

Análise funcional do gene Lanosterol Sintase de *Leishmania amazonensis* na resistência à miltefosina

Palavras-Chave: *Leishmania amazonensis*; resistência aos fármacos; miltefosina

Autores(as):

Ticiane Rodrigues dos Santos, IB– UNICAMP

Victor de Sousa Agostino, IB- UNICAMP

Prof. Dr. Adriano Cappellazzo Coelho, IB- UNICAMP

INTRODUÇÃO:

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas por flebotomíneos. O parasito apresenta duas formas no ciclo de vida: promastigota (alongada e flagelada) e amastigota (intracelular e com flagelo reduzido, localizado no interior do bolso flagelar) (Podinovskaia and Descoteaux 2015). Clinicamente, a doença se manifesta como leishmaniose tegumentar, esta com as seguintes formas clínicas: cutânea localizada, mucocutânea, difusa e disseminada; além da leishmaniose visceral (Silveira 2019). A manifestação clínica da doença depende essencialmente da espécie do parasito e da resposta imunológica do hospedeiro humano.

As espécies de *Leishmania* são divididas em 4 subgêneros: *Leishmania*, *Viannia*, *Sauroleishmania* e *Mundinia*; sendo dois deles, *Leishmania* e *Viannia*, responsáveis pelas formas clínicas da leishmaniose tegumentar e visceral no Brasil (Alvar et al. 2012). No Brasil, há 15 espécies registradas, sendo 8 delas associadas à infecção humana. As espécies causadoras de leishmaniose tegumentar incluem: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) shawii*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenbergi* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Já a espécie *L. (L.) infantum* está associada à leishmaniose visceral (Akhoundi et al. 2016).

Atualmente, os tratamentos para essa doença são limitados. No Brasil, apenas três opções de fármacos estão disponíveis: o antimonial pentavalente, a anfotericina B e a pentamidina. Esses fármacos são de alto custo e de administração via parenteral. Recentemente, a miltefosina (MF) foi aprovada no país como o primeiro fármaco de administração por via oral para o tratamento das leishmanioses.

A MF é um análogo de fosfatidilcolina desenvolvido inicialmente como um antitumoral, e que apresentou eficácia de 90% para pacientes com leishmaniose visceral em países do Sudeste Asiático (Jha et al. 1999). No Brasil, estudos clínicos mostraram uma eficácia de 70% em pacientes com leishmaniose cutânea localizada, resultado superior à eficácia do antimonial pentavalente, fármaco de primeira escolha no país (Machado et al. 2010). Devido a limitação de fármacos disponíveis, as taxas significativas de falhas no tratamento, podendo estar associado à resistência do parasito, o tratamento das leishmanioses constitui-se um importante problema de saúde pública (Uliana et al. 2018). (Fairlamb et al. 2016).

Recentemente, o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Adriano C. Coelho sequenciou o genoma de uma linhagem de *L. amazonensis* resistente à miltefosina (MF150.3), gerada *in vitro* por pressão seletiva do fármaco (Coelho et al. 2014). A partir da análise deste genoma realizada em projeto anterior (Bolsista PIBIC – Processo 122000/2023-4), foram identificadas e validadas algumas mutações em genes potencialmente envolvidos na resistência à MF. Entre

esses genes, foi identificada uma mutação heterozigótica no gene (LAMA_060012000) que codifica a enzima Lanosterol Sintase (LS). Essa enzima atua na síntese de lanosterol, precursor do ergosterol, que é o principal componente da membrana do parasito, diferentemente dos mamíferos cujo principal lipídio da membrana plasmática do parasito é o colesterol (de Souza and Rodrigues 2009). A enzima LS é uma oxidosqualeno ciclase que converte 2,3-oxidosqualeno em um cátion protosterol e, finalmente, em lanosterol. Foi demonstrado recentemente que esta enzima é alvo de benzotiofenos, compostos com atividade anti-*Leishmania* (Paradela et al. 2021). Neste projeto de pesquisa propomos caracterizar funcionalmente o papel desta enzima no fenótipo de resistência à MF, por meio de técnicas de engenharia genética como superexpressão e nocaute gênico.

METODOLOGIA:

Cultivo de promastigotas de *L. amazonensis*

Promastigotas da cepa *L. amazonensis* (MHOM/BR/1973/M2269), assim como da linhagem transgênica expressora da enzima Cas9, e a linhagem resistente MF150.3 foram cultivados em meio 199 (Sigma-Aldrich) complementado com HEPES 40 mM, pH 7,4, adenina 0,1mM, hemina 0,005%, suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado e estéril, e 100 µg/mL de penicilina/estreptomicina mantidos em estufa a 25°C (Kapler, Coburn, and Beverley 1990).

Extração de DNA genômico da linhagem M2269

Cerca de 1×10^8 promastigotas foram lavados com PBS estéril após centrifugação (3000 rpm por 10 min). A seguir, 1 mL de DNAzol foi adicionado, seguido de 1 mL de etanol 99%, com homogeneização por inversão, para lise celular e precipitação do DNA genômico. Este foi recuperado com uma alça de plástico, lavado duas vezes com etanol 70% e transferido para um microtubo para secagem. Finalmente, o DNA foi solubilizado com água Milli-Q, quantificado por absorvância e armazenado a 4°C.

Amplificação por reação em cadeia da polimerase (PCR)

A técnica de PCR foi utilizada para amplificar a fase de leitura aberta do gene *LS* para posterior clonagem em vetor de expressão, e dos cassetes de reparo e os sgRNAs utilizados para o nocaute gênico do gene *LS*, utilizando a tecnologia de CRISPR/Cas9 (Beneke et al. 2017). Para amplificação do gene *LS*, utilizou-se como molde o DNA genômico extraído previamente. Os primers foram desenhados utilizando o software Primer3 (Untergasser et al. 2012) com adição dos sítios de restrição *HindIII* e *XbaI*, na porção 5' dos primers sense e anti-sense respectivamente. A amplificação dos cassetes de reparo para nocaute gênico foi feita a partir dos plasmídeos pTNEO e pTBLAST, com primers obtidos através das plataforma LeishGEdit (Beneke et al. 2017). Já os sgRNA foi amplificado utilizando o primer G00 como molde, além dos iniciadores obtidos via LeishGEdit (<http://www.leishgedit.net/Home.html>). Para as reações de PCR foi utilizada a enzima *Phusion High-Fidelity* (New England Biolabs) conforme a descrição do fabricante. Os produtos das amplificações foram analisados em uma eletroforese em gel de agarose 1%.

Clonagem do gene *LS* em vetor de expressão

Para a clonagem, foi utilizado o plasmídeo pSPNEO, que se replica em *Escherichia coli* e *Leishmania* sp., contendo os genes de resistência aos antibióticos ampicilina e G418 (Coelho et al. 2007). O gene amplificado e o vetor foram digeridos com as enzimas de restrição *XbaI* e *HindIII*, purificados e ligados na proporção 3:1 com a enzima T4 DNA ligase (*Invitrogen*). A ligação foi incubada a 14°C por 16h, seguido da precipitação do DNA e ressuspensão em água Milli-Q. A transformação em *E. coli* foi feita por choque térmico, seguida de recuperação em LB e plaqueamento em meio LB sólido contendo ampicilina. A extração do plasmídeo recombinante foi realizada com o kit *PureLink Quick Miniprep* (Thermo Fisher Scientific).

Nocaute do gene *LS* em *L. amazonensis*

Os cassetes para transcrição dos sgRNAs *in vivo* e os cassetes de reparo foram transfectados em uma linhagem transgênica de *L. amazonensis* expressando as enzimas Cas9 e T7 RNA polimerase. Para cada transfecção, utilizou-se aproximadamente 4×10^7 promastigotas em fase logarítmica, os quais foram lavados com tampão Tb-BSF, e ressuspensos em 150 μ L deste tampão contendo o DNA precipitado. Essa solução foi transferida para a cubeta de transfecção Gene Pulser com intervalo de 0,4 cm (*BioRad*) e a eletroporação foi realizada no aparelho *Gene Pulser Xcell* (*BioRad*) com dois pulsos, utilizando o protocolo *high-voltage* (25 μ F e 150 V) (Robinson and Beverley 2003). O controle negativo foi preparado com uma suspensão de parasitos em Tb-BSF em ausência de DNA. Os parasitos eletroporados foram transferidos para uma garrafa de cultura contendo 5 mL de M199 e mantidos em estufa a 25°C. Depois de 24 horas, foram adicionados mais 5 mL de M199, além dos antibióticos para seleção dos parasitos resistentes, contendo os genes neomicina fosfotransferase (NEO) e blasticidina-s deaminase (BLAST) (300 μ g/mL de paromomicina e 10 μ g/mL de blasticidina). Após 72 horas, os parasitos foram subcultivados e a seleção dos parasitos viáveis estava em andamento, até a submissão deste resumo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Clonagem do gene *LS* em vetor de expressão

A ligação do inserto contendo o gene *LS* no vetor pSPNEO foi simulada *in silico* e está representada na Figura 1 para facilitar a visualização do processo.

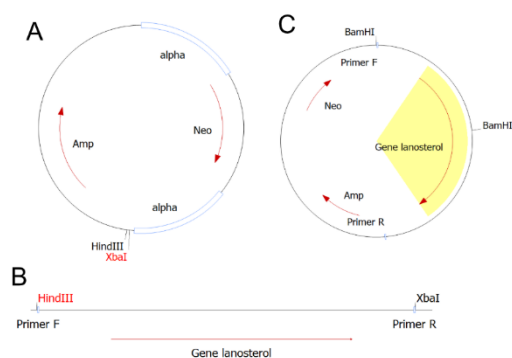


Figura 1: Simulação *in silico* da ligação do inserto (gene *LS*) no vetor (pSPNEO) com os respectivos sítios de restrição para a digestão, além dos sítios da enzima de restrição *Bam*HI, utilizados para a confirmação da clonagem do gene *LS* no vetor de expressão. Legenda: (A) plasmídeo pSPNEO; (B) mapa do gene *LS* com os primers e sítios de restrição indicados; (C) molécula resultante da clonagem do gene *LS* no vetor de expressão pSPNEO.

O gene *LS* foi amplificado por PCR contendo os respectivos sítios de restrição conforme descrito previamente e o resultado está indicado na Figura 2. Após a amplificação do gene, o produto foi purificado.

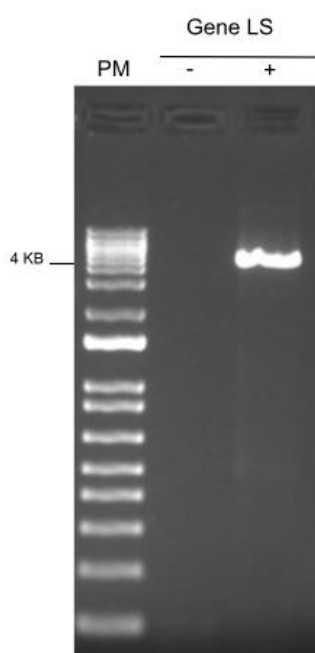


Figura 2: Amplificação do gene *LS*. O produto da amplificação é de 4.724 pb. Legenda: (-) PCR na ausência de DNA genômico; (+) PCR com DNA genômico de *L. amazonensis*; (PM) peso molecular Ladder 1kb; (kb) kilobase.

Após a digestão do vetor e do inserto contendo o gene *LS* com as enzimas *Xba*I e *Hind*III, estes foram ligados e as bactérias foram transformadas e plaqueadas em presença de ampicilina. Foram obtidas 7 colônias recombinantes para a extração do DNA plasmidial. Para a confirmação da ligação, foi utilizada a enzima *Bam*HI, que resultaria no seguinte padrão de duas bandas: 7,4 kb e 2,2 kb (Figura 3). Caso a ligação não tenha ocorrido, uma única banda de 5 kb, correspondente ao plasmídeo linear seria visualizada.

Figura 3: Perfil de digestão com *Bam*HI dos plasmídeos obtidos das bactérias recombinantes provenientes da ligação do gene *LS* no vetor pSPNEO. PM, peso molecular: Ladder 1kb.

A Figura 3 mostra que de fato não houve ligação do vetor ao inserto. Algumas outras tentativas foram realizadas adaptando o protocolo, como a proporção inserto: vetor, mas ainda assim não obtivemos sucesso até o momento em relação à clonagem do gene *LS*.

Geração de uma linhagem nocaute para o gene *LS* de *L. amazonensis*

A amplificação dos DNAs de reparo contendo os genes de resistência aos antibióticos blasticidina e os aminoglicosídeos G418 e paromomicina, assim como os moldes para transcrição *in vivo* dos sgRNAs foram bem-sucedidas, e prosseguimos com a transfecção dos parasitos. Até o momento, foi feito o primeiro subcultivo 72h após a transfecção e os parasitos estão sendo selecionados na presença dos respectivos antibióticos. Foi possível observar também a seleção de parasitos na presença de um único antibiótico (blasticidina ou paromomicina).

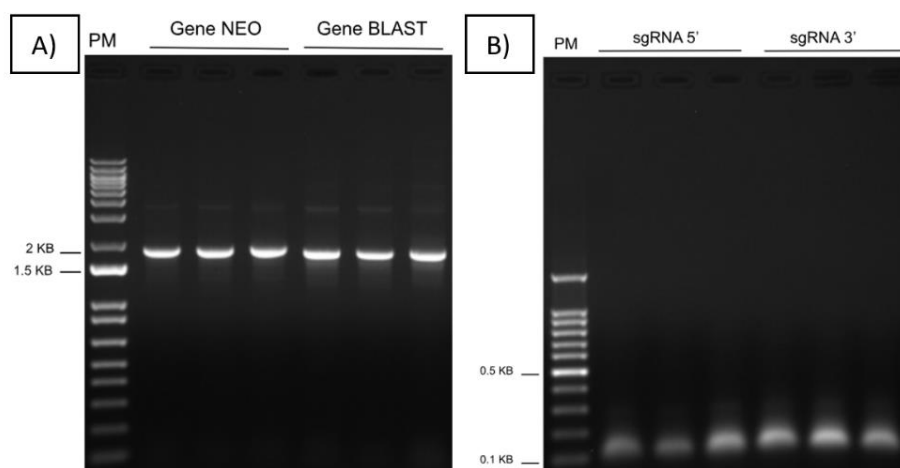
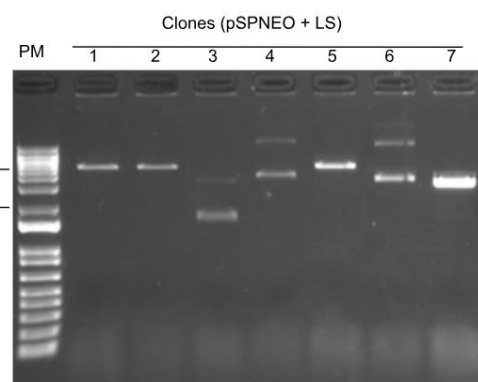


Figura 4: (A) Amplificação por PCR dos cassetes de reparo contendo os genes de resistência NEO de 1756 pb e BLAST de 1.722 pb. **(B)** Amplificação por PCR dos cassetes para a transcrição dos sgRNAs de aproximadamente de 120 pb. Legenda: PM, peso molecular: Ladder 1kb.

CONCLUSÕES:

Considerando o papel fundamental da *LS* na produção do ergosterol, a investigação do seu papel na resistência à miltefosina permanece

como o foco principal dos nossos esforços. Até o momento, não foi possível realizar a clonagem do gene *LS* no vetor de expressão pSPNEO. Contudo, outras estratégias como a clonagem independente de ligase (LIC) estão atualmente em andamento. Em paralelo, a geração de parasitos nocauteados para o gene *LS* está em andamento, e contribuirá na elucidação do papel desta enzima no fenótipo de resistência à MF em *L. amazonensis*.

BIBLIOGRAFIA:

- Akhoundi, M., K. Kuhls, A. Cannet, J. Votypka, P. Marty, P. Delaunay, and D. Sereno. 2016. 'A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of Leishmania Parasites and Sandflies', *PLoS Negl Trop Dis*, 10: e0004349.
- 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: e35671.
- Beneke, T., R. Madden, L. Makin, J. Valli, J. Sunter, and E. Gluenz. 2017. 'A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids', *R Soc Open Sci*, 4: 170095.
- Coelho, A. C., N. Messier, M. Ouellette, and P. C. Cotrim. 2007. 'Role of the ABC transporter PRP1 (ABCC7) in pentamidine resistance in Leishmania amastigotes', *Antimicrob Agents Chemother*, 51: 3030-2.
- Coelho, A. C., C. T. Trinconi, C. H. Costa, and S. R. Uliana. 2014. 'In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a Leishmania amazonensis isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis', *PLoS Negl Trop Dis*, 8: e2999.
- de Souza, W., and J. C. Rodrigues. 2009. 'Sterol Biosynthesis Pathway as Target for Anti-trypanosomatid Drugs', *Interdiscip Perspect Infect Dis*, 2009: 642502.
- Jha, T. K., S. Sundar, C. P. Thakur, P. Bachmann, J. Karbwang, C. Fischer, A. Voss, and J. Berman. 1999. 'Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis', *N Engl J Med*, 341: 1795-800.
- Kapler, G. M., C. M. Coburn, and S. M. Beverley. 1990. 'Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression', *Mol Cell Biol*, 10: 1084-94.
- Machado, P. R., J. Ampuero, L. H. Guimaraes, L. Villasboas, A. T. Rocha, A. Schriefer, R. S. Sousa, A. Talhari, G. Penna, and E. M. Carvalho. 2010. 'Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania

- braziliensis in Brazil: a randomized and controlled trial', *PLoS Negl Trop Dis*, 4: e912.
- Paradela, L. S., R. J. Wall, S. Carvalho, G. Chemi, V. Corpas-Lopez, E. Moynihan, D. Bello, S. Patterson, M. L. S. Güther, A. H. Fairlamb, M. A. J. Ferguson, F. Zuccotto, J. Martin, I. H. Gilbert, and S. Wyllie. 2021. 'Multiple unbiased approaches identify oxidosqualene cyclase as the molecular target of a promising anti-leishmanial', *Cell Chem Biol*, 28: 711-21.e8.
- Podinovskaia, M., and A. Descoteaux. 2015. 'Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction', *Future Microbiol*, 10: 111-29.
- Robinson, K. A., and S. M. Beverley. 2003. 'Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*', *Mol Biochem Parasitol*, 128: 217-28.
- Silveira, F. T. 2019. 'What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniasis so clinically and immunopathologically different? A review in Brazil', *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 113: 505-16.
- Uliana SRB, Trinconi CT, Coelho AC. Chemotherapy of leishmaniasis: present challenges. *Parasitology*. 2018 Apr;145(4):464-480.
- Untergasser, A., I. Cutcutache, T. Koressaar, J. Ye, B. C. Faircloth, M. Remm, and S. G. Rozen. 2012. 'Primer3--new capabilities and interfaces', *Nucleic Acids Res*, 40: e115.