

## RESUMEN

La leishmaniasis es una enfermedad desatendida causada por cerca de 20 especies del género *Leishmania*, que afecta a un número considerable de personas en el Ecuador y en el mundo; siendo la proteína GP63 esencial para la infectividad del parásito. Por otro lado, la técnica CRISPR/Cas9 ha demostrado ser práctica en la edición genómica de *Leishmania* spp., tanto para marcaje de proteínas como para silenciamiento de genes. Por lo tanto, en el presente estudio se aplicó el sistema CRISPR/Cas9 para fusionar la proteína fluorescente mNeonGreen a GP63, con el fin de que en un futuro se pueda aprovechar su seguimiento en tiempo real. Se logró transfectar *Leishmania mexicana* con un plásmido que contenía Cas9 y resistencia a higromicina, además de un ADN donador que, además de mNeonGreen, codificaba una enzima de resistencia a G418. Después de días de selección, se obtuvo una población resistente a G418 que sugiere que la transfección fue exitosa, aunque no fue posible observar fluorescencia a la longitud de onda característica de mNeonGreen; surgiendo, asimismo, inconvenientes con posible autofluorescencia. Este fenómeno pudo deberse a que la eficiencia de transfección fue baja y las técnicas de sondeo poco sensibles o que la Cas9 guiada por el ARNg tuvo un inconveniente encontrando la secuencia diana, por posibles rearrreglos de la cromatina.

### Palabras clave:

- CRISPR/Cas9
- GP63
- *Leishmania mexicana*
- Leishmanolisina

## ABSTRACT

Leishmaniasis is a neglected disease caused by approximately 20 species of the genus *Leishmania*. This illness thrives in Ecuador and in tropical regions of the world. Alongside other proteins, GP63 proved to be an important factor to developed leishmaniasis. On the other hand, CRISPR/Cas9 is a practical tool for genomic editing in *Leishmania* spp., with a range of applications including tagging and knock-outs. Because of this, CRISPR/Cas9 was applied in this study to fuse the fluorescent protein mNeonGreen to GP63, in order to obtain a real-time track for later use. *Leishmania mexicana* promastigotes were successfully transfected with a plasmid harboring Cas9 and a hygromycin resistance gene. Likewise, a donor DNA coding mNeonGreen and a neomycin resistance gene were electropored into the hygromycin resistant population. Subsequently, a G418 resistant population was obtained after days of selection, which suggests that transfection was successful. Still, the fluorescence observed in *L. mexicana* promastigotes corresponded to a different wavelength than the one associated with mNeonGreen, implying that there was an inconvenience regarding autofluorescence. This phenomenon may have been induced by a low transfection rate and low-sensitivity tests, or Cas9 might have had a complication finding the target sequence. The latter may have been generated by a chromatin rearrangement.

### **Keywords:**

- CRISPR/Cas9
- GP63
- *Leishmania mexicana*
- Leishmanolysin