



**INSTITUTO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIAS
DA VIDA E DA NATUREZA (ILACVN)**

BIOTECNOLOGIA

***DESIGN, ASSEMBLY, CLONAGEM E PRESERVAÇÃO DE CIRCUITOS
GENÉTICOS PARATRANSGÊNICOS PARA PREVENÇÃO DA LEISHMANIOSE
VISCERAL***

GIULIO MENDES BRAATZ

Foz do Iguaçu
2023

***DESIGN, ASSEMBLY, CLONAGEM E PRESERVAÇÃO DE CIRCUITOS
GENÉTICOS PARATRANSGÊNICOS DE PREVENÇÃO À LEISHMANIOSE
VISCERAL***

GIULIO MENDES BRAATZ

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto Latino-Americano Ciências da vida e da natureza da Universidade Federal da Integração Latino-Americana, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Cristian Antonio Rojas

Foz do Iguaçu
2023

AGRADECIMENTOS

À minha Mãe, Maria Helena, por sempre acreditar em mim e fazer de tudo para que eu tivesse a melhor educação.

À minha namorada, Rosane, por partilhar comigo todos os bons e maus momentos vividos nos anos de graduação e por ser meu porto seguro.

À UNILA, por me apresentar a beleza da integração latino americana e expandir meus horizontes.

Ao professor Dr. Cristian Rojas, por acreditar em ideias malucas e em mim, assim como no SynFronteras.

Aos professores doutores Rafaella Bonugli-Santos, Kelvison Viana, Jorge Ruiz e Marcelo Ramalho-Ortigão, pelo apoio propiciado para que esse projeto pudesse se tornar realidade.

Aos meus amigos Matheus, Maria e Samuel, pelos cafezinhos inspiradores na Unioeste e por terem sido os primeiros a acreditar que dava para fazer biologia sintética na tríplice fronteira.

Ao SynFronteras, aos membros antigos por abrirem os caminhos e aos novos membros por darem continuidade de forma primorosa a esta organização.

Às Comunidades de biologia sintética brasileira e latino-americana por serem acolhedoras e estarem dispostas a ajudar quem está começando.

RESUMO

A Leishmaniose visceral canina tem registrado um aumento significativo de casos na região oeste do Paraná nos últimos anos, e os métodos de prevenção atuais mostram-se insuficientes para conter o avanço da doença nessa região e em outras partes do Brasil, devido a desafios de implementação. Diante desse cenário, torna-se imperativo desenvolver e aprimorar novas alternativas que possam desacelerar esse avanço. A paratransgênese surge como uma abordagem promissora ao modificar microrganismos presentes na microbiota do vetor da leishmaniose para que passem a produzir moléculas leishmanicidas. Este estudo foca no potencial da paratransgênese e emprega os princípios da biologia sintética para proporcionar padronização, previsibilidade e modularidade a essa estratégia, ainda pouco explorada em pesquisas sobre o tema. Além disso, destaca-se como a primeira pesquisa da UNILA a adentrar o campo da biologia sintética. O trabalho consiste na construção de quatro circuitos genéticos, seguindo os preceitos da biologia sintética, com o intuito de aplicá-los em estratégias de paratransgênese para o controle efetivo da Leishmaniose Visceral. Este estudo não apenas aborda desafios específicos no contexto da Leishmaniose Visceral, mas também estabelece uma base para futuras pesquisas, proporcionando um arcabouço valioso para a expansão do conhecimento e aprimoramento das estratégias de controle da doença.

Palavras-chave: Paratransgênese, Biologia sintética, Leishmaniose Visceral.

ABSTRACT

Canine visceral leishmaniasis has seen a significant increase in cases in the western region of Paraná in recent years, and current prevention methods have proven insufficient to contain the disease's progression in this and other parts of Brazil, primarily due to implementation challenges. Therefore, new and improved alternatives need to be developed to slow down this advancement. Paratransgenesis emerges as a promising approach by modifying microorganisms present in the leishmaniasis vector's microbiota to produce leishmanicidal molecules. This study focuses on the potential of paratransgenesis and employs the principles of synthetic biology to provide standardization, predictability, and modularity to this strategy, an area still underexplored in research on the subject. Additionally, it stands out as the first research at UNILA to delve into the field of synthetic biology. The work involves constructing four genetic circuits, following the tenets of synthetic biology, with the aim of applying them in paratransgenic strategies for effective control of Visceral Leishmaniasis. This study not only addresses specific challenges in the context of Visceral Leishmaniasis but also establishes a foundation for future research, providing a valuable framework for expanding knowledge and enhancing disease control strategies.

Keywords: Paratransgenesis, Synthetic Biology, Visceral Leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo da Leishmania	11
Figura 2 - Modo de ação da paratransgênese	13
Figura 3 - Comparação entre componentes da eletrônica e biologia sintética	16
Figura 4 - Como ocorre o Gibson assembly	17
Figura 5 - Esquema do cassete de expressão de AMPs	26
Figura 6 - Exemplo de visualização de plasmídeo produzido no benchling	28
Figura 7 - Alinhamento dos plasmídeos pUC19 e pBBR1MCS-2	28
Figura 8 - NEBuilder indica se está havendo a sobreposição esperada	29
Figura 9 - Eletroforese em gel de agarose do circuito 1	30
Figura 10 - PCR de colônia dos circuitos 2, 3 e 4	30

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	9
1.1. Leishmaniose Visceral.....	9
1.2. Alternativas de controle da LV.....	11
1.3. Paratransgênese.....	12
1.4. Biologia sintética.....	14
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Geral.....	18
2.2. Específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4. RESULTADOS.....	21
4.1. Escolha do chassi.....	21
4.2. Escolha das moléculas efetoras.....	22
4.4. Benchling - Software para design, visualização e análise de DNA....	26
4.5. Design dos overhangs.....	27
4.6. Assembly dos fragmentos de DNA e clonagem.....	28
4.7. Depósito das sequências em bases de dados.....	29
5. DISCUSSÃO.....	30
5.1. Desafios enfrentados para se fazer biologia sintética na UNILA.....	31
5.2. Resolução de problemas relacionados ao assembly.....	32
6. CONCLUSÃO.....	33
7. REFERÊNCIAS.....	35
6. ANEXOS.....	41
6.1. Anexo 1 – gBlocks®.....	41

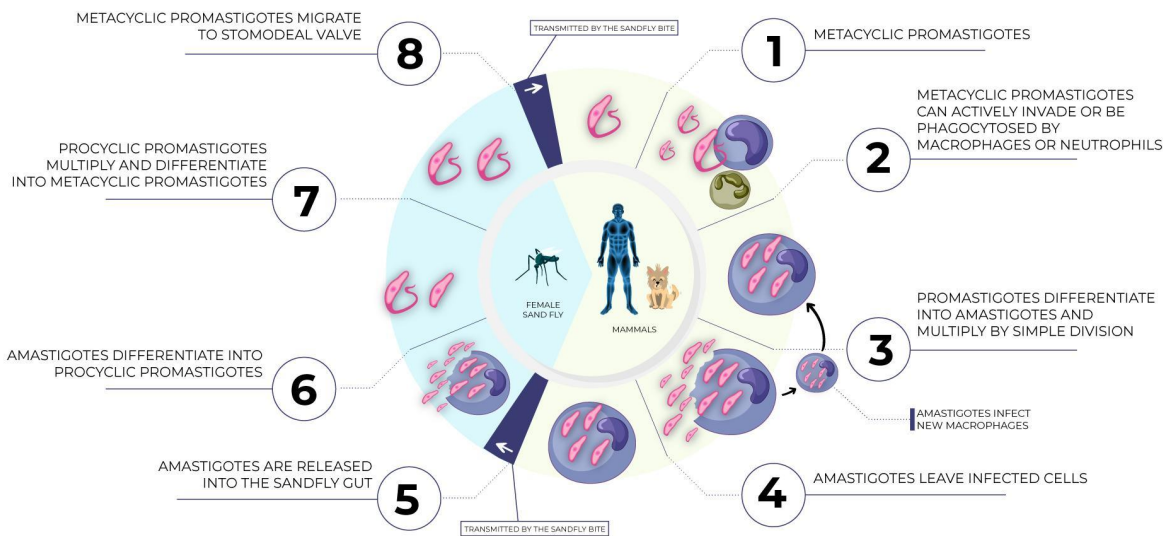
1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose visceral (LV) é uma zoonose tropical negligenciada causada pelo parasita *Leishmania infantum* e transmitida pelo flebotomíneo *Lutzomyia longipalpis* na região de Foz do Iguaçu (Soccol *et al.*, 2017). A infecção se dá através de várias etapas: primeiramente, fêmeas de *L. longipalpis* se alimentam do sangue de animais infectados, adquirindo a *Leishmania* em sua forma amastigota (intracelular). Dentro do intestino médio do vetor, o parasita passa por metaciclos até atingir sua forma infecciosa, promastigota (extracelular e flagelada). Nessa etapa o parasita já está pronto para infectar outros animais e o flebotomíneo pode transmiti-lo ao tentar se alimentar do sangue de outros animais (Figura 1) (Serafim *et al.*, 2021). Os cães são o principal reservatório da doença, isso porque apresentam alta multiplicação do parasita em sua pele, aumentando as chances do flebotomíneo adquirir a leishmania ao picá-los (Dias *et al.*, 2020). Nos humanos a doença é mais rara e tende a afetar crianças abaixo de 10 anos e imunossuprimidos (Organização Pan-Americana da Saúde, 2022)

Os casos de leishmaniose visceral em cachorros (LVc) estão diretamente associados a um maior risco de infecção em humanos, portanto estratégias para o controle da doença nos cães também podem obter efeito no controle da doença humana (Marcondes e Day, 2019).

Figura 1 – Ciclo da Leishmania



Fonte: Adaptado de (ANVERSA et al., 2018)

Segundo a organização mundial da Saúde (OMS), 95% dos casos de LV são fatais se não tratados e estima-se que ocorram entre 50 e 90 mil novos diagnósticos todos os anos, mundialmente. 90% de todos os casos reportados em 2020 ocorreram em apenas 10 países, são eles o Brasil, China, Etiópia, Eritreia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul, Sudão e Iêmen (Organização Mundial da Saúde, 2023).

Do total de casos reportados nas Américas em 2020, 97% estavam no Brasil, seguidos por seus vizinhos na tríplice fronteira de Foz do Iguaçu, Paraguai e Argentina (Organização Pan-Americana da Saúde, 2022).

Os primeiros casos autóctones de LVc em Foz do Iguaçu foram relatados em 2012, e a primeira documentação de casos aconteceu em 2015, confirmando *L. longipalpis* como o agente etiológico da doença. Em 2017, Soccol e colaboradores, através de testagem em massa, inferiram que 23,8% (13085) dos cães da cidade possuíam o parasita, demonstrando que a doença é endêmica no extremo oeste do Paraná e que há grande risco para humanos que residem nessa região (Soccol *et al.*, 2017).

1.2. Alternativas de controle da LV

As principais formas de controle da LV atualmente são através de inseticidas aplicados nos locais de incidência de casos, coleiras impregnadas com inseticidas, vacinas e eutanásia de cães (Sevá *et al.*, 2016).

Inseticidas foram por muito tempo considerados a melhor forma de se prevenir doenças transmitidas por insetos, porém seu uso está associado a muitos problemas, como o risco a outros animais, bioacumulação, desenvolvimento de resistência no vetor e má aceitação da população (Stockdale e Newton, 2013).

Em algumas regiões da Índia, o principal método de prevenção ainda é através de inseticidas, mais especificamente a aplicação *indoor* de DDT, que é considerado tóxico e que atualmente é proibido para utilização em lavouras no Brasil e diversos outros países do mundo devido ao seu efeito acumulativo no organismo e consequências ambientais que gera (Turusov, Rakitsky e Tomatis, 2002; Sundar, Singh e Chakravarty, 2018).

Coleiras impregnadas com inseticidas são consideradas o melhor método atual de prevenção da Leishmaniose. Segundo modelagem matemática, quando são utilizadas por grande parte da população de cães (>90%), as coleiras conseguem reduzir os casos de LVc a zero (Sevá *et al.*, 2016). Porém, a revisão sistemática e meta análise de Yimam e Moheballi (2020) sugere que esses números são bem menores quando testados em condições de semi-campo (54%). Fora de um ambiente controlado, provavelmente esses valores seriam ainda menores, devido ao alto número de animais de rua do Brasil, à destruição das coleiras por parte de alguns animais e ainda, pela negligência dos tutores com o prazo de validade das coleiras.

Atualmente, no Brasil, a única vacina licenciada e permitida para venda é a Leish-Tec®, que contém proteína A2 recombinante e adjuvante saponina em sua composição (Grimaldi *et al.*, 2017). No entanto, em maio de 2023, a comercialização da Leish-Tec® foi suspensa devido a "desvios de conformidade". Esta decisão foi tomada pelas autoridades de saúde em resposta a irregularidades identificadas no processo de fabricação ou distribuição da referida vacina.

Até o momento, não há previsão definida para o retorno da comercialização da Leish-Tec®, o que impacta a disponibilidade de uma opção de imunização contra a leishmaniose no país.

O Brasil e outros países da América Latina (Argentina, Uruguai e Paraguai) já tiveram a eutanásia de cães infectados como principal método de controle da LV. Essa foi uma medida bem controversa, que chegou a eliminar 176 mil cães só no Brasil entre 1990 e 1997 e que não obteve bons resultados, evidenciados pelo aumento de casos de LV nos anos seguintes (Sousa-Paula *et al.*, 2019).

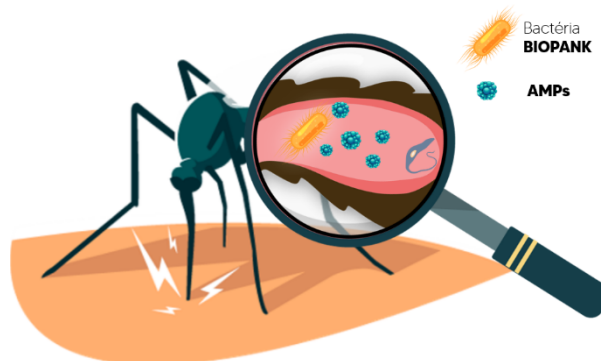
Segundo Marcondes e Day (2019), a baixa efetividade do uso da eutanásia como método de prevenção da LV se dá por 4 fatores: (1) a alta incidência de infecção e infecciosidade em áreas de endemia; (2) a dificuldade de correta identificação de animais infectados devido à baixa sensibilidade e especificidade dos atuais testes sorológicos; (3) o longo tempo entre a detecção dos cães infectados e a eutanásia (de 80 à 180 dias); (4) a tendência de substituição dos cães eutanasiados por novos filhotes, muitas vezes sendo mais de um, gerando uma população jovem que pode ser ainda mais suscetível a LVc.

1.3. Paratransgênese

Levando em conta o panorama da falta de sucesso das atuais estratégias de controle de Leishmaniose, novas estratégias precisam ser criadas e aperfeiçoadas para que a prevenção da doença possa ser feita de forma eficiente (Wilke e Marrelli, 2015).

A paratransgênese é uma estratégia que visa o controle de doenças transmissíveis por vetores, como a leishmaniose, malária, doença de chagas, entre outras. Ela consiste na modificação genética de um microrganismo presente na microbiota do vetor da doença para que ele passe a produzir moléculas antipatogênicas, e depois replicá-lo e reintroduzi-lo no vetor, dessa forma impedindo o desenvolvimento do parasita (Figura 2) (Coutinho-Abreu, Zhu e Ramalho-Ortigao, 2010; Wilke e Marrelli, 2015).

Figura 2 - Modo de ação da paratransgênese



Fonte: Elaborado pelo autor

O primeiro relato de utilização desta técnica foi realizado por Durvasula *et al.* (1997), no qual a bactéria *Rhodococcus rhodnii*, endossimbionte do vetor *Rhodnius prolixus*, foi transformada para expressar cecropina A, um peptídeo antimicrobiano letal ao parasita *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de chagas. Como resultado, foi observada redução de 99% na intensidade da infecção por *T. cruzi* no intestino posterior de *R. prolixus*, e não houve interferência no crescimento populacional do inseto.

O uso da paratransgênese para o controle da transmissão de leishmaniose foi demonstrado pela primeira vez por Hurwitz *et al.* (2011). Os pesquisadores fizeram uma prova de conceito para demonstrar que a bactéria *Bacillus subtilis* poderia ser usada para produzir moléculas heterólogas dentro do intestino médio de *Phlebotomus argentipes*.

Essa pesquisa serve como base para outros estudos relacionados ao uso da paratransgênese na prevenção da leishmaniose, como a busca por novos e mais eficientes candidatos bacterianos para produção de antiparasitários e a escolha de moléculas efetoras com maior eficácia contra as diferentes espécies de *Leishmania*.

O candidato bacteriano (também chamado de chassis na biologia sintética) ideal para a paratransgênese é preferencialmente uma bactéria simbiote do vetor, que possa ser manipulada geneticamente e cultivada em laboratório, que seja boa produtora de proteínas e segura à saúde humana e a de outros animais (Wijerathna, Gunathunga e Gunathilaka, 2020).

Apesar de simbioses de flebotomíneos nunca terem sido descobertos, estudos da microbiota desses insetos puderam identificar várias associações com bactérias que possuem outras características pertinentes à paratransgênese como as do gênero *Bacillus*, *Enterobacter* e *Serratia* (Campolina *et al.*, 2020).

Com exceção da simbiose, a bactéria *Bacillus subtilis* cumpre com todos os requisitos para escolha do chassis para paratransgênese e ainda, possui a capacidade de esporulação, que pode ser usada para a proteção na fase de disseminação da bactéria geneticamente engenheirada para os flebotomíneos (Riley *et al.*, 2021).

O uso de microrganismos como biofábricas para produção de proteínas já é realidade há algum tempo (Mattanovich *et al.*, 2012; Overton, 2014; Zhang, Su e Wu, 2020). O grande desafio da paratransgênese é fazer com que o chassis escolhido seja capaz de produzir quantidade suficiente de moléculas efetoras dentro de um ambiente instável, como o intestino médio de *L. longipalpis*. Essa molécula terá como objetivo a morte ou a interrupção do desenvolvimento da *Leishmania* dentro do vetor (Wijerathna, Gunathunga e Gunathilaka, 2020).

Alguns fatores devem ser analisados na escolha da molécula a ser produzida pela bactéria engenheirada, com ela tendo, preferencialmente: Alto nível de toxicidade à *Leishmania*; baixa ou nenhuma toxicidade à bactérias; nenhuma toxicidade à células animais; alta especificidade; tamanho pequeno e nível de complexidade de produção baixo. Nesse sentido, dois tipos de moléculas se destacam: Os Peptídeos Antimicrobianos (AMPs) e os fragmentos variáveis de cadeia única (scFv), sendo que o primeiro possui a desvantagem de não ser altamente específico e o segundo de ter produção mais complexa e não ser tão efetivo quanto o primeiro (Hurwitz *et al.*, 2014).

Os AMPs constituem uma classe distintiva de moléculas de natureza proteica que possuem papel nos sistemas imunológicos de diversos organismos, que abrangem desde seres humanos até microorganismos. Caracterizados por propriedades antimicrobianas, esses peptídeos ostentam a habilidade de erradicar ou inibir o desenvolvimento de microrganismos, englobando bactérias, fungos e vírus. O mecanismo multifacetado de ação dos AMPs abarca estratégias diversas, mas a mais comum é a indução de permeabilização da membrana celular, culminando na formação de poros ou canais, e, por conseguinte,

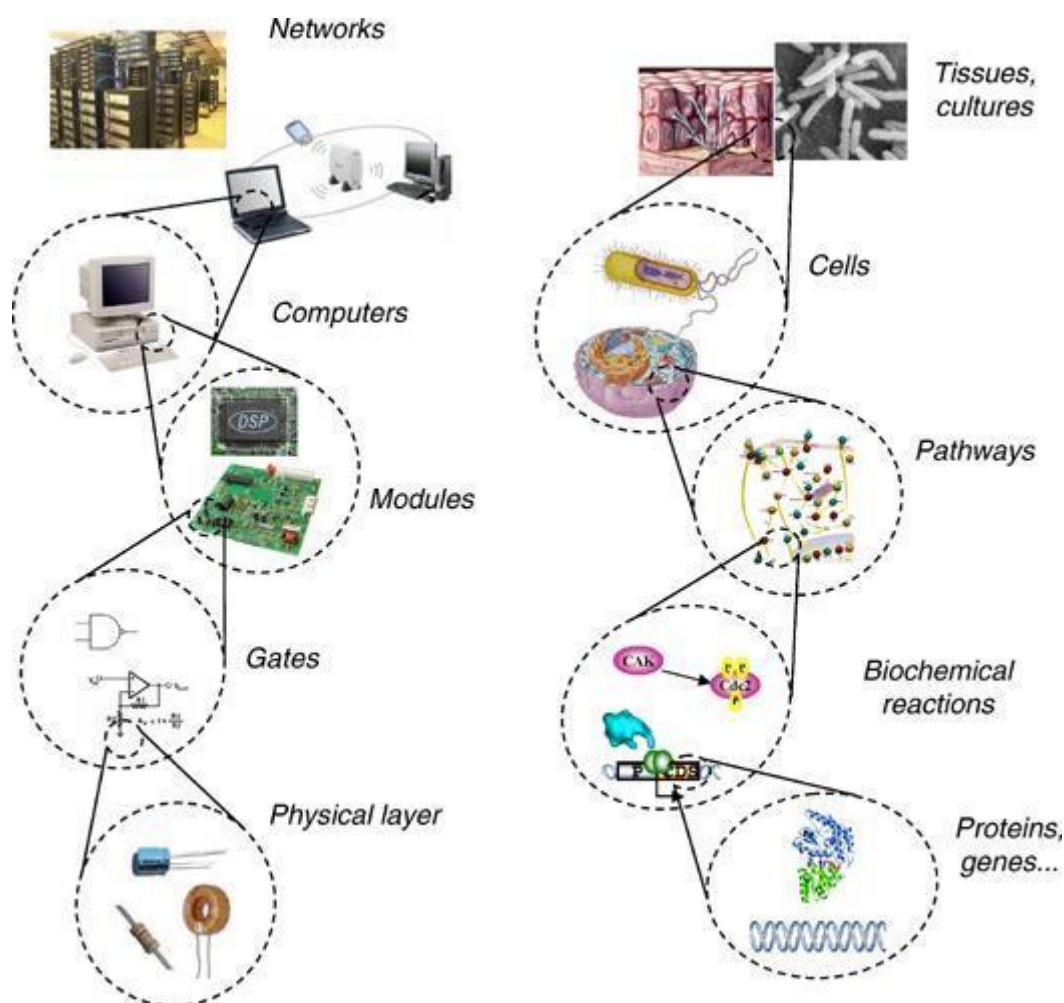
provocando a perda de constituintes celulares essenciais e a subsequente morte celular (Bartels, Dekker e Amiche, 2019).

1.4. Biologia sintética

Ainda não existe consenso na definição do que é biologia sintética, porém uma boa tentativa de explicação é que ela é um método que utiliza princípios da engenharia (projetar, testar e construir) na investigação e aplicação de fenômenos biológicos naturais (Andrianantoandro *et al.*, 2006; Cameron, Bashor e Collins, 2014).

A biologia sintética tenta fazer com que componentes biológicos, como células e genes, possam ser pensados e utilizados como componentes eletrônicos, como computadores e transistores (Figura 3) (Andrianantoandro *et al.*, 2006).

Figura 3 – Comparação entre componentes da eletrônica e biologia sintética



Fonte: Andrianantoandro *et al.* (2006)

Desse modo, circuitos de aparelhos eletrônicos, como um interruptor de luz, poderiam ser reproduzidos em células para ligar e desligar uma função biológica, por exemplo (Gardner, Cantor e Collins, 2000). Assim como nos aparelhos eletrônicos, os componentes que fazem parte do circuito podem ser intercambiáveis. Esses componentes são chamados na biologia sintética de “partes” e são definidos como sequências de DNA que codificam uma determinada função biológica, como promotores, terminadores, regiões codificantes, e outros (Voigt, 2006).

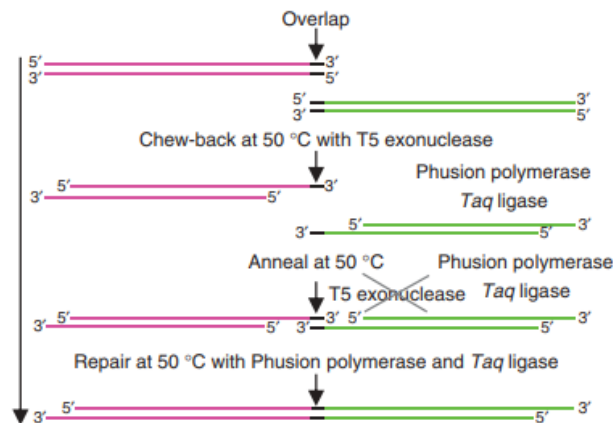
Existem repositórios online com diversas partes caracterizadas, como o *Registry of Standard Biological Parts* e o *SynBioHub*. Para a montagem de um circuito genético é possível usar essas partes caracterizadas ou ainda criar novas partes a partir de sequências de DNA já existentes (McLaughlin *et al.*, 2018).

As sequências de DNA das partes biológicas podem ser sintetizadas por empresas especializadas, porém existe limite da quantidade de pares de bases (pb) que um fragmento desse tipo pode ter (3000 pb para fragmentos lineares e 5000 pb para genes clonados em vetores, geralmente). Por esta razão, circuitos genéticos que ultrapassam esse limite precisam ser divididos em fragmentos de DNA para que possam ser sintetizados e, posteriormente, esses fragmentos precisam ser juntados através de técnicas de ligação de DNA chamadas de *assembly*.

As técnicas mais conhecidas e utilizadas atualmente são as que utilizam enzimas de restrição, como BioBrick e Golden Gate, e as que utilizam sequências homólogas, como Gibson e SLICK. Cada uma possui vantagens e desvantagens, a depender do uso e finalidade da pesquisa (Richter *et al.*, 2019).

O Gibson *assembly* (Figura 4) se destaca por ser um dos métodos mais eficientes e rápidos, e por requerer pouca experiência de bancada para ser executado (Gibson *et al.*, 2009).

Figura 4 – Como ocorre o Gibson Assembly



Fonte: Gibson *et al.* (2009)

A biologia sintética como método ainda é pouco utilizada em pesquisas de paratransgênese, com estes se restringindo apenas à engenharia genética (Durvasula *et al.*, 1997; Hurwitz *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2012). Apenas nos últimos anos a biologia sintética vem tendo seu uso mais explorado para estratégias de paratransgênese, fazendo com o design racional, padronização de partes e a modelagem matemática sejam adicionados como ferramentas para garantia do sucesso da técnica (Leonard *et al.*, 2018; Elston *et al.*, 2021, 2022). Diante do exposto sobre a LV, suas formas de controle atuais e a introdução das estratégias de paratransgênese, torna-se evidente a necessidade de inovação e aprimoramento nas abordagens de combate a essa doença negligenciada. Considerando a urgência em encontrar alternativas eficazes e sustentáveis, o presente estudo propõe-se a avançar no campo da biologia sintética aplicada à paratransgênese. O objetivo central é realizar o design, assembly, clonagem e preservação de circuitos genéticos, visando sua potencial utilização em estratégias de controle da Leishmaniose Visceral. Ao explorar a biologia sintética como ferramenta complementar à engenharia genética, busca-se superar as limitações das abordagens convencionais e contribuir para o desenvolvimento de métodos inovadores que possam efetivamente reduzir a incidência da LV.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

O presente estudo tem como objetivo o design, *assembly*, clonagem e preservação de circuitos genéticos, com possível utilização em estratégias de paratransgênese para controle da Leishmaniose Visceral.

2.2. Específicos

- *Design* de estratégia e de partes biológicas para circuito paratransgênico
- *Assembly* de partes genéticas para montagem de circuitos genéticos produtores de moléculas antiparasitárias.
- Clonagem dos circuitos genéticos em *Escherichia coli*.
- Preservação das bactérias transformadas.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Os Procedimentos Operacionais Padrão (POPs) com a descrição detalhada dos experimentos realizados a fim de possibilitar que pesquisas futuras em biologia sintética e paratransgênese possam ser realizadas estão disponíveis em: https://drive.google.com/drive/folders/1_2xX_9ntr2nkM5-nDk5XNG7yGu0CXUT9?usp=sharing.

3.1. Assembly dos fragmentos de DNA

Fragmentos de DNA gBlocks® (Integrated DNA Technologies) foram desenhados com overhangs nas extremidades com ajuda dos softwares Benchling e NEBuilder. Os gBlocks G3, G4, G5 e G6 foram utilizados na construção dos circuitos 1, 2, 3 e 4, respectivamente, e o gBlock G2 foi utilizado na construção de todos os quatro circuitos (ANEXO 1). O plasmídeo pUC19 foi linearizado e teve overhangs inseridos em sua sequência por PCR.

O Assembly foi feito através da técnica NEBuilder® HiFi DNA Assembly, que consiste em um aperfeiçoamento, feito pela empresa New England Biolabs (NEB), da técnica de Gibson assembly (GIBSON et al., 2009). Foi utilizado o kit comercial NEBuilder® HiFi DNA Assembly Cloning Kit (NEB) e as instruções de preparo cedidas pelo fabricante foram seguidas. Eletroforese em gel de agarose (0,8%) foi realizada para avaliar se houve correta ligação dos fragmentos de DNA.

3.2. Preparação e transformação de células quimiocompetentes

Bactérias *E. coli* DH5 α quimiocompetentes foram preparadas conforme protocolo de Chang *et al.* (2017). A transformação foi feita por choque térmico, uma vez para cada construção, utilizando-se o produto direto dos assemblies, ou seja, plasmídeos pUC19 contendo os circuitos genéticos 1, 2, 3 ou 4 (Chang *et al.*, 2017).

3.3. Avaliação da transformação

Além do uso de meio seletivo com antibiótico ampicilina para que apenas as células que tenham o plasmídeo inserido sobrevivam e possam ser escolhidas,

também foi feita PCR de colônia para avaliar o tamanho e a especificidade do plasmídeo.

3.4. Preservação

As colônias de bactérias que passaram por ambos os testes de avaliação de transformação foram então inoculadas em meio LB (Luria-Bertani) líquido e deixadas para crescer overnight em shaker à 37°C. Posteriormente, 500 µL desse cultivo foram transferidos para microtubos contendo 500 µL de glicerol 50%, totalizando 1 µL de solução com glicerol a 25%. Esse procedimento foi repetido em triplicata para cada uma das quatro construções (bactérias contendo plasmídeos com circuitos genéticos 1, 2, 3 e 4).

Os microtubos foram então resfriados a -20°C por uma hora e posteriormente realocados para armazenamento em freezer -80°C.

4. RESULTADOS

4.1. Escolha do chassi

Na paratransgênese, a seleção criteriosa do chassi é imperativa, uma vez que a eficácia da estratégia está intrinsecamente vinculada à sobrevivência das bactérias e à taxa de produção da molécula efetora. O paradigma ideal para a paratransgênese preconiza a utilização de microrganismos simbióticos dos vetores como chassi, dada a propensão desses organismos em manter uma presença prolongada no interior do vetor. Entretanto, vale ressaltar que *Lutzomyia longipalpis*, vetor da leishmaniose visceral, não apresenta simbiontes, o que propicia a ampliação da investigação para organismos comensais.

Nesse contexto, uma extensa revisão bibliográfica foi realizada em artigos que delineiam a microbiota de flebótomos, assim como em estudos que apontam potenciais bactérias-modelo para aplicação em paratransgênese. Como resultado desse escrutínio, identificamos três candidatos promissores: *Enterobacter cloacae dissolvens*, *Pantoea agglomerans* e *Bacillus subtilis*. As implicações advindas desses chassis revelam uma análise aprofundada das vantagens e desvantagens inerentes a cada um (Quadro 1).

Quadro 1 - Vantagens e desvantagens de possíveis chassis

Chassi	Vantagens	Desvantagens
<i>Enterobacter cloacae dissolvens</i>	<ul style="list-style-type: none"> Bactéria mais abundante no intestino de alguns insetos, incluindo <i>L. longipalpis</i> (Campolina et al., 2020). Utilizado em outras pesquisas de paratransgênese (Wijerathna, Gunathunga e Gunathilaka, 2020). 	<ul style="list-style-type: none"> Algumas cepas são patogênicas. É difícil obter uma cepa. Mal caracterizado.
<i>Pantoea agglomerans</i>	<ul style="list-style-type: none"> Utilizado pela equipe iGEM USP-Brazil 2017 (BioTROJAN) e em outras pesquisas de paratransgênese. Similar a <i>E. coli</i>. Encontrado naturalmente em <i>L. longipalpis</i> (Campolina et al., 2020). Cepa de fácil obtenção. 	<ul style="list-style-type: none"> Menos resistente ao AMP escolhido (Brand et al., 2006). Mal caracterizado. Não esporula.
<i>Bacillus subtilis</i>	<ul style="list-style-type: none"> GRAS (Geralmente reconhecido como seguro). Cepa facilmente obtida. Já utilizado em pesquisas de paratransgênese (Hurwitz et al., 2011). Gram-positivo - Mais resistente ao AMP escolhido (Brand et al., 2006). Peças genéticas bem caracterizadas. Ótima produtora de proteínas (Hurwitz et al., 2011). Esporulação pode ser vantajosa para aplicação em campo. 	<ul style="list-style-type: none"> Não encontrado naturalmente em <i>L. longipalpis</i>, mas estudos mostram que pode sobreviver no intestino médio (Hurwitz et al., 2011). Não similar a <i>E. coli</i>.

Fonte: Elaborado pelo autor

Levando em conta esses parâmetros, o chassi escolhido para implementação final foi *B. subtilis*. Para a montagem do circuito genético, o microrganismo escolhido foi *E. coli*, devido a sua facilidade de manipulação genética e rápido crescimento.

4.2. Escolha das moléculas efetoras

O ponto chave para a escolha das moléculas efetoras foi a capacidade de eliminar o parasita sem apresentar malefícios para o chassi e vetor hospedeiro.

Por esse motivo, os principais candidatos foram os anticorpos de cadeia única (scFvs) e os peptídeos antimicrobianos (AMPs).

O scFv pode apresentar alta especificidade, contribuindo para prevenir efeitos adversos na bactéria ou no vetor hospedeiro. Ele já foi testado em pesquisas em diferentes abordagens, como bloquear a fixação do parasita no intestino médio ou agir diretamente contra o parasita, porém, apresentou baixa letalidade ou requereu grandes quantidades para ser efetivo (Wijerathna, Gunathunga e Gunathilaka, 2020). Enquanto isso, os AMPs já foram aplicados efetivamente em diferentes abordagens paratransgênicas, e a diversidade de moléculas oferece muitas possibilidades de mirar *Leishmania* spp. (Fang *et al.*, 2011). Embora o scFv seja adequado para a produção bacteriana, algumas estruturas secundárias dificultam a produção eficiente. Por outro lado, a produção de AMPs não exige um longo caminho de síntese ou a engenharia de uma via metabólica, e suas sequências curtas de aminoácidos podem ser produzidas eficientemente no chassi bacteriano. Portanto, optamos pelo uso de AMPs com moléculas efetoras, mais especificamente as dermaseptinas (DRSs) DRS-N1, DRS-H3, DRS-S1 e a mutante da fusão entre cecropina A e melitina CAM-W, por possuírem atividade leishmanicida demonstrada na literatura (Brand *et al.*, 2006; Savoia *et al.*, 2008; Kückelhaus *et al.*, 2009; Pérez-Cordero *et al.*, 2011; Ji *et al.*, 2014).

As dermaseptinas (DRSs) são um grupo de peptídeos policatiônicos e curtos em forma de alfa-hélice (21-34 resíduos), contendo um resíduo de triptofano altamente preservado na terceira posição N-terminal, com resíduos hidrofóbicos e resíduos catiônicos polares agrupados em lados opostos (Bartels, Dekker e Amiche, 2019). Eles apresentam uma conservação significativa em pró-domínios precursores, que incluem um peptídeo sinal e um pró-peptídeo ácido que inativa o peptídeo até a região de ação alvo (Nicolas e El Amri, 2009). Esses peptídeos demonstram eficácia *in vitro* contra muitos patógenos (*e. g.* bactérias, parasitas, vírus) e diversos tipos de câncer humano. As membranas negativamente carregadas de alguns patógenos aumentam a interação com as dermaseptinas, induzindo a desestabilização da membrana e a lise celular. Embora as membranas negativamente carregadas estejam presentes nos eritrócitos normais, não há uma grande interação com as dermaseptinas. No

entanto, experimentos clínicos e *in vivo* com dermaseptinas ainda precisam ser investigados para entender os aspectos de segurança de seu uso em tratamentos (Bartels, Dekker e Amiche, 2019).

A dermaseptina-N1 (DRS-N1) foi isolada da secreção cutânea de *Phyllomedusa nordestina* é a menor dermaseptina já descrita, com apenas 20 aminoácidos. Ela exibe atividade médio-alta *in vitro* contra a forma promastigota de *Leishmania infantum* e demonstra toxicidade muito baixa para células mamíferas. Apesar de atividade leishmanicida apenas médio-alta, DRS-N1 apresenta baixa toxicidade contra bactérias, uma característica essencial para que ela possa ser expressa em bactérias, como na estratégia que propomos (Brand *et al.*, 2013).

A DRS-H3, anteriormente chamada de DShypo 01, foi isolada da secreção cutânea de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Brand *et al.*, 2006). Bioensaios com *Leishmania amazonensis* revelam que DRS-H3 é um agente eficiente contra promastigotas deste parasita (CI50 = 15 uM) quando comparada com glucantime (medicamento padrão no tratamento de humanos). Além disso, DRS-H3 atua de maneira mais eficaz contra bactérias gram-negativas, com concentração inibitória mínima (CIM) de 6,6 uM, do que em gram-positivas, com CIM de 26,5 uM, o que pode contribuir para a produção no chassi proposto para a estratégia. Adicionalmente, a DRS-H3, em concentrações de até 53 uM, não demonstrou atividade contra células sanguíneas brancas e vermelhas quando incubada com amostras de sangue (Brand *et al.*, 2006).

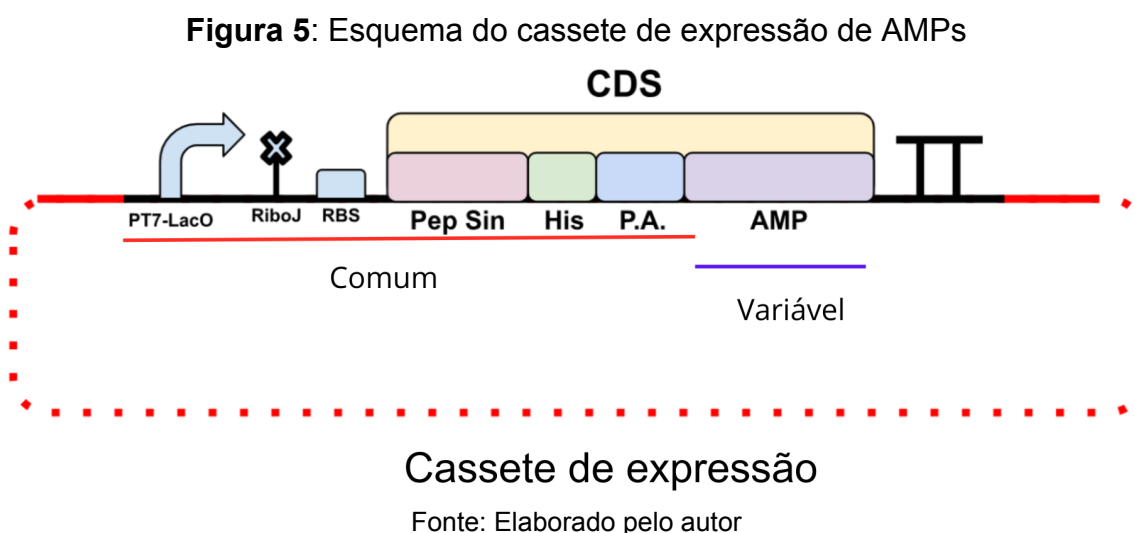
A DRS-S1 foi a primeira dermaseptina isolada da secreção cutânea de *Phyllomedusa sauvagei*. Esse peptídeo tem atividade eficaz contra *Leishmania major* (MIC = 12 uM ou CI50 = 2,4), porém também exibe baixa atividade contra células humanas (CI50 = 10.66) . Selecionamos este peptídeo devido à sua força leishmanicida (Pérez-Cordero *et al.*, 2011).

O CAM-W é um peptídeo híbrido de cecropina A e melitina que compreende a sequência catiônica N-terminal da cecropina A e a sequência N-terminal hidrofóbica da melitina, a qual foi modificada por meio da substituição de quatro triptofanos (KWKL**W**KKIEKWGGIGAVLKWLT**T**WL-NH₂) em relação à cecropina A-melitina original (CA(1-8)M(1-18), KWKL**F**KKIEKVGQGIGAVLKVLT**T**GL). Além disso, este peptídeo já foi expresso

eficientemente em *B. subtilis* WB700, o que pode facilitar o ajuste fino para a estratégia apresentada (Ji *et al.*, 2014, 2017).

4.3. Design do circuito genético

O circuito genético foi concebido com modularidade, sendo o fragmento G2 composto pelas partes compartilhadas entre os *designs*, como promotor, RiboJ, RBS e peptídeo sinal (Figura 5). Os fragmentos G3, G4, G5 e G6 também englobam elementos comuns, como HisTag e terminador, mas possuem parte variável, representada pelo AMP. DRS-N1 era o AMP contido no gBlock G3, assim como DRS-S1 em G4, DRS-H3 em G5 e CAM-W em G6.



Por esta estratégia se tratar de uma prova de conceito, não uma versão final de como seria o dispositivo, optamos por utilizar o promotor PT7-LacO, por se tratar de um promotor forte, amplamente caracterizado e que é induzível por IPTG (isopropil beta-D-1-tiogalactopiranosídeo).

RiboJ é uma ribozima utilizada como isolador genético em sistemas bacterianos na construção de circuitos genéticos sintéticos. Sua função principal é mitigar a dependência de contexto, impedindo interações não intencionais entre partes genéticas adjacentes. Isso contribui para a modularidade e previsibilidade dos circuitos genéticos, permitindo que o comportamento de cada parte seja mais previsível e independente do contexto ao seu redor. Pesquisadores caracterizaram o impacto do isolamento com RiboJ na expressão de um gene repórter controlado por diferentes promotores constitutivos em *Escherichia coli*,

revelando que, dependendo da força do promotor, o isolamento com RiboJ pode aumentar significativamente a abundância de proteínas e transcritos (Clifton *et al.*, 2018).

O sítio de ligação a ribossomo (RBS, do acrônimo em inglês) B0034 é amplamente caracterizado e possui extensa lista de usos no *Registry of Standard Biological Parts*.

O peptídeo sinal OmpA foi escolhido por funcionar tanto em *E. coli* como em *B. subtilis*, de modo a propiciar que testes iniciais de expressão fossem feitos em *E. coli* antes da estratégia final em *B. subtilis* (Pechsrichuang *et al.*, 2016).

A tag de poli histidinas (His-Tag) é uma sequência de aminoácidos contendo histidina que é anexada a uma proteína com a finalidade de facilitar sua purificação. A histidina é um aminoácido que tem afinidade específica com íons de níquel e His-Tags são adicionadas a sequências de proteínas para que elas possam ser isoladas e purificadas usando resinas de níquel (Roshanak *et al.*, 2023).

A peça ácida é uma região com carga altamente negativa que é produzida e anexada à porção N-terminal do peptídeo microbiano, inativando sua atividade biológica. Nesse estágio, quando ainda está nesta fase, é chamado de pró-peptídeo. Quando essa peça é clivada, o peptídeo passa para sua forma ativa. Para nossa estratégia, foi dada preferência de uso as peças acídicas naturais do AMP, porém, alguns não tinham sua peças caracterizadas na literatura, como é o caso de DRS-N1 e CAM-W, sendo adicionada peça acídica sintética no lugar, composta por 10 resíduos de ácido glutâmico (E10) (Júnior *et al.*, 2018).

Por fim, o terminador escolhido foi o terminador duplo B0015, que é também muito bem caracterizado e amplamente utilizado na construção de circuitos genéticos.

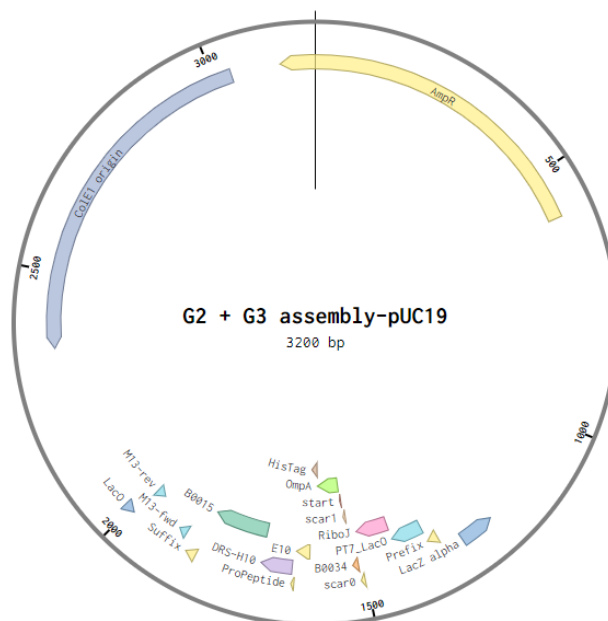
4.4. Benchling - Software para design, visualização e análise de DNA

Benchling (São Francisco, EUA) é uma plataforma avançada de *design* molecular e colaboração para cientistas em diversos campos, incluindo biologia molecular, engenharia genética e biotecnologia. Sua proposta é agilizar o processo de pesquisa e desenvolvimento ao oferecer ferramentas integradas e

intuitivas para o planejamento e execução de experimentos. A plataforma inclui recursos para a concepção e análise de sequências de DNA, RNA e proteínas, bem como para a construção virtual de plasmídeos e vetores (Figura 6).

O *design* das partes biológicas desta pesquisa foi todo feito no Benchling, além do *design* de *primers*, otimização de códons, e simulação de Gibson *assembly*.

Figura 6: Exemplo de visualização de plasmídeo produzido no Benchling



Fonte: Elaborado pelo autor

4.5. Design dos overhangs

O *design* dos overhangs foi feito para que a construção pudesse funcionar tanto para o vetor de clonagem (pUC19) quanto para o vetor de expressão (pBBR1MCS-2). Para tal, ambos plasmídeos foram linearizados com conjunto de primers que se anelavam em regiões iguais dentro do gene lacZ (Figura 7)

Figura 7: Alinhamento dos plasmídeos pUC19 e pBBR1MCS-2 no benchling

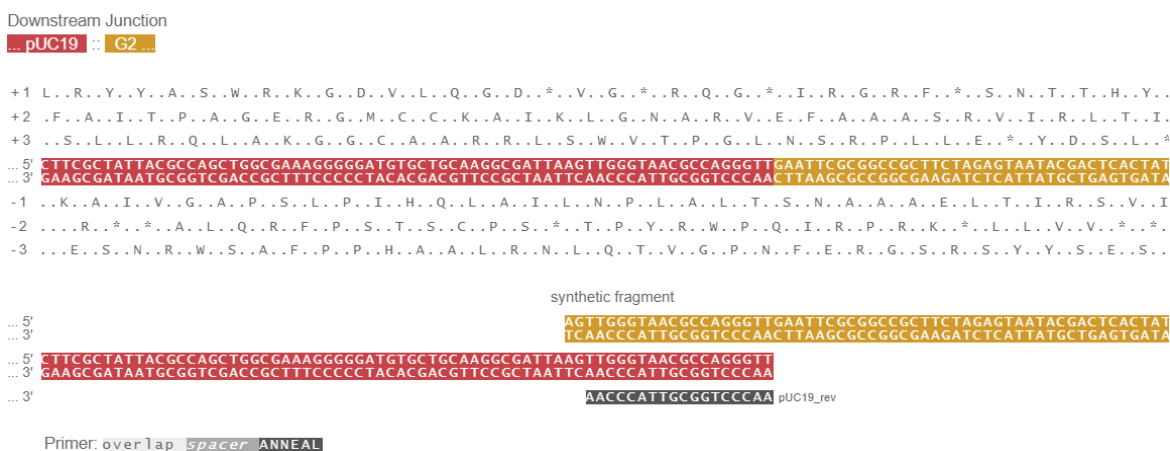


Fonte: Elaborado pelo autor

Os overhangs possuíam em média 20 pb e foram sintetizados (IDT, Coralville, EUA) junto aos gBlocks, de modo que fragmentos G2 sempre se anelassem na junção *upstream* ao vetor pUC19 e na junção *downstream* a outro gBlock (G3, G4, G5 ou G6) e por consequência, esse outro gBlock se anelasse na junção *upstream* ao Gblock G2 e *downstream*, ao pUC19.

Foi feito teste no software online NEBuilder Assembly Tool® foi feito para todos os *assemblies* a fim de avaliar se as construções se anelariam corretamente (Figura 8).

Figura 8: NEBuilder indica se está havendo a sobreposição esperada

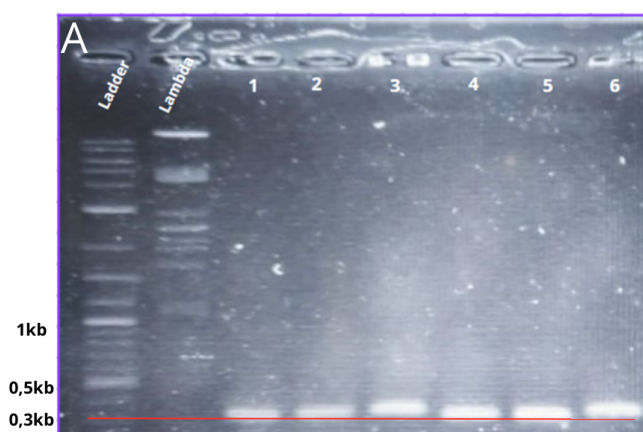


Fonte: Elaborado pelo autor

4.6. Assembly dos fragmentos de DNA e clonagem

Para confirmação da clonagem e da correta inserção dos fragmentos de DNA no vetor, foi realizada PCR de colônia. Para a construção pUC19+G2+G3 (circuito 1), todas as seis colônias foram positivas (Figura 9) e para pUC19+G2+G4(circuito 2), pUC19+G2+G5 (circuito 3) e pUC19+G2+G6 (circuito 4) todas as 3 colônias foram positivas (Figura 10). Em ambos os casos, o amplificado esperado é de 296 pb. O DNA *Ladder* utilizado foi 1 kb Plus DNA Ladder (NEB, Ipswich, Massachusetts, EUA).

Figura 9: Eletroforese em gel de agarose do circuito 1



Fonte: Elaborado pelo autor

Figura 10 - PCR de colônia dos circuitos 2, 3 e 4



Fonte: Elaborado pelo autor

4.7. Depósito das sequências em bases de dados

O *Registry of Standard Biological Parts* (Registro de Peças Biológicas Padronizadas), ou apenas *Registry*, é uma base de dados de peças biológicas alimentada principalmente por participantes da competição iGEM (International

Genetically Engineered Machine). A finalidade principal do Registry é fornecer uma plataforma acessível e organizada para que biólogos sintéticos compartilhem, troquem e reutilizem essas peças de forma consistente em seus projetos.

Todas as peças biológicas criadas foram submetidas ao registry e seu nome e link para acesso se encontram no quadro abaixo (Quadro 2)

Quadro 2: Peças biológicas submetidas ao *Registry*

Pró-peptídeo	AMP	Compósito final
E10	DRS-N1	BBa_K4075012
DRS-S1	DRS-S1	BBa_K4075010
DRS-H3	DRS-H3	BBa_K4075011
E10	CAM-W	BBa_K4075009

Fonte: Elaborado pelo autor

5. DISCUSSÃO

5.1. Desafios enfrentados para se fazer biologia sintética na UNILA

O design de um circuito genético é uma tarefa desafiadora que envolve a complexidade intrínseca da biologia sintética. A necessidade de prever e controlar as interações entre diversas partes biológicas, como promotores, ribossomos e genes, adiciona uma camada de dificuldade significativa. A natureza dinâmica e interdependente dos elementos genéticos requer uma compreensão profunda das nuances moleculares e das vias metabólicas específicas do chassi utilizado. Além disso, a variabilidade nas respostas genéticas, muitas vezes influenciada por fatores ambientais, amplifica o desafio, demandando uma abordagem iterativa no processo de design.

Este trabalho desempenha um papel fundamental ao abrir portas para o avanço da biologia sintética na UNILA, oferecendo um ponto de partida valioso para pesquisas futuras na área. A pesquisa proporciona não apenas resultados laboratoriais, mas também conhecimentos práticos e metodologias testadas que podem servir como um guia para futuros projetos de biologia sintética na universidade. Ao superar desafios iniciais, como o design de circuitos genéticos complexos e a execução de técnicas de clonagem avançadas, este estudo estabelece uma base sólida para experimentos subsequentes.

Além disso, a dificuldade de acesso a reagentes e equipamentos específicos destaca a importância de criar uma infraestrutura robusta para pesquisa em biologia sintética na UNILA. Facilitar o acesso a recursos necessários, como reagentes especializados e equipamentos avançados, não só impulsiona o progresso dessa pesquisa em particular, mas também abre oportunidades para que mais pesquisadores e estudantes se envolvam em projetos de biologia sintética. A expansão dessas capacidades laboratoriais não apenas fortalece a posição da UNILA como um centro de pesquisa inovador, mas também contribui para avanços significativos na compreensão e aplicação da biologia sintética em um contexto latino-americano.

A prática da biologia sintética, apesar de promissora, enfrenta uma série de desafios intrínsecos. O design e a construção de circuitos genéticos demandam uma compreensão profunda dos processos biológicos subjacentes, o que pode ser complexo e intrincado. Além disso, a manipulação genética exige técnicas

avançadas de clonagem, assembly e edição genética, muitas vezes dependentes de reagentes específicos e equipamentos de alto custo. Essa barreira financeira pode dificultar o acesso a recursos essenciais para laboratórios com orçamento limitado, limitando as oportunidades para a pesquisa em biologia sintética.

No entanto, é crucial reconhecer que é possível conduzir pesquisas em biologia sintética mesmo em ambientes com recursos mais modestos. Com a criatividade, colaboração e compartilhamento de conhecimento, comunidades científicas podem superar limitações financeiras. Iniciativas que promovem a cooperação entre laboratórios e o apoio mútuo na obtenção de reagentes e tecnologias específicas desempenham um papel fundamental nesse cenário. O fortalecimento da colaboração e do intercâmbio de recursos dentro da comunidade de biologia sintética é essencial para ampliar o alcance dessa disciplina, possibilitando avanços inovadores mesmo em laboratórios com recursos mais modestos.

5.2. Resolução de problemas relacionados ao assembly

A técnica de Gibson Assembly, embora altamente eficaz, pode enfrentar desafios durante a execução no laboratório. Um problema recorrente é a ineficiência na purificação da PCR, que pode surgir devido a reagentes defeituosos no kit ou condições inadequadas de purificação. Essa questão pode levar à presença de contaminantes que comprometem a eficiência da montagem. Uma estratégia para contornar esse problema é reduzir a quantidade de produto de PCR purificado adicionado à reação de Gibson. Essa abordagem minimiza a presença de contaminantes, preservando a integridade da montagem.

Outro desafio comum está relacionado à baixa eficiência de montagem, muitas vezes decorrente da qualidade das sobreposições de extremidades nos fragmentos de DNA. Uma cuidadosa seleção e design de primers são essenciais para garantir sobreposições ideais. Além disso, quantidades desiguais de fragmentos na reação de Gibson podem levar a uma eficiência reduzida ou falha na montagem. Manter concentrações equilibradas de todos os fragmentos é crucial para otimizar o processo de montagem.

No contexto mencionado, onde a purificação da PCR não estava sendo eficaz devido a problemas com os reagentes do kit, uma solução adotada foi

utilizar diretamente o produto de PCR no Gibson Assembly. No entanto, para evitar possíveis interferências dos reagentes remanescentes, optou-se por adicionar uma quantidade menor do produto de PCR do que seria usado se purificado. Essa adaptação demonstra a importância da flexibilidade e resolução de problemas durante a execução da técnica para garantir resultados bem-sucedidos.

Além dos desafios mencionados na execução da Gibson Assembly, é crucial destacar a importância do uso de células competentes altamente eficientes durante o processo de transformação. Células competentes eficientes desempenham um papel vital na absorção do plasmídeo contendo o circuito genético montado. A escolha adequada de cepas e métodos de preparação de células competentes contribui para uma maior taxa de transformação e, conseqüentemente, uma maior probabilidade de sucesso na obtenção de colônias contendo os circuitos desejados.

6. CONCLUSÃO

O presente estudo fornece uma análise detalhada do design, assembly, clonagem e preservação de circuitos genéticos com potencial aplicação em estratégias de paratransgênese para o controle da Leishmaniose Visceral. A abordagem adotada não apenas delineou os passos cruciais na construção desses dispositivos genéticos complexos, mas também ofereceu insights valiosos para enfrentar os desafios inerentes a esses processos.

Além de apresentar uma possível estratégia para a prevenção da Leishmaniose Visceral, este estudo desempenha um papel fundamental no estímulo à biologia sintética na Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA). Ao superar obstáculos significativos, como a complexidade do design de circuitos genéticos e a falta de alguns reagentes e equipamentos para biologia molecular, esta pesquisa estabeleceu uma base sólida para futuros trabalhos na área, incentivando o desenvolvimento de uma infraestrutura robusta de pesquisa em biologia sintética na instituição.

Como perspectivas futuras, a próxima etapa crítica envolve a clonagem dos circuitos em vetores de expressão para avaliar a produção efetiva dos peptídeos antimicrobianos (AMPs). Posteriormente, a transferência desses

vetores para a bactéria *Bacillus subtilis* permitirá testes mais avançados, visando a inibição do crescimento de *L. infantum in vitro*. Esses passos representam um avanço crucial na validação prática da estratégia proposta, visando o estabelecimento de provas de conceito e aproximando-o de possíveis aplicações no combate à Leishmaniose Visceral.

7. REFERÊNCIAS

- ANDRIANANTOANDRO, Ernesto; BASU, Subhayu; KARIG, David K.; e WEISS, Ron. Synthetic biology: new engineering rules for an emerging discipline. **Molecular Systems Biology**, [s. l.], v. 2, n. 1, 2006.0028, jan. 2006. ISSN 1744-4292, 1744-4292. DOI 10.1038/msb4100073.
- BARTELS, Emiel Jacob Henri; DEKKER, Douwe; e AMICHE, Mohamed. Dermaseptins, Multifunctional Antimicrobial Peptides: A Review of Their Pharmacology, Effectivity, Mechanism of Action, and Possible Future Directions. **Frontiers in Pharmacology**, [s. l.], v. 10, p. 1421, 26 nov. 2019. ISSN 1663-9812. DOI 10.3389/fphar.2019.01421.
- BRAND, Guilherme D. et al. Novel dermaseptins from *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia). **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 347, n. 3, p. 739–746, set. 2006. ISSN 0006291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2006.06.168.
- BRAND, Guilherme et al. The Skin Secretion of the Amphibian *Phyllomedusa nordestina*: A Source of Antimicrobial and Antiprotozoal Peptides. **Molecules**, [s. l.], v. 18, n. 6, p. 7058–7070, 17 jun. 2013. ISSN 1420-3049. DOI 10.3390/molecules18067058.
- CAMERON, D. Ewen; BASHOR, Caleb J.; e COLLINS, James J. A brief history of synthetic biology. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 12, n. 5, p. 381–390, maio 2014. ISSN 1740-1526, 1740-1534. DOI 10.1038/nrmicro3239.
- CAMPOLINA, Thais Bonifácio; VILLEGAS, Luis Eduardo Martinez; MONTEIRO, Carolina Cunha; PIMENTA, Paulo Filemon Paolucci; e SECUNDINO, Nagila Francinete Costa; WARBURG, Alon (ed.). Tripartite interactions: *Leishmania*, microbiota and *Lutzomyia longipalpis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 14, n. 10, p. e0008666, 14 out. 2020. ISSN 1935-2735. DOI 10.1371/journal.pntd.0008666.
- CHANG, Angela Y.; CHAU, V.; LANDAS, Julius A.; e PANG, Yvonne. Preparation of calcium competent *Escherichia coli* and heat-shock transformation. **JEMM methods**, [s. l.], v. 1, n. 22–25, 2017.
- CLIFTON, Kalen P. et al. The genetic insulator RiboJ increases expression of insulated genes. **Journal of Biological Engineering**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 23, dez. 2018. ISSN 1754-1611. DOI 10.1186/s13036-018-0115-6.
- COUTINHO-ABREU, Iliano V.; ZHU, Kun Yan; e RAMALHO-ORTIGAO, Marcelo. Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: Current status and future challenges. **Parasitology International**, [s. l.], v. 59, n. 1, p. 1–8, mar. 2010. ISSN 13835769. DOI 10.1016/j.parint.2009.10.002.
- DANTAS-TORRES, Filipe et al. Vaccination against canine leishmaniasis in Brazil. **International Journal for Parasitology**, [s. l.], v. 50, n. 3, p. 171–176, mar. 2020. ISSN 00207519. DOI 10.1016/j.ijpara.2020.01.001.
- DIAS, Renata Cristina Ferreira et al. Autochthonous canine visceral leishmaniasis

cases occur in Paraná state since 2012: isolation and identification of *Leishmania infantum*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. e009819, 2020. ISSN 1984-2961, 0103-846X. DOI 10.1590/s1984-29612019083.

DURVASULA, Ravi V. et al. Prevention of insect-borne disease: An approach using transgenic symbiotic bacteria. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 94, n. 7, p. 3274–3278, abr. 1997. ISSN 0027-8424, 1091-6490. DOI 10.1073/pnas.94.7.3274.

ELSTON, Katherine M.; PERREAU, Julie; MAEDA, Gerald P.; MORAN, Nancy A.; e BARRICK, Jeffrey E. Engineering a Culturable *Serratia symbiotica* Strain for Aphid Paratransgenesis. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 87, n. 4, p. 13, 2021.

ELSTON, Katherine M.; LEONARD, Sean P.; GENG, Peng; BIALIK, Sarah B.; ROBINSON, Elizabeth; e BARRICK, Jeffrey E. Engineering insects from the endosymbiont out. **Trends in Microbiology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 79–96, jan. 2022. ISSN 0966842X. DOI 10.1016/j.tim.2021.05.004.

FANG, Weiguo; VEGA-RODRÍGUEZ, Joel; GHOSH, Anil K.; JACOBS-LORENA, Marcelo; KANG, Angray; e ST. LEGER, Raymond J. Development of Transgenic Fungi That Kill Human Malaria Parasites in Mosquitoes. **Science**, [s. l.], v. 331, n. 6020, p. 1074–1077, 25 fev. 2011. ISSN 0036-8075, 1095-9203. DOI 10.1126/science.1199115.

GARDNER, Timothy S.; CANTOR, Charles R.; e COLLINS, James J. Construction of a genetic toggle switch in *Escherichia coli*. **Nature**, [s. l.], v. 403, n. 6767, p. 339–342, jan. 2000. ISSN 0028-0836, 1476-4687. DOI 10.1038/35002131.

GIBSON, Daniel G.; YOUNG, Lei; CHUANG, Ray-Yuan; VENTER, J. Craig; HUTCHISON, Clyde A.; e SMITH, Hamilton O. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature Methods**, [s. l.], v. 6, n. 5, p. 343–345, 1 maio 2009. ISSN 1548-7105. DOI 10.1038/nmeth.1318.

GRIMALDI, Gabriel et al.; SCHALLIG, Henk D. F. H. (ed.). Field trial of efficacy of the Leish-tec® vaccine against canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in an endemic area with high transmission rates. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 9, p. e0185438, 27 set. 2017. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0185438.

HURWITZ, Ivy; HILLESLAND, Heidi; FIECK, Annabeth; DAS, Pradeep; e DURVASULA, Ravi. The paratransgenic sand fly: A platform for control of *Leishmania* transmission. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 4, n. 1, p. 82, dez. 2011. ISSN 1756-3305. DOI 10.1186/1756-3305-4-82.

HURWITZ, Ivy; FORSHAW, Adam; YACISIN, Kari; RAMALHO-ORTIGAO, Marcelo; SATOSKAR, Abhay; DURVASULA, Ravi. Paratransgenic Control of Leishmaniasis: New Developments. In: SATOSKAR, Abhay; DURVASULA, Ravi (ed.). **Pathogenesis of Leishmaniasis: New Developments in Research**. New York, NY: Springer New York, 2014. p. 25–43. ISBN 978-1-4614-9108-8. DOI 10.1007/978-1-4614-9108-8_3. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9108-8_3.

Ji, Shengyue; LI, Weili; ZHANG, Lei; ZHANG, Yue; e CAO, Binyun. Cecropin A–melittin mutant with improved proteolytic stability and enhanced antimicrobial activity against bacteria and fungi associated with gastroenteritis in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [s. l.], v. 451, n. 4, p. 650–655, set. 2014. ISSN 0006291X. DOI 10.1016/j.bbrc.2014.08.044.

Ji, Shengyue et al. Efficient biosynthesis of a Cecropin A-melittin mutant in *Bacillus subtilis* WB700. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 40587, 10 jan. 2017. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/srep40587.

JÚNIOR, Nelson G. O. et al. An acidic model pro-peptide affects the secondary structure, membrane interactions and antimicrobial activity of a crotalicidin fragment. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 11127, 24 jul. 2018. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-018-29444-0.

KÜCKELHAUS, Selma A. S.; LEITE, José Roberto S. A.; MUNIZ-JUNQUEIRA, Maria Imaculada; SAMPAIO, Raimunda Nonata; BLOCH, Carlos; e TOSTA, C. Eduardo. Antiplasmodial and antileishmanial activities of phylloseptin-1, an antimicrobial peptide from the skin secretion of *Phyllomedusa azurea* (Amphibia). **Experimental Parasitology**, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 11–16, set. 2009. ISSN 00144894. DOI 10.1016/j.exppara.2009.05.002.

LEONARD, Sean P. et al. Genetic Engineering of Bee Gut Microbiome Bacteria with a Toolkit for Modular Assembly of Broad-Host-Range Plasmids. **ACS Synthetic Biology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1279–1290, 18 maio 2018. ISSN 2161-5063, 2161-5063. DOI 10.1021/acssynbio.7b00399.

MARCONDES, Mary; e DAY, Michael J. Current status and management of canine leishmaniasis in Latin America. **Research in Veterinary Science**, [s. l.], v. 123, p. 261–272, abr. 2019. ISSN 00345288. DOI 10.1016/j.rvsc.2019.01.022.

MATTANOVICH, Diethard; BRANDUARDI, Paola; DATO, Laura; GASSER, Brigitte; SAUER, Michael; PORRO, Danilo. Recombinant Protein Production in Yeasts. In: LORENCE, Argelia (ed.). **Recombinant Gene Expression**. Totowa, NJ: Humana Press, 2012. (Methods in Molecular Biology). v. 824, p. 329–358. ISBN 978-1-61779-432-2. DOI 10.1007/978-1-61779-433-9_17. Disponível em: http://link.springer.com/10.1007/978-1-61779-433-9_17. Acesso em: 30 set. 2022.

MCLAUGHLIN, James Alastair et al. SynBioHub: A Standards-Enabled Design Repository for Synthetic Biology. **ACS Synthetic Biology**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 682–688, 16 fev. 2018. ISSN 2161-5063, 2161-5063. DOI 10.1021/acssynbio.7b00403.

NICOLAS, Pierre; e EL AMRI, Chahrazade. The dermaseptin superfamily: A gene-based combinatorial library of antimicrobial peptides. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, [s. l.], v. 1788, n. 8, p. 1537–1550, ago. 2009. ISSN 00052736. DOI 10.1016/j.bbamem.2008.09.006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. **Leishmaniasis**. [S. l.: s. n.], 12 jan. 2023. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas. N° 11 (Dezembro de 2022). **Leishmaniasis: Epidemiological Report of the Americas**; Washington, D.C., 2022. journalAbbreviation: Epidemiological Report of the Americas. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/56832>.

OVERTON, Tim W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug Discovery Today**, [s. l.], v. 19, n. 5, p. 590–601, maio 2014. ISSN 13596446. DOI 10.1016/j.drudis.2013.11.008.

PECHSRICHUANG, Phornsiri et al. OmpA signal peptide leads to heterogenous secretion of B. subtilis chitosanase enzyme from E. coli expression system. **SpringerPlus**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 1200, dez. 2016. ISSN 2193-1801. DOI 10.1186/s40064-016-2893-y.

PÉREZ-CORDERO, José Julián; LOZANO, José Manuel; CORTÉS, Jimena; e DELGADO, Gabriela. Leishmanicidal activity of synthetic antimicrobial peptides in an infection model with human dendritic cells. **Peptides**, [s. l.], v. 32, n. 4, p. 683–690, abr. 2011. ISSN 01969781. DOI 10.1016/j.peptides.2011.01.011.

RICHTER, David; BAYER, Katharina; TOESKO, Thomas; e SCHUSTER, Stefan. ZeBR α a universal, multi-fragment DNA-assembly-system with minimal hands-on time requirement. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 2980, dez. 2019. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-019-39768-0.

RILEY, Eammon P.; SCHWARZ, Corinna; DERMAN, Alan I.; e LOPEZ-GARRIDO, Javier. Milestones in Bacillus subtilis sporulation research. **Microbial Cell**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1–16, 4 jan. 2021. ISSN 23112638. DOI 10.15698/mic2021.01.739.

ROSHANAK, Sahar; YARABBI, Hanieh; SHAHIDI, Fakhri; TABATABAEI YAZDI, Farideh; MOVAFFAGH, Jebraeil; e JAVADMANESH, Ali. Effects of adding poly-histidine tag on stability, antimicrobial activity and safety of recombinant buforin I expressed in periplasmic space of Escherichia coli. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 5508, 4 abr. 2023. ISSN 2045-2322. DOI 10.1038/s41598-023-32782-3.

SAVOIA, Dianella; GUERRINI, Remo; MARZOLA, Erika; e SALVADORI, Severo. Synthesis and antimicrobial activity of dermaseptin S1 analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 16, n. 17, p. 8205–8209, set. 2008. ISSN 09680896. DOI 10.1016/j.bmc.2008.07.032.

SERAFIM, Tiago D. et al. Leishmaniasis: the act of transmission. **Trends in Parasitology**, [s. l.], v. 37, n. 11, p. 976–987, nov. 2021. ISSN 14714922. DOI 10.1016/j.pt.2021.07.003.

SEVÁ, Anaiá P. et al.; TRAUB-CSEKÖ, Yara M. (ed.). Canine-Based Strategies for Prevention and Control of Visceral Leishmaniasis in Brazil. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 11, n. 7, p. e0160058, 29 jul. 2016. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0160058.

SOCOL, Vanete Thommaz et al.; YURCHENKO, Vyacheslav (ed.). More than the eyes can see: The worrying scenario of canine leishmaniasis in the Brazilian

side of the triple border. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 12, n. 12, p. e0189182, 12 dez. 2017. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0189182.

SOUSA-PAULA, Lucas Christian de; SILVA, Lidiane Gomes da; SALES, Kamila Gaudêncio da Silva; e DANTAS-TORRES, Filipe; FUEHRER, Hans-Peter (ed.). Failure of the dog culling strategy in controlling human visceral leishmaniasis in Brazil: A screening coverage issue? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. e0007553, 26 jun. 2019. ISSN 1935-2735. DOI 10.1371/journal.pntd.0007553.

STOCKDALE, Lisa; e NEWTON, Robert; BÜSCHER, Philippe (ed.). A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 7, n. 6, p. e2278, 20 jun. 2013. ISSN 1935-2735. DOI 10.1371/journal.pntd.0002278.

SUNDAR, Shyam; SINGH, Om Prakash; e CHAKRAVARTY, Jaya. Visceral leishmaniasis elimination targets in India, strategies for preventing resurgence. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, [s. l.], v. 16, n. 11, p. 805–812, 2 nov. 2018. ISSN 1478-7210, 1744-8336. DOI 10.1080/14787210.2018.1532790.

TURUSOV, Vladimir; RAKITSKY, Valery; e TOMATIS, Lorenzo. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks. **Environmental Health Perspectives**, [s. l.], v. 110, n. 2, p. 125–128, fev. 2002. ISSN 0091-6765, 1552-9924. DOI 10.1289/ehp.02110125.

VOIGT, Christopher A. Genetic parts to program bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. 548–557, out. 2006. ISSN 09581669. DOI 10.1016/j.copbio.2006.09.001.

WANG, Sibao; GHOSH, Anil K.; BONGIO, Nicholas; STEBBINGS, Kevin A.; LAMPE, David J.; e JACOBS-LORENA, Marcelo. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 109, n. 31, p. 12734–12739, 31 jul. 2012. ISSN 0027-8424, 1091-6490. DOI 10.1073/pnas.1204158109.

WIJERATHNA, Tharaka; GUNATHUNGA, Samadhi; e GUNATHILAKA, Nayana. Recent developments and future directions in the paratransgenesis based control of Leishmania transmission. **Biological Control**, [s. l.], v. 145, p. 104260, jun. 2020. ISSN 10499644. DOI 10.1016/j.biocontrol.2020.104260.

WILKE, André Barretto Bruno; e MARRELLI, Mauro Toledo. Paratransgenesis: a promising new strategy for mosquito vector control. **Parasites & Vectors**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 342, dez. 2015. ISSN 1756-3305. DOI 10.1186/s13071-015-0959-2.

YIMAM, Yonas; e MOHEBALI, Mehdi; TRAUB-CSEKÖ, Yara M. (ed.). Effectiveness of insecticide-impregnated dog collars in reducing incidence rate of canine visceral leishmaniasis: A systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 9, p. e0238601, 3 set. 2020. ISSN 1932-6203. DOI 10.1371/journal.pone.0238601.

ZHANG, Kang; SU, Lingqia; e WU, Jing. Recent Advances in Recombinant Protein Production by *Bacillus subtilis*. **Annual Review of Food Science and**

Technology, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 295–318, 25 mar. 2020. ISSN 1941-1413, 1941-1421. DOI 10.1146/annurev-food-032519-051750.

6. ANEXOS

6.1. Anexo 1 – gBlocks®

gBlock®	Partes	AMP	Construção final
G2	Prefixo Biobrick	N/A	G2 + G3: BBa_K4075012 G2 + G4: BBa_K4075010 G2 + G5: BBa_K4075011 G2 + G6: BBa_K4075009
	Promotor		
	RiboJ		
	RBS		
	Peptídeo Sinal		
G3	HisTag	DRS-N1	G2 + G3: BBa_K4075012
	E10-DRS-N1		
	Terminador		
	Sufixo Biobrick		
G4	HisTag	DRS-S1	G2 + G4: BBa_K4075010
	proDRS-S1		
	Terminador		
	Sufixo Biobrick		
G5	HisTag	DRS-H3	G2 + G5: BBa_K4075011
	proDRS-H3		
	Terminador		
	Sufixo Biobrick		
G6	HisTag	CAM-W	G2 + G6: BBa_K4075009
	E10-CAM-W		
	Terminador		
	Sufixo Biobrick		