

Geração e caracterização de uma cepa de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* expressora de luciferase

Palavras-Chave: *Leishmania infantum*; luciferase; suscetibilidade a drogas.

Giovanna Bedin Caetano^{1,2}

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho (Orientador)²

1 Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNICAMP; 2 Instituto de Biologia, UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por parasitos intracelulares obrigatórios do gênero *Leishmania*. Os parasitos deste gênero pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae caracterizada pela presença de um cinetoplasto rico em DNA mitocondrial e um único flagelo. As leishmânias possuem duas formas: amastigota e promastigota. A forma promastigota é encontrada no tubo digestivo do flebotômíneo, enquanto a forma amastigota, intracelular obrigatória, é encontrada principalmente no interior de macrófagos (Murray, Berman et al. 2005; Burza, Croft et al. 2018).

As leishmanioses podem se apresentar em duas formas clínicas principais: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV), sendo a LV a mais grave, levando a óbito se não tratada (Burza, Croft et al. 2018). É registrado entre 200 mil e 400 mil casos anuais de leishmaniose visceral, com mais de 90% concentrados no Brasil, Índia, Sudão, Nepal e Bangladesh. No Brasil, são relatados cerca de 3 mil novos casos de LV anualmente (Alvar, Velez et al. 2012).

Atualmente, o tratamento da leishmaniose é limitado a poucos medicamentos. No Brasil, a terapia medicamentosa é baseada principalmente no uso de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidina. Estes medicamentos possuem uma resposta clínica variável, vários efeitos colaterais, são de alto custo e administrados por via parenteral, além de relatos de resistência a esses medicamentos pelo parasito (Croft and Engel 2006, Ponte-Sucre, Gamarro et al. 2017). Diante dos desafios relacionados à quimioterapia da leishmaniose no Brasil, faz-se necessário a busca por alternativas terapêuticas mais eficazes.

Neste cenário, a miltefosina (MF) surge como uma alternativa de administração por via oral com sua eficácia comprovada no tratamento da leishmaniose visceral (LV) na Índia e em países do sudeste asiático endêmicos para a LV (Dorlo, Balasegaram et al. 2012). Levando em consideração os dados observados na literatura o estudo da atividade da MF em espécies circulantes no Brasil é de extrema relevância, principalmente a *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum*, a espécie responsável pela LV no Brasil. Em um estudo clínico no Brasil, a eficácia da MF em pacientes com LV foi de apenas 60%, apresentando falha terapêutica de aproximadamente 52% em pacientes pediátricos e 26% em adultos. Foi constatado que cerca de 43% dos isolados clínicos de *L. infantum* possuíam o locus sensível à miltefosina (MSL). O MSL está presente no cromossomo 31 do parasito. Em isolados de *L. infantum* provenientes de pacientes brasileiros foi identificada uma deleção nesse cromossomo e correlacionada com o risco aumentado de falha no tratamento com MF. Este locus contém quatro genes, 3'-nucleotidase/nucleases (NUC1 e NUC2), helicase e 3,2-trans-enoil-CoA isomerase (Carnielli, Crouch et al. 2018, Carnielli, MontiRocha et al. 2019). Posteriormente, a ausência dos genes NUC1 e NUC2 foi associada à redução da suscetibilidade à MF em *L. infantum*, devido a uma maior resistência às perturbações do metabolismo lipídico causadas pelo fármaco (Carnielli, Dave et al. 2022). A deleção do MSL está amplamente distribuída em isolados brasileiros de *L. infantum*, indicando a alta prevalência entre os parasitos circulantes no Brasil (Schwabl, Boité et al. 2021).

Diante disso, foi proposto gerar e caracterizar uma linhagem estável de *L. infantum* expressora de luciferase, positiva para o MSL. Essa linhagem será útil para ensaios de crescimento e infectividade *in vitro*, além de ser utilizada para a avaliação da atividade *in vitro* e *in vivo* da MF e de outros potenciais candidatos à fármacos anti-

Leishmania. Além disso, uma linhagem transgênica expressora de luciferase é uma ferramenta quantitativa fundamental para determinar a carga parasitária na LV experimental tanto *in vitro* quanto *in vivo*, visto que a produção de bioluminescência por essa proteína permite uma correlação direta com o número de parasitos (Reimao, Oliveira et al. 2015).

METODOLOGIA:

Cultivo de promastigotas de *L. infantum*

Promastigotas de *L. infantum* (cepa JPCM5, MSL positiva) foram cultivados em meio M199 estéril (Sigma-Aldrich) preparado a partir da diluição do pó em água destilada. Este foi complementado com HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina, hemina, suplementado com soro fetal bovino inativado e estéril, penicilina/estreptomicina e urina humana masculina estéril. As culturas foram mantidas em estufa a 25°C e os repiques realizados semanalmente. Os promastigotas foram cultivados para realizar a extração do DNA genômico. A cepa LD, MSL negativa, de *L. infantum* expressora de luciferase encontrava-se disponível no laboratório (Reimao, Oliveira et al. 2015).

Preparação de solução para inóculo de parasitos em camundongo

Promastigotas de *L. infantum* em seu sétimo dia de cultura foram centrifugados ressuspensos em PBS. A infecção do camundongo ocorreu por via intraperitoneal. Os camundongos BALB/c foram obtidos do CEMIB, UNICAMP. Todos os procedimentos realizados com animais foram autorizados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNICAMP (Protocolo CEUA: 5719-1/2021).

Geração de uma linha transgênica de *L. infantum* expressando luciferase

O vetor pSSUint-Luc2 foi transformado em bactérias competentes de *Escherichia coli*, cepa DH5 α , preparadas conforme previamente descrito (Sambrook and Maniatis, 1989). A cultura foi plaqueada em meio LB contendo ampicilina e incubada a 37°C por 16 horas. As bactérias recombinantes tiveram o vetor pSSUint-Luc2 extraído e linearizado com as enzimas de restrição *PacI* e *PmeI*. O cassete linear foi obtido através da purificação em gel de agarose utilizando o kit *PureLink Quick Gel Extraction* (Thermo Fisher Scientific), segundo as instruções do fabricante. A geração da linhagem transgênica de *L. infantum* foi obtida através do protocolo de transfecção descrito por (Beneke, Madde et al. 2017). Promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram centrifugados e lavados com PBS estéril. Estes foram transferidos para cubetas de eletroporação contendo o cassete de DNA a ser integrado e incubados no gelo. A seguir, os parasitos foram transfectados em eletroporador de células, e transferidos para garrafas contendo com meio M199. Após 24 horas, foi adicionada higromicina B para a seleção dos parasitos transgênicos. Para obtenção dos clones de *L. infantum* JPCM5, promastigotas foram plaqueados em meio M199 sólido, contendo biopterina e higromicina B. As colônias foram então expandidas em meio M199 líquido para posterior caracterização.

Atividade da luciferase na linhagem transgênica de *L. infantum*

A atividade da luciferase foi avaliada através da realização de diluição seriada de promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica de crescimento. Para a leitura, adicionou-se o substrato ONE-Glo Reagent (Promega) de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação de unidades relativas de luz (URL) foi realizada em um leitor de placa Molecular Devices SpectraMax M3.

Curva de crescimento de promastigota *in vitro*

Promastigotas foram cultivados em meio M199. As curvas de crescimento foram realizadas em triplicata e o crescimento avaliado durante 7 dias. A contagem de promastigotas foi realizada em câmara de Neubauer.

Determinação da atividade da MF contra promastigotas de *L. infantum*

Após a contagem de promastigotas em câmara de Neubauer, estes foram incubados em concentrações crescentes de MF em placa de 96 poços contendo meio M199. Posteriormente, adicionou-se a solução de MTT, e incubou-se novamente. Após esse período, a reação foi interrompida com SDS 20% para a lise dos parasitos. Os

valores de EC₅₀ foram determinados a partir de curvas de regressão sigmoide, utilizando o programa GraphPad Prism 8.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Geração de uma linha transgênica de *L. infantum* expressando luciferase

Inicialmente, uma PCR foi realizada para verificar a presença dos genes da *luciferase* (*Luc2*) e *higromicina fosfotransferase* (*hyg*) no vetor pSSUint-luc2. As reações específicas para esses genes amplificaram produtos de tamanhos esperados de 1,3 e 0,75 kb, respectivamente. Após a confirmação da presença dos genes, o vetor foi linearizado com as enzimas de restrição *PacI* e *PmeI* (Reimao, Oliveira et al. 2015), para em seguida ser purificado e integrado no *locus* ribossomal. A luciferase é responsável pela produção de bioluminescência e a higromicina fosfotransferase confere resistência ao antibiótico higromicina B.

O cassete linear contendo os genes *luc2* e *hyg* foi transfectado, e os parasitos selecionados na presença do antibiótico higromicina B. Foram selecionados quatro clones a partir da população transfectada com o cassete linear. Também foi selecionada uma linhagem controle transfectada com a construção circular do vetor pSSUint-luc2. Uma PCR foi realizada a partir do DNA genômico para confirmar a presença dos genes *luc2* e *hyg* nos respectivos clones. As reações de PCR confirmaram a presença de ambos os genes nas linhagens transgênicas da cepa JPCM5, mas não na cepa JPCM5 não transfectada. A integração do cassete linear no *locus* ribossomal foi confirmada em um dos clones selecionados [*L. infantum* JPCM5 Luc2 clone 3], utilizando duas combinações de iniciadores que amplificam fragmentos de 1,2 e 6,7 kb (Reimao, Oliveira et al. 2015).

Atividade da luciferase na linhagem transgênica de *L. infantum*.

A atividade da luciferase foi avaliada em duplicatas e o ensaio foi realizado a partir de uma diluição seriada de promastigotas de *L. infantum* JPCM5 e *L. infantum* JPCM5 Luc. Com isso, após a avaliação dos 4 clones selecionados, o clone 3 foi escolhido por apresentar uma melhor correlação de unidades relativas de luz por parasitos (Figura 1).

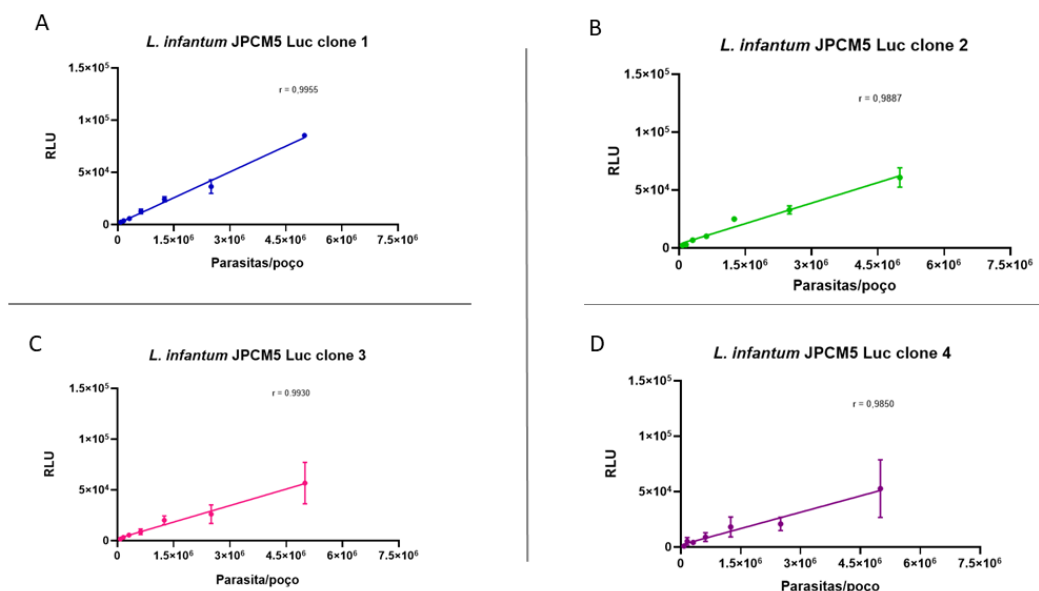


Figura 1. Gráfico demonstrando a correlação entre intensidade de luminescência e número de promastigotas da linhagem transgênica de *L. infantum* JPCM5. (A) *L. infantum* JPCM5 Luc clone 1; (B) *L. infantum* JPCM5 Luc clone 2; (C) *L. infantum* JPCM5 Luc clone 3; (D) *L. infantum* JPCM5 Luc clone 4.

Curva de crescimento de promastigotas da linhagem transgênica contendo o gene *luc2*

A curva de crescimento na forma promastigota foi realizada com o clone 3 que apresentou a melhor correlação entre unidades relativas de luz (RLU) e o número de parasitos (Figura 1). A partir desse ensaio foi possível observar que a cepa selvagem e a linhagem transgênica possuem um perfil de proliferação similar, atingindo a fase estacionária após 96 horas (Figura 2).

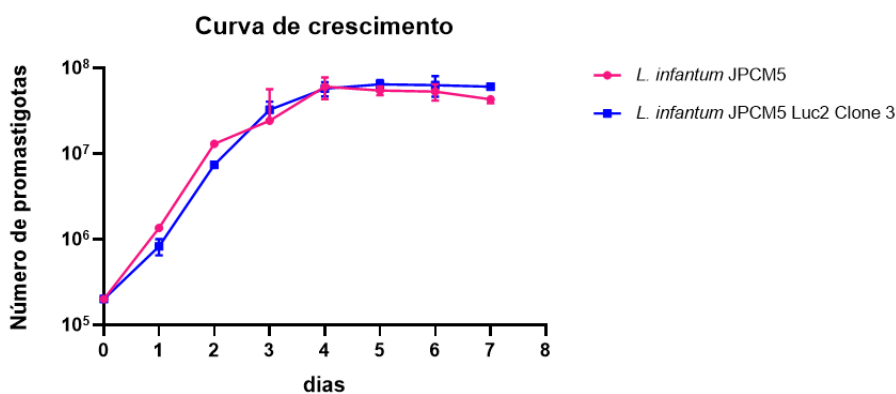


Figura 2. Curva de proliferação de promastigotas da cepa selvagem (*L. infantum* JPCM5) e transgênica (*L. infantum* JPCM5 Luc2 clone 3).

Atividade da MF contra promastigotas de *L. infantum* das cepas LD e JPCM5 expressoras de luciferase

Estudos recentes demonstraram que a deleção do MSL de *L. infantum* pode aumentar o risco de falha no tratamento com MF em 9,4 vezes. Foi sugerido que o MSL ainda pode ser utilizado como um potencial marcador molecular de falha do tratamento da LV com MF (Carnielli, Crouch et al. 2018, Carnielli, Monti-Rocha et al. 2019). Uma vez que a linhagem transgênica da cepa JPCM5 expressora de luciferase foi gerada, a atividade da MF foi avaliada por MTT. A cepa selvagem foi utilizada como controle, assim como a cepa LD (MSL negativa) (Tabela 1 e Figura 3).

Tabela 1. Suscetibilidade *in vitro* à MF em promastigotas de *L. infantum*

Linhagem / Fármaco	Promastigota			(n) ¹
	<i>L. infantum</i> JPCM5	<i>L. infantum</i> JPCM5 Luc 2 clone 3	<i>L. infantum</i> LD	
Miltefosina (μM)	4,87 ± 2,25	7,20 ± 3,75	16,55 ± 3,13	3

¹ Número de experimentos independentes realizados em triplicata.

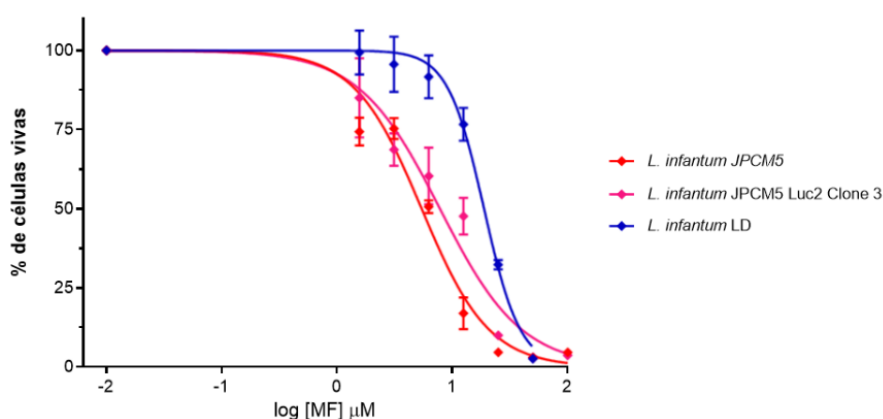


Figura 3. Curva dose-resposta de promastigotas de *L. infantum* em presença de concentrações crescentes de MF das cepas LD, JPCM5 e da linhagem transgênica JPCM5 Luc2 Clone 3.

Os ensaios de suscetibilidade à MF em promastigota demonstraram que a linhagem transgênica e a cepa selvagem de *L. infantum* JPCM5 apresentaram valores similares de EC₅₀. Entretanto, os promastigotas da cepa JPCM5 mostraram-se mais sensíveis à MF que a cepa LD (MSL negativa) (Tabela 1).

CONCLUSÕES:

Neste projeto, foi gerada uma linhagem de *L. infantum* expressora de luciferase. A caracterização molecular desta linhagem, confirmou a integração do gene *luc2* no locus ribossomal. Os promastigotas da linhagem transgênica da cepa JPCM5 apresentaram um perfil de proliferação semelhante ao da cepa selvagem e foi possível estabelecer uma correlação linear entre o número de parasitos e a produção de luz nesta linhagem transgênica.

BIBLIOGRAFIA

Alvar, J., I. D. Velez, C. Bern, M. Herrero, P. Desjeux, J. Cano, J. Jannin and M. den Boer (2012). "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence." *PLoS One* 7(5): e35671.

Beneke T, Madden R, Makin L, Valli J, Sunter J, Gluenz E (2017). A CRISPR Cas9 highthroughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R Soc Open Sci.* 4(5):170095.

Burza, S., S. L. Croft and M. Boelaert (2018). "Leishmaniasis." *Lancet* 392(10151): 951-970.

Carnielli, J. B. T., K. Crouch, S. Forrester, V. C. Silva, S. F. G. Carvalho, J. D. Damasceno, E. Brown, N. J. Dickens, D. L. Costa, C. H. N. Costa, R. Dietze, D. C. Jeffares and J. C. Mottram (2018). "A *Leishmania infantum* genetic marker associated with miltefosine treatment failure for visceral leishmaniasis." *EBioMedicine* 36: 83-91.

Carnielli, J. B. T., A. Dave, A. Romano, S. Forrester, P. R. de Faria, R. Monti-Rocha, C. H. N. Costa, R. Dietze, I. A. Graham and J. C. Mottram (2022). "3'Nucleotidase/nuclease is required for *Leishmania infantum* clinical isolate susceptibility to miltefosine." *EBioMedicine* 86: 104378.

Carnielli, J. B. T., R. Monti-Rocha, D. L. Costa, A. Molina Sesana, L. N. N. Pansini, M. Segatto, J. C. Mottram, C. H. N. Costa, S. F. G. Carvalho and R. Dietze (2019). "Natural Resistance of *Leishmania infantum* to Miltefosine Contributes to the Low Efficacy in the Treatment of Visceral Leishmaniasis in Brazil." *Am J Trop Med Hyg* 101(4): 789-794.

Croft, S. L. and J. Engel (2006). "Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1: S4-8.

Dorlo, T. P., M. Balasegaram, J. H. Beijnen and P. J. de Vries (2012). "Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis." *J Antimicrob Chemother* 67(11): 2576-2597.

Murray, H. W., J. D. Berman, C. R. Davies and N. G. Saravia (2005). "Advances in leishmaniasis." *Lancet* 366(9496): 1561-1577.

Ponte-Sucre, A., F. Gamarro, J. C. Dujardin, M. P. Barrett, R. López-Vélez, R. García-Hernández, A. W. Pountain, R. Mwenechanya and B. Papadopoulou (2017). "Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge." *PLoS Negl Trop Dis* 11(12): e0006052.

Reimao, J. Q., J. C. Oliveira, C. T. Trinconi, P. C. Cotrim, A. C. Coelho and S. R. Uliana (2015). "Generation of luciferase-expressing *Leishmania infantum* chagasi and assessment of miltefosine efficacy in infected hamsters through bioimaging." *PLoS Negl Trop Dis* 9(2): e0003556.

Sambrook, J. F., E. R.; and Maniatis, T.; (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed.), Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Schwabl, P., M. C. Boité, G. Bussotti, A. Jacobs, B. Andersson, O. Moreira, A. L. FreitasMesquita, J. R. Meyer-Fernandes, E. L. Telleria, Y. Traub-Csekö, S. Vaselek, T. Leštinová, P. Volf, F. N. Morgado, R. Porrozzì, M. Llewellyn, G. F. Späth and E. Cupolillo (2021). "Colonization and genetic diversification processes of *Leishmania infantum* in the Americas." *Commun Biol* 4(1): 139.