



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”

Instituto de Biociências

Departamento de Ciências Químicas e Biológicas

**GERAÇÃO DE LINHAGENS de *Leishmania braziliensis* NOCAUTE (KO)
PARA IP6K, TERT E IP6K+TERT UTILIZANDO A ABORDAGEM
CRISPR/Cas9**

Vitor Luiz da Silva

Botucatu – SP

2022

Vitor Luiz da Silva

**GERAÇÃO DE LINHAGENS de *Leishmania braziliensis* NOCAUTE (KO)
PARA IP6K, TERT E IP6K+TERT UTILIZANDO A ABORDAGEM
CRISPR/Cas9**

Trabalho de conclusão de curso (TCC)
desenvolvido de 01/03/2021 a 28/02/2022
e apresentado ao Instituto de Biociências,
UNESP, câmpus de Botucatu, como pré-
requisito para obtenção do título de
bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Dr. Marcelo Santos da Silva

Botucatu – SP

Março de 2022

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Silva, Vitor Luiz da.

Geração de linhagens de *Leishmania braziliensis* nocaute (KO) para IP6K, TERT e IP6K+TERT utilizando a abordagem CRISPR/Cas9 / Vitor Luiz da Silva. - Botucatu, 2022

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas - Bacharelado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcelo Santos da Silva

Capes: 20202008

1. *Leishmania*. 2. Biologia celular. 3. Bactérias.
4. Difosfatos. 5. Genética.

Palavras-chave: CRISPR/Cas9; *Leishmania braziliensis*; Pirofosfatos de Inositol.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer e dedicar este trabalho de conclusão de curso às seguintes pessoas:

Minha família e, em especial minha mãe Glaucia David da Silva e minha vó Júlia Rodrigues da Silva as quais me criaram e me ensinaram valores que só se encontram no seio familiar e deram todo suporte emocional possível para que pudesse concluir esta graduação com êxito;

Aos meus colegas de curso e também da vida, em especial aos meus amigos(as) Flávia Carina Zanatta, Raissa dos Santos e Luis Felipe Giandoni que acompanharam de perto todos os prazeres e desprazeres da vida acadêmica e sempre (ou quase sempre) apoiaram as minhas decisões não só acadêmicas, mas também pessoais;

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcelo Santos da Silva que tomo como exemplo a ser seguido e a minha ex orientadora Prof. Dr. Maria Isabel Nogueira Cano, por todo ensinamento doado a mim desde minha iniciação na carreira científica até os dias atuais;

Aos meus colegas de laboratório Yete Gambarani Ferri, Arthur de Oliveira Passos e Bryan E. Abuchery por sempre compartilharem conhecimentos e boas risadas no ambiente de trabalho;

A todos os profissionais do departamento de Ciências Químicas e Biológicas (setor genética) do Instituto de Biociências, em especial à Juliana Ramos da diretoria técnica acadêmica pela sua competência exemplar no exercer de seu trabalho.

AGRADECIMENTO ÀS AGÊNCIAS DE FOMENTO

Agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo suporte financeiro. Este trabalho foi financiado a partir dos processos nº 2020/16481-1 e 2019/10753-2.

SUMÁRIO

Resumo	5
Abstract.....	6
1. Introdução e justificativa.....	7
2. Objetivos	9
3. Metodologia.....	10
3.1 – Somia dos cromossomos de <i>L. braziliensis</i> (M2903)	10
3.2 – Cultivo e manutenção de <i>L. braziliensis</i>	10
3.3 – <i>Toolkit</i> para edição gênica por CRISPR/Cas9.....	10
3.4 – PCR para gerar ‘sgRNA’ e DNA doador.....	11
3.5 – Transfecção e seleção dos clones	12
3.6 – Confirmação das linhagens nocautes de <i>L. braziliensis</i> (PCR e RT-PCR)	12
3.7 – Curva de crescimento.....	13
3.8 – Análise do conteúdo de DNA.....	13
4. Resultados e discussão.....	13
4.1 – Predição da somia dos cromossomos de <i>L. braziliensis</i>	13
4.2 – Geração dos ‘sgRNAs’ e DNAs doadores.....	14
4.3 – Transfecção e confirmação das linhagens KO (IP6K ^{-/+} e TERT ^{-/-}) por PCR.....	15
4.4 – Transfecção e confirmação da linhagem duplo KO (TERT ^{-/-} + IP6K ^{-/+}) por PCR.....	17
4.5 – Confirmação das linhagens geradas por RT-PCR.....	18
4.6 – Análise do perfil de proliferação das linhagens geradas.....	20
4.7 – Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo das linhagens geradas.....	20
5. Conclusões e perspectivas.....	21
6. Plano de gestão de dados.....	22
7. Agradecimentos às agências de fomento	22
8. Referências.....	22

Resumo

As leishmanioses referem-se a um grupo de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, a qual afeta principalmente pessoas em estado de vulnerabilidade social. Atualmente, os fármacos disponíveis para o tratamento das leishmanioses contribuem para o aparecimento de outras comorbidades clínicas devido aos seus efeitos colaterais, sendo assim, a busca por novos alvos terapêuticos é de extrema relevância. Em eucariotos modelo, os pirofosfatos de inositol (PP-IPs), principalmente IP₇ e IP₈, estão envolvidos em uma ampla gama de processos celulares, como regulação do comprimento dos telômeros e recombinação homóloga (HR). No entanto, as proteínas-alvo dos PP-IPs, assim como seu mecanismo de ação, ainda são questões abertas. IP₇ e IP₈ são sintetizados por vias envolvendo a participação das quinases IP6K e PP-IP5K, respectivamente. Parasitos tripanossomatídeos não possuem genes ortólogos para PP-IP5K, ou seja, provavelmente não sintetizam IP₈, o que os torna excelentes modelos para o estudo de IP₇. Assim, este projeto consiste em gerar linhagens de *Leishmania braziliensis* nocaute (KO) para IP6K (IP6K^{-/-}/IP6K^{-/+}), telomerase (TERT^{-/-}) e double-KO (IP6K^{-/-}/IP6K^{-/+} + TERT^{-/-}), o que facilitará a investigação subsequente do papel dos PP-IPs e sua possível correlação com os telômeros. Estas linhagens de *L. braziliensis* serão essenciais para responder futuras questões fundamentais, como por exemplo: *L. braziliensis* é capaz de sobreviver por quanto tempo na ausência de IP₇ e telomerase? Há algum *crosstalk* entre PP-IPs e telômeros em *Leishmania*? Deste modo, durante o desenvolvimento deste projeto, utilizamos ferramentas *in silico* para elaboração de RNA guias e DNA doadores específicos para aplicação da tecnologia CRISPR/Cas9 e consequente edição gênica de *L. braziliensis*. Após transfecção e seleção clonal dos transfectantes, realizamos as confirmações das linhagens geradas por PCR e RT-PCR. Além disso, caracterizamos as linhagens geradas utilizando curvas de crescimento e análises do conteúdo de DNA por citometria de fluxo. A obtenção destas linhagens abrirá caminho para o desenvolvimento de outros projetos visando compreender o papel dos PP-IPs no metabolismo de DNA (sobretudo na dinâmica telomérica), o que poderá contribuir para descobertas de novas abordagens terapêuticas visando a eliminação parasitária, uma vez que quinases são excelentes alvos para o desenvolvimento de fármacos e os telômeros são considerados o relógio molecular das células eucarióticas.

Abstract

Leishmaniasis refers to a group of diseases caused by parasites of the *Leishmania* genus, which mainly affects people in a social vulnerability state. Currently, the drugs available for the treatment of leishmaniasis contribute to the appearance of other clinical comorbidities due to their side effects. Therefore, the search for new therapeutic targets is extremely relevant. In model eukaryotes, inositol pyrophosphates (PP-IPs), mainly IP₇ and IP₈, are involved in a wide range of cellular processes, such as regulation of telomere length and homologous recombination (HR). However, the target proteins of PP-IPs, as well as their mechanism of action, are still open questions. IP₇ and IP₈ are synthesized by pathways involving the participation of kinases IP6K and PP-IP5K, respectively. Trypanosomatids do not have orthologous genes for PP-IP5K, i.e., they probably do not synthesize IP₈, which makes them excellent models for the study of IP₇. Thus, this project consists of generating lineages of *Leishmania braziliensis* knockout (KO) for IP6K (IP6K^{-/-}/IP6K^{-/+}), telomerase (TERT^{-/-}) and double-KO (IP6K^{-/-}/IP6K^{-/+} + TERT^{-/-}), which will facilitate further investigation of the role of PP-IPs and their possible correlation with telomeres. These *L. braziliensis* lineages will be essential to answer fundamental questions, such as: how long is *L. braziliensis* able to survive in the absence of IP₇ and telomerase? Is there any crosstalk between PP-IPs and telomeres in *Leishmania*? Thus, during the development of this project, we used *in silico* tools to elaborate small guide RNAs (sgRNAs) and specific DNA donors for the application of CRISPR/Cas9 system and consequent genome editing of *L. braziliensis*. After transfection and clonal selection of transfectants, we confirmed the lineages generated by PCR, and RT-PCR. Furthermore, we characterized the generated lineages through growth curves and DNA content analyzes by flow cytometry. Obtaining these lineages will pave the way for the development of other projects aimed at understanding the role of PP-IPs in DNA metabolism (especially in telomeric dynamics), which may contribute to the discovery of new therapeutic approaches aimed at parasitic elimination, since kinases are excellent targets for drug development and telomeres are considered the molecular clock of eukaryotic cells.

1. Introdução e justificativa

Os protozoários do gênero *Leishmania* (família *Trypanosomastidae*) são agentes etiológicos das leishmanioses, um conjunto de enfermidades que apresentam diferentes manifestações clínicas (Neves et al., 2000; WHO 2021). Segundo a Organização Mundial da Saúde, anualmente são registrados cerca de 2 milhões de novos casos de leishmanioses no mundo. No Brasil, segundo o ministério da saúde, cerca de 3 mil pessoas são contaminadas a cada ano, o que torna um país endêmico para leishmaniose (WHO 2021).

Na escala evolutiva, tripanossomatídeos (incluindo *Leishmania* spp.) divergiram de outros eucariotos por volta de 200 a 500 milhões de anos atrás (da Silva et al., 2017a), período entre o surgimento de artrópodes e mamíferos. Portanto, compreende-se que os tripanossomatídeos provavelmente divergiram concomitante ao aparecimento de novos nichos que emergiram com surgimento dos metazoários, o que levou a processos de co-evolução parasitárias e simbióticas (Simpson et al., 2004; Simpson et al., 2006; Flegontov et al., 2013; da Silva et al., 2017a). Estes organismos apresentam algumas características únicas entre os eucariotos (acerca de sua maquinaria molecular), como por exemplo a ausência de íntrons (da Silva and Cano, 2017), o uso quase universal da transcrição de longos clusters policistrônicos pela RNA polimerase II (Oppendoes et al., 2016; Clayton, 2019), a ausência da via clássica de reparo de DNA quebrado na forma de dupla fita chamada cNHEJ (classical non-homologous end joining) (Burton et al., 2007; Passos-Silva et al., 2010; Nenarokova et al., 2019) e relativa plasticidade genômica frente a agentes genotóxicos (Laffitte et al., 2016; Bussotti et al., 2018; da Silva 2021). Essas características peculiares podem ser justificadas pelo fato destes organismos pertencerem ao filo Euglenozoa, havendo a possibilidade de terem retido algumas características 'primitivas' desse grupo (da Silva et al., 2017a). Uma outra possibilidade é que talvez estes organismos tenham sofrido um processo chamado *genome streamlining* durante a transição de um estilo de vida livre para parasitário, o que pode ter ocasionado a perda de muitos genes codificadores de proteínas (Albalat and Cañestro, 2016; Oppendoes et al., 2016; da Silva et al., 2017a). Ainda não está claro, em termos moleculares, o que permitiu essa transição, mas provavelmente a ausência de genes essenciais para um estilo de vida livre direcionou este evento adaptativo. Um exemplo que suporta esta hipótese pode ser encontrado na via de síntese dos pirofosfatos de inositol (PP-IPs), onde homólogos para a quinase PP-IP5K aparentemente não estão presentes nos tripanossomatídeos, mas estão presentes em organismos kinetoplastídeos de vida livre (Mantilla et al., 2021).

Os pirofosfatos de inositol (PP-IPs) são moléculas solúveis, conjugadas com um ou mais grupos pirofosfatos ligado a um anel inositol (Saiardi et al., 2004; Jadav et al., 2013; Cordeiro et al., 2017). Em mamíferos, os PP-IPs (principalmente os chamados IP₇ e IP₈) estão envolvidos em uma ampla gama de processos celulares, como recombinação homóloga (HR) e controle do comprimento telomérico. Porém, os mecanismos de ação dos PP-IPs nestas vias ainda não estão bem estabelecidos. Em mamíferos, IP₇ (alvo de estudo deste projeto) e IP₈ são sintetizados a partir de vias complementares que envolvem a participação das quinases IP6K e PP-IP5K,

respectivamente (Figura 1). No entanto, como acima mencionado, parasitos tripanossomatídeos (e.g., *Leishmania braziliensis*) têm genes ortólogos para IP6K, mas não possuem ortólogos para PP-IP5K, o que teoricamente os impede de sintetizarem IP₈, tornando-os excelentes modelos para o estudo de IP₇ (Figura 1).

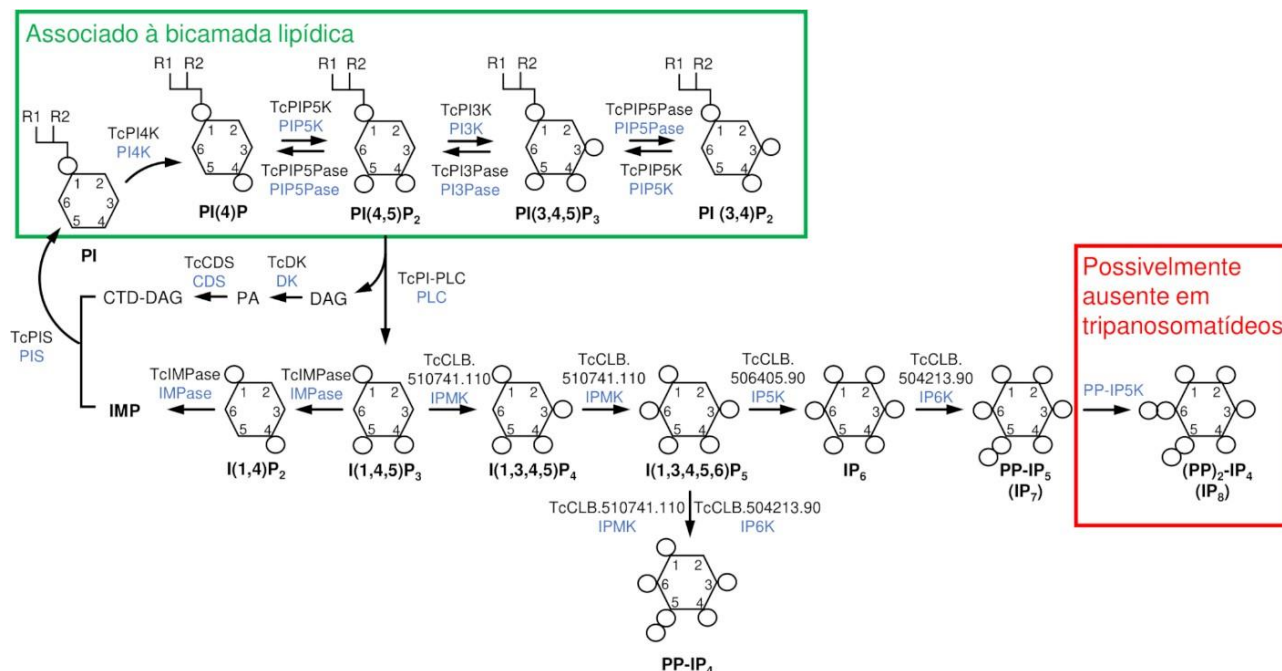


Figura 1. Possível via para a síntese de PP-IPs. Resumidamente, PLC (TcPI-PLC) hidrolisa PI(4,5)P₂ gerando I(1,4,5)P₃. O I(1,4,5)P₃ é fosforilado por IPMK (TcCLB.510741.110) para gerar I(3,4,5)P₄ e I(3,4,5,6)P₅. I(3,4,5,6)P₅ é fosforilado por IP5K (TcCLB.506405.90) para gerar IP₆. I(3,4,5,6)P₅ e IP₆ podem ser ainda fosforilados por IP6K (TcCLB.504213.90) para gerar PP-IP4 e PP-IP5 (IP₇), respectivamente. Os tripanossomatídeos (aparentemente) não possuem ortólogos para PP-IP5K. As enzimas de mamíferos estão escritas em azul, enquanto os IDs dos genes para ortólogos do tripanossomatídeo *T. cruzi* estão em preto. PI = Fosfatidilinositol, DAG = diacilglicerol, PA = ácido fosfático, CTD-DAG = domínio citoplasmático de DAG, IMP = inosina monofosfato, R1 = ácido palmico, R2 = ácido oleico.

Além da via de síntese dos PP-IPs, a maquinaria telomérica desses protozoários também apresenta características únicas e peculiares. Por exemplo, em *Leishmania*, a semelhança de outros eucariotos, os telômeros são compostos por repetições do tipo TTAGGG associadas a proteínas que formam um complexo *shelterin-like* divergente (Assis et al., 2021). Além disso, os telômeros (como em eucariotos modelo) são mantidos pela ação da holoenzima telomerase. O complexo ribonucleoproteico da telomerase destes parasitas é composto minimamente por um componente protéico chamado TERT (*Telomerase Reverse Transcriptase*) e uma molécula de RNA denominada TER (Telomerase RNA). O componente TERT compartilha domínios estruturais conservados com TERTs de outros eucariotos, embora a TERT de *Leishmania* spp. apresente resíduos de aminoácidos exclusivos (Giardini et al., 2006). Já o componente TER apresenta domínios estruturais compartilhados entre outros TER, como a região do molde utilizada pela TERT durante a elongação dos telômeros e o TBE (*Template Boundary Element*) responsável pela interação entre o TER e a TERT. Porém, sua estrutura secundária é completamente divergente (Vasconcelos et al., 2014).

Deste modo, torna-se extremamente importante a investigação acerca dos mecanismos de ação dos PP-IPs em vias de reparo de DNA e manutenção telomérica utilizando tripanossomatídeos como modelo, já que evidências sugerem um possível *crosstalk* entre PP-IPs e a dinâmica telomérica em modelos eucariotos, sem distinguir qual PP-IP seria responsável por pirofosforilar proteínas de atuação telomérica (Saiardi et al., 2004; York et al., 2005). Para isso, abordagens envolvendo perda de função gênica da quinase IP6K e telomerase são fundamentais para análises mais acuradas. Uma maneira eficiente para realização destas abordagens envolve a tecnologia CRISPR/Cas9.

CRISPR (*Clustured Regulary Interspaced Short Palindromic Repeats*) é um sistema de defesa contra vírus encontrado em bactérias e arqueas (Wiedenheft et al., 2012). Estas repetições palindrômicas curtas fazem parte do DNA bacteriano e estão organizadas em óperons, adjacentes a sequências correspondentes ao gene Cas, formando o complexo CRISPR/Cas. Por sua vez, a proteína Cas9 (presente em *Streptococcus pyogenes*), então codificada pelo gene Cas, possui atividade endonucleásica, i.e., é capaz de executar cortes na dupla fita do DNA em regiões específicas. Esse mecanismo é dependente de dois pequenos RNAs associados (crRNA e tracrRNA) que formam uma estrutura secundária que direciona a endonuclease Cas9 a região alvo a ser clivada (Jinek et al., 2012). A clivagem de DNA por intermédio da proteína Cas9 só é possível através da atividade do tracrRNA (RNA transativador) que, não apenas participa no processamento do pré crRNA (CRISPR RNA) através da enzima RNase III, como também ativa a clivagem de DNA por meio da Cas9 guiada pelo crRNA maduro (Jinek et al., 2012).

Em outras palavras, a clivagem do DNA exógeno só é possível pela presença de uma sequência complementar ao DNA alvo, fornecida pelo crRNA. A facilidade para realizar as edições genômicas utilizando o CRISPR/Cas9 bacteriano surgiu quando o grupo liderado por Jennifer Doudna e Elizabeth Charpentier (Jinek et al., 2012) fundiram o tracrRNA ao crRNA, criando enorme praticidade para utilização deste sistema em diferentes organismos, inclusive em tripanossomatídeos (Beneke et al., 2017).

Assim, a geração de linhagens nocautes para a quinase IP6K e telomerase (TERT), abrirá caminho para investigarmos se estas proteínas podem ser bons alvos para o desenvolvimento de fármacos contra as leishmanioses pois, além de apresentarem baixa identidade em relação aos seus homólogos em humanos, quinases são excelentes alvos para o desenvolvimento de fármacos e os telômeros são considerados o relógio molecular das células eucarióticas.

2. Objetivos

Objetivo geral

Gerar linhagens de *L. braziliensis* nocautes (KO) para o gene IP6K (IP6K^{-/-} ou IP6K^{-/-}) e para o gene TERT (TERT^{-/-} ou TERT^{-/-}), utilizando a tecnologia CRISPR/Cas9. Também pretendemos gerar uma linhagem *double-knockout* (DKO) para IP6K e TERT (linhagem IP6K^{-/-} ou IP6K^{-/-} e TERT^{-/-}) em *L. braziliensis*.

Objetivos específicos

Realizar análises *in silico* e elaborar primers específicos para o sistema CRISPR/Cas9; Amplificar os sgRNAs (*small guide RNAs*) e DNA doadores; Realizar 1º ciclo de transfecção; Selecionar e confirmar as linhagens geradas de *L. braziliensis*; Realizar 2º ciclo de transfecção para a geração da linhagem DKO; Selecionar, confirmar e caracterizar as linhagens.

3. Metodologia

3.1 Somia dos cromossomos de *L. braziliensis* (M2903)

Para o cálculo do número de cópias cromossômicas em *L. braziliensis* (M2903), seguimos a metodologia de Zhang et al (2014). Antes disso, usamos a ferramenta bamCoverage do pacote deepTools (<https://deeptools.readthedocs.io/en/develop/content/tools/bamCoverage.html>), para estimar a profundidade de sequenciamento de cada cromossomo e realizar normalização usando o método RPKM. A mediana da profundidade de cada cromossomo (dchr) foi então determinada seguida pelo cálculo total da profundidade mediana para todos os cromossomos (dT = mediana. [dchr1...dchr35]). Esses valores foram então divididos por dois para representar a profundidade mediana de um alelo haplóide de um cromossomo. O número de cópias do cromossomo foi dado por $Schr = dchr / (dT / 2)$. Essas etapas foram implementadas em um script R para realizar a análise automaticamente. Vale ressaltar que, para aplicação desta estratégia, assumimos inicialmente que todos os cromossomos eram diplóides.

Esta análise foi realizada em colaboração com o Dr. Antônio M. Rezende, FIOCRUZ, Instituto Aggeu Magalhães.

3.2 Cultivo e manutenção de *L. braziliensis*

Formas promastigotas procíclicas de *L. braziliensis* (M2903) foram cultivadas a 28 °C em meio 199 (Gibco), pH 7.3, suplementado com 20 mL de HEPES 1 M (GE Healthcare Life Sciences), 5 mL de adenina 0,1% (Sigma- Aldrich), 500 µL de 0,1% de Biotina (Sigma-Aldrich), 500 µL de 10 mg/mL de hemin (Sigma-Aldrich), 10% de soro fetal bovino inativado (Cultilab), 1% (v/v) de solução antibiótica (estreptomicina / penicilina) (Cultilab) e 500 µL de Biotina 10 mM (Sigma-Aldrich). A linhagem de *L. braziliensis* expressando T7/Cas9 e as linhagens geradas foram cultivadas no mesmo meio supracitado, adicionalmente suplementado com as respectivas drogas de seleção: 50 µg/mL hygromycin (Invivogen), ou 10 µg/mL blasticidin (Invivogen), ou 20 µg/mL de puomicina (Invivogen).

3.3 Toolkit para edição gênica por CRISPR/Cas9

O *toolkit* elaborado por Beneke (Beneke et al., 2017) e seus colaboradores permite realizar a edição gênica em organismos tripanosomatídeos de forma menos laboriosa quando comparado à outros organismos (e.g.: mamíferos). Este *toolkit* permite o nocaute de genes em diversas espécies de tripanosomatídeos sem a necessidade de utilizar lentivírus para transfecção e sem

realizar uma pré-clonagem de DNA. O sistema elaborado por Beneke permite realizar a síntese de uma pequena sequência de DNA dupla fita, a partir de dois iniciadores (*primers*), em uma reação de PCR específica (sem *template*) (Beneke et al., 2017). Esta sequência de DNA é composta pelo promotor da T7 RNA polimerase e pela sequência que originará o RNA guia (sgRNA) quando transcrita. Células previamente transfectadas com um plasmídeo contendo o gene da T7 RNA polimerase e o gene da endonuclease Cas9 serão utilizadas como receptáculo em uma nova transfecção contendo a pequena sequência de DNA dupla fita (promotor T7 + 'sgRNA') e uma sequência DNA doadora (contendo o gene de resistência que se integrará na região de clivagem).

Como quebras de DNA na forma de dupla fita tendem a ser reparadas por vias de recombinação homóloga (HR), especialmente nos tripanosomatídeos, a sequência DNA doadora tende a ser inserida na região de clivagem. Assim, Beneke desenvolveu um conjunto de plasmídeos com diferentes marcadores de drogas selecionáveis, onde cada plasmídeo serve como um molde para amplificação de uma sequência de DNA doador específica. Flanqueando cada gene de resistência, deve ser inserido (via PCR) as regiões 5' e 3' - UTR do gene de interesse, as quais serão recombinadas no local de clivagem.

O desenho dos primers para a amplificação da sequência de DNA dupla fita (promotor T7 + 'sgRNA') e para a síntese de cada sequência doadora pode ser feita utilizando a ferramenta LeishGEdit (<http://www.leishgedit.net>). Esta ferramenta *online* facilita o uso deste sistema versátil de plasmídeos, uma vez que as sequências de *primers* necessários para editar qualquer gene presente no genoma de várias espécies de tripanosomatídeos serão geradas automaticamente.

3.4 PCR para gerar 'sgRNA' e DNA doador

As reações de PCR para obtenção dos fragmentos utilizados na síntese do sgRNA e DNA doadores foram realizadas conforme descrito por Beneke et al, 2017. Para amplificação dos DNA doadores, foram utilizados plasmídeos específicos como molde juntamente com PCR mix contendo a *Phusion high-fidelity DNA polymerase* 4 U (New England BioLabs), dNTPs 0.2 mM, MgCl₂ 2 mM e oligos específicos a 2 µM em um volume final de 20 µL. As condições para amplificação consistiram em uma desnaturação inicial de 98 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de 95 °C/30 seg, 65 °C/30 seg e 72 °C/2 min e 15 seg, com extensão final à 72 °C por 7 min. Para amplificação dos sgRNAs, foi realizado um mix contendo *Phusion high-fidelity DNA polymerase* 1 U (New England BioLabs), dNTPs 0.2 mM, MgCl₂ 2 mM e oligos específicos a 2 µM em um volume final de 20 µL. As condições para amplificação consistiram em uma desnaturação inicial de 98 °C por 30 seg seguido por 35 ciclos de 95 °C/10 seg, 60 °C/30 seg e 72 °C/ 15 seg, com extensão final à 72 °C por 10 min. Os produtos amplificados dos fragmentos dos DNAs doadores e para síntese dos sgRNAs foram visualizados em gel de agarose 1%. Para estimar os tamanhos dos fragmentos, utilizou-se o marcador DNA Ladder 1 kb plus (Thermo Scientific). O termociclador utilizado foi o PTC-200 (MJ-Research) e as imagens foram obtidas utilizando o equipamento G-BOX.

3.5 Transfecção e seleção dos clones

Culturas promastigotas procíclicas de *L. braziliensis* expressando T7/Cas9 foram utilizadas nas transfecções dos produtos obtidos nos PCRs (sgRNA e DNA doador), esterilizados por 5 min a 94 °C. As células foram centrifugadas (1.10^7 por transfecção) à 1000 *g* 2 min, o sobrenadante foi descartado e o pellet foi ressuspenso em tampão de transfecção (66.7 mM Na₂HPO₄, 23.3 mM NaH₂PO₄, 5 mM KCl, 50 mM HEPES pH 7.3 suplementado com 150 µM CaCl₂). As células foram transferidas para uma cubeta de eletroporação de 0.2 mm e submetidas ao programa X-001 de transfecção do equipamento Amaxa Nucleofector™ IIb (Lonza). Como controle negativo da eletroporação e seleção, a cultura de *L. braziliensis* T7/Cas9 foi utilizada sem adição de produtos de PCR. Após a eletroporação, as células foram incubadas *overnight* em meio 199. Posteriormente, as células foram submetidas ao processo de seleção dos mutantes policlonais através da adição dos respectivos antibióticos de seleção e cultivados por 7 dias em meio M199. A seleção monoclonal foi obtida por diluição seriada em placas de 96 poços.

Estes ensaios foram realizados em parceria com o grupo do Dr. Nilmar S. Moretti, UNIFESP, Escola Paulista de Medicina.

3.6 Confirmação das linhagens nocautes de *L. braziliensis* (PCR e RT-PCR)

Após a seleção dos clones, linhagens em fase exponencial de crescimento ($\sim 2 \times 10^7$ células/mL) foram submetidas à extração de DNA e RNA para confirmar as edições genômicas realizadas. As extrações de DNA genômico foram realizadas utilizando PBS, TE high (20 mM de Tris e 10 mM EDTA), TE low (10 mM de Tris e 1 mM de EDTA), 1 mg/mL proteinase K, 10% de SDS, 1,5 M de acetato de sódio e lavagem com etanol 70%. Após a extração de DNA, as amostras foram quantificadas pelo equipamento Nanodrop (Epoch Biotek) e armazenados a 4 °C. Os DNAs genômicos extraídos serviram como molde em reações de PCR convencional (utilizando os primers específicos presentes na tabela 1) para confirmação da integração dos fragmentos de DNA doador e deleção dos genes de interesse.

Tabela 1. Oligonucleotídeos utilizados para confirmação das edições genômicas (PCR convencional)

Gene alvo	Nome do primer	Sequência nucleotídica (5' → 3')
IP6K (5'UTR)	F1	ACGTGTCGTTAGCCTACCG
IP6K	R1	TCTCCATCCGCTCAGCG
TERT (5'UTR)	F1'	CGTACACGTATAGAGTGCCTC
TERT	R1'	ACAGAGGAAGGGTTGGGTC
Blasticidina	R2 (p/ IP6K) ou R2' (p/ TERT)	CCACGAGTTCTGCACAAGG
Puromicina	R3 (p/ IP6K) ou R3' (p/ TERT)	GACTGACGCCAACTGTCTG

As extrações de RNA total foram realizadas utilizando-se protocolo padrão baseado em Trizol (Thermo-Fischer Scientific). As amostras extraídas foram quantificadas pelo equipamento Qubit 4 fluorometer (Thermo-Fischer Scientific) e armazenadas a -80 °C.

As amostras de RNA total extraídas foram previamente tratadas com DNase I (Thermo-

Fischer Scientific) para a realização da RT – PCR utilizando o kit *SuperScript IV One-Step RT – PCR System* que consiste na síntese de cDNA e, posterior amplificação do mesmo utilizando os iniciadores específicos dos genes alvos (F1 e R1 para IP6K e F1' e R1' para TERT, vide tabela 1).

3.7 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento dos promastigotas de *L. braziliensis* (linhagens WT, T7/Cas9 e TERT^{-/-} e IP6K^{-/+}) foram realizadas a 28 °C, partindo-se de uma concentração inicial 1.10⁶ células/mL em meio 199 suplementado conforme descrito no item 3.2. A contagem das células foi realizada manualmente e em triplicata por meio de câmara de Neubauer e utilizando microscópio óptico (Carl-Zeiss). A concentração final foi dada pela fórmula: $\bar{x} \text{ quadrants} \cdot \text{dilution}^{-1} \cdot 10^4$. Os números obtidos foram plotados através do software *Graphpad Prism 5*.

3.8 Análise do conteúdo de DNA

As análises de conteúdo de DNA foram realizadas por citometria de fluxo. Foram utilizadas as linhagens de *L. braziliensis* (T7/Cas9, TERT^{-/-} e IP6K^{-/+}) em fase exponencial (~1.10⁷ cells/mL). Cada amostra foi coletada por centrifugação (1600 g por 5 min), lavada duas vezes usando PBS e fixada/permeabilizada com etanol a 70% *overnight* a 4 °C. O pellet contendo as células foi lavado uma vez com PBS e ressuspenso em 500 µL de PBS contendo 10 µg/mL de iodeto de propídio (PI) e 100 µg/mL de RNase A. Após 45 min de incubação a 37 °C, as células foram analisadas usando BD Accur C6 Flow Cytometer (BD Biosciences). A proporção de células distribuídas entre as fases do ciclo celular (G1, S e G2/M) foi inferido através da quantificação dos histogramas dos conteúdos de DNA. Cerca de 50.000 parasitas foram contados em cada análise. Os histogramas foram gerados utilizando-se o software FlowJo, v10.

4. Resultados e discussão

4.1 Predição da somia dos cromossomos de *L. braziliensis*

O genoma da maioria das espécies de *Leishmania* possui grande variação em seu tamanho (apresenta cerca de 33 Mb) e está organizado entre 34-36 cromossomos. (El-Sayed et al., et al., 2005). Sabe-se que estes parasitas possuem alta plasticidade genômica, com grande capacidade para realização de rearranjos cromossômicos (Sterkers et al., 2011, Sterkers et al., 2014; da Silva et al., 2021). A análise da somia dos cromossomos das linhagens de *L. braziliensis* é fundamental para fins que levam a substituição completa de genes por recombinação homóloga, como a abordagem CRISPR/Cas9. Em organismos diplóides (com todos os cromossômicos dissômicos), a abordagem padrão para depleção gênica utilizando CRISPR/Cas9 não apresenta grandes empecilhos. Porém, para genes alojados em cromossomos com variação numérica de suas cópias, esta abordagem torna-se um tanto mais trabalhosa (Bryant et al., 2019). A fim de analisar a variação do número de cópias cromossômicas da linhagem M2903 de *L. braziliensis*, fizemos uma predição da somia cromossômica destes parasitas (em colaboração com o Dr. Antônio Rezende –

FIOCRUZ), como descrito no item 3.1 deste relatório. A Figura 2 indica que *L. braziliensis* (M2903) é um organismo diplóide, mas alguns cromossomos desta linhagem apresentam-se trissômicos. Como os genes IP6K e TERT estão localizados, respectivamente, nos cromossomos 14 e 35 e ambos são dissômicos, não haverá muitos problemas para realização das edições gênicas por CRISPR/Cas9.

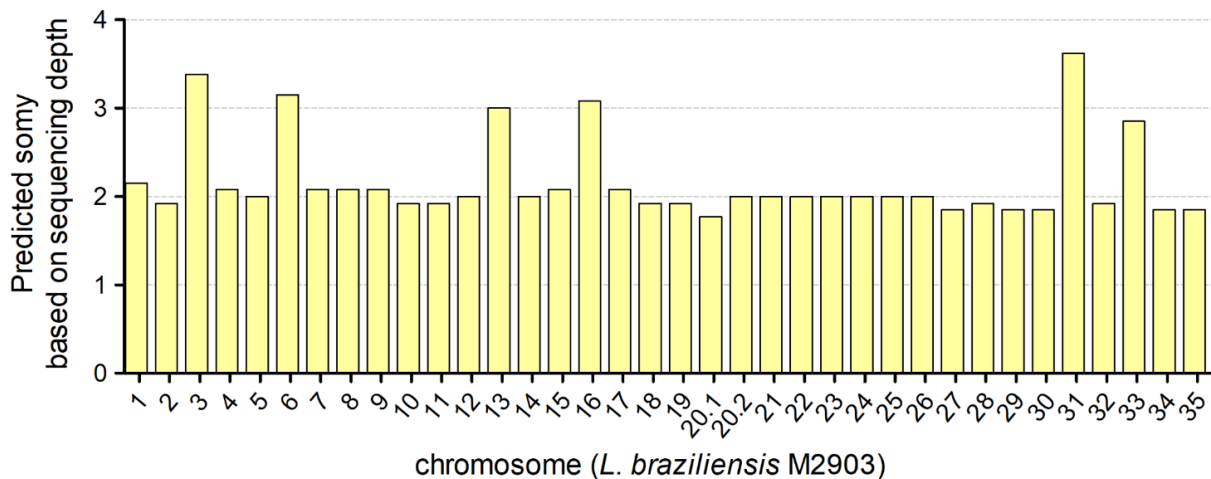


Figura 2. Predição da somia cromossômica para *L. braziliensis* (M2903). Os genes TERT e IP6K estão localizados nos cromossomos 35 e 14, respectivamente. Ambos os cromossomos são dissômicos.

4.2 Geração de 'sgRNAs' e DNAs doadores

Para depletar ambos os genes IP6K e TERT, os 'sgRNAs' e DNAs doadores foram sintetizados a partir de PCR convencional e, especificamente para a síntese dos DNAs doadores, foram utilizados os plasmídeos ptBLAST e ptPURO (Beneke et al., 2017). A obtenção do molde de DNA para futura síntese *in vivo* do sgRNA (Figura 3A) e a obtenção dos respectivos DNA doadores (Figura 3B) foi um sucesso, uma vez que os produtos gerados por PCR estavam dentro do tamanho esperado (Figure 3). Vale ressaltar que foram utilizados 3 tipos diferentes de sgRNAs para IP6K e mais 4 tipos diferentes de sgRNAs para TERT, afim de inserir quebras de DNA em diferentes partes do gene, otimizando assim o sucesso da depleção (nocaute).

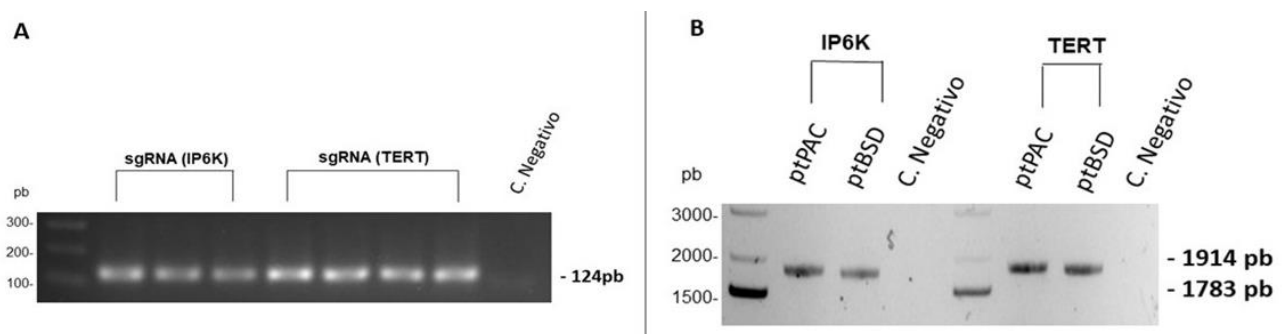


Figura 3. Síntese dos 'sgRNAs' e DNA doadores. A. Amplicons dos 'sgRNAs' para nocautes dos genes IP6K (à esquerda) e TERT (à direita) B. Amplicons dos DNA doadores para os genes IP6K (à esquerda) e TERT (à direita). Os doadores conferem resistência aos antibióticos: puromicina (PURO) e blasticidina (BSD). Gel de agarose 2% corado com SYBR safe.

4.3 Transfecção e confirmação das linhagens KO (IP6K^{-/-} e TERT^{-/-}) por PCR

A endonuclease Cas 9 e a RNA polimerase T7 são importantes para viabilizar a abordagem CRISPR/Cas9, uma vez que realizam, respectivamente, a clivagem de dupla fita de DNA e a síntese da transcrição *in vivo* dos sgRNAs. Assim, linhagens de *L. braziliensis* M2903, engenheiradas para expressar RNA polimerase T7 e endonuclease Cas 9 foram transfectadas com os moldes de DNA para síntese *in vivo* do sgRNA e DNAs doadores, como descrito no item 3.3 de metodologia e discutido acima nesta presente seção. Cerca de 7 dias após a transfecção e a seleção dos clones como descrito no item 3.4, amostras de DNA genômico foram submetidos aos ensaios de PCR convencional, como descrito no item 3.5 e foram utilizados os oligonucleotídeos mencionados na tabela 1. Para confirmação da depleção dos genes IP6K e TERT, *primers* foram desenhados para flanquear cada gene na região inicial (5'UTR) e interna. Para confirmação da correta inserção dos DNAs doadores, seguimos o mesmo princípio, utilizando primers que flanqueiam a região interna de cada gene que confere resistência para blastidina e/ou puomicina, provenientes respectivamente dos plasmídeos ptBlast e ptPuro (Beneke et al., 2017) (Figura 4 e 5).

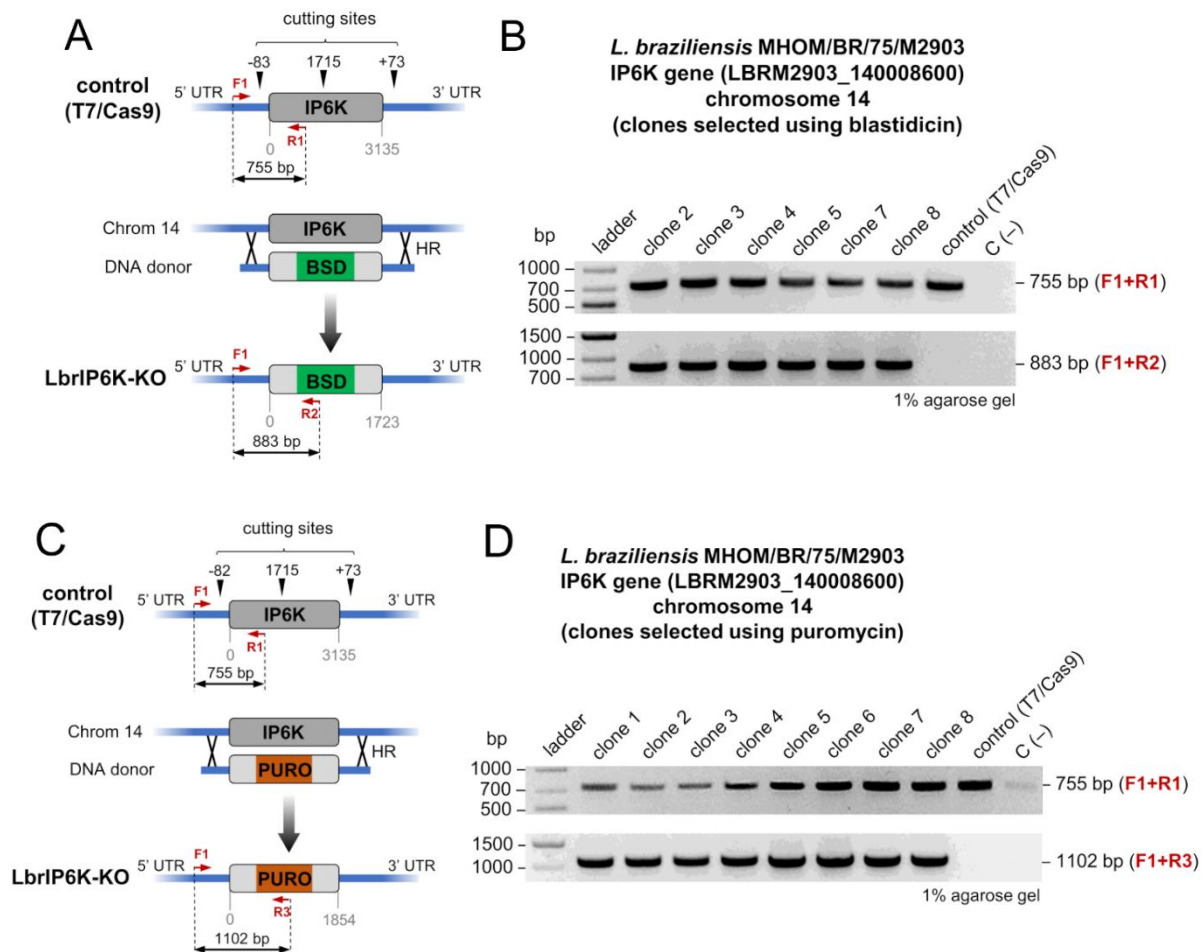


Figura 4. Geração de linhagens *L. braziliensis* single-null para IP6K (IP6K^{-/-}). A e C. Esquemas mostrando a abordagem usada para nocautear IP6K em *L. braziliensis* (M2903) usando puomicina (A) e blastidina (C). As setas vermelhas representam os primers projetados para confirmar os KO's. B. Após a primeira fase de transfecção, seleção usando blastidina, e diluição seriada para seleção dos clones, análises de PCR confirmaram que todos os seis clones selecionados eram *single null* para IP6K (IP6K^{-/-}). D. Após a seleção usando puomicina, também obtivemos apenas clones *single null* para (IP6K^{-/-}).

Como observado na Figura 4, após seleção clonal por diluição seriada, conseguimos obter apenas linhagens *single null* para IP6K (IP6K^{-/-}). Nestes parasitos, apenas um dos alelos do gene IP6K foi substituído pelo cassete doador que contém o gene que confere resistência ou à blasticidina (Figura 4A, B) ou à puromicina (Figura 4C, D). O amplicon de 755 pb refere-se ao gene IP6K, amplificado a partir dos iniciadores *F1*+*R1* (Figura 4B e D). O amplicon de 883 pb refere-se ao gene de resistência à blasticidina, amplificado a partir dos iniciadores *F1*+*R2* (Figura 4B). O amplicon de 1102 pb refere-se ao gene de resistência à puromicina, amplificado a partir dos iniciadores *F1*+*R3* (Figura 4D). A incapacidade em obtermos linhagens *double null* para IP6K (IP6K^{-/-}) sugere que talvez este gene seja essencial para *L. braziliensis*, como já sugerido para outros trypanosomatídeos (Mantilla et al., 2021).

Em relação à telomerase (TERT), como observado na figura 5, após seleção clonal por diluição seriada, conseguimos obter linhagens *single-* e *double-null* para TERT (TERT^{-/-} e TERT^{-/-}). Nas linhagens TERT^{-/-} apenas um dos alelos do gene TERT foi substituído pelo cassete doador que contém o gene que confere resistência à blasticidina (Figura 5A, B) e puromicina (Figura 5C, D). Nas linhagens TERT^{-/-} os dois alelos TERT foram substituídos pelos cassetes doadores contendo o gene que confere resistência à puromicina (Figura 5C, D). O amplicon de 778 pb refere-se ao gene TERT, amplificado a partir dos iniciadores *F1'*+*R1'* (Figura 5B e D). O amplicon de 876 pb refere-se ao gene de resistência à blasticidina, amplificado a partir dos iniciadores *F1'*+*R2'* (Figura 5B). O amplicon de 1095 pb refere-se ao gene de resistência à puromicina, amplificado a partir dos iniciadores *F1'*+*R3'* (Figura 5D).

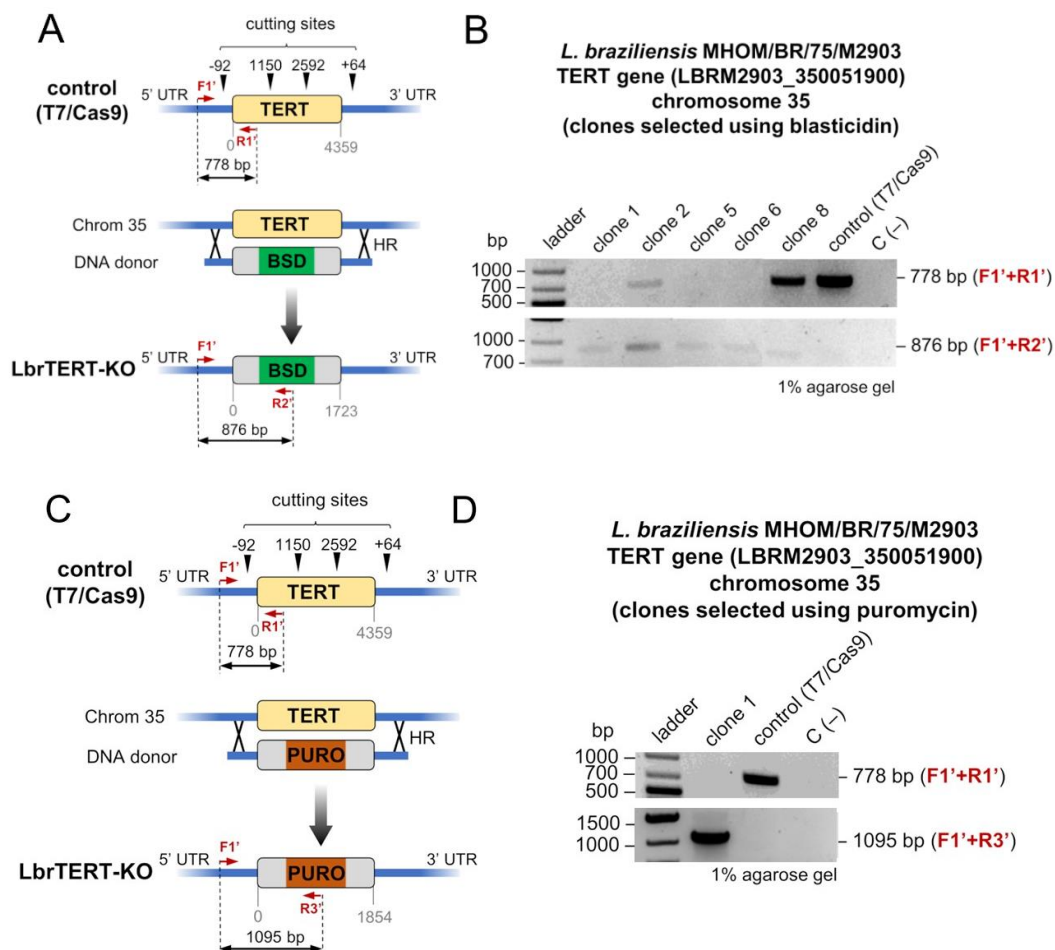


Figura 5. Geração de linhagens *L. braziliensis* single- e double-null para TERT (TERT^{-/-} e TERT^{-/-}). A e C. Esquemas mostrando a abordagem usada para depletar TERT em *L. braziliensis* (M2903) usando blasticidina (A) e puromicina (C). As setas vermelhas representam os *primers* projetados para confirmar os KO's. **B.** Após a primeira fase de transfecção e seleção usando blasticidina, as análises de PCR confirmaram que os clones 1, 5 e 6 são *double-null* para TERT e os clones 2 e 8 são *single-null*. **D.** Após transfecção, seleção usando puromicina, e diluição seriada para seleção dos clones, análises de PCR confirmaram que o clone 1 é um *double-null* para TERT (TERT^{-/-}).

Nossos resultados de edição do genoma corroboram outros estudos que afirmam que o sistema CRISPR/Cas9 funciona de forma muito eficiente para editar o genoma de *L. braziliensis* (Adaui et al., 2020; Espada et al., 2021; Sharma et al., 2022). Embora um estudo recente tenha gerado um plasmídeo específico para *L. braziliensis* (pTB007_Viannia), permitido a integração e expressão estável de ambos T7 RNA polimerase e Cas9 neste organismo (Espada et al., 2021), nossos resultados mostram que o plasmídeo original (gerado por Beneke et al., 2017 para *Leishmania* spp.), funciona de forma eficiente também em *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*.

4.4 Transfecção e confirmação da linhagem duplo KO (TERT^{-/-} + IP6K^{-/-}) por PCR

Perante estes resultados, decidimos realizar uma abordagem mais audaciosa e realizar mais uma tentativa de nocaute utilizando como *background* de transfecção uma linhagem de *L. braziliensis* *double-null* para TERT^{-/-} selecionada com puromicina [depois de verificar que essa linhagem continuou a expressar T7/Cas9 (dados não mostrados)], a fim de nocautear o gene IP6K desta mesma linhagem, tendo como produto final uma linhagem duplo-KO (DKO) para IP6K^{-/-} e TERT^{-/-} (Figura 6).

Após esta nova rodada de transfecção, não fomos capazes de obter um double-null para IP6K (como esperado), mas obtivemos uma linhagem DKO: double-null para TERT (TERT^{-/-}) + single-null para IP6K (IP6K^{-/-}) (Figura 6). Os PCRs confirmaram a substituição dos dois alelos TERT pelo gene de resistência à puromicina (Figura 6 - primers F1'+R1' e F1'+ R3'), e a substituição de um alelo IP6K por um gene de resistência à blasticidina (Figura 6 - primers F1+R1 e F1+R2).

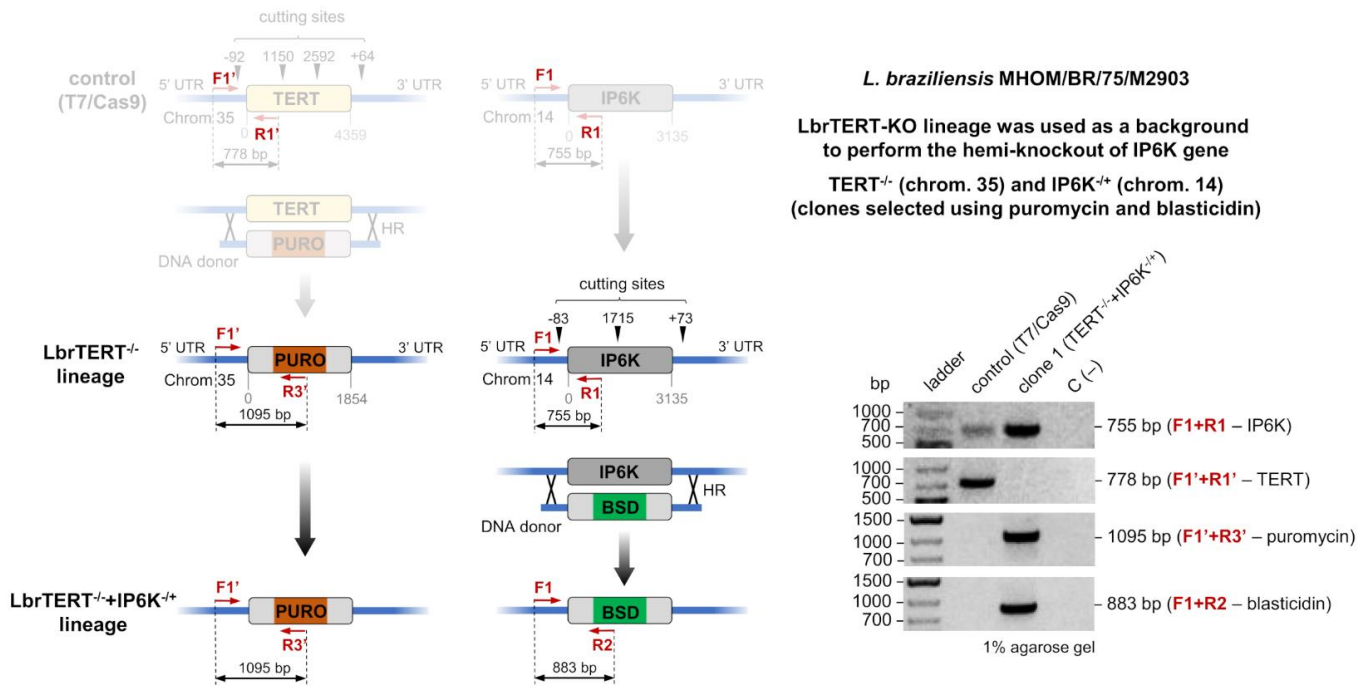


Figura 6. Geração de linhagens *L. braziliensis* DKO (com *single-* e *double-null* para IP6K e TERT). **Esquerda:** esquema mostrando a estratégia DKO usada para primeiro depletar TERT (obtendo uma linhagem TERT^{-/-}), a qual serviu como *background* para a 2^o rodada de transfecção, obtendo uma linhagem *double-null* para TERT (TERT^{-/-}) + *single-null* para IP6K (IP6K^{-/-}). **Direita:** Resultados da PCR confirmam a geração da linhagem DKO, evidenciando a presença de ambos os DNAs doadores nos loci corretos nos clones selecionados (o gene de resistência à puromicina substituiu os dois alelos TERT e o gene de resistência à blasticidina substituiu apenas um alelo IP6K).

Após realizarmos uma revisão bibliográfica sobre a geração de linhagens DKO em *L. braziliensis*, não identificamos nenhum estudo que tenha obtido êxito nesta abordagem (Espada et al, 2021; Adaui et al., 2020, Sharma et al., 2022). Acreditamos que esta estratégia possa ser útil para a geração de linhagens DKO para outros genes, contribuindo significativamente para o sucesso de edições genômicas múltipla neste organismo.

4.5 Confirmação das linhagens geradas por RT-PCR

Os ensaios de RT-PCR foram realizados para confirmar (de forma qualitativa) a ausência ou a presença da expressão (mRNA) dos genes TERT e IP6K nos clones nocaute selecionados. Para isso, foi utilizado RNA total extraído da linhagem controle (T7/Cas9) e das linhagens nocaute (IP6K^{-/-}, TERT^{-/-} e TERT^{-/-} + IP6K^{-/-}), além dos iniciadores específicos para os genes alvo, como descrito no item 3.6 (vide tabela 1).

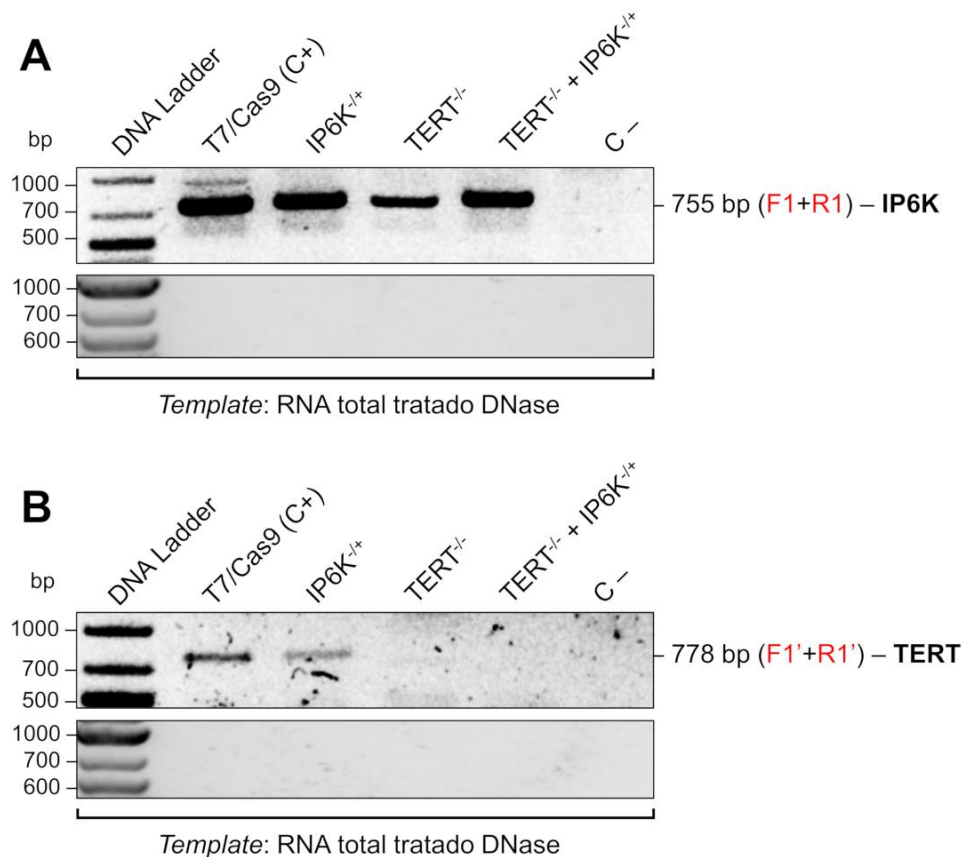


Figura 7. Confirmação da presença dos genes IP6K e TERT nas amostras de cDNA por RT-PCR. A. Amplificação das amostras T7/Cas9, IP6K^{-/-}, TERT^{-/-}, TERT^{-/-} + IP6K^{-/-} e RNA tratado com DNase utilizando os iniciadores R1 e F1 (IP6K) – tabela 1. **B.** Amplificação das amostras T7/Cas9, IP6K^{-/-}, TERT^{-/-}, TERT^{-/-} + IP6K^{-/-} e RNA tratado com DNase utilizando os iniciadores R1' e F1' (TERT) – tabela 1. Géis de agarose 1% corado com SYBR safe.

Quando utilizamos os iniciadores F1 e R1 (IP6K), observamos um fragmento no tamanho de 755 pb correspondente a amplificação de parte do cDNA do gene IP6K (Figura 7A) em todas as amostras de RNA total extraídas. Este resultado corrobora os ensaios anteriores, indicando que as linhagens de *L. braziliensis* nocautes possuem apenas um dos alelos do gene IP6K substituído pelo cassette doador de expressão que contém o gene de resistência à blasticidina.

Contudo, quando utilizamos os iniciadores F1' e R1' (TERT), não observamos amplificação de cDNA nas amostras TERT^{-/-} e TERT^{-/-} + IP6K^{-/-}, implicando na ausência total deste gene para estas linhagens nocauteadas, enquanto nas amostras T7/Cas9 e IP6K^{-/-}, ocorreu a amplificação de um fragmento no tamanho de 778 pb (Figura 7B), indicando a expressão de TERT (como esperado). Este resultado confirma que os clones de *L. braziliensis* nocautes para TERT são, de fato, nocaute para ambos alelos.

Nota-se também que, em ambas reações (IP6K e TERT) não houve amplificação nas amostras onde o *template* utilizado foi o RNA total tratado com DNase, evidenciando que as amostras de RNA utilizadas para a síntese do cDNA estavam livres de possíveis DNAs contaminantes (Figura 7A e B).

4.6 Análise do perfil de proliferação das linhagens geradas

Após a confirmação dos nocautes, realizamos curvas de crescimento para verificarmos o perfil de proliferação celular. Escolhemos um clone IP6K^{-/+} e TERT^{-/-} previamente selecionados e realizamos curvas de crescimento junto com as linhagens WT e T7/Cas9 (Figura 8). O resultado obtido pela curva de crescimento sugere que as linhagens geradas, quando comparados às linhagens controle, não sofreram mudanças significativas relacionada à proliferação. No entanto, podemos observar que a linhagem TERT^{-/-} aparenta se estabilizar por mais tempo em sua fase estacionária enquanto a linhagem IP6K^{-/+} apresenta um ligeiro declínio expressivo após a fase estacionária, em relação aos demais (Figura 8). Vale destacar que linhagens nocautes para telomerase tendem a apresentar alterações de fenótipo após algumas passagens, como é o caso de alguns tipos de células humanas (Agarwal et al., 2011) e leveduras (Jay et al., 2016). Estamos mensurando as passagens e coletando amostras periodicamente para averiguar alterações fenotípicas, como déficit de crescimento ou presença de dano no DNA.

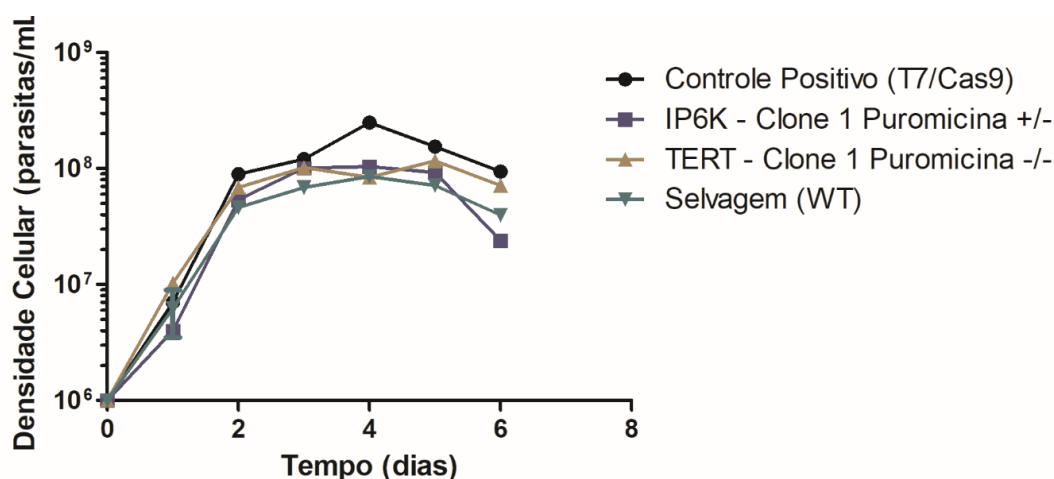


Figura 8. Curva de crescimento. Curvas de crescimento de formas promastigotas de *L. braziliensis* (M2903) (linhagens WT, T7/Cas9, TERT^{-/-} e IP6K^{-/+}). Essas linhagens apresentaram perfis de proliferação semelhantes. Todas as curvas de crescimento partiram de 1.10⁶ parasitas/mL. As barras de erros indicam SD de três experimentos independentes.

4.7 Análise do conteúdo de DNA por citometria de fluxo das linhagens geradas

Embora alterações fenotípicas significativas em relação à proliferação das linhagens geradas não tenham sido observadas, decidimos investigar uma possível presença de parada no ciclo celular. Para isso, realizamos análises do conteúdo de DNA utilizando citometria de fluxo. Os resultados sugerem que as linhagens analisadas não apresentaram diferenças em relação ao seu conteúdo de DNA (Figure 9). Em outras palavras, não há presença de parada de ciclo celular.

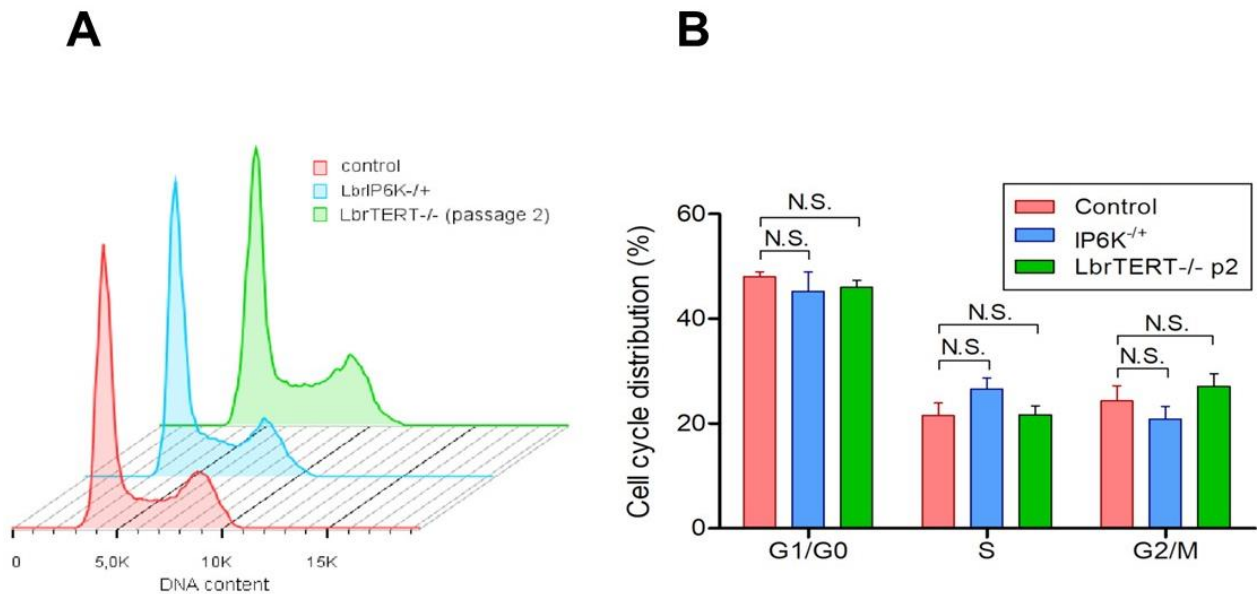


Figura 9. As linhagens TERT^{-/-} e IP6K^{-/+} de *L. braziliensis* aparentemente não apresentam prejuízos no ciclo celular. A. Histogramas comparando linhagens de controle, TERT^{-/-} e IP6K^{-/+}. Não há evidência de comprometimento do ciclo celular. **B.** Esses ensaios foram realizados em triplicata biológica, e 50.000 parasitas (n = 50.000) foram contados em cada análise. Barras de erros indicam SD. A diferença observada não foi estatisticamente significativa usando o teste t de Student.

Porém, cabe destacar que diferenças relacionadas ao ciclo celular talvez sejam observadas após sucessivas passagens, especialmente no caso da linhagem TERT^{-/-}, pois na ausência da telomerase, os telômeros tendem a encurtar a cada ciclo.

5. Conclusão e perspectivas

A tecnologia CRISPR/Cas9 se mostrou uma ferramenta eficiente na edição gênica de *L. braziliensis*. Revisando os dados presentes na literatura, chegamos a conclusão que esta é a primeira vez que foi realizada a depleção total do gene TERT e depleção parcial do gene IP6K em uma única célula de *L. braziliensis* (Adaui et al., 2020; Espada et al., 2021; Sharma et al., 2022). Realizamos as confirmações da depleção através de ensaios de PCR e RT-PCRs. Porém, não houve tempo hábil para as análises de quantificação da expressão gênica das linhagens geradas por qPCR. De qualquer modo, a obtenção destas linhagens evidencia que estes parasitas são capazes de sobreviver (ao menos pelo período avaliado) na ausência de telomerase (talvez devido a presença do mecanismo chamado ALT – *alternative lengthening of telomeres*) (Zhang and Zou, 2020). Porém, ainda não sabemos se *L. braziliensis* consegue sobreviver na ausência de IP6K (e possivelmente IP₇) (Mantilla et al., 2021). Pretendemos manter estas linhagens em cultura para avaliar por quanto tempo elas conseguem se manter íntegras na ausência de telomerase (i.e.: sem apresentar fenótipos que evidenciem senescência replicativa), o que nos daria indícios sobre o limite de Hayflick (Hayflick, 1965) nestes organismos.

Em um novo projeto derivado, pretendemos utilizar estas linhagens para investigar mais a fundo a possível correlação entre PP-IPs e telômeros, sobretudo em processos envolvendo

recombinação homóloga (por exemplo, desafiando as linhagens geradas com agentes genotóxicos e avaliando sua capacidade de reparo). Isso poderá contribuir para descobertas de novas abordagens terapêuticas visando a eliminação parasitária, uma vez que quinases (e.g.: IP6K) são excelentes alvos para o desenvolvimento de fármacos e os telômeros são o relógio molecular das células. Alternativamente, pretendemos também investigar a capacidade infectiva (patogenicidade e virulência) destas linhagens em comparação com a linhagem controle. Caso elas se mostrem menos infectivas (atenuadas), pretendemos utilizá-las como agente imunizante (em ensaios *in vivo*) com o objetivo de estimular o sistema imune do hospedeiro mamífero contra infecções subsequentes, o que seria uma grande etapa na geração de uma vacina contra leishmaniose.

6. Plano de gestão de dados

Até a divulgação/publicação dos resultados, todos os dados obtidos durante o desenvolvimento do projeto estão sendo armazenados em notebooks de laboratório e também no servidor do instituto (<https://ncc.unesp.br/gridunesp/docs/>), o qual requer acesso pessoal. Posteriormente, pretendemos disponibilizar nossos dados brutos em repositórios públicos de livre acesso, como por exemplo GitHub (<https://github.com/>).

7. Agradecimento às agências de fomento

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processos nº 2020/16481-1 e 2019/10753-2.

8. Referências

- . Aداui, V., Kröber-Boncardo, C., Brinker, C., Zirpel, H., Sellau, J., et al., (2020). Application of crispr/cas9-based reverse genetics in *Leishmania braziliensis*: Conserved roles for hsp100 and hsp23. *Genes*, 11(10), 1159.
- . Agarwal, S., & Daley, G. Q. (2011). Telomere dynamics in dyskeratosis congenita: the long and the short of iPS. *Cell research*, 21(8), 1157-1160.
- . Albalat, R., and Cañestro, C. (2016). Evolution by gene loss. *Nat. Rev. Genet.* 17, 379–391. doi:10.1038/nrg.2016.39
- . Assis, L.H., Andrade-Silva, D., Shiburah, M.E., de Oliveira, B.C., Paiva, S.C., Abuchery, B.E., Ferri, Y.G., et al., (2021). Cell Cycle, Telomeres, and Telomerase in *Leishmania* spp.: What Do We Know So Far?. *Cells*, 10(11), 3195. doi:10.3390/cells10113195.
- . Beneke, T., Madden, R., Makin, L., Valli, J., Sunter, J., and Gluenz, E. (2017). A CRISPR Cas9 high-throughput genome editing toolkit for kinetoplastids. *R. Soc. Open Sci.* 4, 170095. doi:10.1098/rsos.170095.
- 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, 2017a. re 482, 331 (2012)
- . Burton, P., McBride, D. J., Wilkes, J. M., Barry, J. D., and McCulloch, R. (2007). Ku heterodimer-independent end joining in *Trypanosoma brucei* cell extracts relies upon sequence microhomology. *Eukaryot. Cell* 6, 1773–81. doi:10.1128/EC.00212-07.
- . Bussotti, G., Gouzelou, E., Boité, M. C., Kherachi, I., Harrat, Z., Eddaikra, N., et al. (2018). *Leishmania* genome dynamics during environmental adaptation reveal strain-specific differences in

gene copy number variation, karyotype instability, and telomeric amplification. *MBio*. doi:10.1128/mBio.01399-18.

. Bryant, J. M., Baumgarten, S., Glover, L., Hutchinson, S., and Rachidi, N. (2019). CRISPR in Parasitology: Not Exactly Cut and Dried! *Trends Parasitol.* 35 (6), 409–422. doi: 10.1016/j.pt.2019.03.004

. Clayton, C. (2019). Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open biology*, 9(6), 190072.

. Cordeiro, C. D., Saiardi, A., and Docampo, R. (2017). The inositol pyrophosphate synthesis pathway in *Trypanosoma brucei* is linked to polyphosphate synthesis in acidocalcisomes. *Mol. Microbiol.* 106, 319–333. doi:10.1111/mmi.13766.

. da Silva, M. S. (2021). DNA Double-Strand Breaks: A Double-Edged Sword for Trypanosomatids. *Front. Cell Dev. Biol.* doi:10.3389/fcell.2021.669041.

. da Silva, M. S., Pavani, R. S., Damasceno, J. D., Marques, C. A., McCulloch, R., Tosi, L. R. O., et al. (2017a). Nuclear DNA Replication in Trypanosomatids: There Are No Easy Methods for Solving Difficult Problems. *Trends Parasitol.* 33, 858–874. doi:10.1016/j.pt.2017.08.002.

. da Silva, M. S., and Cano, M. I. N. (2017). *Frontiers in Parasitology*, eds. M. Santos da Silva and M. Isabel N. Cano BENTHAM SCIENCE PUBLISHERS doi:10.2174/97816810840531170101.

. El-Sayed, N. M., Myler, P. J., Blandin, G., Berriman, M., Crabtree, J., Aggarwal, G., et al., (2005). Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science*, 309(5733), 404-409.

. Espada, R. C., Quilles Júnior, J. C., Albuquerque-Wendt, A., Cruz, M. C., Beneke, T., Lorenzon, L. B., et al., (2021). Effective genome editing in *Leishmania (Viannia) braziliensis* stably expressing Cas9 and T7 RNA polymerase. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1097.

. Flegontov, P., Votýpka, J., Skalický, T., Logacheva, M. D., Penin, A. A., Tanifuji, G., et al. (2013). *Paratrypanosoma* Is a Novel Early-Branching Trypanosomatid. doi:10.1016/j.cub.2013.07.045.

. Giardini, M. A., C. B. Lira, Conte FF, Camillo LR, de Siqueira Neto JL, Ramos CH, Cano MI. (2006) The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol Res*, 98 (5): 447-54.

Hayflick, L. The Limited In Vitro Lifetime of Human Diploid Cell Strains. *Exp. Cell Res.* 1965, 37, 614–636.

. Jadav, R. S., Chanduri, M. V. L., Sengupta, S., and Bhandari, R. (2013). Inositol pyrophosphate synthesis by inositol hexakisphosphate kinase 1 is required for homologous recombination repair. *J. Biol. Chem.* 288, 3312–3321. doi:10.1074/jbc.M112.396556.

. Jay, K. A., Smith, D. L., & Blackburn, E. H. (2016). Early loss of telomerase action in yeast creates a dependence on the DNA damage response adaptor proteins. *Molecular and cellular biology*, 36(14), 1908-1919.

. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. 2012. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337:816–821 DOI 10.1126/science.1225829.

. Laffitte, M.-C. N., Leprohon, P., Papadopoulou, B., and Ouellette, M. (2016). Plasticity of the *Leishmania* genome leading to gene copy number variations and drug resistance. *F1000Research* 5, 2350. doi:10.12688/f1000research.9218.1.

. Mantilla, B. S., Amaral, L. D. Do, Jessen, H. J., and Docampo, R. (2021). The Inositol Pyrophosphate Biosynthetic Pathway of *Trypanosoma cruzi*. *ACS Chem. Biol.* doi:10.1021/acschembio.0c00759.

. Nenarokova, A., Záhonová, K., Krasilnikova, M., Gahura, O., McCulloch, R., Zíková, A., et al. (2019). Causes and Effects of Loss of Classical Nonhomologous End Joining Pathway in Parasitic Eukaryotes. *MBio* 10. doi:10.1128/mbio.01541-19.

- . Neves, D.P., Melo, A.L., Genaro, O., Linardi, P.M. (2000). *Parasitologia Humana* 10, 31-72. Ed. São Paulo: Editora Atheneu.
- . Oppendoes, F. R., Butenko, A., Flegontov, P., Yurchenko, V., and Lukeš, J. (2016). Comparative Metabolism of Free-living Bodo saltans and Parasitic Trypanosomatids. *J. Eukaryot. Microbiol.* 63, 657–678. doi:10.1111/jeu.12315.
- . Passos-Silva, D. G., Rajão, M. A., Nascimento de Aguiar, P. H., Vieira-da-Rocha, J. P., Machado, C. R., and Furtado, C. (2010). Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J. Nucleic Acids* 2010, 840768. doi:10.4061/2010/840768.
- . Saiardi, A., Bhandari, R., Resnick, A. C., Snowman, A. M., and Snyder, S. H. (2004). Phosphorylation of proteins by inositol pyrophosphates. *Science* 80. 306, 2101–2105. doi:10.1126/science.1103344.
- . Sharma, R., Avendaño Rangel, F., Reis-Cunha, J. L., Marques, L. P., Figueira, C. P., Borba, P. B., et al., (2022). Targeted Deletion of Centrin in *Leishmania braziliensis* Using CRISPR-Cas9-Based Editing. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 1431.
- . Simpson, A., Gill, E. E., Callahan, H. A., Litaker, R. W., and Roger, A. J. (2004). Early Evolution within Kinetoplastids (Euglenozoa), and the Late Emergence of Trypanosomatids. *Protist* 155, 407–422. doi:10.1078/1434461042650389.
- . Simpson, A. G. B., Stevens, J. R., and Lukeš, J. (2006). The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends Parasitol.* 22, 168–174. doi:10.1016/j.pt.2006.02.006.
- . Sterkers, Y., Lachaud, L., Crobu, L., Bastien, P., & Pagès, M. (2011). FISH analysis reveals aneuploidy and continual generation of chromosomal mosaicism in *Leishmania major*. *Cellular microbiology*, 13(2), 274-283.
- . Sterkers, Y., Crobu, L., Lachaud, L., Pagès, M., & Bastien, P. (2014). Parasexuality and mosaic aneuploidy in *Leishmania*: alternative genetics. *Trends in parasitology*, 30(9), 429-435.
- . Vasconcelos, E. J., Nunes, V. S., da Silva, M. S., Segatto, M., Myler, P. J., & Cano, M. I. N. (2014). The putative *Leishmania* telomerase RNA (Leish TER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence. *PloS one*, 9(11), e112061.
- . WHO, 2021. <https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis> (Acesso em 16/12/2021) às 8 h.
- . York, S. J., Armbruster, B. N., Greenwell, P., Petes, T. D., & York, J. D. (2005). Inositol diphosphate signaling regulates telomere length. *Journal of Biological Chemistry*, 280(6), 4264-4269.
- . Zhang W. W., Ramasamy G., McCall L. I., Haydock A., Ranasinghe S., Abeygunasekara, et al. (2014). Genetic analysis of *Leishmania donovani* tropism using a naturally attenuated cutaneous strain. *PLoS Pathogens*, 10(7), e1004244. doi: 10.1371/journal.ppat.1004244.
- . Zhang, J. M., & Zou, L. (2020). Alternative lengthening of telomeres: from molecular mechanisms to therapeutic outlooks. *Cell & Bioscience*, 10(1), 1-9.
- . Wiedenheft, B., Sternberg, S. & Doudna, J. RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482, 331–338 (2012). <https://doi.org/10.1038/nature10886>.