênese, o *locus* de DNA CRISPR é transcrito, formando o chamado pre-crRNA. O processamento dessa fita longa culmina com a produção de diversas fitas maduras de crRNA. Essa sequência associa-se ao tracrRNA e à Cas9, formando o complexo ribonucleoproteico responsável pela atividade imunológica.

A etapa de interferência se dá a partir de um novo contato da espécie bacteriana com o DNA viral. A sequência PAM é identificada pelo complexo proteico CRISPR/Cas9 e o crRNA associado serve como um guia para o DNA alvo, dada sua homologia. A ligação entre o crRNA e o DNA alvo ativa o complexo proteico, que a partir dos domínios nuclease presentes na proteína Cas9, promove rompimento da dupla fita do DNA invasor, inativando-o (HRYHOROWICZ, M *et al*, 2017).

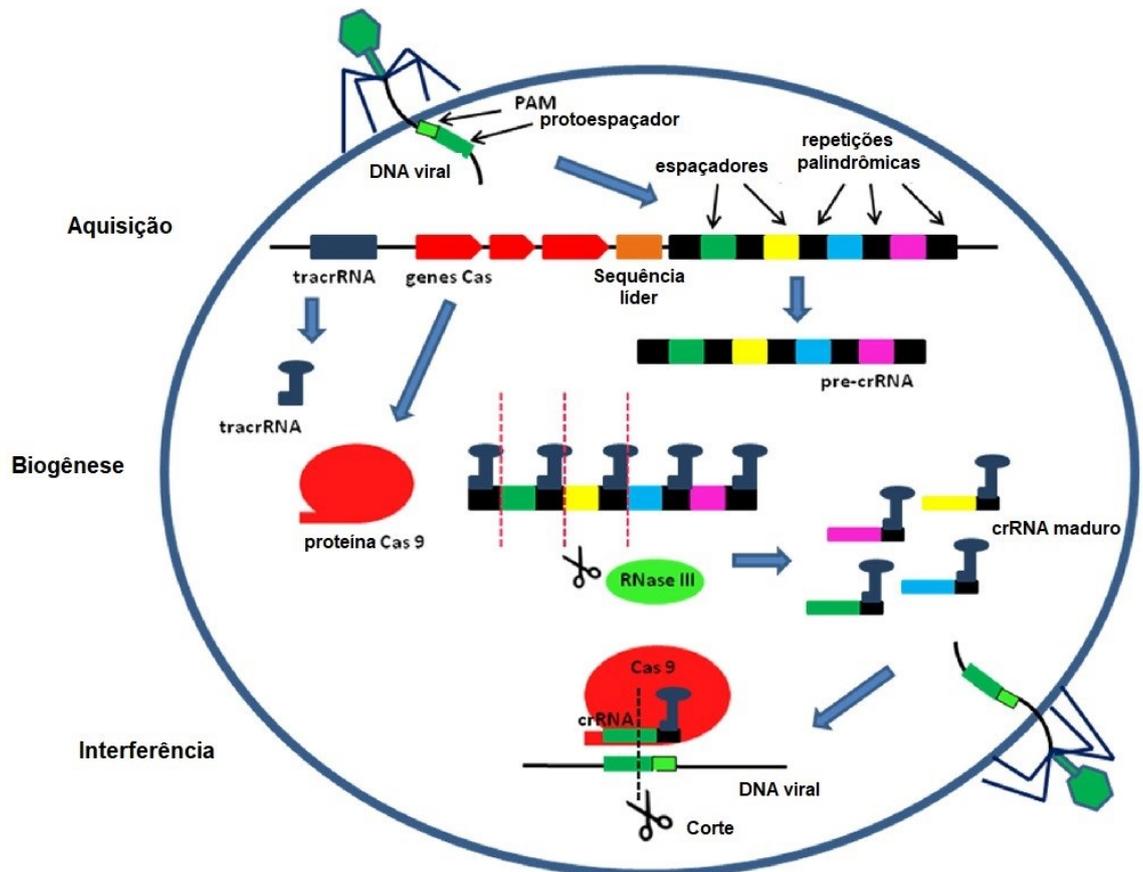


Figura 8: Funcionamento do sistema CRISPR/Cas9 em bactérias. Adaptado de Hryhorowicz, M *et al*, 2017.

Dada a especificidade com que o complexo CRISPR/Cas9 consegue reconhecer sequências de DNA alvo e promover sua clivagem, grande interesse se manifesta acerca da possibilidade de utilização dessa ferramenta para a manipulação gênica. Em 2012, Jinek *et al*, trouxeram grandes contribuições à causa ao relatar pela primeira vez o uso do sistema CRISPR/Cas9 para induzir quebras em dupla fita de DNA em plasmídeos e pequenas sequências de DNA *in vitro*. Além disso, o mesmo trabalho demonstrou a possibilidade de uso de uma sequência de RNA quimérica, fundindo as sequências do RNA de transativação e o RNA guia específico em uma única molécula. Diversos trabalhos, como os de Cong *et al*, 2013, e Mali *et al*, 2013, foram publicados na sequência, demonstrando o uso dessa ferramenta para a alteração de material genético em células de mamíferos e humanos, respectivamente. A possibilidade de produção de RNAs guias que substituam o crRNA permite a escolha de outras sequências alvo, desde que se tenha conhecimento dessa sequência de interesse. Os avanços no sequenciamento genético de diversos organismos vão ao encontro dessa tecnologia emergente, possibilitando a manipulação genética em diversos organismos.

Em termos de edição gênica, outra etapa deve ser levada em consideração. Após a quebra gerada na dupla fita de DNA pelo sistema CRISPR/Cas9, mecanismos celulares de reparo ao DNA entram em ação. Esses mecanismos podem ser explorados para guiar um reparo induzido e promover a alteração desejada. Os principais métodos de reparo incluem o reparo direcionado por homologia, que pode ser guiado no sistema de edição gênica fornecendo um doador que possua homologia às regiões onde houve a quebra na fita, o reparo por junção de pontas não homologas, que é uma forma de reparo associada a diversos erros no local de quebra da fita e o reparo mediado por micro-homologia, que se dá por regiões de homologia próximas às quebras da fita (**Figura 9**).

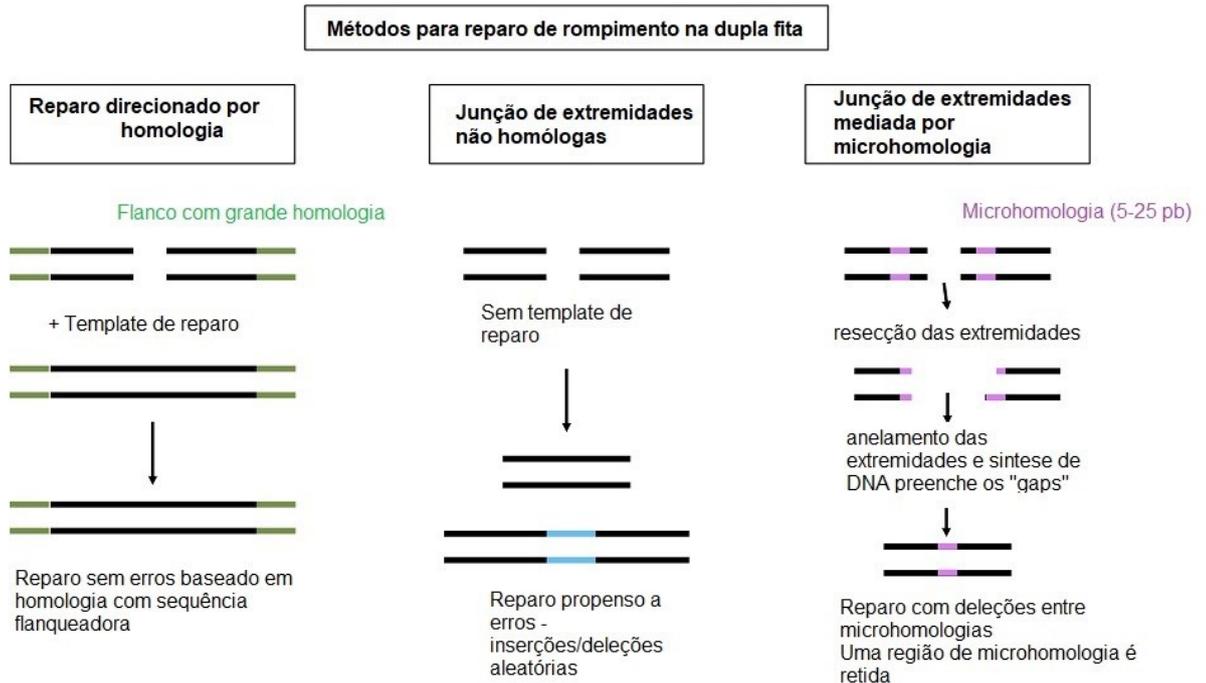


Figura 9: Tipos de reparo de DNA. Adaptado de Gearing, M.

Para se ter o sistema CRISPR/Cas9 funcional, são necessários, portanto, dois elementos: A proteína Cas9 funcional e um single guide RNA quimérico específico para a região onde deseja-se promover a edição. Adicionalmente, sequências doadoras homólogas à região de quebra da dupla fita podem também se mostrar necessárias dependendo da estratégia selecionada. Desse modo, diversos protocolos se desenvolveram para possibilitar a entrega desses materiais às células em estudo.

Para a proteína, três possibilidades se apresentam, com diferentes abordagens: Primeiramente, há a possibilidade de fornecimento da proteína de forma direta. Essa estratégia elimina a necessidade de transcrição, tradução e qualquer processamento relacionado à síntese da mesma. Dessa forma, essa estratégia se mostra eficiente no sentido de que a edição gênica se processa mais rapidamente quando comparado às outras possibilidades. Adicionalmente, a proteína tem vida útil limitada, o que se mostra estratégico, já que, dessa forma, ela apresenta menor potencial para geração de efeitos off-target. As principais limitações do uso da proteína diretamente se mostram no âmbito *in vivo*. A mesma é capaz de induzir respostas imunológicas celulares e humorais, reduzindo drasticamente sua eficácia.

A distribuição da mesma também se demonstra como um fator complicador, dada a carga e tamanho da proteína. Por último, o processo de produção e purificação da mesma também limita a possibilidade de utilização desta, já que requer para tal um sistema com custos significativos (ZHANG *et al*, 2019).

Outra possibilidade para fornecer a proteína às células é o uso de sequências de DNA que codifiquem Cas9, na forma de plasmídeos, por exemplo. As dificuldades associadas a esse método não são muito diferentes às anteriores. Há grande dificuldade em obter-se eficiência em ceder DNA para o núcleo das células alvo, e por vezes, esse processo mostra-se citotóxico. Além disso, a estratégia por uso do DNA requer maior tempo para o aparecimento de alterações gênicas além da expressão, pela própria célula, de Cas9, que propicia efeitos *off-target* a longo prazo. (ZHANG *et al*, 2019). O intermediário a esses dois protocolos é a utilização de mRNA para Cas9, induzindo sua tradução no grupo celular de interesse. Essa estratégia possui vantagens sobre o uso de DNA (início de atividade mais rápido, menor efeito a longo prazo e eliminação da necessidade de atingir o núcleo celular) e menores dificuldades quando comparada ao uso da proteína pronta. Suas principais limitações estão relacionadas à instabilidade das moléculas de RNA e aos cuidados necessários em sua manipulação. A **tabela 2 e a figura 10** sintetizam essa comparação entre os métodos. A escolha do protocolo de utilização varia dependendo da finalidade e otimizações para os protocolos vem sendo propostas continuamente.

Assim como para a proteína, para o SgRNA também há diferentes protocolos para fornecer o material às células alvo. Para o caso de uso da proteína íntegra, promove-se a formação do ribonucleocomplexo, ao incubar a proteína com o RNA quimérico, e o fornecimento de ambos os compostos ocorre simultaneamente. Esse processo pode ser vantajoso, além das vantagens do uso da proteína diretamente, pelo fato de realizar-se apenas uma etapa de fornecimento às células alvo. As outras possibilidades são o fornecimento do SgRNA transcrito previamente *in vitro*, ou de sequências de DNA, plasmidiais por exemplo, para síntese dos guias pelas próprias células. Diferentes trabalhos demonstram a viabilidade de ambos os protocolos (ZHANG e MATLASHEWSKI, 2015; BENEKE *et al*, 2017).

Tabela 2: Estratégias para fornecimento de proteína Cas9 às células alvo.

| | DNA | mRNA | Proteína |
|-------------------------------------|------------|-----------------------------------|-------------|
| Transcrição no núcleo | Sim | Não | Não |
| Tradução no citoplasma | Sim | Sim | Não |
| Produto final funcionando no núcleo | Sim | Sim | Sim |
| Tempo para início da atividade* | >8H | 4-6H | 3H |
| Estabilidade | Ampla | Boa (mediante adaptações no mRNA) | Ruim |
| Duração de atividade | 1 Semana | Dias | 24-48H |
| Risco de integração | Sim | Não | Não |
| Efeitos <i>off-target</i> | Alto risco | Baixo risco | Baixo risco |

Adaptado de Zhang *et al*, 2019. Pós transfecção*

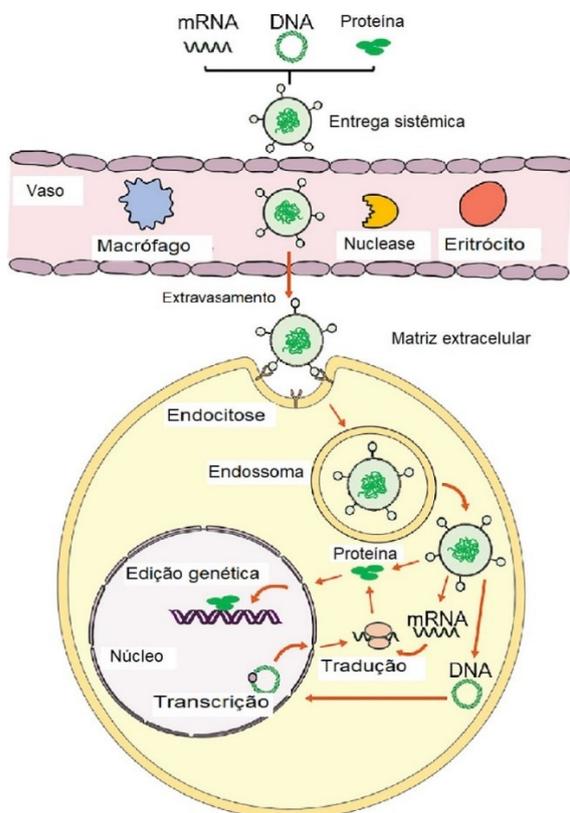


Figura 10: Estratégias para fornecimento de proteína Cas9 às células alvo. Adaptado de Zhang *et al*, 2019.

O sistema CRISPR/Cas9 apresenta-se, portanto, como uma importante alternativa aos sistemas de edição genética previamente disponíveis. Este se mostra mais simples e viável em termos econômicos e de tempo, dada a simplicidade atrelada ao mesmo. Outra vantagem significativa é a possibilidade de edições simultâneas em mais de um gene, anteriormente impossível com as ferramentas disponíveis (HRYHOROWICZ *et al*, 2017). Além da possibilidade de uso como ferramenta para edição gênica, outros usos vêm sendo derivados do sistema em questão, adaptando a proteína Cas9 para outras funções. Alterações nos sítios de atividade nucleasa da proteína Cas9, com formação de dCas9 (*deadCas9*), associação da mesma a fatores de transcrição e repressão, associação com domínios trocadores de nucleotídeos ou acetiltransferases são algumas das estratégias utilizadas para estudos de expressão gênica e epigenética (HRYHOROWICZ *et al*, 2017; ZHANG *et al*, 2019). Outras proteínas Cas vêm sendo exploradas de outras formas, demonstrando outros potenciais do sistema CRISPR. O uso de Cas13, por exemplo, uma proteína capaz de reconhecer sequências de RNA específicas e promover o corte inespecífico e colateral de outras sequências de RNAs permitiu o desenvolvimento do sistema SHERLOCK por Zhang e colaboradores como um potencial kit diagnóstico para alguns vírus (GOOTENBERG *et al*, 2017). Alguns dos usos do sistema CRISPR estão representados na **figura 11**.

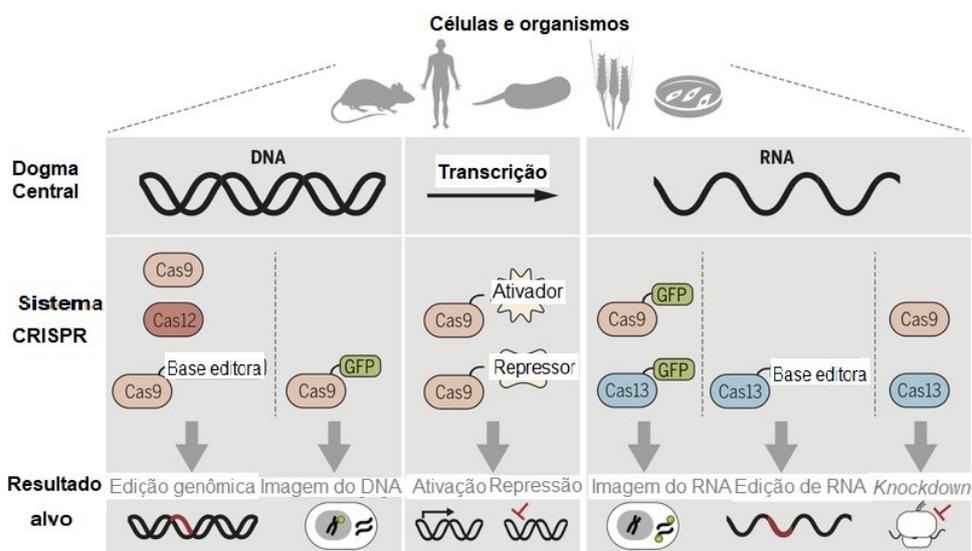


Figura 11: Possibilidades de uso do sistema CRISPR. Adaptador de Knott, G.; Doudna, J. 2018.

1.2.1 CRISPR/Cas9 em tripanosomatídeos

Alguns estudos para a aplicação do sistema CRISPR/Cas9 em diferentes espécies de *Leishmania* já foram publicados demonstrando a validade para aplicação do sistema nesse grupo de organismos. Em 2015, Sollelis *et al*, foram responsáveis pelo primeiro trabalho com esse grupo de organismos, promovendo o *knockout* em *Leishmania major*, de três genes da proteína paraflagellar rod-2, organizados *in tandem* no cromossomo 16. O grupo utilizou um plasmídeo, pTCAS9, para induzir a expressão constitutiva de Cas9 nesses organismos, e um plasmídeo, pLS7, para a expressão de SgRNA *in vivo*. Este possuía ainda sequências homólogas à região onde foi designado o corte pela Cas9, interespaçadas por gene de resistência à puromicina. Os resultados do grupo revelaram o sucesso na obtenção de parasitos *knockout* para os genes da proteína paraflagelar rod-2 a partir de análises por PCR, FISH, western blot e imunofluorescência. Adicionalmente, foi realizado sequenciamento completo de clones *knockout* e parasitos *wild type* para avaliação de efeitos *off target* decorrentes do uso do sistema. Os resultados estavam de acordo com o previsto, demonstrando a especificidade dessa ferramenta.

No mesmo ano, Zhang e Matlashewski induziram o *knockout* do gene da proteína transportadora de miltefosina em *Leishmania donovani* utilizando um plasmídeo para a expressão de Cas9 e plasmídeos para a expressão dos guias *in vivo* pelos parasitos. Esse trabalho ainda demonstrou a precisão da ferramenta a termos de favorecer o reparo mediado por sequência homóloga, permitindo ainda a inserção de sequências no genoma editado. Em 2017, os autores apresentaram novos resultados, demonstrando refinamento da metodologia além de demonstrar funcionalidade da mesma para as espécies *L. mexicana* e *L. major*. No mesmo ano, Beneke *et al* apresentaram um novo protocolo para o fornecimento dos RNAs guia, a partir da expressão da T7 RNAPolimerase e transfecção das sequências de DNA usadas em transcrições *in vitro* para promover síntese de SgRNAs *in vivo*. Além disso, o trabalho ainda apresenta uma nova ferramenta online para desenho dos RNAs guia além de diversos plasmídeos para a rápida geração de DNAs direcionados à inserções de tags fluorescentes, *knock-ins* e outras modificações (disponíveis em Leishgedit.net).

Peng *et al*, publicaram, em 2015, o primeiro trabalho de CRISPR/Cas9 envolvendo *Trypanosoma cruzi*. Os autores transfectaram parasitos, cepa CL, com

plasmídeos para expressão de Cas9 e de proteína fluorescente verde (eGFP). Posteriormente, SgRNAs, previamente transcritos *in vitro*, para interrupção do gene de eGFP foram dados aos parasitos com posterior avaliação de fluorescência. A partir do segundo dia pós-transfecção foi possível observar diminuição dos níveis de fluorescência com acentuação desse perfil até o quinto dia. Posteriormente, os autores demonstraram a viabilidade do protocolo para indução de alteração em genes endógenos. Ensaio revelaram alterações funcionais na edição de genes de alfa-tubulina, histidina amônia-liase e um transportador de ácidos graxos. Outros resultados importantes do trabalho sugerem que a via de reparo mediado por micro-homologia (MMEJ) parece ser a via favorecida em *T. cruzi*. Burle-Caldas *et al* em 2018 demonstrou a possibilidade de utilização da proteína recombinante SaCas9 para induzir *knockout* do gene GP72 em *cruzi*. O mesmo resultado foi obtido com a utilização de Cas9 expressa constitutivamente pelos parasitos. Esses trabalhos abriram possibilidade para estudos mais profundos, a partir da realização de *knockouts* e *knock-ins* direcionados a elucidar melhor o mecanismo fisiopatológico das leishmanioses e doença de chagas, assim como abrindo fronteiras para a identificação de novos alvos farmacológicos para tratamento e profilaxia dessas enfermidades.

JUSTIFICATIVA

Dada a relevância epidemiológica das leishmanioses, a escassez de ferramentas para seu controle, tanto no contexto mundial quanto local, e de dados sobre a funcionalidade de genes descritos a nível genômico, estudos para elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da enfermidade assim como a busca por novos alvos farmacológicos para tratamento e profilaxia da infecção tornam-se imprescindíveis. A emergência da resistência a miltefosina, único fármaco de administração oral aprovado para uso em humanos para tratamento de leishmaniose visceral e tegumentar, é uma realidade, e é extremamente relevante, especialmente em regiões onde os antimonials pentavalentes já se mostram ineficientes. A técnica revolucionária de CRISPR/Cas9 foi adaptada para edição gênica em *Leishmania*, e permite alterações de forma precisa e rápida, se tornando uma ferramenta moderna para avaliação de genes associados ao ciclo celular, expressão gênica ou à virulência em *Leishmania*, os quais são potenciais alvos para desenvolvimento de fármacos, melhor conhecimento sobre mecanismos de resistência ao tratamento, assim como para a potencial obtenção de parasitos atenuados para a formulação de uma estratégia vacinal para a leishmaniose. No entanto, face à limitações, tais como uma versão confiável do genoma, estudos empregando CRISPR/Cas9 com a espécie *L. amazonensis* são ainda escassos, embora essa espécie seja um dos principais agentes etiológicos das leishmanioses no novo mundo e apresenta mecanismos de virulência, interação com o sistema imune do hospedeiro e resistência aos fármacos, significativamente distintos daqueles apresentados por outras espécies. Assim, nesse estudo nos dedicamos a avaliar em que extensão, protocolos de edição gênica por CRISPR/Cas9, já descritos para outras espécies de *Leishmania*, são efetivos em produzir *knockout* no gene do transportador de miltefosina, como prova de conceito, em *L. amazonensis*.

OBJETIVOS

Objetivo Geral: Avaliar diferentes sistemas de edição gênica por CRISPR/Cas9 em *Leishmania amazonensis* empregando como prova de conceito a edição do gene da proteína transportadora de miltefosina.

Objetivos Específicos:

1. Gerar parasitos capazes de expressar transientemente o sistema CRISPR/Cas9 via plasmídeo episomal.
2. Gerar parasitos capazes de expressar constitutivamente o sistema CRISPR/Cas9 via plasmídeo integrativo.
3. Produzir Cas9 recombinante e testar sua atividade *in vitro* e para edição gênica em *L. amazonensis*.
4. Validar o sistema de edição gênica para a espécie em estudo realizando um *knockout* descrito na literatura para outras espécies de *Leishmania* (Proteína transportadora de miltefosina).
5. Determinar a IC50 para miltefosina dos parasitos mutantes para o transportador de miltefosina
6. Avaliar o fenótipo dos parasitos mutantes quanto a sua infectividade para macrófagos murinos

MATERIAIS E MÉTODOS

Culturas celulares

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas em meio 199 (Gibco) suplementado com adenina 10mmol.L^{-1} (Sigma Aldrich), hepes pH 7,5 1mol.L^{-1} (LGC Biotecnologia), hemina 0,25% (Sigma Aldrich), biotina 0,1% (Sigma Aldrich) e soro fetal bovino 10% (SFB) (Gibco), a 26°C , em incubadora de demanda de oxigênio bioquímico (BOD). As culturas foram acompanhadas diariamente sendo realizados repiques uma a duas vezes por semana mediante necessidade, respeitando o crescimento e recuperação da cultura a partir de cada inserção e tratamento. Adições de geneticina (Gibco) ($5,8\ \mu\text{g/mL}$), higromicina B (Invitrogen- Thermo Fisher) ($6,04\ \mu\text{g/mL}$), e miltefosina (Cayman Chemical Company) ($42,52\ \mu\text{Mol/mL}$) ao meio de cultura foram realizadas quando aplicável em concentração definida após ensaio para determinação de IC50.

Plasmídeos, RNAs guias, sequências doadoras e primers

O plasmídeo “pRM006” (**Figura 12**), contendo a sequência para a expressão da proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes*, foi cedido pela Dra. Eva Gluenz (University of Oxford, Oxford, Reino Unido). O plasmídeo “pLDCN” (**Figura 13**), contendo a mesma sequência, foi cedido pelo Dr. Greg Matlashewski (McGill University, Quebec, Canadá). As sequências de RNA guia foram transcritas *in vitro*, como descrito posteriormente, a partir de um DNA molde desenhado tendo em vista as estratégias de bioinformática e produzidos pela Sintese-Brasil, representante da Integrated DNA Technologies (IDT). Os primers para reação em cadeia da polimerase (PCR) e as sequências doadoras foram desenhadas tendo em vista a estratégia em questão e foram produzidos pela Sintese-Brasil, representante da IDT.

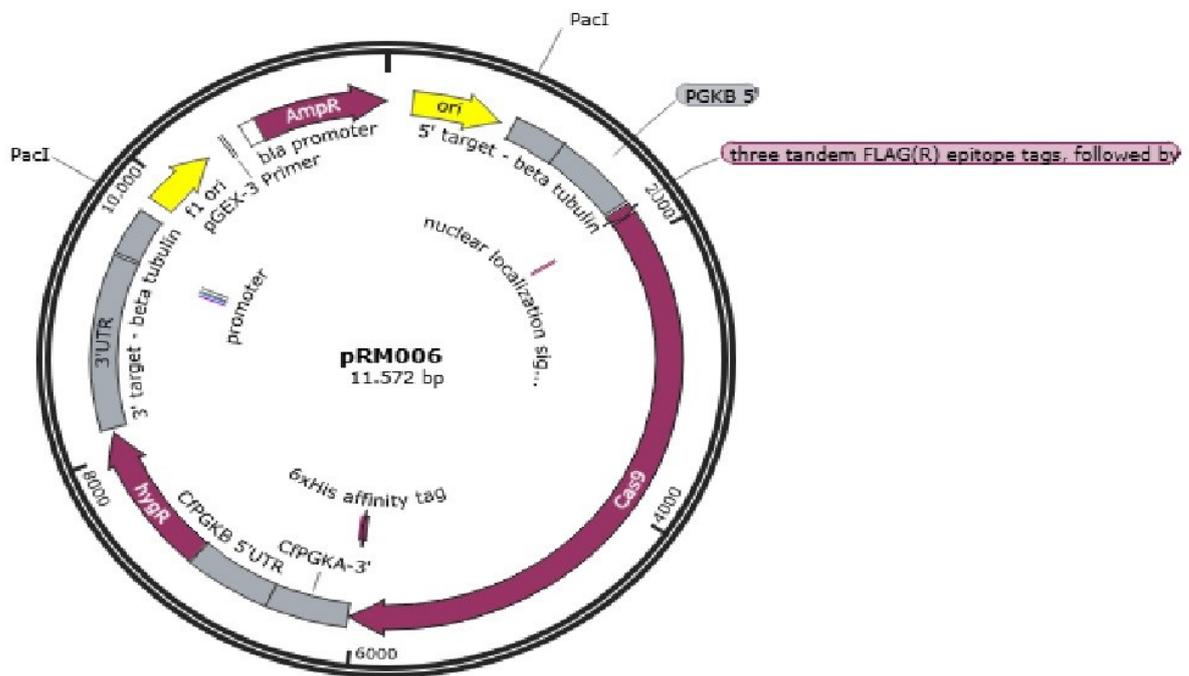


Figura 12: Plasmídeo pRM006, para expressão constitutiva de SpCas9 em diferentes espécies de *Leishmania*. O plasmídeo em questão possui gene de resistência para higromicina, sendo esse antibiótico utilizado para selecionar população transfectada. O plasmídeo funciona com uma estratégia integrativa, sendo que, ao ser linearizado com o uso de endonuclease *PacI*, o mesmo possui dois braços flanqueando a sequência codificadora de SpCas9 com as regiões 3' e 5'UTR do gene de Beta-tubulina de *L. major*. Em caso de homologia entre o fragmento transfectado e a região ortóloga no organismo alvo, o fragmento se integra no DNA a partir de recombinação homóloga.

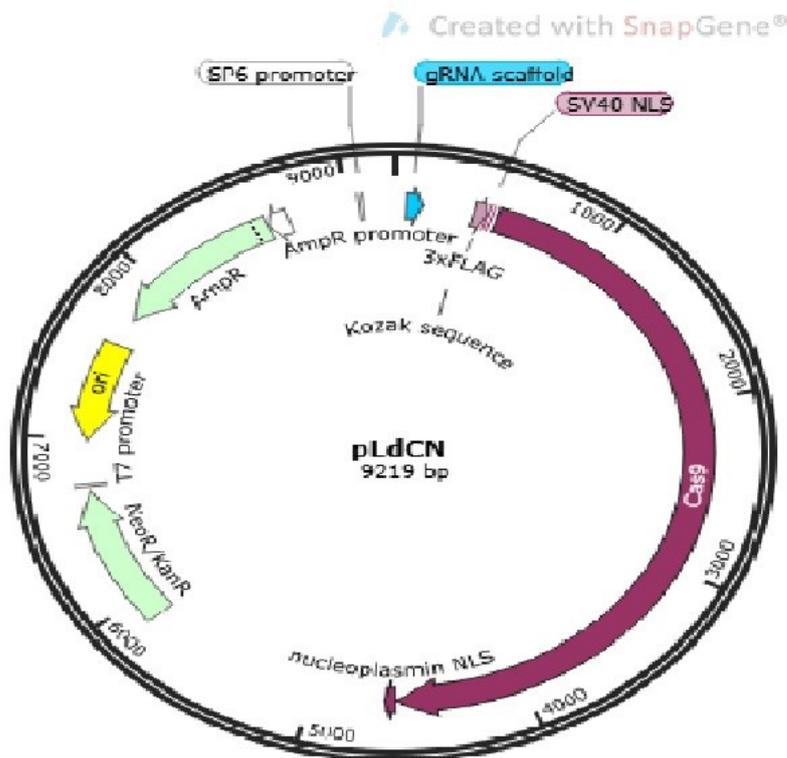


Figura 13: Plasmídeo pLDCN, para expressão transiente de SpCas9 em diferentes espécies de *Leishmania*. O plasmídeo em questão possui gene de resistência para neomicina/kanamicina/geneticina, sendo qualquer um desses antibióticos utilizado para selecionar população transfectada. O plasmídeo funciona de maneira episomal, possuindo sítios promotores para diferentes RNAPolimerases, podendo ser utilizado para síntese dos SgRNAs na própria cultura celular expressando SpCas9 a partir de clonagens prévias dessas sequências no próprio plasmídeo.

Transfecção de *Leishmania amazonensis* com o plasmídeo pRM006 para expressão constitutiva de Cas9

Previamente, 25 µg de DNA plasmidial pRM006 foram submetidos a digestão com 30 unidades de enzima de restrição PacI (New England Biolabs) e NEBuffer 3.1 (New England Biolabs), por 16 horas a 37°C. Os produtos da digestão foram submetidos a eletroforese em gel de agarose 0,7% para confirmar a linearização do mesmo.

Formas promastigotas (8×10^7), em fase log tardia de crescimento foram centrifugadas a 1540 x g, por 10 minutos a 4°C e ressuspensas em 160µL de tampão de eletroporação Tb-BSF (NaPO₄, CaCl₂, KCl, hepes), como descrito por Burkard *et al* 2011. DNA plasmidial (10 µg) linearizado foi preparado com tampão de eletroporação em volume final de 20µL. Os 20µL de suspensão de DNA plasmidial

foram adicionados de 80µL de suspensão celular e alocados em uma cuveta de eletroporação Gene Pulser 0,2 cm (BioRad) e a mesma foi submetida a dois pulsos em programa de eletroporação X-001 do equipamento Amaxa nucleofactor II (Lonza Biotechnologies). Após o choque, o conteúdo da cuveta foi adicionado à garrafa de cultura contendo 5mL de meio 199 suplementado com 10% de SFB. 20 µL de tampão de eletroporação foram adicionados aos 80µL restantes de suspensão celular e submetidos ao mesmo procedimento como controle.

Passadas 48 horas da transfecção, quantidades previamente definidas de higromicina B (Invitrogen- Thermo Fisher) (6,04 µg/ml) foram adicionadas a ambas as culturas celulares e ambas foram observadas diariamente em microscópio até ser observada seleção de parasitos resistentes no grupo receptor do plasmídeo.

Transfecção de parasitos expressando Cas9 transientemente via plasmídeo pLDCN com SgRNA e sequência doadora

4.10⁷ parasitos na forma promastigota, em fase log de crescimento, foram centrifugados a 1540 xg por 10 minutos a 4°C. O pellet celular foi ressuspenso em 80µL de Buffer Tb-BSF.

20 µg de SgRNAs previamente transcritos e purificados foram adicionados a 1µMol de solução de oligonucleotídeo referente à sequência doadora para direcionar o reparo homólogo e Buffer Tb-BSF para volume final de 20µL.

A solução mix de ácidos nucleicos e a suspensão celular foram misturadas e alocados em cuveta 2cm Gene Pulser (BioRad) e submetidas a dois protocolos X-001 no equipamento Amaxa Nucleofactor II (Lonza Biotechnologies). Após o choque, os conteúdos da cuveta foram passados a uma garrafa de cultura contendo meio 199 suplementado com 10% de SFB. Mesma quantidade de parasitos foi transfectada com 20ul de tampão Tb-BSF como controle.

Passadas 48 horas da transfecção, quantidades previamente definidas de miltefosina (42,52 µMol/mL) foram adicionadas às garrafas de cultura e ambas foram observadas diariamente em microscópio até ser observada a seleção de parasitos resistentes no grupo que recebeu os SgRNAs.

Análise da expressão de proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* por parasitos *L. amazonensis* transfectados com plasmídeos pLDCN e pRM006

Formas promastigotas ($4 \cdot 10^7$) de *Leishmania amazonensis*, previamente transfectadas com plasmídeos para expressão de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* (pLDCN e pRM006) em fase log tardia de crescimento foram submetidas a centrifugação a 1540 xg por 10 minutos a 4°C e o pellet celular resultante foi ressuscitado em 400µL de tampão de lise celular (5mM Tris-HCL pH 8,0; 15mM NaCl; 0,1% NP-40; 0,05 deoxicolato de sódio, 0,01% SDS; Mix inibidor de protease 5% (Sigma Aldrich)), de forma a obter extrato proteico de $1 \cdot 10^5$ parasitos/µL. Às amostras foi adicionado tampão de amostra de proteínas (62,5 mM Tris-HCL pH 6,8; 10% de glicerol; 2% SDS; 5% β-Mercaptoetanol; 0,002% de azul de bromofenol) em proporção 1:4 (Tampão:Amostra) e submetidas a aquecimento a 100°C por 10 minutos.

Os extratos gerados foram submetidos a eletroforese de gel de poliacrilamida 10%, 100V, por 70 minutos, corados com solução de comassie blue (Sigma Aldrich) (Comassie Blue 2,5g/L, ácido acético 7%, metanol 50%) por 1 hora e analisados quanto a sua qualidade em GelDoc EZ Documentation System (BioRad).

Os mesmos foram posteriormente submetidos a nova eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, 100V, 70 minutos e transferidos a membrana de nitrocelulose (Amersham Protan 0,45µm – GE Healthcare) por 1 hora a 350 mA utilizando tampão de transferência (25mM Tris-HCl, 192 mM glicina, 20% (v/v) metanol). Posteriormente a membrana foi incubada com solução de bloqueio (PBS1x, Tween 20 0,1%, Leite em pó desnatado 5%) por 1 hora. A membrana é posteriormente lavada com solução de PBS 1x Tween 20 0,1% 3 vezes, 5 minutos cada lavagem e incubada com anticorpo primário anti-Cas9, cedido pela professora Santuza Teixeira, (diluído 1:1000 em solução de bloqueio com 3% de leite desnatado em pó) por 16 horas a 4°C. A membrana foi novamente lavada 3 vezes e incubada com anticorpo secundário anti-IgG *mouse* associado a peroxidase (Diluido 1:3000 em solução de bloqueio) por uma hora a temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi incubada com solução reveladora do Kit ECL-Plus (GE Healthcare), expostas contra filme de raio X (Hyperfilm ECL, GE Healthcare) e reveladas utilizando revelador e fixador Kodak, seguindo as instruções do fabricante.

Ensaio de viabilidade celular via MTT para determinação de metade da concentração inibitória máxima (IC50)

De modo a estabelecer a quantidade de droga suficiente para selecionar população com resistência adquirida a higromicina, geneticina e miltefosina, via aquisição de gene de resistência em plasmídeos ou *knockout* induzido, formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8 foram submetidas a ensaio de viabilidade celular por MTT, como descrito por Dutta, *et al*, 2005, com adaptações, como demonstrado na **figura 14**.

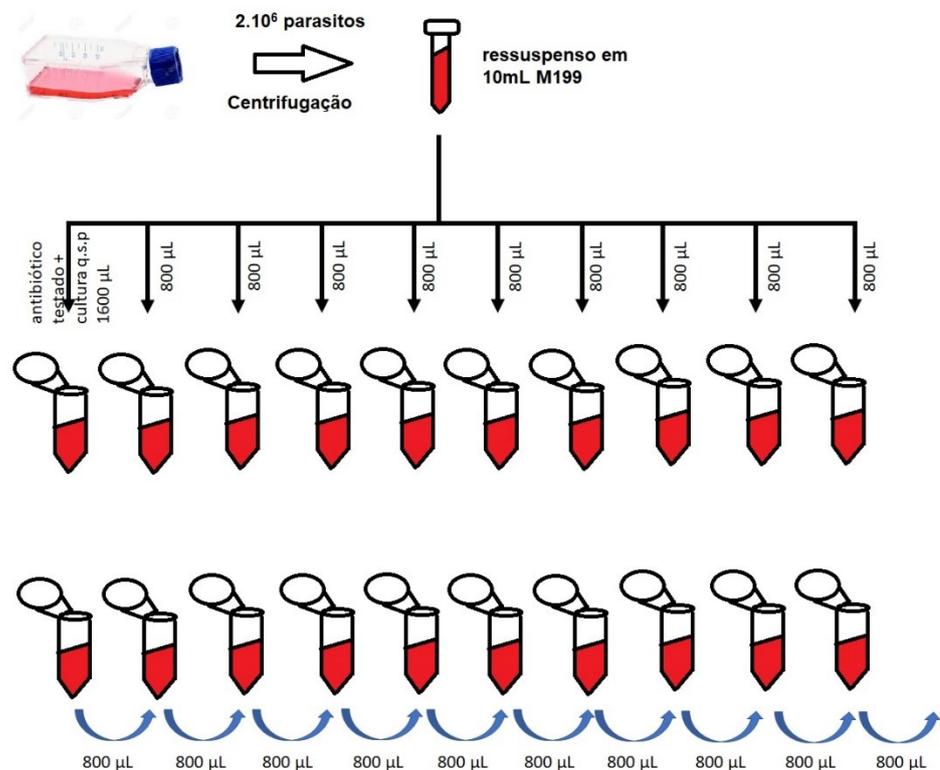


Figura 14: Representação esquemática do protocolo de diluição seriada de drogas para avaliação de viabilidade celular utilizando o ensaio de MTT

Formas promastigotas (2.10^6), fase logarítmica de crescimento, foram submetidas a centrifugação 2000 xg por 10 minutos à 4°C. O sedimento foi ressuspensão em 10mL de meio de cultura 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino. Esse volume foi posteriormente distribuído em 11 tubos *ependorf* de capacidade 2mL da seguinte forma: No primeiro tubo foram adicionados volumes correspondentes às concentrações a serem testadas das drogas geneticina (3,2 µL de solução 50mg/mL), higromicina (6,4 µL de solução 50mg/mL) e miltefosina (8,65

μL de solução 37mMol/mL) e quantidades suficientes para 1600 μL de cultura. Nos 10 outros tubos foram adicionados 800 μL de cultura, de modo que um desses será utilizado como controle positivo e não fara parte da diluição seriada. 800 μL do primeiro tubo são então homogeneizados com o material do tubo 2 e desses, 800 μL são homogeneizados com o material do tubo 3, sucessivamente até o decimo tubo, promovendo diluição (1:2) na concentração de droga entre os tubos. Preparou-se um tubo extra apenas com 800 μL de meio de cultura como controle negativo.

Plaquearam-se 200 μL de cada tubo em placa de 96 poços em triplicata, de modo a conter $4 \cdot 10^4$ parasitos por poço mais quantidades decrescentes de droga. Após plaqueamento, a placa foi devidamente vedada com parafilm e alocada em BOD a 26°C. Aguardou-se período de incubação de 48-72 horas, dependendo do tempo de ação da droga.

Para aferir a viabilidade celular após período de ação da droga, adicionou-se à cada poço, 50 μL de solução 2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl) - 2,5-difeniltetrazolio) (Sigma Aldrich) e encubou-se a placa a 37°C ao abrigo de luz. Centrifugou-se a placa a 2000 rpm por 5 minutos, desprezou-se o sobrenadante e resuspendeu-se o sedimento de formazan resultante com 200 μL de solução de Dimetilsulfoxido (DMSO) (Merck-Milipore) e procedeu-se à leitura da absorbância resultante em comprimento de onda de 495 nm em leitor de ELISA (BioRad, Richmond, Ca. USA). A partir dos valores obtidos para os controles, foi possível estabelecer a porcentagem de sobrevivida dos parasitos em cada poço a partir da exposição a concentrações decrescentes da droga. Os valores de concentração da droga (em Log_2) foram plotados contra a % de sobrevivida dos parasitos no programa Graphpad Prism 5, utilizando a função Sigmoide para obter o valor de IC50.

Análises bioinformáticas

As análises bioinformáticas foram processadas a partir dos materiais disponíveis relacionadas ao genoma de *L. amazonensis*. Pelo fato de esse não estar totalmente sequenciado e anotado, as informações disponíveis em bases de dados (tritypdb.org; lge.ibi.unicamp.br) foram associadas às disponíveis para outras espécies, principalmente *Leishmania mexicana*, dada a proximidade genética entre as espécies.

As análises basearam-se na avaliação da sequência de tubulina para esse organismo, prevendo possível homologia para inserção de plasmídeo integrativo “pRM006”, e, principalmente, avaliação da sequência do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina, de modo a identificar as possíveis sequências guia para indução de *knockout*, avaliação de sítios de restrição para validar a estratégia de confirmação do mesmo e desenho dos primers para reação em cadeia da polimerase. As principais ferramentas utilizadas foram as pesquisas de ortólogos com alinhamentos das diferentes sequências utilizando o Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation (MUSCLE – disponível em <https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) nas bases de dados e para avaliação dos primers desenhados (Disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) e digestões *in silico* para previsão dos produtos das diferentes digestões realizadas (disponível em <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/index.php>).

Desenho dos SgRNAs e sequências doadoras

Para desenho do SgRNAs, foi utilizada a ferramenta disponível na base de dados tritrypdb.net, Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool (EuPaGDT, disponível em <http://grna.ctegd.uga.edu/>). Para tal, foi utilizada a sequência do gene codificador do transportador de miltefosina de *L. mexicana* (U1103) (LmxM.13.1530), dada a disponibilidade desse genoma para procura de off targets e a semelhança com o gene disponível para *amazonensis*. Os guias foram filtrados para o uso com SpCas9, motivo PAM “NGG”, e a estratégia de reparo por sequência doadora homóloga foi desenhada com braços contendo 30 nucleotídeos de homologia a partir do sítio de quebra da dupla fita, planejando a inserção de três *stop códons* (TAG) *in tandem*, e a inserção de sítio de restrição para HindIII (AAGCTT) dada a ausência desse sítio nesse gene em *L. amazonensis*. Os guias foram disponibilizados pela ferramenta e listados levando em consideração os scores definidos pelo programa. A seleção dos mesmos se deu pela posição no gene, sendo posições próximas à metade do mesmo preferidas. As sequências selecionadas foram então analisadas quanto a sua viabilidade para utilização em *L. amazonensis*, avaliando a conservação da região escolhida e manutenção do motivo PAM nessa outra espécie.

Definidas as sequências dos SgRNAs, os mesmos foram adaptados à estratégia utilizada para síntese dos mesmos, desenhando por fim uma sequência de DNA, para ser utilizada como primer, contendo o sítio de ancoragem para a T7 RNA polimerase, sequência promotora para a mesma, sequência específica a ser utilizada como guia pela Cas9 (20pb) e sequência referente a *scaffold* da Cas9 para síntese do SgRNA quimérico.

Síntese dos SgRNAs

Para síntese dos SgRNAs, foram utilizados, inicialmente, os oligonucleotídeos previamente desenhados, contendo sítios necessários à ação da T7 RNA polimerase, sequência específica responsável por guiar a Cas9 ao sítio de corte e parte da sequência do *scaffold* da Cas9. Esses, foram utilizados como *primer forward* em reação em cadeia da polimerase, utilizando plasmídeo pAc-SgRNA-Cas9 (**Figura 15**) como *template* de DNA, o mesmo possuindo sequência completa do *scaffold* de Cas9, possibilitando síntese do RNA quimérico. Os primers utilizados para a reação estão dispostos no **ANEXO A**. A reação foi processada utilizando 20ng de DNA molde, 4 µL de tampão 5x GoTaq (Promega); 4nMol de desoxiribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 10 pMol de *primers forward* e *reverse*, 0,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e água DNase/RNase free (IDT), quantidade suficiente para volume de reação de 20 µL. As condições utilizadas na PCR encontram-se descritas na **tabela 3**.

Tabela 3: Condições de PCR para geração de *templates* de DNA para transcrição *in vitro* dos SgRNAs.

| Ciclos | Tempo | Temperatura |
|--------|---------------|-------------|
| 1x | 1 minuto | 95°C |
| 30x | 30 segundos | 95°C |
| | 30 segundos | 60°C |
| | 3:40 minutos | 72°C |
| 1x | 10:00 minutos | 72°C |
| 1x | infinito | 4°C |

Os produtos resultantes da PCR foram submetidos a purificação utilizando kit Nucleospin Gel and PCR cleanup (Macherey-Nagel), conforme instruções do fabricante. Os produtos foram submetidos a gel de agarose 1%.

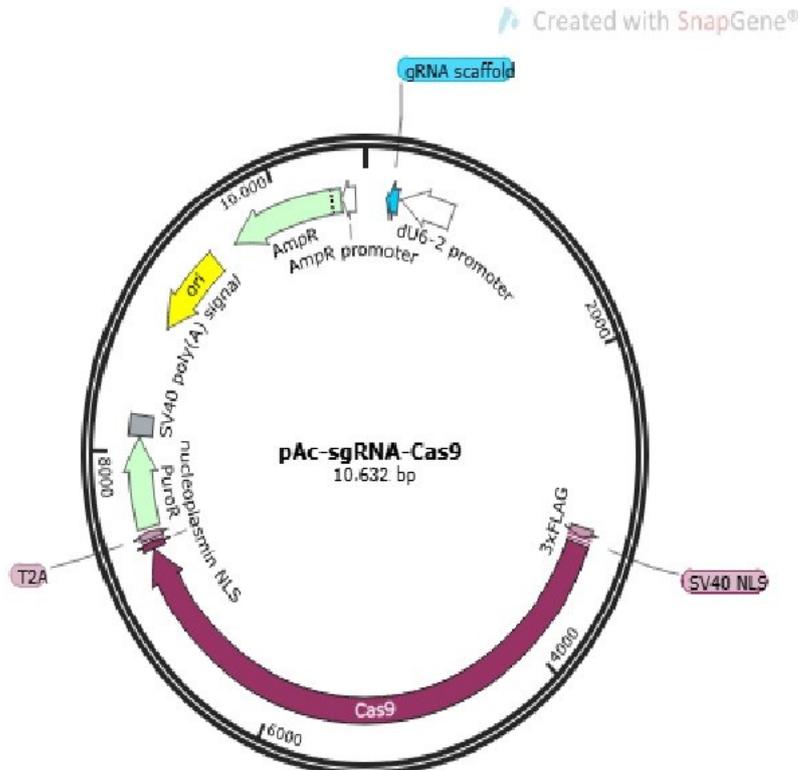


Figura 15: Plasmídeo pAc-SgRNA-Cas9, utilizado como *template* para a síntese dos SgRNAs. O vetor em questão é utilizado na PCR como molde para amplificação do *scaffold* de Cas9. Primers contendo região específica para os SgRNAs e regiões complementares a esse plasmídeo são sintetizados e utilizados na reação, promovendo a formação de oligonucleotídeos a serem utilizados posteriormente na transcrição *in vitro*.

Depois de purificados, os oligonucleotídeos foram utilizados para síntese dos SgRNAs *in vitro*, utilizando Kit MEGashortscript™ T7 (Thermo Fischer Scientific, USA), seguindo as instruções do fabricante. Os transcritos foram posteriormente purificados utilizando Kit MEGAclean (Thermo Fischer Scientific, USA), promovendo precipitação dos demais conteúdos com mistura de fenol ácido:Clorofórmio:Álcool isoamílico (25:24:1), precipitação do RNA com álcool 95° RNase free (Merck) e ressuspensão em água RNase free. Os produtos purificados foram posteriormente quantificados em Nanodrop e submetidos a gel de agarose 1,2% em condições desnaturantes. O gel foi preparado utilizando 0,6g de agarose e 47,5 mL de tampão MOPS (4,185g MOPS (Sigma Aldrich), 3 M acetato de sódio, EDTA 0,5 M, pH 8,0, água RNase Free quantidade suficiente para 1 L). Após dissolução da agarose por aquecimento, foram adicionados 2,5mL de formaldeído e a solução foi colocada em

suporte para polimerização. 1µL de amostra de RNA foi preparado junto a 5µL de tampão de amostra para RNA (contido no Kit) e 9µL de água RNase *free*, aquecida por 10 minutos a 65°C, adicionadas 20µg/mL de brometo de etídeo e aplicadas no gel. A eletroforese procedeu a 100V por 45 minutos e o gel foi posteriormente analisado em aparelho fotodocumentador (GEL LOGIC 1500 Imaging System).

Extração de DNA plasmidial

Para extração de DNA plasmidial, Bactérias quimiocompetentes *Escherichia coli* cepa XL1-Blue, previamente transformada com plasmídeo para expressão de Cas9 pRM006, cedidas pela Dra. Gabriela Burle-Caldas, foram inoculadas em 50mL de meio de cultura Luria-Bertani (triptona, NaCl, extrato de levedura, ampicilina 500 µg/mL) e deixadas a 37°C sob agitação por 16 horas para crescimento. Atingida densidade ótica ótima ($0,4 < x < 0,6$), as células foram submetidas a extração de DNA plasmidial com kit Quiagen Spin Miniprep (Quiagen) seguindo as instruções do fabricante.

Os mesmos foram ainda submetidos a protocolo de purificação mediante adição de 10% do volume em acetato de sódio 3M e 2 volumes de etanol 100% resfriado para precipitação dos conteúdos de DNA na amostra. A amostra foi posteriormente ressuspensa em volume adequado de água nucleasse *free* (Integrated DNA Technologies) e armazenada a -20°C para uso a curto prazo.

Os produtos gerados foram posteriormente dosados em Nanodrop e avaliados em gel de agarose (0,7%) para confirmação da qualidade da extração.

Extração de DNA genômico

Para extração de DNA genômico, 1.10^8 leishmanias em forma promastigota em fase logarítmica de crescimento foram submetidas a protocolo de extração de DNA genômico do Kit genomicPrep Mini Spin (GE Healthcare) conforme indicado pelo fabricante.

Os produtos obtidos foram dosados em Nanodrop e posteriormente utilizados em reação em cadeia da polimerase para amplificação específica do gene do transportador de miltefosina.

Reações de PCR para amplificação de fragmento contemplando região de corte do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina induzido por proteína SaCas9

Para amplificação de fragmento contido no gene codificador da proteína transportadora de miltefosina por PCR, foram empregados *primers forward* e *reverse* (**Anexo A**) previamente desenhados. A reação foi processada utilizando DNA genômico de parasitos *wild type* e parasitos previamente transfectados com o complexo ribonucleoproteico (SaCas9 + SgRNA) e selecionados na presença de miltefosina. Para a reação foram utilizados 20 ng de DNA molde, 4 µL de tampão 5x GoTaq (Promega); 4nMol de desoxiribonucleotídeos fosfatados (dNTP), 10 pMol de *primers forward* e *reverse*, 0,25 U de GoTaq DNA polimerase (Promega) e água DNase/RNase free (IDT), quantidade suficiente para volume de reação de 20 µL. As amostras foram preparadas e prontamente colocadas em termociclador Verit Thermal Cycler 96 well (Applied Biosystems, Califórnia, USA). As condições utilizadas na PCR encontram-se descritas na **tabela 4**. Após término da reação, as amostras foram adicionadas de 1,0µg/mL de brometo de etídeo e quantidade suficiente de tampão de amostra, submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7%, 100 V por 60 minutos, utilizando tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE)(Tris- 40mM, ácido Acético 20mM, EDTA 1mM) e avaliadas em GelDoc EZ Documentation System (BioRad).

Tabela 4: Condições de PCR para amplificação de fragmento contido no gene do TM.

| Ciclos | Tempo | Temperatura |
|--------|---------------|-------------|
| 1x | 1 minuto | 95°C |
| 30x | 30 segundos | 95°C |
| | 30 segundos | 68°C |
| | 3:40 minutos | 72°C |
| 1x | 10:00 minutos | 72°C |
| 1x | infinito | 4°C |

Digestão dos produtos de PCR para confirmação da edição genética

Os produtos resultantes das PCRs (20µL) foram submetidos a digestão enzimática com 10 Unidades de endonuclease XhoI, 3 µL de NEBuffer 3:1(10x) e água

nuclease free (IDT) em quantidades suficientes para reação de 30 μ L. Amplificado de PCR de mesmo gene (TM) em *Leishmania infantum* com *knockout* e reparo por homologia inserindo sítio de restrição para XhoI, previamente confirmado por nosso grupo, foi submetido a mesmo procedimento de modo a ser utilizado como controle positivo da digestão. As reações foram incubadas em banho maria a 37°C, por 16 horas, adicionadas a quantidade suficiente de tampão de amostra, 1,0 μ g/mL de brometo de etídeo e submetidas a eletroforese em gel de agarose 0,7%, 100V por 60 minutos, com tampão TAE com posterior avaliação em GelDoc EZ Documentation System (BioRad).

Indução e purificação de SaCas9

De modo a obter quantidades suficientes e funcionais de Cas9 de *Staphylococcus aureus* (SaCas9), uma alíquota de bactérias *Escherichia coli* cepa rosetta-gami2, foi descongelada e colocada em contato com 15 ng de DNA plasmidial de vetor p6xHisSaCas. A mistura foi submetida a banho seco a 42°C por 90 segundos para transformação do material genético. 20 mL de meio LB ágar (NaCl, triptona, extrato de levedura, ágar bacteriológico) foram plaqueados e adicionados de 20 μ L de soluções 1 μ g/ μ L de clorafenicol e ampicilina para seleção de bactérias aceptoras do plasmídeo. À suspensão transformada, foi adicionado 1 mL de meio LB e a mistura foi deixada sob agitação por 60 minutos. 100 μ L da mesma foram então espalhados, com alça de Drigalski na placa de cultura e incubada a 37°C por 16 horas.

No dia seguinte, quatro pré-inóculos foram preparados da seguinte forma: Uma colônia isolada da placa de cultura foi retirada com auxílio de uma ponteira estéril e adicionada a 20mL de meio LB, em tubo falcon de 50mL, com 20 μ g de clorafenicol e ampicilina. A mistura foi incubada a 37°C por 5 minutos, homogeneizada e separada em quatro tubos falcon, alocando 5mL em cada. Os pré-inóculos foram então deixados por 16 horas em Agitador, a 37°C, 180 RPM.

No dia seguinte, cada um dos pré-inóculos foi vertido em 500 mL de meio LB, preparado de mesma forma, e alocados em agitador a 37°, 180 RPM. Após 4 horas, a densidade optica foi medida, demonstrando crescimento adequado das células (0,4 < DO < 0,6). Procedeu-se, portanto, ao início da indução de expressão da proteína recombinante. 500 μ L de solução 1 mM de Isopropil-beta-D-1-Tiogalactopiranosida

(IPTG) foi adicionado a cada um dos inóculos e incubado a 18°C por 24 horas em agitador a 180 RPM.

Passado o período de indução, as suspensões celulares foram submetidas a centrifugação a 8000 RPM para obtenção apenas das células. Cada *pellet* formado foi ressuspenso utilizando 40mL de tampão de ligação (fosfato 20mM, NaCl 0,5M, imidazol 30mM) e 800ul de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF-Sigma Aldrich) 100mM e posteriormente submetido a lise mecânica pelo equipamento Emulsiflex (ATA Scientific), seguindo as instruções de uso do fabricante. Os produtos gerados foram submetidos a centrifugação a 40000xg, 30 minutos, 4°C em centrífuga de alta performance e a fração solúvel foi recolhida.

Procedeu-se então à purificação da proteína de interesse a partir do sistema de cromatografia líquida AKTAprime (GE Healthcare), seguindo os protocolos descritos pelo fabricante. Foi utilizado para tal, uma coluna de níquel, utilizada unicamente para purificação dessa proteína, previamente estripada, hidratada e recuperada com solução de sulfato de níquel como indicado pelo fabricante. As amostras foram submetidas ao equipamento, com coleta posterior de amostra *flowthrough*. Posteriormente a coluna foi submetida a eluição com tampão de eluição rico em imidazol (fosfato 20mM, NaCl 0,5M, imidazol 500mM) e as frações com maiores quantidades de proteína, como indicadas pelo equipamento, foram coletadas e submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 10%, 100V, 70 minutos e coradas por solução de Comassie Blue para análise. As frações mais concentradas foram reunidas em tubo falcon de 50mL com filtro de 50 Kda (Amicon - MerckMilipore) e submetidas a nova centrifugação a 4000xg, 4°C por 20 minutos. A amostra retida, rica em SaCas9 purificada, foi recuperada e submetida a doseamento por método de Bradford, utilizando o kit Bio-Rad Protein Assay, seguindo as instruções do fabricante.

Teste de atividade de SaCas9 *in vitro*

Para atestar a atividade nuclease da proteína SaCas9 recém purificada, procedeu-se a ensaio de digestão *in vitro*. Para tal, um amplificado de PCR gerado a partir da região codificadora do gene GP72 de *T. cruzi* foi utilizado como DNA molde e um SgRNA desenhado para promover corte nesse gene foi utilizado em associação à proteína SaCas9. Tanto o amplificado de PCR quanto o SgRNA foram gentilmente cedidos pela Dra. Gabriela Burle-Caldas, do Laboratório de Genética de

Tripanossomatídeos (ICB-UFMG). A metodologia foi seguida como descrito previamente (Burle-Caldas *et al* 2017). 12 µg de SaCas9 purificada foram incubados com 18 µg de SgRNA, 8 µL de Cas9 Buffer (20 mM HEPES pH 7,5, 150 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 0,5 mM DTT), 2 µg de DNA molde e água nucleasse *free* (IDT) quantidade suficiente para reação de 20 µL. Uma SaCas9 de lote anterior e atividade previamente confirmada foi utilizada como controle positivo, sendo outra reação preparada da mesma forma em paralelo. A reação de digestão foi incubada em estufa a 37°C por 135 minutos e posteriormente submetida a eletroforese em gel de agarose 1%, 100 V, 45 min e o gel foi posteriormente avaliado em aparelho fotodocumentador (GEL LOGIC 1500 Imaging System).

Transfecção de *L. amazonensis Wild type* com complexo ribonucleoproteico composto por proteína SaCas9 recombinante e SgRNA específico para o transportador de Miltefosina

Formas promastigotas ($4 \cdot 10^6$), em fase log de crescimento, foram centrifugados a 1540 xg por 10 minutos a 4°C. O *pellet* celular foi ressuspenso em 70µL de Buffer Tb-BSF.

SaCas9 (15 µg) e 20 µg de SgRNAs, previamente transcritos e purificados, foram incubados com 10 µL de Buffer Tb-BSF 3X por 10 minutos a temperatura ambiente e posteriormente 10 minutos a 37°C em banho seco de modo a formar o complexo ribonucleoproteico. Foram adicionados a essa mistura, 1µMol de solução de oligonucleotídeos referente à sequência doadora para direcionar o reparo homólogo e água nucleasse *free* para volume final de 30µL.

A solução mix de ácidos nucleicos e complexo ribonucleoproteico e a suspensão celular foram misturadas e alocados em cuvetas 2cm Gene Pulser (BioRad) e submetidas a dois protocolos X-001 no equipamento Amaxa Nucleofactor II (Lonza Biotechnologies). Após o choque, os conteúdos da cuvetas foram passados a uma garrafa de cultura contendo meio 199 suplementado com 10% de SFB. Mesma quantidade de parasitos *wild type* foi transfectada com 30µL de tampão Tb-BSF como controle.

Passadas 48 horas da transfecção, quantidades previamente definidas de miltefosina (42,52 µMol/mL) foram adicionadas às garrafas de cultura e ambas foram

observadas diariamente em microscópio até ser observada a seleção de parasitos resistentes no grupo que recebeu os SgRNAs.

Obtenção de macrófagos derivados de medula óssea (BMDM-Bone marrow derivated macrophages) e infecção por *L. amazonensis*

Macrófagos derivados de medula óssea foram obtidos como descrito por Oliveira (2018). Camundongos BALB/c foram eutanasiados por deslocamento de coluna cervical, e posteriormente seus fêmures e tíbias foram dissecados assepticamente. Todos os ossos foram embebidos em álcool 70°GL e posteriormente lavados com PBS 1X. As extremidades ósseas foram retiradas e a parte central foi lavada com meio DMEM suplementado com 10% de SFB com auxílio de uma seringa de insulina, para obtenção dos conteúdos medulares. Os conteúdos foram alocados em tubo falcon e submetidos a centrifugação por 1200 RPM, 8 minutos, 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet celular foi ressuspensão em meio DMEM completo para diferenciação celular (suplementado com 10% de SFB, 1% de L-glutamina, 100U/mL de penicilina G e 20% de sobrenadante de cultura celular L929) e alocado em garrafas de cultura e incubadas a 37°C em atmosfera controlada com 5% de CO₂. Após 48 horas de cultivo, mais 20 mL de meio DMEM completo foram adicionados às garrafas de cultura.

Após 7 dias, as células diferenciadas devem ser retiradas da garrafa. Para tal, foram realizadas sucessivas lavagens das paredes da garrafa com PBS 1X assim como destacamento mecânico das células com auxílio de rodo celular (Cell Scraper, 24cm, TPP - Techno Plastic Products). Os sobrenadantes coletados foram recolhidos e submetidos a centrifugação por 1500 RPM, 10 minutos, 4°C e os pellets formados foram ressuspensos em 5 mL de meio DMEM completo. Uma alíquota da suspensão celular foi retirada para avaliação de viabilidade celular em microscópio por coloração com azul de trypan. As células foram contadas em câmara de Neubauer e 1.10^5 macrófagos foram plaqueados em Chamber Slide (Lab-Tek), sendo colocados a 37°C, 5% de CO₂ por 2 horas para fixação.

Para avaliar a infecção, 5.10^5 parasitos (5:1), em forma promastigota, fase estacionária de crescimento, foram incubadas por diferentes tempos (3,6,24,48 e 72 horas) com os macrófagos fixados. Para cada poço, foi aguardado o tempo previsto de infecção e posteriormente, foram retirados os sobrenadantes, contendo as células

não internalizadas. Para avaliação da porcentagem de macrófagos infectados, os poços da chamber slide foram submetidos a coloração por panótico rápido (Laborclin, Pinhais, Paraná, Brasil), seguindo as instruções do fornecedor. Os poços então foram contados em microscópio ótico Olympus BX50 (Olympus, Center Valley, PA, USA). Foram contabilizados 300 macrófagos por poço, com avaliação de número de células infectadas e quantidade de parasitos por célula. A análise estatística dos dados se deu por teste pareado t-student.

RESULTADOS

Avaliação da expressão de SpCas9 por *Leishmania amazonensis* PH8 transfectada com plasmídeo episomal pLDCN

O vetor episomal pLDCN, para expressão de Cas9 de *Streptococcus pyogenes* teve sua identidade previamente confirmada por meio de reações de digestão (SOUTO, 2019), e posteriormente foi empregado para a transfecção de *L. amazonensis* PH8. Para a seleção de parasitos capazes de produzir SpCas9, foi

utilizado o antibiótico geneticina, cujo relativo gene de resistência encontra-se no vetor de expressão. Dessa forma, foi necessário primeiramente delimitar o valor de IC50 dessa droga para a cepa em questão. A **figura 16** demonstra o comportamento de *L. amazonensis* PH8 frente a concentrações de G418 decrescentes em ensaio de viabilidade celular com MTT. É possível observar o comportamento em curva sigmoide esperado para essa análise. A quantidade suficiente para induzir a morte de 50% dessa população foi obtida a partir desses dados (1,45 +- 1,15 µg/mL).

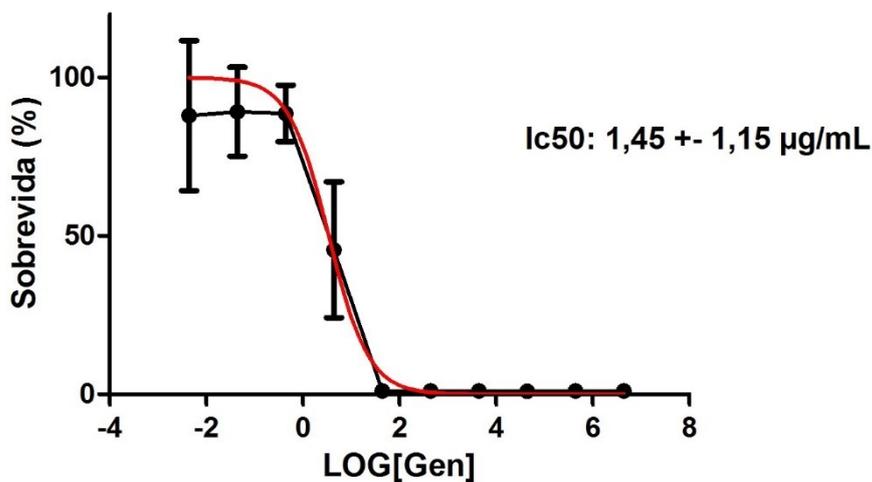


Figura 16: Determinação da IC50 de geneticina para *L. amazonensis* PH8 por ensaio de MTT. Formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8 foram expostas a diferentes concentrações de G418 e a viabilidade celular foi determinada após 72 horas. Determinação da concentração inibitória de 50% da população foi calculada utilizando o software GraphPad prism 5.

Uma vez definido o valor correspondente a IC50 dessa substância para essa cepa (1,45 µg/mL de cultura), foi considerada a utilização de quantidade quatro vezes maior de geneticina para promover a seleção de população resistente (5,8 µg/mL).

Após transfecção e seleção com 4x o valor da IC50 para geneticina, foi avaliada a expressão de SpCas9. Para isso, procedeu-se à obtenção de extrato proteico total dessa cepa e de controles. A avaliação da qualidade dos extratos proteicos de *L. amazonensis* PH8 *wild type*, da mesma cepa transfectada com plasmídeo pLDCN e de *L. infantum* PP75 transfectada com plasmídeo pRM006, controle positivo para expressão de Cas9 encontra-se no **anexo B** dessa dissertação. Os extratos foram

então submetidos a Western blot para avaliação da expressão específica de Cas9, com anticorpo anti-Cas9 (**Figura 17**).

Considerando o resultado positivo para expressão de SpCas9, com peso molecular (160 Kda), a cepa transfectada foi considerada apta para os experimentos posteriores de edição com SgRNAs para indução de *knockout* do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina.

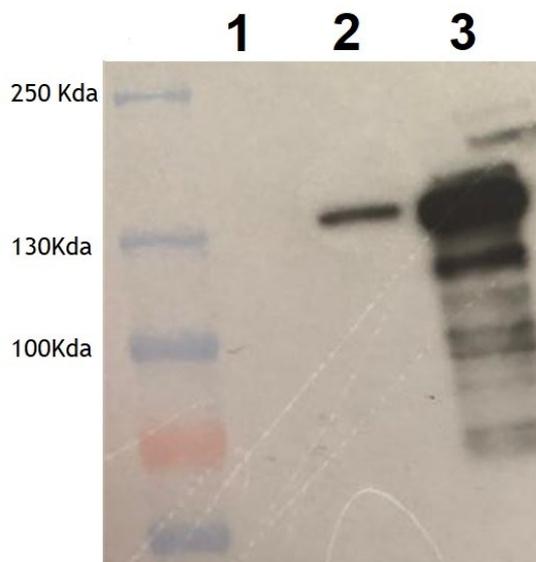


Figura 17: Avaliação da expressão de Cas9 por *L. amazonensis* tranfectada com o plasmídeo pLDCN. Formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8, previamente transfectadas com plasmídeo pLDCN para expressão de Cas9, foram lisadas para obtenção de extrato proteico total. Esse foi submetido a ensaio de western blot, utilizando anticorpo anti-Cas9 para atestar a presença da proteína (3). Parasitas *wild type* foram utilizados como controle negativo (1) e *L. infantum* pRM006 (2) foram utilizados como controle positivo.

Geração de parasitos capazes de expressar Cas9 de *Streptococcus pyogenes* a partir de um plasmídeo integrativo (pRM006)

Alternativamente ao plasmídeo episossomal (pLDCN), procedemos à geração de parasitos capazes de expressar a proteína Cas9 por meio de plasmídeo integrativo (pRM006), almejando posteriormente avaliar se há diferença relativa à eficiência entre as estratégias. A estratégia formulada para uso desse plasmídeo consiste em promover a inserção da sequência codificadora da proteína Cas9 de *Streptococcus pyogenes* no *locus* de beta-tubulina de diferentes espécies de Leishmania.

O plasmídeo pRM006 contém sequência codificadora para gene de resistência a higromicina, e dessa forma, foi necessário estabelecer, primeiramente, a IC50 relativa a esse antibiótico para *L. amazonensis* PH8. Dessa forma, formas promastigotas dessa cepa foram submetidas a ensaio de viabilidade celular por MTT após incubação com quantidades decrescentes de higromicina B. A **figura 18** demonstra o comportamento da cepa submetida a esse ensaio. É possível observar o comportamento esperado, a partir do qual foi possível extrapolar o valor relativo à quantidade de higromicina suficiente para promover a morte de 50% da população, estabelecendo o valor de IC50 para essa cepa (1,51 +- 1,27 µg/mL).

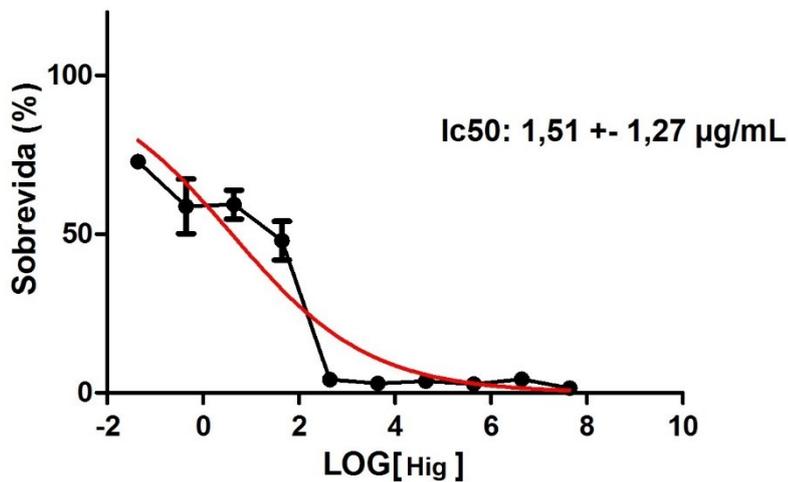


Figura 18: Determinação da IC50 de higromicina para *L. amazonensis* PH8 por ensaio de MTT. Formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8 foram expostas a diferentes concentrações de higromicina e a viabilidade celular foi determinada após 72 horas. O valor referente à concentração inibitória de 50% da população foi determinado utilizando o software GraphPad prism 5.

Para obtenção dos parasitos expressando Cas9 de forma constitutiva, o plasmídeo pRM006 foi extraído de *E. coli* e, posteriormente, submetido a digestão com endonuclease de restrição PacI. O plasmídeo pRM006 possui dois sítios de restrição para a enzima PacI, e, portanto, a reação de digestão promove a formação de dois fragmentos distintos. O fragmento maior, 8944 pares de base, além de possuir a sequência codificadora do gene de resistência a higromicina, possui sequência codificadora da proteína Cas9, sendo essas flanqueadas pelas regiões 5' e 3' UTR de

genes de Beta-tubulina de *Leishmania major* Friedlin. A transfecção com o fragmento maior promove a inserção da sequência codificadora para Cas9 em sítio de beta-tubulina de diferentes espécies de *Leishmania* mediante recombinação homóloga. A **figura 19** ilustra a digestão realizada com *Pacl*, a qual gerou apenas dois fragmentos em tamanhos esperados (8944 e 2626).

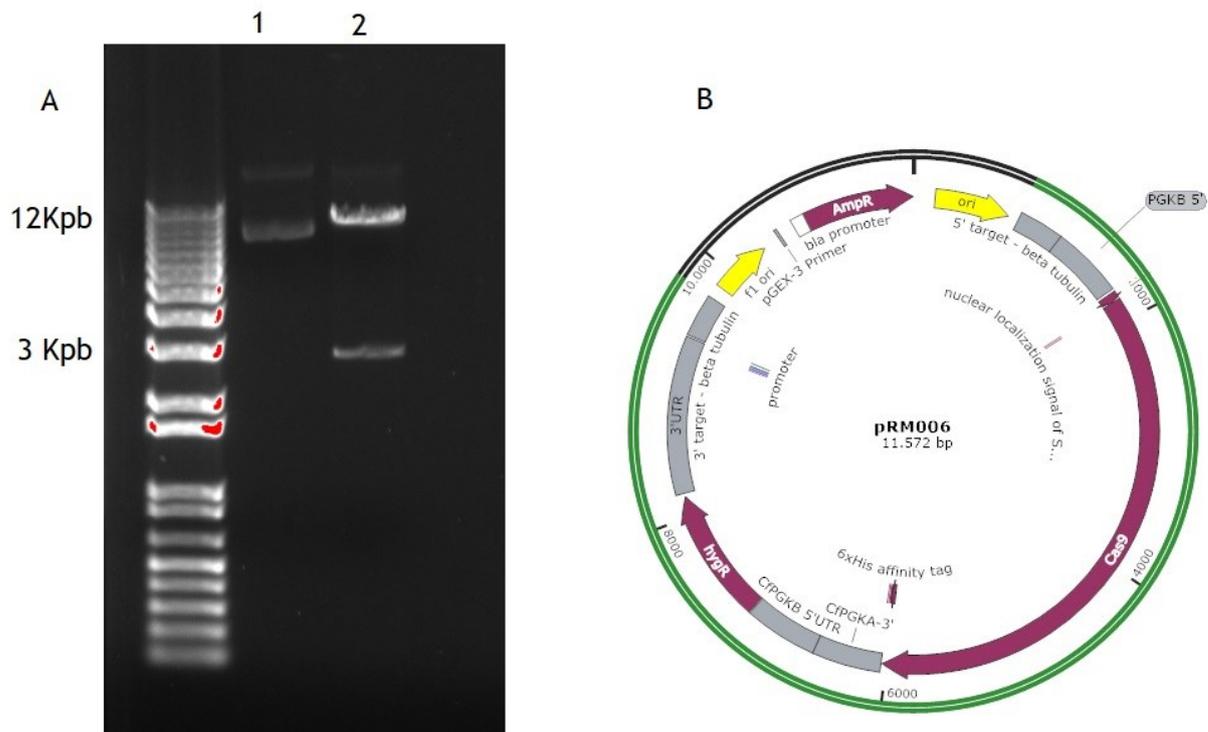


Figura 19: Digestão do plasmídeo pRM006 com enzima *Pacl*. A) Para utilização de forma integrativa, o plasmídeo pRM006 (11.572 pb) (1) foi submetido a digestão com enzima de restrição *Pacl* e o produto obtido (2) foi posteriormente submetido a eletroforese em gel de agarose. B) O plasmídeo possui dois sítios de restrição para *Pacl* (831 e 9775), de modo que sua digestão promove a formação de dois fragmentos (8944 pb em verde e 2626 pb em preto).

Uma vez que a região de beta-tubulina presente no pRM006 é proveniente do genoma de *L. major*, procedeu-se a realização de análises bioinformáticas para prever a possibilidade de homologia e de recombinação homóloga ocorrer em *L. amazonensis*. Para tal, foram utilizados os dados disponíveis no sequenciamento do genoma de *L. amazonensis* fornecido pela UNICAMP (disponível em lge.ibi.unicamp.br). Esses dados, entretanto, não se mostram completos e devidamente anotados, de modo que as análises possibilitaram a identificação de sequência apenas sugestiva de beta-tubulina em meio aos *Scaffolds* disponíveis na base de dados. Esses dados, entretanto, são relativos à região codificadora desse

gene, não às UTRs. Desse modo, as análises demonstraram-se insuficientes para garantir a existência de homologia entre as regiões desejadas no genoma de *L. major* e *L. amazonensis*. Apesar disso, a demonstração da utilização desse plasmídeo para *Leishmania mexicana*, uma espécie muito próxima a *L. amazonensis*, pelo trabalho de Beneke e colaboradores (2017), nos deu suporte para o prosseguimento dos experimentos e a realização da transfecção. As análises utilizando a base de dados tritryp demonstraram que a sequência inserida no plasmídeo referente à porção 5' de beta-tubulina das 16 cópias de beta-tubulina de *L. major* Friedlin possui 81% de similaridades com região ortóloga, que precede o gene LmxM. 32.0792 (beta-tubulina), em *L. mexicana*. Essa não demonstrou *hit* significativa para *L. amazonensis*. Para a porção 3', a mesma análise demonstrou 86% de similaridade com a região posterior ao mesmo gene previamente citado, e para *L. amazonensis*, uma região, não anotada, foi identificada, possuindo os mesmos 86% de similaridade.

Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram então submetidas a protocolo de transfecção com plasmídeo pRM006 linearizado. Após dois dias os parasitos transfectados foram submetidos a seleção com higromicina B em concentração relativa a 4x a IC50 definida para a cepa em questão. Após tratamento com o antibiotico, foi possível observar seleção de parasitos resistentes. Esses foram submetidos a lise para obtenção de extrato proteico para posterior confirmação da expressão de SpCas9 por ensaio de western blot. Os géis de poliacrilamida utilizados para teste do extrato proteico encontram-se disponíveis no **anexo B**. Já a **figura 20** demonstra o resultado da análise de western blot com anticorpo específico anti-Cas9. Observa-se a presença de reatividade com proteína de 160 KDa, com peso molecular esperado para Cas9, na cepa transfectada, assim como no controle positivo, correspondendo a cepa PH8 previamente transfectada com o plasmídeo episossomal, mas não no controle negativo (PH8 não transfectada).

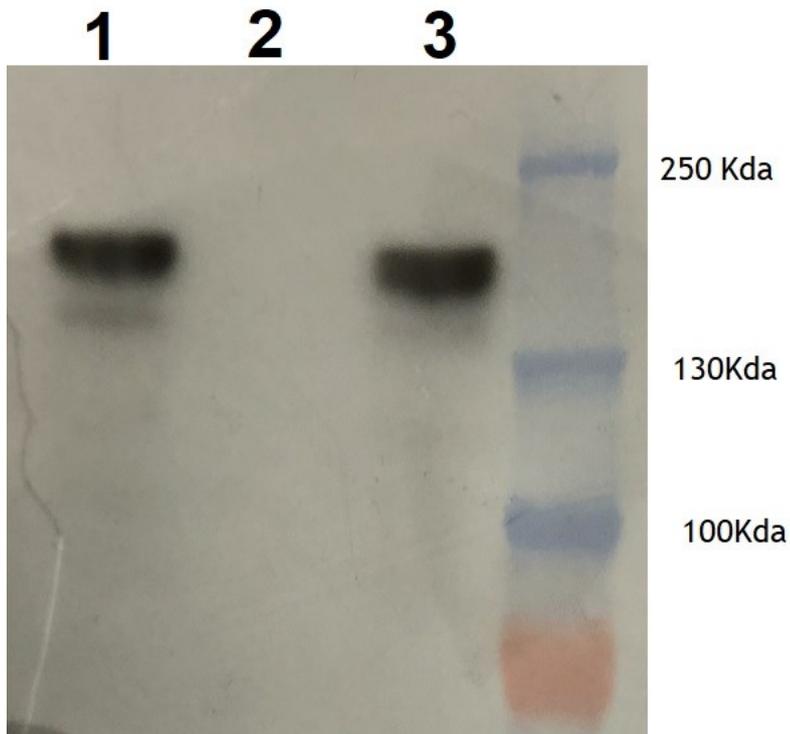


Figura 20: Avaliação da expressão de Cas9 por *L. amazonensis* tranfectada com o plasmídeo pRM006. Formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8, previamente tranfectadas com plasmídeo pRM006 para expressão de Cas9, foram lisadas para obtenção de extrato proteico total. Esse foi submetido a ensaio de western blot, utilizando anticorpo anti-Cas9 para atestar a presença da proteína (3). Parasitas *wild type* foram utilizados como controle negativo (2) e *L. amazonensis* previamente tranfectada com plasmídeo pLDCN (1) foram utilizados como controle positivo.

Análise bioinformática da sequência do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina e desenho das sequências de RNA guia

A partir da confirmação da expressão de proteína Cas9 por ambas as cepas tranfectadas com os diferentes plasmídeos (pLDCN e pRM006), procedeu-se à análise da sequência codificadora do gene do transportador de miltefosina (TM), a fim de estabelecer as melhores sequências guias para indução desse *knockout*.

Inicialmente, procedeu-se à realização de BLAST utilizando a base de dados fornecida pela UNICAMP referente ao sequenciamento de *L. amazonensis* para busca de sequência referente ao gene do transportador. Essa busca, entretanto, não retornou resultados satisfatórios pois o genoma está incompleto, fragmentado e não

tem anotações adequadas, fazendo com que fosse necessário a utilização de outras ferramentas. Partindo-se do gene utilizado por Zhang e Matlashewski, LdBPK_131590.1, o transportador de miltefosina no organismo *Leishmania donovani*, procedemos à pesquisa por ortólogos, ou seja, genes geneticamente relacionados a esse em outros organismos geneticamente próximos. Foram identificados por meio dessa análise, o gene ortólogo em *L. mexicana*, LmxM.13.1530, que possivelmente apresentaria-se como um bom modelo para ser utilizado como preditor para *L. amazonensis*, e uma sequência isolada da CDS (região codificadora - coding sequence) referente ao ortólogo em *L. amazonensis*, LAMA_000208300.

Cabe ressaltar que, uma vez que o sequenciamento do genoma de *L. amazonensis* está incompleto, pesquisadores do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Vacinas (INCTV) decidiram investir no sequenciamento do genoma dessa espécie, empregando plataformas Illumina e PACBIO (Resultados ainda não publicados). A sequência disponível na base de dados foi então comparada com os dados referentes a esse sequenciamento. Os resultados da análise demonstram que há apenas um match significativo no genoma que apresenta 100% de homologia à sequência depositada no tritryp, garantindo que a utilização da mesma realmente reflete a sequência original para a cepa PH8. Adicionalmente, foi confirmado que a sequência em questão se localiza na fita reversa do cromossomo 13, assim como as sequências ortólogas em *L. infantum*, *L. donovani* e *L. mexicana*. A sequência foi, portanto, utilizada para o delineamento dos RNAs guias. Adicionalmente, foi utilizada sequência do ortólogo em *L. mexicana*, devido à similaridade entre as espécies (99% de identidades entre os ortólogos) e a necessidade de organismo de referência para predição de off-targets na seleção de sequências guias.

Para desenho das sequências guias, foi utilizada a ferramenta online disponível pela base de dados do tritryp, o EuPaGDT (Eukaryotic Pathogen CRISPR guide RNA/DNA Design Tool), utilizando SpCas9 (PAM Motif NGG) para localização dos guias para a Cas9 referente a *Sterptococcus pyogenes*, e utilizando o organismo *L. mexicana* (MHOMGT2001U1103 – TriTrypDB-28) como organismo de referência para pesquisa de *off-targets*. A sequência utilizada como *template* foi a do gene relativo a *L. mexicana*, LmxM.13.1530 e a inserção realizada na sequência doadora foi TAGATAGATAGAAGCTT, referente a três *stop-codons in tandem* e o sítio de restrição para a endonuclease HindIII. A **figura 21** demonstra de forma esquemática

a estratégia utilizada. Foram utilizadas as duas sequências de maior *score* calculado pela ferramenta, que se localizavam em região mais central do gene, de modo a ser mais provável de gerar *knockout* gênico com menores possibilidades de formação de uma proteína truncada, mas ainda funcional. Ambas foram posteriormente avaliadas quanto a viabilidade para o ortólogo em *L. amazonensis*, de forma que ambas apresentaram 100% de homologia entre as duas espécies e, portanto, demonstraram-se como um guia válido.

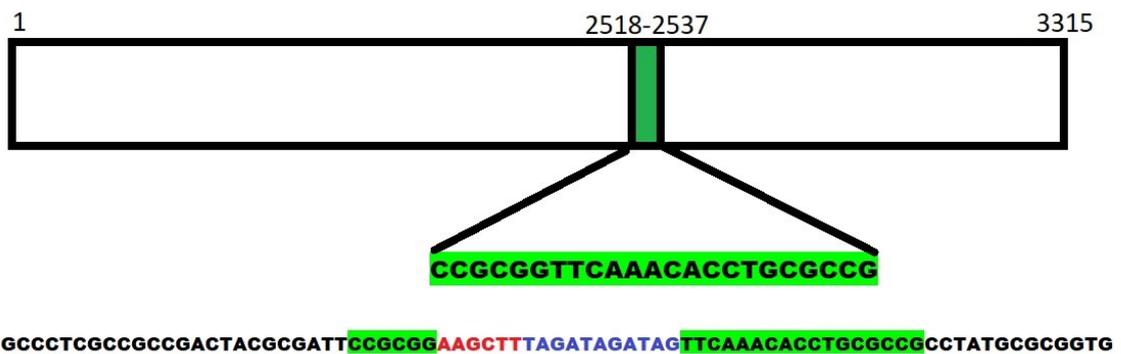


Figura 21: Representação da estratégia de *knockout* do TM para *L. amazonensis*. O gene do transportador de miltefosina de *L. amazonensis* PH8 (3315pb) foi submetido a análise por ferramenta de desenho de SgRNAs EuPaGDT. As sequências de maior *score*, definidas pelo software, foram selecionadas (verde) e avaliadas quanto a sua validade para essa espécie. A sequência doadora, responsável por direcionar o reparo da dupla fita por reparo homólogo direcionado, foi projetada para conter sequência relativa a sítio de restrição para endonuclease HindIII (vermelho), para ser utilizada posteriormente para confirmação do *knockout* e três *stop codons in tandem*, cobrindo os 3 *frames* de leitura (azul). Essa sequência possui ainda braços de homologia de 30 pb, de modo a direcionar o mecanismo de reparo celular.

Síntese dos SgRNAs para geração de mutantes do TM por parasitos expressando SpCas9

As sequências selecionadas para agirem como guias foram adicionadas de sequências complementares, relativas à posterior etapa de transcrição *in vitro* (sítio para ligação da T7 RNA polimerase, promotor da T7, etc) e sintetizadas na forma de oligonucleotídeos. Esses foram utilizados como *primers forward* em uma PCR, tendo como DNA molde o plasmídeo pAC-sgRNA-Cas9, que contém o *scaffold* da sequência da proteína SpCas9, como descrito por Burle-Caldas, 2018. As sequências dos primers utilizados encontram-se descritas no **Anexo A** e as condições de PCR na

tabela 3. A **figura 22** demonstra os produtos obtidos com a PCR, em tamanho esperado (87 pb) e a manutenção da integridade dos mesmos após processo de purificação.

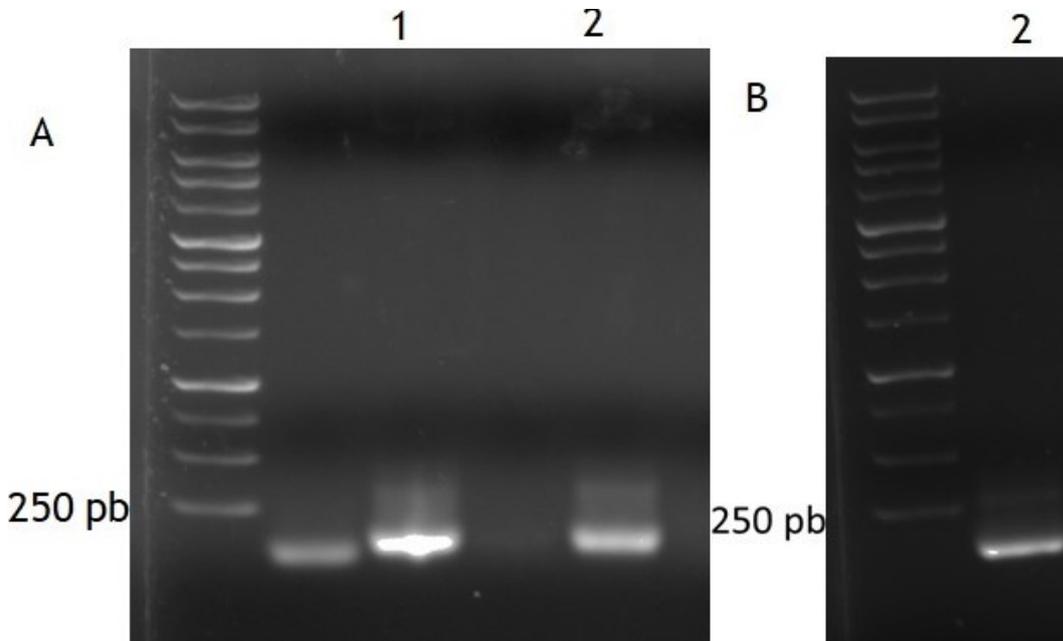


Figura 22: Síntese dos *templates* para produção dos SgRNAs a partir de PCR. Primers contendo sequência específica para o SgRNA e porção complementar a plasmídeo pAC-sgRNA-Cas9 foram submetidos a PCR para geração de fragmento de DNA *template* para transcrição *in vitro*. A) Produtos de PCR em tamanhos esperados (87pb) foram obtidos para ambos os guias para o transportador de miltefosina (1 e 2). A amostra representada pelo guia presente na canaleta 1 não foi submetida a purificação devido a presença de amplificação na reação de controle negativo relativa à sua PCR. B) Os produtos de PCR foram submetidos a purificação e seus produtos seriam submetidos a transcrição *in vitro*.

Os produtos gerados pelas reações de PCR foram posteriormente submetidos a transcrição *in vitro* para geração dos SgRNAs a serem utilizados para promoção de *knockout*. Os produtos da transcrição foram analisados em gel de agarose 2% em condições desnaturantes. Com a observação de apenas uma banda, referente ao SgRNA transcrito e íntegro e conseqüente êxito no processo de transcrição, o SgRNA foi considerado pronto para ser transfectado junto às cepas com expressão de SpCas9 de modo a induzir o *knockout* específico do TM.

Geração de mutantes do transportador de miltefosina em parasitos expressando SpCas9 transientemente

Primeiramente, de modo a selecionar parasitos editados após transfecção com SgRNA, seria necessário tratamento da população com quantidade suficiente de miltefosina para promoção de morte de parasitos sensíveis a essa substância. Dessa forma, foi determinada a sensibilidade de parasitos *L. amazonensis* PH8 a esse fármaco por meio de ensaio de viabilidade celular por MTT. A **figura 23** demonstra o comportamento dessa população frente a quantidades decrescentes de miltefosina. O comportamento demonstrado pela cepa seguiu o padrão esperado e a IC50 foi determinada em 10,63 $\mu\text{Mol/mL}$.

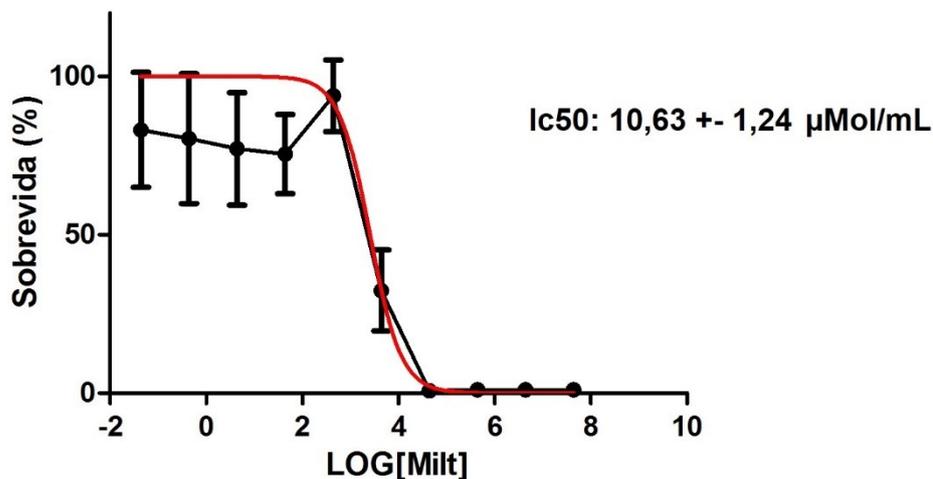


Figura 23: Determinação da IC50 de miltefosina para *L. amazonensis* PH8 por ensaio de MTT. Formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8 foram expostas a diferentes concentrações de miltefosina e a viabilidade celular foi determinada após 72 horas. Determinação da concentração inibitória de 50% da população foi calculada utilizando o software GraphPad prism 5.

Formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, expressando transientemente SpCas9, por meio de plasmídeo episomal pLDCN foram submetidas a procedimento de transfecção com SgRNAs para induzir o *Knockout* do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina. Adicionalmente, no mesmo procedimento foram fornecidas às células um *template* de DNA para direcionar o reparo na dupla fita por meio de homologia e assim promover a inserção de três códons de parada assim como um sítio de restrição enzimático. Os parasitos foram permitidos se recuperar ao procedimento por 48 horas e foram prontamente selecionados na presença de 4 vezes a concentração inibitória 50 de miltefosina (42,52 $\mu\text{Mol/mL}$).

Selecionada a população resistente, os mesmos foram submetidos a extração de DNA genômico e esse foi utilizado como *template* em uma PCR, utilizando iniciadores para amplificação de fragmento de 3200 pb contido na região codificadora do gene do transportador de miltefosina. Esse fragmento foi então submetido a digestão enzimática com a endonuclease HindIII, e os produtos gerados foram analisados em gel de agarose. A **figura 24** demonstra o resultado obtido com a digestão. É possível observar que os parasitos transfectados com o SgRNA específico para induzir o *knockout* do gene do TM, tiveram o reparo da fita dupla de DNA guiado pelo fragmento doador co-transfectado. Isso pode ser observado devido ao aparecimento de 2 fragmentos (2947 e 745 pb) oriundos da digestão com a endonuclease HindIII, sendo o sítio para essa reação, inserido no momento do reparo. Parasitos expressando Cas9 transientemente não transfectados com SgRNA foram submetidos ao mesmo processo de modo a serem utilizados como controles. É possível observar que a digestão do fragmento amplificado a partir do DNA desse grupo de parasitas gera apenas um fragmento, indicando não haver sítio para essa endonuclease nesse fragmento de forma natural.

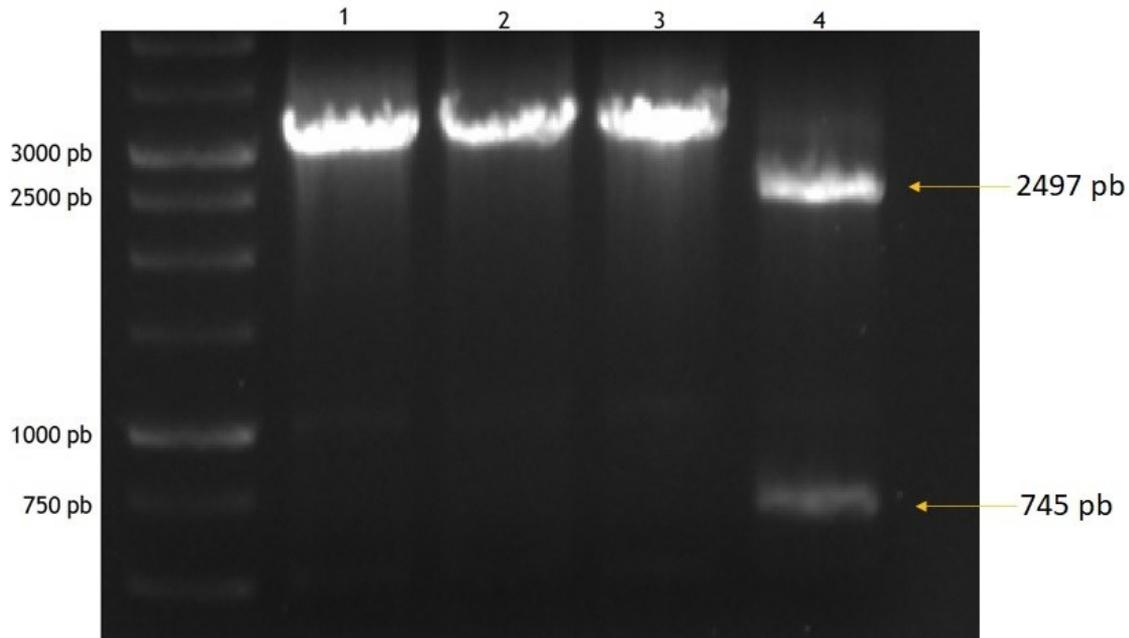


Figura 24: Confirmação da geração de mutantes do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina por PCR, em parasitos com expressão transiente de SpCas9. Amplificação por PCR do gene do transportador de miltefosina (3,2 Kpb), a partir de DNA genômico foi feita e o produto foi submetido a digestão enzimática com HindIII. Amostra Não digerida (1) e digerida (2) de parasitos PH8 expressando SpCas9 transfectados com tampão de transfecção (Mock) foram utilizados como controle. Amostra de parasitos transfectados com o SgRNA, selecionados na presença de miltefosina, não digerida (3) e digerida (4) demonstram a inserção precisa de um sitio de restrição para HindIII, previamente ausente, dada a geração de dois fragmentos (2497 e 745 pb) em posição esperada.

Indução e purificação de SaCas9 recombinante

Alternativamente ao uso dos plasmídeos para expressão de Cas9, avaliamos a proteína Cas9 recombinante para a indução de *knockouts* no gene do transportador de miltefosina. Para tal, procedeu-se à indução de produção da proteína recombinante para posterior transfecção da mesma e confirmação da validade dessa estratégia.

Bactérias *E.coli* Rosetta-gami2 foram transformadas com plasmídeo p6xHisSaCas e posteriormente tiveram a produção de proteína Cas9 de *Staphylococcus aureus* recombinante induzida por IPTG. Após a lise mecânica, o extrato proteico foi submetido a purificação, utilizando uma coluna preenchida com sulfato de níquel, já que a estrutura da proteína recombinante foi adicionada uma cauda de poli-histidina, que possui afinidade pela coluna de níquel. A mesma foi submetida posteriormente a eluição com quantidades crescentes de tampão contendo

imidazol, substância que compete com a histidina pelos sítios de ligação ao níquel, promovendo assim eluição de frações, previamente acopladas à coluna cromatográfica, ricas na proteína recombinante produzida. De modo a confirmar o conteúdo das frações eluídas, as mesmas foram submetidas a eletroforese em gel de poliácridamida 10% e depois coradas com solução de Comassie Blue. As frações identificadas tanto pelo software acoplado ao sistema cromatográfico quanto pela análise do gel, como ricas em proteína recombinante desejada foram juntadas e submetidas a centrifugação em tubo falcon acoplado com filtro de 50 Kda, de modo a purificar a amostra. Ambos os resultados desses ensaios se encontram demonstrados na **figura 25**. As amostras foram posteriormente submetidas a doseamento por ensaio com reagente de Bradford, e alocadas a -80°C para posterior uso.

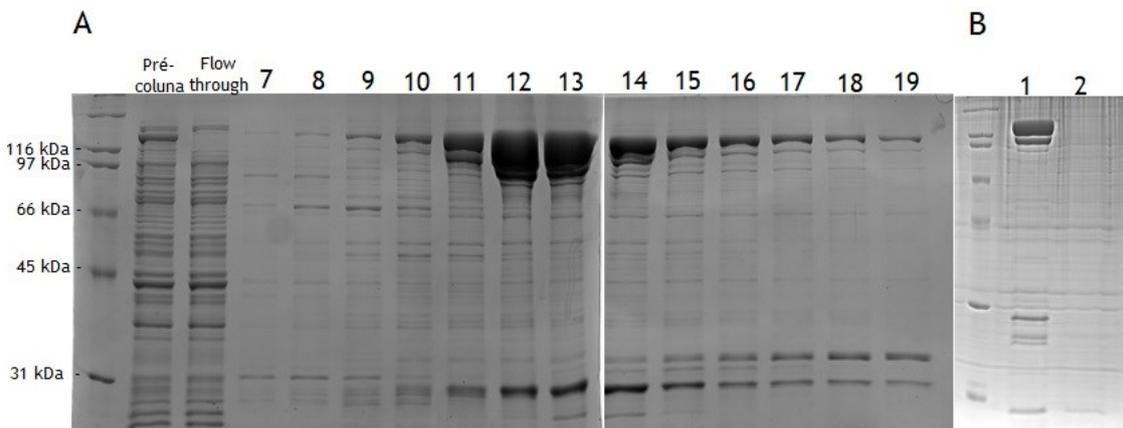


Figura 25: Indução e purificação de SaCas9 recombinante. *E. Coli* Rosetta-Gami2 foram transformadas com DNA plasmidial contendo a sequência do gene de SaCas9. Indução foi realizada com IPTG por 24 horas/ 18°C . Células foram submetidas a lise mecânica. O extrato foi submetido a centrifugação em alta velocidade (40.000 xg), e a proteína purificada em coluna de níquel. A) Gel de poliácridamida para avaliação dos produtos da extração. Amostras pré-coluna (1), flow-through (2) (pós-coluna) e frações colhidas após eluição pelo sistema AKTA-prime foram analisadas em gel de poliácridamida 10%. B) Frações ricas em SaCas9 (11,12,13 e 14) foram coletadas. A porção da amostra que não passou pelo filtro (1) foi armazenada e a porção da amostra que passou pelo filtro (2) foi descartada.

Teste de atividade endonuclease de SaCas9 recombinante *in vitro*

Afim de testar a atividade da proteína SaCas9 recombinante produzida, uma alíquota da mesma foi submetida a teste de atividade *in vitro* para confirmar a capacidade da mesma de promover um corte em dupla fita de DNA quando guiada por uma sequência de RNA guia. Para tal, a proteína recombinante foi incubada com SgRNA desenhado para reconhecer e guiar o corte em região codificadora do gene GP72 de *T. cruzi*. O complexo ribonucleoproteico formado foi então incubado com um

fragmento amplificado de PCR de região flanqueadora ao sítio de quebra planejado. O produto resultante dessa reação de digestão foi submetido a eletroforese em gel de agarose 1%. A **figura 26** demonstra a habilidade da proteína recém purificada em promover a quebra do fragmento em questão (1.7 Kpb) nos tamanhos previstos (1.1 e 0,6 Kpb), o que valida a sua utilização para indução de edições nas culturas celulares a serem testadas.

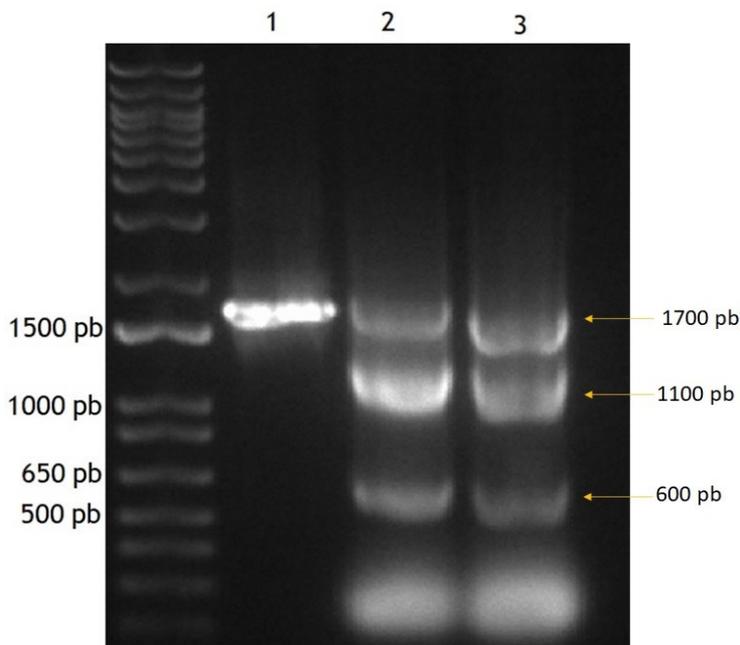


Figura 26: Ensaio de atividade *in vitro* para proteína SaCas9. Um amplificado de PCR de 1,7Kpb do gene GP72 de *Trypanosoma cruzi* (1) foi utilizado para aferir a atividade nuclease da SaCas9 recombinante. A proteína foi incubada por 30 minutos a 37°C com um SgRNA específico para induzir um corte na dupla fita do produto de PCR, gerando um fragmento de 1,1Kpb e um de 0,6Kpb (3). Uma SaCas9 com atividade conhecida foi utilizada como controle (2). As bandas de baixo peso molecular observadas nas canaletas onde houve encubação com o complexo ribonucleoproteico correspondem aos RNAs utilizados como guia para indução de corte pela proteína.

Geração de mutantes do transportador de miltefosina utilizando proteína SaCas9 recombinante e SgRNA desenhado para *L. infantum* em *L. amazonensis*

Com a confirmação da atividade da SaCas9 recombinante produzida, a mesma se mostrou apta para utilização em ensaios de transfecção para indução de edições

em *L. amazonensis*. Dessa forma, procedemos a geração de mutantes do TM em cepa PH8 desse parasito.

O SgRNA utilizado nesse experimento havia sido desenhado, sintetizado, purificado e transcrito como descrito previamente. O mesmo havia sido desenhado para ser utilizado na indução de *knockout* no mesmo gene para parasitos da espécie *L. infantum*. De modo a avaliar a viabilidade de utilização do mesmo para *L. amazonensis*, a sequência do RNA guia foi alinhada com o gene de *L. amazonensis*, de modo a observar a homologia entre os mesmos assim como a preservação do motivo PAM (NNGRRT para Cas9 de *Staphylococcus aureus*). A análise, representada esquematicamente pela **Figura 27**, demonstrou a presença de um único par de base diferente entre a sequência do RNA guia e a região complementar no gene de interesse, de modo que o “*mismatch*” encontrava-se 3 pares de base após o sítio de corte promovido pela nuclease. Além disso, outro “*mismatch*” foi observado por um dos braços de homologia da sequência doadora, no primeiro par de base da extremidade 5’.

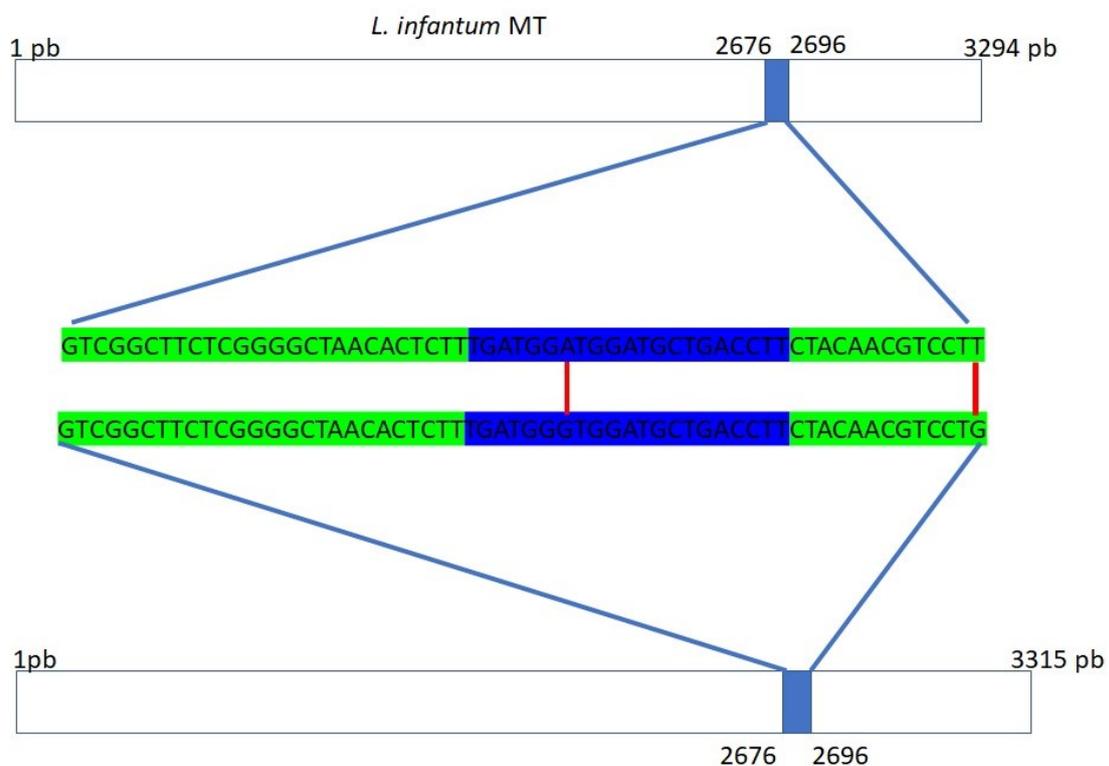


Figura 27: Análise de viabilidade de utilização do SgRNA desenhado para promover *knockout* em *L. infantum* em *L. amazonensis*. A sequência do SgRNA previamente desenhado e utilizado com sucesso para *L. infantum* foi analisada contra o gene ortólogo em *L. amazonensis*. A análise permitiu observar

que o SgRNA em questão (azul), encontra-se em região conservada entre as espécies, sendo observado apenas um par de base diferente (vermelho). A análise ainda dos pares de bases referentes a sequência doadora (verde) revelou mais um 'mismatch' na porção final da sequência.

Dessa forma, tanto o RNA guia quanto a sequência doadora foram considerados, de maneira arbitrária, homólogos o suficiente da sequência de *L. amazonensis* para que fosse tentada a indução de edição genética utilizando o mesmo. A **figura 28** demonstra de forma esquemática a estratégia utilizada.

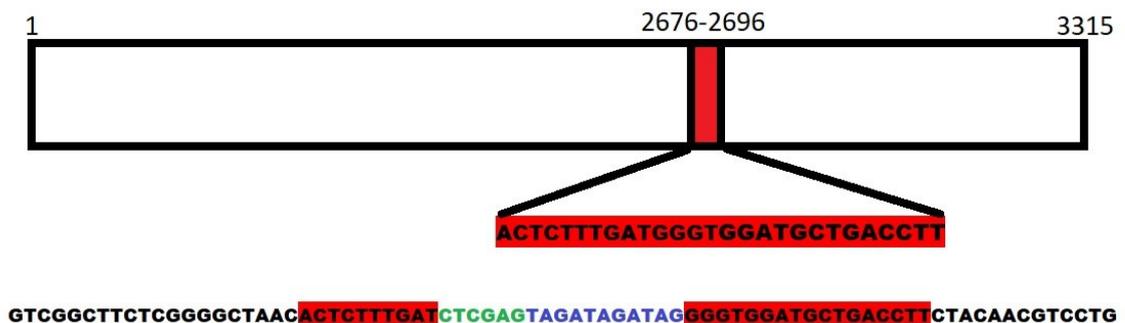


Figura 28: Utilização de SgRNA desenhado para *L. infantum* para induzir alteração genética em *L. amazonensis*. Sequência guia (vermelho) para indução de quebra da dupla fita em região central da região codificadora do gene alvo. Adicionalmente, sequência doadora composta por braços de 30 pb de homologia com a região onde foi induzido o corte, três *stop códons in tandem* (azul) e sítio de restrição para XhoI(verde).

Procedeu-se então à transfecção de formas promastigotas, *wild type*, desse parasito com o complexo ribonucleoproteico, contendo SgRNA desenhado para promover corte na região codificadora do gene do TM. Adicionalmente, sequências doadoras contendo três códons de terminação *in tandem*, um sítio de restrição para a endonuclease XhoI e braços de homologia correspondentes à região de corte foram transfectados a essas células. Após 48 h do procedimento de transfecção, procedeu-se à seleção de população resistente utilizando concentração previamente definida de miltefosina. Observado crescimento celular no grupo transfectado, os parasitos foram submetidos à extração de DNA genômico. Esse DNA genômico foi utilizado como *template* em uma PCR para amplificação de fragmento de 3,2 Kb, correspondente à região codificadora do gene do transportador de miltefosina. Com o intuito de confirmar a edição genética, o fragmento obtido na PCR foi submetido a digestão com endonuclease de restrição XhoI. A **figura 29** demonstra o resultado obtido com a

digestão, avaliado em gel de agarose. Por possuir naturalmente um sítio de digestão para XhoI no gene do TM, *L. amazonensis wild type*, ao ser submetida a digestão com essa endonuclease, culmina com a geração de dois fragmentos de digestão (diferentemente de *L. infantum*, que não possui sítio de digestão para essa enzima nesse gene). Parasitos com edição promovida como previsto, apresentam um sítio de restrição adicional pela sequência doadora, culminando com a formação de três fragmentos.

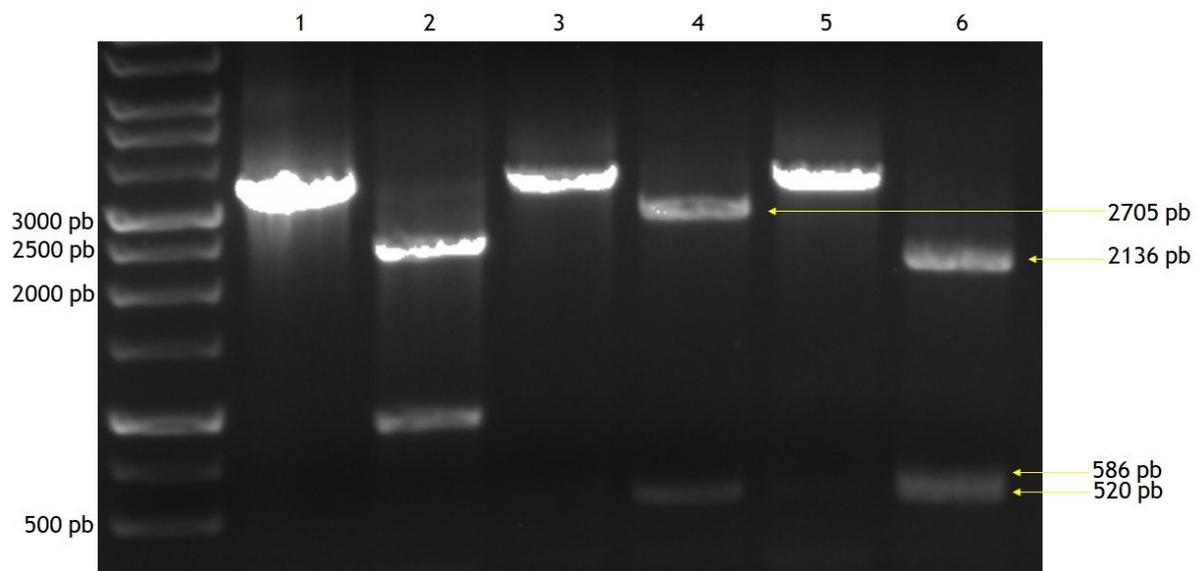


Figura 29: Confirmação da geração de mutantes do gene codificador da proteína transportadora de miltefosina gerado por proteína SaCas9 recombinante e SgRNA específico para o gene do transportador de miltefosina por PCR. DNA genômico de formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8 foi extraído e submetido a amplificação por PCR do gene do transportador de miltefosina (3,2 Kpb), seguido de digestão enzimática com XhoI. Amostra não digerida (1) e digerida (2) de uma sequência de DNA conhecida, contendo um sítio de digestão para XhoI foi utilizado como controle da digestão. Amostra não digerida (3) e digerida (4) de parasitos Mock demonstram a existência de um sítio para XhoI, a partir da formação de dois fragmentos (2705 e 520 pb) com a digestão. Amostra não digerida (5) e digerida (6) de parasitos mutantes possuem um sítio de digestão extra inserido pela sequência doadora, portanto, sua digestão gera três fragmentos (2136, 586, 520 pb).

Determinação de IC50 para miltefosina em parasitos *knockout* no TM induzido por SaCas9 recombinante

Afim de iniciar a avaliação das alterações fenotípicas geradas pela mutação no gene codificador do TM, formas promastigotas de *L. amazonensis* geneticamente editadas com o uso de SaCas9 foram submetidas a novo ensaio de viabilidade celular para observar o comportamento dessa cepa frente a diferentes concentrações de

miltefosina, assim como para estipular a nova IC50 dessa droga para a cepa mutante. A **figura 30** demonstra o comportamento exibido por esses parasitos no ensaio de viabilidade por MTT. Pode-se observar com esse resultado notória alteração no perfil de susceptibilidade dessa droga, como esperado, o que corrobora os dados já apresentados na literatura que referem o gene codificador do transportador de miltefosina como um importante mecanismo de aquisição de resistência a essa droga.

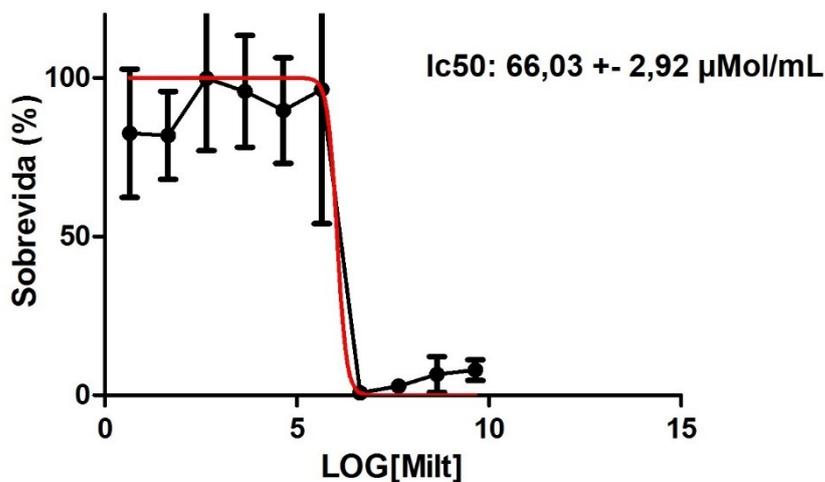


Figura 30: Determinação da IC50 de miltefosina para *L. amazonensis* PH8 KO, induzido por SaCas9 com SgRNA específico para o transportador de miltefosina, por ensaio de MTT. Formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8 KO foram expostas a diferentes concentrações de miltefosina e a viabilidade foi determinada após 72 horas. Determinação da concentração inibitória de 50% da população foi calculada utilizando o software GraphPad prism 5.

Avaliação da infecção de macrófagos derivados de medula óssea por parasitos mutantes para o TM

Com o intuito de avaliar se as alterações no transportador de miltefosina implicam em alterações de infectividade de parasitos transfectados, procedemos à infecção de macrófagos derivados de medula óssea com parasitos mutantes para o gene codificador da proteína transportadora de miltefosina pela utilização de SaCas9.

Como pode ser observado na **figura 31**, não houve diferença significativa no número de macrófagos infectados por parasitos de ambas as cepas e nem no número de parasitos por macrófago infectado. Esse resultado mostra-se diferente do resultado obtido por Deep e colaboradores (2017) com isolados clínicos resistentes a miltefosina

de *L. donovani*. Isso pode ser explicado pelas diferenças intraespecíficas entre as cepas e espécies utilizadas nos trabalhos, assim como ao fato de no presente trabalho serem utilizadas cepas com uma única alteração genômica estabelecida, enquanto que no trabalho de Deep, as cepas, por se tratarem de isolados clínicos podem apresentar mais do que uma alteração, sendo esse conjunto responsável pelo perfil mais infectivo observado.

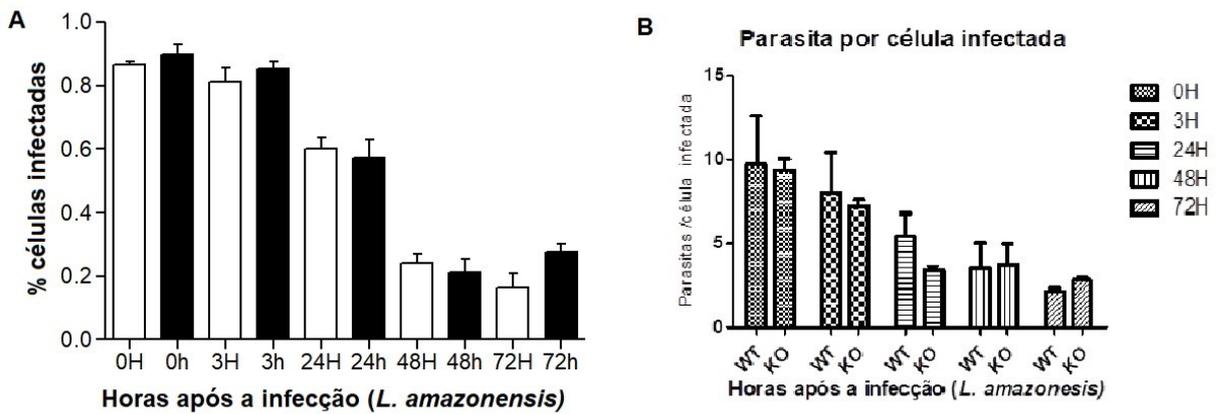


Figura 31: Avaliação do potencial infectivo de *L. amazonensis* mutante para o TM. Formas promastigotas de *L. amazonensis* PH8 foram submetidas a protocolo para infecção de macrófagos a fim de avaliar a possível diferença no perfil infectivo como consequência da edição no gene do TM. A infecção foi avaliada quanto ao número de macrófagos infectados (A) e o número de leishmanias por macrófago infectado (B). Nenhum dos parâmetros demonstrou diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

DISCUSSÃO

Melhorias processuais envolvendo otimização de protocolos, desenvolvimento de novas estratégias, melhorias dos softwares para previsão de RNAs guia e mesmo formulações e kits comerciais para uso de Cas9 vêm sendo pesquisadas e introduzidas para maior eficiência e adequação do sistema de CRISPR/Cas9, tipo II, para edição gênica desde sua adaptação pelos trabalhos pioneiros de Jinek, *et al* (2012), Cong, *et al* (2013), e Mali, *et al* (2013).

O presente trabalho demonstrou a possibilidade de utilização de diferentes protocolos do sistema CRISPR/Cas9 do tipo II para a indução de mutações no gene codificador da proteína transportadora de miltefosina para *Leishmania amazonensis*. Dado que não há ainda na literatura relatos de *knockouts* induzidos com essa ferramenta para essa espécie, e ainda que as espécies de *Leishmania* apresentam significativa variabilidade em seu genoma (SAMARASINGHE, *et al*, 2018; LYPACZEWSKI, *et al*, 2018) esse trabalho mostra-se importante como forma de estabelecer protocolos funcionais, possibilitando a realização de outras edições em outros alvos gênicos futuramente, assim como a avaliação do impacto da edição deste gene nessa espécie. Espécies de *Leishmania* variam consideravelmente em sua sensibilidade à diferentes fármacos e o entendimento dos mecanismos de resistência envolvidos tem impactos para a abordagem terapêutica e descoberta de novos fármacos, entre outros aspectos (CROFT *et al*, 2006).

Para otimização do uso da ferramenta CRISPR/Cas9 para edição gênica de forma precisa e específica de um dado alvo, é fundamental que seja avaliada e minimizada a ocorrência dos chamados *off targets*. Para que seja feita a comparação das sequências dos RNAs guias e *donors* com outras potenciais regiões de homologia no genoma e estabelecimento dos *scores* para seleção dos mesmos, é ideal que o genoma do organismo em questão esteja disponível e completo. Esse requisito

encontra-se disponível para as espécies *L. braziliensis*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. donovani* e *L. major* entre outras (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/>). Embora tentativas de sequenciamento e publicações relacionadas estejam disponíveis para *L. amazonensis* (REAL *et al*, 2013), este não está completo e apresenta deficiências de anotações. É possível antecipar que, com as perspectivas associadas ao uso com maior frequência e refinamento da técnica de CRISPR/Cas9, cada vez mais dados referentes a sequenciamentos de outras espécies serão necessários e possivelmente também estarão disponíveis. Desta forma, por se tratar de uma espécie de grande relevância, o grupo de pesquisadores do INCTV investiu em sequenciar o genoma da cepa PH8 de *L. amazonensis*, por Illumina e PACBIO. As sequências e informações adquiridas ainda estão em processamento de bioinformática.

Não obstante a escassez de dados confiáveis para o genoma de *L. amazonensis*, esse aspecto não impediu que avanços fossem alcançados em relação à avaliação de diferentes protocolos, plasmídeos e outras informações que já haviam sido descritos para outras espécies de *Leishmania* (pLDCN – ZHANG e MATLASHEWSKI 2015 e pRM006-BENEKE *et al*, 2017) ou *T. cruzi* (SaCas9 - BURLE-CALDAS *et al*, 2018), ao longo desse trabalho. A utilização das ferramentas e dados preliminares disponíveis, associadas a comparações com organismos geneticamente próximos a *L. amazonensis*, como *L. mexicana* (REAL *et al*, 2013), permitiram a evolução das análises, desenho dos RNAs guia e confirmação com sucesso de alteração no alvo.

Ressalta-se que não foram observadas alterações de ordem morfológica ou nas taxas de multiplicação e curvas de crescimento nos organismos alvo. Entretanto, é possível que todos os efeitos *off-target* não tenham sido previstos, não sendo possível afirmar que outras alterações não tenham sido geradas nos parasitos em questão. Acreditamos que ainda assim, esse trabalho demonstra a possibilidade de utilização do sistema de edição genética em organismos em situação similar a *L. amazonensis*, de modo que os resultados obtidos podem mostrar-se satisfatórios, mesmo que a nível preliminar, respeitando as limitações associadas. Certamente, na medida em que o genoma completo de *L. amazonensis* estiver disponível, esses resultados poderão ampliar a análise funcional e potenciais aplicações da mesma.

Foram utilizados nesse trabalho, dois plasmídeos para a expressão de Cas9 de *S. pyogenes*, assim como a utilização de Cas9 recombinante de *S. aureus*. Vale ressaltar que a atividade nuclease de ambas as proteínas é comparável, como descrito por Burle-Caldas *et al*, 2018, e, portanto, as mesmas diferem apenas pelo motivo PAM identificado, o que somente altera a sequência dos RNAs guias.

A SaCas9 recombinante foi testada *in vitro*, qualitativamente, quanto a sua atividade como nuclease e mostrou-se efetiva em gerar quebra específica na dupla fita de DNA, promovendo a formação de fragmentos de tamanho esperado, apesar de o DNA utilizado para esse ensaio não ter se apresentado totalmente digerido ao fim da reação. Isso possivelmente se deu por uso de excesso de material genético para o ensaio ou menor tempo de incubação do que o necessário para catalisar a reação, para tal quantidade de reagentes, uma vez que não houve determinação quantitativa prévia das proporções de enzima e DNA genômico. Ainda assim, a proteína foi considerada apta para uso.

A validação da utilização de cada uma das estratégias e sua disponibilidade para um dado organismo demonstra-se importante, dadas as diferentes particularidades associadas às mesmas. Teoricamente, sendo a eficiência de edição comparável entre as proteínas utilizadas, o uso da proteína recombinante pode ser uma melhor opção para indução de *knockouts* gênicos, dependendo do objetivo e circunstâncias do ensaio. Isso se deve à curta meia vida associada à utilização da mesma, o que estaria correlacionado com a minimização da possibilidade de efeitos *off-target*. Além disso, não seria utilizado um marcador de resistência a antibióticos nessa estratégia, o que seria importante por minimizar alterações no organismo estudado, mantendo o seu *background* o mais próximo possível do encontrado na natureza. Desse modo, essa metodologia é mais indicada para se ter controle fino sobre as alterações induzidas.

Embora já existam produtos disponíveis no mercado, optou-se neste estudo, por produção da SaCas9 a partir de um gene sintético. A produção e purificação, em pequena escala da proteína se mostrou relativamente simples e com bom rendimento (aproximadamente 8mg/mL), uma vez que a proteína é solúvel e foi purificada com níveis elevados de pureza.

Vale ressaltar que a utilização da proteína recombinante, implica na formação prévia, *in vitro*, do complexo ribonucleoproteico, ou seja, é necessária a produção *in vitro* dos RNAs guias. No entanto, esse processo permite que células *wild type* sejam submetidas a um único procedimento de transfecção para geração de células mutantes.

A expressão *in vivo* de Cas9 mostra-se como uma alternativa ao uso da proteína recombinante, nos casos de construções já disponíveis e dependendo do objetivo. Além disso, é possível fazer uso de outras estratégias para fornecimento de SgRNAs para os grupos celulares alvo, sem depender exclusivamente da produção *in vitro* dos RNAs. Exemplos seriam o uso de um vetor para expressão *in vivo* dos SgRNAs, como descrito por Zhang e Matlashewski (2015), o uso de um vetor para expressão concomitante de Cas9 e dos SgRNAs, como descrito por Zhang *et al* (2017), ou o uso de um vetor para expressão de T7 RNA polimerase, com transfecção posterior de oligonucleotídeos precursores do SgRNA e consequente síntese *in vivo* dos mesmos. A permanente, ou longa expressão de Cas9, entretanto, pode ser fator determinante ao induzir alterações indesejadas nesse grupo celular, sendo a principal limitação de seu uso (ZHANG *et al*, 2019).

Expressão de Cas9 por longos períodos, assim como a utilização de SgRNAs de baixo *score* pode culminar com alterações genéticas em *locus* diferentes do desejado, com implicações significativas. Para estudos de função gênica, é ideal garantir que as alterações induzidas sejam decorrentes apenas do alvo de estudo, promovendo, assim, dados mais concretos sobre a funcionalidade do gene estudado nas condições avaliadas. Para a produção de cepas vacinais, o mesmo princípio é válido. Pretende-se que o organismo atenuado seja o mais próximo possível dos organismos encontrados na natureza, diferindo-se apenas pela mutação pontual pretendida. Não é recomendado, nesses casos, portanto, a utilização de plasmídeos para expressão de Cas9 com o intuito de produção dessas cepas. Além da produção constante da nuclease, que demandaria diversas passagens *in vitro* para perda do plasmídeo, a inserção de gene de resistência a antibiótico também pode ser fator responsável por alterações fenotípicas indesejáveis para a mesma. Enfatiza-se, portanto, que a estratégia a ser utilizada para indução de alterações gênicas varia para cada estudo, sendo determinantes as avaliações de diversos fatores como: Disponibilidade de ferramentas para o organismo em questão, disponibilidade de

ferramentas para produção de RNAs guia, finalidade da edição e características específicas do organismo trabalhado.

Leishmania sp. são células consideradas de difícil transfecção (KELLER *et al*, 2018). Portanto, a estratégia adotada para o fornecimento dos materiais genéticos às células utilizadas nesse trabalho foi a eletroporação, que apesar de ter se mostrado funcional, culmina com grande morte celular, reduzindo, portanto, a eficiência. Seria de grande utilidade para a continuação de trabalhos com esses grupos celulares, assim como para outras células de difícil transfecção, a otimização de protocolos diferentes para fornecimento desses materiais às células alvo. Keller e colaboradores (2014), demonstraram a possibilidade de promover a transdução de proteínas em *Leishmania tarentolae*, com a utilização de peptídeos penetradores de células (Cell-Penetratin Peptides- CPP). Os mesmos autores, em 2018, reportaram dificuldades para uso da mesma metodologia com intuito de transfectar material plasmidial na mesma espécie. Apesar de se tratar de uma espécie diferente, pertencente a outro subgênero, esse trabalho incita a busca por formas mais efetivas de realização desse transporte, de modo a facilitar e melhorar a eficiência e a simplificação dos procedimentos envolvidos.

A expressão de proteína SpCas9 por grupos celulares previamente transfectados com os vetores pLDCN e pRM006 foi constatada por metodologia de *western blot*. O resultado obtido para as células receptoras do plasmídeo pLDCN demonstrou a presença de diversas bandas reativas ao anticorpo específico anti-Cas9. Esse resultado, também observado para parasitos *L. infantum* no trabalho de Souto, 2019, pode possivelmente resultar de uma super-expressão da proteína e/ou degradação da mesma. Isso se daria, devido à grande quantidade de cópias do plasmídeo episossomal por célula, o que pode implicar em maior estabilidade da expressão de Cas9 por essas células.

Ao contrário, o resultado obtido para a expressão de Cas9 pelo grupo receptor do plasmídeo pRM006 apresentou-se como uma banda única. Por se tratar de um plasmídeo integrativo, desenhado para promover a recombinação homóloga com a região codificadora do gene de beta-tubulina, os grupos celulares que receberam esse plasmídeo podem possuir número de cópias limitado em cada célula, e, conseqüentemente, menor expressão dessa proteína. Vale ainda ressaltar que o

número de cópias do gene de beta-tubulina é variável entre as diferentes espécies de *Leishmania* (JACKSON *et al*, 2006), e, dessa forma, o potencial para recombinação homóloga e consequente expressão do gene de interesse pode variar entre as mesmas. Para aprimoramento dessa estratégia, seria interessante, assim que as sequências UTR, flanqueadoras do *locus* de beta-tubulina estejam disponíveis, a partir do genoma completo de *L. amazonensis*, modificar a sequência presente no plasmídeo pRM006, para promover a integração mais específica nesse *locus*.

A cepa transfectada com plasmídeo pRM006 no presente trabalho perdeu rapidamente (3-5 passagens *in vitro*) a habilidade de expressar Cas9 e a sobrevivência sob pressão com higromicina B. Transfecção com o mesmo SgRNA utilizado com sucesso para a cepa com plasmídeo pLDCN foi realizada, porém, sem obtenção de parasitos *knockout* (resultados não demonstrados). A cepa com plasmídeo episossomal, submetida aos mesmos tratamentos, e passada 20-25 vezes *in vitro* na ausência de pressão de antibiótico, manteve a expressão de Cas9, possibilitando o prosseguimento dos experimentos. Como não há certeza com relação ao número de cópias e sequência das regiões UTR relativas à beta-tubulina em *L. amazonensis*, pode-se supor que a perda do plasmídeo pelos parasitos em questão possa ter ocorrido por não ter havido integração do fragmento no *locus* esperado, manutenção do plasmídeo na forma episossomal em baixo número de cópias ou evento de recombinação após integração. Os resultados positivos na análise por *western blot* podem ter sido decorrentes de uma pequena fração de plasmídeos não linearizados que possa ter sido transfectado concomitantemente aos fragmentos lineares, já que não houve purificação do fragmento linearizado, após digestão com *PacI*. Um aspecto importante para maior conhecimento da aplicabilidade dos diferentes protocolos de edição gênica, relaciona-se à estabilidade da expressão de Cas9, se transitória, persistente, ou em quanto tempo ela pode ser perdida na ausência de pressão seletiva. A partir das diferenças observadas, almejamos, posteriormente, dar continuidade aos estudos, de modo a prover melhor entendimento do fenômeno observado. Esse, caso confirmado, pode se mostrar importante por promover uma estratégia para expressão transitória de Cas9 em *L. amazonensis*.

O alvo selecionado como prova de conceito para edição gênica em *L. amazonensis* foi o gene codificador da proteína transportadora de miltefosina, uma ATPase transmembrana do tipo E1/E2. Essa proteína, capaz de promover o influxo de

fosfolípidos para o meio intracelular é responsável também por promover a entrada do fármaco miltefosina para o interior dos parasitos. Alterações na sequência desse gene são tidos como o principal mecanismo pelo qual diferentes espécies de *Leishmania* se tornam resistentes ao tratamento com essa substância (DEEP *et al*, 2017; PÉREZ-VICTORIA *et al*, 2006). Assim, ao promover uma alteração direcionada na sequência codificadora desse gene e induzindo um reparo controlado, é possível tornar cepas sensíveis, resistentes à miltefosina (ZHANG e MATLASHEWSKI, 2015).

Dessa forma, o gene do TM foi escolhido como alvo tanto por promover um fenótipo de fácil confirmação de mutação, sem depender da inserção de genes marcadores, aditivos fluorescentes ou outras estratégias comumente utilizadas, quanto por ter sido o alvo do trabalho de Zhang e Matlashewski (2015), se mostrando uma prova de conceito ideal para validação do sistema, para um organismo sem relatos prévios de *knockouts* induzidos por essa metodologia.

Os parasitos que apresentavam expressão transiente de SpCas9 a partir do plasmídeo pLDCN foram então submetidos a transfecção com SgRNAs, desenhados para *L. amazonensis*, previamente transcritos *in vitro* e, posteriormente, selecionados na presença de miltefosina para obtenção de população mutante para esse gene. Optamos pela estratégia de transfecção com SgRNA e *donor*, devido à experiência prévia do grupo indicando maior rapidez na seleção dos parasitos após transfecção e pela facilidade de avaliar em nível molecular, pela digestão enzimática, a presença da sequência editada. As análises moleculares realizadas demonstraram que a população exposta ao SgRNA em questão e sequência doadora, para promover reparo homólogo do dano na dupla fita de DNA, apresentou edição do gene TM, contendo sítio de restrição para HindIII no produto amplificado de seu genoma. Os fragmentos gerados, com tamanhos esperados, demonstram sucesso na inserção de sequência de restrição no gene em questão e em posição pré-definida, promovendo a edição gênica como esperado.

Para transfecção com SaCas9 recombinante, foi utilizado um SgRNA já disponível no laboratório, previamente transcrito *in vitro*, tendo como alvo o transportador de miltefosina de *L. infantum*. Considerando as possíveis diferenças de sequência entre os ortólogos de *L. amazonensis* e *L. infantum*, foi conduzida análise bioinformática para confirmar a viabilidade de uso do RNA guia em questão,

demonstrando que o mesmo possuía homologia à mesma região em *L. amazonensis*, diferindo em apenas um par de bases. Após amplificação do fragmento correspondente à região codificadora do gene do transportador de miltefosina, e digestão enzimática com endonuclease XhoI, observou-se a adição de um sítio de restrição no TM, o qual é inexistente nas células controle. Dessa forma, foi confirmada a edição gênica precisa no *locus* desejado, gerando a inserção de parte da sequência doadora em posição prevista.

Além da demonstração a nível molecular da edição gênica do TM de *L. amazonensis* por meio de diferentes estratégias, foram realizadas análises fenotípicas dos parasitos editados. Inicialmente, foi avaliada a sensibilidade dos mesmos à miltefosina após mutação induzido pela proteína recombinante. O resultado do ensaio demonstrou diminuição significativa na sensibilidade desse grupo de parasitos ao fármaco em questão (6 vezes). Esse achado está de acordo com os trabalhos de Pérez-Victoria (2003) e Zhang e Matlashewski (2015), que relatam que alterações na sequência desse gene são um fator determinante para o aparecimento de resistência à miltefosina.

Trabalhos recentes demonstram que *L. donovani* resistente à miltefosina tem alterações concomitantes em seu perfil de virulência (DEEP *et al*, 2017 e 2018). De maneira complementar, o trabalho de Bockstal e colaboradores (2019), demonstra que parasitos *L. infantum* que apresentam defeitos no gene do transportador de miltefosina demonstram infectividade reduzida a vetores flebotomíneos. Face a essa potencial associação, conduzimos um ensaio de infecção de macrófagos com a cepa geneticamente editada. Os resultados não demonstraram diferenças significativas nas taxas de infecção ou no número de parasitos por célula quando comparados o grupo mutante e o grupo selvagem. Assim, os parasitos resistentes não foram mais infectivos. Esse resultado mostra-se diferente do observado por Deep e colaboradores (2017). Entretanto, diversos fatores podem explicar os diferentes perfis observados. Além das variações entre as espécies, já que o trabalho de Deep foi realizado com *L. donovani*, a cepa utilizada no trabalho é um isolado clínico, submetido a outras possíveis pressões seletivas concomitantes e independentes que afetam a virulência. É possível, portanto, que as alterações na infectividade observadas sejam decorrentes de outro fator e não somente dos mecanismos de resistência à miltefosina. Embora esforço tenha sido realizado para evitar alterações *off-target*, vale ainda ressaltar que

as mesmas não podem ser descartadas, face às limitações metodológicas do nosso trabalho, podendo interferir no fenótipo observado para a cepa mutante. Cabe ainda ressaltar que apesar de ter por intenção a aquisição de parasitos *knockouts* para o gene do transportador de miltefosina, os experimentos realizados nesse trabalho foram feitos com uma população selecionada na presença de miltefosina, mas sem obtenção de clones confirmadamente mutantes. Dessa maneira, é possível que se trate de uma população de parasitos mistos e, conseqüentemente, a presença de indivíduos não mutantes pode culminar com a observação de um fenótipo atenuado ao esperado para uma população totalmente *knockout*. É importante, portanto, para prosseguimento dos experimentos, a obtenção de clones mutantes para se eliminar essa possível variação.

Apesar dos achados iniciais indicarem a não existência de efeitos sobre a infectividade desses parasitos, outras investigações devem ser feitas para obter uma conclusão mais robusta. Desse modo, pretende-se avaliar o possível aumento de metacicloênese para esses parasitos, sendo esse outro fator associado a infectividade e que se mostrou alterado na cepa estudada por Deep e colaboradores. Além disso, por ser o TM um transportador de fosfolípides (Pérez-Victoria *et al*, 2003), pretendemos avaliar os índices de exposição de fosfatidilserina na membrana celular, um componente associado a infectividade dado o mecanismo de mimetismo apoptótico (WANDERLEY e BARCINSKI, 2010). Estudo recente de nosso grupo, em que foram mapeadas alterações por meio de análises metabolômicas em *L. amazonensis* (CREPALDI *et al*, 2019), demonstrou importante associação entre exposição de fosfatidilserina e perda de virulência por passagens sucessivas em cultura. Dessa forma, guardamos como perspectiva a possibilidade de investigar a exposição de fosfatidilserina, por citometria de fluxo, e concomitantemente, alterações no metabolismo de fosfolípides, por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massas.

Não obstante a ausência de alterações na infecção em macrófagos, há possibilidade que as mesmas ocorram durante a infecção *in vivo*. Assim, pretendemos avaliar esse aspecto em modelo *in vivo*, mensurando a carga parasitária, desenvolvimento de lesão e outros parâmetros. Ainda como perspectiva, pretendemos realizar transfecções utilizando os SgRNAs com os três modelos para compará-los,

em um mesmo ensaio quanto a eficiência de edição gerada, partindo-se de número celular igual e contabilizando os parasitos alterados.

Considerando os resultados alcançados nesse estudo, e com a conclusão das análises do genoma de *L. amazonensis*, abre-se um amplo caminho para que novas edições possam ser planejadas para essa importante espécie, de modo a ampliar o estudo de diferentes genes, suas funções e seu impacto para novas abordagens terapêuticas e vacinas.

CONCLUSÕES

Com o presente trabalho foi possível demonstrar a efetividade para geração controlada e específica de mutações gênicas em *L. amazonensis*, empregando transfecção com plasmídeo episossomal, para expressão de SpCas9, ou proteína SaCas9 recombinante. Os parasitos gerados não demonstraram alterações fenotípicas aparentes, exceto pela comprovada resistência à miltefosina, ausente previamente às alterações induzidas.

REFERÊNCIAS

- ANDRADE, A.R.O.; NUNES, V.L.B.; GALATI, E.A.B.; DE ARRUDA, C.C.P.; SANTOS, M.F.C.; ROCCA, M.E.G.; AQUINO, R.B.; Epidemiological study on leishmaniasis in an area of environmental tourism and ecotourism, state of Mato Grosso do Sul, 2006-2007. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** Uberaba, Vol.42, n.5, p488-493, 2009.
- ANVERSA, L.; TIBURCIO, M.G.S.; RICHINI-PEREIRA, V.B.; RAMIREZ, L.E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.64, n.3, p281-289, 2018.
- BARRAL, A.; PEDRAL-SAMPAIO, D.; GRIMALDI JR, G.; MOMEN, H.; MCMAHON-PRATT, D.; DE JESUS, A.R.; ALMEIDA, R.; BADARO, R.; BARRAL-NETTO, M.; CARVALHO, E.M.; JOHNSON JR. W.D. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: Evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.** V.44, I. 5, p. 536-546, 1991.
- BENEKE, T.; MADDEN, R.; MAKIN, L.; VALLI, J.; SUNTER, J.; GLUENZ, E. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **Royal Society Open Science.** v.4. 2017.
- BERG, J.M.; TYMOCZKO, J.L.; STRYER, L.; GATTO JR. G.J. **Biochemistry.** 7. Ed. New York: W.H. Freeman and Company, 2012.
- BOCKSTAL, L.V.; SÁDLOVÁ, J.; SUAU, H.A.; HENDRICKX, S.; MENESES, C.; KAMHAWI, S.; VOLF, P.; MAES, L.; CALJON, G. Impaired development of a miltefosine-resistant *Leishmania infantum* strain in the sand fly vectors *Phlebotomus perniciosus* and *Lutzomyia longipalpis*. **IJP: Drugs and Drug Resistance.** V.11, p. 1-7, 2019.
- BURKARD, G.S.; JUTZI, P.; RODITI, I. Genome-wide RNAi screens in bloodstream form of trypanosomes identify drug transporters. **Molecular and Biochemical Parasitology.** V.175, I.1, p. 91-94, 2011.
- BURLE-CALDAS, G.A.; SOARES-SIMÕES, M.; LEMOS-PECHNICKI, L.; DAROCHA, W.D.; TEIXEIRA, S.M.R. Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. **International Journal of Parasitology.** V.48, I.8, p. 591-596, 2018.

CDC – Leishmaniasis – Resources for Health Professionals, 2018. Disponível em: https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/health_professionals/index.html. Acesso em 22 Dez. 2019.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V.156, I.2, p. 93-101, 2007.

CONG, L.; RAN, F.A.; COX, D.; LIN, S.; BARRETTO, R.; HABIB, N.; HSU, P.D.; WU, X.; JIANG, W.; MARRAFFINI, L.; ZHANG F. Multiples genome engineering using CRISPR/Cas systems. **Science**. 339(6121), p. 819-823, 2013.

CREPALDI, F.; de TOLEDO, J.S.; do CARMO, A.O.; MACHADO, L.F.M.; de BRITO, D.D.V.; SERUFO, A.V.; ALMEIDA, A.P.M.; de OLIVEIRA, L.G.; RICOTTA, T.Q.N.; MOREIRA, D.S.; MURTA, S.M.F.; DINIZ, A.B.; MENEZES, G.B.; LÓPEZ-GONZÁLVIZ, Á.; BARBAS, C.; FERNANDES, A.P. Mapping alterations induced by long-term axenic cultivation of *Leishmania amazonensis* promastigotes with a multiplatform metabolomic fingerprint approach. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**. V.9, n. 403, 2019.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. V.19, I. 1, p. 111 – 126, 2006.

CUI, Y.; YU, L. Application of the CRISPR/Cas9 gene editing technique to research on functional genomes of parasites. **Parasitology international**. V.65, I.6, p. 641- 644, 2016.

DEEP, D.K.; SINGH, R.; BHANDARI, V.; VERMA, A.; SHARMA, V.; WAJID, S.; SUNDAR, S.; RAMESH, V.; DUJARDIN, J.C.; SALOTRA, P. Increased miltefosine tolerance in clinical isolates of *Leishmania donovani* is associated with reduced drug accumulation, increased infectivity and resistance to oxidative stress. **PLoS Negl Trop Dis**. V.11, I.6, 2017.

DEEP, D.K.; SINGH, R.; KULSHRESTHA, A.; WAJID, S.; SALOTRA, P. Lipase precursor-like protein promotes miltefosine tolerance in *Leishmania donovani* by enhancing parasite infectivity and eliciting anti-inflammatory responses in host macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.62, I.12, 2018.

DORLO, T.P.C.; BALESEGARAM, M.; BEIJNEN, J.H.; VRIES, P.J. Miltefosine: A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. V.67, I.11, p. 2576-2597, 2012.

Miltefosine: DRUGBANK. Disponível em <https://www.drugbank.ca/drugs/DB09031>. Acesso em 22 Nov. 2019.

DUTTA, A.; BANDYOPADHYAY, S.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**. V.54, p. 119-122, 2005.

FERNANDEZ-PRADA, C.; VINCENT, I.M.; BROTHERON, M.C.; ROBERTS, M.; ROY, G.; RIVAS, L.; LEPROHON, P.; SMITH, T.K.; OUELLETTE, M. Different mutations in a P-type ATPase transporter in *Leishmania* parasites are associated with cross-resistance to two leading drugs by distinct mechanisms. **PLoS Negl Trop Dis**. V.10, I.12, 2016.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R.R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**. V.14, n. 7, p. 2317-2336, 2009.

GEARING, M. PITching MMEJ as an alternative route for gene editing. Disponível em: <https://blog.addgene.org/pitching-mmej-as-an-alternative-route-for-gene-editing>.

Acesso em 30 Jan. 2020.

GOOTENBERG, J.S.; ABUDAYYEH, O.O.; LEE, J.W.; ESSLETZBICHLER, P.; DY, A.J.; JOUNG, J.; VERDINE, V.; DONGHIA, N.; DARINGER, N.M.; FREIJE, C.A.; MYHRVOLD, C. BHATTACHARYYA, R.P.; LIVNY, J.; REGEV, A.; EUGENE, V.K.; HUNG, D.T.; SABETIE, P.C.; COLLINS, J.J.; ZHANG, F. Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2. **Science**. 356, p. 438-442, 2017.

HRYHOROWICZ, M.; LIPINSKI, D.; ZEYLAND, J.; SLOMSKI, R. CRISPR/Cas9 Immune System as a Tool for Genome Engineering. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**. v.65, p. 233-240. 2017.

ISHINO, Y.; SHINAGAWA, H.; MAKINO, K.; AMEMURA, M.; NAKATA, A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. **Journal of bacteriology**. V.169, n. 12, p. 5429-5433, 1987.

JACKSON, A.P.; VAUGHAN, S.; GULL, K. Comparative genomics and concerted evolution of β – tubulin paralogs in *Leishmania* spp. **BMC Genomics**. V. 7, n. 137, 2006

JINEK, M.; CHYLINSKI, K.; FONFARA, I.; HAUER, M.; DOUDNA, J.A.; CHARPENTIER, E. A programmable dual RNA-guided DNA endonuclease in adaptative bacterial immunity. **Science**. 337(6096), p. 816-821, 2012.

- KELLER, A-A.; BREITLING, R.; HEMMERICH, P.; KAPPE, K.; BRAUN, M.; WITTIG, B.; SCHAEFER, B., LORKOWSKI, S.; REISSMANN, S. Transduction of proteins into *Leishmania tarentolae* by formation of non-covalent complexes with cell-penetrating peptides. **Journal of Cellular Biochemistry**. V.115, p. 243-252, 2014.
- KELLER, A-A.; SCHEIDING, B.; BREITLING, R.; LICHT, A.; HEMMERRICH, P.; LORKOWSKI, S.; REISSMANN, S. Transduction and transfection of difficult-to-transfect cells: Systematic attempts for the transfection of protozoa *Leishmania*. **Journal of Cellular Biochemistry**. V. 120, p. 14 – 27, 2019.
- KNOTT, G.J.; DOUDNA, J. A. CRISPR-Cas guides the future of genetic engineering. **Science**. 361(6405), p. 866-869, 2018.
- LAINSON, R.; RYAN, L.; SHAW, J.J. Infective stages of *Leishmania* in the sandfly vector and some observations on the mechanism of transmission. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. V. 82, n. 3, p. 421-424, 1987.
- LYPACZEWSKI, P.; HOSHIZAKI, J.; ZHANG, W-W.; McCALL, L-I.; TORCIVIA-RODRIGUEZ, J.; SIMONYAN, V.; KAUR, A.; DEWAR, K.; MATLASHEWSKI, G. A complete *Leishmania donovani* reference genome identifies novel genetic variations associated with virulence. **Scientific Reports**. V. 8, n. 16549, 2018.
- MALI, P.; YANG, L.; ESVELT, K.M.; AACH, J.; GUELL, M.; DICARLO, J.E.; NORVILLE, J.E.; CHURCH, G.M. RNA-guided human genome engineering via Cas9. **Science**. 339(6121), p. 823-826, 2013.
- MONDELAERS A.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M.P.; HENDRICKX, S.; EBERHARDT, E.; GARCIA-HERNANDEZ, R.; LACHAUD, L.; COTTON, J.; SANDERS, M; CUYPERS, B.; IMAMURA, H.; DUJARDIN, J.C.; DELPUTTE, P.; COS, P.; CALJON, G.; GAMARRO, F.; CASTANYS, S.; MAES, L. Genomic and molecular characterization of miltefosine resistance in *Leishmania infantum* strains with either natural or acquired resistance through experimental selection of intracellular amastigotes. **PLoS ONE**. V.11, I.4, 2016.
- MORAIS-TEIXEIRA, E.D.; DAMASCENO, Q.S.; GALUPPO, M.K.; ROMANHA, A.J.; RABELLO, A. The in vitro leishmanicidal activity of hexadecylphosphocholine (miltefosine) against four medically relevant *Leishmania* species of Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, V. 106, n. 4, p. 475-478, 2011.
- MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAIVA, N.G. Advances in Leishmaniasis. **Lancet**. v. 366, p. 1561-1577. 2005.

PENG, D.; KURUP, S.P.; YAO, P.Y.; MINNING, T.A.; TARLETON, R.L. CRISPR-Cas9-mediated single-gene and gene family disruption in *Trypanosoma cruzi*. **mBio**. 6(1), 2015.

OLIVEIRA, LEANDRO GONZAGA. **Avaliação de mediadores pró-inflamatórios, pró-resolutivos e da via de sinalização ERK1/2 em modelo murino de infecção por *Leishmania* spp.** 2018. 144 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2018. Disponível em https://repositorio.ufmg.br/bitstream/1843/BUOS-BB6JD9/1/corre_op_s_defesa_tese_leandro_vers_o_final.pdf Acesso em 03 Dez. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2018 Disponível em: www.paho.org/leishmaniasis .

PÉREZ-VICTORIA, F.J.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. *Leishmania donovani* resistance to miltefosine involves a defective inward translocation of the drug. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. V.47, I. 8, p. 2397-2403, 2003.

PÉREZ-VICTORIA, F.J.; GAMARRO, F.; OUELLETTE, CASTANYS, S. A novel P-type phospholipid translocase from *leishmania* involved in drug resistance. **The Journal of Biological Chemistry**. V.278, n. 50, p. 49965 – 49971, 2003.

PÉREZ-VICTORIA, F.J.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M.P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Phospholipid Translocation and miltefosine potency require both *L. donovani* miltefosine transporter and the new protein LdRos3 in *Leishmania* parasites. **The Journal of Biological Chemistry**. V.281, n.33, p. 23766-23775, 2006.

Miltefosine: Pubchem. Disponível em: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Miltefosine>. Acesso em 30 Jan. 2020.

REAL, F.; VIDAL, R.O.; CARAZZOLLE, M.F.; MONDEGO, J.M.C.; COSTA, G.G.L.; HERAI, R.H.; WÜRTELE, M.; DE CARVALHO, L.M.; FERREIRA, R.C.; MORTARA, R.A.; BARBIÉRI, C.L.; MIECZKOWSKI, P.; SILVEIRA, J.F.; BRIONES, M.R.S.; PEREIRA, G.A.G.; BAHIA, D. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA Research**. V.20, I.6, p. 567 – 581, 2013.

SAMARASINGHE, S.; SAMARANAYAKE, N.; KARIYAWASAM, U.L.; SIRIWARDANA, Y.D.; IMAMURA, H.; KARUNAWEEERA, N.D. Genomic insights into

virulence mechanisms of *Leishmania donovani*: evidence from an atypical strain. **BMC Genomics**. V. 19, n. 843, 2018.

SAMPAIO, GILMARA DE SOUZA. **Estudo comparativo entre o antimoniato-n-metilglucamina (Glucantime) e o isotionato de pentamidina (pentacarinat) em lesões cutâneas da leishmaniose tegumentar**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz, Salvador, 2013. Disponível em <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/7633/1/Gilmara%20de%20Souza%20Sampaio.Metilglucamina...2013.pdf> Acesso em 19 Dez. 2019.

SEIFERT, K.; PÉREZ-VICTORIA, F.J.; STETTLER, M.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M.P.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F.; CROFT, S.L. Inactivation of the miltefosine transporter, LdMT, causes miltefosine resistance that is conferred to the amastigote stage of *Leishmania donovani* and persists in vivo. **International Journal of Antimicrobial Agents**. V.30, I. 3, p. 229-235, 2007.

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

SOLLELIS, L.; GHORBAL, M.; MACPHERSON, C.R.; MARTINS, R.M.; KUK, N.; CROBU, L.; BASTIEN, P.; SCHEF, A.; LOPEZ-RUBIO, J.J.; STERKERS, Y. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in *Leishmania* parasites. **Cellular Microbiology**. V.17, I.10, p. 1405-1412, 2015.

SOUTO, TATIANE CRISTINA. **Otimização de protocolos de edição gênica utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9 em *Leishmania infantum***. 2019. 107 f. Dissertação (Mestrado em Genética) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAI, M.; PRAJAPATI, V.K.; SINGH, A.K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J.C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**. V.55, I.4, p. 543-550, 2012.

TEIXEIRA, S.M.R. Control of gene expression. In Trypanosomatidae. **Braz J Med Biol Res**. V.31, n. 12, p.1503-1516, 1998.

TORRES-GUERRERO, E.; QUINTANILLA-CEDILLO, M.R.; RUIZ-ESMENJAUD, J.; ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000 Research**. 6:750, 2017.

- VALDIVIA, H.O.; ALMEIDA, L.V.; ROATT, B.M.; REIS-CUNHA, J.L.; PEREIRA, A.A.S.; GONTIJO, C.; FUJIWARA, R.T., REIS, A.B.; SANDERS, M.J.; COTTON, J.A.; BARTHOLOMEU, D.C. Comparative genomics of canine-isolated *Leishmania (Leishmania) amazonensis* from an endemic focus of visceral leishmaniasis in Governador Valadares, southeastern Brazil. **Sci. Rep.** 7: 40804, 2017.
- WANDERLEY, J.L.M.; BARCINSKI, M.A. Apoptosis and apoptotic mimicry: the *Leishmania* connection. **Cellular and Molecular Life Sciences**. V. 67, I.10, p. 1653 – 1659, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis, disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/en/>, Acesso em 30/01/20.
- YUBAO, C.; LILI, Y. Application of the CRISPR/Cas9 gene editing technique to research on functional genomes of parasites. **Parasitology International**. v.65, p.641-644. 2016.
- ZHANG, H-X.; ZHANG, Y.; YIN, H. Genome editing with mRNA encoding ZFN, TALEN, and Cas9. **Molecular Therapy**. V. 27, n.4, 2019.
- ZHANG, W.; MATLASHEWSKI, G. CRISPR-Cas9-Mediated Genome Editing in *Leishmania donovani*. **mBio**, v.6, i.4. 2015.
- ZHANG, W.; LYPACZEWSKI, P.; MATLASHEWSKI, G. Optimized CRISPR-Cas9 genome editing for *Leishmania* and its use to target a multigene family, induce chromosomal translocation and study DNA break repair mechanisms. **mSphere**. V.2, I,1, 2017.

ANEXO A: Iniciadores utilizados no trabalho

Reações de PCR com plasmídeo pAC-SgRNA-Cas9 para síntese dos SgRNAs:

Primer forward para síntese de SgRNA-A:

5'GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCAAGAACATCAC
CGTGTCGGGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG 3'

Primer forward para síntese de SgRNA-B:

5'GGAGGCCGGAGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAGCGGCGCAGGTGT
TTGAACCG GTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAG 3'

Primer reverse universal:

5' TTCACCGGGCTCAGCCACGAAAAA 3'

Sequência doadora referente ao SgRNA-A:

5'GTTAGCTTCCACAAGAACATCACCGTGTCGTAGATAGATAGAAGCTTGTGGTG
CAGTTCATCTTTGCCTTCTACGTC 3'

Sequência doadora referente ao SgRNA-B:

3'CACCGCGCATAGGCGGCGCAGGTGTTTGAAGCTTCTATCTAAAGCTTCCGCG
GAATCGCGTAGTCGGCGGCGAGGGC 5'

Primers para amplificação de região presente na CDS do transportador de miltefosina:

Primer Forward:

5'CGCAAGTGCCTTCCCACCAGAATC 3'

Primer Reverse:

5'GTC GCG CAG GGT AGG GAA GAG G 3'

ANEXO B: Géis teste para avaliação da qualidade dos extratos proteicos

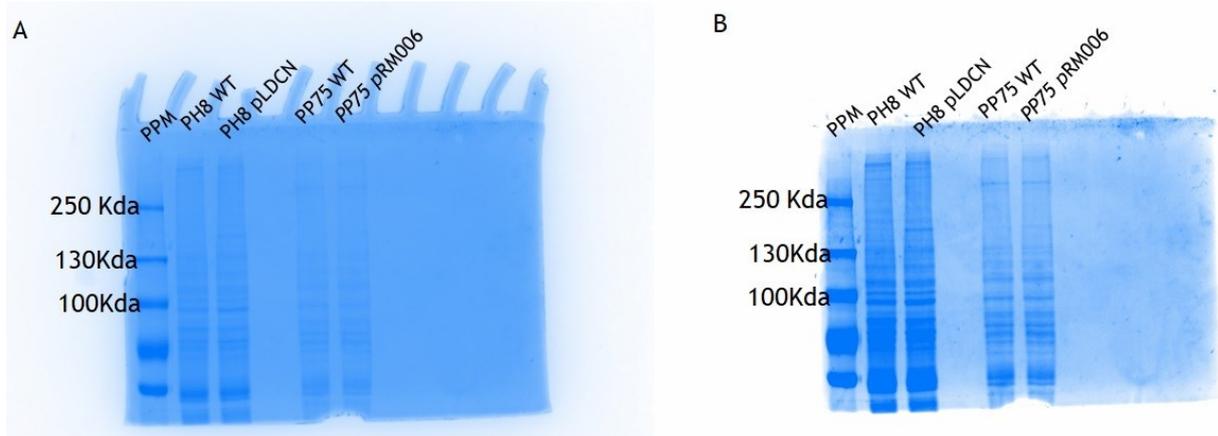


Figura 1: Extrato proteico total de *Leishmania Amazonensis* PH8. A) A fim de confirmar a expressão de Cas9 pela cepa transfectada com plasmídeo pLDCN, foram gerados extratos proteicos totais de *L. amazonensis* PH8 transfectada para posterior avaliação por *western blot*. *L. amazonensis* wild type foi utilizada como controle negativo e *L. infantum* PP75 com expressão de Cas9 confirmada previamente foi utilizada como controle positivo. B) Clareamento do *background* do gel para melhor observação das bandas.

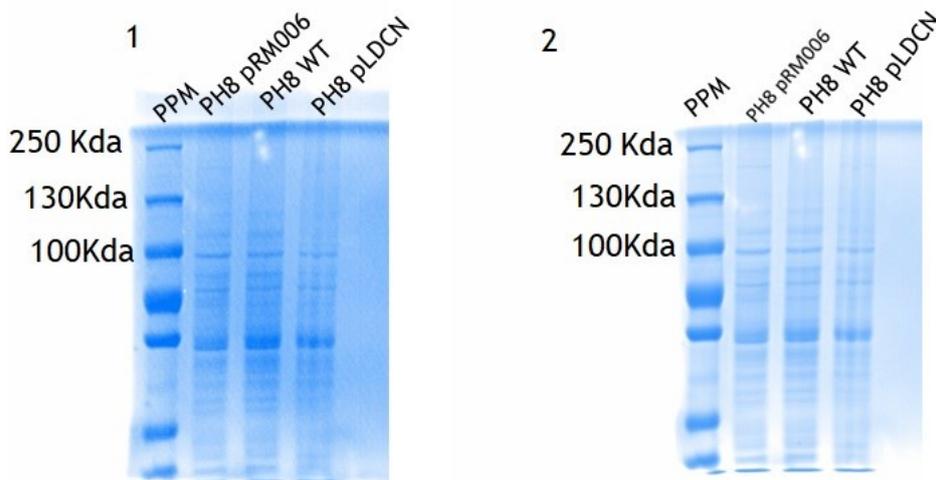


Figura 2: Extrato proteico total de *Leishmania Amazonensis* PH8. A) A fim de confirmar a expressão de Cas9 pela cepa transfectada com plasmídeo pRM006, foram gerados extratos proteicos totais de *L. amazonensis* PH8 transfectada para posterior avaliação por *western blot*. *L. amazonensis* wild type foi utilizada como controle negativo e *L. amazonensis* PH8 com expressão de Cas9 confirmada previamente foi utilizada como controle positivo. B) Clareamento do *background* do gel para melhor observação das bandas.

ANEXO C: Gene do transportador de miltefosina de *L. amazonensis*

>LAMA_000208300 | *Leishmania amazonensis* MHOM/BR/71973/M2269 | Phospholipid-translocating ATPase N-terminal/E1-E2 ATPase/Cation transport ATPase (P-

type)/Phospholipid-translocating P-type ATPase C-terminal, putative | genomic |
 KE391201.1 reverse | (geneStart+0 to geneEnd+0) | length=3315

ATGCCCAATCAACCGCGTGTGGCGCAAGTGCCTTCCCACCAGAATCCTCCCAGGCAAG
 CTCTCTAAGTCCTTCTGTGTTTTAGCGCAGAGGCGGACGTGGACGAGGATGACGAGGTG
 ATCGTGTACTTTAAACAACCCAGAGGCGAACGCGCAGTTCAAGTACCCGTCGAACTTTATT
 CGCACCTCCAAGTACTCGCTCATTTTCTTCTCCCCTCAGCCTCCTGTTCGAGTTCAGG
 AAGGTGAGTAATTTGTACTTCTCATCAACGTATATTACGCTCATCCCAGGTTGTGTCT
 CCGCTGAATCCGGCGACATCGATTGCGCCGCTGTCTTCTGTCTCCTGGTGGCAATCATC
 AAGGAGGCTGTGGAGGACATCAAGCGACATCGGGCCGATAACCGTGCCAACTCGGTTTTA
 ACGGAGGTAGTGCAGAAAGGCAAGCTCGTCTCGGTGCACAGCAAGGACATCCACCTGGT
 GACGTGCTACGTATCAAGAACAGTGGAGAGGTGCACGCCGATGTCTCATGTCTCCTCG
 TCCCTCGAGGAGGACAGGCCTTTATAGACACGTGCAACCTGGACGGCGAGTCGAACCTG
 AAGCCACGCAGGGCTTTGGAAGTGACCTGGGGCCTCTGCAAAATTGAGACAATCATGAAT
 ACCACAGCTGTGTTGCACACGAGCAAGCCAGACCAGGGTTGCTGTCTGGACGGGGCTG
 TTGGAGATCAATGGCGAGGAGCACGCACTCTCGCTGGACCAGTTCCTGTATCGCGGCTGC
 GTGTTACGCAACACGGACTGGGCGTGGGGCATGATTGCCTACGCAGGTGTGCACAGAA
 CTGTTCCGAAACTTGAAGCCAAACCCGCAAGTTCGTGCAACCTCGACCGCAAGCTGAAC
 TACTTTATCATAGCCATCCTCATATTCCAGAACATCATGCTTTCATCTTAGCCTCCATG
 GCAGTGTGGTGAACAACAAGTACAAGGAAACGCTTACCTCCGCTTCTTTATCAACAGC
 CGCCAGAACATAACGCTGTGGGGTACCCTTACTTGTAGCTATTTTATTTGCTGAGCTAC
 TGCGTGCCCATCTCGCTGTTCGTACGATTGAGGTATGCAAGGTGATCCAGGCGCAGTGG
 ATGCGGGTGGACTGCCTCATGATGGAGTACATGAACAACCGCTGGCGGCACTGCCAGCCG
 AACACGTCGAACCTCAACGAGCAGCTGGGAATGGTGCCTTCATCTTCAGCGACAAAAC
 GGGACGTTGACAGGAACTCATGAAGTTCAGCAAGGCGACGCTCTCGGCATTCCGATC
 GAGGCCGACAGCCTGGACAAATGCATCGTGCAGCTGCGCAAGGAGACCGAGTCGAAGAGG
 CTAGGCCCGCTGCAGGAGTACTTTCTCGCGTTGGCCTTGTGCAACACGGTTCAGCCCTC
 AAGGACGACACGGATGGCCTCAGTGTCTACGAAGGCGAGTCCCAGACGAGGTGGCG
 CTGGTTCGAGACCGCTGCTGCTGTGCGCTATCGCCTCATCAACCGTACGACAAAGTCCATC
 ACGCTCCTCCTGCAGAATGATACGCGTAAGGTGTACAACATCCTCGCCACACTGGAGTTC
 ACGCCGGACCGCAAGATGATGAGCATCATCGTGCAGGACAGCGACACCAACAAATTATG
 CTATACAATAAGGGGGCCGACAGCTTTCATCAGGCCGCGAGCTGAGCCGCGCCCGGATGTG
 CAAGAACACATAGAAAGTGTGACATCCCTCTGACGGAGATGTCTCGTTCGGGGCTCCGC
 AACTGTGGTGTGCGCCAAGGACATCACACGCCCGCAGTTCGACCTGTGGTACGAGAAG
 TTCGTCGAGGTTCGCAAGTCTCTGCACAACCGCAGCTCCAAGATTGATAAAGTCTGCTTA
 GAGATGGAGCAAGACATGCGGCTCGTTCGGCGCCACCGCCATCGAGGACAAGCTGCAAGAC
 GAGGTGCCCTGAGACACTGTCGTTTTTCTTGAACGCCGGTGTGATCATTGGATGCTCACT
 GGCACAAAGCGCGAGACTGCGGTGACGATCGCTGCAACGTCGACCCTGTGCGACCCGCGC
 AACGACTTCATCGACCACGTCGACATTGGCCATCTGAATCCATCGGACCCCAAGGCGATT
 GAGCGCGTAGGGCGGACCTCGACGTGGTGGAGCAGCACATCGCGCTCAAGGGGACCCAC
 AAGGAGCGCGCTGCACCTTGGTTCATCGACGCGCCGGCGTGAACATCTCGATGGAGCAC
 TACTTTAACAGTTTCTGCGCATCTCCATCAGTTAAACTCCGCGTCTGCTGTCTCTC
 ACGCCGATCCAGAAGGCAAGCGTCTGTCATGTTCCAGAAGTCAACCGGTAAGACAGCG
 CTGGCCATCGGTGACCGGCAACGACGTGTCATGATCCGGGAGGGACGTGTGGGCGTG
 GGCATTATTGGGGTGGAAAGGTGCTCATGCCGCCCTCGCCGCGACTACGCGATTCCGCGG
 TTCAAACACCTGCGCCGCTATGCGCGGTGCATGGGCGCTACTCGCTCTTCCGAAACGCC
 AGCTGCATCTGGTTAGCTTCCACAAGAATCACCCTGTCGGTGGTGCAGTTCATCTTT
 GCCTTCTAGCTCGGCTTCTCGGGGCTAACACTCTTTGATGGGTGGATGCTGACCTTCTAC
 AACGTCCTGATGACAAGTGTCCACCTTCTTCATGGGCATATTCGATAAAGGACCTCCCC
 GAAGAGGCCCTGCTGGAGCGGCCGAAGCTGTACACACCGTTGTCGCATGGCGAGTACTTT
 AACGTGGCGACGCTTCTGCGGTGGTTCGCGAATCACTAATAACAGCATTGATTCTCTTC
 TACGCTGCTTATCCGACATTGGTCCATCAAGACGGTTCATCAACGCTACACTGGCGCT
 GAGACCGGCACGCTCGTGTTCAGCGGCTTGATCCTCGTCAATCAAACCTCGCTTCGCCCTG
 CAGATCCGCTACTGGCAGTGGCTGCAAGTTTTCCGCGATGGTGGTGGCACTGTCTTTCTTC
 CTGTTGTTGTTTCTCGTCTACTCCGCCATTCCTCGATCTCAGTGACACGAATTTCTAC
 TACCAAGCCTTCGACCTGATGTGACCGCCAAATACTGGTCTTCTCTGCTCCTCTACGTT
 GGTATCGAGTTGGCGGCGTACTCGGTTTCATAGTGTCCAGAAGAGCCTCTCCCTACC
 CTGCGGACGTCGCGGAGCGACAGCACGCCCTTCAAAGAGTGGGCGGCGGAGGAGATCG
 CTCGATAGTGCATAG

ANEXO D: Alinhamento dos genes TM de *L. amazonensis* e *L. infantum*

LAMA_000208300
 LINF_130020800

ATGCCCAATCAACCGCGTGTGGCGCAAGTGCCTTCCCACCAGAATCCTCCCAGGCAAG
 ATGCCCAACCAACCGCGTGTGGCGCAAGTGCCTTTCACCAGAATCTTCCCAGACAAG

```

*****
LAMA_000208300 CTCTCTAAGTCCTTCTGCTGTTTTAGCGCAGAGGCGGACGTGGACGAGGATGACGAGGTG
LINF_130020800 CTCTCCAAGTCCTTCTGCTGCTTTAGCGCAGAGGCGGACGTGGACGAGGATGATGAGGTG
*****

LAMA_000208300 ATCGTGTACTTTAACACCCAGAGGCGAACGCGCAGTTCAAGTACCCGTCGAACTTTATT
LINF_130020800 ATCGTGTACTTTAACACCCAGAGTGAACGCGCAGTTAATTATCCGTCGAACTTCATT
*****

LAMA_000208300 CGCACCTCCAAGTACTCGTCAATTTCCCTTCTCCACTCAGCCTCCTGTTTCGAGTTCAGG
LINF_130020800 CGTACCTCCAAGTACACACTCATCTCCTTCCCTCCACTCAGCCTCCTGTTGGAGTTCAAA
**

LAMA_000208300 AAGGTGAGTAATTTGTACTTCCCTCATCAACGTCATATTCAGCCTCATCCCGGGTGTGTCT
LINF_130020800 AAGGTGAGTAATTTGTATTTCTCATGAACGTCATATTCAGCCTCATCCAGGTGTGTCC
*****

LAMA_000208300 CCGCTGAATCCGGCGACATCGATTGCGCCGCTGTCTTCCGTCCTCGTGGCAATCATC
LINF_130020800 CCGCTAAGTCCGGCGACCTCGATTGCGCCGCTGTCTTGTGCTCATCGTGGCACTCATC
*****

LAMA_000208300 AAGGAGGCTGTGGAGGACATCAAGCGACATCGGGCCGATAACCGTGCCAACCTCGTTTTTA
LINF_130020800 AAAGAGGGGTGGAGGACATCAAGCGACATCAGGCCGACAACCGGCCAACCTCGATTTTA
**

LAMA_000208300 ACGCAGGTAGTGGCAAAGGCAAGCTCGTCTCGGTGCACAGCAAGGACATCCACCCTGGT
LINF_130020800 GTGCAGGTACTGCGAAACGGCAAGCTCGTCTCGGTGCACAGCAAGGACATCCACCCTGGT
*****

LAMA_000208300 GACGTCGTACGTATCAAGAACAGTGGAGGAGTGCACGCCGATGTCGTATGCTCTCCTCG
LINF_130020800 GACGTCATGCGTATCAAGAACGCGAGGAGTGCACGCCGATGTCGTATGCTCTCCTCG
*****

LAMA_000208300 TCCCTCGAGGAGGGACAGGCCCTTTATAGACACGTGCAACCTGGACGGCGAGTCGAACCTG
LINF_130020800 TCCGTCGAGGAAGGACAGGCATTTATAGACACATGTAACCTGGACGGCGAGACGAACTG
***

LAMA_000208300 AAGCCACGCAGGGCTTTGGAAGTGACCTGGGGCCTCTGCAAAATTGAGACAATCATGAAT
LINF_130020800 AAGTCACGCAAGGCTCTGGAAGCCACTGGGCGCTCTGCGAAGTCGAGGCATCATGAAT
***

LAMA_000208300 ACCACAGCTGTGTTGCACACGAGCAAGCCAGACCCAGGGTTGCTGTGTCGTTGGCAGGGGCTG
LINF_130020800 AGCACAGCCGTAAGTGCACACGAGCAAGCCAGACCCAGGGTTGCTGTGTCGTTGGCAGGGGCTG
*

LAMA_000208300 TTGGAGATCAATGGCGAGGAGCAGCACTCTCGCTGGACCAGTTCTCTGTATCGCGGCTGC
LINF_130020800 TTGGAAATCAATGGCGAGGAGCAGCTCTCTCGCTGAACAGTTCTCTGTATCGCGGCTGC
*****

LAMA_000208300 GTGTTACGCAACACGACTGGGCGTGGGGCATGATTGCCTACGCAGGTGTCGACACGAAG
LINF_130020800 GTGTTACGCAACACGACTGGGCGTGGGGCATGATTGCCTACGCAGGGTTCGACACGAAG
*****

LAMA_000208300 CTGTTCCGAAACTTGAAGCCAAAACCGCCAAAGTCGTCGAACCTCGACCGCAAGCTGAAC
LINF_130020800 CTGTTCCGAAACTTGAAGCCAAAACCGCCAAAGTCGTCGAACCTCGACCGCAAGCTGAAC
*****

LAMA_000208300 TACTTTATCATAGCCATCCTCATATTCAGAACATCATGCTCTTCATCTTAGCCTCCATG
LINF_130020800 TACTTTATCATAGCCATCCTCATATTCAGAACATCATGCTCTTCATCTTAGCCTCCATG
*****

LAMA_000208300 GCAGTGTGGTGGAAACAACAAGTACAAGGAAACGCCTTACCTCCGCTTCTTTATCAACAGC
LINF_130020800 GCAGTGTGGTGGAAACAACAAGTACAAGGAAACGCCTTACCTCCGCTTCTTTATCAACAGC
*****

LAMA_000208300 CGCCAGAACAATAACGCTGTGGGGTACCGTTACTTGAGCTATTTTCATTTTGCTGAGCTAC
LINF_130020800 CGCAAGAACGTAACCTGTGGGGTACCGTTACTTGAGCTATTTTCATTTTGCTGAGCTAC
***

LAMA_000208300 TGCGTGCCCATCTCGCTGTTTCGTCACGATTGAGGTATGCAAGGTGATCCAGGCGCAGTGG
LINF_130020800 TGCGTGCCCATCTCGCTGTTTCGTCACGATTGAGGTATGCAAGGTGATCCAGGCGCAGTGG
*****

LAMA_000208300 ATGCGGGTGGACTGCCTCATGATGGAGTACATGAACAACCGCTGGCGGCCTGCCAGCCG
LINF_130020800 ATGCGGGTGGACTGCCTCATGATGGAGTACATGAACAACCGCTGGCGGCCTGCCAGCCG

```

```

*****
LAMA_000208300 AACACGTCGACCTCAACGAGCAGCTGGGAATGGTGCCTTCATCTTCAGCGACAAAAC
LINF_130020800 AACACGTCGACCTCAACGAGCAGCTAGCAATGGTGCCTTCATCTTCAGCGACAAAAC
***** * *****

LAMA_000208300 GGGACGTTGACAGAGAACGTCATGAAGTTCAAGCAAGGCGACGCTCTCGGCATTCGGATC
LINF_130020800 GGGACGTTGACAGAGAACGTCATGAAGTTCAAGCTAGGCGACGCTCTCGGTAATCCGATC
***** * *****

LAMA_000208300 GAGGCCGACAGCCTGGACAAATGCATCGTGCAGCTGCGCAAGGAGACCGAGTCAAGAGG
LINF_130020800 GACGCCGACAAATCTGGACGAGTGCATCGCGCAGCTGCGCAAGGAGCCGAGTCAAGGGG
** ***** * ***** *****

LAMA_000208300 CTAGGCCCGCTGCAGGAGTACTTTCTCGCGTTGGCCTTGTGCAACACGGTTCAGCCCTTC
LINF_130020800 CTAGGCCCGCTGCAAGAGTACTTTCTCGCGTTGGCCTGTGCAACACGGTTCAGCCCTTC
***** * ***** *****

LAMA_000208300 AAGGACGACACGGATGGCCTCAGTGTCTACGAAGGCAGCTCCCCAGACGAGGTGGCG
LINF_130020800 AAGGACGACACGGATGACTTGGGTGTGTCTACGAAGGCAGCTCCCCAGACGAGGTGGCG
***** * * **** *****

LAMA_000208300 CTGGTCGAGACCGCTGCTGCTGTCGGCTATCGCCTCATCAACCGTACGACAAAGTCCATC
LINF_130020800 CTGGTCGAGACCGCTGCTGCTGTCGGCTATCGCCTCATCAGCCGTACGACAAAGTCCATC
***** * ***** *****

LAMA_000208300 ACGCTCCTCCTGCAGAATGATACGCGTAAGGTGTACAACATCCTCGCCACACTGGAGTTC
LINF_130020800 ACGCTACTCCTGCACGATGGGACGCGCAAGGTATACAACATCCTCGCCACACTGGAGTTC
***** * ***** * ** *****

LAMA_000208300 ACGCCGACCGCAAGATGATGAGCATCATCGTCGAGGACAGCGACACCAACAAATATG
LINF_130020800 ACGCCGACCGCAAGATGATGAGCATCATCGTCGAGGACAGCGACACCAACAAATATG
***** * ***** *****

LAMA_000208300 CTATACAATAAGGGGGCCGACAGCTTCATCAGGCCGAGCTGAGCCGCGCCCGGATGTG
LINF_130020800 CTGTACAATAAGGGGGCCGACAGTTTCATCAGGCCGAGCTGAGCCGCGCCCGGATGTG
** ***** *****

LAMA_000208300 CAAGAACACATAGAAAGTGTGACATCCCTCTGACGGAGATGTCTCGTCGGGGCTCCGC
LINF_130020800 CAGGGGCACATCGAAAATGTGAGATCCCTCTGACGGAAATGTCTCGTCGGGGCTCCGC
** * ***** * ** * ** *****

LAMA_000208300 ACGCTGCTGGTGTGCGCCAAGGACATCACACGCGCCAGTTCGACCTGTGGTACGAGAAG
LINF_130020800 ACGCTGCTTGTGTGCGCCAAGGATATCACACGCGCCAGTTCGACCTGTGGTACGAGAAG
** ***** ***** ***** ***** *****

LAMA_000208300 TTCGTCGAGGTGCGCAAGTCTCTGCACAACCGCAGCTCCAAGATTGATAAAGTCTGCTTA
LINF_130020800 TTCGTCGAAGCGCGCAAGTCCCTGCACAACCGCAGCTCCAATATTGATAAAGTCTGCTTA
***** * ***** ***** ***** *****

LAMA_000208300 GAGATGGAGCAAGACATGCGGCTCGTCCGCGCCACCGCCATCGAGGACAAGCTGCAAGAC
LINF_130020800 GAGATGGAGCAAGATATGCGGCTCGTCCGCGCCACCGCCATCGAGGACAAGCTGCAAGAC
***** ***** ***** ***** *****

LAMA_000208300 GAGGTGCCTGAGACACTGTCGTTTTTCTTGAACGCCGGTGTGATCATTTGGATGCTCACT
LINF_130020800 GAGGTCCCTGAGACACTGTCCTTCTTCTTGAGCGCCGGTGAATCATTTGGATGCTCACT
***** ***** * ** ***** ***** *****

LAMA_000208300 GCGACAAGCGCGAGACTGCCGTGACGATCGCTGCAACGTCGACCCCTGTGCGACCCGCGC
LINF_130020800 GCGACAAGCGCGAGACCGCGTGACGATCGCTGCAACGTCGACCCCTGTGCGACCCGCGC
***** ***** ***** ***** *****

LAMA_000208300 AACGACTTCATCGACCACGTCGACATTTGGCCATCTGAATCCATCGGACCCCAAGGCGATT
LINF_130020800 AACGACTTCATCGACCACATCGACATTTGGTCATCTGAATTCATCGGATCCCAAGGCGATT
***** ***** ***** ***** ***** *****

LAMA_000208300 GAGCGGTAGGGCGGACCTCGACGTGGTGGAGCAGCACATCGCGCTCAAGGGGACCCAC
LINF_130020800 GAGCGGTAGGGCGGACCTCGAAGTGGTGGAGCAGCACATCGCGCTCAAGGGGACCCAC
***** ***** ***** ***** *****

LAMA_000208300 AAGGAGCGCGCTGCACCTTGGTCATCGACGGCCCGCGCTGAACATCTCGATGGAGCAC
LINF_130020800 AAGGAGCGCGCTGCACCTTGGTCATCGACGGCCCGCGCTGAACATCGCAATGGAGCAC
***** ***** ***** ***** *****

LAMA_000208300 TACTTTAACCAGTTCCTGCGCATCTCCCATCAGTTAAACTCCGCCGTCTGCTGTCGTCCTC
LINF_130020800 TACTTTGACCAGTTCCTGCGCTCTCCCATCAGTCAACTCCGCCGTCTGCTGTCGTCCTC
***** ***** ***** ***** * *****

```

LAMA_000208300 ACGCCGATCCAGAAGGCAAGCGTCGTTTCGCATGTTCCAGAAGTCAACCGGTAAGACAGCG
LINF_130020800 ACGCCGATCCAGAAGGCAACCGTCGTTTCGCATGTTCCAGAAGTCAACCGGTAAGACAGCG

LAMA_000208300 CTGGCCATCGGTGACGGCGCCAACGACGTGCCATGATCCGGGAGGGACGTGTGGGCGTG
LINF_130020800 CTGGCCATCGGTGACGGCGCCAACGACGTGCCATGATCCGGGAGGGGCGTGTGGGCGTG

LAMA_000208300 GGCATTATTGGGGTGAAGGTGCTCATGCCGCCCTCGCCGCCGACTACGCGATTCCGCGG
LINF_130020800 GGCATTATTGGGCTGAAGGTGCACACGCCGCCCTCGCCGCCGACTACGCGATTCCGCGG

LAMA_000208300 TTCAAACACCTGCGCCGCTATGCGCGGTGCATGGGCGCTACTCGCTCTTCCGAAACGCC
LINF_130020800 TTCAAACACCTGCGCCGCTATGCGCGGTGCATGGGCGCTACTCGCTCTTCCGCAACGCC

LAMA_000208300 AGCTGCATTCTGGTTAGCTTCCACAAGAACATCACCGTGTGGTGGTGCAGTTCATCTTT
LINF_130020800 AGCTGCATTCTGGTTAGCTTCCACAAGAACATTACTGTGTGGTGGTGCAGTTCATCTTT

LAMA_000208300 GCCTTCTACGTGCGCTTCTCGGGGCTAACACTCTTTGATGGGTGGATGCTGACCTTCTAC
LINF_130020800 GCCTTCTACGTGCGCTTCTCGGGGCTAACACTCTTTGATGGATGGATGCTGACCTTCTAC

LAMA_000208300 AACGTCCTGATGACAAGTGTCCACCCTTCTTCATGGGCATATTCGATAAAGACCTCCCC
LINF_130020800 AACGTCCTTCTAACAAAGTATCCACCCTTCTTCATGGGCATATTCGATAAAGACCTCCCC

LAMA_000208300 GAAGAGGCCCTGCTGGAGCGGCCGAAGCTGTACACACCGTTGTTCGCATGGCGAGTACTTT
LINF_130020800 GAAGATGCCCTGCTGGAGCGGCCGAAGCTGTACACACCGTTGTTCGCATGGCGAGTACTTT

LAMA_000208300 AACGTGGCGACGCTTCTGCGGTGGTTCGCCGAATCACTAATAACAGCATTGATTCTCTTC
LINF_130020800 AACCTGGCGACGCTTCTGCGGTGGTTCGTGCAATCACTAATAACAGCGGTGATCCTCTTC

LAMA_000208300 TACGCTGCTTATCCGACATTGGTCCATCAAGACGGTTCATCAACGCTACACTGGCGCT
LINF_130020800 TATGCTGCTTACCCGACATTGATCCGTCAAGACGGTTCATCAACGCTACACTGGCGCT
**

LAMA_000208300 GAGACCGGCACGCTCGTGTTCAGCGGCTTGATCCTCGTCATTCAAACGCTTCGCCTG
LINF_130020800 GAGACCGGCACGCTCGTGTTCAGCGGCTTGATCCTCGTCATTCAAACGCTTCATCCTG

LAMA_000208300 CAGATCCGCTACTGGCAGTGGCTGCAAGTTTTTCGGCATGGTATGGCACTGTCTTTCTTC
LINF_130020800 CAGATCCGCTACTGGCAGTGGCTGCAGGTGTTGGCATGGCGATGTCGATTTTCTCTTT

LAMA_000208300 CTGTTGTTGTTTCTCGTCTACTCCGCCATTCCCTCGATCTTCAGTGACACGAATTTCTAC
LINF_130020800 CTGTTGTTGTTTCTCGTCTACTCCGCCATTCCCTCAGTCTTCAGTGACACGAATTTCTAC

LAMA_000208300 TACCAAGCCTTCGACCTGATGTCGACCGCCAAATACTGGTTCCTCCTGCTCCTCTACGTT
LINF_130020800 TACCAAGCCTTCGATCTCATGTCGACCGCCAAAGTACTGGTTCCTCCTGCTCCTCTACGTT

LAMA_000208300 GGTATCGAGTTGGCGCCGCTACTCGGTTTCATAGTGTCCAGAAGAGCCTTCCCTTACC
LINF_130020800 GGCACCGAGGTGGTGGTCTACTCGGCTCATGACGTTCAGAGTCCAGAAGAACCTTCCCTTACC
**

LAMA_000208300 CTGCGCGACGTCGCGGAGCGACAGCAGCCCTTCAAAGAGTGGGCGCGGAGGAGATCG
LINF_130020800 CTGCGCGACGTCGCGGAGCGACAGTACGCTGTTCAAACGTTGGAAGCTGTGA-----

LAMA_000208300 CTCGATAGTGCATAG
LINF_130020800 -----