

## RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),  
o texto completo desta dissertação será disponibilizado  
somente a partir de 26/10/2020.

**ESTUDOS IN VITRO DA INIBIÇÃO DA  
ATIVIDADE DA TELOMERASE DE *Leishmania*  
*major***

**Whisnayer Martins Gentil**

**Botucatu – SP  
2018**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**"Júlio de Mesquita Filho"**  
**INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU**

**ESTUDOS IN VITRO DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE**  
**DA TELOMERASE DE *Leishmania major***

**Whisnayder Martins Gentil**

**Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Nogueira Cano**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas (Genética) Genética.

**Botucatu – SP**

**2018**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSANGELA APARECIDA LOBO-CRB 8/7500

Gentil, Whisnayder Martins.

Estudos in vitro da inibição da atividade da telomerase de *Leishmania major* / Whisnayder Martins Gentil. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano

Capes: 20202008

1. *Leishmania*. 2. Telômero. 3. Moléculas. 4. Fármacos. 5. Edição de genes.

Palavras-chave: BIBR1532; CRISPR-Cas; *Leishmania*; Telomerase.

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIACÕES</b> .....	<b>6</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>8</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>10</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
1.1. AS LEISHMANIOSES E SEU AGENTE ETIOLÓGICO .....	12
1.2. CICLO BIOLÓGICO DOS PARASITOS DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> .....	16
1.3. BIOLOGIA MOLECULAR DOS PARASITOS DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i> .....	18
1.4. TELÔMEROS: ESTRUTURA E MANUTENÇÃO .....	19
1.5. O COMPLEXO TELOMERASE DE <i>LEISHMANIA</i> SPP. E SEUS COMPONENTES TERT E TER.....	21
1.6. O SISTEMA CRISPR-CAS9 USADO NA EDIÇÃO DE GENOMAS.....	24
1.7. RESULTADOS DA INIBIÇÃO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE EM ORGANISMOS MODELOS E EM <i>TRYPANOSOMA BRUCEI</i> .....	26
1.8. CARACTERÍSTICAS DO INIBIDOR NÃO COMPETITIVO DA ATIVIDADE DA TELOMERASE, BIBR1532 ...	28
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
2.1. OBJETIVO GERAL.....	33
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	33
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>33</b>
3.1. CONSTRUÇÃO VIRTUAL DO PLASMÍDEO PLS7-LMTERT .....	33
3.2. CULTIVO DE <i>LEISHMANIA MAJOR</i> .....	35
3.3. ENSAIO DE MTT .....	37
3.4. DETERMINAÇÃO DO IC <sub>50</sub> DOS FÁRMACOS HIGROMICINA E PUOMICINA PARA <i>L. MAJOR</i> EM FASE EXPONENCIAL .....	38
3.5 DETERMINAÇÃO DO IC <sub>50</sub> DO BIBR1532 PARA <i>L. MAJOR</i> EM FASE EXPONENCIAL.....	38
3.6. TRANSFEÇÃO DE <i>L. MAJOR</i> EM FASE EXPONENCIAL .....	39
3.7. ISOLAMENTO DE CLONES PUROS, DE <i>L. MAJOR</i> TRANSFECTADAS, EM PLACA DE MEIO M199 SEMISSÓLIDA .....	40
3.8. EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>LEISHMANIA MAJOR</i> .....	42
3.9. EXTRAÇÃO DE DNA USANDO ETANOL .....	43
3.10. OBTENÇÃO DO LISADO CELULAR PARA PCR DIRETA DE CULTURAS DE <i>LEISHMANIA</i> .....	43
3.11. DETERMINAÇÃO, POR PCR, DO GENÓTIPO DOS CLONES CRISPRs .....	44
3.12. EXTRAÇÃO DO PLASMÍDEO pTCAS9 DOS PARASITOS TRANSFECTADOS .....	46
3.13. CURVA DE CRESCIMENTO.....	46
3.14. OBTENÇÃO DE EXTRATO PROTEICO TOTAL DE <i>L. MAJOR</i> .....	47
3.15. WESTERN BLOT .....	48
3.16. SOUTHERN BLOT TELOMÉRICO DE <i>L. MAJOR</i> EM FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO.....	48
3.17. SUBCLONAGEM DOS FRAGMENTOS HR1 E HR2 NO PLASMÍDEO PLS6.....	51
3.18. CONFECÇÃO DE LÂMINAS, DE <i>L. MAJOR</i> , CORADA COM GIEMSA .....	52
3.19. CONFECÇÃO DE LÂMINAS, DE <i>L. MAJOR</i> , CORADAS COM IODETO DE PROPÍDIO.....	52
3.20. TRANSFEÇÃO DE <i>L. MAJOR</i> COM OLIGONUCLEOTÍDEO <i>MORPHOLINO</i> ANTISENSEO .....	53
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
4.1. IMPLEMENTAÇÃO DA METODOLOGIA CRISPR-CAS9.....	54
4.1.1 Determinação do IC <sub>50</sub> para higromicina e puomicina .....	54
4.1.2. Transfecção de <i>L. major</i> com pTCAS9 e seleção de linhagem pura.....	56
4.1.3. Expressão da endonuclease Cas9 pela linhagem Lmj-Cas9.....	58

4.1.4. A expressão de Cas9 não altera o perfil de crescimento de <i>Lmj-Cas9</i> .....	59
4.1.5. Montagem do pLS7-LmTERT .....	61
4.1.5.1 Construção virtual do pLS7-LmTERT .....	61
4.1.5.2. Subclonagem do fragmento HR2 no pLS6 .....	63
4.1.5.3. Subclonagem do fragmento TERT-HR1 no pLS6-HR2 e finalização da construção do plasmídeo pLS7-LmTERT.....	67
4.1.6. Obtenção e confirmação de clones puros CRISPRs .....	71
4.1.7. Análise por Western blot, da expressão da proteína LmTERT, nos clones CRISPRs.....	76
4.1.8. Curva de crescimento dos clones CRISPRs .....	78
4.1.9. Análise morfológicas dos clones CRISPRs.....	80
4.1.10. Efeito do heminocaute e do nocaute de LmTERT na manutenção dos telômeros.....	82
4.2. INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DA TELOMERASE DE <i>L. MAJOR</i> . .....	85
4.2.1. Determinação do IC <sub>50</sub> para o BIBR1532 .....	85
4.2.2. Curva de crescimento de <i>L. major</i> tratada com BIBR1523 .....	87
4.2.3. Efeito do tratamento de <i>L. major</i> com BIBR1532.....	88
4.2.4. Efeitos do tratamento contínuo, de <i>L. major</i> em fase exponencial, com BIBR1532 .....	92
4.3. PADRONIZAÇÃO DA UTILIZAÇÃO DE OLIGONUCLEOTÍDEO MORPHOLINO ANTISENSE COMO FERRAMENTA DE BLOQUEIO PÓS-TRANSCRICIONAL EM <i>L. MAJOR</i> .....	98
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>101</b>
<b>6. REFERÊNCIAS .....</b>	<b>103</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>112</b>
ANEXO 1. INICIADOR UTILIZADOS PARA CONFIRMAR TRANSFECCÃO DE <i>L. MAJOR</i> COM O PTCAS9 E SUBCLONAGEM DAS HRS NO PLASMÍDEO PLS7-LMTERT .....	112
ANEXO 2. SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DE HOMOLOGIA TERT-RH1 .....	113
ANEXO 3. SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA REGIÃO DE HOMOLOGIA TERT-RH2.....	113
ANEXO 4. SEQUÊNCIA DE NUCLEOTÍDEOS DA <i>SEED</i> PARA A TERT DE <i>L. MAJOR</i> .....	114
ANEXO 5. SEQUÊNCIA DA TERT DE <i>L. MAJOR</i> , ( <i>GENBANK</i> ) .....	114

## Lista de Abreviações

**BIBR1532:** (2-[E) -3-naphtalen-2-yl-but-2-enylamino]- benzoic acid), uma molécula sintética pequena que interage com a TERT e impede o alongamento dos telômeros.

**Cas9:** ribonucleoproteína, que faz parte da tecnologia de edição gênica CRISPR-Cas, responsável por clivar sequências de DNA usando um RNA como guia.

**Clones CRISPRs:** clones puros, isolados em placa de ágar, de *L. major* que foi transfectada com os plasmídeos pTCAS9 e pLS7-LmTERT

**Gene *LmTERT*:** gene que expressa a transcriptase reversa TERT.

**HR1:** sequência de DNA, que tem homologia com a extremidade 5' do gene *LmTERT*, e permitirá a realização de *gene replacement*, juntamente com a HR1, após a clivagem do gene pela Cas9.

**HR2:** sequência de DNA, que tem homologia com a extremidade 3' do gene *LmTERT*, e permitirá a realização de *gene replacement*, juntamente com a HR1, após a clivagem do gene pela Cas9.

**Lmj-Cas9:** linhagem de *Leishmania major* expressando a endonuclease Cas9.

**LmjF:** *Leishmania major*, selvagem, cepa *Friedlin*.

**Lmj-WT:** *Leishmania major* selvagem (não carrega nenhum plasmídeo, mas passada pelos processos de transfecção, sendo por tanto um controle).

**PFR2-HR1:** sequência do plasmídeo pLS6 que foi substituída pela sequência HR2 na montagem do plasmídeo pLS7-LmTERT.

**PFR2-HR2:** sequência do plasmídeo pLS6 que foi substituída pela sequência HR1 na montagem do plasmídeo pLS7-LmTERT.

**pGEM-HR1:** plasmídeo pGEM-T em que foi clonado o fragmento de DNA TERT-HR1.

**pGEM-HR2:** plasmídeo pGEM-T em que foi clonado o fragmento de DNA TERT-HR2.

**pLS6:** plasmídeo utilizado para montar o pLS7-LmTERT em que a *Seed* e as HRs não são específicas para o gene *LmTERT*.

**pLS6-HR2:** plasmídeo pLS6 em que a sequência PFR2-HR1 foi substituída pela sequência TERT-HR2 oriunda no plasmídeo pGEM-HR2, no processo de montagem do plasmídeo pLS7-LmTERT.

**pLS7-LmTERT:** plasmídeo a ser utilizado, juntamente com o pTCAS9, para editar o gene *LmTERT*, sendo composto basicamente pelas HRs (HR1 e HR2) que flanqueiam o gene de resistência a puromicina, o sgRNA e a *Seed*.

**pTCAS9:** plasmídeo de expressão, para *Leishmania major*, da endonuclease Cas9.

**Seed:** a sequência do sgRNA que tem homologia com a sequência de DNA (gene *LmTERT*) a ser clivada pela Cas9.

**sgRNA:** RNA responsável por proporcionar a maturação da endonuclease Cas9 e direcionar a mesma para a uma sequência específica no DNA a ser clivada.

**TER:** RNA usado pela TERT para adicionar repetições teloméricas (TTAGGG) nas extremidades dos cromossomos.

**TERT:** transcriptase reversa, que faz parte do complexo telomerase, responsável por adicionar repetições teloméricas usando um RNA como molde.

**TERT-HR1:** fragmento DNA, clonado em plasmídeo pGEM-T e usado na montagem do plasmídeo pLS7-LmTERT, composto pela HR1 juntamente com os sítios enzimáticos para a *HpaI* e *MfeI*.

**TERT-HR2:** fragmento DNA, clonado em plasmídeo pGEM-T e usado na montagem do plasmídeo pLS7-LmTERT, composto pela HR2, sgRNA, a *Seed* e os sítios enzimáticos para a *XbaI* e *ApaI*.

## Resumo

As leishmanioses são doenças tropicais negligenciadas, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Elas são consideradas pela Organização Mundial da Saúde como uma doença endêmica em muitos países, incluindo o Brasil. Assim, a busca por novas metodologias de combate e controle dessas doenças parasitárias se faz necessária. Uma das abordagens refere-se ao estudo da biologia molecular dos parasitos causadores da doença, como o estudo dos telômeros, os quais são repetições em *tandem* associadas a proteínas e localizadas nas extremidades dos cromossomos da maioria dos eucariontes. Sua função é diferenciar os terminais de cromossomos das quebras de DNA em dupla fita e assim proteger tais extremidades da degradação e dos mecanismos de reparo das células, que em muitos casos resulta na perda de material genético codificante ao fim de cada ciclo celular. Os estudos da biologia telomérica de *Leishmania* têm auxiliado bastante no entendimento deste organismo, no qual o complexo telomerase é composto minimamente por um componente proteico, TERT, e por um RNA, TER, sendo que a caracterização funcional destes componentes é uma das metas de nosso grupo de pesquisa. Tal caracterização tende a ser feita, principalmente, por meios de compostos inibitórios específicos da função desses componentes ou por meio de manipulação gênica, tal qual a tecnologia CRISPR-Cas, que tem possibilitado alterações genômicas precisas e pontuais bem como o silenciamento rápido e específico de genes em diferentes organismos, incluindo *Leishmania*. Assim, buscamos observar os efeitos da remoção da atividade do componente proteico da telomerase (TERT) em *L. major*, sendo para tal utilizado um inibidor específico da TERT, denominado BIBR1532, e a tecnologia CRISPR-Cas9, para alvejar especificamente o gene que codifica esse componente. Essa empreitada resultou em linhagens de *L. major* expressando de forma estável a endonuclease Cas9 e clones de *L. major* com nocaute em um dos alelos do gene da TERT cuja remoção não resultou em alterações na taxa de crescimento e nem gerou efeitos morfológicos aparentes, de acordo com os padrões de análises usados, embora a realização de Southern blot de telômeros sugira prováveis alterações nessas estruturas decorrente da ausência de um dos alelos do gene *LmTERT*. Além disso, o uso dessa tecnologia em nosso laboratório provou ser um grande sucesso, e uma formidável aliada, tornando-se uma ferramenta indispensável em nossos estudos futuros. A inibição da TERT, por meio do BIBR1532, gerou uma gama de resultados,

os quais abrangem atraso no crescimento das culturas, parasitos com perda de flagelo e formação de vacúolos, e, dependendo da dose do inibidor usada e do tempo de tratamento, observou-se morte celular, sendo que tais efeitos podem ser ainda mais amplos tendo em vista que nossas análises foram extremamente superficiais e que estudos mais elaborados podem fornecer informações mais precisas e refinadas do efeito desse inibidor em *L. major*. Temos também, trabalhado na padronização de uma ferramenta de bloqueio pós-transcricional em *L. major*, denominada oligonucleotídeo *morpholino* antisense, com o intuito de observar futuramente o efeito de *knockdown* de alguns componentes teloméricos de *L. major*. Usando essas abordagens, esperamos que uma nova luz possa ser lançada sobre a função de componentes da maquinaria telomérica de *Leishmania*, na homeostase celular do parasito, e que as informações aqui obtidas colaborem futuramente no desenvolvimento de um método de controle e/ou erradicação das leishmanioses.

**Palavras chaves:** *Leishmania*; Telomerase; BIBR1532; CRISPR-Cas.

## Abstract

Leishmaniasis are neglected tropical disease, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which according to the World Health Organization is endemic in many countries, including Brazil. Thus, the search for new alternatives to combat and control these parasitic diseases, are necessary. One of the current potential approaches are to study the biology of telomeres, which are tandemly repeated sequences associated with proteins located at the ends of the chromosomes of most eukaryotes. The main function of telomeres is to differentiate the chromosome end termini from double-stranded DNA breaks and thus, to protect the ends from degradation and damage repair mechanisms, which, at the end of each cell cycle, can result in loss of genetic material. The telomere biology studies of *Leishmania* have greatly improved our knowledge about this organism, in which the telomerase complex is composed minimally by a protein component, TERT, and by an RNA, TER. The functional characterization of these components is one of the goals of our research group. Such characterization is usually done by using inhibitory compounds specific to the function of these components or by gene manipulation, such as the CRISPR-Cas technology, which has enabled precise genomic alterations as well as the rapid and specific silencing of genes in different organisms, including *Leishmania*. Thus, we sought to observe the effects of inhibiting the *L. major* telomerase activity, using a specific TERT inhibitor, called BIBR1532, and to induce gene knockout using CRISPR-Cas9 technology, to specifically target the gene encoding the protein component (TERT). This work resulted in *L. major* strains stabling expressing the Cas9 endonuclease and heminockout *L. major* strains for one of the TERT alleles, whose removal did not result in changes in parasite growth rate and did not generate apparent morphological effects according to our analysis. However, the Southern blotting of telomeres suggests probable changes in these structures due to the absence of one of the homologues of the LmTERT gene. In addition, the use of this technology in our laboratory has proved a great success, and a formidable ally, becoming an indispensable tool in our future studies. The inhibition of TERT, through BIBR1532 generated a range of results which included, cell growth arrest, loss of flagella, formation of intracellular vacuoles, and depending on the dose of inhibitor used and the time of treatment, we could also observe cell death. In our view such effects may be even broader because our analyses were superficial and need to be more

elaborate to provide more accurate and refined information about the effect of this inhibitor in *L. major*. We have also been working on the standardization of a post-transcriptional blocking tool for *L. major*, called morpholino antisense oligonucleotide, with the aim to induce in the future knockdown effects of some *L. major* telomeric components. Using these approaches, we hope that a new light can be launched about the function of components of the Leishmania telomeric machinery in the parasite cellular homeostasis and that the information obtained here will collaborate in the future to the development of a methods to control and/or eradicate leishmaniasis.

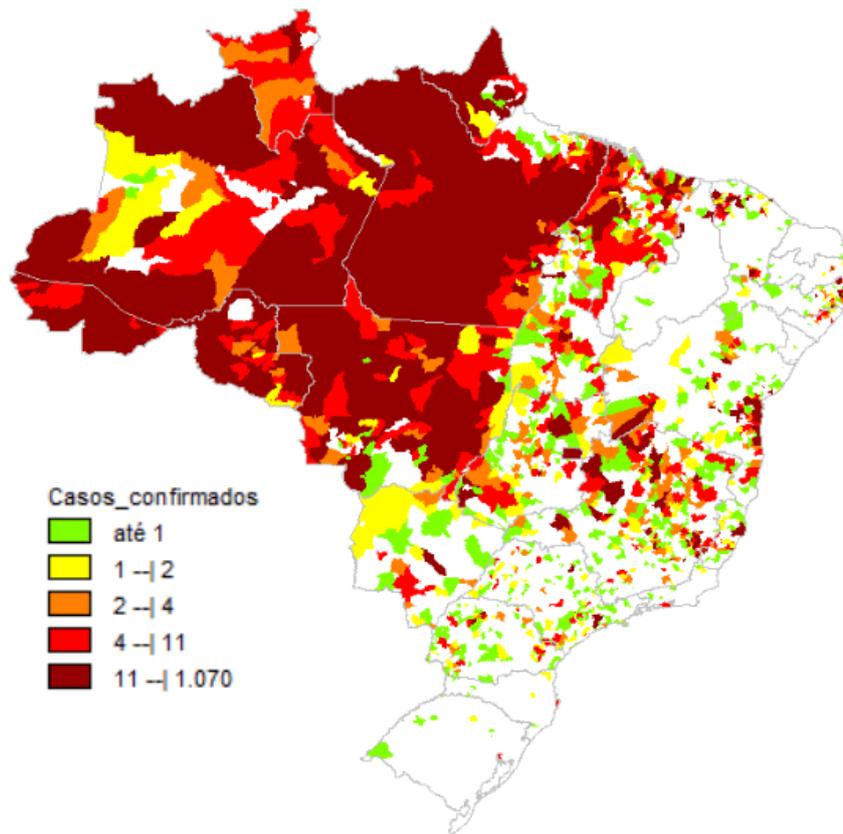
**Key Words:** *Leishmania*; Telomerase; BIBR1532; CRISPR-Cas.

## **1. Introdução**

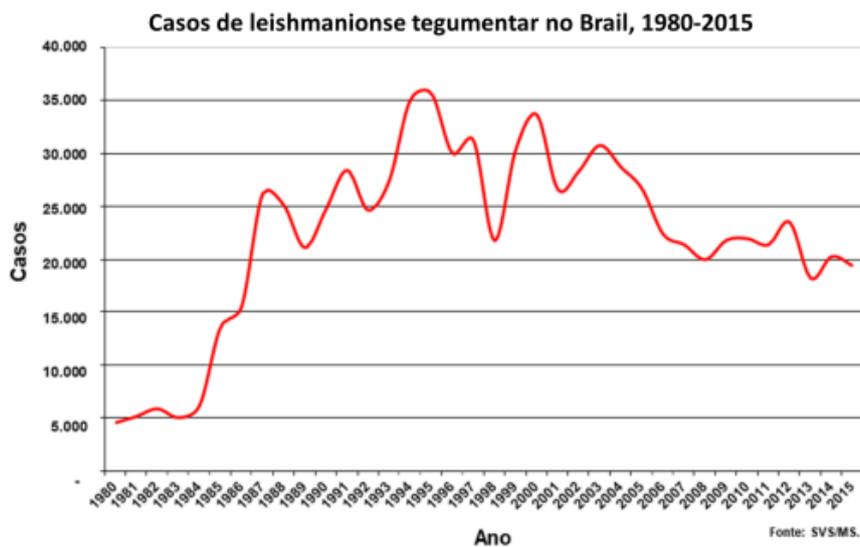
### **1.1. As leishmanioses e seu agente etiológico**

Os parasitos do gênero *Leishmania*, família Trypanosomatidae são causadores de uma gama de doenças conhecidas como leishmanioses. As leishmanioses são um conjunto de doenças que apresentam inúmeras formas clínicas, sendo classificadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), entre as doenças infecciosas mais severas de importância em saúde pública. (MANUAL DE VIGILANCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR-MS, 2017; WHO, 2017). Isto se deve ao fato de as leishmanioses apresentarem alta incidência em áreas tropicais e subtropicais, altas taxas de morbidade e mortalidade, ampla distribuição geográfica, grande variedade de espécies de parasitos causadores da doença e de formas clínicas manifestadas, ausência de tratamento eficiente e de medidas de prevenção adequadas (ALVAR et al., 2012; CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2017; WHO, 2017).

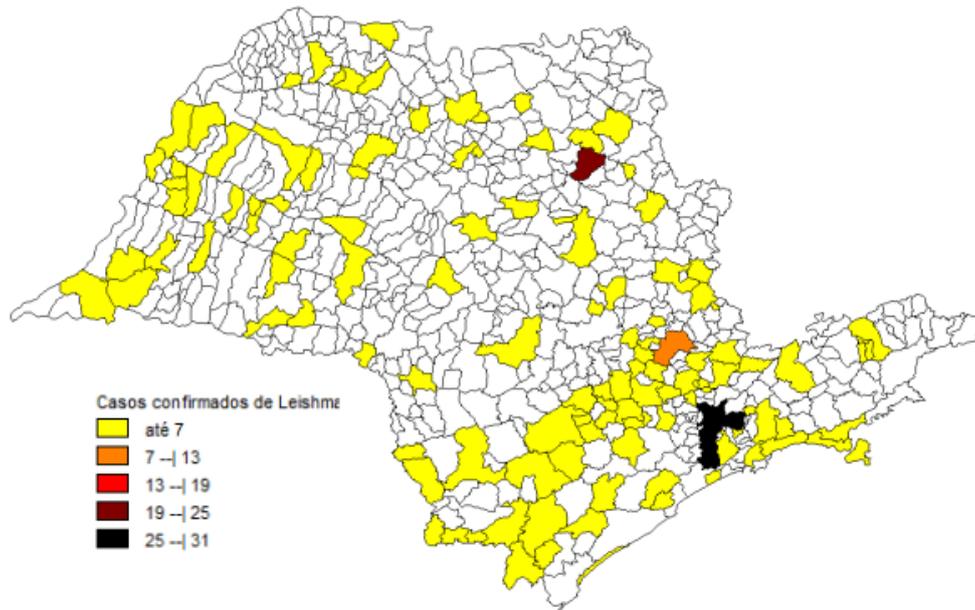
No Brasil, a doença apresenta ampla distribuição geográfica uma vez que se tem registro de casos em todas as regiões brasileiras (Figura 1), com uma média anual de 25.763 novos casos registrados e um coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes, durante os anos de 1980 e 2015 (Figura 2), sendo que, de acordo com dados obtidos pelos Sistema Único de Saúde (SUS) observou-se um total de 18.775 novos casos de leishmaniose tegumentar no Brasil no ano de 2017 dos quais 292 foram registrados no estado de São Paulo (Figura 3) (DATASUS, 2017. MANUAL DE VIGILANCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR-MS, 2017).



**Figura 1.** Mapa dos casos de leishmaniose tegumentar, por município, no Brasil no ano de 2017 de acordo com o município de origem do paciente. Dados coletados pelo SUS e obtidos na página oficial do DATASUS (DATASUS, 2017).



**Figura 2.** Casos confirmados de leishmaniose tegumentar no Brasil entre 1980 e 2015. Figura retirada do site do Ministério da Saúde (2017).



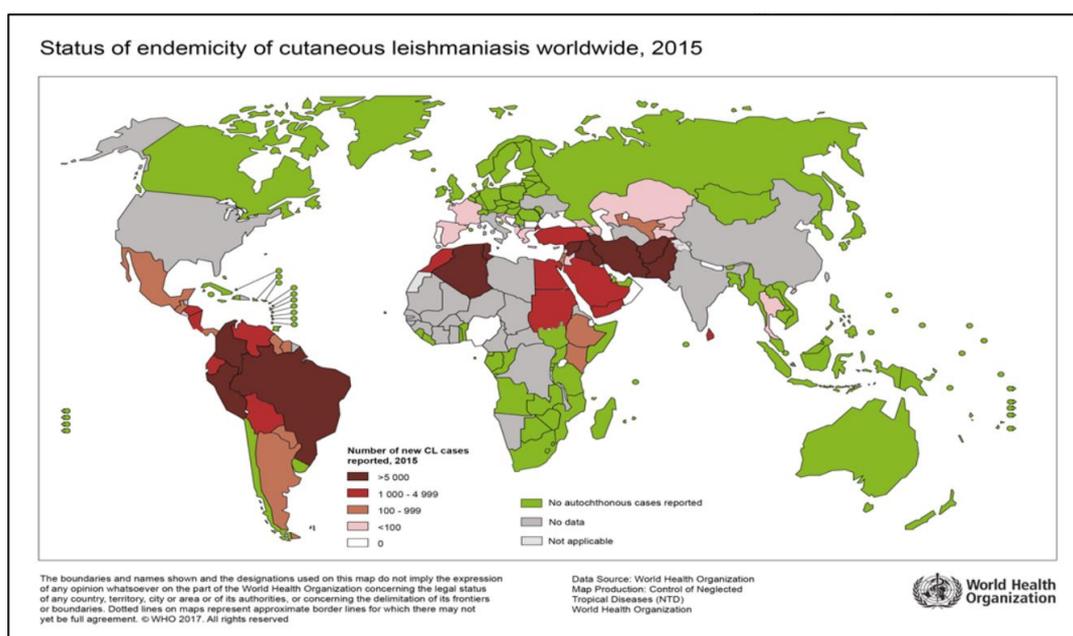
**Figura 3.** Mapa dos casos de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo no ano de 2017 de acordo com o município de origem do paciente. Dados coletados pelo SUS e obtidos na página oficial do DATASUS (DATASUS, 2017).

As leishmanioses podem se manifestar de diversas formas, destacando-se: leishmaniose tegumentar ou cutânea (LC), caracterizada pela presença de lesões na pele que variam em severidade e duração podendo ser auto-curativas, sendo em alguns casos, quando as lesões se apresentam de formas múltiplas, incapacitante; leishmaniose cutânea difusa (LCD), é uma doença que devido à deficiência na resposta imune celular do hospedeiro apresenta, na forma de lesões múltiplas, longa duração; leishmaniose mucocutânea (LMC), doença com característica desfigurante e mutilante causadora de úlceras nas mucosas de nariz, boca, laringe e faringe, as quais não curam espontaneamente, podendo causar a perda de extremidades do corpo; e a leishmaniose visceral (LV) ou kala-azar, a forma mais severa de leishmaniose, onde os parasitos infectam órgãos internos como o fígado e o pâncreas, levando a uma série de sintomas, em sua maioria fatal se não tratada adequadamente. No Brasil a forma visceral é causada pela espécie *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) (CHAPPUIS et al., 2007; PREVENTION, 2017; ROBERTS; JANOBY, 2000; WHO, 2017).

As leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, subdividido entre os subgêneros *Leishmania* e *Viannia* e transmitida ao homem pela fêmea de cerca de 30 espécies de dípteros, popularmente conhecidos como mosquito palha, birigui, cangalha, tatuquira, entre outros, divididos entre os gêneros *Phlebotomus*

(transmissor da leishmaniose no Velho Mundo) e *Lutzomya* (transmissor da leishmaniose no Novo Mundo). A forma clínica e a intensidade da doença estão diretamente relacionadas à espécie do parasito infectante e ao estado imunológico do hospedeiro mamífero (CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2017; CHAPPUIS et al., 2007; MANUAL DE VIGILANCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR-MS, 2017; WHO, 2017).

A leishmaniose cutânea é o tipo mais comum da doença, causada por diferentes espécies do gênero *Leishmania*, tais como a *L. amazonensis*, *L. major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. braziliensis* entre outras. No Brasil, a espécie *L. braziliensis* é a principal causadora de LC e *L. major* a principal espécie no Velho Mundo. Estima-se que surjam de 0,7 a 1,2 milhões de novos casos de leishmaniose tegumentar por ano no mundo (Figura 4) (CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; WHO, 2017



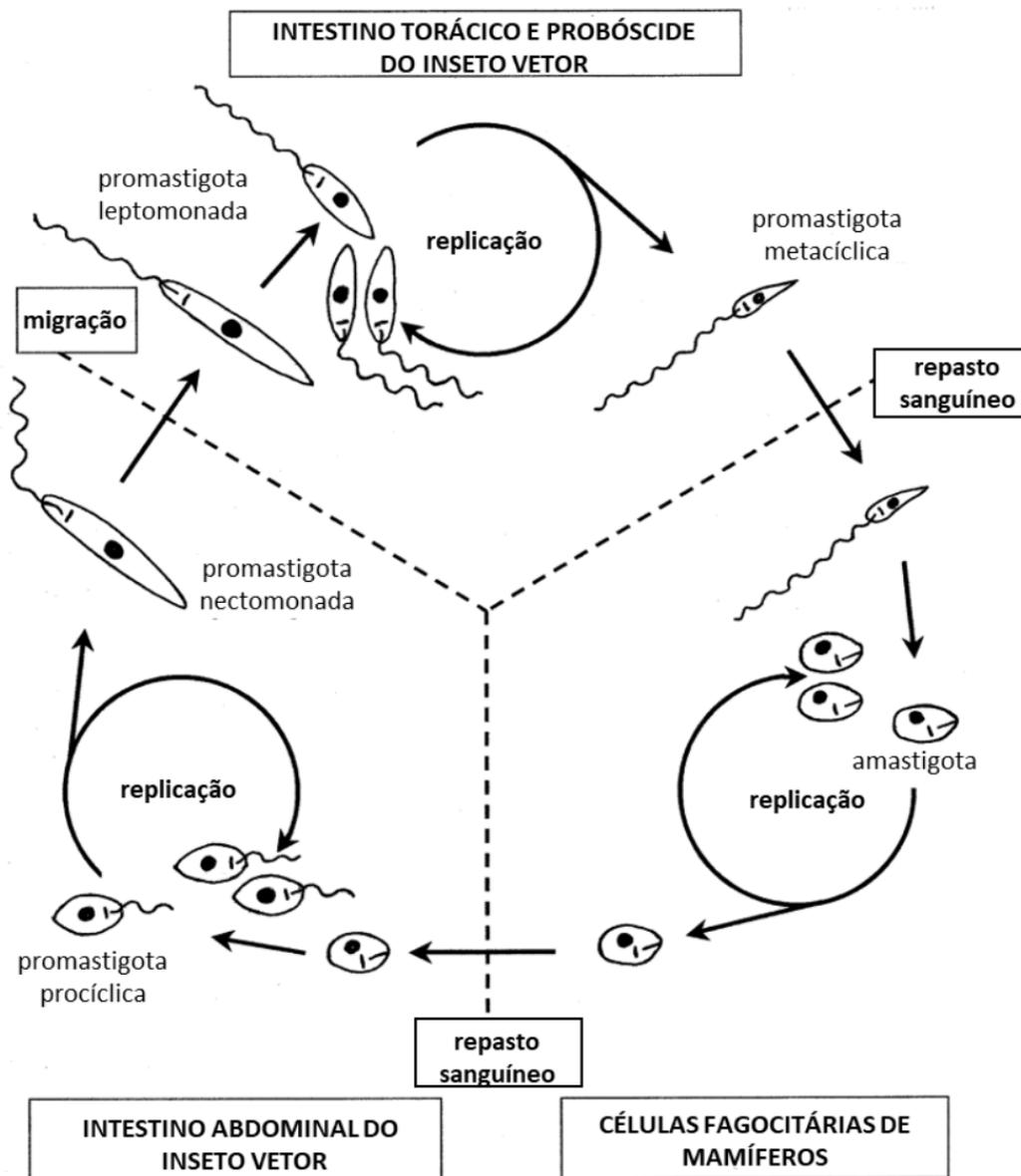
**Figura 4.** Distribuição de indivíduos infectados por leishmaniose cutânea no mundo. Figura retirada do site do WHO (“WHO | Global Health Observatory | Map Gallery”, [s.d.]

O ciclo de vida da *Leishmania* é realizado em dois hospedeiros diferentes, um hospedeiro mamífero e um inseto vetor, sendo por tanto um parasito com um ciclo de vida dito digenético, apresentando uma forma flagelada, com uma constituição alargada,

no inseto vetor e uma forma arredondada, na qual o flagelo não é aparente, no hospedeiro mamífero (CHAPPUIS et al., 2007) (Figura 5).

## **1.2. Ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania***

O ciclo de vida da *Leishmania spp.* inicia-se quando uma fêmea do inseto vetor, infectada com a forma promastigota infectiva não proliferativa (promastigota metacíclica) da *Leishmania*, se alimenta do sangue do hospedeiro mamífero, liberando estas formas infectivas na sua corrente sanguínea (DA SILVA et al., 2013; GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). Uma vez na corrente sanguínea, os macrófagos, e outras células fagocitárias, fagocitam as promastigotas metacíclica que então se transformam em amastigotas, de morfologia esférica e com flagelo inaparente, no interior da célula fagocitária e passam a se dividir por fissão binária, levando ao rompimento da célula e à infecção de novas células fagocitárias (CHAPPUIS et al., 2007; GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do díptero vetor pode ingerir células fagocitárias infectadas com amastigotas, e/ou amastigotas livres, do hospedeiro mamífero, e uma vez no trato digestivo do inseto (intestino abdominal), as amastigotas transforma-se em promastigotas procíclicas, altamente proliferativas e também denominadas de promastigotas recém-transformadas, em que adquirem uma forma ovalada com um curto flagelo aparente. Após diversas divisões celulares, uma parte das promastigotas procíclicas tornam-se alongadas, sendo então chamadas de promastigotas nectomonadas, e migram para o intestino anterior do inseto (intestino torácico) onde voltam a sofrer divisões celulares, sem aparente alterações morfológicas, sendo nessa fase chamadas de promastigotas leptomonadas na qual uma pequena parcela pode vir a transforma-se posteriormente na forma infectiva e não proliferativa do parasita, chamada promastigota metacíclica, fechando o ciclo quando o inseto infectado realiza um novo repasto sanguíneo (Figura 5 ) (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).



**Figura 5.** Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* spp, demonstrando de maneira resumida as formas do parasito no hospedeiro invertebrado (inseto vetor) e no hospedeiro mamífero. Adaptado de Gossage et al, 2003.

De acordo com Croft et al., (2006), os antimoniais pentavalentes são a primeira opção de tratamento das leishmanioses, porém, segundo Chappuis et al., (2007) e o Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar-MS (2017), esses fármacos tem a desvantagem de serem tóxicos e induzirem a resistência nos parasitos. Outros fármacos usados no combate às leishmanioses são a anfotericina B e a miltefosina; o primeiro é geralmente a escolha de muitos países por sua alta eficácia e poucos efeitos secundários, porém o seu valor elevado limita seu uso em países em desenvolvimento; a miltefosina

é o único fármaco anti-leishmaniose atualmente utilizado para tratamento das formas viscerais, no entanto, o seu efeito teratogênico impede a sua utilização por toda a população infectada (CHAPPUIS et al., 2007; MANUAL DE VIGILANCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR-MS, 2017). Assim, o fato de não existirem vacinas profiláticas contra as leishmanioses, as medidas de prevenção para combater a enfermidade baseiam-se no controle de vetores e dos reservatórios dos parasitos, como os cães infectados, e também na melhoria de habitações e condições de higiene da população (CHAPPUIS et al., 2007; WHO, 2017).

Mediante tais informações, a busca pelo desenvolvimento de novos fármacos, que sejam mais efetivos e que tenham ainda baixo custo e efeitos colaterais para os pacientes, se faz necessária. As descobertas recentes, tanto no que se refere à fisiologia dos parasitos, quanto ao sequenciamento do genoma de inúmeras espécies de *Leishmania*, abrem novas portas e trazem esperança para o desenvolvimento de novos fármacos que, em uma abordagem lógica, tenham mais de um alvo, a fim de diminuir a possibilidade de os parasitos desenvolverem resistência antes de serem eliminados do hospedeiro.

Entre as informações recentemente obtidas, os telômeros surgem como um dos alvos em potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, tendo em vista o seu papel na estabilidade do genoma dos parasitos bem como na proliferação celular (GIARDINI et al., 2014; SEKARAN; SOARES; JARSTFER, 2014).

### **1.3. Biologia molecular dos parasitos do gênero *Leishmania***

Parasitos do gênero *Leishmania* são organismos diplóides e assexuados com genoma diferente do genoma típico dos eucariotos. Seu genoma nuclear é de aproximadamente 70 Mb, possui de 34 a 36 cromossomos lineares, dependendo da espécie, com massa molecular variando de 0,35 a 3,0 Mb. A presença, de uma organela fusiforme única e especializada rica em DNA mitocondrial (kDNA) conhecida como cinetoplasto é outra característica marcante dos protozoários do gênero *Leishmania* (SIMPSON, 1987). Devido seus cromossomos condensados não serem visíveis durante a mitose, não é possível realizar análises citogenéticas em *Leishmania* spp., (IVENS et al., 2005; WINCKER et al., 1996). Em condições adversas, como seleção por drogas ou

estresse nutricional, tal protozoário pode amplificar segmentos específicos do genoma, transformando-os em minicromossomos. *Leishmania* spp. possuem o genoma conservado entre suas diferentes espécies, com a maioria dos polimorfismos concentrados nas extremidades dos cromossomos (STILES et al., 1999). Seus genes não apresentam íntrons e são transcritos como precursores policistrônicos (semelhante a bactérias), característica compartilhada por vários protozoários da ordem Kinetoplastida. A formação de mRNA maduros individuais envolve *trans-splicing*, em que se tem o acréscimo de um mini éxon (ou sequência líder), com *cap* 7-Metilguanossina em sua extremidade 5', e a adição da cauda poli-A na extremidade 3' (STILES et al., 1999). Como os promotores gênicos individuais estão ausentes, é provável que a regulação gênica ocorra em nível pós-transcricional (STILES et al., 1999), sendo que, uma possível evidência dessa regulação seja que os sítios de transcrição policistrônicos estejam próximos à histonas H3 acetiladas (THOMAS et al., 2009). O sequenciamento dos genomas de *L. infantum*, *L. braziliensis* e *L. amazonensis* demonstrou que a composição genética dessas três espécies é muito semelhante ao genoma de *L. major* (IVENS et al., 2005; PEACOCK et al., 2007; REAL et al., 2013), o que sugere que poucos genes do protozoário estão envolvidos na determinação da forma clínica da leishmaniose, desenvolvida após a infecção, e talvez o genoma do hospedeiro infectado tenha um papel mais importante nas manifestações clínicas da doença (PEACOCK et al., 2007).

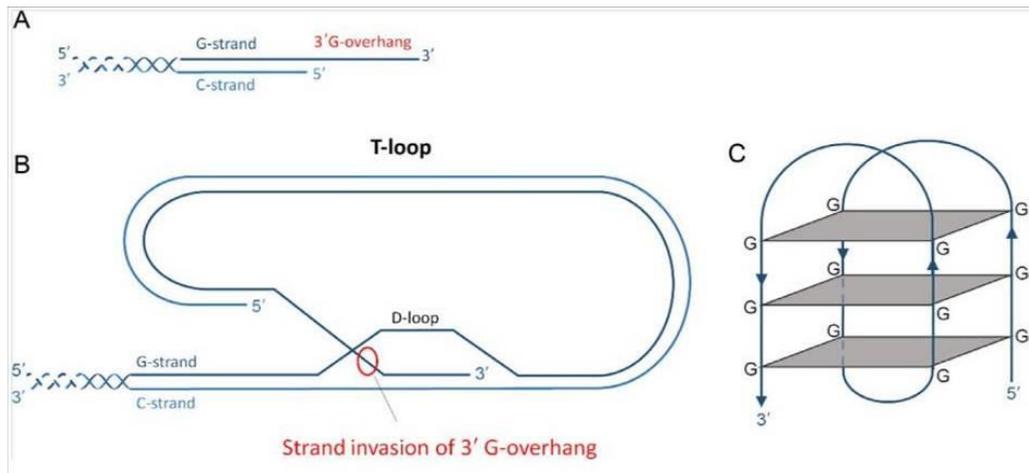
#### **1.4. Telômeros: estrutura e manutenção**

Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas, contendo repetições em *tandem*, localizados nas extremidades dos cromossomos da maioria dos eucariontes. Sua função é proteger as extremidades dos cromossomos da degradação, que resulta na perda de material genético codificante durante as sucessivas divisões celulares, e dos mecanismos de reparo das células que poderiam reconhecer esses terminais dos cromossomos como quebras de DNA em dupla fita (BLACKBURN; GALL, 1978; GIARDINI et al., 2014). Além da perda de material genético codificante, outra consequência do encurtamento gradual dos telômeros é a fusão das extremidades, que pode levar a outros danos no DNA, a senescência ou até a morte celular (Giardini et al.,

2014). Assim, o funcionamento da maquinaria telomérica está diretamente relacionado a processos biológicos, tais como ciclo celular, envelhecimento e câncer (GIARDINI et al., 2014).

Os telômeros são o substrato para a ribonucleoproteína (RNP) telomerase, uma transcriptase reversa, responsável pela replicação dos telômeros. A enzima utiliza um componente RNA como molde (BLACKBURN, 1990) para repor as perdas sofridas durante as sucessivas divisões celulares. O complexo mínimo da telomerase é formado por dois componentes principais, um componente proteico (*telomerase reverse transcriptase*; TERT) e um componente RNA longo não codificador (*Telomerase RNA*; TER), o qual possui uma sequência molde que é copiada, na ponta dos cromossomos, pela TERT. A TERT é a subunidade maior e que desempenha a função catalítica adicionando repetições teloméricas (TTAGGG) à extremidade 3'-OH dos telômeros, orientada pela sequência molde contida no componente de RNA (TER), que por sua vez, é um componente integral e essencial da enzima (GIARDINI et al., 2014). Embora a presença desses dois elementos seja suficiente para a replicação dos telômeros *in vitro*, esta ação *in vivo* necessita de outros componentes, os quais fazem parte do complexo RNP, geralmente específico de cada organismo (GIARDINI et al., 2014).

O DNA telomérico é formado por uma região de fita dupla e uma de fita simples, que na maioria das espécies é composto por curtas repetições simples (TTAGGG), sendo uma das fitas rica em guaninas enquanto a outra é rica em citosinas (Figura 5) (GIARDINI et al., 2014). A fita 3' termina em uma protrusão de fita simples rica em G, chamada "3' *G-overhang*", a qual é reconhecida por proteínas capazes de se associarem à fita simples de DNA, que muitas vezes cumprem o papel de proteger as extremidades ou de ativar a telomerase, regulando assim, a replicação dos telômeros (COLLINS, 2006; GIARDINI et al., 2014). A protrusão 3' *G-overhang* pode ainda vir a formar estruturas secundárias importantes para a proteção dos telômeros, como o *T-loop*, que consiste na invasão do 3' *G-overhang* na fita dupla, formando uma estrutura em laço, estabilizada por diversas proteínas, ou ainda, estruturas na forma de *G-quadruplex*. Ambas as estruturas possuem função de proteger as extremidades dos telômeros do ataque de nucleases (Figura 5) (GIARDINI et al., 2014).



**Figura 5. Diferentes configurações teloméricas.** (A) O DNA telomérico é formado por uma região de fita simples e uma de fita dupla. Um dos filamentos é rico em citosina (*C-rich*) e o filamento oposto é rico em guanina (*G-rich*) que também forma a protrusão 3' *G-overhang*. (B) Conformação secundária em *T-loop* do telômero, (C) Conformação secundária em *G-quadruplex* do telômero. Figura retirada de: Giardini et al., (2014).

As proteínas teloméricas podem interagir direta ou indiretamente com a telomerase e como outras proteínas, cuja função não está restrita somente aos telômeros, e com o próprio DNA, seja ele de fita dupla ou simples. Aparentemente suas funções estão relacionadas à região telomérica com a qual interagem (VEGA; MATEYAK; ZAKIAN, 2003). Durante o ciclo celular normal das células, a manutenção dos telômeros é constantemente modulada, ação esta, realizada pelas diferentes proteínas e suas inúmeras interações (STEWART et al., 2012; VEGA; MATEYAK; ZAKIAN, 2003). Graças à essas interações diversas, e à variação das proteínas em diferentes espécies, que os telômeros são estruturas dinâmicas, na qual a própria complexidade varia entre as espécies (STEWART et al., 2012; VEGA; MATEYAK; ZAKIAN, 2003).

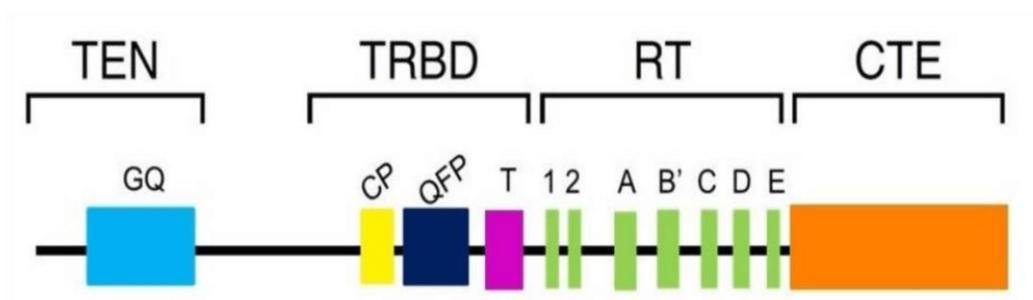
### 1.5. O complexo telomerase de *Leishmania* spp. e seus componentes TERT e TER

À semelhança do que acontece na maioria dos eucariotos, o DNA telomérico em *Leishmania* é composto por uma repetição curta de seis nucleotídeos, do tipo 5'-TTAGGG-3', associado direta ou indiretamente a proteínas e amplificado pela

telomerase. Em *Leishmania*, o complexo telomerase também é composto por um componente proteico TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) e por um componente de RNA denominado TER (*Telomerase RNA*) (GIARDINI et al., 2014).

O componente TERT, determinado em *Leishmania major* por um gene de cópia única (gene *LmTERT*), localizado no cromossomo 36 (*LmjF.36.T3930*) e tendo 4.356 pb (GIARDINI et al., 2006a), contém quatro domínios estruturais e funcionais (Figura 6), os domínios TEN (*telomerase essential N terminal*), TRBD (*telomerase RNA binding domain*), RT (*retrotranscriptase*) e CTE (*C-terminal extention*) (GIARDINI et al., 2006a; XIA et al., 2000). O domínio transcriptase reversa contém os motivos 1, 2 e A-E que estruturalmente se assemelham aos dedos e a palma de uma mão, enquanto o domínio CTE representa o polegar da mão e é uma região menos conservada, mas com importância na atividade enzimática (GIARDINI et al., 2014).

Dois domínios principais foram identificados na região amino-terminal da TERT, o domínio TEN (*telomerase essential N terminal*), que contém o motivo GQ (ARMBRUSTER et al., 2001; LAI; MITCHELL; COLLINS, 2001), implicado na interação da telomerase com o DNA telomérico, o qual não é muito conservado entre as TERTs de diferentes espécies, porém, é essencial para a atividade da enzima *in vivo* e *in vitro* e para sua processividade na adição dos nucleotídeos (JACOBS; PODELL; CECH, 2006; MORIARTY; MARIE-EGYPTIENNE; AUTEXIER, 2004; ROUDA; SKORDALAKES, 2007; SEALEY et al., 2010); e o domínio TRBD, que contém os motivos CP, QFP e T, implicados na interação do componente enzimático (TERT), com o componente RNA (TER), e que tem baixa afinidade por DNA (WYATT; WEST; BEATTIE, 2010; XIA et al., 2000). O domínio TRBD mostra uma alta conservação entre espécies e sua estrutura parece sugerir que é um bom sítio de interação de inibidores da telomerase (ROUDA; SKORDALAKES, 2007). Estes dois domínios estão unidos por uma região de aminoácidos não conservados e não estruturados conhecida como *linker* (WYATT; WEST; BEATTIE, 2010).



**Figura 6. Estrutura primária do componente TERT da telomerase.** Na fração amino-terminal está o domínio TEN (que contém o motivo GQ) e o domínio TRBD (que contém os motivos CP, QFP e T) separados por um *linker* não estruturado. Estes domínios são importantes para a interação da enzima com ácidos nucleicos (DNA telomérico e componente TER da telomerase). Na região carboxi-terminal estão os domínios RT que contém os motivos 1, 2 A-E, de importância para a atividade enzimática e o motivo CTE menos conservado entre as TERTs descritas e que parece também estar implicado na catálise da enzima (HUANG et al., 2014).

Os estudos de interação entre o componente TERT e o componente TER, mostram que o TER interage com vários motivos conservados na TERT, a maioria dos quais estão localizados na região TRBD (LAI; MITCHELL; COLLINS, 2001). Ensaaios de cristalografia que mostram a estrutura tridimensional exclusivamente do domínio TRBD evidenciam a importância deste domínio na interação com o TER e no processo de alongação telomérica (HARKISHEIMER et al., 2013; HUANG et al., 2014; SANDIN; RHODES, 2014). Porém, existe evidência de sítios de interação TERT-TER fora do domínio TRBD. Lewis e Wuttke (2012) propõem um sítio de união TER-TERT na região carboxi-terminal do domínio TEN, enquanto Harkisheimer et al. (2013) reporta a existência de um domínio conservado no *linker* da TERT de vertebrados, este motivo, chamado de TFLY é de importância para a interação entre os componentes e para a correta ação da telomerase.

Apesar da TERT do parasito compartilhar domínios estruturais com TERTs de outros eucariotos, ela apresenta substituições em resíduos de aminoácidos que formam motivos importantes (ex. motivo T, telomerase específico), que são característicos somente das TERTs de *Leishmania* (GIARDINI et al., 2006).

O TER de *Leishmania* (LeishTER), descrito pelo nosso grupo de pesquisa (VASCONCELOS et al., 2014), é codificado por um gene localizado em um locus sintênico no cromossomo 25 de cinco espécies de *Leishmania*. Todos os TER descritos têm uma estrutura secundária, altamente conservada entre as TERTs, que lhes permite realizar funções similares e interagir com a região TRBD (LUE, 2004). Isto é evidenciado pelo descobrimento de mutações no TER que são capazes de abolir a interação entre TER e TERT e que resultam numa incapacidade de manter o tamanho dos telômeros em diferentes organismos, pois estas mutações alteram segmentos conservados da estrutura secundária da molécula de RNA (LIN et al., 2004). Entre os componentes estruturais conservados do TER, está a região TBE (*template boundary*

*element*), envolvida com a interação com a telomerase e está localizada na porção 5' da molécula e a região do molde (GIARDINI et al., 2014), que consiste na sequência reversa complementar da repetição telomérica, com tamanho aproximado de uma repetição e meia (LUE, 2004). Outras regiões a se saber, que têm sido descritas como importantes na interação TERT-TER, são a região de *pseudoknot*, e o domínio CR4/5 que interage especificamente com o motivo QFP do domínio TRBD da TERT. São de importância também outras regiões conhecidas como *stem loops*, que formam a estrutura secundária da molécula. Estes elementos afetam a atividade e processividade enzimática da telomerase (CHEN; GREIDER, 2004; LUE, 2004).

O conhecimento mais aprofundado das características e funções dos componentes da telomerase em *Leishmania* pode ajudar a desenvolver novas estratégias para superar a leishmaniose, uma vez que a telomerase é considerada um alvo potencial para o tratamento anti-parasita. Por este motivo, neste trabalho propomos induzir a inibição *in vitro* e *in vivo* do componente TERT da telomerase de *L. major* utilizando a estratégia de nocaute por substituição gênica usando o sistema CRISPR-Cas9 (próximo tópico) e o tratamento dos parasitos com um inibidor específico da telomerase, o BIBR1532, com o intuito primário de se observar a real relevância da TERT pra a sobrevivência e viabilidade do parasito.

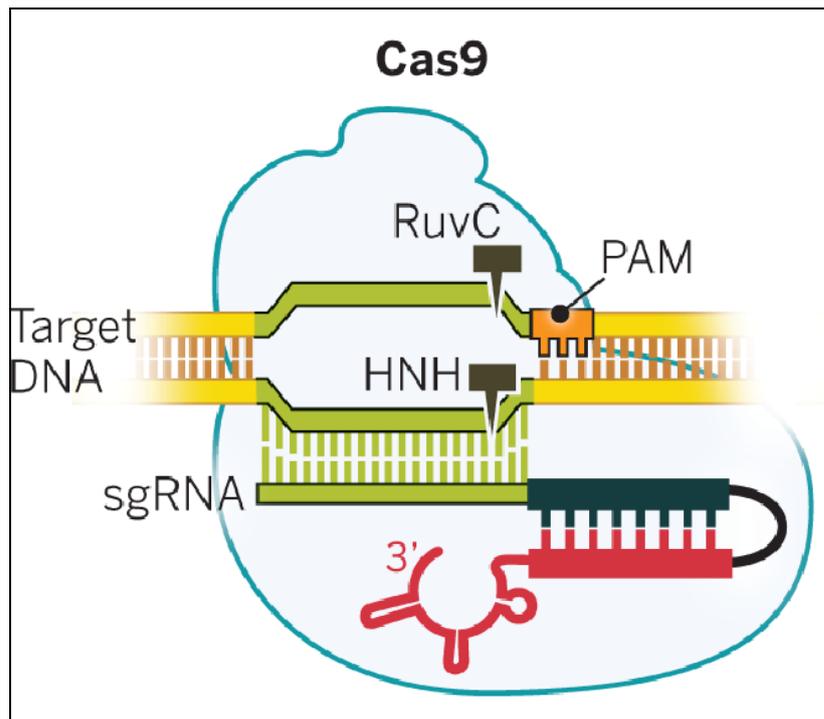
## **1.6. O sistema CRISPR-Cas9 usado na edição de genomas**

De acordo com Grissa et al (2007), a CRISPR (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*) trata-se de uma família de DNA repetitivo observado em cerca de 45% do domínio Bactéria e em 84% do domínio Archaea. Tais repetições são separadas por trechos de sequência variada, chamadas espaçadores e provenientes de DNA exógeno seja ele de um plasmídeo ou vírus, que uma vez transcrito em RNA age como um RNA guia (RNAg ou gRNA) para uma endonuclease inespecífica chamada Cas (CRISPR-associated). A endonuclease Cas por sua vez, reconhece e corta sequências de DNA homólogas ao seu RNAg, o que significa que diferentes RNAg resultam em sítios de cortes diferentes para a Cas (LANDER; CHIURILLO; DOCAMPO, 2016). A enzima Cas é bem diversa entre os diferentes organismos que possuem o sistema CRISPR-Cas, contudo a Cas9 (descoberta em *Streptococcus*

*pyogenes*) é mais amplamente utilizada por requerer apenas uma proteína Cas, um RNA guia e um DNA alvo para clivagem, podendo ser adaptada a diferentes organismos (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Assim, CRISPR em associação com a enzima Cas, forma o sistema imune CRISPR-Cas de bactérias e Archaeae, que permite a esses organismos “lembrarem” e destruírem DNA estranho com o qual tenham tido contato previamente (RATH et al., 2015).

Resumidamente, a ação do sistema CRISPR-Cas9 exige a associação entre uma endonuclease Cas9, e uma estrutura guia formada de dois RNAs, sendo um tracrRNA (*trans-activating CRISPR RNA*), com a função de ativar a Cas9, e um CRISPR RNA (crRNA) que determina a sequência de corte do DNA alvo (DELTCHEVA et al., 2011). Neste caso também é possível ser utilizada uma única molécula de RNA quimérica resultante da fusão do tracrRNA e crRNA, chamada gRNA (*guide RNA*) ou sgRNA (*single guide RNA*) (Figura 7) (JINEK et al., 2012; MALI et al., 2013). O crRNA ou o sgRNA possui na sua extremidade 5' uma sequência de 20 nucleotídeos, que é complementar a um trecho em um dos filamentos do DNA alvo chamado de sequência alvo (*target sequence*). A Cas9 por sua vez, reconhece uma sequência denominada PAM (*protospacer-adjacent motif*), localizado na porção 3' do filamento complementar onde se encontra a sequência alvo. As sequências PAM são específicas para cada tipo de Cas e no caso da CRISPR-Cas9, a PAM trata-se de um trinucleotídeo (NGG) onde o G significa o nucleotídeo guanina e o N pode ser qualquer um dos 4 nucleotídeos do DNA (Figura 7) (ANDERS et al., 2014).



**Figura 7.** Uso da CRISPR-Cas9 para introduzir quebras bifilamentares no DNA em um locus genômico, que se tornará alvo da maquinaria de reparo do DNA a qual catalisa o reparo de pontas não homólogas (NHEJ, nonhomologous end joining) ou por recombinação homóloga (HDR, homology-directed repair) (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Uma vez que a PAM é reconhecida, a Cas9 inicia a abertura do DNA alvo permitindo que a sequência de 20 nucleotídeos do sgRNA pareie com a sequência alvo no DNA (ANDERS et al., 2014). Havendo correspondência entre tais sequências, dois sítios ativos da Cas9 (RuvC e HNH) irão cortar ambos os filamentos do DNA (Figura 7), resultando em uma quebra bifilamentar que geralmente é reparada pela maquinaria de reparo de pontas não homólogas ou por recombinação homóloga, resultando na interrupção da expressão gênica ou até no nocaute gênico (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014).

Assim, com esta metodologia, pode-se alvejar sequências muito específicas no DNA de uma célula, como por exemplo o gene que codifica o componente TERT da telomerase de *Leishmania*.

### **1.7. Resultados da inibição da atividade da telomerase em organismos modelos e em *Trypanosoma brucei***

Muitos organismos fazem uso da telomerase para manter o tamanho dos telômeros e resolver o problema do término da replicação do DNA nas extremidades dos cromossomos (BLACKBURN, 2005). Em humanos e leveduras, a atividade da telomerase é finamente regulada por proteínas as quais são capazes de detectar o tamanho dos telômeros (GIARDINI et al., 2014), no entanto, em inúmeras situações a atividade do complexo telomerase é inibida, como no caso da maioria das células somáticas humanas em que a capacidade de adicionar repetições teloméricas é naturalmente perdida. Organismos unicelulares, que possuem a telomerase ativa, também podem vir a perder a capacidade de replicar seus telômeros, seja por um evento natural ou induzido. De forma geral, a perda da atividade do complexo telomerase leva ao encurtamento gradativo do tamanho dos telômeros, que ao final de vários ciclos celulares, culmina em senescência replicativa, crise e a morte celular por apoptose (DREESEN; CROSS, 2006; GIARDINI et al., 2014).

Em humanos, uma pequena porcentagem de células somáticas, que entram em senescência replicativa e apresentam telômeros curtos, pode ultrapassar este momento ao reativar a atividade da telomerase, correspondente a 85-90% desses casos, conseguindo assim manter sua proliferação. Já o restante das células, que não conseguem reativar a atividade da telomerase (10-15% dos tumores malignos), ou tiveram o gene que codifica um dos componentes do complexo RNP deletado ou inativado, fazem uso de mecanismos alternativos para o alongamento dos telômeros (ALT; *Alternative Lengthening of Telomeres*), a imagem do que ocorre em algumas leveduras e tripanosomatídeos como *Trypanosoma brucei*, (DREESEN; CROSS, 2006; GIARDINI et al., 2014; LUNDBLAD; BLACKBURN, 1993).

Os mecanismos de ALT são, em grande parte, baseados em eventos de recombinação que amplificam ou rearranjam sequências teloméricas existentes (GIARDINI et al., 2014), e foram primeiramente descritos em leveduras de brotamento *Saccharomyces cerevisiae*, as quais são capazes de sobreviver e alongar telômeros na ausência de telomerase, graças à ação de proteínas envolvidas com a maquinaria de recombinação homóloga (LUNDBLAD; BLACKBURN, 1993).

O *Trypanosoma brucei*, protozoário tripanosomatídeo causador da doença do sono, apresenta a sua superfície recoberta por uma densa camada de glicoproteínas virulentas conhecidas como “*Variant Surface Glycoprotein (VSG)*”. Como elas são transcritas, na sua maioria, a partir de sítios de expressão teloméricos denominados

“*Expression Sites (ES)*”, Dreesen e Cross (2006) decidiram verificar se a regulação da expressão de *VSG* dependia dos telômeros. Para tanto, geraram parasitos deficientes para a enzima telomerase usando deleção gênica. Eles verificaram que os parasitos telomerase negativos apresentaram perda progressiva dos telômeros a uma taxa de 3–6 bp por duplicação celular e que tal perda estava diretamente relacionada ao problema da terminação da replicação do DNA e ao tamanho do 3'-*G-overhang*. Após os telômeros alcançarem um tamanho crítico para o parasito, ocorreu a estabilização dos telômeros que continham *ES* silenciosos, por um mecanismo independente da telomerase, o que foi acompanhado da perda de minicromossomos e rearranjos entre os cromossomos de tamanho intermediário, sem nenhuma alteração aparente nos megacromossomos. Por outro lado, embora telômeros contendo *ES* ativos também tenham apresentado extenso encurtamento, eles frequentemente quebravam e os *VSGs*, que eram transcritos a partir dos mesmos, eram trocados por outros, via conversão gênica duplicativa. Quando a atividade da telomerase nestes parasitos foi restaurada, verificou-se que nos telômeros contendo sítios *ES* ativos, a taxa de alongação dos telômeros foi muito mais rápida (~160 bp/duplicação celular) que a taxa de alongação de telômeros contendo *ES* silenciosos, que foi da ordem de 6-8 bp/duplicação celular, sugerindo que a transcrição desfaz a cromatina telomérica, aumentando o acesso da telomerase para a alongação dos telômeros.

Assim, apesar de leveduras e tripanosomas naturalmente fazerem uso da telomerase para manter o tamanho dos seus telômeros, a resposta dos mesmos à perda da telomerase é utilizar modos alternativos a telomerase, como a recombinação homóloga entre terminais cromossômicos para garantir sua sobrevivência na ausência da enzima, mesmo que isto signifique grandes alterações genômicas, como ocorrem em *T. brucei* (DREESEN; CROSS, 2006).

## **1.8. Características do inibidor não competitivo da atividade da telomerase, BIBR1532**

O BIBR1532 (2-[*E*]-3-naphtalen-2-yl-but-2-enylamino]- benzoic acid) é uma molécula sintética pequena (não competitiva e não nucleosídica) que impede a alongação da repetição telomérica, interferindo com a processividade da telomerase

(BARMA et al., 2003). Pascolo et al. (2002), propuseram que o BIBR1532 possui um sítio próprio de interação na TERT, distinto dos sítios de interação com o DNA e RNA.

Tal ideia foi demonstrada por Bryan et al. (2015), através de análises da estrutura cristalográfica do componente TERT da telomerase de *Tribolium castaneum* (tcTERT), que o BIBR1532 interage com o domínio catalítico da enzima em um bolso hidrofóbico conservado (motivo FVYL), localizado próximo, na montagem final da proteína, ao domínio TRBD (*Telomerase RNA Binding Domain*) e a superfície do TRBD que interage com o domínio de ativação CR4/5 no RNA da telomerase humana (hTER). Mutações nesse bolso hidrofóbico FVYL da hTERT, resultam em diminuição na interação TERT-TER e no tamanho dos telômeros. Além disso, algumas mutações em resíduos de aminoácidos presentes nesse motivo são encontradas em portadores das telomeropatias conhecidas como disqueratose congênita e anemia aplástica, demonstrando a relevância biológica e clínica do motivo FVYL (BRYAN et al., 2015). Desta forma, a hipótese dos autores de que o contato entre o motivo FVYL e CR4/5 muito provavelmente induz a montagem ou estabilização do complexo RNP TERT-TER, contribuindo para a atividade enzimática é corroborada. Assim, quando o inibidor de telomerase BIBR1532 se liga ao motivo FVYL ele perturba essa interação impedindo a montagem apropriada do complexo e, por conseguinte, inibe a atividade da enzima (BRYAN et al., 2015).

Um alinhamento entre as sequências de aminoácidos da proteína TERT de *L. major* (LmTERT) e da TERT humana (hTERT), demonstrou que o motivo FVYL é conservado entre estas espécies (Figura 8). É notável a semelhança na composição de aminoácidos do motivo FVYL de *L. major*, em comparação com o mesmo motivo da enzima TERT de humano (hTERT) (BRYAN et al., 2015). Os resíduos que se ligam ao BIBR1532 em hTERT são F1012, V1025, Y1089, e L1092, enquanto que em *L. major* eles sofreram substituições conservadas, a saber: a F1012 foi substituída por uma valina (V1305), a V1025 por uma metionina (M1317), a Y1089 por um triptofano (W1396), sendo a única exceção a substituição não conservada da L1092 por uma serina (S1400) (Figura 8). Embora a sequência primária de aminoácidos sugira semelhança, ela não é suficiente para assegurar que, em *L. major*, somente os resíduos do motivo FVYL, sejam os responsáveis pela interação de LmTERT com o BIBR1532.

Vale ressaltar que a LmTERT (156 kDa) é bem maior que a hTERT (80kDa) (GIARDINI et al., 2006a), o que pode significar que outros resíduos na TERT do

parasito possam estar envolvidos nessa interação. O alinhamento das estruturas terciárias de ambas as proteínas certamente poderá contribuir para confirmar esses achados preliminares.

```

L. major    LPVARNRCVAVLLLRPLAVCVGRLCRLLSGHQRFLLAARQSACDVSAAEV RACVL----T 1311
H. sapiens  -----KCHS-LFLDLQVNSLQTV--TNIYKILL-----LQAYRFHACVLQLPFHQ 1023
M. musculus -----KCHG-LFLDLQVNSLQTV--INIYKIFL-----LQAYRFHACVIQLPFDQ 1023
R. novergicus -----KCHG-LFLDLQVNSLQTV--INIYKIFL-----LQAYRFHACVIQLPFDQ 1023
M. auratus  -----KCHS-LFLDLQMNSLQTV--INVYKIFL-----LQAYRFHACALQLPFDQ 1023
      .*.*.*  : : :.*  :.* ..*.:

L. major    ALHRTMQAKLRVLQARTVCVVTAQRGRTPRGTSLKGRRNHFCSHEALSAGRKCCERRRKG 1371
H. sapiens  QVWKNPTFFLRVISDTASLCYSILKAKNA-GMSLGAKG-----AAGPLPSEAVQ-- 1071
M. musculus RVRKNLTFFLGISSQASCCYAILKVKNP-GMTLK-----ASGSFPPEAAH-- 1069
R. novergicus RVRKNLTFFLGISSQASCCYAILKVKNP-GMTLK-----ASGSFPPEAAH-- 1069
M. auratus  HVRKNPAFFLSIISNIASCCYSILKVKNP-GMTLKAKG-----ASGSFPPEAAR-- 1071
      :... * : : : :... * : * : * .

```



```

L. major    RNRNRNTRVCLRSFWWLAEEVESQWRRSLSALHRAAPRLGEARGPTALSPSPGASASLL 1431
H. sapiens  -----WLCHQAF-LLKLTRHRVTYVPLLGSLRRTAQTQLSRKLPGTTLTALEAAANPAL 1123
M. musculus -----WLCYQAF-LLKLAHHSVYKCLLGPLRTAQKLLCRKLPEATMTILKAAADPAL 1121
R. novergicus -----WLCYQAF-LLKLAHHSVYKCLLGPLRTAQKLLCRKLPEATMTILKAAADPAL 1121
M. auratus  -----WLCYQAF-LLKLAGHSVTYKCLLGPLRTAQKQLCRKLPRATMAILETAADPAL 1123
      ..*.* * : : *.* * * : : *.*

```

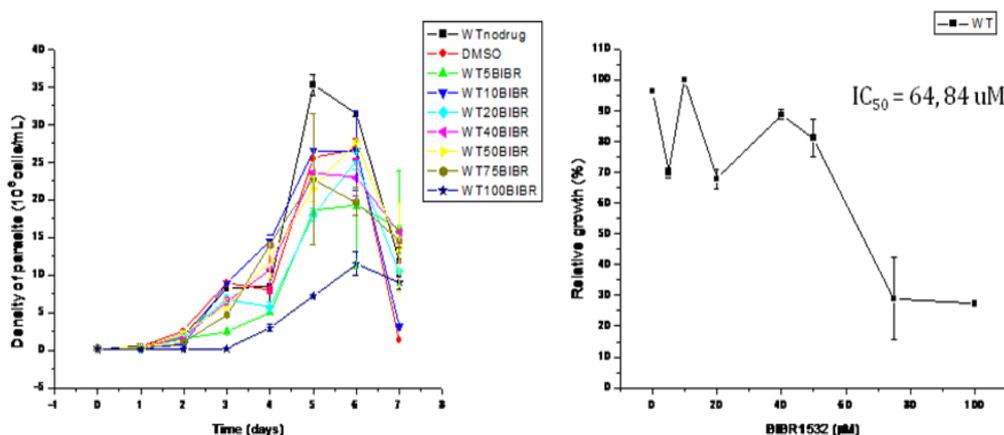
**Figura 8. Comparação entre as regiões C-terminal das TERT humana e de *Leishmania major* que contém o motivo FVYL de interação com o inibidor BIBR1532.** No alinhamento (MUSCLE, Multiple Sequence Comparison by Log – Expectation, EMBL-EBI, <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkh340>), usando parâmetros padrão, os resíduos de aminoácidos sombreados em amarelo são aqueles que estão envolvidos na interação da com BIBR1532 dentro do motivo FVYL. Verifica-se que em *L. major*, ocorrem substituições conservativas para a maioria dos resíduos com exceção da leucina (L), na posição 1092 na TERT de mamíferos, ser trocada por uma serina (S), na posição 1400 na LmTERT.

Além disso, é importante informar que o BIBR1532 tem pouco efeito sobre as polimerases de DNA e RNA de mamíferos, sendo considerado um dos mais potentes inibidores específicos da telomerase (DAMM et al., 2001; SHIRGAHI TALARI et al., 2015; PASCOLO et al., 2002; PIOTROWSKA-NITSCHKE et al., 2005). Por outro lado, tem efeito antiproliferativo muito potente sobre células provenientes de diferentes tipos de tumores, incluindo mama, pulmão, leucemia, ovário, etc., induzindo essas células a senescência e apoptose de maneira dose-dependente (RUDEN; PURI, 2013). Entretanto, as mesmas doses não afetam a viabilidade de células progenitoras e de células somáticas

normais (CHEN; LI; TOLLEFSBOL, 2009; EL-DALY et al., 2005; PARSCH et al., 2008; PASCOLO et al., 2002) .

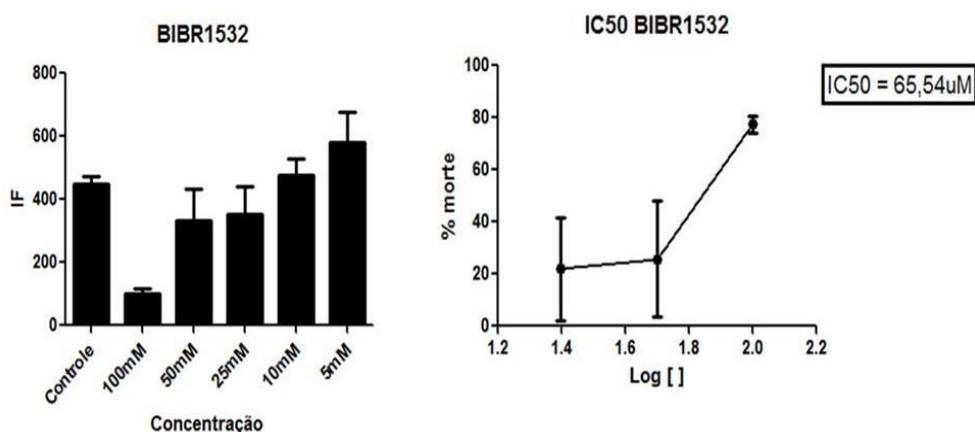
O fato das leishmanioses serem doenças de ocorrência mundial, e o Brasil um dos principais países que apresenta alta incidência da doença, a ausência de fármacos 100% eficientes e com preços acessíveis a toda população e com poucos efeitos colaterais, assim como a inexistência de vacinas com capacidade profilática, faz com que novas formas de combate e prevenção a tais enfermidades parasitárias sejam obtidas com urgência, no entanto, primariamente é preciso entender o funcionamento e relevância das maquinarias e processos biológicos do organismo o que permite projetar e inferir metodologias de combate, controle e prevenção desse organismo.

Graças a estudos recentes desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa, em especial pela Pós-Doutora Marcela Segatto, foi possível observar que formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio axênico e formas amastigotas durante infecção de macrófagos in vitro, tratadas com BIBR1532 na concentração estimada de 64,84  $\mu\text{M}$  (Figura 9) e 65,64  $\mu\text{M}$  (Figura 10), respectivamente, apresentaram redução de crescimento quando comparadas com parasitos sem tratamento (controle). Também foi possível mostrar que BIBR1532 tem ação sobre a capacidade infectiva da forma amastigota, e que não induz toxicidade a macrófagos peritoniais de camundongo BALB/c, usado nos testes (Figura 11). Estes resultados sugerem a ação leishmanicida do BIBR1532 e por isso propusemos neste trabalho, estudar sua ação direta sobre a atividade da enzima telomerase do parasito.

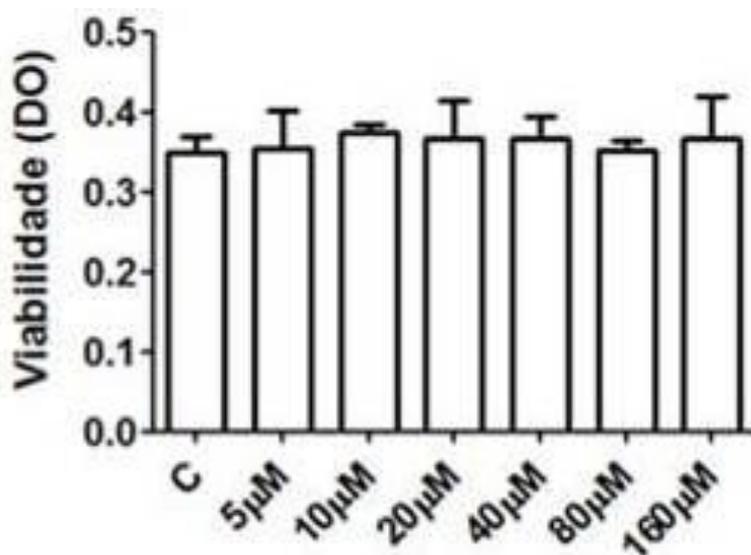


**Figura 9.** Curva de crescimento de *L. amazonensis* na forma promastigota na presença de diferentes concentrações do inibidor BIBR1532 e determinação da dose de tratamento do fármaco. Gráfico da

esquerda, densidade de parasitos x dias em cultura na presença de BIBR1532 nas seguintes concentrações: 0, 5, 10, 20, 40, 50, 75 e 100  $\mu$ M. Gráfico da direita, porcentagem relativa de crescimento x concentração de BIBR1532, para determinação a dose de tratamento usando o programa *GraphPad Prism* versão 5.01.



**Figura 10.** Efeito do tratamento com diferentes concentrações de BIBR1532 sobre macrófagos infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* e determinação da dose do inibidor a ser usada. No gráfico da esquerda, diferentes concentrações do BIBR1532 foram testadas após 24h de infecção de macrófagos com formas amastigotas de *L. amazonensis*. O índice de infecção foi calculado 48 horas após o tratamento utilizando-se o cálculo Índice de Infecção (IF) = % macrófagos infectados x n° médio de amastigotas/macrófago. \*P<0,0001 em relação ao controle, estimado usando ANOVA. No gráfico mostrado a direita, determinou-se a concentração do BIBR1532 a ser utilizada em cultura de macrófagos infectados com formas amastigotas, [log [concentração do fármaco] x %morte (inibição)] usando-se o *GraphPad Prism* versão 5.01.



## 6. Referências

- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, p. e35671, 31 maio 2012.
- AMBIT, A. et al. Morphological Events during the Cell Cycle of *Leishmania major*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1429–1438, nov. 2011.
- ANDERS, C. et al. Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease. **Nature**, v. 513, n. 7519, p. 569–73, 25 set. 2014.
- APARECIDA DOS REIS, LUANA, 20117. Estudo Da Interação Dna Com O Corante Fluorescente Dapi Utilizando A Técnica De Pinça Ótica. [s.l: s.n.]. Disponível em: <[http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/11580/texto\\_completo.pdf?sequence=1](http://www.locus.ufv.br/bitstream/handle/123456789/11580/texto_completo.pdf?sequence=1)>. Acesso em: 22 ago. 2018.
- ARMBRUSTER, B. N. et al. N-terminal domains of the human telomerase catalytic subunit required for enzyme activity in vivo. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 22, p. 7775–86, 15 nov. 2001.
- BARMA, D. K. et al. Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 13, n. 7, p. 1333–6, 7 abr. 2003.
- BASHASH, D. et al. Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells. **Hematology (Amsterdam, Netherlands)**, v. 22, n. 6, p. 330–340, 3 jul. 2017.
- BENEKE, T. et al. A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. **Royal Society Open Science**, v. 4, n. 5, p. 1–16, 2017.
- BERARDINELLI, F. et al. Targeting telomerase and telomeres to enhance ionizing radiation effects in in vitro and in vivo cancer models. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 773, p. 204–219, jul. 2017.
- BLACKBURN, E. H. Telomeres and their synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 249, n. 4968, p. 489–90, 3 ago. 1990.
- BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. **FEBS letters**, v. 579, n. 4, p. 859–62, 7 fev.

2005.

BLACKBURN, E. H.; GALL, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. **Journal of molecular biology**, v. 120, n. 1, p. 33–53, 25 mar. 1978.

BRYAN, C. et al. Structural Basis of Telomerase Inhibition by the Highly Specific BIBR1532. **Structure (London, England : 1993)**, v. 23, n. 10, p. 1934–42, 6 out. 2015.

CAMPELO, R. et al. *Leishmania major* Telomerase TERT Protein Has a Nuclear/Mitochondrial Eclipsed Distribution That Is Affected by Oxidative Stress. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 57–66, jan. 2015.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL. CDC - Leishmaniasis - Disease. 2017.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat.Rev.Microbiol.**, v. 5, n. 1740–1534 (Electronic), p. 873–882, 2007.

CHEN, H.; LI, Y.; TOLLEFSBOL, T. O. Strategies Targeting Telomerase Inhibition. **Molecular Biotechnology**, v. 41, n. 2, p. 194–199, 28 fev. 2009.

CHEN, J.-L.; GREIDER, C. W. An emerging consensus for telomerase RNA structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14683–4, 12 out. 2004.

COLLINS, K. The biogenesis and regulation of telomerase holoenzymes. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 7, n. 7, p. 484–94, jul. 2006.

CONTE, F. F.; CANO, M. I. N. Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 13, p. 1435–1443, nov. 2005.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical microbiology reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–26, 1 jan. 2006.

DA SILVA, M. S. et al. **Nuclear DNA replication in trypanosomatid protozoa.** [s.l.: s.n.].

DA SILVA, M. S. et al. Differences in the Detection of BrdU/EdU Incorporation

Assays Alter the Calculation for G1, S, and G2 Phases of the Cell Cycle in Trypanosomatids. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 64, n. 6, p. 756–770, nov. 2017.

DAMM, K. et al. A highly selective telomerase inhibitor limiting human cancer cell proliferation. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 24, p. 6958–6968, 17 dez. 2001.

DATASUS, 2017.

<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>.

Disponível em:

<<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0203&id=29878153>>.

Acesso em: 7 set. 2018.

DELTCHEVA, E. et al. CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. **Nature**, v. 471, n. 7340, p. 602–607, 31 mar. 2011.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, p. 1258096–1258096, 28 nov. 2014.

DREESEN, O.; CROSS, G. A. M. Telomerase-independent stabilization of short telomeres in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and cellular biology**, v. 26, n. 13, p. 4911–9, 1 jul. 2006.

DREESEN, O.; LI, B.; CROSS, G. A. M. Telomere structure and shortening in telomerase-deficient *Trypanosoma brucei*. **Nucleic Acids Research**, v. 33, n. 14, p. 4536–4543, 2005.

EL-DALY, H. et al. Selective cytotoxicity and telomere damage in leukemia cells using the telomerase inhibitor BIBR1532. **Blood**, v. 105, n. 4, p. 1742–1749, 15 fev. 2005.

GIARDINI, M. A. et al. The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. **Parasitology Research**, v. 98, n. 5, p. 447–454, 14 abr. 2006a.

GIARDINI, M. A. et al. The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. **Parasitology Research**, v. 98, n. 5, p. 447–454, 14 abr. 2006b.

- GIARDINI, M. A. et al. Telomere and telomerase biology. **Progress in molecular biology and translational science**, v. 125, p. 1–40, 2014.
- GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International journal for parasitology**, v. 33, n. 10, p. 1027–34, 15 set. 2003.
- GRISSA, I.; VERGNAUD, G.; POURCEL, C. CRISPRFinder: a web tool to identify clustered regularly interspaced short palindromic repeats. **Nucleic acids research**, v. 35, n. Web Server issue, p. W52-7, 8 jul. 2007.
- HARKISHEIMER, M. et al. A motif in the vertebrate telomerase N-terminal linker of TERT contributes to RNA binding and telomerase activity and processivity. **Structure (London, England : 1993)**, v. 21, n. 10, p. 1870–8, 8 out. 2013.
- HUANG, J. et al. Structural basis for protein-RNA recognition in telomerase. **Nature structural & molecular biology**, v. 21, n. 6, p. 507–12, 4 jun. 2014.
- ISHEMGULOVA, A. et al. CRISPR/Cas9 in *Leishmania mexicana*: A case study of LmxBTN1. **PLoS ONE**, v. 13, n. 2, p. 1–17, 2018.
- IVENS, A. C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436–42, 15 jul. 2005.
- JACOBS, S. A.; PODELL, E. R.; CECH, T. R. Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 3, p. 218–25, 5 mar. 2006.
- JAISWAL, R.; KUMAR, P.; YADAVA, P. Telomerase and its extracurricular activities. **Cellular and Molecular Biology Letters**, v. 18, n. 4, p. 538–54, 1 jan. 2013.
- JINEK, M. et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science (New York, N.Y.)**, v. 337, n. 6096, p. 816–21, 17 ago. 2012.
- KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for

extrachromosomal replication and expression. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 3, p. 1084–94, mar. 1990.

KONG, W. et al. Knockdown of hTERT and Treatment with BIBR1532 Inhibit Cell Proliferation and Invasion in Endometrial Cancer Cells. **Journal of Cancer**, v. 6, n. 12, p. 1337–1345, 2015.

LAI, C. K.; MITCHELL, J. R.; COLLINS, K. RNA binding domain of telomerase reverse transcriptase. **Molecular and cellular biology**, v. 21, n. 4, p. 990–1000, 15 fev. 2001.

LANDER, N.; CHIURILLO, M. A.; DOCAMPO, R. Genome Editing by CRISPR/Cas9: A Game Change in the Genetic Manipulation of Protists. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 63, n. 5, p. 679–90, set. 2016.

LAVANYA, C. et al. Down regulation of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression by BIBR1532 in human glioblastoma LN18 cells. **Cytotechnology**, v. 70, n. 4, p. 1143–1154, 15 ago. 2018.

LEWIS, K. A.; WUTTKE, D. S. Telomerase and telomere-associated proteins: structural insights into mechanism and evolution. **Structure (London, England : 1993)**, v. 20, n. 1, p. 28–39, 11 jan. 2012.

LIN, J. et al. A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 41, p. 14713–8, 12 out. 2004.

LING, X.; WEN, L.; ZHOU, Y. Role of Mitochondrial Translocation of Telomerase in Hepatocellular Carcinoma Cells with Multidrug Resistance. **International Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 7, p. 545–554, 2012.

LIPINSKA, N. et al. Telomerase and drug resistance in cancer. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 74, n. 22, p. 4121–4132, 16 nov. 2017.

LUE, N. F. Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? **BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology**, v. 26, n. 9, p. 955–62, set. 2004.

- LUNDBLAD, V.; BLACKBURN, E. H. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. **Cell**, v. 73, n. 2, p. 347–60, 23 abr. 1993.
- MALI, P. et al. RNA-Guided Human Genome Engineering via Cas9. **Science**, v. 339, n. 6121, p. 823–826, 15 fev. 2013.
- MALLINSON, D. J.; COOMBS, G. H. Biochemical characteristics of the metacyclic forms of *Leishmania major* and *L. mexicana mexicana*. **Parasitology**, v. 98, n. 01, p. 7, 6 jan. 1989.
- MANUAL DE VIGILANCIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR-MS, 2017.  
**Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].
- MENG, E. et al. Targeted inhibition of telomerase activity combined with chemotherapy demonstrates synergy in eliminating ovarian cancer spheroid-forming cells. **Gynecologic Oncology**, v. 124, n. 3, p. 598–605, mar. 2012.
- MORIARTY, T. J.; MARIE-EGYPTIENNE, D. T.; AUTEXIER, C. Functional organization of repeat addition processivity and DNA synthesis determinants in the human telomerase multimer. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 9, p. 3720–33, maio 2004.
- Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC**. Disponível em: <[http://www.gene-tools.com/morpholino\\_antisense\\_oligos](http://www.gene-tools.com/morpholino_antisense_oligos)>. Acesso em: 31 ago. 2017.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MOTTRAM, J. Protocols for handling and working with *Leishmania* species. **Mottram laboratory**, p. 2–31, 2008.
- MUELLER, S. et al. Targeting telomerase activity by BIBR1532 as a therapeutic approach in germ cell tumors. **Investigational New Drugs**, v. 25, n. 6, p. 519–524, 27 set. 2007.
- MUÑOZ-JORDÁN, J. L. et al. t-loops at trypanosome telomeres. **The EMBO journal**, v. 20, n. 3, p. 579–88, 1 fev. 2001.
- MUZZA, M. et al. Oxidative stress and the subcellular localization of the telomerase

reverse transcriptase (TERT) in papillary thyroid cancer. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 431, p. 54–61, 15 ago. 2016.

PARSCH, D. et al. Consequences of Telomerase Inhibition by BIBR1532 on Proliferation and Chemosensitivity of Chondrosarcoma Cell Lines. **Cancer Investigation**, v. 26, n. 6, p. 590–596, 11 jan. 2008.

PASCOLO, E. et al. Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 18, p. 15566–15572, 2002.

PEACOCK, C. S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature genetics**, v. 39, n. 7, p. 839–47, 17 jul. 2007.

PIOTROWSKA-NITSCHKE, K. et al. Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. **Development**, v. 132, n. 3, p. 479–490, 5 jan. 2005.

PREVENTION, C.-C. FOR D. C. AND. CDC - Leishmaniasis. 2017.

PureLink ® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit Purifying PCR Products. [s.d.].

RATH, D. et al. Efficient programmable gene silencing by Cascade. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 1, p. 237–46, 9 jan. 2015.

REAL, F. et al. The genome sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: functional annotation and extended analysis of gene models. **DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes**, v. 20, n. 6, p. 567–81, 1 dez. 2013.

ROBERTS, L. S.; JANOBY, J. **Gerald D. Schmidt & Larry S. Roberts' foundations of parasitology**. 6 ed. ed. Boston: McGraw Hill, 2000.

ROBINSON, K. A.; BEVERLEY, S. M. Improvements in transfection efficiency and tests of RNA interference (RNAi) approaches in the protozoan parasite *Leishmania*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 128, n. 2, p. 217–28, maio 2003.

ROUDA, S.; SKORDALAKES, E. Structure of the RNA-binding domain of

telomerase: implications for RNA recognition and binding. **Structure (London, England : 1993)**, v. 15, n. 11, p. 1403–12, nov. 2007.

RUBIO, M. A.; DAVALOS, A. R.; CAMPISI, J. Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress. **Experimental Cell Research**, v. 298, n. 1, p. 17–27, 1 ago. 2004.

RUDEN, M.; PURI, N. Novel anticancer therapeutics targeting telomerase. **Cancer Treatment Reviews**, v. 39, n. 5, p. 444–456, 1 ago. 2013.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D. W. (DAVID W. **Molecular cloning : a laboratory manual**. [s.l.] Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANDIN, S.; RHODES, D. Telomerase structure. **Current opinion in structural biology**, v. 25, p. 104–10, abr. 2014.

SARETZKI, G. Telomerase, mitochondria and oxidative stress. **Experimental Gerontology**, v. 44, n. 8, p. 485–492, ago. 2009.

SARIN, K. Y. et al. Conditional telomerase induction causes proliferation of hair follicle stem cells. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 1048–52, 18 ago. 2005.

SEALEY, D. C. F. et al. The N-terminus of hTERT contains a DNA-binding domain and is required for telomerase activity and cellular immortalization. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 6, p. 2019–35, abr. 2010.

SEKARAN, V.; SOARES, J.; JARSTFER, M. B. Telomere maintenance as a target for drug discovery. **Journal of medicinal chemistry**, v. 57, n. 3, p. 521–38, 13 fev. 2014.

SHIRGAHI TALARI, F. et al. Potent Human Telomerase Inhibitors: Molecular Dynamic Simulations, Multiple Pharmacophore-Based Virtual Screening, and Biochemical Assays. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 55, n. 12, p. 2596–2610, 28 dez. 2015.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. **Annual review of microbiology**, v. 41, n. 1, p. 363–82, out. 1987.

**SnapGene | Software for everyday molecular biology**. Disponível em:

<<http://www.snapgene.com/>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

- SOLLELIS, L. et al. First efficient CRISPR-Cas9-mediated genome editing in Leishmania parasites. **Cellular Microbiology**, v. 17, n. 10, p. 1405–1412, 2015.
- STEWART, J. A. et al. Maintaining the end: roles of telomere proteins in end-protection, telomere replication and length regulation. **Mutation research**, v. 730, n. 1–2, p. 12–9, 1 fev. 2012.
- STILES, J. K. et al. Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in Leishmania. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 93, n. 8, p. 781–807, dez. 1999.
- TAHTOUH, R. et al. Telomerase Inhibition Decreases Alpha-Fetoprotein Expression and Secretion by Hepatocellular Carcinoma Cell Lines: In Vitro and In Vivo Study. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119512, 30 mar. 2015.
- THOMAS, S. et al. Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in Leishmania major. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, p. 152, 8 abr. 2009.
- VASCONCELOS, E. J. R. et al. The putative Leishmania telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112061, 12 nov. 2014.
- VEGA, L. R.; MATEYAK, M. K.; ZAKIAN, V. A. Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 4, n. 12, p. 948–59, dez. 2003.
- WHO. WHO. **WHO**, 2017.
- WHO | Global Health Observatory | Map Gallery**. Disponível em: <<http://gamapserv.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>>. Acesso em: 13 jun. 2018.
- WINCKER, P. et al. The Leishmania genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. **Nucleic acids research**, v. 24, n. 9, p. 1688–94, 1 maio 1996.
- WYATT, H. D. M.; WEST, S. C.; BEATTIE, T. L. InTERTpreting telomerase structure and function. **Nucleic acids research**, v. 38, n. 17, p. 5609–22, 1 set. 2010.