

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE BOTUCATU (IBTEC)

Isabela Gasetta Ferraz Paiva

Avaliação da variante alélica (L162V) do gene PPARA humano na modulação de genes chave relacionados a interação parasito-hospedeiro em células THP-1.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-Orientador: Diego Peres Alonso

Botucatu
Março de 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JULIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA DE BOTUCATU (IBTEC)

Isabela Gasetta Ferraz Paiva

Avaliação da variante alélica (L162V) do gene PPARA humano na modulação de genes chave relacionados a interação parasito-hospedeiro em células THP-1.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção de título de Mestre pelo programa de pós graduação Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Unesp de Botucatu.

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla

Co-Orientador: Diego Peres Alonso

Botucatu
Março de 2021

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Paiva, Isabela Gasetta Ferraz.

Avaliação da variante alélica (L162V) do gene PPARA humano na modulação de genes chave relacionados a interação parasito-hospedeiro em células THP-1 / Isabela Gasetta Ferraz Paiva. - Botucatu, 2021

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Paulo Eduardo Martins Ribolla
Capes: 20202008

1. Leishmaniose visceral. 2. Peroxissomos. 3. Relação hospedeiro-parasito. 4. Receptores nucleares.

Palavras-chave: L162V; Leishmaniose visceral; PPARA; Parasito-hospedeiro.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Paulo Ribolla, que aceitou orientar a minha tese de mestrado, mostrando-se sempre disponível a ajudar. Pelos conselhos, sugestões e por sempre valorizar muito esse trabalho.

À minha mãe, Cristina, incentivadora e colaboradora dos meus estudos, a grande mestra da minha vida, que sempre me impulsionou com palavras de amor, atenção e carinho. Minha inspiração de resiliência e força de vontade.

Às minhas irmãs Aline, Bruna e Manuela e ao meu sobrinho Matheus, que sempre me deram um grande apoio emocional, indispensável na minha jornada.

Ao meu pai, Sebastião, que sempre acreditou em mim e me incentivou em tudo que eu me propunha a fazer e que estaria muito orgulhoso de mim neste momento.

Às minhas amigas de Botucatu, pela convivência fraterna que foi essencial nesse período.

Ao meu co-orientador, Diego Alonso, um agradecimento muito especial pelo seu companheirismo, por sua dedicação, por sua paciência, sempre procurando ensinar e me ajudar a crescer. Por compartilhar comigo todos os momentos desse desafio, por acreditar em mim incondicionalmente e me incentivar em todos os momentos. Por todos os seus ensinamentos e pelo entusiasmo com esse trabalho, que foi essencial para os resultados obtidos.

Agradeço a CAPES e a Fapesp pelo apoio científico e financeiro que possibilitou execução deste projeto, através da bolsa de mestrado, processo: 2017/25854-3.

“TORNAMOS NOSSO MUNDO SIGNIFICATIVO PELA CORAGEM
DAS NOSSAS PERGUNTAS E PELA PROFUNDIDADE DAS NOSSAS
RESPOSTAS”

CARL SAGAN

RESUMO

Os receptores ativados da proliferação de peroxissomos (PPARs) compõem uma subfamília de receptores nucleares. Três isoformas, codificadas por genes separados, foram identificadas até então: PPARA (Alfa, α), PPARB (beta, β/δ) e PPARG (gama, γ). Esses receptores, que agem como fatores de transcrição, exibem diferentes funções e distribuições nos tecidos. Até o presente momento, sabe-se que os genes regulados pelos PPARs participam principalmente da regulação de proteínas chave, envolvidas no metabolismo intra e extracelular de lipídeos, oxidação de ácidos graxos e processos inflamatórios. O PPARA, em especial, é expresso em vários tecidos metabolicamente ativos, incluindo fígado, rim, coração, músculo esquelético, tecido adiposo e nos macrófagos que além de fazerem parte do sistema imunológico, possuem um papel importante no metabolismo lipídico. Pela sua influência na regulação lipídica e pelo fato da sua atividade ser facilmente modulada por drogas sintéticas, o PPAR α é considerado um alvo muito importante para o tratamento eficaz das dislipidemias. Desordens lipídicas têm sido relatadas em pacientes humanos e até mesmo em cães domésticos com Leishmaniose Visceral (LV) ativa. A LV no Brasil é uma doença parasitária causada pela infecção de macrófagos do hospedeiro pelo protozoário *Leishmania infantum* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis*, tendo como principais reservatórios os canídeos selvagens e cães domésticos. Nesse contexto, o PPAR α pode-se mostrar como um possível gene candidato a contribuir com o risco geneticamente determinado da LV. Em um estudo caso-controle realizado pelo nosso grupo na área endêmica de Teresina-PI genótipos contendo o alelo mutado 162V foram significativamente mais freqüentes entre indivíduos com LV do que entre todos os indivíduos não infectados ($p= 0.007$). Além disso indivíduos sadios possuindo pelo menos um alelo mutado 162V, apresentam quase quatro vezes mais chances de contrair a doença do que indivíduos que não possuem a mutação (razão de chances 3,91 e intervalo de confiança 1,38-11,07). O presente projeto tem por objetivo utilizar a tecnologia CRISPR-Cas9 para a geração de macrófagos geneticamente modificados para conter a mutação L162V do gene PPARA humano, com o intuito de avaliar o papel da variante alélica L162V do gene PPAR α no estabelecimento e desenvolvimento da Leishmaniose Visceral.

ABSTRACT

Activated peroxisome proliferation receptors (PPARs) make up a subfamily of nuclear receptors. Three isoforms, encoded by separate genes, were identified so far: PPARA, PPARG and PPARG. These receptors, which act as transcription factors, exhibit different functions and distributions in tissues. To date, it has been known that the genes regulated by PPARs participate mainly in the regulation of key proteins, involved in the intra- and extracellular metabolism of lipids, oxidation of fatty acids and inflammatory processes. PPARA is expressed in several metabolically active tissues, including liver, kidney, heart, skeletal muscle, adipose tissue, and macrophages that play an important role in lipid metabolism as well as being part of the immune system. Due to its influence on lipid regulation and the fact that its activity is easily modulated by synthetic drugs, PPARA is considered a particularly important target for the effective treatment of dyslipidemias. Lipid disorders have been reported in human patients and even in dogs with active Visceral Leishmaniasis (VL). VL in Brazil is a parasitic disease caused by infection of host macrophages by the protozoan *Leishmania infantum* and transmitted by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*, with wild canids and domestic dogs as its main reservoirs. In this context, PPARA might be a possible candidate gene to contribute to the genetically determined risk of VL. In a case-control study conducted by our group in the endemic area of Teresina-PI genotypes containing the mutated 162V allele were significantly more frequent among individuals with VL than among all uninfected individuals ($p = 0.007$). In addition healthy individuals having at least one mutated 162V allele are nearly four times more likely to contract the disease than individuals who do not have the mutation (odds ratio 3.91 and confidence interval 1.38-11.07) The present project aims to use CRISPR-Cas9 technology for the generation of genetically modified macrophages to contain the human PPARA gene L162V mutation for in vitro infection assays with *Leishmania infantum* as well as an overall analysis of the gene expression profile of the modified cells with the purpose of evaluating the role of the L162V allelic variant of the PPARA gene in the establishment and development of Visceral Leishmaniasis The present project aims to use CRISPR-Cas9 technology for the generation of genetically modified macrophages to contain the L162V mutation of the human PPARA gene, in order to evaluate the role of the allelic variant L162V of the PPARA gene in the establishment and development of Visceral Leishmaniasis.

Lista de Figuras

Figura 01 – Mapa do Brasil mostrando áreas com maior concentração de casos de LV no Brasil em 2015.....	15
Figura 02 – Ciclo de vida da <i>L. infantum</i>	17
Figura 03. Esquema com as principais etapas experimentais.....	37
Figura 04 – Região de amplificação por PCR do gene PPARA.....	38
Figura 05 – Gel dos produtos de amplificação por PCR do fragmento parcial do gene PPARA humano.....	38
Figura 06 – Mapa do vetor Puc19hPAPARA.....	39
Figura 07 – Gel dos produtos de amplificação por PCR do fragmento de 1800pb.....	40
Figura 08 – Sequenciamento Sanger realizado após às mutações sítio dirigidas.....	41
Figura 09 – Mapa do constructo Puc19hPAPARAMutLV+PAM-NEO (final).....	42
Figura 10 – Teste de clivagem do RNA guia.....	43
Figura 11 – Gel da digestão dos plasmídeos CTL + PAM e MUTLV + PAM.....	44
Figura 12 – Esboço do tamanho dos fragmentos.....	45
Figura 13 – Gel de eletroforese para checar o tamanho dos fragmentos.....	46
Figura 14 – PCR diagnóstico para confirmar a presença do cassete de neomicina no genoma das células THP-1 controles (CTL) e mutadas (MUT).....	48
Figura 15 – PCR com os primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> do cassete de neomicina.....	48
Figura 16 – Sequenciamento da região da mutação L162V no éxon 5.....	49
Figura 17 – Análise de Componentes Principais (PCA).....	50
Figura 18 – Diagrama de Venn e Gráfico de barras.....	51
Figura 19 – Análise de enriquecimento funcional de vias.....	52

Lista de tabelas

Tabela 1. Vias diferencialmente expressas na comparação CTL x MUT.....	53
Tabela 2. Vias diferencialmente expressas na comparação WT x MUT.....	54
Tabela 3. Vias diferencialmente expressas na comparação WT x CTL.....	55

Lista de abreviaturas:

ApoE - Apolipoproteína E

BP – Processos Biológicos

BWA – Burrows-Wheeler Aligner

CRISPR – Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas

crRNAs – CRISPR-RNAs

CTL – Controle

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

dsDNA – DNA de dupla fita

FDR – *False Discovery Rate*

FBS – Soro Fetal Bovino

gDNA – DNA genômico

GFF - Gene-Finding Format

HDL - Lipoproteína de alta densidade

KEGG - Enciclopédia Genes e Genomas de Kyoto

LDL – Lipoproteína de baixa densidade

LEU – Leucina

LV – Leishmaniose Visceral

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

MUT – Mutado

NGS – Sequenciamento de Nova Geração

NT – *Neutralize Tagment Buffer*

PAM – *Protospacer Adjacent Motif*

PCA – Análise de Componentes Principais

PCR – Reação em Cadeia da Polimerase

PPAR – Receptores ativados da proliferação de peroxissomos

PPARA – Receptores ativados da proliferação de peroxissomos alfa

pUC19 - Vetor de clonagem de plasmídeos

RNA – Ácido Ribonucleico

RNPs – Complexo de ribonucleoproteínas

RPMI – Meio *Roswell Park Memorial Institute*

sgRNA – RNA guia

TG – Triglicérides

THP-1 – Linhagem celular imortalizada de macrófagos humanos

tracrRNA – RNA de transativação

TrisHCl - Tris(hidroximetil)aminometano ácido clorídrico

VAL – Valina

VLDL - Lipoproteínas de densidades muito baixas

WT – Selvagem

Sumário

INTRODUÇÃO	14
Leishmaniose Visceral (LV)	14
Características Epidemiológicas da LV no Brasil	15
Ciclo da <i>L. infantum</i>	16
Níveis Lipídicos Séricos e Leishmaniose Visceral	18
Receptores ativados da proliferação de peroxissomos (PPARs) como alvos terapêuticos adjuvantes na Leishmaniose Visceral	20
CRISPR/CAS9 como ferramenta de manipulação genômica baseada em recombinação homóloga	23
OBJETIVO	24
MATERIAL E MÉTODOS	25
Preparação da amostra e extração de DNA	25
Digestão com EcoRI e Hind III	25
Ligação do inserto (produto de PCR) no vetor (pUC19)	26
Transformação do produto de ligação em células DH5-alfa competentes	26
Minipreparação de plasmídeo pelo método de lise alcalina	26
Confirmação da Clonagem	27
Mutação sítio-dirigida	28
Clonagem do cassete de resistência a Neomicina no Plasmídeo Puc19hPAPARAMut+PAM29	
Confirmação da Sequência de DNA do Vetor por Illumina Next Generation Sequencing (NGS)	30
Transcrição <i>in vitro</i> do sgRNA	32
Digestão do DNA molde	32
Cultura de células THP-1	33
Curva de resistência a Neomicina	33
Ensaio de MTT	33
Lipofecção das células THP-1	34
Eletroporação das células THP-1	34
Verificação da edição do genoma das células THP-1	35
Transcriptoma	35
Processamento de dados de RNA-Seq e análise de expressão diferencial de genes	36
Análises de <i>Gene ontology</i> e anotação de vias	36
RESULTADOS	37
Fluxograma com as principais etapas experimentais	37
Construção do DNA molde para a recombinação homóloga	37
PCR para amplificação parcial do gene PPARA humano	38
Mapa do constructo Puc19hPPARA	39
Confirmação da Clonagem	39
Mutação sítio-dirigida	40
Clonagem do cassete de resistência a Neomicina no Plasmídeo Puc19hPAPARAMut+PAM42	
Teste de clivagem do RNA guia com a enzima cas9	43
Digestão do Plasmídeo com NdeI e PmeI	44
Ensaio de lipofecção	44
Eletroporação das células THP-1	47

Estudo do perfil global de expressão gênica das THP-1 modificadas com a variante L162V	49
DISCUSSÃO	56
CRISPR-cas9 como ferramenta para produzir <i>knock-in</i> em células THP-1.....	56
Análise de expressão gênica nas células THP-1 modificadas com a variante L162V	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

INTRODUÇÃO

Leishmaniose Visceral (LV)

A epidemiologia das leishmanioses é extremamente diversa: 20 espécies de *Leishmania spp.* são patogênicas para o homem, e 30 espécies de flebotomíneos são vetoras. Existem duas classificações epidemiológicas para a doença: zoonose, que inclui animais hospedeiros como reservatórios no ciclo de transmissão, e antroponose, na qual o homem é a única fonte de infecção para o mosquito vetor. (Desjeux, 2004). O parasito é encontrado em 88 países do mundo, principalmente na África, América do Sul e Central, Ásia e Sul da Europa, sendo que 90% das infecções potencialmente fatais ocorrem em somente seis países: Brasil, Etiópia, Sudão, Sudão do Sul, Índia e Bangladesh. (Pigott et al., 2014)

As leishmanioses são divididas em três condições médicas que envolvem patologia mucosa, cutânea ou visceral. Praticamente toda a mortalidade associada às leishmanioses resulta de doença visceral. (Alvar et al., 2012). Dessa forma, dentre todas as formas clínicas a mais severa é a leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar ou febre dum-dum, tem um período de incubação variável e os sintomas iniciais incluem: febre intermitente, mal estar e tremores. A doença manifesta-se por esplenomegalia que pode ser acompanhada de hepatomegalia. (Rodrigues, Cordeiro-Da-Silva, Laforge, Silvestre, & Estaquier, 2016).

Existem dois tipos de LV, que se diferenciam nas características de transmissão: A LV zoonótica é transmitida do reservatório animal, principalmente o cão doméstico, para o inseto vetor e desse para o homem, e a LV antroponótica é transmitida do homem para o inseto vetor e desse novamente para o homem. Duas espécies do complexo donovani transmitem a doença: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (Ready, PD., 2014). A LV zoonótica ocorre onde há transmissão de *L. infantum*; enquanto que a LV antroponótica é transmitida por *L. donovani* (Brazil, 2013).

A doença é transmitida aos seres humanos pela picada de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. O *Lutzomyia longipalpis*, é o principal vetor de LV na América Latina, tem uma ampla gama de distribuição que se estende do México ao Uruguai. (Lainson & Rangel, 2005), (Brazil, 2013).

Características Epidemiológicas da LV no Brasil

Os principais reservatórios que participam do ciclo zoonótico da LV são canídeos selvagens e cães domésticos, a região nordeste é a mais afetada, com 50% dos 3 a 4 mil casos anuais do país. A doença, que era tipicamente rural, a partir de 1980 passou a ser responsável por epidemias urbanas, inicialmente em Teresina – PI e em São Luís – MA. Atualmente a LV se acha distribuída em vários estados, tais como: Mato grosso do Sul, Minas gerais e São Paulo, com epidemias que atingem cidades do porte de Campo Grande – MS, Belo Horizonte – MG, Araçatuba e Bauru – SP. (Ministério da Saúde, 2016).

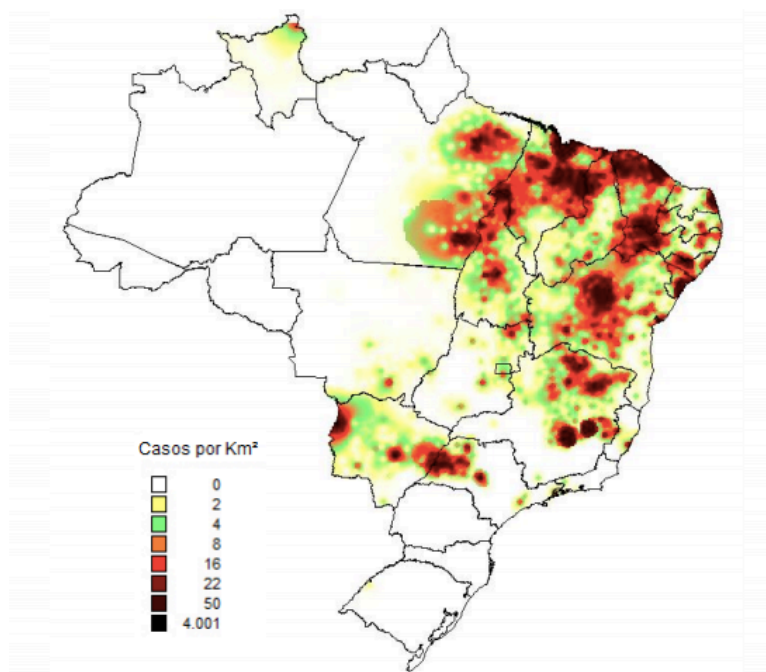


Figura 01. Mapa do Brasil mostrando áreas com maior concentração de casos de LV no Brasil em 2015. (Ministério da Saúde, 2016).

O panorama epidemiológico não deixa dúvida quanto à severidade da situação e da distribuição geográfica da LV. De 1980 até 2008, mais de 70.000 casos de LV foram reportados no Brasil, com 3.800 mortes. O número médio de casos por ano aumentou de 1.601 (1985 - 1989) para 3630 (2000-2004), mantendo a média desde então. Na década de 1990, apenas 10% dos casos ocorriam fora da região Nordeste, mas em 2007 a proporção alcançou 50% dos casos. De 2006 até 2008, a transmissão autóctone da LV

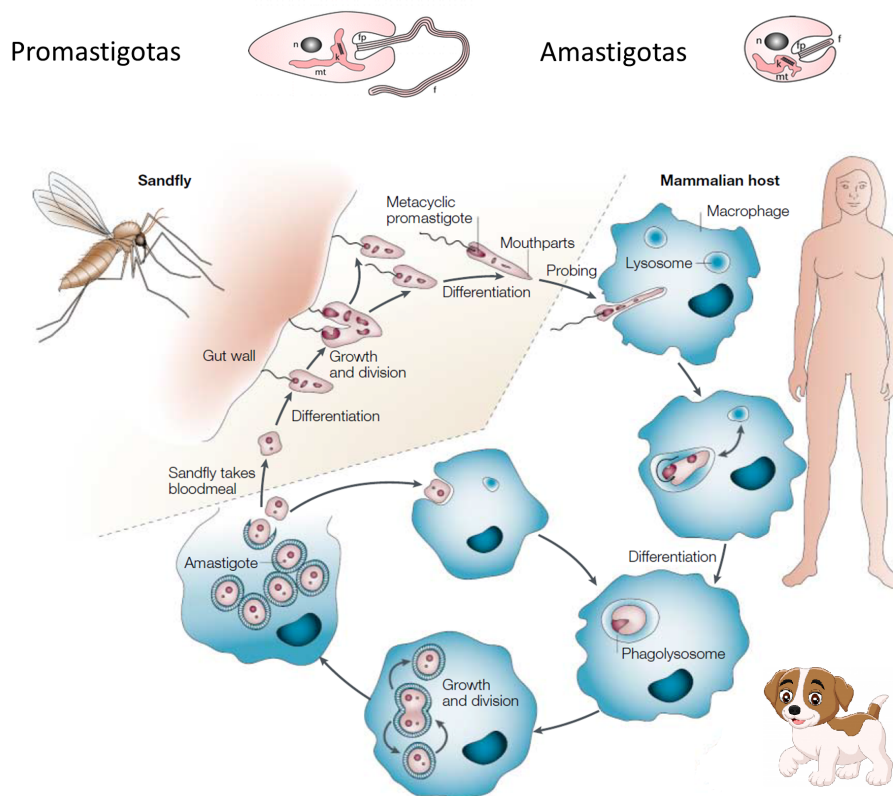
foi reportada em mais de 1200 municípios em 21 estados da Federação. (Werneck, 2008).

Especificamente no estado de São Paulo vem se verificando um processo de expansão da doença, à medida que se constata a adaptação do vetor em zonas urbanas (Camargo - Neves & Gomes 2002). A doença em cães, desde o primeiro registro da sua ocorrência, já foi notificada em 34 municípios, ocorrendo em seis regiões administrativas: Araçatuba, Bauru, Marília, Presidente Prudente, Grande São Paulo e São João da Boa Vista. Em seres humanos, até junho de 2006, a doença já havia sido registrada em 34 municípios das regiões de Araçatuba, Bauru, Marília e Presidente Prudente (Secretaria da Saúde do Estado de São Paulo, 2006).

Ciclo da *L. infantum*

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas da *Leishmania*. No trato digestivo anterior do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos liberando essas formas. Reproduzem-se por divisão binária e diferenciam-se rapidamente em formas flageladas denominadas de promastigotas, que também se reproduzem por processos sucessivos de divisão binária. As formas promastigotas transformam-se em paramastigotas as quais colonizam o esôfago e a faringe do vetor, onde permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo, quando se diferenciam em formas infectantes - promastigotas metacíclicas. O ciclo do parasito no inseto se completa em torno de 72 horas. Após este período, as fêmeas infectantes ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado liberam as formas promastigotas metacíclicas juntamente com a saliva do inseto. Na epiderme do hospedeiro, estas formas são fagocitadas por células do sistema mononuclear fagocitário. No interior dos macrófagos diferenciam-se em amastigotas multiplicam-se até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então a disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Ministério da Saúde, 2016).

Ciclo de vida da *L. infantum*



Adaptado de Sacks and Noben-Trauth, 2002

Figura 02. Ciclo de vida da *L. infantum*. Os parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos pelas picadas de flebotomíneos infectados, que injetam um pequeno número de promastigotas metacíclicas em estágio infeccioso na pele. Essas formas são eficientemente opsonizadas por componentes séricos e absorvidas por macrófagos, onde residem em fagolisossomos e se transformam em amastigotas replicantes. Macrófagos infectados são captados por flebotomíneos durante o repasto sanguíneo; e são lisados no intestino médio da mosquito, liberando parasitas que se transformam em promastigotas de estágio não infeccioso de divisão rápida. Essas formas passam por um processo de fixação à parede do intestino médio, liberação e migração em direção ao intestino anterior que é acompanhada por sua diferenciação para promastigotas metacíclicas que podem ser transmitidos ao próximo hospedeiro quando o mosquito faz a próxima alimentação com o sangue do hospedeiro. (Sacks & Noben-Trauth, 2002).

Níveis Lipídicos Séricos e Leishmaniose Visceral

Além de toda a sintomatologia clássica da doença, interessante, distúrbios lipídicos têm sido relatados em pacientes humanos e até mesmo em cães domésticos com LV ativa. O perfil lipídico na maioria dos casos é caracterizado por altos níveis séricos de triglicérides (TG), com aumento de apolipoproteína E (apoE); que desempenha um papel fundamental no metabolismo de colesterol e TG, pois é responsável pelo “clearance” de lipoproteínas remanescentes ao se ligar a receptores específicos de apoE no fígado; e altos níveis de lipoproteínas de densidades muito baixas (VLDL); por outro lado, são relatados baixos níveis de colesterol total (TC), baixos níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e baixos níveis de lipoproteínas de alta densidade (HDL) (Bekaert et al., 1989; Bekaert et al., 1992; Nieto et al., 1992; Liberopoulos et al., 2002; Lal et al., 2007).

Uma provável explicação para esses achados seria a maior dependência de lipídeos e proteínas como fonte de energia das formas amastigotas do parasita dentro dos macrófagos infectados (Rosenzweig et al., 2008) e que a presença de colesterol é importante para a infecção dos macrófagos pelo parasita (Pucadyil et al., 2004). Nesse contexto, parâmetros que modulam os níveis de TG, lipoproteínas e apoE são de grande interesse em pacientes com LV.

Um estudo-caso controle foi realizado pelo nosso grupo na área endêmica de LV em Teresina – PI, envolvendo 156 indivíduos. Nesse trabalho, foram analisados os perfis lipídicos, polimorfismos no intron 8 e intron 6 no gene que codifica a lipoproteína lipase (LPL) e polimorfismos que estão relacionados as três isoformas principais (apoE2, apoE3, e apo E4) no gene que codifica a apolipoproteína E (apoE) em pacientes com LV ativa, pacientes infectados e assintomáticos e indivíduos não infectados. Além disso, foi realizado um estudo in vitro de interação parasita-macrófago para avaliar o efeito de VLDL, HDL e LDL na infecção de *Leishmania infantum* chagasi em macrófagos peritoniais de camundongo (Carvalho et al., 2014).

Os resultados mostraram um aumento de TG e VLDL e redução de HDL em pacientes infectados; além disso, a mutação do intron 8 do gene da LPL e o alelo E2 da apoE estão significativamente relacionadas com essa alteração nos níveis séricos lipídicos. A análise multivariada, usando indivíduos não infectados como controle, mostra que a proteção contra a LV está significativamente associada com a presença do

genótipo selvagem em homozigose para a mutação no intron 8 do gene da LPL (OR, 0.2; 95% CI, 0.15-0.64; $p=0.003$) e com o genótipo apoE3 em homozigose (OR, 0.3; 95% CI, 0.08-0.94; $p=0.039$). Por outro lado, a presença do genótipo mutado em homozigose para a mutação no intron 8 do gene da LPL (OR, 3.7; 95% CI, 1.67-12.10; $p=0.014$) e níveis elevados de VLDL (OR, 18.5; 95% CI, 1.75- 29.55; $p=0.015$) estão fortemente associados com a susceptibilidade para LV. Além disso, o resultado do estudo de infecção de macrófagos por *L. infantum* claramente mostrou um número significativamente maior de parasitas fagocitados por macrófagos (até 47%), quando estes foram incubados com VLDL (Carvalho et al., 2014).⁸

O conjunto de dados obtidos nesse trabalho, claramente mostra a importância e a relação de níveis lipídicos séricos alterados na infecção por *L. infantum*. Mais que isso, mostra que os genes da LPL e da apoE estão envolvidos com esse fenótipo lipídico alterado.

A relação entre os níveis lipídicos séricos, principalmente em relação ao colesterol, e a infecção por *Leishmania* evidencia peculiaridades ainda mais interessantes quando analisamos mais de perto a relação parasito- macrófago infectado.

A entrada de *Leishmania* envolve, de uma maneira geral, interações com a membrana plasmática da célula hospedeira, sendo o colesterol um de seus principais constituintes. Uma das funções essenciais do colesterol é a manutenção de domínios especializados na membrana das células, chamados “lipid rafts”. Esses domínios são distribuídos de maneira não-aleatória na membrana celular e são ricos em colesterol e esfingolipídeos ligados a proteínas específicas relacionadas à sinalização celular, e também a receptores que participam no reconhecimento e entrada de microorganismos na célula hospedeira. A integridade desses domínios de membrana é crucial na regulação dos eventos de transdução de sinal e entrada de patógenos (Pucadyil et al., 2004).

A necessidade de colesterol da membrana plasmática do hospedeiro para a ligação e internalização de *Leishmania donovani* em macrófagos tem sido demonstrada. A depleção de colesterol dos macrófagos por drogas sequestrantes resultou na redução da infecção de *Leishmania*, provavelmente por diminuir a interação do parasito com a superfície da célula hospedeira (Pucadyil et al., 2004; Tewary et al., 2006). Interessantemente, a redução da ligação de *L. donovani* a macrófagos depletados de

colesterol pode ser revertida pelo “reabastecimento” de colesterol na membrana, evidenciando o requerimento específico de colesterol no processo de infecção (Pucadyil et al., 2004). A LV também é caracterizada por uma imunidade celular deficiente. Logo após a entrada no hospedeiro, os parasitas prolongam sua sobrevivência subvertendo o sistema imune do hospedeiro. A infecção por *L. donovani* resulta numa diminuição na capacidade de macrófagos infectados apresentarem eficientemente antígenos para as células T (Chakraborty et al., 2005). Essa deficiência é correlacionada com alterações nas propriedades físicas das membranas celulares de macrófagos, e tem sido proposta como um mecanismo de escape do parasita. Como o colesterol tem uma ampla variedade de efeitos nas propriedades físicas das membranas celulares, a deficiência na apresentação de antígenos nos macrófagos infectados pode ser resultado da absorção do colesterol do hospedeiro pelo parasita (Pucadyil et al., 2007).

Alguns estudos recentes corroboram essa hipótese. Sen et al., 2011 mostraram que macrófagos infectados por *L. donovani* tornam-se não responsivos à sinalização por Interferon Gama ($IFN\gamma$), e perdem a capacidade de matar os parasitas em seu interior. A causa para este fenômeno é a habilidade do parasita em sequestrar colesterol da membrana celular dos macrófagos tornando-a menos fluída; como consequência, a disposição dos receptores para $IFN\gamma$ na membrana é alterada e a sinalização celular não acontece. A capacidade de endocitose de LDL-colesterol do hospedeiro também foi relatada para *L. amazonensis*, principalmente em situações fisiológicas desfavoráveis (Andrade-Neto et al., 2011).

O papel do colesterol e de diversas frações lipídicas na infecção e patogênese das Leishmanioses vem sendo cada vez mais bem caracterizado. O emprego de drogas que modulam os níveis lipídicos séricos constitui, portanto, uma promissora estratégia terapêutica contra essas doenças.

Receptores ativados da proliferação de peroxissomos (PPARs) como alvos terapêuticos adjuvantes na Leishmaniose Visceral

Os receptores ativados da proliferação de peroxissomos (PPARs) compõem uma subfamília de receptores nucleares. Três isoformas, codificadas por genes separados, foram identificadas até então: $PPAR\alpha$, $PPAR\beta/\delta$ e $PPAR\gamma$. Os PPARs são fatores de

transcrição ligante-dependentes que regulam a expressão de genes alvo ao se ligarem em elementos responsivos da proliferação de peroxissomos (PPREs) em sítios específicos nos genes regulados. Esses receptores (PPARs) exibem diferentes funções e distribuições nos tecidos, e também algumas diferenças na especificidade dos ligantes. Até o presente momento, sabe-se que os genes regulados pelos PPARs participam principalmente da regulação de proteínas chave, envolvidas na regulação intra e extracelular de lipídeos, e processos inflamatórios (Yessoufou e Wahli, 2010; e Gbaguidi et al., 2002).

O PPARA humano é expresso em vários tecidos metabolicamente ativos, incluindo fígado, rim, coração, músculo esquelético e tecido adiposo. O PPARA é expresso também em macrófagos, endotélio vascular e em células da musculatura lisa. (Berger e Moller, 2002; Rigamonti et al., 2008).

Os genes alvo do PPARA estão envolvidos em inúmeros processos biológicos, mas destacam-se os que são ligados a vias de metabolismo lipídico, incluindo vias de oxidação, captação e transporte de ácidos graxos; e vias de síntese de lipoproteínas. Além de ser capaz de aumentar a expressão gênica, o PPARA também pode reprimir a transcrição gênica ao interagir diretamente com outros fatores de transcrição e interferir com suas vias de sinalização. É por esse mecanismo que o PPARA é capaz de inibir a expressão de genes pró inflamatórios e, conseqüentemente, suprimir a resposta inflamatória apresentando também um papel na imunidade (Duval et al., 2007).

Como os principais ligantes agonistas naturais do PPARA são ácidos graxos e seus metabólitos, eicosanóides e prostaglandinas; foi sugerido um papel central para esse receptor na modulação e percepção de níveis lipídicos. Recentemente, tem sido demonstrado que o PPARA é o alvo primário para várias classes de compostos sintéticos (principalmente a classe dos fibratos) usados com sucesso no tratamento eficaz de níveis séricos anormais de lipídios e lipoproteínas (dislipidemias) (Berger e Moller, 2002; Duval et al., 2007). Camundongos nocaute para o PPARA mostram aumento do conteúdo hepático de triglicérides (TG), produção aumentada de lipoproteínas de densidades muito baixas (VLDL) “clearance” defeituoso de lipoproteínas ricas em TG nos tecidos periféricos, e aumento dos níveis plasmáticos de TG quando comparados com camundongos selvagens. Conseqüentemente, em camundongos a ativação do PPARA por agonistas sintéticos reduz a esteatose hepática, reduz a produção de VLDL ricas em TG, e reduz os níveis plasmáticos de TG (Duval et

al., 2007).

Em estudos em pacientes humanos com vários fenótipos clínicos, a administração de agonistas do PPARA (fenofibratos) reduziu os níveis plasmáticos de TG em todos os casos. O mecanismo proposto para esse efeito desejável é a modulação realizada pelo PPARA do gene da lipoproteína lipase (LPL), aumentando sua expressão direta ou indiretamente (Duval et al., 2007). Outro gene cuja expressão está sob o controle do PPARA é o da apolipoproteína E (apoE) (Galetto et al., 2001). Essa lipoproteína desempenha um papel fundamental no metabolismo de colesterol e TG, pois é responsável pelo “clearance” de lipoproteínas remanescentes ao se ligar a receptores específicos de apoE no fígado (Ferreira et al., 2010).

A expressão do PPARA em macrófagos também sugere que esse fator de transcrição tenha um papel na imunidade. Corroborando essa observação, vários estudos confirmaram o papel do PPARA na modulação da resposta imune. Em camundongos nocaute, a deficiência de PPARA muda o equilíbrio Th1/Th2 em favor da resposta pró-inflamatória Th1 (Yessoufou et al. 2006). Na verdade, a ativação PPARA diminui a expressão de vários componentes da resposta pró-inflamatória, como chemocinas e citocinas, ao diminuir a expressão do fator de transcrição Th1 T-bet, e ao aumentar a expressão do GATA-3, que é um regulador positivos das citocinas Th2 (Attakpa et al., 2009).

Nesse contexto, o PPARA se mostrou como possível gene candidato a contribuir com o risco geneticamente determinado da LV. Em um estudo caso-controle realizado pelo nosso grupo na área endêmica de Teresina-PI genótipos contendo o alelo mutado 162V foram significativamente mais frequentes entre indivíduos com LV do que entre todos os indivíduos não infectados ($p= 0.007$). Além disso indivíduos sadios possuindo pelo menos um alelo mutado 162V, apresentam quase quatro vezes mais chances de contrair a doença do que indivíduos que não possuem a mutação (razão de chances 3,91 e intervalo de confiança 1,38- 11,07) (Carvalho et al., 2014).

A relação da infecção por *L. infantum* com níveis lipídicos séricos e a modulação dos lípidos pelo PPARA sugerem que ensaios biológicos com variantes alélicas desses receptores em macrófagos infectados por *L. infantum* podem representar um bom caminho a seguir para o entendimento da interação parasita-hospedeiro na LV. Além disso novas técnicas de manipulação genética associadas a linhagens celulares

estáveis e com alta capacidade proliferativa permitem a introdução de alelos de interesse (no caso do gene do PPARA, o alelo 162V) e posterior triagem com a utilização de marcadores selecionáveis na aplicação em estudos funcionais para a avaliação de genes alvo da célula hospedeira (macrófagos) na infecção por *L. infantum*.

CRISPR/CAS9 como ferramenta de manipulação genômica baseada em recombinação homóloga

Técnicas de engenharia genômica baseadas em recombinação homóloga têm sido amplamente utilizadas para a geração de modelos celulares e de animais geneticamente modificados, que são ferramentas essenciais para a pesquisa biomédica para analisar funções de genes específicos durante os processos de estabelecimento de doenças. Em alguns casos, estas técnicas também têm sido utilizadas para gerar camundongos nos quais uma variante alélica de um gene humano relacionado a determinada doença substitui o gene original no genoma do camundongo. Tais camundongos 'humanizados' podem fornecer informações importantes sobre o papel de variantes específicas de proteínas, o que pode ser útil para o desenvolvimento de drogas (Scheer et al., 2013).

Recentemente, o sistema CRISPR/Cas foi desenvolvido para a introdução de quebras de fita dupla sequencia-específicas no DNA alvo. Ele baseia-se na descoberta de que muitos procariotos são capazes de destruir fagos invasores utilizando complexos ribonucleoprotéicos compostos por CRISPR-RNAs (crRNAs), crRNAs de transativação (tracrRNA), e proteínas associadas a CRISPR (CAS). Em particular, a Cas9 de *Streptococcus pyogenes* tem sido empregada para o direcionamento por RNAs-guia (sgRNA), com o intuito de produzir quebras de fita dupla em localizações genômicas específicas (Chylinski et al., 2013).

O sistema pode ser adaptado para atingir diferentes locais genômicos simplesmente modificando o motivo específico da sequência no sgRNA. Este sistema tem sido empregado com sucesso para aumentar a frequência de direcionamento de genes por recombinação homóloga em diversos organismos mais simples, em cultura de células e também em células embrionárias de camundongos (Gennequin et al., 2013).

OBJETIVO

Estabelecer um protocolo para a manipulação genética com o uso da tecnologia CRISPR-cas9 para a recombinação homóloga em linhagens imortalizadas de macrófagos humanos (THP-1), com o intuito de avaliar o papel da variante alélica L162V do gene PPARA na modulação de genes chave relacionados à interação parasito-hospedeiro na LV.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparação da amostra e extração de DNA

Para o isolamento do fragmento do gene PPARA humano, foi utilizada uma amostra de sangue humano que foi submetida à extração de DNA utilizando o Kit ReliaPrep™ Blood gDNA Miniprep System, segundo as recomendações do fabricante. A amostra de DNA foi armazenada a temperatura de -20°C, para os ensaios de clonagem do fragmento do gene PPARA no vetor pUC19.

Amplificação parcial do gene PPARA e geração de um constructo para *knock-in* da variante alélica L162V do gene PPARA humano

O primeiro passo para a geração dos vetores para a recombinação homóloga foi a amplificação parcial por PCR do gene PPARA com os oligos PPARA-FW (5-(EcoRI) GGGCCCGAATTCAGTCTCCAGTGGAGCATTG -3') e PRARA-RV (5-(HindIII) GGGCCCAAGCTTATCTTGGCATTTCGTCCAAA -3'), sob o seguinte protocolo: Desnaturação inicial de 98°C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e 30 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8µl do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

Digestão com EcoRI e Hind III

O vetor pUC19 e o produto de PCR foram digeridos com as enzimas EcoRI e Hind III de acordo com o seguinte protocolo: 1µl (20 unidades) da enzima EcoRI, 1µl (20 unidades) da enzima HindIII, 2µl de EcoRI Buffer (10x) foram adicionados em 16µl (1µg) dos respectivos DNA (plasmídeo e inserto), completando a reação para um total de 20µl. A reação foi incubada por 60 minutos a 37°C. A ligação e a transformação em células bacterianas DH5-alfa de *E. coli* serão detalhadas a seguir.

Ligação do inserto (produto de PCR) no vetor (pUC19)

O produto de PCR e o vetor digeridos, foram ligados através da seguinte reação de ligação: 1µl da enzima T4 DNA Ligase (New England Biolabs), 2 de T4 DNA Ligase Buffer (10X), 50 ng do vetor pUC19 digerido e 37,5 ng do fragmento de PCR digerido do gene PPARA.

A reação foi incubada *overnight* a -20°C para posterior transformação em células competentes DH5-alfa de *E.coli*.

Transformação do produto de ligação em células DH5-alfa competentes

A reação de transformação foi realizada da seguinte forma: Adicionou-se 2µl da reação de ligação à uma alíquota de 50µl das células DH5-alfa competentes, essa solução foi incubada por 25 minutos no gelo; decorrido esse tempo a amostra foi transferida para um termobloco a 37°C por 5 minutos e, posteriormente, foi incubada novamente no gelo por 2 minutos. Em seguida, adicionou-se à reação, 800µl de meio de cultura LB-líquido sem antibiótico e a solução foi deixada para recuperação a 37°C por 40 minutos, com agitação de 225rpm. Em seguida, foram plaqueados 100µl da reação em placas de LB-Ágar com Ampicilina (100µg/mL) e as placas foram incubadas *overnight* a 37°C. Após o crescimento das colônias, algumas delas foram selecionadas para a minipreparação dos plasmídeos pelo método de *lise* alcalina para a posterior confirmação da clonagem por PCR.

Minipreparação de plasmídeos pelo método de *lise* alcalina

A fonte de DNA plasmidial utilizada foi a bactéria *Escherichia coli*, a qual foi crescida durante 16 horas a temperatura de 37°C em meio LB contendo antibiótico, sob vigorosa agitação (250 rpm). Foram transferidos 1,5 mL da cultura bacteriana para dois tubos de microcentrifuga do tipo eppendorf distintos e estes foram centrifugados durante 3 minutos a 14000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados em hipoclorito 1% e então novamente adicionou-se 1,5 mL da mesma cultura bacteriana nos tubos, a fim de se obter um “pellet” a partir de 3 mL. Os tubos foram centrifugados sob as mesmas condições anteriores e então as células presentes no “*pellet*” foram ressuspensas com

auxílio de micropipet, em 100 μ L de tampão de ressuspensão (solução I) (25 mM TrisHCl pH 8,0, 10 mM EDTA pH 8,0, glicose 50 mM). Os tubos foram incubados durante 5 minutos a temperatura ambiente (deixados na bancada). Adicionou-se então, 200 μ L de solução alcalina recém preparada (solução II) (NaOH 0,2M, SDS 1%) e homogeneizou-se os tubos delicadamente 10 vezes por inversão. Sequencialmente, adicionou-se 150 μ L de solução III (60,0 mL de acetato de potássio 5,0 M, 11,5 mL de ácido acético glacial e 28,5 mL de água) e, para homogeneização, agitou-se vigorosamente os tubos, os quais foram incubados no gelo durante 10 minutos e posteriormente centrifugados durante 5 minutos a 14000 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos do tipo *ependorf* previamente rotulados (o “*pellet*” foi descartado em hipoclorito 1.0%) e então, na capela, foram acrescidos de 1V de clorofórmio cada, para nova centrifugação (3 minutos, 14000 rpm). Também na capela, as fases aquosas foram transferidas para novos tubos e então, adicionou-se 1,0V de isopropanol, já na bancada. Os tubos foram incubados no gelo durante 10 minutos e centrifugados por 15 minutos a 14000 rpm. Os sobrenadantes foram descartados em hipoclorito 1% e o “*pellet*” foi lavado com 100 μ L de etanol 70% gelado, a partir de centrifugação durante 5 minutos a 14000 rpm. Novamente, os sobrenadantes foram descartados em hipoclorito 1.0% e, para total remoção deste, utilizou-se uma micropipeta para retirada do que havia sobrado nos tubos. Com o “*pellet*” seco, este foi ressuspendido em 30.0 μ L de tampão TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA).

Confirmação da Clonagem

A confirmação da clonagem foi feita pela amplificação do fragmento utilizando um primer do inserto do gene PPARA, PparaExon5 (5-TTCTTTTCGGCGAACGATTCG-3') e um do vetor pUC19, M13 Reverse (5-GTCATAGCTGTTTCCTG-3'), gerando um produto de 1800 pb (Figura 3). O fragmento foi então purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) conforme recomendação do fabricante e posteriormente sequenciado para a identificação da sequência, foram utilizados na reação de sequenciamento 5 μ l (100.0 ng) dos fragmentos purificados. As sequências de DNA foram determinadas em sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems) utilizando-se 4 μ l de 2,5X Save Money (400mM Tris-HCl pH9,0, 10mM MgCl₂), 4 μ l de BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit v 3.1 (Applied Biosystems, Foster City, CA), 3,2

pmol dos oligonucleotídeos, e 5 µl do DNA genômico a 20 ng/µl. As reações de sequenciamento foram realizadas com os ciclos de temperatura programados para: 25 ciclos de 95°C por 10 segundos, 50°C por 5 segundos, 60°C por 4 segundos, com rampa de 1°C por segundo, como recomendado pelo fabricante. Após a amplificação as amostras foram mantidas a 4°C até o momento do uso. Para cada amostra foram utilizadas 2 reações, sendo uma para o *primer forward* e outra para o *reverse*.

Mutação sítio-dirigida

Foram utilizadas duas construções diferentes para o vetor clonado: Uma que contém apenas a mutação da sequência do PAM (*Protospacer Adjacent Motif*), estritamente necessária para a clivagem pela enzima Cas9, que foi utilizada como um controle da manipulação da técnica e denominada mutPAM, e a segunda, denominada mutLV+PAM, que contém a mutação de interesse (L162V) acrescentada a mutação da sequência PAM. Ambos os *templates* foram utilizados para recombinação homóloga com a técnica CRISPR - cas9.

A partir da obtenção do inserto clonado, foi iniciado o protocolo de mutação sítio-dirigida. A mutação 162V foi introduzida por PCR utilizando um par de oligos sobrepostos contendo a sequência de DNA do alelo mutado: Pparamut2-FW (5'-CGATTTACACAAGTGCGTTTCTGTCGGGATG-3') e Pparamut2c-RV, (5'-CATCCCGACAGAAACGCACTTGTGAAATCG-3') na amplificação do vetor pUC19ppara, gerando agora o vetor pUC19PPARAMut, sob o seguinte protocolo: Desnaturação inicial de 95°C por 5 minutos, seguida de 18 ciclos com desnaturação a 95°C por 50 segundos, anelamento a 60°C por 50 segundos, extensão a 68°C por 9 minutos, seguido de extensão final a 68°C por 7 minutos. Após a reação de PCR, o produto foi incubado com a enzima DpnI por 60 minutos, a 37°C. Essa enzima digere apenas DNA metilado e, portanto, somente o vetor parental é degradado, enriquecendo a amostra com o vetor amplificado contendo as mutações desejadas.

Após realizada a primeira etapa, foi iniciada a segunda mutação sítio-dirigida, a mutação da sequência PAM, utilizando o par de oligos sobrepostos contendo a sequência de DNA do alelo mutado PAMmutF (5'-GATTCGACTCAAGCTTGTGTATGACAAGTGC-3') e PAMmutR (5'-GCACTTGTGCATACACAAGCTTGAGTCGAATC-3'), na amplificação do vetor

pUC19pparamut gerando agora o vetor Puc19hPAPARAMut+PAM seguindo o mesmo protocolo mencionado acima. O produto da reação foi então transformado em células competentes de DH5-alfa de *E.coli* e purificado através da minipreparação de plasmídeos, detalhada anteriormente.

Clonagem do cassete de resistência a Neomicina no Plasmídeo

Puc19hPAPARAMut+PAM

O plasmídeo Puc19hPAPARAMut+PAM foi linearizado com a enzima de restrição XhoI, de acordo com o seguinte protocolo: 2µl de 10X NEBuffer, 1.0 µl (20 unidades) da enzima XhoI, 2µl de *Nuclease-Free water* foram adicionados a 15.0 µl (1µg) de DNA do plasmídeo, totalizando uma reação de 20µl. Ao final da digestão o produto submetido à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8µl do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV. O fragmento de interesse foi excisado do gel e foi purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

O cassete loxP-gb2-neo-loxP que confere resistência a neomicina/kanamicina foi amplificado por PCR de um plasmídeo comercial (Gene Bridges) com os seguintes primers:

XhoIFW (5'-GGGCGCCTGTAAGCCCAGCTACAATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3')

XhoIRV (5'-GCAATTCTCCTGTCTTTGCCTCTAATACGACTCACTATAGGGCTC-3')

Sob o seguinte protocolo: Desnaturação inicial de 98°C por 30 segundos, seguida de 35 ciclos com desnaturação a 98°C por 10 segundos, anelamento a 57°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 2 minutos e 30 segundos, seguido de extensão final a 72°C por 10 minutos. Posteriormente o produto de PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8µl do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV. O

fragmento foi então purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega), seguindo as recomendações do fabricante.

Na porção 5' de cada primer há uma região (sublinhada) que possui complementariedade com o plasmídeo Puc19hPAPARAMut+PAM nas regiões flanqueadoras do sítio de restrição da enzima XhoI. E na porção 3' de cada primer há uma região (negrito) complementar ao cassete loxP-gb2-neo-loxP. O produto de PCR foi clonado utilizando o kit *pEASY® - Uni Seamless Cloning and Assembly* com o seguinte protocolo: 1,5 µl (56.0 ng) do vetor linearizado, 1,05 µl (28ng) do cassete, 2.0µl de H₂O *Nuclease-Free* foram adicionados a 5µl de (2x) Assembly Mix, totalizando um volume final de 10ul que foi incubado a 50° por 15 minutos.

Posteriormente 2µl foram aliqotados dessa reação e transformados em células XL10-Gold® Ultracompetent Cells de acordo com o protocolo de transformação recomendado pelo fabricante.

Confirmação da Sequência de DNA do Vetor por Illumina Next Generation Sequencing (NGS)

Para a confirmação a sequência de DNA, após as clonagens, o vetor completo (8781pb) foi sequenciado através de técnicas de NGS utilizando plataforma MiSeq Illumina.

Assim, a biblioteca de gDNA foi preparada utilizando o kit Nextera XT (fragmentação enzimática). O protocolo é dividido em três etapas: fragmentação e ligação ao adaptador; amplificação da biblioteca; e purificação da biblioteca.

I. Fragmentação e ligação ao adaptador

Foi adicionado 10µl do reagente TD (*Tagment DNA Buffer*) em uma placa de 96 poços, 10µl do DNA foi transferido para a placa-96 e homogeneizado com o reagente TD já adicionado. Em seguida, 5µl do reagente ATM (*Amplicon Tagment Mix*) foi adicionado para cada poço e homogeneizado. A placa foi colocada no termociclador a 55° C por 5 minutos. O volume da reação foi de 25µl. Depois de decorridos os 5 minutos, a placa foi retirada do termociclador e adicionou-se 5µl do reagente NT (*Neutralize Tagment Buffer*), a reação foi incubada a temperatura ambiente por 5 minutos.

II. Amplificação da biblioteca

Nessa etapa, a biblioteca foi amplificada e adicionaram-se as sequências P5, P7 e os barcodes (índex): Index 1 primers (i7) – primer que possui a sequência barcode e P7; e Index 2 primers (i5) – primer que possui a sequência barcode e P5.

Os índices (1 e 2) utilizados para cada amostra, foram escolhidos. Os dois índices utilizados para cada amostra foram 501 e 701 e 502 e 702. As combinações foram escolhidas contendo um índice de cada. Em seguida, adicionou-se na reação 5µl de cada índice escolhido para cada amostra.

Após a adição dos index foi adicionado 7,5µl de NPM (*Nextera PCR Master Mix*) para cada amostra, em seguida, a placa foi colocada no termociclador, com a seguinte ciclagem: 72°C por 3 minutos, 95°C por 30 segundos, 15 ciclos (95°C por 10 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e 72°C por 5 minutos, pausando a reação a 10°C).

III. Purificação da Biblioteca

Nessa etapa, foram utilizadas *beads* magnéticas (*Agencourt® AMPure XP® PCR Purification system*) que apresentam afinidade ao DNA para purificar a biblioteca.

Foi adicionado 30µl das *beads* magnéticas para cada amostra, homogeneizado e incubado a temperatura ambiente por 5 minutos. Após a incubação, a placa foi colocada em uma placa magnética por 2 minutos, em seguida o sobrenadante foi descartado e os poços foram lavados duas vezes adicionando 200µl de etanol 80% e retirando completamente após 30 segundos. Após a lavagem, a placa de 96 poços foi retirada da placa magnética e as *beads* foram ressuspensas em 40µl de água ultra pura com uma incubação a temperatura ambiente por 5 min. Na etapa seguinte, a placa foi posicionada na placa magnética por 2 minutos e o sobrenadante, contendo o DNA, foi transferido para outro poço limpo da placa, estando pronto para a quantificação por detecção de fluorescência pelo uso do kit *Qubit. dsDNA High Sensitivity*.

Cada amostra foi quantificada, conforme as recomendações do fabricante, com o kit *Qubit. dsDNA High Sensitivity*, seguindo uma tabela de conversão onde cada ng/ul de DNA quantificado equivalia a 4,375 nM. As duas bibliotecas foram então normalizadas a 4nM e um pool final foi confeccionado usando 10µl de cada biblioteca normalizada. A biblioteca então seguiu para diluição final e desnaturação.

Desnaturação final e diluição para o sequenciamento NGS: 5µl do pool final foram desnaturados com 5µl de NaOH (0,2M) por 5 minutos a temperatura ambiente. Decorrido o tempo, a biblioteca foi diluída com o tampão de Hibridização HT1 para a concentração final de 10pM em um volume de 600µl.

A biblioteca diluída foi aplicada no cartucho de reagentes do kit Miseq Nano V2, para o sequenciamento por 300 ciclos paired -end (150 x 150).

Análise de Bioinformática: Após o sequenciamento, o software CLCbio genomics workbench foi utilizado para a confirmação da sequência dos dois templates. Sucintamente, todos os *reads* sequenciados para cada amostra foram mapeados contra as sequências de referência determinadas *in silico* para os dois *templates* gerando uma sequência consenso. Essa sequência consenso foi então alinhada com a sequência de referência e a confirmação pôde então ser inferida.

Transcrição *in vitro* do sgRNA

A transcrição *in vitro* do sgRNA, foi realizada com o kit MEGAscript® T7, de acordo com as recomendações do fabricante. O oligo-alvo específico (5' TAATACGACTCACTATAGCGAACGATTCGACTCAAGCGTTTTAGAGCTAGA AATAGCAAG 3') foi projetado para conter a sequência do promotor da T7 RNA polimerase, 20 nucleotídeos de sgRNA (selecionados usando o software CHOPCHOP; <https://chopchop.cbu.uib.no>) e 14 nucleotídeos do RNA de transativação (região universal), o RNA transcrito foi quantificado por espectrofotometria no aparelho Nanodrop.

Digestão do DNA molde

Para isolar o fragmento do gene PPARA, os plasmídeos foram digeridos com a enzima PstI (*New England Biolabs*®) e NdeI (*New England Biolabs*®). Para isso, 1µl (20 unidades), da enzima PstI, 1µl (20 unidades) da enzima NdeI, 1µl de Buffer CutSmart (10x) e 2µl de BSA (100x) foram adicionados em 15µl (1,5 µg) de DNA dos plasmídeos, completando a reação para um total de 20µl. A reação foi incubada por 60 minutos a 37 °C. No final da reação, a digestão foi confirmada através de eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8µl do produto amplificado pela

reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV. O fragmento foi então purificado com o kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-UP System (Promega) seguindo as recomendações do fabricante.

Cultura de células THP-1

As células THP-1 humanas foram mantidas em cultura no meio do *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Invitrogen) contendo 10% de FBS e suplementado com 2mM de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) e mantidas a 37 ° C sob 5% de CO₂.

Curva de resistência a Neomicina

Para determinar a concentração mínima de neomicina que é letal para células selvagens (não-resistentes), foi realizada uma curva de resistência à neomicina. Para isso, células THP-1 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^5 células por poço e incubadas a 37 °C *overnight*. No dia seguinte, o meio foi substituído por meio fresco contendo concentrações variadas (50 µg/ml - 1000 µg/ml) de antibiótico (G-418, Gibco Geneticin) em triplicatas. Após sete dias, a viabilidade celular em cada poço foi determinada pelo ensaio MTT.

Ensaio de MTT

Após sete dias de tratamento com neomicina, as células THP-1 previamente cultivadas em placas de 96 poços foram incubadas, 2h com 20.0 µl de reagente MTT (*Sigma-Aldrich*) a 37°C sob 5% de CO₂. O meio então, foi removido e foram adicionados 50.0 µl de SDS 20% por poço para dissolver os cristais de MTT formados. A placa foi incubada a 37 °C *overnight*, e no dia seguinte a absorbância foi medida a 570 nm.

Lipofecção das células THP-1

No dia anterior à transfecção, as células THP-1 foram semeadas em placas de 96 poços na concentração de 2×10^4 células por poço. No dia da transfecção, para cada poço a ser utilizado no experimento, foram adicionamos $5 \mu\text{l}$ de meio Opti-MEM em um tubo *Eppendorf* estéril de 1,5 ml, seguido pela adição de 21.0 ng de sgRNA e 105.0 ng da proteína Cas9 *TrueCut*™. Após vortexar a mistura, foram adicionados $0,2 \mu\text{l}$ de reagente Cas9 Plus à solução contendo a proteína Cas9 e sgRNA. Para a entrega do dsDNA molde, 200ng de DNA de fita dupla foram adicionados ao complexo de ribonucleoproteínas (RNPs) formado pela cas9 conjugada ao sgRNA. Enquanto isso, $5 \mu\text{l}$ de meio Opti-MEM foram adicionados a um tubo *Eppendorf* estéril separado, seguido pela adição de $0,3 \mu\text{l}$ de Reagente de Transfecção *Lipofectamine*™ CRISPRMAX™. Em seguida, os RNPs e a Cas9 foram adicionados à solução de lipofectamina CRISPRMAX, incubados a $25 \text{ }^\circ\text{C}$ por aproximadamente 10 minutos e depois adicionado às células THP-1. O meio de transfecção foi substituído 48 horas após a transfecção.

As células foram incubadas por 3 semanas para obtenção dos clones resistentes; o meio foi substituído duas vezes por semana na concentração de G418 de $400 \mu\text{g/ml}$, previamente determinada pelo ensaio MTT e a curva de antibiótico. Após três semanas, o DNA das células transfectadas foi extraído e utilizado para reação PCR, a fim de confirmar se a edição foi bem-sucedida.

Eletroporação das células THP-1

Para a reação da transfecção por eletroporação das células THP-1, dois tubos *eppendorf* contendo 2.0×10^7 células THP-1 foram centrifugados a 1500 rpm por 10 minutos. Enquanto a centrifugação ocorria, foi plaqueado 0.5 ml de meio RPMI sem antibióticos em 10 poços de uma placa de 24 poços; dentre eles, 5 poços foram reservados para a transfecção com o DNA molde controle experimental (CTL) e 5 poços com o DNA molde mutado (MUT). Após decorridos os 10 minutos de centrifugação, o meio foi completamente removido dos dois tubos e o pellet com as células foi ressuspensionado em $50.0 \mu\text{l}$ de Resuspension Buffer R para cada tubo. Em seguida, o equipamento Neon Transfection System foi ligado e preparado para a transfecção conforme recomendações do fabricante. Os parâmetros de eletroporação

utilizados foram baseados em padronizações prévias, os quais foram: Tensão (V): 1400 Pulsos, largura (ms): 20 Pulsos, tipo de ponteira: 10.0 µl. Ao final do experimento, as células foram incubadas a 37 °C sob 5% de CO₂; após 48h, foi adicionado 400.0 µg/ml de Geneticin™ (G418 Gibco™) aos 10 poços transfectados. O meio com antibiótico foi trocado a cada 3 dias, por 3 semanas. Após decorrido esse período, foi verificado crescimento celular em 3 poços do controle e 2 poços do mutado, o DNA das células foi extraído para análises de confirmação da inserção da mutação L162V e do cassete de neomicina.

Verificação da edição do genoma das células THP-1

Para a confirmação do sucesso da edição genômica, o DNA das células foi amplificado utilizando dois *primers*, um presente no Éxon 4 do gene PPARA: PPARA *Forward* (5-AGTCTCCCAGTGGAGCATTG-3') e o outro presente no Éxon 6, PPARA *Reverse* (5-ATCTTGGCATTTCGTCCAAAA-3'), gerando um produto de 4600pb para células THP-1 do tipo selvagem e um produto de 6300pb para células com o cassete de neomicina introduzido no genoma. Os produtos de pcr foram submetidos à eletroforese em gel de agarose segundo Sambrook et al. (1989). 8µl do produto amplificado pela reação de PCR foi adicionado de 2µl de tampão de amostra e aplicado em gel de agarose 1% (GIBCO) em solução de TAE 1X contendo brometo de etídio a 0,5µg/ml. Após a corrida a 90V por 40min as bandas foram visualizadas em um transluminador UV.

Transcriptoma

As células THP-1 selvagem, controle e mutadas foram divididas em triplicatas e mantidas em cultura no meio do *Roswell Park Memorial Institute* (RPMI 1640, Invitrogen) contendo 10% de FBS, suplementado com 2mM de glutamina, 1% de penicilina/estreptomicina (P/S) e mantidas a 37°C sob 5% de CO₂ até atingirem 90% de confluência. Em seguida, foram coletadas para extração de RNA com o reagente Trizol™, de acordo com recomendações do fabricante. Ao final da extração, o RNA das amostras foi quantificado através do equipamento NanoDrop™ e assim, as bibliotecas de cDNA foram construídas com 4.0 µg de RNA, utilizando o kit SureSelected Strand

Specific RNA Library Prep (Agilent Technologies), de acordo com as recomendações do fabricante. As bibliotecas foram sequenciadas através da plataforma Illumina Next Seq 500, com sequenciamento *single end* de 150 pb.

Processamento de dados de RNA-Seq e análise de expressão diferencial de genes

O programa BWA (Burrows-Wheeler Aligner) foi utilizado para alinhar os *reads* totais contra o genoma humano disponível no NCBI (Homo sapiens, assembly GRCh38.p13). Após o alinhamento, a anotação de genes foi realizada com o programa featureCounts, utilizando o arquivo de anotação genômica, GFF (Gene Finding Format, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=human>). Para análises posteriores foram utilizadas apenas contagens únicas de genes. A análise de expressão diferencial foi realizada com o pacote DESeq2 versão 1.24.012. Os genes que apresentam valor de p ajustado menor que 0.05 foram considerados significativamente regulados. A visualização dos dados da análise de componentes principais (PCA) foi realizada em R, utilizando o pacote pcaExplorer.

Análises de *Gene ontology* e anotação de vias

As análises de *gene ontology* foram realizadas para as listas de genes de expressão diferencial identificados usando o g: Profiler (<https://biit.cs.ut.ee/gprofiler/gost>). O teste exato de Fisher foi considerado o método estatístico (p-valor <0,05) e o método de Benjamini & Hochberg foi utilizado para a correção de False Discovery Rate (FDR).

RESULTADOS

Fluxograma com as principais etapas experimentais

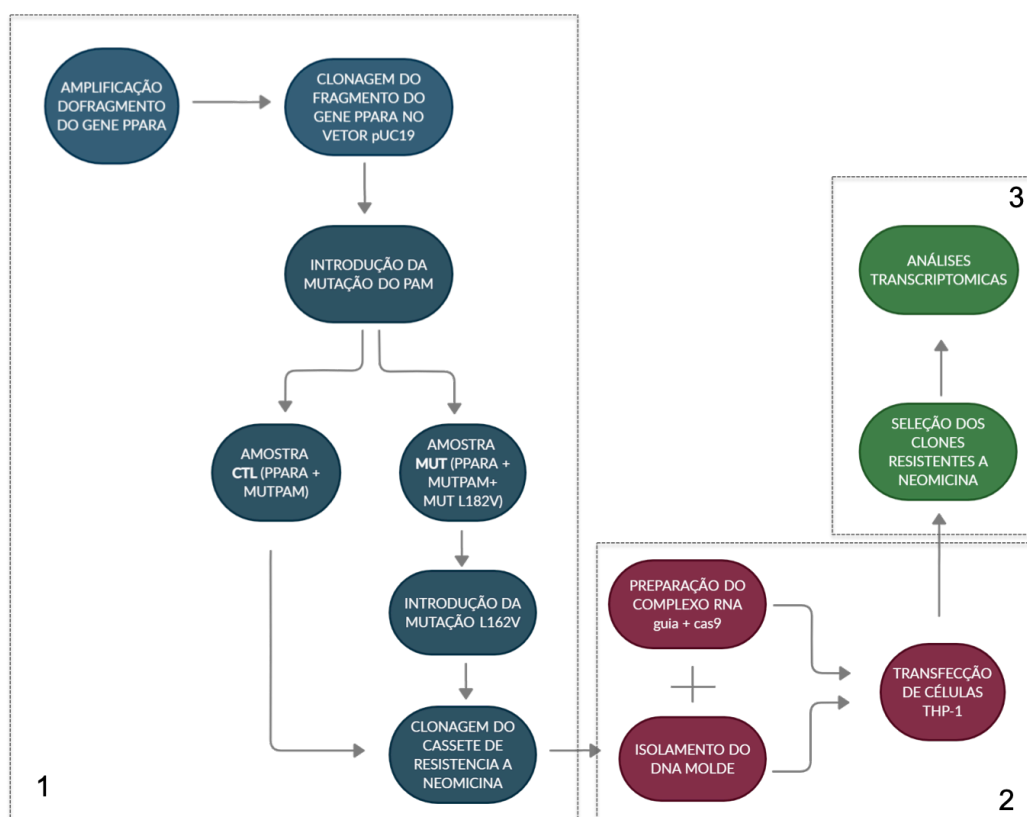


Figura 03. Esquema com as principais etapas experimentais. A primeira etapa experimental foi a amplificação do fragmento do gene de interesse (PPARA), seguida pela clonagem do fragmento no vetor pUC19 e pela mutação da região PAM. Após essa etapa, as amostras foram divididas em duas, sendo que uma foi submetida ao protocolo de mutação sítio dirigida para introdução da variante alélica L162V e a outra serviu como controle, ou seja, permaneceu somente com a mutação no PAM. Posteriormente, um cassete que contém o gene de resistência a neomicina foi introduzido em ambas as amostras para a futura seleção das células modificadas geneticamente. Na segunda etapa experimental, foi realizada a transcrição *in vitro* do RNA guia e a transfeção das células THP-1 com o complexo (cas9 + RNA guia) e os dsDNA's moldes (controle e mutado). Na terceira e última etapa experimental, as células resistentes a neomicina foram selecionadas com G418 e o RNA foi extraído para análises do conjunto de transcritos.

Construção do DNA molde para a recombinação homóloga

Para os ensaios de recombinação homóloga com CRISPR-cas9, foi necessário construir um DNA molde para ser inserido no locus desejado do DNA genômico das células THP-1, utilizando a tecnologia CRISPR-cas9. A construção foi realizada da seguinte forma: O DNA foi extraído de uma amostra de sangue humano, e o fragmento do gene PPARA que contém o éxon 4, 5 e 6 foi amplificado. A variante alélica L162V

está presente no éxon 5, portanto, foi necessário selecionar um fragmento com uma parte dos éxons 4 e 6 e seus respectivos íntrons, juntamente com o éxon 5, de acordo com a figura 4. Após a extração, o DNA foi sequenciado, através de sequenciamento Sanger, para confirmar a sequência.

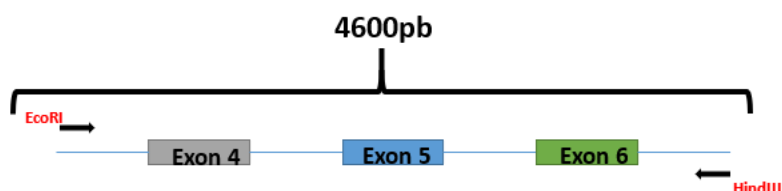


Figura 04. Região de amplificação por PCR do gene PPARA: A região contém parte dos éxons 4 e 6 e seus respectivos íntrons e o éxon 5 completo.

PCR para amplificação parcial do gene PPARA humano

A Figura 05 mostra um gel de agarose com os produtos de PCR amplificados com o fragmento parcial do gene PPARA humano. O tamanho dos fragmentos é de aproximadamente 4800pb. Após a confirmação de tamanho no gel, os fragmentos foram preparados para a clonagem.

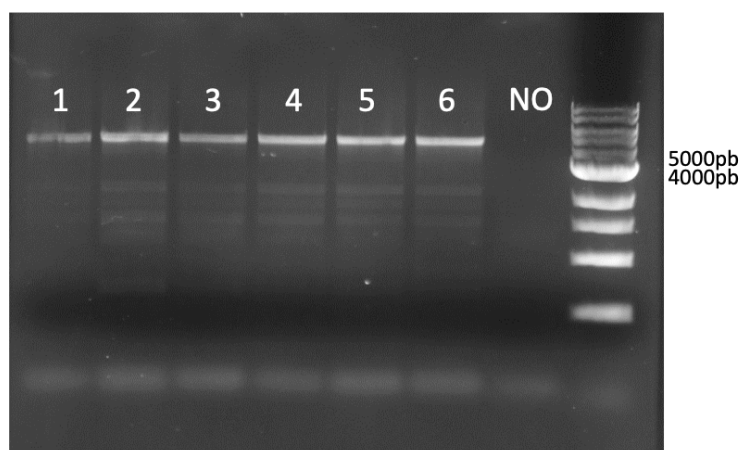


Figura 05. Gel dos produtos de amplificação por PCR do fragmento parcial do gene PPARA humano. As bandas do ladder identificadas indicam que o tamanho esperado de 4800pb foi amplificado.

Mapa do constructo Puc19hPPARA

O produto de PCR foi então, digerido com as enzimas EcoRI e HindIII e clonado no sítio múltiplo de clonagem do vetor pUC19. A figura 6, mostra o mapa do vetor, com o fragmento do gene PPARA, clonado *em silico* no programa Snapgene.

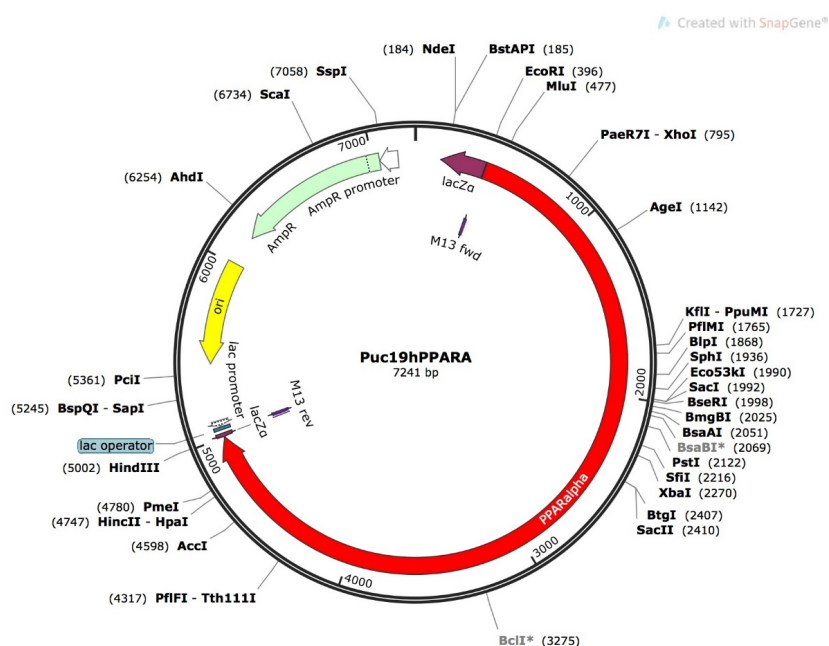


Figura 06. Mapa do vetor Puc19hPPARA. A região em vermelho representa o fragmento do gene PPARA humano contendo parte dos exons 4 e 6 e os seus respectivos íntrons e o éxon 5. O mapa foi desenhado no programa *SnapGene*.

Confirmação da Clonagem

A confirmação da clonagem foi feita pela amplificação do fragmento utilizando um primer do inserto, PparaExon5 (5-TTCTTTTCGGCGAACGATTCG-3') e um do vetor pUC19, M13 Reverse (5-GTCATAGCTGTTTCCTG-3'), gerando um produto de 1800 pb (Figura 07). As amostras de 1 a 14 representam colônias crescidas após a clonagem e transformação do construto em células competentes DH5α, de onde o DNA plasmidial foi extraído para a realização da reação de PCR.

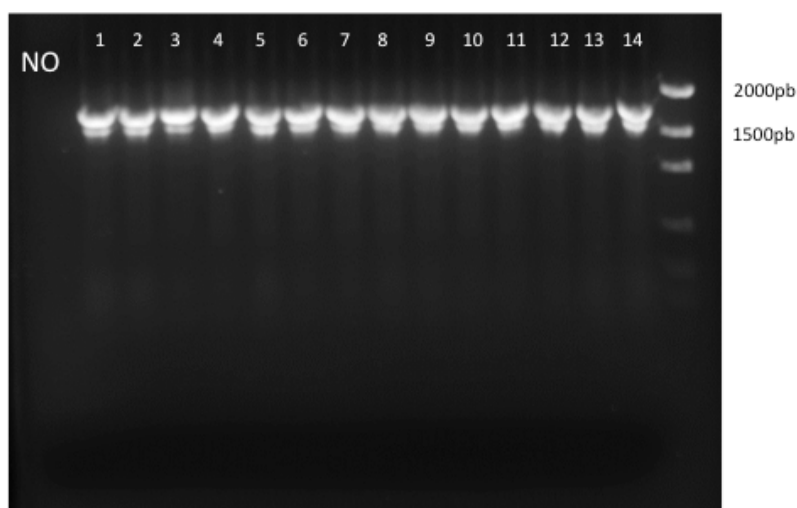


Figura 07. Gel de agarose dos produtos de amplificação por PCR do fragmento de 1800 pb. A região corresponde à amplificação parcial do gene PPARA humano com um iniciador presente no esqueleto do vetor (M13 Reverse) e o outro iniciador presente no éxon 5 do gene PPARA. As bandas do *ladder* identificadas indicam a amplificação do fragmento de 1800 pb.

Mutação sítio-dirigida

Após a clonagem do fragmento do gene PPARA no vetor pUC19, seguindo um protocolo de mutação sítio dirigida, duas mutações foram adicionadas ao DNA clonado no vetor, a primeira trata-se da mutação L162V, ou seja, a mudança de uma Leucina para uma Valina; essa modificação é dada pela troca de uma Citosina por uma Guanina. Em seguida, uma segunda mutação foi realizada, uma vez que a enzima cas-9, responsável por promover a quebra da dupla fita de DNA, só é capaz de fazê-la quando reconhece uma sequência específica denominada PAM (*Protospacer Adjacent Motif*) no caso do sistema CRISPR-cas9, o PAM é a sequência NGG (um nucleotídeo qualquer seguido por duas guaninas). Dessa forma foi necessário alterar a sequência PAM, a fim de evitar a quebra pela cas-9 do inserto de dsDNA, que serve como molde para a recombinação homóloga nos experimentos de transfecção. Essa mutação compreende apenas a substituição do códon, sem modificar o aminoácido, evitando assim, qualquer alteração na tradução do gene.

A variante alélica L162V foi introduzida por PCR com mutação sítio-dirigida utilizando o par de oligos sobrepostos contendo a sequência de DNA do alelo mutado Pparamut2-FW (5'CGATTTCAACAAGTGCGTTTCTGTCCGGGATG-3') e Pparamut2c-Back, (5'-CATCCCGACAGAAACGCACCTTGTGAAATCG-3') pela amplificação do vetor pUC19ppara, gerando agora o vetor pUC19pparamutLV. A partir deste momento, as amostras foram divididas em dois grupos: Controle (CTL), que contém apenas a mutação na região PAM e mutado (MUT), que contém a mutação 162V e a mutação da região PAM.

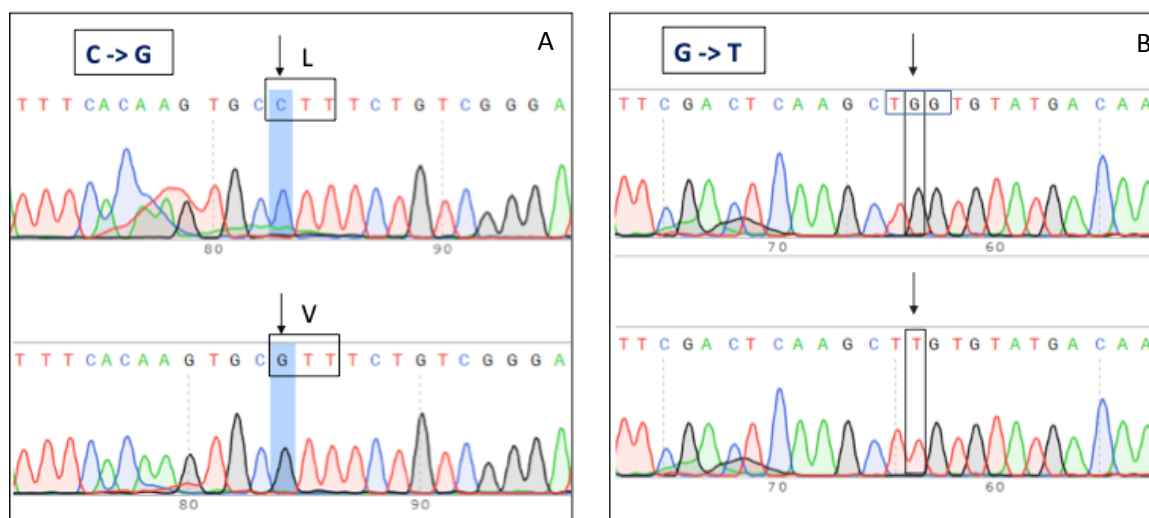


Figura 08. Sequenciamento Sanger realizado após o protocolo de mutação sítio dirigida. No quadro A, está representado a mutação L162V, alteração de uma leucina para uma valina, ocasionada pela mudança de um C para G. No quadro B, está representado a mutação da região PAM, onde um G foi substituído por um T, sem causar alteração no aminoácido.

A mutação da sequência PAM foi introduzida por PCR com mutação sítio-dirigida utilizando o par de oligos sobrepostos contendo a sequência de DNA do alelo mutado PAMmutF (5' GATTCGACTCAAGCTTGTGTATGACAAGTGC-3') e PAMmutR (5'-GCACTTGTGCATACACAAGCTTGAGTCGAATC-3') pela amplificação do vetor pUC19pparamut gerando agora o vetor Puc19hPAPARAMut+PAM. Após inseridas as duas mutações sítio-dirigidas, a região alvo foi sequenciada através de sequenciamento Sanger para a confirmação da substituição dos nucleotídeos (Figura 08).

Clonagem do cassete de resistência a Neomicina no Plasmídeo Puc19hPAPARAMut+PAM

Os plasmídeos Puc19hPAPARAMut+PAM CTL e MUT, foram linearizados com a enzima de restrição XhoI e o cassete loxP-gb2-neo-loxP que confere resistência a neomicina/canamicina foi amplificado por PCR de um plasmídeo comercial (Gene Bridges) com os seguintes primers: XhoIFW (5'-GGGCGCCTGTAAGCCCAGCTACAATTAACCCTCACTAAAGGGCG-3'); XhoIRV (5'-GCAATTCTCCTGTCTTTGCCTCTAATACGACTCACTATAGGGCTC-3').

Em seguida, o cassete que confere resistência a neomicina/canamicina foi clonado por recombinação nos plasmídeos Puc19hPAPARAMut+PAM CTL e MUT gerando o plasmídeo Puc19hPAPARAMut+PAM-NEO CTL e MUT (figura 09). Para a confirmação da sequência de DNA do vetor final obtido, após as clonagens, foi realizado o seu sequenciamento completo (8781pb) através de NGS utilizando a plataforma MiSeq Illumina.

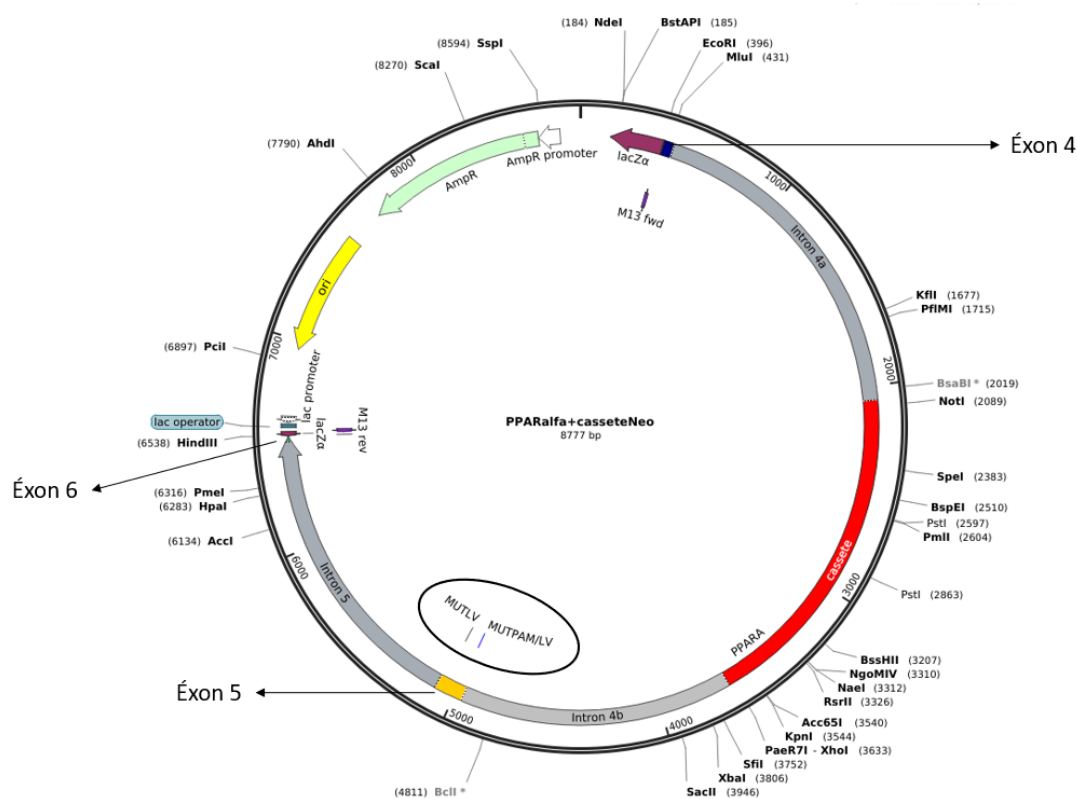


Figura 09. Mapa do constructo Puc19hPAPARAMutLV+PAM-NEO (final). A região em cinza representa o fragmento do gene PPARA humano contendo uma do parte éxon 4, uma do éxon 6, seus respectivos introns e o éxon 5 inteiro (região em amarelo). A variante alélica L162V (MUTLV) e a mutação do PAM estão apontadas no éxon 5 e o cassete que confere resistência a neomicina/canamicina está representado em vermelho.

Teste de clivagem do RNA guia com a enzima cas9

Logo após a transcrição *in vitro* do RNA guia, foi realizado um teste de eficiência de clivagem, com a enzima cas9. Para isso, três reações foram realizadas: A reação 1, com o dsDNA molde gerado pela linearização do vetor final com a sequência específica do PAM mutada, incubado com a enzima cas9 e o RNA guia-alvo, desenhado para os experimentos de transfecção das células THP-1 (sgRNA 12) e as reações 2 e 3, com o dsDNA molde selvagem, ou seja, sem a mutação na região PAM, incubado com o sgRNA12 e com um RNA guia inespecífico (não alvo), respectivamente. Os resultados mostraram que o sgRNA12, mostrou ser eficiente para guiar a enzima cas9 para o local de quebra específico no genoma, no éxon 5, uma vez que só houve quebra do dsDNA na amostra 2, onde a sequência não possui a mutação no PAM e foi incubada com o sgRNA12, específico para quebra do dsDNA nessa região no genoma das células THP-1. A figura 10, mostra um gel de eletroforese com as amostras 1, 2 e 3, sendo que na amostra 1 e 3 o fragmento possui 6300 pb, mostrando assim que não foi clivado pela enzima cas9; a amostra 2, por sua vez, possui dois fragmentos, de aproximadamente 3600 pb e 2700 pb.

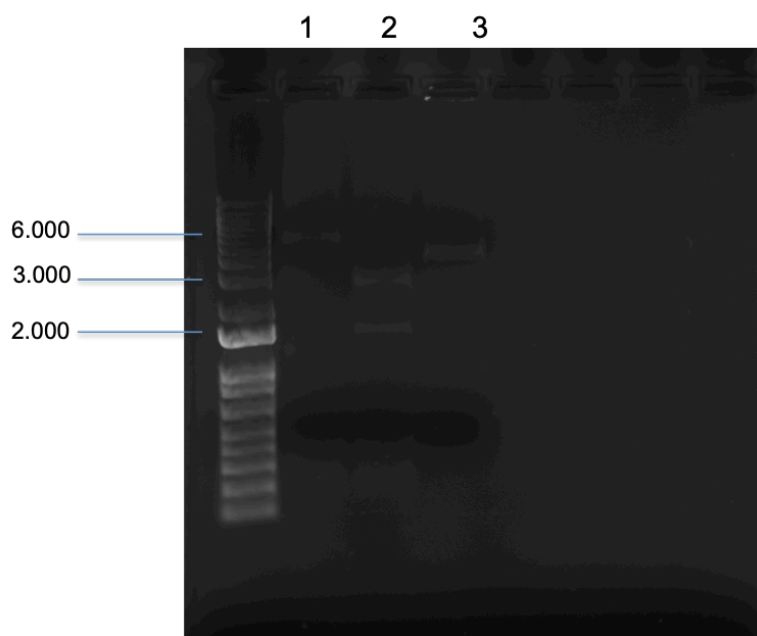


Figura 10. Teste de clivagem do RNA guia. Amostra 1: banda de aproximadamente 6.000pb, do dsDNA selvagem não clivado; amostra 2: dsDNA mutado clivado com a enzima cas 9 gerando 2 fragmentos de aproximadamente 3600pb e 2700pb e amostra 3: banda de aproximadamente 6.000pb do dsDNA mutado não clivado.

Digestão do Plasmídeo com NdeI e PmeI

Para os experimentos de lipofecção e eletroporação, ambos os vetores (CTL e MUT) foram digeridos com as enzimas NdeI e SmaI, para obter o fragmento molde para recombinação homóloga. Esse fragmento contém o éxon 5 e o cassete de resistência a neomicina com os respectivos braços de homologia, que se inicia no éxon 4 e termina no íntron 6. O produto de digestão, foi checado através de um gel de agarose 1% (figura 11), o fragmento de interesse, contendo aproximadamente 6.000 pb foi removido do gel e o DNA foi purificado para ser utilizado nos experimentos de transfecção com o RNA guia e a cas9.

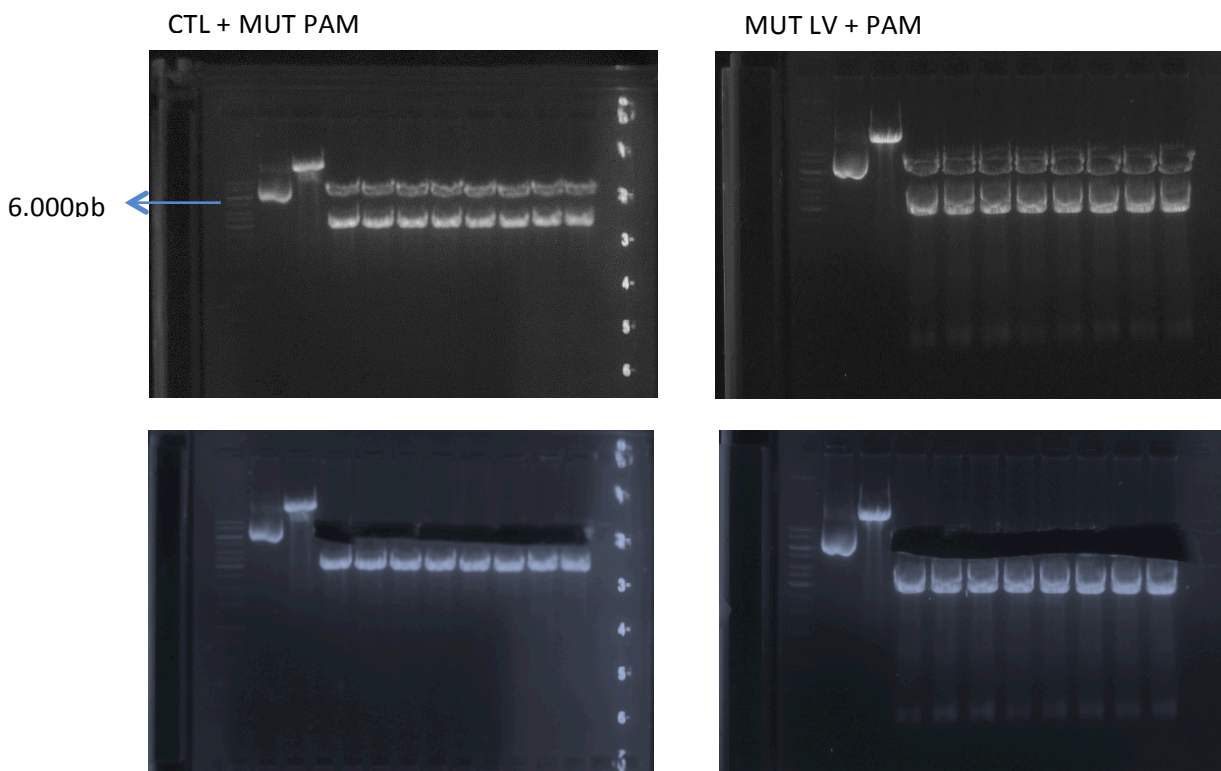


Figura 11. Gel da digestão dos plasmídeos CTL + PAM e MUTLV + PAM. A primeira banda, da esquerda para direita, mostra o plasmídeo inteiro, a segunda o plasmídeo linearizado digerido com a enzima NdeI e as oito bandas seguintes representam o plasmídeo digerido com NdeI e PmeI. O produto de digestão (6100 pb) foi cortado do gel de eletroforese para purificação do DNA.

Ensaio de lipofecção

O ensaio de lipofecção foi realizado em triplicatas, tanto para as amostras transfectadas com o DNA controle (CTL), como para as amostras transfectadas com o

DNA mutado (MUT). Como controle do experimento, foram utilizadas células THP-1 apenas com lipofectamina e células THP-1 com todos os reagentes da transfecção e DNA molde, porém sem o RNA guia. As células foram mantidas com 400µg/ml de Geneticin™ (G418 Gibco™) por 3 semanas. Após decorrido esse período, foi verificado crescimento de células em dois poços transfectados com CTL e dois poços transfectados com o MUT. O DNA das células foi então, extraído para análises de confirmação da inserção da mutação L162V e do cassete de neomicina.

A reação de PCR com o DNA das células THP-1 transfectadas, foi realizada utilizando primers para as regiões flangeadoras da mutação L162V e do cassete de neomicina. Para essa reação, foram utilizados dois controles: o positivo, que consiste no fragmento do gene PPARA com o cassete de neomicina, utilizado previamente como molde para a recombinação homóloga, e o controle negativo que consiste no mesmo fragmento, porém proveniente do DNA das células THP-1 selvagens, as quais não possuem o cassete de neomicina nem a mutação L162V.

O sucesso na edição do genoma das células THP-1, pode ser confirmado através do tamanho do fragmento do produto de PCR corrido em um gel de eletroforese, sendo que o fragmento de DNA “selvagem” possui 4600pb, enquanto o fragmento de DNA “mutado” possui 6300pb, uma vez que o cassete que confere resistência a neomicina possui 1700pb (figura 12).

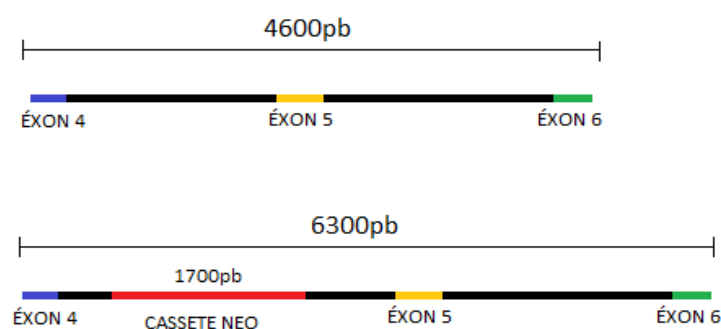


Figura 12. Esboço do tamanho dos fragmentos. É possível checar o sucesso da lipofecção através dos tamanhos dos fragmentos, uma vez que se o dsDNA for integrado no genoma das células THP-1, o produto de PCR deve ter 6300pb (4600pb + 1700pb = 6300pb).

Os resultados da reação de PCR mostraram que não foi possível obter sucesso na lipofecção. A figura 13, mostra um gel de agarose com os tamanhos dos fragmentos do

DNA das células THP-1 transfectadas, comparadas com o fragmento do DNA das células THP-1 selvagens (controle negativo) e ao fragmento do dsDNA que serviu como molde para a recombinação homóloga (controle positivo).

Em um cenário de êxito na lipofecção, os fragmentos que representariam o DNA das células mutadas através da transfecção com o dsDNA molde (MUTPAM e MUTLV + PAM) deveriam ter o mesmo tamanho do fragmento do gene PPARA que contém também o cassete de neomicina (6300pb), o controle positivo, consideramos ainda, que se as células fossem homozigotas, ou seja, se o cassete estivesse sido, durante a recombinação homóloga, incorporado pelos dois alelos das células THP-1, o gel mostraria apenas um fragmento de 6300 pb. Em uma outra opção de sucesso na lipofecção, o gel mostraria dois fragmentos, um com o mesmo tamanho do dsDNA que serviu como molde para a recombinação homóloga (6300pb) e o outro com o mesmo tamanho do fragmento das células THP-1 selvagens, isso porque as células poderiam ser heterozigotas, ou seja, com apenas alelo mutante incorporado ao cassete. Como as os fragmentos das duas amostras transfectadas (MUTPAM e MUTLV + PAM), apresentaram o mesmo tamanho do fragmento de DNA das células selvagens (4600pb) concluímos que a lipofecção não funcionou apropriadamente.

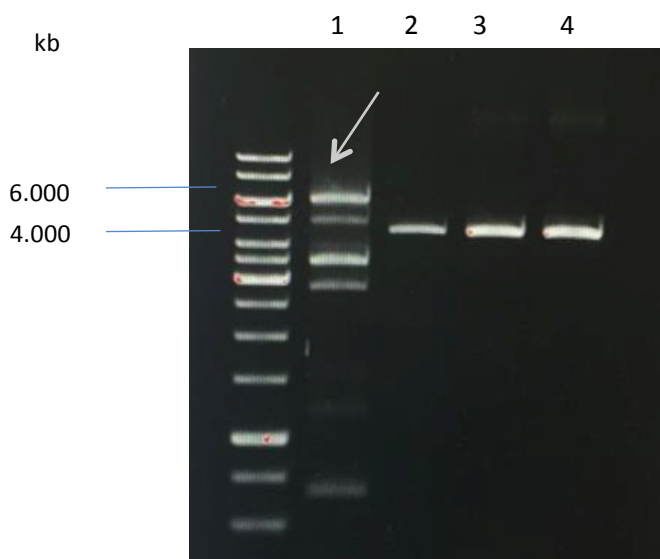


Figura 13. Gel de eletroforese para checar o tamanho dos fragmentos. A amostra 1, mostra o plasmídeo que foi utilizado como molde para recombinação homóloga, a banda apontada pela seta representa o tamanho do controle positivo (6100pb). A segunda banda mostra o DNA das células THP-1 selvagens (4600pb) e a terceira e quarta banda mostram o DNA das células que foram transfectadas. As duas últimas duas bandas apresentam o mesmo tamanho da célula THP-1 selvagem (4600pb) mostrando que o dsDNA com o cassete de resistência a neomicina e a mutação L162V não foram incorporadas no genoma.

Eletrporação das células THP-1

Foi iniciado um novo protocolo de transfecção das células THP-1, dessa vez, baseado na eletrporação através do equipamento Neon Transfection System. No total, foram realizadas 10 eletrporações das células THP-1, sendo que cinco delas foram realizadas com o DNA molde mutado e cinco com o DNA molde controle. A partir deste momento, para facilitar o entendimento dos resultados, as células transfectadas com o DNA controle serão nomeadas como “THP-1 controles” e as células transfectadas com o DNA mutado serão nomeadas de “THP-1 mutadas”.

Após 3 semanas de tratamento com neomicina, foi possível observar crescimento de células em 2 poços de THP-1 controle e em 3 poços de THP-1 mutada, as células foram coletadas de cada poço para avaliar o sucesso da inserção da mutação L162V e do cassete de neomicina no genoma das células.

A figura 14 mostra um gel de PCR com a confirmação da inserção do cassete de neomicina no genoma de duas replicatas de células THP-1 mutadas, no local desejado, uma vez que o PCR foi realizado com um primer na região do Exon 6 e um primer na região do cassete. O fragmento gerado contém 4600 pb, que compreende o início do cassete de neomicina, o éxon 5 e o éxon 6. Além disso, foi notado que apesar das células controle apresentarem crescimento com a presença de G418 na concentração de 400.0 μ /ml, não foi possível identificar o cassete de neomicina na região desejada, através da reação de PCR. Dessa forma, foi realizado um PCR com os primers *forward* e *reverse* da sequência do cassete, tanto para as amostras controles como para as amostras mutadas, e foi observada a presença, em todas as amostras testadas, de uma banda de 1.700 pb no gel, que é exatamente o tamanho da sequência do cassete de neomicina, portanto o cassete está presente no genoma das células controles, como demonstrado na figura 15, porém não é possível saber a sua localização exata no genoma dessas células. Sendo assim, não há evidências suficientes para afirmar que o cassete de neomicina foi integrado no local correto no genoma das células THP-1 controle. Algumas hipóteses podem ser levantadas para explicar esse acontecimento, uma delas é de que o cassete de neomicina foi integrado no genoma, porém em um outro local, diferente do que foi direcionado; a segunda hipótese é a de que o cassete tenha sido recombinação no local correto, mas a quantidade de células recombinadas foi muito baixa e, portanto, não sendo possível a detecção do cassete pela reação de PCR.

Ademais, o fato de as células mutadas apresentarem o cassete de resistência a neomicina integrado no seu genoma, sugere que provavelmente a mutação L162V foi inserida também, uma vez que o fragmento com o cassete clonado, possuía a mutação de interesse. Para confirmar a inserção da mutação, foi realizado um sequenciamento Sanger com os produtos de PCR amplificados do DNA das células controle e mutadas, a fim de verificar a ausência e a presença da mutação L162V no genoma, respectivamente. A figura 16 mostra que as células THP-1 controle não possuem a mutação L162V, enquanto nas células mutadas, é possível observar a mudança de uma citosina para uma guanina, modificando assim o aminoácido leucina (LEU) para valina (VAL), o que caracteriza a mutação L162V.

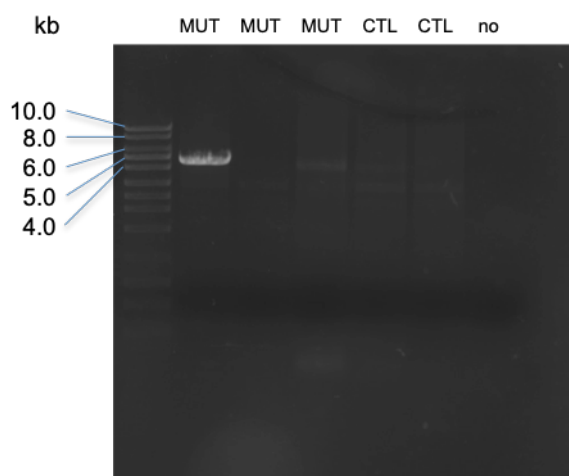


Figura 14. PCR diagnóstico para confirmar a presença do cassete de neomicina no genoma das células THP-1 controles (CTL) e mutadas (MUT). Nota-se que uma banda de 4.600 pb foi amplificada em duas amostras de células mutadas. Essa banda representa a região que se inicia no cassete (primer *Forward*) e se estende até o éxon 6 (primer *reverse*). Nota-se também que essa região não foi amplificada, quando utilizado o DNA das células controle.

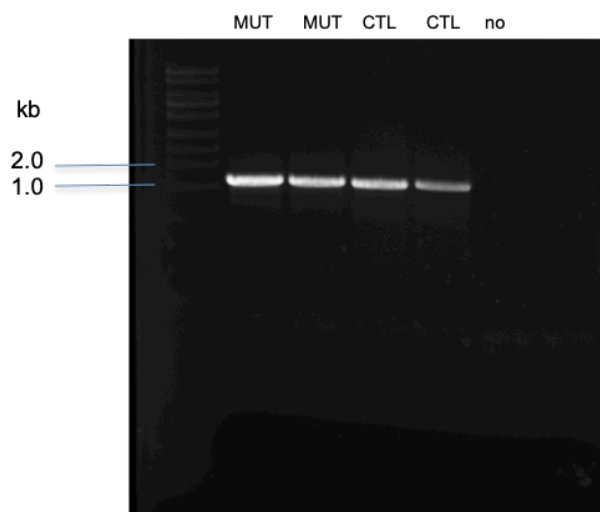


Figura 15. PCR com os primers *forward* e *reverse* do cassete de neomicina. A figura mostra uma banda de 1.700 pb, exatamente o tamanho do cassete de neomicina, mostrando que ele está presente no genoma tanto das células controles (CTL) como das células mutadas (MUT).

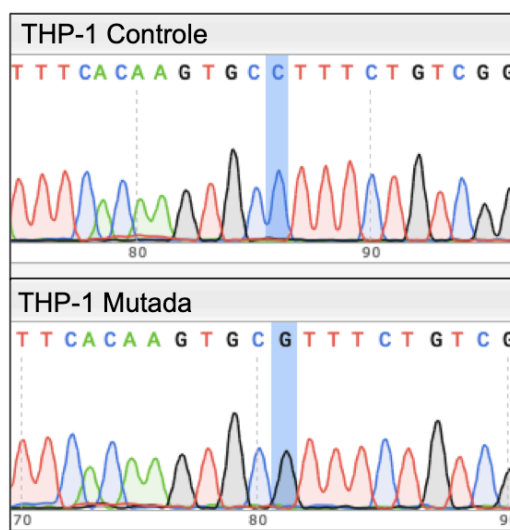


Figura 16. Sequenciamento da região da mutação L162V no éxon 5. Na imagem, é possível identificar que as células controles possuem a sequência selvagem CTT, que codifica uma Leucina (CUU). As células mutadas, por sua vez, possuem a sequência GTT que codifica uma Valina (GUU). Confirmando assim, a modificação dessa região no genoma das células THP-1.

Estudo do perfil global de expressão gênica das THP-1 modificadas com a variante L162V

Os dados gerados, são fruto de uma comparação entre células mutadas, células controles e células selvagens. A comparação entre o que está sendo expresso em células selvagens e mutadas é o principal foco deste ensaio, porém, a presença do cassete de neomicina no íntron 4 do gene PPARA pode gerar algum tipo de alteração no perfil de expressão gênica, dessa forma, as células controles foram utilizadas para compensar o efeito dessa possível variação na célula, uma vez que essas células possuem o cassete de resistência a neomicina mas não possuem a mutação L162V, dessa forma, a única diferença entre essas células é a variante em questão. O esperado para essas análises é que o perfil de expressão gênica das células controle e selvagens fossem semelhantes, mostrando assim que o cassete de neomicina possui pouca influência sobre a expressão gênica, e por isso, a comparação entre controle *versus* mutada e selvagem *versus* mutada deverá gerar resultados semelhantes e quaisquer alterações observadas, portanto, poderiam ser fruto da mutação L162V.

Para entender as alterações de transcritos, possivelmente geradas pela mutação L162V, o conjunto de dados foi submetido a uma análise de componente principal (PCA), com o objetivo de avaliar semelhanças entre o perfil de expressão global de cada

replicata para cada grupo amostral: selvagem (WT), controle (CTL) e mutada (MUT). Os resultados, demonstraram que o perfil de transcrição se agrupou da seguinte forma: selvagem, controle e mutada (figura 16). Uma amostra foi retirada do conjunto selvagem, uma vez que a leitura de *reads* dessa amostra no sequenciamento foi muito baixa e, portanto, inviável para a utilização nas análises. No primeiro eixo (PC1), responsável por 60,27% da variação, as amostras selvagem e controle agruparam-se próximas umas das outras, enquanto as amostras mutadas se agruparam separadamente.

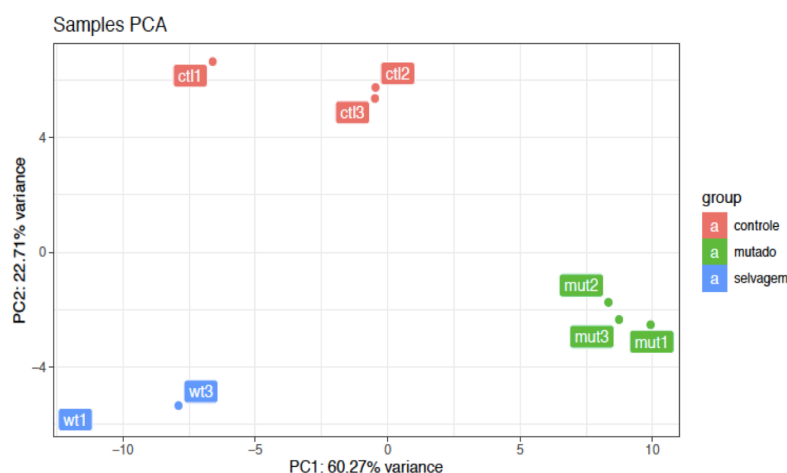


Figura 17. Análise de Componentes Principais (PCA). Para análise de PCA foi utilizado o conjunto de dados de expressão de *log fold change*. As amostras se agruparam em três grupos: WT, CTL e MUT.

Para análises de enriquecimento de vias, foram feitas comparações entre: WT x CTL, CTL x MUT e WT x MUT. Para cada uma das comparações foram utilizados os genes que foram diferencialmente expressos de forma significativa (p ajustado <0.05). O diagrama de Venn (figura 18a), mostra que as comparações CTL x MUT e WT x MUT compartilham 173 vias, sendo que possuem no total 267 e 261 elementos, respectivamente, ou seja, a maior parte das vias enriquecidas são comuns para ambas as comparações, enquanto a comparação WT x CTL possui poucas vias enriquecidas, totalizando 36 elementos. Esses dados demonstram que além de as amostras CTL e WT serem parecidas, ainda existe um número significativo de vias enriquecidas compartilhadas entre as demais comparações (WT x MUT e CTL x MUT). A figura 18b mostra um gráfico de barras com a quantidade de genes *up-regulated* (regulados positivamente) e *down-regulated* (regulados negativamente). A comparação WT x CTL

gerou 200 genes regulados positivamente e 130 genes regulados negativamente, enquanto a comparação CTL x MUT gerou 377 genes regulados positivamente e 422 genes regulados negativamente e a comparação WT x MUT gerou 600 genes regulados positivamente e 302 genes regulados negativamente.

O número total de genes diferencialmente expressos de maneira significativa para cada uma das comparações foi: WT x CTL: 330; CTL x MUT: 799; WT x MUT: 902. A partir deste dado, é possível constatar, novamente, que as amostras WT e CTL respondem de maneira semelhante quando comparadas às amostras MUT, enquanto a relação WT x CTL gerou uma quantidade pequena de genes significativamente expressos (330), quando comparada à relação CTL x MUT (799) e WT x MUT (902). Além disso, os 902 genes significativamente expressos na comparação WT x MUT, são relacionados a algum mecanismo do sistema imune, inclusive de resposta a patologias, como as leishmanioses. As tabelas 1, 2 contém a lista com os 50 primeiros termos significativamente expressos para análise de enriquecimento de vias, ordenados pelo p-valor ajustado (do menor para o maior), das comparações WT x MUT e CTL e MUT, sendo que os primeiro 45 termos são referentes a BP (processos biológicos) e os 5 últimos a KEGG (Enciclopédia de Genes e Genoma de Kyoto), para a comparação WT x CTL, a tabela 3 contém apenas 45 termos, sendo que 43 são relacionados a BP e 2 a KEGG, visto que não foram encontrados mais genes para comparação, relacionados a esses processos (BP e KEGG). A lista completa de termos encontrados para as três comparações encontra-se disponível no material suplementar.

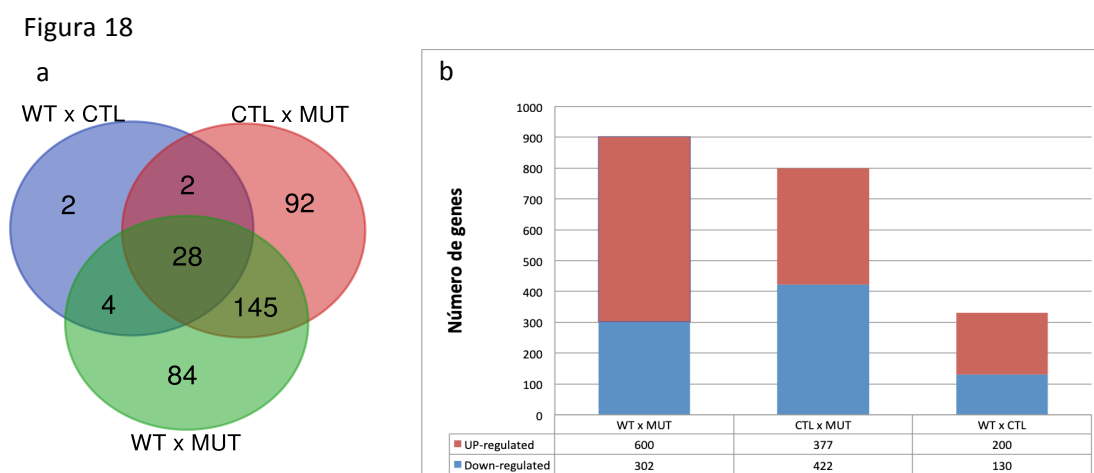


Figura 18. Diagrama de Venn e Gráfico de barras. (a) O diagrama de Venn mostra a quantidade de vias que as comparações WT x CTL; CTL x MUT e WT x MUT compartilham em comum. (b) O gráfico de barras mostra a quantidade de genes que estão *up-regulated* e *down-regulated* para cada uma das comparações.

A análise de vias enriquecidas, também foi demonstrada a partir de um gráfico, presente na figura 19, que separa as vias enriquecidas de acordo com os seguintes parâmetros: GO:MF (função molecular); GO:PB (função biológica); GO:CC (componente celular) e KEGG (Enciclopédia Genes e Genomas de Kyoto). Em todos os parâmetros descritos, a comparação WT x MUT e CTL x MUT, mostrou uma quantidade alta de vias enriquecidas, enquanto a comparação WT x CTL, apresentou poucas vias enriquecidas para todos os parâmetros citados.

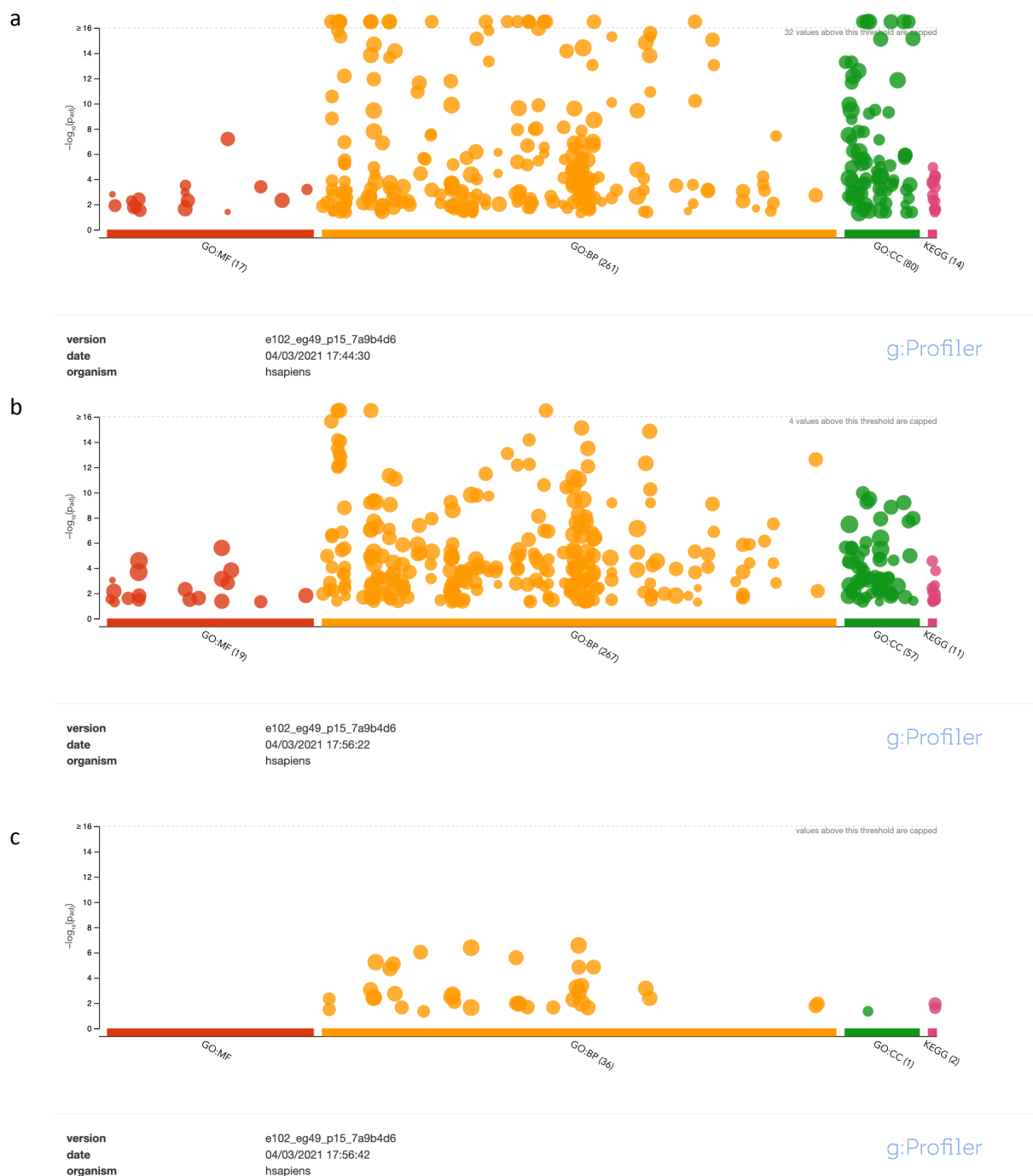


Figura 19. Análise de enriquecimento funcional de vias. Os gráficos representam as seguintes comparações: (a) WT x MUT; (b) CTL x MUT; (c) WT x CTL.

Tabela 1. Vias diferencialmente expressas na comparação CTL x MUT

CTL x MUT	term_name	term_id	adjusted_p_value
GO:BP	immune effector process	GO:0002252	5,80638E-20
GO:BP	immune system process	GO:0002376	9,21113E-20
GO:BP	immune response	GO:0006955	1,09272E-18
GO:BP	leukocyte activation	GO:0045321	4,41972E-16
GO:BP	regulation of developmental process	GO:0050793	1,01387E-15
GO:BP	cell activation	GO:0001775	1,14217E-15
GO:BP	cellular response to organic substance	GO:0071310	1,81141E-15
GO:BP	myeloid leukocyte activation	GO:0002274	1,81772E-14
GO:BP	leukocyte degranulation	GO:0043299	2,07239E-14
GO:BP	myeloid leukocyte mediated immunity	GO:0002444	2,58025E-14
GO:BP	regulation of multicellular organismal process	GO:0051239	4,04897E-14
GO:BP	granulocyte activation	GO:0036230	2,5171E-13
GO:BP	cell activation involved in immune response	GO:0002263	2,77245E-13
GO:BP	leukocyte mediated immunity	GO:0002443	3,44018E-13
GO:BP	regulation of multicellular organismal development	GO:2000026	4,22865E-13
GO:BP	cellular response to chemical stimulus	GO:0070887	5,63499E-13
GO:BP	positive regulation of multicellular organismal process	GO:0051240	5,71682E-13
GO:BP	leukocyte activation involved in immune response	GO:0002366	6,92007E-13
GO:BP	neutrophil mediated immunity	GO:0002446	1,67742E-12
GO:BP	neutrophil degranulation	GO:0043312	1,78364E-12
GO:BP	neutrophil activation	GO:0042119	2,01662E-12
GO:BP	neutrophil activation involved in immune response	GO:0002283	2,36083E-12
GO:BP	myeloid cell activation involved in immune response	GO:0002275	2,9085E-12
GO:BP	positive regulation of cellular process	GO:0048522	5,3907E-12
GO:BP	response to external stimulus	GO:0009605	5,75232E-12
GO:BP	response to cytokine	GO:0034097	6,21174E-12
GO:BP	anatomical structure development	GO:0048856	7,50912E-12
GO:BP	response to organic substance	GO:0010033	9,70908E-12
GO:BP	positive regulation of biological process	GO:0048518	4,50916E-11
GO:BP	regulated exocytosis	GO:0045055	5,87526E-11
GO:BP	secretion	GO:0046903	6,25549E-11
GO:BP	cellular response to cytokine stimulus	GO:0071345	1,08942E-10
GO:BP	developmental process	GO:0032502	1,22591E-10
GO:BP	response to type I interferon	GO:0034340	1,68469E-10
GO:BP	secretion by cell	GO:0032940	2,92864E-10
GO:BP	cell adhesion	GO:0007155	2,95837E-10
GO:BP	response to stimulus	GO:0050896	3,93127E-10
GO:BP	biological adhesion	GO:0022610	4,03307E-10
GO:BP	multicellular organism development	GO:0007275	5,11313E-10
GO:BP	cellular response to type I interferon	GO:0071357	5,75579E-10
GO:BP	type I interferon signaling pathway	GO:0060337	5,75579E-10
GO:BP	regulation of response to stimulus	GO:0048583	8,6093E-10
GO:BP	anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	1,15743E-09
GO:BP	exocytosis	GO:0006887	1,37151E-09
GO:BP	export from cell	GO:0140352	1,37603E-09
KEGG	Phagosome	KEGG:04145	2,58963E-05
KEGG	Rheumatoid arthritis	KEGG:05323	0,000154748
KEGG	Leishmaniasis	KEGG:05140	0,002283058
KEGG	Lysosome	KEGG:04142	0,003651913
KEGG	NOD-like receptor signaling pathway	KEGG:04621	0,007496138

Tabela 2. Vias diferencialmente expressas na comparação WT x MUT

WT x MUT	term_name	term_id	adjusted_p_value
GO:BP	immune response	GO:0006955	4,61924E-30
GO:BP	immune system process	GO:0002376	1,64323E-28
GO:BP	immune effector process	GO:0002252	1,07824E-27
GO:BP	leukocyte activation	GO:0045321	9,40337E-21
GO:BP	cell activation	GO:0001775	2,75165E-20
GO:BP	leukocyte degranulation	GO:0043299	9,7987E-20
GO:BP	myeloid leukocyte mediated immunity	GO:0002444	1,59673E-19
GO:BP	defense response	GO:0006952	4,40907E-19
GO:BP	regulated exocytosis	GO:0045055	4,97413E-19
GO:BP	granulocyte activation	GO:0036230	8,96359E-19
GO:BP	innate immune response	GO:0045087	9,32683E-19
GO:BP	neutrophil degranulation	GO:0043312	1,15698E-18
GO:BP	neutrophil activation involved in immune response	GO:0002283	1,66536E-18
GO:BP	neutrophil activation	GO:0042119	1,75106E-18
GO:BP	leukocyte activation involved in immune response	GO:0002366	2,98739E-18
GO:BP	defense response to other organism	GO:0098542	3,71494E-18
GO:BP	cell activation involved in immune response	GO:0002263	4,35023E-18
GO:BP	cytokine-mediated signaling pathway	GO:0019221	5,69068E-18
GO:BP	myeloid cell activation involved in immune response	GO:0002275	5,7842E-18
GO:BP	neutrophil mediated immunity	GO:0002446	6,16448E-18
GO:BP	response to cytokine	GO:0034097	1,4475E-17
GO:BP	response to external stimulus	GO:0009605	2,67506E-17
GO:BP	exocytosis	GO:0006887	2,92812E-17
GO:BP	response to other organism	GO:0051707	9,39798E-17
GO:BP	response to biotic stimulus	GO:0009607	9,42172E-17
GO:BP	response to external biotic stimulus	GO:0043207	1,05246E-16
GO:BP	myeloid leukocyte activation	GO:0002274	1,09363E-16
GO:BP	response to type I interferon	GO:0034340	1,38452E-16
GO:BP	leukocyte mediated immunity	GO:0002443	3,2701E-16
GO:BP	biological process involved in interspecies interaction between organisms	GO:0044419	3,40342E-16
GO:BP	cellular response to type I interferon	GO:0071357	4,21662E-16
GO:BP	type I interferon signaling pathway	GO:0060337	4,21662E-16
GO:BP	cellular response to cytokine stimulus	GO:0071345	4,80984E-16
GO:BP	cellular response to chemical stimulus	GO:0070887	1,45043E-15
GO:BP	cell surface receptor signaling pathway	GO:0007166	2,09951E-15
GO:BP	secretion by cell	GO:0032940	3,3864E-15
GO:BP	export from cell	GO:0140352	3,89869E-15
GO:BP	response to stimulus	GO:0050896	5,65784E-15
GO:BP	response to organic substance	GO:0010033	1,42115E-14
GO:BP	cellular response to organic substance	GO:0071310	1,78475E-14
GO:BP	response to stress	GO:0006950	2,52727E-14
GO:BP	secretion	GO:0046903	2,80046E-14
GO:BP	response to interferon-gamma	GO:0034341	3,69841E-14
GO:BP	defense response to symbiont	GO:0140546	7,07917E-14
GO:BP	defense response to virus	GO:0051607	7,07917E-14
KEGG	Antigen processing and presentation	KEGG:04612	1,02172E-05
KEGG	Measles	KEGG:05162	4,5606E-05
KEGG	Epstein-Barr virus infection	KEGG:05169	5,55732E-05
KEGG	Leishmaniasis	KEGG:05140	0,000112541
KEGG	Phagosome	KEGG:04145	0,000137469

Tabela 2. Vias diferencialmente expressas na comparação WT x CTL

WT x CTL	term_name	term_id	adjusted_p_value
GO:BP	anatomical structure development	GO:0048856	1,39126E-07
GO:BP	developmental process	GO:0032502	2,05987E-07
GO:BP	cell migration	GO:0016477	7,23041E-07
GO:BP	locomotion	GO:0040011	1,90704E-06
GO:BP	multicellular organism development	GO:0007275	3,28924E-06
GO:BP	tissue development	GO:0009888	5,92126E-06
GO:BP	cell motility	GO:0048870	1,09934E-05
GO:BP	localization of cell	GO:0051674	1,09934E-05
GO:BP	anatomical structure morphogenesis	GO:0009653	1,33634E-05
GO:BP	regulation of developmental process	GO:0050793	0,000311652
GO:BP	system development	GO:0048731	0,000380944
GO:BP	cellular response to chemical stimulus	GO:0070887	0,000503499
GO:BP	movement of cell or subcellular component	GO:0006928	0,000697851
GO:BP	cellular developmental process	GO:0048869	0,000942346
GO:BP	response to organic substance	GO:0010033	0,001345768
GO:BP	cell differentiation	GO:0030154	0,001470583
GO:BP	cellular response to organic substance	GO:0071310	0,003198909
GO:BP	signaling	GO:0023052	0,003465951
GO:BP	animal organ development	GO:0048513	0,003758801
GO:BP	cell communication	GO:0007154	0,004096872
GO:BP	ossification	GO:0001503	0,004228361
GO:BP	cell surface receptor signaling pathway	GO:0007166	0,005753265
GO:BP	regulation of cell migration	GO:0030334	0,007120928
GO:BP	response to chemical	GO:0042221	0,007822648
GO:BP	regulation of locomotion	GO:0040012	0,009148314
GO:BP	regulation of cell motility	GO:2000145	0,009825454
GO:BP	positive regulation of phosphorylation	GO:0042327	0,010282841
GO:BP	regulation of multicellular organismal development	GO:2000026	0,014398932
GO:BP	regulation of cellular process	GO:0050794	0,015381241
GO:BP	positive regulation of catalytic activity	GO:0043085	0,017987978
GO:BP	regulation of multicellular organismal process	GO:0051239	0,018204002
GO:BP	positive regulation of phosphorus metabolic process	GO:0010562	0,019740597
GO:BP	positive regulation of phosphate metabolic process	GO:0045937	0,019740597
GO:BP	multicellular organismal process	GO:0032501	0,023304855
GO:BP	skeletal system development	GO:0001501	0,029965845
GO:BP	peptidyl-tyrosine phosphorylation	GO:0018108	0,043259283
GO:BP	positive regulation of molecular function	GO:0044093	0,044952415
GO:BP	regulation of cellular component movement	GO:0051270	0,047142652
GO:BP	response to biotic stimulus	GO:0009607	0,047949995
GO:BP	peptidyl-tyrosine modification	GO:0018212	0,047975547
GO:BP	regulation of cell communication	GO:0010646	0,048074739
GO:CC	neuromuscular junction	GO:0031594	0,043740359
KEGG	Pathways in cancer	KEGG:05200	0,010115199
KEGG	Proteoglycans in cancer	KEGG:05205	0,022890329

DISCUSSÃO

CRISPR-cas9 como ferramenta para produzir *knock-in* em células THP-1

No presente trabalho, foi avaliada a influência da mutação L162V do gene PPARA na modulação do perfil geral de expressão gênica em células THP-1. O método escolhido para introduzir a mutação L162V em células THP-1 foi a tecnologia CRISPR-cas9. No entanto, diversos fatores devem ser levados em consideração para garantir a entrega do RNA guia, juntamente com a cas9 e o dsDNA no núcleo das células de forma eficiente. Os elementos mais críticos do protocolo são a construção do fragmento de DNA molde e a escolha do método de transfecção das células.

Quando um fragmento de DNA é inserido no genoma, por *knock-in* através da tecnologia CRISPR-cas9, baseado na recombinação homóloga, é essencial que após a transfecção, seja feita uma seleção das células que tenham incorporado a sequência alvo no genoma. Dessa forma, foi clonado, juntamente ao fragmento do gene PPARA, no vetor pUC19, um cassete de resistência a neomicina. A sequência que confere resistência a neomicina foi incluída no íntron 4; essa localização foi pensada, levando em consideração que o cassete deveria estar em uma região não codificadora, ou seja, em um íntron. Além disso, de acordo com Shy e col. (2016), para se ter maior sucesso no reparo dirigido por homologia, é recomendado utilizar um fragmento com Gennequin e col. (2013) também demonstraram que braços de homologia longos (entre 1.800pb e 5.000pb) funcionam apropriadamente para recombinação homóloga em células de camundongos. Essa posição onde o cassete foi clonado atende a essas recomendações principais.

O segundo ponto importante a ser considerado para os experimentos com a tecnologia CRISPR-cas9 são os métodos de transfecção. Para além da transfecção com lipofecção, existe também o método de eletroporação e uso de vetores lentivirais como veículo de entrega do complexo ribonucleoproteico (RNPs), e do dsDNA. O protocolo descrito neste trabalho, objetivou utilizar dois métodos: a lipofecção e a eletroporação, sendo que a eletroporação foi o que se mostrou mais promissor para o *knock-in* em células THP-1.

A lipofectamina CRISPRMAX, utilizada na transfecção das células THP-1, é mais robusta na entrega do complexo RNP, quando comparada a outras lipofectaminas utilizadas em uma variedade de linhagens celulares, devido a sua facilidade de uso e baixa toxicidade (Yu et al., 2016). Contudo, células que crescem em suspensão, como as THP-1, são mais difíceis de transfectar. Papapetrou e col. (2005) mostraram que a entrega de RNPs por eletroporação com o equipamento Neon Transfection System, foi eficaz em todas as diferentes linhagens celulares testadas e muitas vezes era o único método que poderia produzir *Indels* em células difíceis de transfectar. Os resultados do presente trabalho também corroboraram essa hipótese, uma vez que apesar das limitações do protocolo, pode-se obter uma eletroporação eficaz, que foi superior a abordagem baseada em lipofecção, a qual não apresentou sucesso nas transfecções. Foram realizadas cinco tentativas de lipofecções com o protocolo utilizando o método químico (lipídios) e nenhuma delas se mostrou eficiente na edição das células THP-1. Já o protocolo baseado na eletroporação, foi eficiente na primeira tentativa, gerando células modificadas geneticamente em 60% das transfecções com o dsDNA MUT e 40% nas transfecções com o dsDNA CTL.

Análise de expressão gênica nas células THP-1 modificadas com a variante L162V

Com o sucesso da inserção da mutação L162V nas células THP-1, foi então avaliado o papel dessa variante na modulação do nível de expressão gênica global nessas células da linhagem monoclônica. Para tanto, as abordagens aqui descritas destinam-se a entender se a variante L162V pode influenciar na modulação de genes chave que atuam na resposta parasito-hospedeiro na infecção por *Leishmania infantum*. Como mencionado anteriormente, foi possível detectar que indivíduos saudáveis possuindo pelo menos um alelo mutado L162V, apresentam quase quatro vezes mais chances de contrair a doença do que indivíduos que não possuem a mutação (razão de chances 3,91 e intervalo de confiança 1,38-11,07).

Estudos demonstraram que níveis lipídicos podem ser utilizados para avaliar o risco de infecção e desenvolvimento de leishmaniose visceral, além disso, elementos lipídicos não-imunes têm uma correlação com a infecção por *L. infantum* (Alonso et al., 2007, Seçmeer et al., 2006).

Um estudo realizado demonstrou que o polimorfismo L162V do gene PPARA é um marcador de risco para a infecção sintomática, porém o gene mutado não foi associado a níveis lipídicos alterados, no estudo, foi levantada a hipótese de que uma possível explicação para esse acontecimento é o baixo número de indivíduos que apresentam o alelo com a valina, uma vez que o alelo tem uma frequência baixa na população (10,8%) e apenas o perfil lipídico de 8 indivíduos foi medido (Carvalho et al., 2014).

Diante do exposto, a hipótese de que essa mutação específica do gene PPARA poderia modular vias lipídicas, não foi descartada e de acordo com os dados levantados da literatura, expostos neste trabalho, continuaram sendo consideradas como relevantes para um estudo funcional. Dessa forma, ao considerar as análises transcricionais, os principais genes a serem avaliados, foram os relacionados ao metabolismo lipídico e de colesterol, no entanto, os resultados apresentados mostraram pouca relação com vias lipídicas e, contrariamente do que era esperado, a maior parte das alterações foram relacionadas a genes e vias do sistema imune.

A comparação entre as células selvagens (WT) e a mutada em PPARA L162V (MUT) gerou 902 genes diferencialmente expressos, que quando submetidos a análise de enriquecimento funcional de vias, foram, em sua maior parte relacionados a funções moleculares do sistema imune, por exemplo: fagocitose, ativação de neutrófilos, resposta contra patógenos, ativação de células T, etc. Como é o caso dos genes CD209, envolvido na apresentação de antígenos, CD4, expresso na superfície de macrófagos e células T, CCL3, quimiocina 3, NCF2, fator 2 do citosol de neutrófilos e HLA-DRB1, antígeno de histocompatibilidade HLA classe II, cadeia beta DRB1. Também foram encontrados genes envolvidos na resposta imune contra *Leishmania spp.* (ITGB2, ELK1, FCGR2A, NCF2, STAT 1, HLA-DRB1, MYDB88, TGFB3, HLA-DRA, NFKBIA e ITGAM). A comparação entre as células contendo o cassete de resistência a neomicina (CTL) e as células mutadas (MUT) gerou 799 genes com resultados similares, apontando também para vias do sistema imune, quando submetidos a análise de enriquecimento de vias.

Dentre os genes significativamente expressos presentes apenas nas comparações WT x MUT e CTL x MUT, está o HLA-DRB1. Em uma avaliação mais aprofundada, foi encontrado um estudo recente, sobre o risco genético de LV, que buscou entender o papel do HLA-DRB1 como um fator de risco genético importante na LV, neste estudo

foi demonstrado que variantes comuns na região HLA de classe II HLA-DRB1-HLA-DQA1 estão associadas à suscetibilidade à LV (Blackwell et al., 2020).

Outros genes comuns entre comparações WT x MUT e CTL x MUT como: CCL3, IL1RN e STAT2, foram identificados como genes regulados pelo PPARA em camundongos em vias relacionadas à inflamação (Kersten et al., 2010). Além disso, foi demonstrado que o gene CCL3 possui papel de secretar neutrófilos na primeira onda de recrutamento de células dendríticas para o local de infecção com *L. major*, sugerindo que a liberação seletiva de quimiocinas secretadas por neutrófilos pode regular o desenvolvimento da resposta imune contra patógenos (Navas et al., 2014). A comparação entre as células selvagens (WT) e as células contendo o cassete de resistência a neomicina (CTL), gerou apenas 330 genes diferencialmente expressos e as análises de enriquecimento de vias apontaram, em sua maior parte, mecanismos naturais e estruturais das células, como mobilidade celular, migração, junção neuromuscular e vias relacionadas ao câncer.

Os dados aqui descritos sugerem que há uma semelhança entre as amostras WT e CTL, uma vez que quando comparadas entre si, geraram poucos genes diferencialmente expressos e quando ambas são comparadas à amostra MUT, separadamente, geram uma resposta similar: um número significativo de genes relacionados ao sistema imune. Sendo assim, o cassete de resistência a neomicina parece não exercer influência relevante na modulação das vias descritas anteriormente e o que parece estar influenciando a modulação desses genes relacionados a resposta imune nas células THP-1, é a variante L162V, dado que a única diferença entre as amostras CTL e MUT, é a substituição de uma leucina por uma valina. Na tabela com as vias enriquecidas, é possível verificar uma quantidade significativa de genes relacionados a mecanismos do sistema imune para as comparações WT x MUT e CTL x MUT, em ambas as comparações, foi observado enriquecimento de vias relacionadas a mecanismos da imunidade inata, ativação de leucócitos, ativação de neutrófilos, exocitose, resposta a interferon do tipo I e ativação de granulócitos. Tais mecanismos estão envolvidos na resposta contra patógenos (Beutler, 2004), (Ellis & Beaman, 2004). Além disso, as análises de KEGG, também mostraram vias de resposta específica a *Leishmania spp.*, fagossomo e lisossomo.

A alteração funcional de vias imunes sugere que essa variante pode desempenhar um papel importante na regulação de genes e vias relacionados a mecanismos do sistema imune. Já é conhecido que o PPARA regula diferentes aspectos das respostas imunes, incluindo inflamação e produção de citocinas. Além disso, vários estudos mostraram evidências de que os agonistas do PPARA têm efeitos potentes na regulação das respostas imunes (Yang et al., 2008, Kim et al., 2017). Dessa forma, o estudo da variante L162V na resposta imune contra patógenos mostra-se promissor. Ademais, mais investigações podem ser desenvolvidas nesse sentido, utilizando as células THP-1 geneticamente modificadas com a variante L162V, para avaliar o efeito dessa modificação na infecção por *Leishmania infantum* e na resposta contra esses patógenos, e utilizando drogas agonistas do PPARA pós infecção por esses parasitos a fim de avaliar se existe alguma diferença na resposta imune, com e sem a administração desses compostos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alonso, D. P., Ferreira, A. F. B., Ribolla, P. E. M., Santos, I. K. F. D. M., Pires E Cruz, M. D. S., De Carvalho, F. A., Abatepaulo, A. R. R., Costa, D. L., Werneck, G. L., Farias, T. J. C., Soares, M. J. S., & Costa, C. H. N. (2007). Genotypes of the mannan-binding lectin gene and susceptibility to visceral leishmaniasis and clinical complications. *Journal of Infectious Diseases*, *195*(8), 1212–1217. <https://doi.org/10.1086/512683>
- Alvar, J., Vélez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., & de Boer, M. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS ONE*, *7*(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035671>
- Andrade-Neto, V. V., Cicco, N. N. T., Cunha-Junior, E. F., Canto-Cavalheiro, M. M., Atella, G. C., & Torres-Santos, E. C. (2011). The pharmacological inhibition of sterol biosynthesis in *Leishmania* is counteracted by enhancement of LDL endocytosis. *Acta Tropica*, *119*(2–3), 194–198. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2011.05.001>
- Attakpa, E., Hichami, A., Simonin, A. M., Sansón, E. G., Dramane, K. L., & Khan, N. A. (2009). Docosahexaenoic acid modulates the expression of T-bet and GATA-3 transcription factors, independently of PPAR α , through suppression of MAP kinase activation. *Biochimie*, *91*(11–12), 1359–1365. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2009.09.012>
- BEKAERT, E. D., DOLE, E., DUBOIS, D. Y., BOUMA, M. -E, LONTIE, J. -F, KALLEL, R., MALMENDIER, C. L., & AYRAULT-JARRIER, M. (1992). Alterations in lipoprotein density classes in infantile visceral Leishmaniasis: presence of apolipoprotein SAA. *European Journal of Clinical Investigation*, *22*(3), 190–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2362.1992.tb01825.x>
- Bekaert, E. D., Kallel, R., Bouma, M. E., Lontie, J. F., Mebazaa, A., Malmendier, C. L., & Ayrault-Jarrier, M. (1989). Plasma lipoproteins in infantile visceral Leishmaniasis: deficiency of apolipoproteins A-I and A-II. *Clinica Chimica Acta*, *184*(2), 181–191. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(89\)90288-X](https://doi.org/10.1016/0009-8981(89)90288-X)
- Berger, J., & Moller, D. E. (2002). *Tm a ppar*.
- Beutler, B. (2004). Innate immunity: An overview. *Molecular Immunology*, *40*(12), 845–859. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2003.10.005>
- Blackwell, J. M., Fakiola, M., & Castellucci, L. C. (2020). Human genetics of leishmania infections. *Human Genetics*, *M1*. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02130-w>
- BRASIL. (2016). Volume único Volume único. *The New England Journal of Medicine*, *773*. http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_saude_led_atual.pdf
- Camargo-neves, V. L. F. De. (2007). Avaliação do hábito alimentar de. *Boletim Epidemiológico Paulista*, *4*, 2–7.
- Carvalho, M. D. T., Alonso, D. P., Vendrame, C. M. V., Costa, D. L., Costa, C. H. N.,

- Werneck, G. L., Ribolla, P. E. M., & Goto, H. (2014). Lipoprotein lipase and PPAR alpha gene polymorphisms, increased very-low-density lipoprotein levels, and decreased high-density lipoprotein levels as risk markers for the development of visceral leishmaniasis by leishmania infantum. *Mediators of Inflammation*, 2014(VI). <https://doi.org/10.1155/2014/230129>
- Chakraborty, D., Banerjee, S., Sen, A., Banerjee, K. K., Das, P., & Roy, S. (2005). Leishmania donovani Affects Antigen Presentation of Macrophage by Disrupting Lipid Rafts. *The Journal of Immunology*, 175(5), 3214–3224. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.3214>
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W., Alvar, J., & Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5(11), 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>
- Chylinski, K., Le Rhun, A., & Charpentier, E. (2013). The tracrRNA and Cas9 families of type II CRISPR-Cas immunity systems. *RNA Biology*, 10(5), 726–737. <https://doi.org/10.4161/rna.24321>
- Desjeux, P. (2004). Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 27(5), 305–318. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>
- Duval, C., Müller, M., & Kersten, S. (2007). PPAR α and dyslipidemia. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(8), 961–971. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.05.003>
- Ellis, T. N., & Beaman, B. L. (2004). Interferon- γ activation of polymorphonuclear neutrophil function. *Immunology*, 112(1), 2–12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2004.01849.x>
- Ferreira, C. N., Carvalho, M. G., Fernandes, A. P. S. M., Lima, L. M., Loures-Valle, A. A., Dantas, J., Janka, Z., Palotás, A., & Sousa, M. O. (2010). Comparative study of apolipoprotein-E polymorphism and plasma lipid levels in dyslipidemic and asymptomatic subjects, and their implication in cardio/cerebro-vascular disorders. *Neurochemistry International*, 56(1), 177–182. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2009.09.016>
- Galetto, R., Albajar, M., Polanco, J. I., Zakin, M. M., & Rodríguez-rey, J. C. (2001). Identification of a peroxisome-proliferator-activated-receptor response element in the apolipoprotein E gene control region. *Biochemical Journal*, 357(2), 521–527. <https://doi.org/10.1042/0264-6021:3570521>
- Gbaguidi, F. G., Chinetti, G., Milosavljevic, D., Teissier, E., Chapman, J., Olivecrona, G., Fruchart, J. C., Griglio, S., Fruchart-Najib, J., & Staels, B. (2002). Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) agonists decrease lipoprotein lipase secretion and glycated LDL uptake by human macrophages. *FEBS Letters*, 512(1–3), 85–90. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02223-8](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02223-8)
- Gennequin, B., Otte, D. M., & Zimmer, A. (2013). CRISPR/Cas-induced double-strand breaks boost the frequency of gene replacements for humanizing the mouse Cnr2 gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 441(4), 815–819. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.10.138>

- Haraguchi, G., Kobayashi, Y., Brown, M. L., Tanaka, A., Isobe, M., Gianturco, S. H., & Bradley, W. A. (2003). PPAR α and PPAR γ activators suppress the monocyte-macrophage apoB-48 receptor. *Journal of Lipid Research*, 44(6), 1224–1231. <https://doi.org/10.1194/jlr.M300077-JLR200>
- Karimi, A., Alborzi, A., & Amanati, A. (2016). *Visceral Leishmaniasis : An Update and Literature Review Visceral Leishmaniasis : An Update and Literature Review*. June. <https://doi.org/10.5812/pedinfect.31612>
- Kersten, S., Rakhshandehroo, M., Knoch, B., & Müller, M. (2010). Peroxisome proliferator-activated receptor alpha target genes. *PPAR Research*, 2010. <https://doi.org/10.1155/2010/612089>
- Kim, Y. S., Lee, H.-M., Kim, J. K., Yang, C.-S., Kim, T. S., Jung, M., Jin, H. S., Kim, S., Jang, J., Oh, G. T., Kim, J.-M., & Jo, E.-K. (2017). PPAR- α Activation Mediates Innate Host Defense through Induction of TFEB and Lipid Catabolism. *The Journal of Immunology*, 198(8), 3283–3295. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1601920>
- Lal, C. S., Kumar, A., Kumar, S., Pandey, K., Kumar, N., Bimal, S., Sinha, P. K., & Das, P. (2007). Hypocholesterolemia and increased triglyceride in pediatric visceral leishmaniasis. *Clinica Chimica Acta*, 382(1–2), 151–153. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2007.04.007>
- Lainson, R & Rangel, EF. *Lutzomyia longipalpis* and the ecoepidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2005; 100: 811-27.
- Liberopoulos, E., Alexandridis, G., Bairaktari, E., & Elisaf, M. (2002). Severe hypocholesterolemia with reduced serum Lipoprotein(a) in a patient with visceral leishmaniasis. *Annals of Clinical and Laboratory Science*, 32(3), 305–308.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., & RANDALL, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, 193(1), 265–275. [https://doi.org/10.1016/s0021-9258\(19\)52451-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9258(19)52451-6)
- Navas, A., Vargas, D. A., Freudzon, M., McMahon-Pratt, D., Saravia, N. G., & Gómez, M. A. (2014). Chronicity of dermal leishmaniasis caused by *Leishmania panamensis* is associated with parasite-mediated induction of chemokine gene expression. *Infection and Immunity*, 82(7), 2872–2880. <https://doi.org/10.1128/IAI.01133-13>
- Nieto, C. G., Barrera, R., Habela, M. A., Navarrete, I., Molina, C., Jiménez, A., & Serrera, J. L. (1992). Changes in the plasma concentrations of lipids and lipoprotein fractions in dogs infected with *Leishmania infantum*. *Veterinary Parasitology*, 44(3–4), 175–182. [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(92\)90115-P](https://doi.org/10.1016/0304-4017(92)90115-P)
- Papapetrou, E. P., Zoumbos, N. C., & Athanassiadou, A. (2005). Genetic modification of hematopoietic stem cells with nonviral systems: Past progress and future prospects. *Gene Therapy*, 12, S118–S130. <https://doi.org/10.1038/sj.gt.3302626>
- Pigott, D. M., Bhatt, S., Golding, N., Duda, K. A., Battle, K. E., Brady, O. J., Messina, J. P., Balard, Y., Bastien, P., Pratlong, F., Brownstein, J. S., Freifeld, C. C., Mekaru, S. R., Gething, P. W., George, D. B., Myers, M. F., Reithinger, R., & Hay, S. I. (2014). Global distribution maps of the leishmaniasis. *ELife*, 3, 1–21.

<https://doi.org/10.7554/eLife.02851>

- Pucadyil, T. J., & Chattopadhyay, A. (2007). Cholesterol: a potential therapeutic target in Leishmania infection? *Trends in Parasitology*, 23(2), 49–53. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.12.003>
- Pucadyil, T. J., Tewary, P., Madhubala, R., & Chattopadhyay, A. (2004). Cholesterol is required for Leishmania donovani infection: Implications in leishmaniasis. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 133(2), 145–152. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.10.002>
- Ready, PD. (2014). Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*, 6(1), 147–154. <https://doi.org/10.2147/CLEP.S44267>
- Rigamonti, E., Chinetti-Gbaguidi, G., & Staels, B. (2008). Regulation of macrophage functions by PPAR- α , PPAR- γ , and LXRs in mice and men. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(6), 1050–1059. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.107.158998>
- Rodrigues, V., Cordeiro-Da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R., & Estaquier, J. (2016). Regulation of immunity during visceral Leishmania infection. *Parasites and Vectors*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1412-x>
- Rosenzweig, D., Smith, D., Opperdoes, F., Stern, S., Olafson, R. W., & Zilberstein, D. (2008). Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. *The FASEB Journal*, 22(2), 590–602. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9254com>
- Sacks, D., & Noben-Trauth, N. (2002). The immunology of susceptibility and resistance to Leishmania major in mice. *Nature Reviews Immunology*, 2(11), 845–858. <https://doi.org/10.1038/nri933>
- São Paulo. (2006). *Secretaria de Estado da Saúde. Superintendência de Controle de Endemias. Coordenadoria de Controle de Doenças. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral americana do estado de São Paulo*. 161 p.
- Shy B, Macdougall M, Clarke R, Merrill B. Co-incident insertion enables high efficiency genome engineering in mouse embryonic stem cells. *Nucleic Acids Res*. 2016;44:gkw685. doi:10.1093/nar/gkw685
- Scheer, N., Snaith, M., Wolf, C. R., & Seibler, J. (2013). Generation and utility of genetically humanized mouse models. *Drug Discovery Today*, 18(23–24), 1200–1211. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2013.07.007>
- Seçmeer, G., Cengiz, A. B., Gürgey, A., Kara, A., Cultu, O., Tavil, B., & Devrim, I. (2006). Hypertriglyceridemia and decreased high-density lipoprotein could be a clue for visceral leishmaniasis. *Infectious Diseases in Clinical Practice*, 14(6), 401–402. <https://doi.org/10.1097/01.idc.0000219053.50922.99>
- Sen, S., Roy, K., Mukherjee, S., Mukhopadhyay, R., & Roy, S. (2011). Restoration of ifn γ subunit assembly, ifn γ signaling and parasite clearance in leishmania donovani infected macrophages: Role of membrane cholesterol. *PLoS Pathogens*, 7(9). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002229>
- Tewary, P., Veena, K., Pucadyil, T. J., Chattopadhyay, A., & Madhubala, R. (2006). The sterol-binding antibiotic nystatin inhibits entry of non-opsonized Leishmania

- donovani into macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 339(2), 661–666. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.11.062>
- Werneck, G. L. (2008). Forum: Geographic spread and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. Introduction. *Cadernos de Saude Publica*, 24(12), 2937–2940. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2008001200023>
- Yang, Y., Gocke, A. R., Lovett-Racke, A., Drew, P. D., & Racke, M. K. (2008). PPAR alpha regulation of the immune response and autoimmune encephalomyelitis. *PPAR Research*, 2008. <https://doi.org/10.1155/2008/546753>
- Yessoufou, A., Hichami, A., Besnard, P., Moutairou, K., & Khan, N. A. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor α deficiency increases the risk of maternal abortion and neonatal mortality in murine pregnancy with or without diabetes mellitus: Modulation of T cell differentiation. *Endocrinology*, 147(9), 4410–4418. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0067>
- Yessoufou, A., & Wahli, W. (2010). Multifaceted roles of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) at the cellular and whole organism levels. *Swiss Medical Weekly*, 140(SEPTEMBER), 1–9. <https://doi.org/10.4414/smw.2010.13071>
- Yu, X., Liang, X., Xie, H., Kumar, S., Ravinder, N., Potter, J., Mollerat, X. De, & Chesnut, J. D. (2016). Improved delivery of Cas9 protein / gRNA complexes using lipofectamine CRISPRMAX. *Biotechnology Letters*, 38(6), 919–929. <https://doi.org/10.1007/s10529-016-2064-9>