

**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.

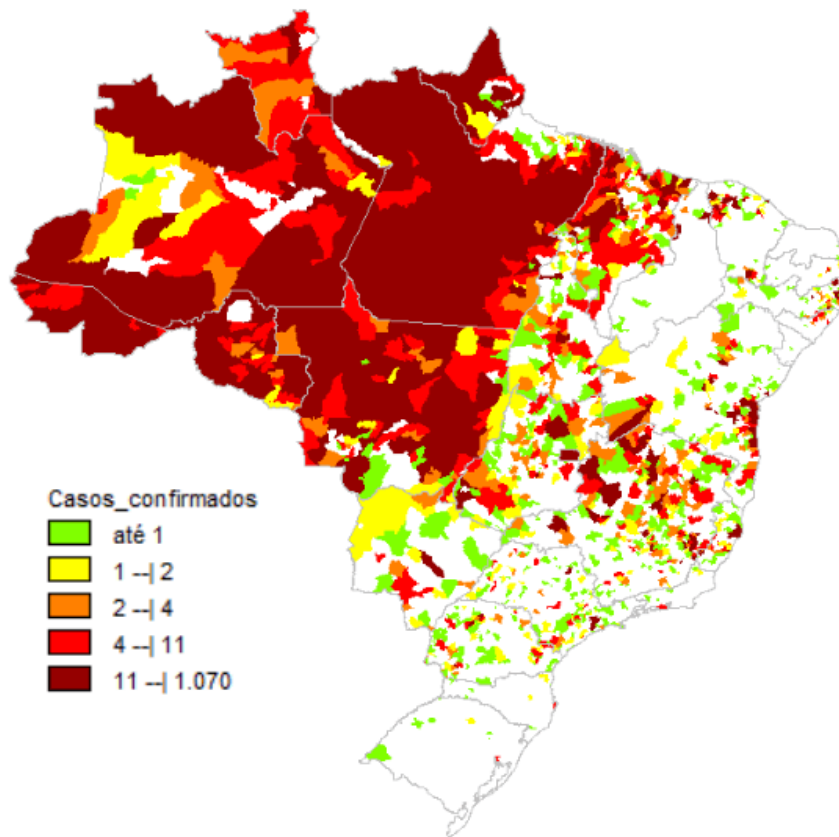
**Key Words:** *Leishmania*; Telomerase; BIBR1532; CRISPR-Cas.

## **1. Introdução**

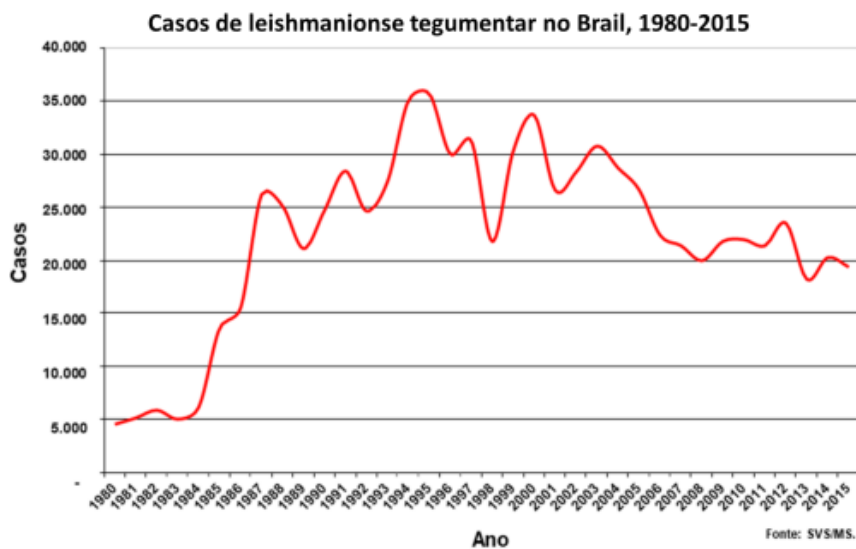
### **1.1. As leishmanioses e seu agente etiológico**

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).

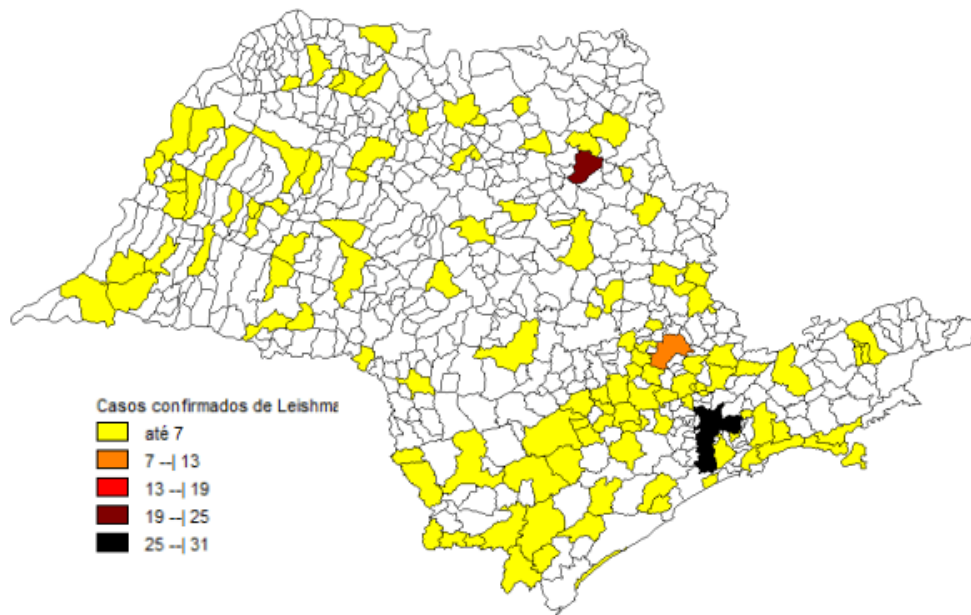
No Brasil, a doença apresenta ampla distribuição geográfica uma vez que se tem registro de casos em todas as regiões brasileiras (Figura 1), com uma média anual de 25.763 novos casos registrados e um coeficiente de detecção médio de 14,7 casos/100 mil habitantes, durante os anos de 1980 e 2015 (Figura 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).



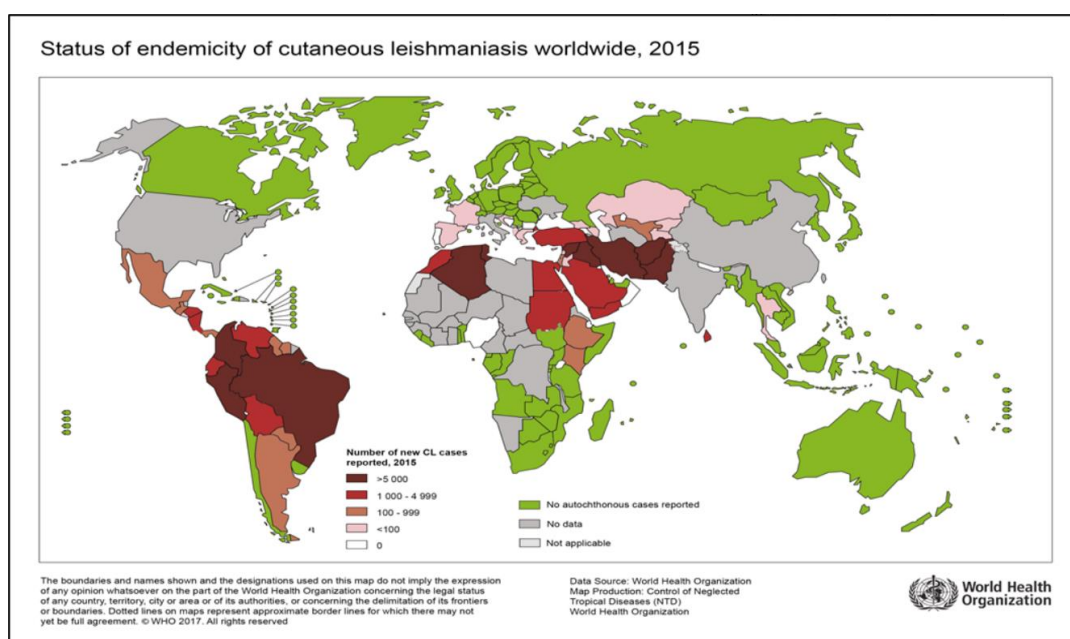
**Figura 3.** Mapa dos casos de leishmaniose tegumentar no estado de São Paulo no ano de 2017 de acordo com o município de origem do paciente. Dados coletados pelo SUS e obtidos na página oficial do DATASUS (DATASUS, 2017).

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



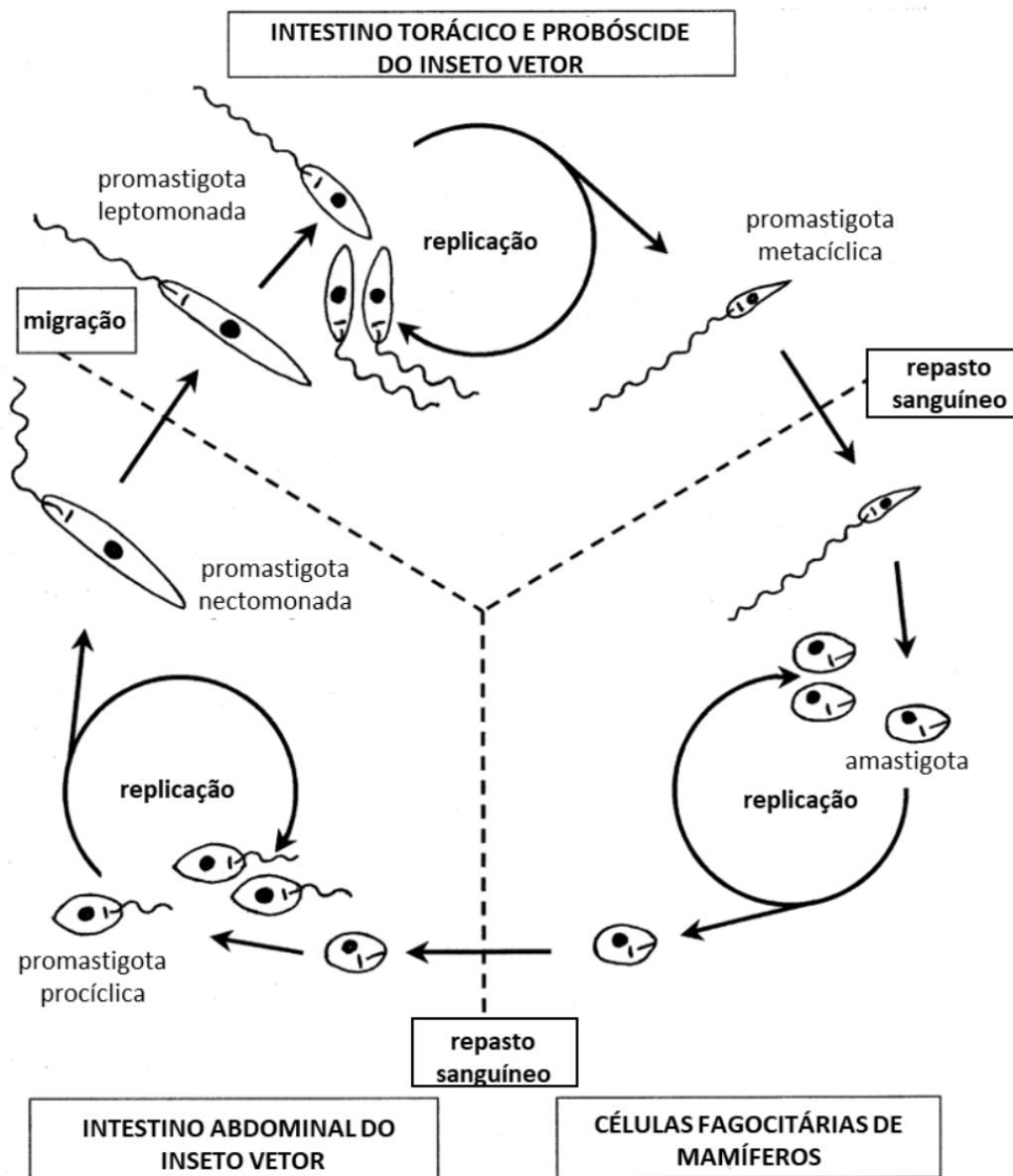
**Figura 4.** Distribuição de indivíduos infectados por leishmaniose cutânea no mundo. Figura retirada do site do WHO (“WHO | Global Health Observatory | Map Gallery”, [s.d.]

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).

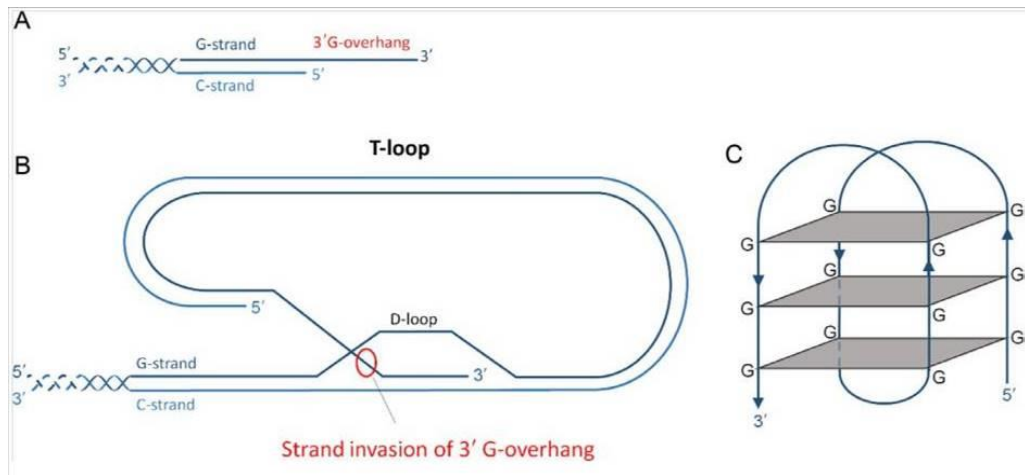
#### **1.4. Telômeros: estrutura e manutenção**

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).

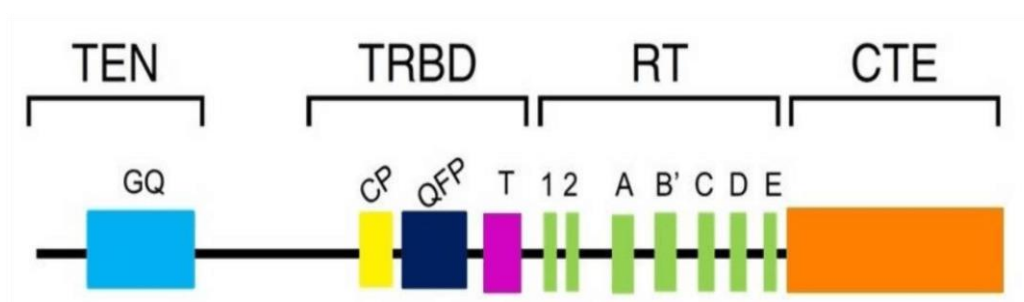
### 1.5. O complexo telomerase de *Leishmania* spp. e seus componentes TERT e TER

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). Ensaios 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.

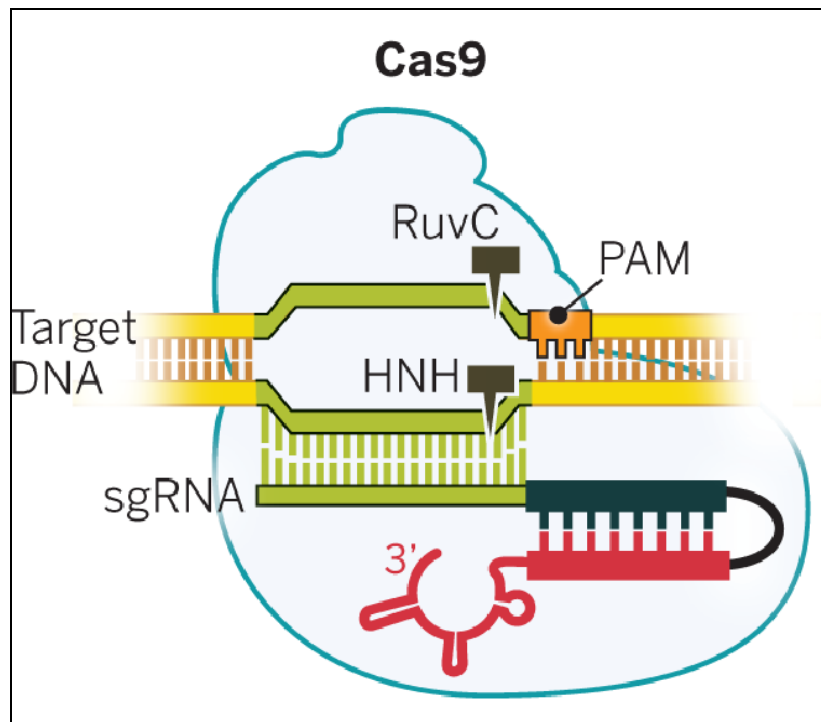
## **1.6. O sistema CRISPR-Cas9 usado na edição de genomas**

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 lócus 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-LLKLAHHSVIYKCLLGPLRTAQKLLCRKLPEATMTILKAAADPAL 1121
R. novergicus -----WLCYQAF-LLKLAHHSVIYKCLLGPLRTAQKLLCRKLPEATMTILKAAADPAL 1121
M. auratus  -----WLCYQAF-LLKLAGHSVTYKCLLGPLRTAQKQLCRKLPRATMAILETAADPAL 1123
      ..*.* * : : *.* * * : : *.*

```

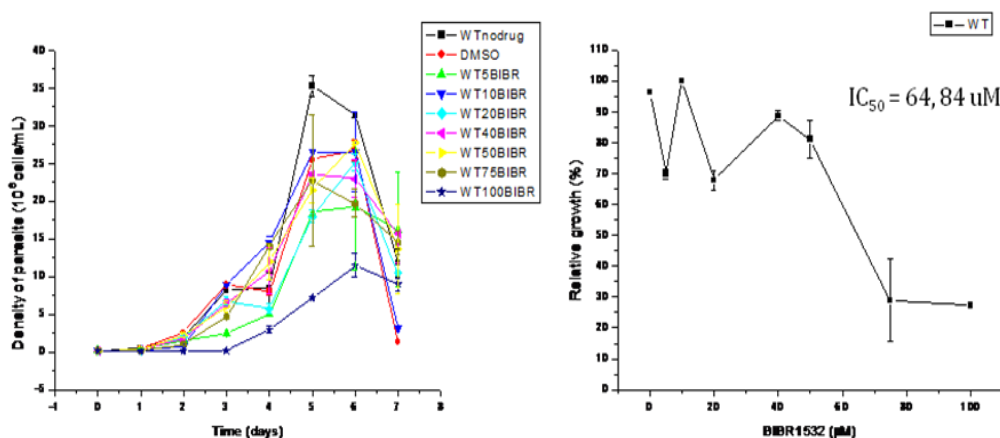
**Figura 8. Comparação entre as regiões C-terminal das TERT humana e de *Leishmania major* que contém o motivo FVYL de interação com o inibidor BIBR1532.** No alinhamento (MUSCLE, Multiple Sequence Comparison by Log – Expectation, EMBL-EBI, <https://academic.oup.com/nar/article-lookup/doi/10.1093/nar/gkh340>), 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) .

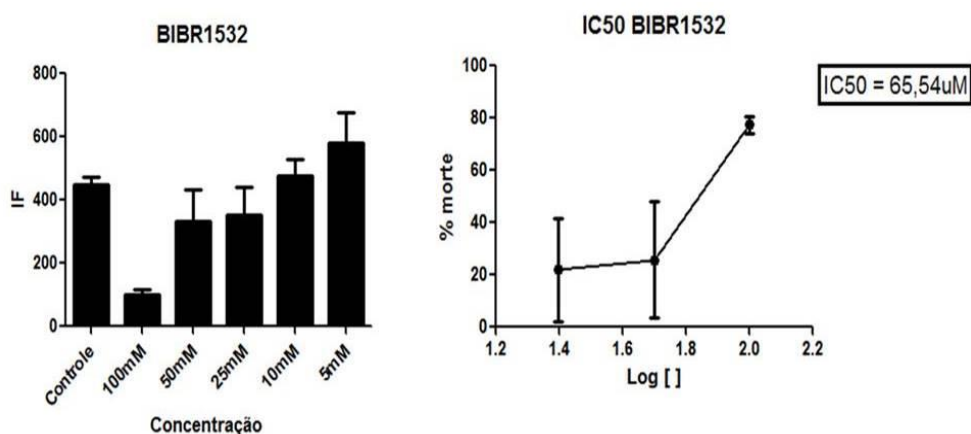
O fato das leishmanioses serem doenças de ocorrência mundial, e o Brasil um dos principais países que apresenta alta incidência da doença, a ausência de fármacos 100% eficientes e com preços acessíveis a toda população e com poucos efeitos colaterais, assim como a inexistência de vacinas com capacidade 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.

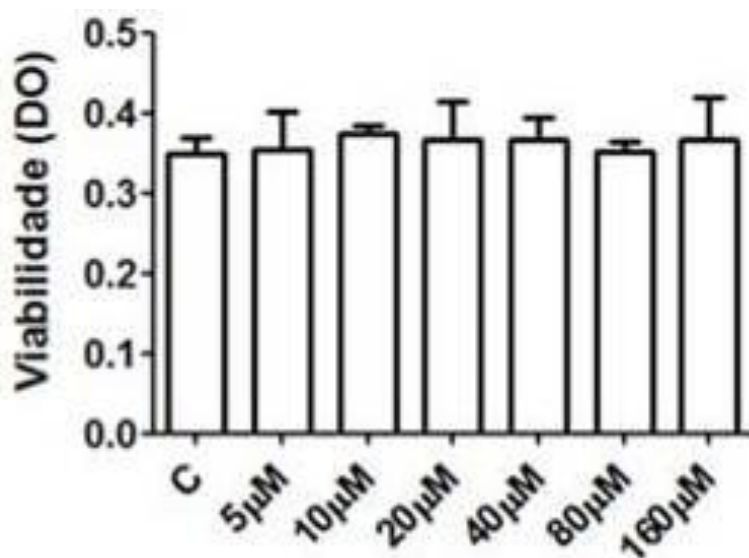


**Figura 9.** Curva de crescimento de *L. amazonensis* na forma promastigota na presença de diferentes concentrações do inibidor BIBR1532 e determinação da dose de tratamento do fármaco. Gráfico da

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.



**Figura11.** Macrófagos peritoniais de camundongo BALB/c,  $7 \times 10^4$  células, foram cultivados com concentrações crescentes de BIBR1532 por 24 horas. A densidade de células viáveis foi determinada a 570nm pela utilização do método colorimétrico de redução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Mosmann, 1983). C, macrófagos não tratados utilizados como controle.

## 2. Objetivos

### 2.1. Objetivo geral

- Realizar o nocaute do componente TERT da telomerase de *Leishmania major*, por substituição gênica, usando CRISPR-Cas9 e inibição in vitro da atividade da telomerase, usando o fármaco BIBR1532, e assim analisar os efeitos in vitro da ausência de TERT em *L. major* no que se refere a capacidade proliferativa e tamanho dos telômeros.

### 2.2. Objetivos específicos

- Implantar a metodologia CRISPR-Cas9 no Laboratório de Telômeros (LabTelo);
- Avaliar os efeitos do nocaute do gene *LmTERT*, por CRISPR-Cas9, na proliferação celular de *L. major*;
- Avaliar a interferência do inibidor BIBR1532 na proliferação celular de *L. major*;
- Avaliar o efeito in vitro do nocaute e da ação do BIBR1532 sobre os telômeros de formas promastigotas de *L. major*.

## 3. Materiais e Métodos

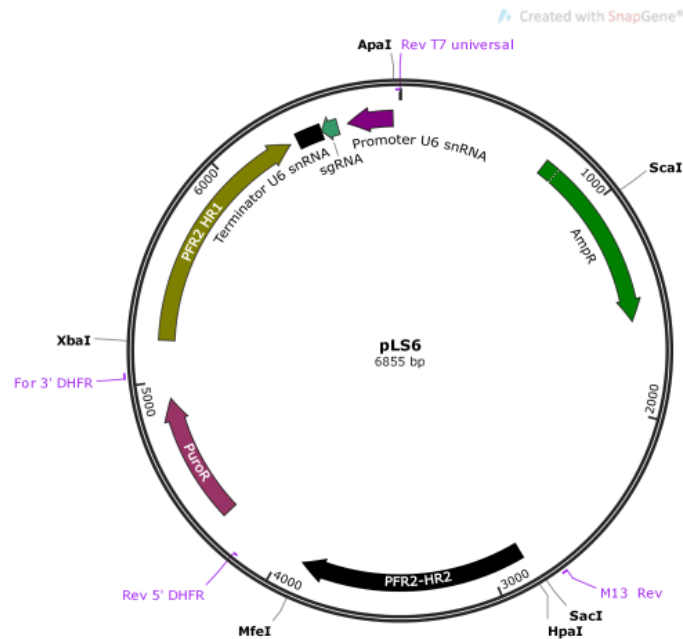
### 3.1. Construção virtual do plasmídeo pLS7-LmTERT

A construção do plasmídeo pLS7-LmTERT foi realizada conforme instruções fornecidas por Sollelis et al (2015), sob orientação dos nossos colaboradores, Dra.

Noelia Lander e Dr. Miguel Chiurillo (FCM-UNICAMP), que têm vasta experiência com a metodologia CRISPR-Cas9 aplicada a protozoários tripanosomatídeos.

O plasmídeo pLS7-LmTERT foi desenhado baseado no plasmídeo pLS6 (Figura 12) (SOLLELIS et al., 2015), o qual possui 6.855 pb e contém elementos que permitem a expressão do sgRNA, como a região 5'UTR do gene que codifica o U6snRNA (215 bp) e terminador 3'UTR (120 bp) do gene que codifica o U6snRNA. Além disso, o plasmídeo pLS6 contém um gene que confere resistência a puromicina, usado para seleção de clones transfectados, flanqueado por duas regiões de homologia (HR1 e HR2) usadas durante o processo de recombinação homóloga para substituição gênica e consequente inserção do gene de resistência a puromicina no local de interesse. Sendo assim, as regiões HRs devem ser correspondentes às sequências gênicas ou do locus que se deseja substituir. Logo, as HRs do pLS6 foram substituídas por sequências do gene *LmTERT* (*LmjF.36.T3930*), o qual possui 4.356 pb, durante a construção do pLS7-LmTERT. Estas sequências permitiram a inserção do gene de resistência a puromicina dentro do locus do gene *LmTERT* durante o evento de nocaute por substituição, e facilitou a seleção dos clones positivos resistentes ao antibiótico. Para finalizar a construção do pLS7-LmTERT, foi inserido o sgRNA homólogo a uma região do gene *LmTERT*, o qual foi clonado entre o promotor e o terminador U6 (ver mapa do pLS7-LmTERT, Figura 16).

O sgRNA foi escolhido utilizando-se ferramentas de bioinformática disponíveis online, como o BLAST, para a escolha da sequência a ser utilizada como sgRNA, manteve-se como regra a escolha de uma sequência de 20 pb do gene de interesse, imediatamente anterior a uma sequência PAM (NGG), sequência esta específica ao gene de *LmTERT*, a qual não se encontra dentro de nenhuma das regiões de homologia (HR1 e HR2). Para clonar as regiões de homologia (HR1 e HR2), sequências contendo ~500bp cada, representando regiões contidas nas porções 5' e 3' do gene *LmTERT* (*LmjF.36.T3930*), foram sintetizadas e clonadas em plasmídeo pGEM-T pela empresa Genone (Figura 28-A e 28-B).



**Figura 12.** Mapa do plasmídeo pLS6, contendo as regiões HRs que foram substituídas pelas sequências e sítios para as principais enzimas a serem utilizadas e os iniciadores usados para confirmar a subclonagem das sequências de interesse. Figura idealizada no programa *SnapGene*®, versão 3.2.1.

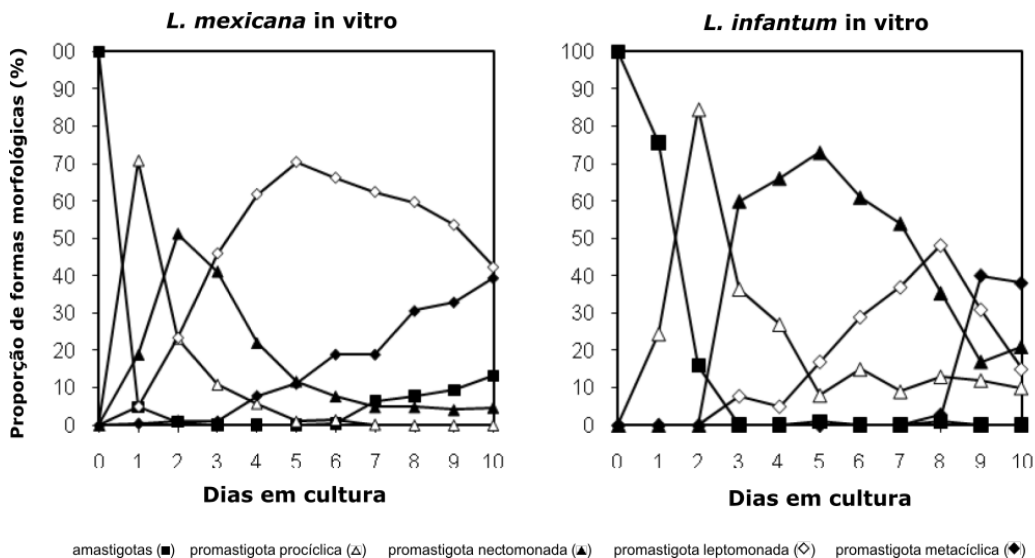
### 3.2. Cultivo de *Leishmania major*

Para todos os experimentos realizados nesse trabalho, a espécie *Leishmania major* cepa *Friedlin* (LmjF) (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN), cedida pelo CLIOC (coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz) sob a sigla IOC/L2821, foi utilizada. O genoma desta cepa está totalmente sequenciado e disponível para análises *in silico* no banco de dados *EBI-ENA Sequence Read Archive* (SRA).

Formas promastigotas proliferativas foram cultivadas a temperatura de 26°C, utilizando o meio de cultura comercial 199 1X, pH 7,3 (Cultilab) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab) inativado pelo calor (Kapler et al. 1990) suplementado com 1X de antibióticos/antimicóticos (Cultilab), 4,3µM de bicarbonato de sódio, 41,75mM HEPES, 104,38µM Adenina, 0,0001% Biotina e 0,00052 % Hemina. A determinação da quantidade e porcentagem de parasitos em cultura foi feita por contagem em câmara de Neubauer e ensaio de MTT (tópico 3.3), respectivamente.

De acordo com Gossage et al, (2003), ao se cultivar parasitas do gênero *Leishmania* *in vitro*, é possível se observar nas culturas formas que são naturalmente encontradas no hospedeiro invertebrado (ver tópicos 1.2 e 3.13 para mais informações).

Assim, é possível se realizar a transformação *in vitro* de formas amastigotas provenientes do hospedeiro mamífero em formas promastigotas procíclicas, também denominadas de promastigotas recém-transformadas *in vitro*. No terceiro dia de cultivo dessas formas as culturas serão compostas, em proporções variadas e dependendo da espécie de *Leishmania*, por formas promastigota procíclica, promastigota nectomonada e promastigota leptomonada, ambas com capacidade proliferativa. A partir do quarto dia de cultivo e dependo da espécie, prevalecem nas culturas as formas promastigotas leptomonadas e promastigotas metacíclicas. Como mostrado na Figura 13, ao longo do tempo ocorre um aumento gradual das formas promastigotas estacionárias e metacíclicas, e diminuição das formas proliferativas promastigotas leptomonadas (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003).



**Figura 13.** Perfil de desenvolvimento de *Leishmania mexicana* e *Leishmania infantum* *in vitro*. Gráfico de cultura iniciada com formas amastigotas (■) tecidual e passando pelas formas promastigota procíclica (Δ), promastigota nectomonada (▲), promastigota leptomonada (◇) e promastigota metacíclica (◆) ao longo de 10 dias de cultivo. Gráfico adaptado de Gossage et al, (2003)

De acordo com Mottram (2008), para se manter cultura de *Leishmania* na forma proliferativa, e em bom estado, é necessário realizar repiques ou passagens (p) das culturas a cada 2 ou 3 dias (dependendo do número inicial de células em cultivo). Formas promastigotas de *L. major* concluem um ciclo celular em aproximadamente 10,2 horas, ou seja, cada repique ou passagem de uma cultura (p; com 3 dias de cultivo) representaria cerca de 7 divisões celulares ou 7 duplicações populacionais dos parasitas

nessa culturas (AMBIT et al., 2011; MOTTRAM, 2008). Cultivar *Leishmania* em meio de cultura por um período maior que quatro dias resulta em transformação de parte das formas proliferativas em formas metacíclicas (infectiva não proliferativa) e em morte celular. Adicionalmente a este fato, aparentemente formas proliferativa, como promastigotas leptomonadas, que ficam em cultura por prolongado período de tempo e não se transformam em promastigotas metacíclicas, entram em fase estacionária (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; MALLINSON; COOMBS, 1989).

Dessa forma, para referências posteriores, culturas em crescimento, por até 4 dias, são aqui chamadas de cultura em fase exponencial de crescimento (com cerca de  $5 \times 10^7$  células/mL no caso de *L. major*), composta apenas por formas de *Leishmania* altamente proliferativas, ao passo que culturas com >4 dias são chamadas de cultura em fase estacionária, composta por formas proliferativas e estacionárias tal qual as formas metacíclicas (Figura 13).

Neste trabalho as passagens foram feitas contando as células em câmara de Neubauer e transferindo um volume de cultura, dependendo do número de células, para nova garrafa de cultivo de forma a se ter  $1 \times 10^6$  células por mL nessa nova cultura. Alternativamente, passagens (p) também foram aqui consideradas ao se remover toda a cultura em cultivo e adicionar, na mesma garrafa, meio de cultura fresco.

### 3.3. Ensaio de MTT

O ensaio de MTT é método colorimétrico que faz uso da redução do composto hidrofílico MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide), de cor amarelada, em cristais de formazan (hidrofóbico), de cor rocha, pelo processo de respiração celular, isto implica em dizer que a conversão só é realizadas por células metabolicamente ativas, sendo a taxa de conversão proporcional a essas células. Dessa forma, a intensidade da cor roxa (medido em absorvência de 570-590 nm) serve como um indicador de quantidade ou porcentagem de células em cultura (MOSMANN, 1983).

Assim, fazendo uso do protocolo descrito em Mosmann (1983), com algumas modificações, 1 mL de cultura de células, testes e controles, foi transferido para tubos de centrífuga de 1,5 mL e centrifugadas 2.300g por 5 minutos a 20°C, seguida da ressuspensão das células em 200 µl de MTT (0,3 mg/ml) diluído em PBS 1X (137 mM

NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), sendo posteriormente incubadas a 26°C por 1:30 h. Após este período foi adicionado 200 µl de solução de lise (10% SDS/10 mM HCl), seguida de homogeneização em vórtex e incubação a temperatura ambiente por 15 min, para permitir a lise celular e completa dissolução dos cristais de formazan gerados pelas células vivas.

Amostras de 100 µl foram retiradas de cada tubo e depositadas em placa *ELISA* de 96 *wells* com fundo em U (*Greiner Bio-one*). A solução de MTT/sol. de lise (v/v) foi utilizada como branco para as medidas espectrofotométricas. Valores de absorbância referentes à produção de formazan foram medidos em espectrofotômetro (*Multiskan EX, Labsystems*) a 590nm. Os ensaios foram feitos em duplicatas ou triplicatas (dependendo do ensaio), para os grupos controle e testes, e os dados usados na confecção de gráficos no Excel (MOSMANN, 1983).

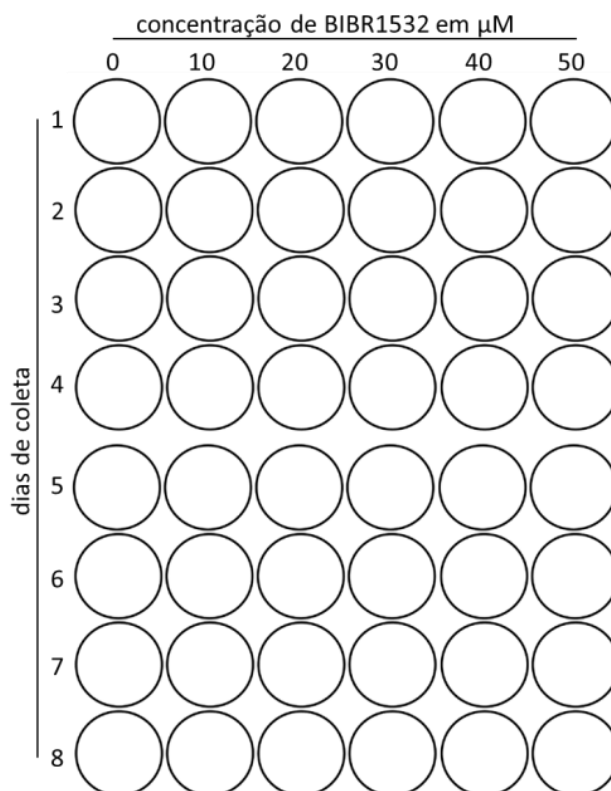
### **3.4. Determinação do IC<sub>50</sub> dos fármacos higromicina e puromicina para *L. major* em fase exponencial**

A metade da concentração inibitória máxima (IC<sub>50</sub>), para os fármacos higromicina e puromicina, foi determinada tratando, em placa *ELISA* de 24 *wells* com fundo chato, 1 mL de cultura contendo 3x10<sup>6</sup> parasitos, com concentrações variadas de higromicina ou puromicina (0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL) por um período de 24 horas quando foi então usado ensaio de MTT (tópico 3.3) para determinar o efeito de cada concentração sobre os parasitos, para tal, os valores gerados pelo método de MTT foram usados na confecção de gráficos.

### **3.5 Determinação do IC<sub>50</sub> do BIBR1532 para *L. major* em fase exponencial**

A determinação do IC<sub>50</sub> (metade da concentração inibitória máxima) do BIBR1532 foi realizada com o composto da marca Santa Cruz Biotechnology (número de catálogo: 321674-73-1) diluído em DMSO na concentração de 100 mM (solução estoque). Assim, culturas em duplicatas, de *Leishmania major* em fase exponencial, foram distribuídas em placas de 24 *wells* (1mL/poço) juntamente com 6 concentrações

diferentes de BIBR1532 (0, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{M}$ ), totalizando 8 culturas, em duplicata, para cada concentração (Figura 14). Essas culturas foram incubadas a 26°C e coletado uma cultura (1 mL), de cada tratamento, por dia ao longo de 8 dias, as quais eram usadas para fazer ensaio de MTT como descrito no t3pico 3.3. Ao fim dos 8 dias os dados foram reunidos e usados na confec33o de gr3pfico.



**Figura 14.** Esquema do tratamento de culturas de *L. major*, em placa ELISA, com diferentes concentrações de BIBR1532 para determinação de  $\text{IC}_{50}$ .

### 3.6. Transfecção de *L. major* em fase exponencial

Para a transfecção de *Leishmania*, em fase exponencial, foi utilizando o *old method* como descrito em *Protocols for handling and working with Leishmania species* (MOTTRAM, 2008), com algumas modificações. Resumidamente, utilizou-se formas promastigotas de *L. major*, na fase logarítmica de crescimento ( $\pm 3 \times 10^7$  células/mL). As células foram centrifugadas a 2.300 g por 5 min e o precipitado ressuspenso em metade do volume original de tampão de eletroporação gelado (21 mM pH 7.5; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ; 6 mM Glucose). Em seguida foram novamente

centrifugadas e ressuspensas em 400 µl de tampão de eletroporação gelado. A elas foram adicionados 50 µg de DNA plasmidial (não linearizado) e a mistura transferida para cubeta de eletroporação de 2-mm (Bio-RAD), previamente resfriada à 4°C. As células foram eletroporadas uma vez a 0.45 kV e capacidade de 500 µF por 6.5ms (*Gene Pulser Xcell™, BIO-RAD*), colocadas a 4°C por 10 min e em seguida inoculadas em 5 mL de M199 e 20% de soro fetal bovino a 26°C por 12h. No dia seguinte, adicionou-se a cultura a concentração apropriada de antibiótico, determinada previamente por IC<sub>50</sub>, seguida de nova incubação a 26°C por cerca de 7 dias, para seleção das células carregando os plasmídeos de interesse. Ao término deste período as células foram plaqueadas em placas de ágar/M199 + antibiótico de seleção, para isolamento de clones puros como descrito a seguir.

### **3.7. Isolamento de clones puros, de *L. major* transfectadas, em placa de meio M199 semissólida**

Após a transfecção e incubação de 7 dias, em cultura, para seleção dos parasitos carregando os plasmídeos de interesse (pTCAS9 ou pLS7-LmTERT; como descrito no tópico anterior), as células em cultura foram contadas em câmara de Neubauer e 4x10<sup>2</sup> células foram diluídas em 200 µl de meio M199 contendo 20% de soro fetal bovino. Em seguida os parasitos foram plaqueados em placas de Petri contendo 20 mL de ágar/M199 (v/v) e 20% de soro fetal bovino com a devida concentração de antibiótico utilizado para a seleção dos transformantes contendo os plasmídeos específicos. As placas foram então vedadas com fita adesiva e incubadas a 26°C por cerca de 7 dias.



**Figura 15.** Colônias de *L. major* transfectadas com pTCAS9, crescendo em placa de M199 semissólido contendo 20% de soro fetal bovino e 30  $\mu\text{g/mL}$  de higromicina, após 7 dias de incubação a 26 °C.

Clones puros, representados por colônias isoladas (Figura 15), foram então inoculadas em 5 mL de M199 contendo 20% de soro fetal bovino e incubados por cerca de 7 dias, sendo que esses clones puros foram chamados de clones Lmj-Cas9 (clones puros de *L. major*, carregando o plasmídeo pTCAS9, isolados em placa de meio M199 semissólido), e clones CRISPRs (clones puros de formas de *L. major*, carregando simultaneamente os plasmídeos pTCAS9 e pLS7-LmTERT, e isolados em meio M199 semissólido), independente do genótipo desses clones.

No caso dos clones CRISPRs, essas colônias recém inoculadas em meio de cultura forma consideradas como sendo a passagem um (p1) dos clones, porém, se considerarmos todos os dias de cultivos e passos realizados antes de se obter esses clones, a real passagem dos mesmos seria p10 (54 dias de cultivo;  $\pm 127$  duplicações populacionais (ver tópico 3.2 para mais informações). Ao término deste período, os clones foram congelados individualmente, como alíquotas de 1 mL, em criotubos de 2mL a -80°C com 5% DMSO de acordo com *Protocols for handling and working with*

*Leishmania species* (MOTTRAM, 2008). Às garrafas de cultura contendo os clones CRISPRs foi adicionado mais 5 mL de meio de cultura (M199/10% soro fetal bovino) e incubado por mais 3 dias. Estas culturas representam a passagem 2 (p2) que foram então utilizadas para extração de DNA genômico (de acordo com o tópico 3.8), e usadas para caracterizar, por PCR, o genótipo dos clones, como descrito no tópico 3.11. Também se utilizou lisado celular, obtido como descrito no tópico 3.10, para essa caracterização dos clones via PCR.

### **3.8. Extração de DNA genômico de *Leishmania major***

Na obtenção de DNA genômico total foi usado o protocolo de tampão TELT descrito em *Protocols for handling and working with Leishmania species* (MOTTRAM, 2008), com algumas modificações. Assim, centrifugou-se 5 mL de cultura em fase logarítmica tardia ( $5 \times 10^7$  células/mL) a 3.000 g por 5 min e lavada por duas vezes com 5 mL de PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Para proceder com a lise celular, o precipitado foi delicadamente ressuspense em 750 µl de tampão TELT (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA pH 8,0; 100 mM Cloreto de Lítio e 0,1 % Triton x-100), transferido para tubo de centrífuga de 2 mL, tipo enppendorf, e mantido sob leve inversão por 5 min a temperatura ambiente seguida da adição de 750 µl de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1; v/v) e inversão leve a temperatura ambiente por 5 min seguido por centrifugação a 16.000 g por 5 min, transferiu-se a fase superior do centrifugado para um novo tubo de centrífuga de 2 mL e realizou-se mais duas extrações com fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1; v/v), como descrito anteriormente, terminado por transferir a fase superior do centrifugado para um novo tubo de centrífuga de 2 mL e adicionando-se ao mesmo 1 mL de etanol 100% gelado (-20°C) seguida de inversão por 1 min a temperaturas ambiente, centrifugação de 16.000 g por 1 min, descarte do etanol 100% e adição de 1 mL de etanol 70% gelado (4°C), inversão em temperatura ambiente por 1 min, centrifugação de 16.000 g por 2 min, descarte de todo o etanol e “secagem” do DNA a 37 °C por cerca de 5 min. Uma vez “seco”, o DNA foi ressuspense em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0) com 10µg/mL de RNase-A (Thermo Fisher) e incubado a 37 °C

por 1h, para completa digestão do RNA, seguido de quantificação em nanodrop (*Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioTek*) e guardado a 4 °C.

### **3.9. Extração de DNA usando etanol**

Adicionar 0,3M de Acetato de Sódio, ao DNA que se deseja limpar, juntamente com 2,5X, do volume inicial, de etanol 100% gelado (-20°C), incubar sob inversão a temperatura ambiente por 5 min, adicionar 1 mL de etanol 70% gelado (4°C) e manter sob inversão por 1 min, centrifugar a 16.000g por 10 min a 4°C, descartar o etanol, secar o precipitado a 37°C por 5 min, ressuspender em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0 e 1 mM EDTA pH 8,0), incubado a 37 °C por cerca de 1h e quantificar em nanodrop (*Epoch™ Microplate Spectrophotometer, BioTek*).

### **3.10. Obtenção do Lisado celular para PCR direta de culturas de Leishmania**

A fim de tornar viável analisar um amplo número de clones CRISPRs, o que aumentaria as chances de identificar clones TERT -/- (nocaute dos dois alelos do gene *LmTERT*), foi desenvolvido uma metodologia que permitiu realizar PCR direto de células, isto é, sem precisar passar pelos processos de extração química de DNA, como descrito no tópico 3.8. Essa metodologia, consiste em coletar 200µl de culturas, com no máximo  $3 \times 10^6$  células/mL, centrifugar 16.000 g por 5 min, ressuspender o precipitado em 20µl de tampão de Lise-W (30 mM Tris-Cl pH 8, 50 mM NaOH e 5mM CaCl<sub>2</sub>) suplementado com 20 µg de proteinase-K, incubado 30 min a 50 °C seguida da inativação da proteinase-K a 95 °C por 10 min. O lisado resultante foi utilizado para os ensaios de PCR, ou guardado a -20 °C. Para cada reação de PCR utilizou-se aproximadamente 3µl desse lisado.

### 3.11. Determinação, por PCR, do genótipo dos clones CRISPRs

Para caracterizar os clones CRISPRs (clones puros, isolados em placa de ágar, de *L. major* que foi transfectada com os plasmídeos pTCAS9 e pLS7-LmTERT), isto é, determinar o genótipo dos clones [nocaute (*TERT* -/-), heminocaute (*TERT* +/-) ou selvagem (*TERT* +/+)] realizou-se PCR desses clones, usando DNA genômico obtido segundo protocolo descrito no tópico 3.8, ou lisado celular como descrito no tópico 3.10, e iniciadores específicos (anexo 1).

Vale ressaltar que *L. major* é um organismo diploide, apresentando 36 cromossomos, sendo que o gene que codifica a TERT neste organismo encontra-se em cópia única no cromossomo 36 (*LmjF.36.T3930*) e tem 4.356 pb (GIARDINI et al., 2006b).

As PCRs consistiram em amplificação de fragmentos específicos do gene *LmTERT* selvagem (*LmTERT* +) e do gene *LmTERT* mutado (*LmTERT* -). Para o gene *LmTERT* (+), que tem 4.365 pb, um dos iniciadores (PreHR1-F) anela em uma região antes do início do gene e o outro (Seed-R) em uma região dentro do gene, tendo a própria Seed como sequência de anelamento, e produzindo um fragmento de 898 pb (Figura 16); esse par de iniciadores foi chamado de conjunto III (ver anexo 1 para mais informações).



**Figura 16.** Estrutura esquemática do gene selvagem que codifica a TERT (*LmTERT* +; de 4.365 pb) mostrando a localização do conjunto de iniciadores III (PreHR1-F e Seed-R) usados para amplificar um fragmento de 898 bp que confirmaria a presença de ao menos um alelo do gene nos clones mutados. Figura idealizada no programa *SnapGene*®, versão 3.2.1

Caso ocorra o nocaute de *LmTERT* (por substituição gênica) usando o método CRISPR, parte do locus *LmTERT* será substituído pelo gene que confere resistência a puromicina. Assim, usando os iniciadores PreHR1-F, que anela em uma região antes do início do gene *LmTERT* e o Puro-R, que anela em uma região dentro do gene que

confere resistência a puromicina (Figura 17), será amplificado um fragmento de 1.577 pb somente a partir de DNA genômico dos clones que sofreram essa edição (nocaute ou heminocaute), indicando que o gene que confere resistência a puromicina foi inserido no locus *LmTERT* no cromossomo 36. Esse par de iniciadores foi chamado de conjunto IV (ver anexo 1 para mais informações).



**Figura 17** Inserção do cassete que contém o gene que confere resistência a puromicina no locus do gene *LmTERT* mostrando a localização do conjunto de iniciadores IV (PreHR1-F e Puro-R) usado para a confirmação de clones contendo a inserção em um (heminocaute) ou nos dois alelos (nocaute) do gene *LmTERT*. Figura idealizada no programa *SnapGene*®, versão 3.2.1

Dessa forma, a combinação dessas duas PCRs permitiram inferir o genótipo dos clones isolados. No total, foram realizados três eventos separados de transfecção de linhagens *Lmj-Cas9* (*L. major* carregando o plasmídeo pTCAS9) com o plasmídeo pLS7-*LmTERT* e, portanto, três eventos de caracterização genotípica dos clones usando PCR. A primeira transfecção culminou na caracterização de 10 clones (A-J) (tópico 4.1.6; Figura 26). A segunda transfecção resultou na caracterização de 14 clones (1-14) (tópico 4.1.6; Figura 27) e a terceira transfecção na caracterização de 48 clones, que foram caracterizados parcialmente (realizou-se a PCR apenas para o gene *LmTERT* +) (tópico 4.1.6; Figura 28).

Inicialmente, esperava-se que uma única transfecção fornecesse ao menos três clones *TERT*  $-/-$ , principalmente devido a eficiência do sistema CRISPR/Cas, os quais seriam usados em estudos posteriores. Contudo, devido à ausência desses clones no primeiro evento e apenas um no segundo evento (clone 9) (tópico 4.1.6; Figura 27-a), cujo real genótipo permanece confuso, realizou-se uma terceira transfecção, que surgiu como um último esforço para se obter outros clones *TERT*  $-/-$ , em que se realizou a PCR apenas para a versão selvagem do gene *LmTERT* (*LmTERT* +) uma vez que a presença da banda para esse gene exclui automaticamente os clones que não são *TERT*  $-/-$  (homozigótico mutado).

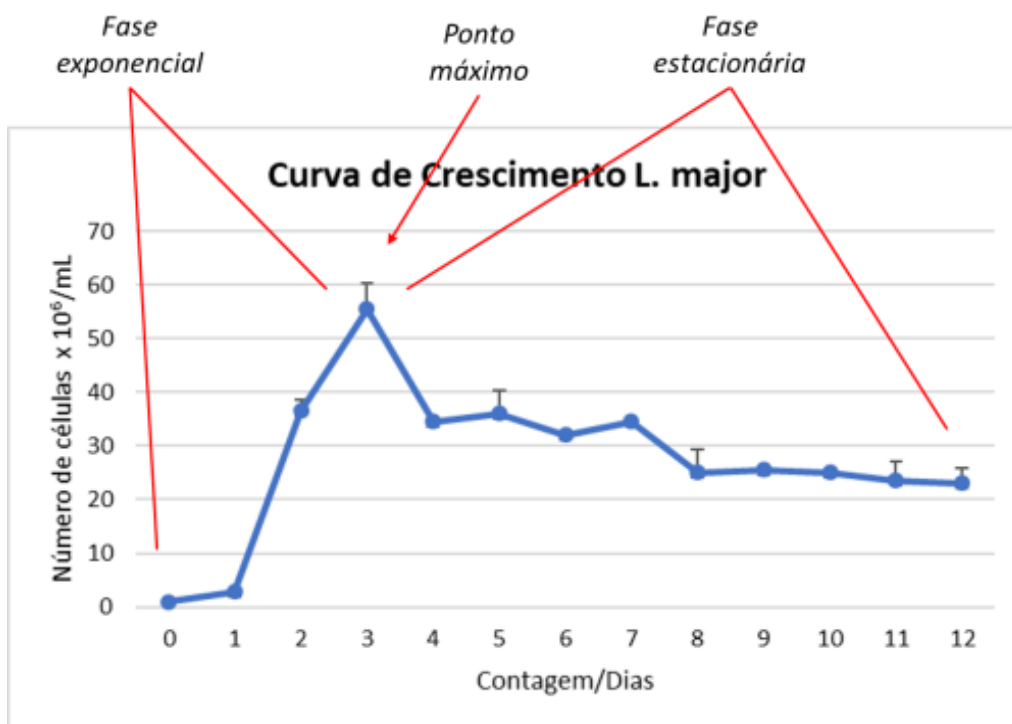
### 3.12. Extração do plasmídeo pTCAS9 dos parasitos transfectados

O plasmídeo pTCAS9 foi recuperado de *L. major*, em cultura de 5 mL em meio 199, em fase exponencial de crescimento, usando o Kit de Mini prep (Promega). A “identidade” do plasmídeo foi confirmada por PCR usando iniciadores específicos (tópico 4.1.2 e Anexo 1).

### 3.13. Curva de crescimento

Para se observar a taxa, velocidade de crescimento e outros eventos relacionados, de parasitos selvagens, transfectados (clones CRISPRs) e de parasitos tratados com o inibidor BIBR1532, realizou-se diferentes curvas de crescimento. Para tal, obteve-se primeiramente um inóculo inicial de 5 mL de parasitos em fase exponencial de crescimento ( $1 \times 10^7$  a  $5 \times 10^7$  células/ml) em seguida  $1 \times 10^6$  células/mL de cada cultura foi usada como inóculo inicial de cada uma das curvas em um volume final de 5 ml de meio M199 contendo 10% de soro fetal bovino e antibiótico. Foram feitas triplicatas de cada uma destas culturas, as quais foram incubadas por 7-12 dias à 26°C. Para a montagem das curvas de crescimento, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer em intervalos de 24 h. A quantidade de parasitos foi expressa em número de parasitos/mL. As curvas foram montadas usando o programa Excel.

Com o intuito de se facilitar as discussões posteriores, dividiu-se as curvas de crescimento em três partes; a fase exponencial que compreende do dia 0 ao dia 3 (ou até atingir o ponto máximo); o ponto máximo, no terceiro dia, que é o ponto da curva de crescimento que representa o maior número de células em cultura durante todo o período de cultivo; e a fase estacionária, a partir do quarto dia de cultivo representada pela parte decrescente da curva (Figura 18). A partir do quarto dia as culturas passam a ser compostas por formas promastigotas estacionárias e formas metacíclicas infectivas não proliferativas (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; MALLINSON; COOMBS, 1989).



**Figura 18** Curva de crescimento de *L. major*, em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e antibióticos. Demonstração das fases de crescimento dos parasitos dentro da curva de crescimento (fase exponencial, ponto máximo e fase estacionária). As barras representam os desvios padrões.

### 3.14. Obtenção de extrato proteico total de *L. major*

Os extratos proteicos foram preparados a partir de culturas de 50 mL, em fase exponencial tardia de crescimento ( $\pm 5 \times 10^7$  células/ml), em que cerca de  $2.5 \times 10^9$  células foram centrifugadas a 6.000 g por 5 min a 4°C e lavadas 2 vezes com 5 ml de PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) suplementado com 2% de glucose. Em seguida as células foram ressuspensas em 1 mL tampão A (20 mM Tris-HCl pH 7.5; 1 mM EGTA pH 8.0; 1 mM EDTA pH 8.0; 15 mM NaCl) suplementado, no momento do uso, com 1 mM espermidina, 0,3 mM espermina e 1 mM de DTT. Em seguida foram congeladas em nitrogênio líquido por 1 min e descongeladas no gelo. Durante o descongelamento adicionou-se 0,5% de NP40 e 1X coquetel de inibidor de proteases, seguido de incubação em gelo por 30 min e centrifugação a 16.000 g por 20 min a 4°C. O sobrenadante resultante, extrato proteico total, foi coletado, quantificado e armazenados a -80 °C.

### 3.15. Western blot

Extratos proteicos (10 µg para detecção da enzima Cas9 e 200 µg para detecção da proteína TERT e GAPDH), obtidas como descrita acima (tópico 3.14), provenientes de Lmj-WT (*Leishmania major* selvagem que não carrega nenhum plasmídeo, mas passada pelo processo de transfecção das linhagens Lmj-Cas9 e dos clones CRISPR), Lmj-Cas9 (linhagem de *Leishmania major* expressando a endonuclease Cas9) e clones CRISPR (linhagem de *Leishmania major* carregando os plasmídeos pTCAS9 e pLS7-LmTERT), em fase exponencial, foram submetidos a fracionamento em gel de poliacrilamida 10% SDS-PAGE (SAMBROOK; RUSSELL, 2001) e após a separação, as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF (*Amersham Hybond Low Fluorescence 0,2 mm PVDF; GE Healthcare*), utilizando sistema de transferência úmida (*Mini Trans-Blot® Cell, BIO-RAD*). As membranas foram reveladas seguindo o protocolo da *Amersham ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare)* com algumas modificações. As incubações com os anticorpos primário e secundário foram realizadas em solução de bloqueio [PBS-1X; 0,1% Tween 20 e 1% Blotting-Grade Blocker (Bio-Rad)]. Os títulos utilizados para os anticorpos foram os seguintes:

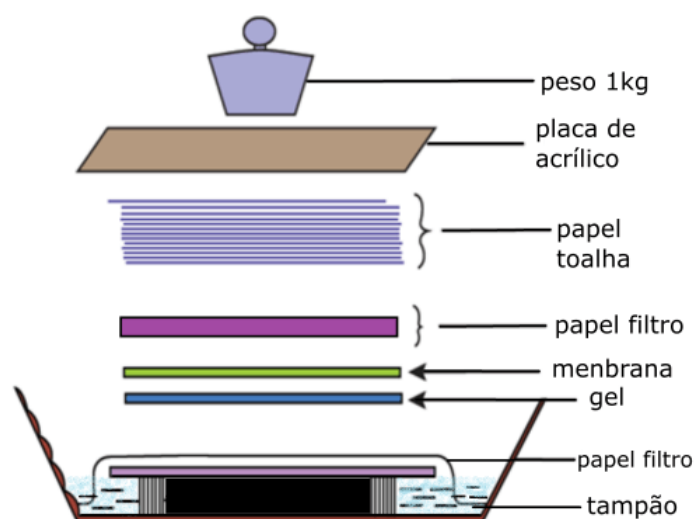
- Anti-FLAG, (Sigma®) para a Cas9 obtido de coelho: 1/5000;
- Anti-TERT N-Terminal (GIARDINI et al., 2006a) para a TERT obtidos em coelho: 1/8000;
- Anti-GAPDH (Sigma®) para a GAPDH obtido de coelho: 1/2.000;
- Anticorpo secundário anti-coelho obtido em camundongo e conjugado com peroxidase-HRP (Bio-Rad): 1/50.000.

### 3.16. Southern blot telomérico de *L. major* em fase exponencial de crescimento

Ensaio realizado com base no kit *TeloTAGGG-Telomere Length Assay* da Roche (edição 9.0, 2011) em Conte e Cano (2005), com DNA genômico obtido de culturas e fase exponencial de crescimento, como descrito no tópico 3.8, para observar diferenças no perfil de restrição tomérico (TRF; *Telomere Restriction Fragment*). Resumidamente, digeriu-se 1 µg de DNA genômico, obtido das culturas em questão, com *RsaI* (Promega; 5 U/µg de DNA) de acordo com o protocolo da enzima, com incubação de 16 h a 37°C em volume de 30 µl. Para confirmar que os fragmentos liberados pela digestão com *RsaI* tratavam-se de fato de fragmentos da região telomérica, digeriu-se 2 µg dos mesmos DNAs, em paralelo à digestão por *RsaI*, com nuclease BAL-31 (Fermentas; 1U/2µg de DNA), de acordo com o protocolo da enzima, com incubação de 1h a 30°C em volume de 100 µl, seguida de uma limpeza rápida com etanol, como descrito no tópico 3.9, e digestão de 1µg do DNA recuperado com *RsaI* (Promega; 5 U/µg de DNA) de acordo com o protocolo da enzima, com incubação de 16 h a 37°C em volume de 30 µl.

A nuclease BAL-31 é uma exonuclease altamente específica para fita simples de ácidos nucleicos (DNA e RNA) sendo que uma vez iniciada a digestão a mesma avança degradando região de fita dupla sem gerar cortes internos no ácido nucleico. Isso significa que o tratamento de DNA genômico com essa exonuclease resultará na degradação das regiões teloméricas e subteloméricas, dependendo do tempo de incubação, o que permite dizer se os padrões de bandas observados em um Southern blot telomérico de fato tratam-se de repetições teloméricas.

Uma vez realizadas as digestões, fragmentos foram separados em gel de agarose 0,8% de 16,5 cm e voltagem de 80V (4,8V/cm) por 4 horas em tampão TAE-1X. Terminado a corrida, o gel contendo o DNA digerido foi lavado rapidamente por duas vezes com água Milli-Q (±100mL/lavagem) e feito duas incubação, 15 min cada a temperatura ambiente, em solução desnaturante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) sobre leve agitação (±100mL/incubação), novamente feito duas lavagens rápidas com água Milli-Q (±100mL/lavagem) seguido de duas incubações, 15 min cada e a temperatura ambiente, em solução de neutralização (0.5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7.5; ± 100mL/incubação) e feito transferência por capilaridade (Figura 19), por 16h a temperatura ambiente, usando membrana de nylon 0,45µm (*Amersham Hybond<sup>TM</sup> N<sup>+</sup> -GE Healthcare*) e SSC-20X (3M NaCl, 0,3 M Citrato de Sódio, pH 7,0) como tampão de transferência.



**Figura 19.** montagem de transferência por capilaridade de Southern blot.

Após a transferência, para fixação do DNA, realizou-se o *crosslinking* da membrana por UV (120mJ) seguida de duas lavagens rápidas ( $\pm 20\text{mL/lavagem}$ ) em SSC-2X (0,3M NaCl, 0,03M Citrato de Sódio, pH 7,0) e incubação á 42°C por 1h sob leve agitação em  $\pm 25\text{mL}$  de solução de pré-hibridização (5X SSC, 0,1% sarcosil, 0,02% SDS) previamente aquecida. Decorrido esse tempo, descartou-se a solução de pré-hibridização e se adicionou 15 mL solução de hibridização (15 mL de solução de pré-hibridização com 1 $\mu\text{l}$  sonda telomérica de fita C marcada com DIG) seguida de incubação á 42°C por 16h sob leve agitação.

Para prepara a membrana para a revelação, descartou-se a solução de hibridização e lavou-se a membrana 2X com tampão de lavagem estrigente I (2 $\times$  SSC, 0.1% SDS) a temperatura ambiente por 5 min ( $\pm 20\text{mL/lavagem}$ ), seguida de duas lavagens de 20 min a 50°C com tampão de lavagem estrigente II (0.2 $\times$  SSC, 0.1% SDS) ( $\pm 20\text{mL/lavagem}$ ) e uma lavagem de 5 mina a temperatura ambiente com 100 mL de tampão de lavagem (0,1 M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7,5 e 0,3 % Tween-20). Todas as lavagens foram feitas sob leve agitação.

A revelação consistiu em incubar a membrana por 30 min a temperatura ambiente em 75 mL de solução de bloqueio (1% do Blotting-Grade Blocker em tampão de ácido maleico; 0,1M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7,5) seguido dos descarte dessa

solução e incubação em 25 mL de solução Anti-DIG-AP (solução de bloqueio com 75 mU/mL de Anti-DIG-AP; Roche) por 30 min a temperatura ambiente. Posteriormente lavou-se a membrana 2x ( $\pm 50$  mL/lavagem) com tampão de lavagem (0,1 M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7,5 e 0,3 % Tween-20) por 15 min em temperatura ambiente seguida de incubação em 50 mL de tampão de detecção (0,1 M Tris-HCl, 0,1M NaCl) por 5 min a temperatura ambiente. Todos os passos foram feito sob leve agitação. Por último, a membrana foi exposta a solução de CSPD (Roche) e revelado em *G-BOX Chemi- XR5* por 1 hora.

### 3.17. Subclonagem dos fragmentos HR1 e HR2 no plasmídeo pLS6

Para a remoção do fragmento PFR2-HR1 do plasmídeo pLS6, 50  $\mu$ g do pLS6 foi inicialmente digerido com *XbaI* (*over night* a 37°C com 2,5 U/ $\mu$ g de DNA em volume de digestão de 100  $\mu$ l) para linearização do plasmídeo, em seguida o produto da digestão foi limpo usando kit de purificação Invitrogen (“*PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit Purifying PCR Products*”, [s.d.]), seguida de uma segunda digestão com *ApaI* (*over night* a 37°C com 2,5 U/ $\mu$ g de DNA em cerca de 80 $\mu$ l de digestão). O produto da digestão foi fracionados em gel de agarose 0,7% e um fragmento de 5.2 kb, correspondente ao pLS6 vazio (sem PFR2-HR1), foi então extraído do gel e purificado usando kit de purificação Invitrogen (“*PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit Purifying PCR Products*”, [s.d.]).

O passo seguinte, consistiu na remoção do fragmento TERT-HR2 clonado no vetor pGEM-T, o qual foi removido por dupla digestão com as enzimas *XbaI* e *ApaI* (usando mesmo esquema da digestão do pLS6 descrito acima). A banda correspondente a este fragmento, de 979 pb, foi cortada e purificada do gel de agarose usando o kit de purificação Invitrogen (“*PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit Purifying PCR Products*”). O fragmento TERT-HR2 e o vetor pLS6 vazio (sem o fragmento PFR2-HR1) foram então ligados com T4 DNA ligase (Invitrogen), na proporção 3:1 (inserto/vetor) e o produto da ligação correspondente ao plasmídeo pLS6-HR2, foi usado para transformar *E. coli* cepa DH5-alpha. A confirmação do sucesso da clonagem, DNA plasmidial recombinante, foi realizada ao se linearizar o plasmídeo, obtido por mid-prep, com a enzima *XbaI* e ainda por meio de sequenciamento.

A etapa seguinte consistiu na subclonagem do fragmento TERT-HR1 no pLS6-HR2, onde 50 µg de cada plasmídeo (pLS6-HR2 e pGEM-HR1) foi inicialmente digerido com a enzima *MfeI* (2,5 U/µg de DNA), para linearização dos plasmídeos, em um volume total de 100 µl, por a 37°C e em seguida foram limpas usando kit de purificação Invitrogen (*“PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit Purifying PCR Products”*, [s.d.]), seguida de uma segunda digestão com *SacI* (2,5 U/µg de DNA) em um volume total de 80 µl por 16 horas a 37°C. Os produtos das digestões foram fracionados em gel de agarose 0,7% e os devidos fragmentos foram então extraído do gel e purificado usando kit de purificação Invitrogen (*“PureLink® Quick Gel Extraction and PCR Purification Combo Kit Purifying PCR Products”*, [s.d.]) (fragmento de 5.1 kb, correspondente ao pLS6-HR2 sem PFR2-HR2 e fragmento de 486 pb correspondente a TERT-HR1), sendo em seguida ligados com T4 DNA ligase (Invitrogen), na proporção 3:1 (inseto/vetor) e o produto da ligação foi usado para transformar *E. coli* cepa Top10. A confirmação da clonagem foi realizada por meio de reação de PCR e sequenciamento.

### **3.18. Confecção de lâminas, de *L. major*, corada com Giemsa**

Realizou-se esfregação de cultura de *L. major* (5µl, independentemente do número de células) em lâmina histológica, previamente limpa. Após o esfregação, as lâminas foram secas a temperatura ambiente, fixadas por 1 min em etanol 70% gelado, secas a temperatura ambiente, coradas com Giemsa (0,15%) por 5 min, lavadas com água da torneira e fotografadas em microscópio de luz (*Microscope ECLIPSE 80i – Nikon*) em aumento de 100X, com auxílio do programa *NIS elements software* (v. Ar 3.10).

### **3.19. Confecção de lâminas, de *L. major*, coradas com iodeto de propídio**

O iodeto de propídio (PI) é um marcador fluorescente vermelho de capacidade intercalante (intercala entre os pares de base de ácidos nucleicos tal qual DNA e RNA)

cujo o pico de emissão de fluorescência encontra-se no espectro vermelho (600 nm), (APARECIDA DOS REIS, LUANA, [s.d.]).

Assim, foram coletados 200 µl de cultura de *L. major* (independentemente do número de células) em tubo de 1,5 mL, tipo Eppendorf, seguida de centrifugação a 2.500g por 5 min e o precipitado foi ressuspensão em 200 µl de formalina 2% por 10 min a temperatura ambiente, para fixação das células. Uma vez fixadas, as células foram precipitadas por centrifugação (2.500 g por 5 min), o precipitado lavado duas vezes com 1mL de PBS-1X, ressuspensão em 200 µl de PBS-1X com 100 µg/µL de RNase-A DNase free (Thermo Scientific), incubado 45 min a 37 °C e novamente precipitado por centrifugação. O precipitado foi então ressuspensão em 20 µl de PBS-1X e 80 µl de etanol 88%, o qual foi adicionado lentamente em vórtex, seguido de incubação a temperatura ambiente por 10 min para fixação. (DA SILVA et al., 2017). A confecção de lâminas consistiu em fazer esfregaço de 10 µl de células fixadas, em lâminas histológicas previamente limpas, esperar secar a temperatura ambiente, pingar sobre a lâmina 10 µl de solução de iodeto de propídio a 50 µg/mL (Thermo Scientific), cobrir com lamínula, vedar as bordas da lâmina com esmalte, incubar 10 min a temperatura ambiente e fotografar em microscópio de fluorescência (*Microscope ECLIPSE 80i – Nikon*), em aumento de 100X com imersão. As imagens foram capturadas com auxílio do programa *NIS elements software* (v. Ar 3.10).

### **3.20. Transfecção de *L. major* com oligonucleotídeo *morpholino* antisense**

Fazendo uso do protocolo de transfecção “*old method*”, descrito em Motram (2008), realizou-se a transfecção de *L. major* com oligonucleotídeo *morpholino*. Resumidamente, utilizamos  $2,5 \times 10^7$  células de *L. major* em fase exponencial de crescimento as quais foram transfectadas com 10 µM de oligonucleotídeo *morpholino* controle (*Fluoresceinated standard control*, 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA-3', *GeneTools*). As células transfectadas foram inoculadas em 3 mL de M199, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e incubadas a 26°C por 12 horas. Transcorrida as primeiras 12 horas, realizou-se coletas sucessivas de 100 µl da cultura a cada 6 horas, durante 3 dias. Os parasitos coletados foram fixados em formalina 1%, lavados em PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10

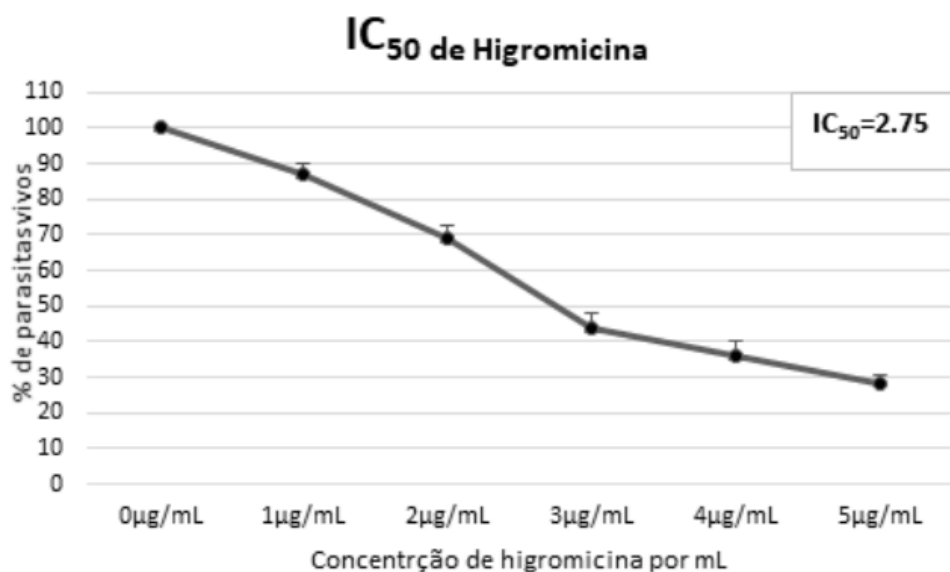
mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4) e corados com DAPI, seguido de análise em microscópio de fluorescência Nikon 80i, aumento de 100X, com auxílio do programa *NIS elements software* (v. Ar 3.10).

## **4. Resultados e Discussão**

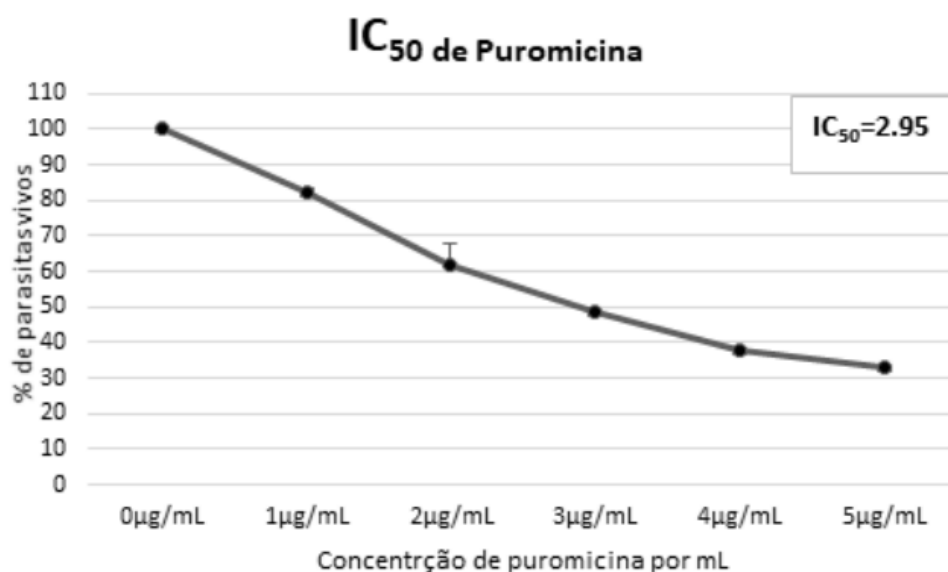
### **4.1. Implementação da metodologia CRISPR-Cas9**

#### **4.1.1 Determinação do IC<sub>50</sub> para higromicina e puromicina**

Com a finalidade de determinar as quantidades de fármacos a serem utilizados para seleção de células carregando os plasmídeos de interesse os quais contem como marca de seleção genes que conferem resistência a antibióticos, foram realizados ensaios para se determinar o IC<sub>50</sub> dos fármacos higromicina e puromicina (tópico 3.4). O IC<sub>50</sub> foi definido como a concentração de higromicina ou puromicina que inibiu a conversão do MTT para cristais formazan, em cerca de 50% das células nas culturas testadas. Como mostrado na Figura 20, o IC<sub>50</sub> para higromicina foi estimado em 2,75 µg/mL e para puromicina o IC<sub>50</sub> foi estimado em 2,95 µg/mL (Figura 21), sendo que os ensaios foram feitos em triplicatas e a média destas utilizadas para montagem do gráfico. É valido salientar que para se conseguir a concentração de fármaco necessária para atuar eficientemente como um marcador de seleção das células transfectadas, o valor do IC<sub>50</sub> deve ser multiplicado por 10. Assim, a concentração dos fármacos a serem utilizados na seleção dos clones de *L. major* transfectados com os plasmídeos de interesse (pTCAS9 e pLS7-LmTERT) ficou determinada em 27,5 µg/mL e 29,5 µg/mL para higromicina e puromicina, respectivamente de forma a garantir que nas culturas permanecessem viáveis somente os parasitos transformados.



**Figura 20.** Gráfico mostrando o IC<sub>50</sub> de higromicina para *L. major* em fase exponencial. Os ensaios foram realizados usando concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL de fármaco, em um período de 24 horas, sendo o IC<sub>50</sub> definido em cerca de 2.75 µg/mL de higromicina, o qual foi determinado por meio do ensaio de MTT. Gráfico confeccionado a partir de triplicatas. As barras representam os desvios padrões.

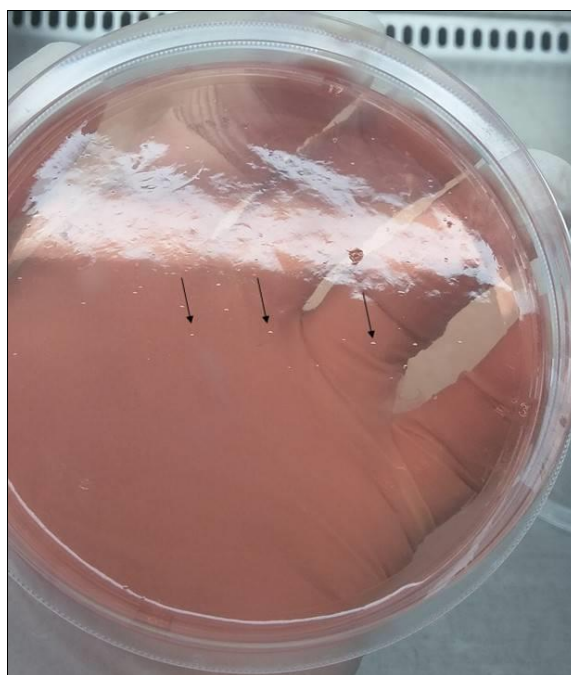


**Figura 21.** Gráfico mostrando o IC<sub>50</sub> de puromicina para *L. major* em fase exponencial. Os ensaios foram realizados usando concentrações de 0, 1, 2, 3, 4 e 5 µg/mL de fármaco, em um período de 24 horas, sendo o IC<sub>50</sub> definido em cerca de 2.95 µg/mL de puromicina, o qual foi determinado por meio do ensaio de MTT. Gráfico confeccionado a partir de triplicatas. As barras representam os desvios padrões.

O trabalho pioneiro realizado por Sollelis *et al.*, (2015) fez uso de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de ambos os fármacos para selecionar *L. major*, em fase exponencial, transfectadas com os referidos plasmídeos. Tendo em vista que tal valor apresentava-se muito próximo do aqui encontrado, optamos por utilizar a concentração de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , tanto para higromicina quanto para puromicina, para selecionar os clones de *L. major* transfectadas em placa de M199 semi-sólido suplementado com 20% soro fetal bovino e antibióticos específicos como descrito no tópico 3.7.

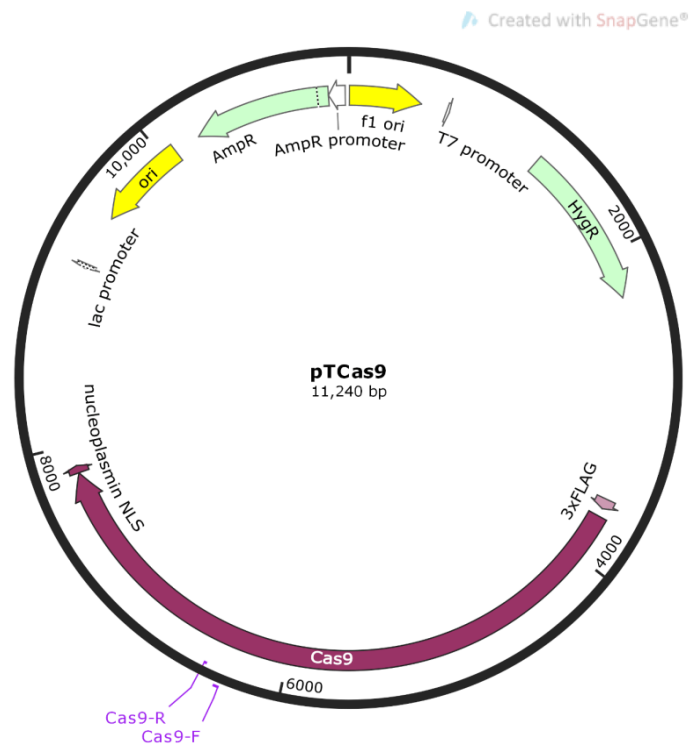
#### 4.1.2. Transfecção de *L. major* com pTCAS9 e seleção de linhagem pura

Com o intuito de se obter a linhagem *L. major* carregando o plasmídeo pTCAS9 (Lmj-Cas9), foi realizada a transfecção de *L. major* selvagem com o plasmídeo pTCAS9, como descrito no tópico 3.6, e posterior seleção de clones puros, usando seleção dos clones em meio 199 contendo 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  higromicina, como já descrito (tópico 3.7). As colônias isoladas, representando os clones puros, foram obtidas após 8 dias de cultivo (Figura 22). Assim, para as análises posteriores, 5 colônias foram escolhidas e inoculadas em garrafas de cultura contendo meio 199 suplementado de soro fetal bovino e higromicina.

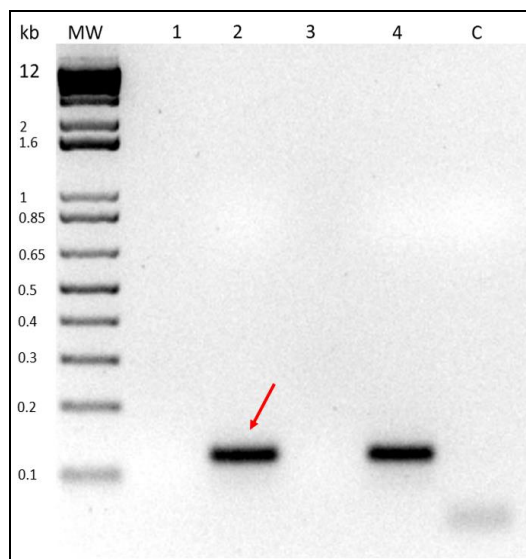


**Figura 25.** Colônias de *L. major* transfectadas com pTCAS9, crescendo em placa de M199 semissólido contendo 20% de soro fetal bovino e 30 µg/mL de higromicina, após 7 dias de incubação a 26 °C.

Para checar a presença do plasmídeo pTCAS9 nessas linhagens foi realizado ensaio de PCR (Figura 24). Assim, utilizou-se os iniciadores Cas9-F e Cas9-R (Figura 23 e Anexo 1) para amplificar um pequeno fragmento de 127 pb do gene que codifica a endonuclease Cas9 presente no plasmídeo pTCAS9.



**Figura 23.** Mapa do pTCAS9, mostrando a posição do gene que codifica a endonuclease Cas9, o gene que confere resistência a higromicina e o gene que confere resistência a ampicilina e a posição dos iniciadores Cas9-F e Cas9-R, que foram utilizados para conferir por PCR a existência de transformantes pTCAS9 nas culturas dos parasitos transfectados. O mapa apresentado foi idealizado utilizando-se o programa *SnapGene*® versão 3.2.1.

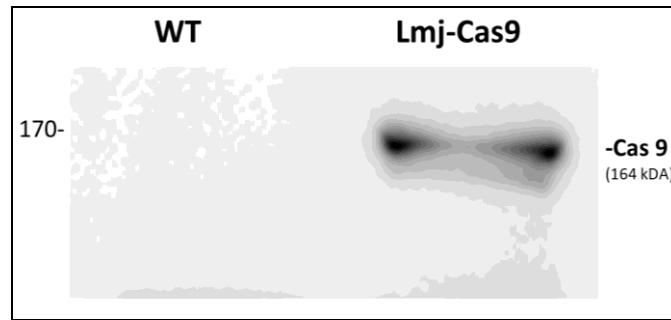


**Figura 24. Confirmação via PCR da presença do plasmídeo pTCAS9 em linhagem de *L. major* transfetadas.** Gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. MW- marcador molecular 1kb Plus (Invitrogen); 1- mini-prep de *L. major* selvagem; 2- mini-prep de *L. major* transformada com pTCAS9, 3- plasmídeo pTCAS9; 4- produto de amplificação do plasmídeo pTCAS9 (0.12 kb); C- branco.

Como demonstrado na Figura 23 (linha 2), um dos clones de *L. major* selecionados em cultura contém o plasmídeo pTCAS9, uma vez que o fragmento de 127 bp só foi amplificado a partir de células desta linhagem e do DNA plasmidial pTCAS9 (Figura 23, linha 4). Nenhum produto foi amplificado a partir de DNA obtido de *L. major* selvagem (Figura 23, linha, 1). Assim, o clone puro no qual confirmou-se a presença do plasmídeo pTCAS9 foi nomeado Lmj-Cas9, sendo que o passo seguinte foi a confirmação da expressão da endonuclease Cas9 utilizando Western blot.

#### 4.1.3. Expressão da endonuclease Cas9 pela linhagem Lmj-Cas9

A fim de confirmar que a endonuclease Cas9 está sendo sintetizada pela linhagem Lmj-Cas9, foi realizado um Western blot (como descrito no tópico 3.15) utilizando extratos proteicos (10 $\mu$ g) obtidos de fase exponencial das linhagens selvagem e transfetada (Lmj-Cas9) e soro anti-Flag (Figura 25). Aqui vale lembrar que a proteína Cas9 está clonada no vetor pTCAS9 em fusão com um tag 3x FLAG no N-terminal (ver figura Figura 23 para mais informação).

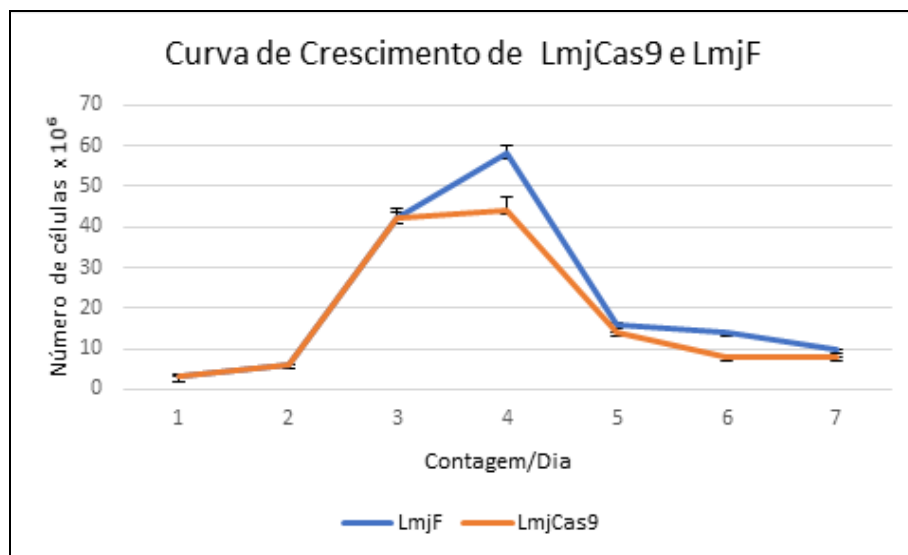


**Figura 25. Confirmação da expressão da endonuclease Cas9 na linhagem Lmj-Cas9 usando Western blot.** Extratos proteicos (10 ug de cada extrato) das linhagens selvagem (wt) e Lmj-Cas9 foram fracionados em SDS-PAGE 10% e as proteínas foram transferidas para membrana de PVDF seguido de incubação com anticorpo primário anti-FLAG (Sigma®) e secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase-HRP (BIO-RAD), revelados por quimioluminescência usando ECL (GE).

Semelhante ao resultado obtido por Sollelis et al., (2015), a expressão da endonuclease Cas9 foi confirmada pela detecção de uma banda única, com peso estimado em 164 kDA (Figura 25, Lmj-Cas9), em extratos proteicos obtidos da linhagem Lmj-Cas9, ao passo que a linhagem selvagem (Figura 25, WT), não apresenta a banda portando não expressa a proteína.

#### **4.1.4. A expressão de Cas9 não altera o perfil de crescimento de Lmj-Cas9**

Após a confirmação da presença do plasmídeo pTCAS9 e da expressão da endonuclease Cas9 na linhagem Lmj-Cas9, o passo seguinte foi checar se a presença do plasmídeo e a expressão de uma proteína exógena viria a interferir de forma significativa no crescimento do parasito em cultura. Para tanto, foram realizadas curvas de crescimento, em triplicata, das linhagens selvagem *L. major* (LmjF) e Lmj-Cas9 (Figura 26).



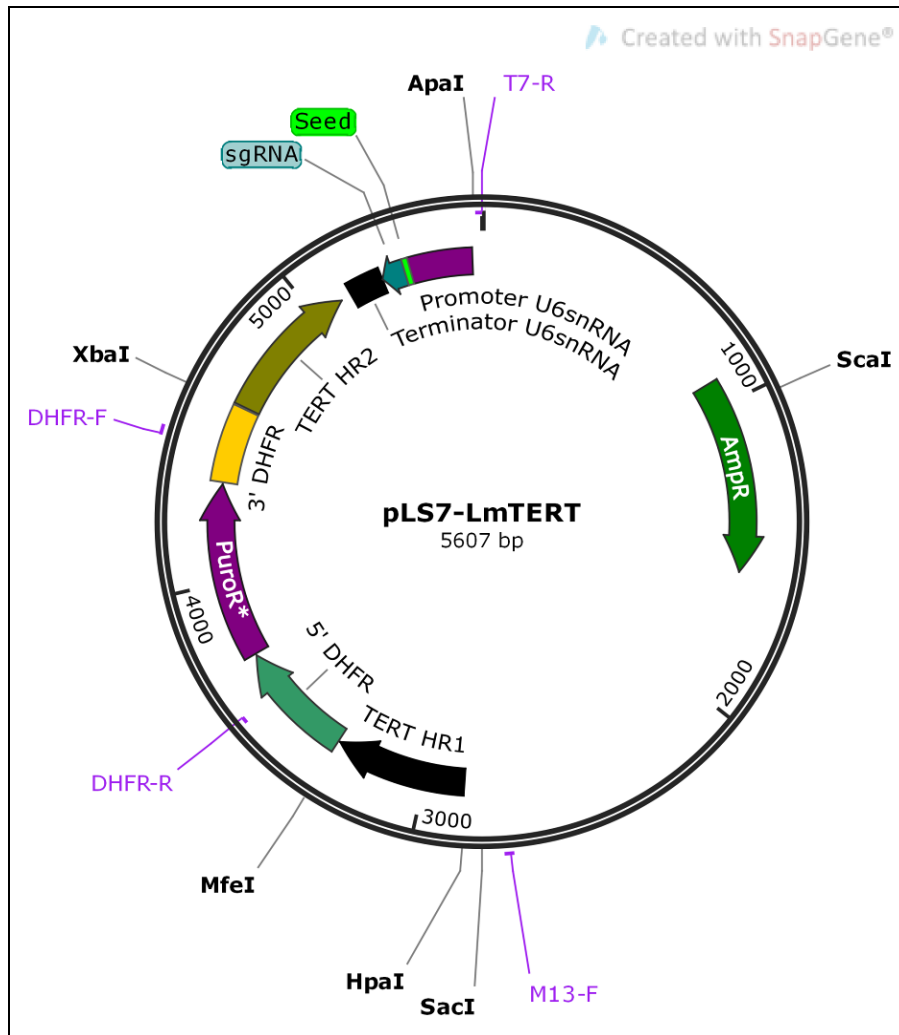
**Figura 26.** Curva de crescimento de *L. major* (LmjF) e Lmj-Cas9 realizada em 7 dias e iniciada com  $1 \times 10^6$  células/mL para ambas as linhagens. Gráfico gerado a partir da média de triplicatas de contagens de células em câmara de Neubauer. As barras representam os desvios padrões.

O gráfico (Figura 26) mostra o perfil de crescimento das linhagens *L. major* selvagem (LmjF), (linha azul), e Lmj-Cas, (linha laranja), ao longo de 7 dias. Trabalhos recentes, de outros pesquisadores, tem demonstrado que a expressão da endonuclease Cas9 não afeta de forma significativa a taxa de crescimento de *L. major*, quando comparada com a linhagem selvagem (BENEKE et al., 2017; ISHEMGULOVA et al., 2018; SOLLELIS et al., 2015). É possível observar que a Lmj-Cas9 atinge o ponto máximo da curva com um menor número de células ( $4,5 \times 10^7$  células/ml) quando comparada com a *L. major* selvagem ( $5,8 \times 10^7$  células/mL) (Figura 26), o que, segundo Mottram (2008), é natural considerando que a linhagem Lmj-Cas9 encontra-se sobre pressão seletiva de um fármaco ( $30 \mu\text{g/mL}$  higromicina). Por isso conclui-se que a expressão de Cas9 não é tóxica para *L. major*.

## 4.1.5. Montagem do pLS7-LmTERT

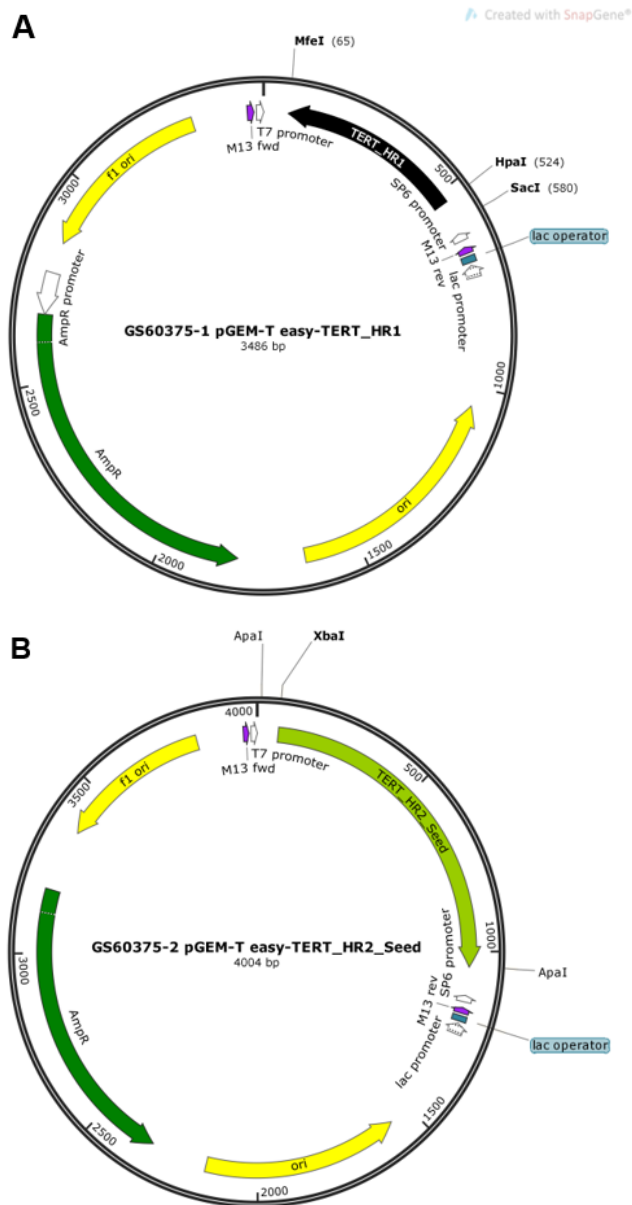
### 4.1.5.1 Construção virtual do pLS7-LmTERT

A construção do plasmídeo pLS7-LmTERT (Figura 27) foi realizada como descrita anteriormente (tópico 3.1), e exigiu a escolha de um sgRNA e de duas regiões de homologia presentes no gene *LmTERT* (HR1 e HR2). É importante ressaltar que o gene *LmTERT* é consideravelmente grande (4.356 pb) (anexo 5) e contém sítios para algumas das principais enzimas de restrição (*HpaI*, *MfeI*, *XbaI* e *ApaI*) necessárias para a clonagem destes fragmentos. Os cassetes HR1 e HR2 (451 e 497 pb, respectivamente) foram escolhidos dentro do gene *TERT* de *L. major* em adição a uma sequência que será utilizada pela endonuclease Cas9, aqui denominada *Seed*, para realizar o corte e posterior indução do reparo da quebra do DNA, a qual foi definida também dentro do gene *LmTERT* (*LmjF.36.T3930*) utilizando-se a ferramenta *BLAST*. Esta sequência está localizada a 40 pb do local de delimitação da HR1 no pLS7-LmTERT (Figura 27) e foi assim escolhida por ser a sequência com menor homologia com outras regiões do genoma do parasito (*Leishmania major*, cepa *Friedlin* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN)). A Figura 27 mostra a localização dos cassetes HR1 e HR2 e da *Seed* no pLS7-LmTERT, além dos principais sítios para as enzimas de restrição e dos iniciadores usados durante as subclonagens.



**Figura 27.** Mapa do plasmídeo pLS7-LmTERT mostrando a posição dos cassetes TERT-HR1 e TERT-HR2 mais a posição das sequências U6snRNA, sgRNA, *Seed*, promotor do U6snRNA e os sítios para as principais enzimas de restrição e dos iniciadores usados para confirmar a subclonagem. Figura idealizada no programa SnapGene®, versão 3.2.1 (“SnapGene | Software for everyday molecular biology”, [s.d.]).

As HRs, assim como a *Seed*, foram sintetizadas e clonadas separadamente em plasmídeo pGEM-T pela empresa Genone, sendo que a HR1 juntamente com os sítios enzimáticos para a *HpaI* e *MfeI* foi denominada TERT-HR1, enquanto que o fragmento composto pela HR2 mais U6snRNA, sgRNA, a *Seed*, o promotor do U6snRNA e os sítios enzimáticos para a *XbaI* e *ApaI*, foi denominado de TERT-HR2 (Figuras 27 e 28-A). Tais fragmentos foram devidamente removidos para serem usados na construção do pLS7-LmTERT (tópico 3.17).

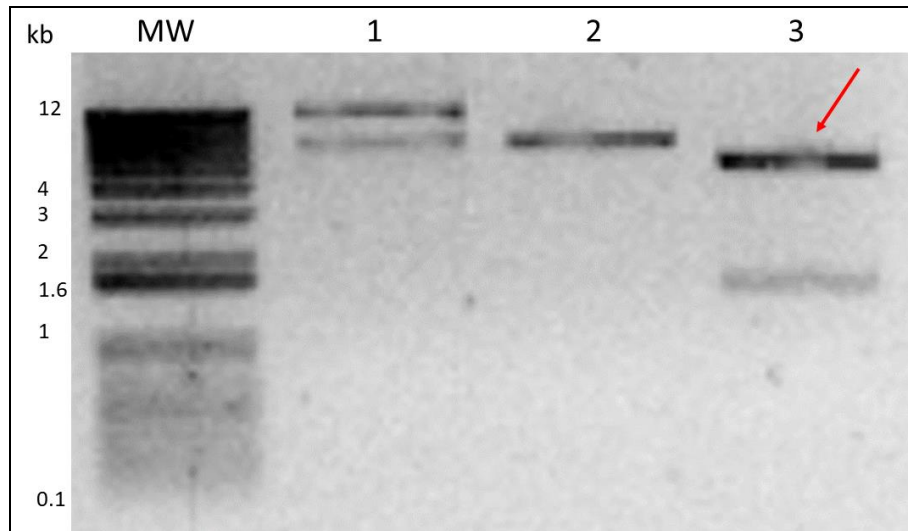


**Figura 28.** Mapa dos plasmídeos de clonagem contendo os fragmentos usados para montar o plasmídeo pLS7-LmTERT. **A-** fragmento TERT-HR1 de 455 bp; **B-** fragmento TERT-HR2 (HR2+U6snRNA+sgRNA+seed+promotor do U6snRNA) de 979 bp. Mapas idealizados no programa SnapGene®, versão 3.2.1.

#### 4.1.5.2. Subclonagem do fragmento HR2 no pLS6

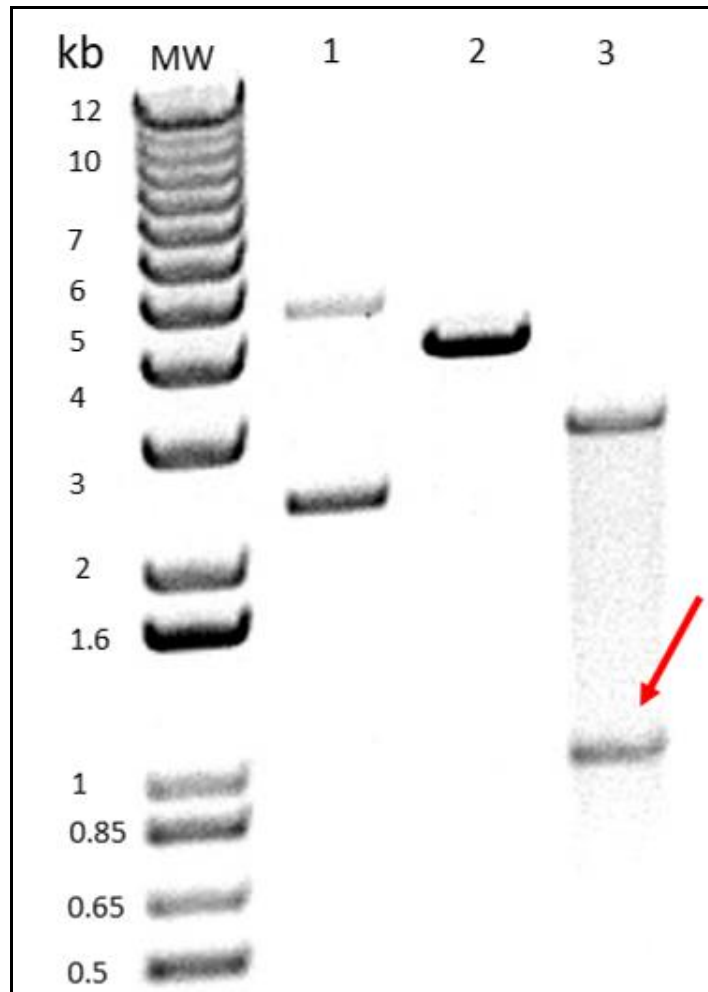
Com o intuito de montar o plasmídeo pLS7-LmTERT, os fragmentos TERT-HR1 e TERT-HR2 foram removidos dos vetores de clonagem e subclonados no

plasmídeo pLS6, como descrito no tópico 3.17. Primeiramente removeu-se o fragmento PFR2-HR2 do pLS6 por digestão dupla com as enzimas de restrição *XbaI* e *ApaI* e purificou-se em gel de agarose, o pLS6 ainda contendo o fragmento PFR2-HR1(Figura 29, linha 3).



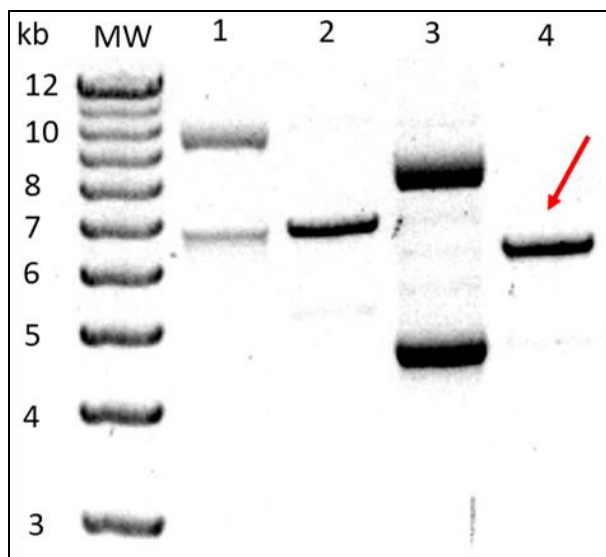
**Figura 29. Remoção do fragmento PFR2-HR1 do vetor pLS6.** Gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo. 1- pLS6 não digerido; 2- pLS6 digerido com *XbaI* (6,8 kb); 3- pLS6 digerido com *XbaI* e *ApaI*. A seta indica o fragmento de 5,2 kb, correspondente ao pLS6 sem o fragmento PFR2-HR1 (1,3 kb).

Em seguida realizou-se a remoção do fragmento TERT-HR2 do vetor de clonagem (pGEM-HR2) purificando-se o fragmento em gel de agarose (Figura 30, linha 3).



**Figura 30. Remoção dos fragmentos TERT-HR2 do pGEM-HR2.** Gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo. **1-** pGEM-HR2 não digerido; **2-** pGEM-HR2 linearizado com *XbaI*; **3-** liberação do fragmento TERT-HR2 (contendo HR2+U6snRNA+sgRNA+*Seed*+promotor do U6snRNA) do pGEM-HR2 (0.97 kb), após digestão com *XbaI* e *ApaI*.

O fragmento TERT-HR2 e o vetor pLS6 foram então ligados. Como mostrado na Figura 31 (linha 4), o plasmídeo agora denominado pLS6-HR2 apresenta como esperado, peso molecular de 6.1kb.



**Figura 31. Confirmação da clonagem do fragmento TERT-HR2 no pLS6.** Gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo. 1- pLS6 não digerido; 2- pLS6 linearizado com *XbaI* contendo o fragmento PFR2-HR1 (6,8kb); 3- pLS6-HR2 não digerido; 4- pLS6-HR2 linearizado com *XbaI* (6,1 kb).

Para confirmar a clonagem do fragmento TERT-HR2 no pLS6, DNA plasmidial pLS6-HR2 foi sequenciado pelo método Sanger (Anexo 3). O alinhamento múltiplo da sequência TERT-HR2 por BLAST confirmou o sucesso da subclonagem (Figura 32). Assim, esse plasmídeo passou a ser efetivamente denominado pLS6-HR2.

NCBI Blast: GTTGCSGGGCCYTGCGSCTTTTTATCMAGCACTTCATTCGCACGATGCAA... <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?CMD=Get&RID=PZPGBKZB016>

**Descriptions**  
Sequences producing significant alignments:

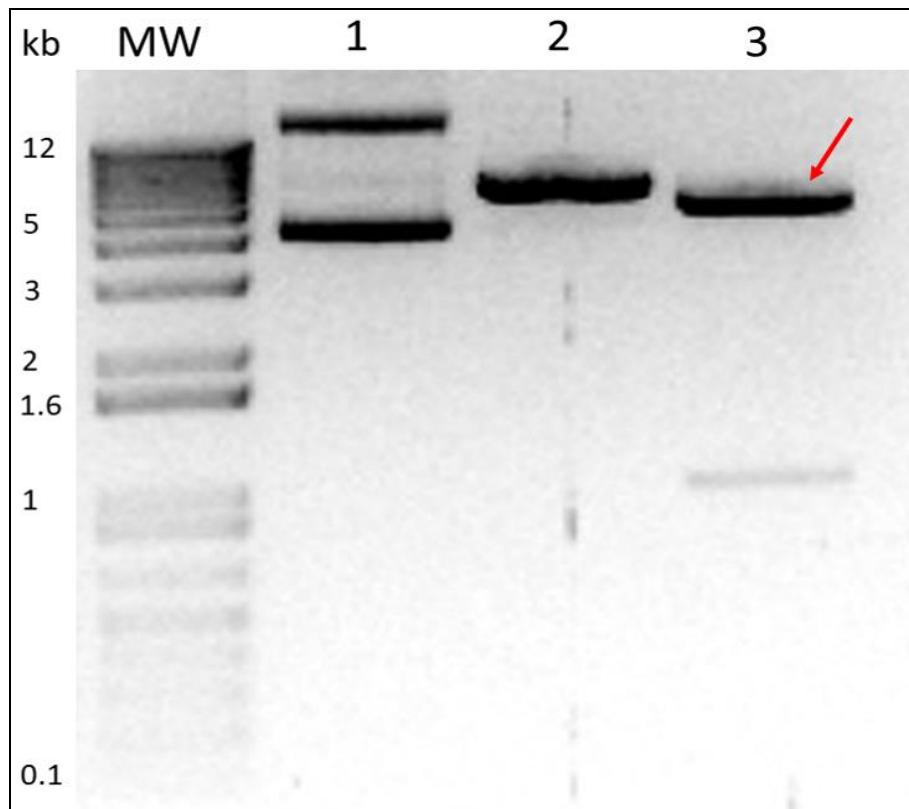
Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Leishmania major strain Friedlin complete genome, chromosome 36	778	923	56%	0.0	99%	<a href="#">FR796432.1</a>
Leishmania major strain Friedlin putative telomerase reverse transcriptase partial mRNA	774	774	47%	0.0	99%	<a href="#">XM_001686924.1</a>
Leishmania donovani strain MHOM/IN/1983/AG83 isolate late passage chromosome 36 sequence	562	702	56%	6e-156	90%	<a href="#">CP019545.1</a>
Leishmania donovani strain MHOM/IN/1983/AG83 isolate early passage chromosome 36 sequence	562	702	56%	6e-156	90%	<a href="#">CP018604.1</a>
Leishmania donovani BPK282A1 complete genome, chromosome 36	562	702	56%	6e-156	90%	<a href="#">FR799623.2</a>
Leishmania infantum JPCM5 genome chromosome 36	562	702	56%	6e-156	90%	<a href="#">FR796468.1</a>
Leishmania donovani telomerase reverse transcriptase, putative (LDBPK_384120) mRNA, complete cds	558	558	47%	8e-155	90%	<a href="#">XM_003865478.1</a>
Leishmania infantum JPCM5 putative telomerase reverse transcriptase partial mRNA	558	558	47%	8e-155	90%	<a href="#">XM_001468585.1</a>
Leishmania amazonensis telomerase reverse transcriptase (TERT) gene, complete cds	532	532	47%	5e-147	89%	<a href="#">AY232307.1</a>

**Figura 32. Alinhamento múltiplo por BLAST da sequência de nucleotídeos do fragmento TERT-HR2 clonado no pLS6-HR2.**

#### **4.1.5.3. Subclonagem do fragmento TERT-HR1 no pLS6-HR2 e finalização da construção do plasmídeo pLS7-LmTERT**

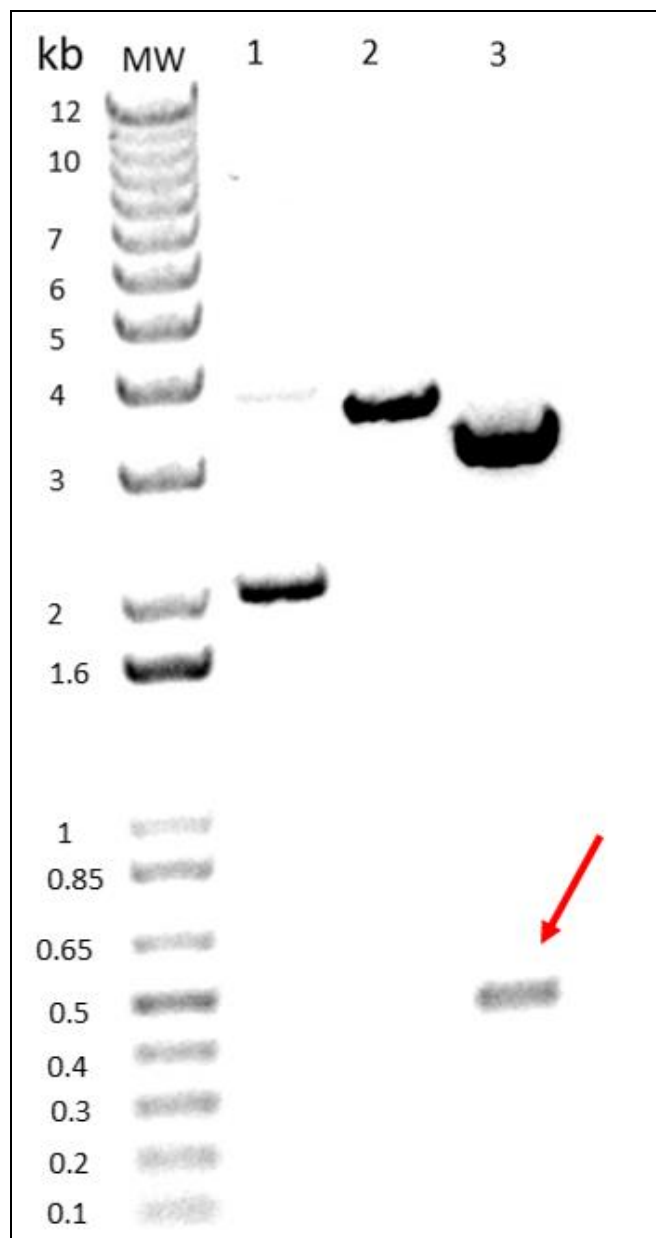
O fragmento TERT-HR1 deveria ser removido do pGEM-HR1 e subclonado no pLS6-HR2 utilizando as enzimas *HpaI* e *MfeI*, como descrito por Sollelis *et al.*, (2015), contudo, depois de inúmeras tentativas falhas, optamos por utilizar a enzima *SacI* em substituição a enzima *HpaI* tendo em vista que esta última gera extremidades abruptas, consideradas mais difíceis para a realização da ligação *in vitro* entre inserto e plasmídeo. O motivo de utilizarmos a enzima *SacI* é que ambos os plasmídeos (pLS6-HR2 e pGEM-HR1) apresentam o sítio para a enzima *SacI* muito próximo do sítio para a enzima *HpaI* (Figura 27 e Figura 28-A), outro motivo é que a *SacI* produz extremidades adesivas o que facilita a reação de ligação *in vitro* entre inserto e plasmídeo.

Assim sendo, o plasmídeo pLS6-HR2 foi digerido com ambas enzimas com a finalidade de remover o fragmento PFR2-HR2 para posterior inserção, na mesma posição, do fragmento TERT-HR1 (Figura 33, linha 3). Em seguida, o fragmento digerido correspondendo ao plasmídeo pLS6-HR2 sem o fragmento PFR2-HR2 foi retirado do gel e purificado para ser utilizado na subclonagem do fragmento TERT-HR1.



**Figura 33. Remoção do fragmento PFR2-HR2 do pLS6-HR2.** Gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo. 1- pLS6-HR2 não digerido; 2- pLS6-HR2 digerido com *MfeI* (6,1 kb); 3- pLS6-HR2 digerido com *MfeI* e *SacI*. A seta indica o fragmento de 5,1 kb, correspondente ao pLS6-HR2 sem o fragmento PFR2-HR2 (1,1 kb).

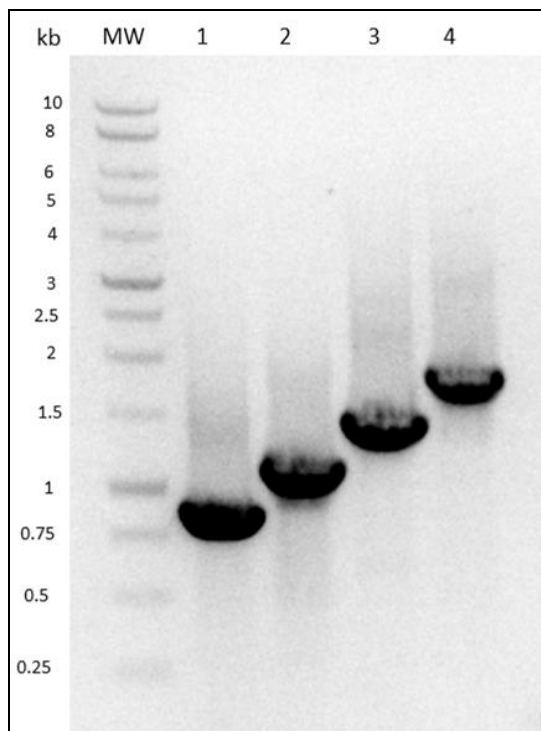
O passo seguinte consistiu na remoção do fragmento TERT-HR1 clonado no vetor pGEM-T (Figura 28-A), o qual foi removido por dupla digestão utilizando as enzimas *MfeI* e *SacI*, como mostrado na Figura 34 (linha 3). A banda correspondente a este fragmento, de 0.5 kb, foi cortada do gel de agarose e purificada para ser ligada ao plasmídeo pLS6-HR2.



**Figura 34. Remoção do fragmento TERT-HR1 do pGEM-HR1.** Gel de agarose 0.8% corado com brometo de etídeo. 1- pGEM-HR1 não digerido; 2- pGEM-HR1 linearizado com *HpaI*; 3- liberação do fragmento TERT-HR1 do pGEM-HR1 (0.5 kb) após digestão com *SacI* e *MfeI*.

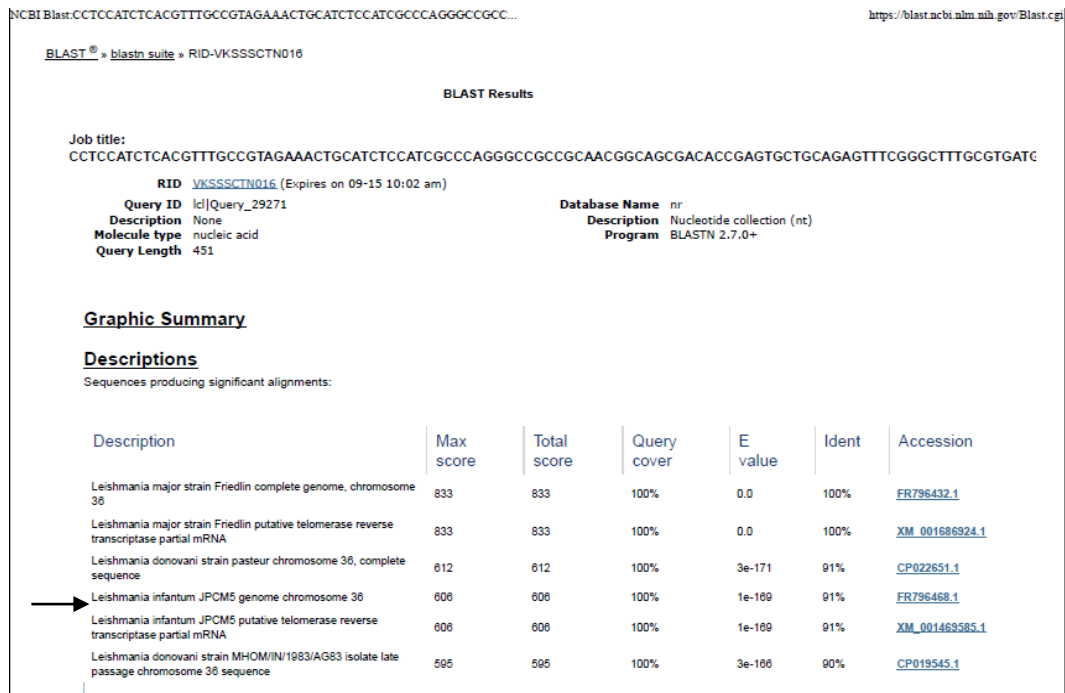
O fragmento TERT-HR1 e o vetor pLS6-HR2 foram então ligados, resultando no plasmídeo pLS7-LmTERT, usado para eletroporar *E. coli* (cepa Top10) como descrito no tópico 3.17. A confirmação da clonagem correta dos fragmentos foi realizada por meio de reação de PCR para amplificação das regiões HRs, tanto do plasmídeo pLS7-LmTERT (Figura 35, linhas 1 e 2) quanto do pLS6 (Figura 35, linhas 3 e 4), sendo que, a combinação de iniciadores utilizadas para amplificar estas regiões foi

a mesma para ambos os plasmídeos: para amplificar a região TERT-HR1 e PFR2-HR2, foram utilizados os iniciadores M13-F e DHFR-R e, para amplificar a região TERT-HR2 e PFR2-HR1, os iniciadores T7-R e o DHFR-F (Figura 27 e anexo 1).



**Figura 35. Comprovação da clonagem de TERT-HR1 no pLS6, finalizando a construção do plasmídeo pLS7-LmTERT.** Produtos de reação de PCR utilizando iniciadores específicos foram fracionados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídeo. **MW**- marcador molecular 1 kb Plus (Invitrogen); **1**- Região TERT-HR1 do pLS7-LmTERT (0.87 kb); **2**- Região TERT-HR2 do pLS7-LmTERT (1.1 kb); **3**- Região PFR2-HR2 do pLS6 (1.4 kb); **4**- Região PFR2-HR1 do pLS6 (1.8 kb).

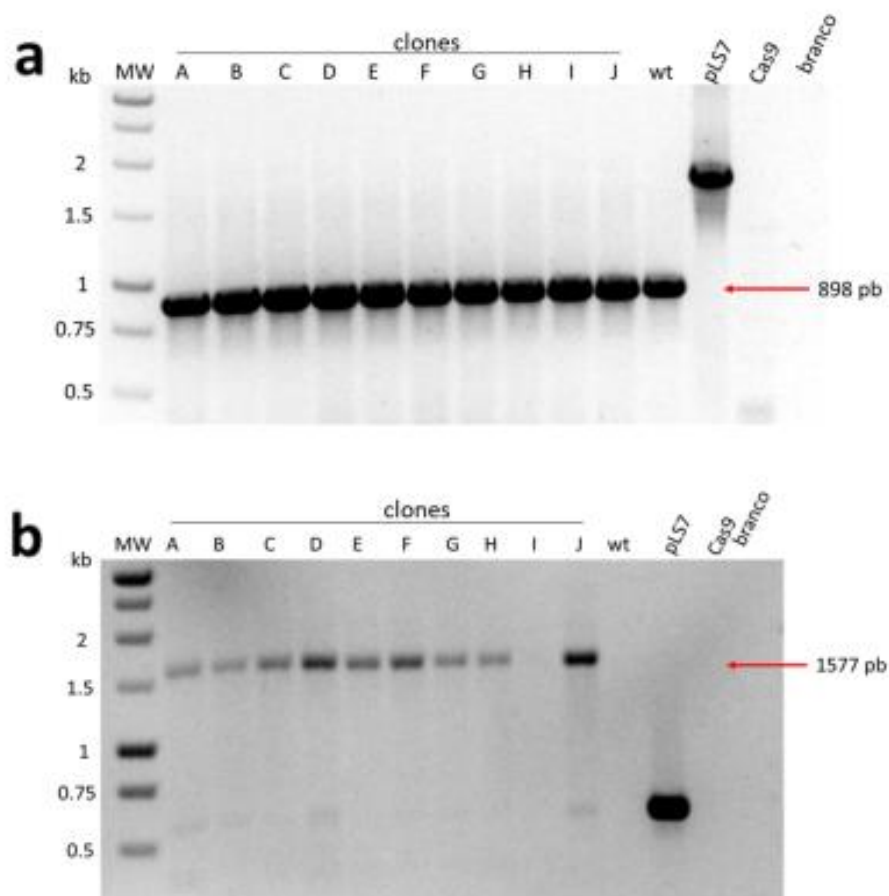
A subclonagem do fragmento TERT-HR1 no pLS6-HR2 também foi confirmada por sequenciamento Sanger (Figura 36). Desta forma, o plasmídeo pLS7-LmTERT foi obtido, permitindo dar continuidade aos ensaios.



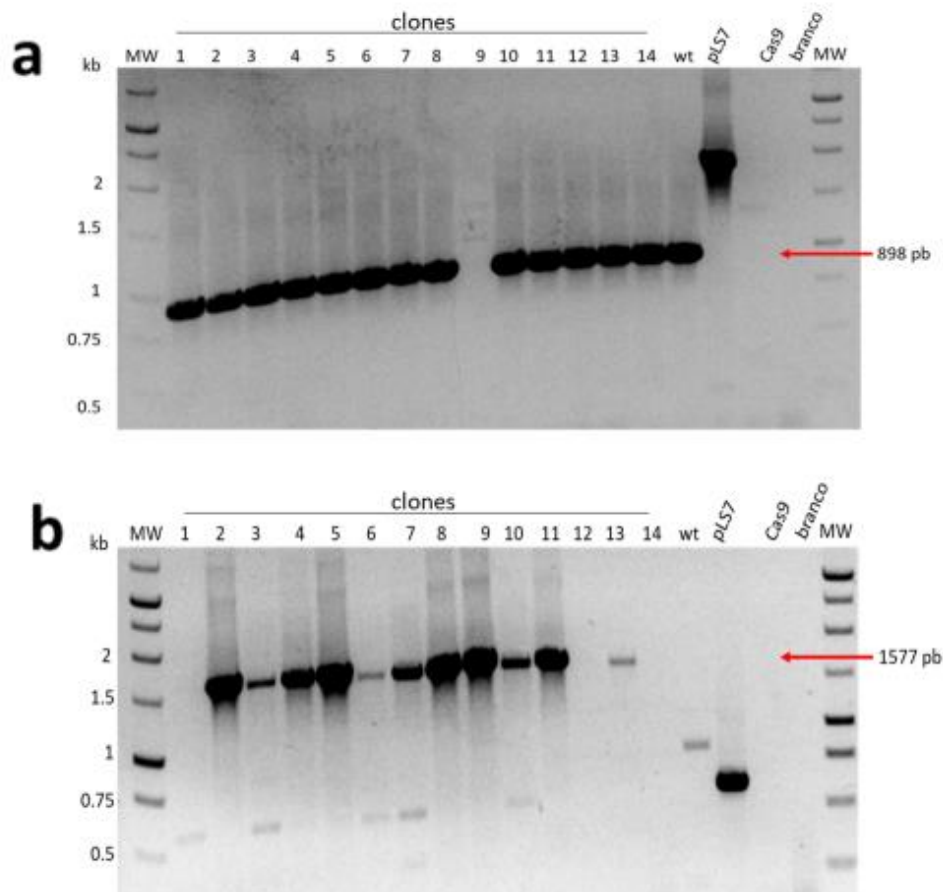
**Figura 36.** Alinhamento múltiplo por BLAST da sequência de nucleotídeos do fragmento TERT-HR1 clonado no pLS7-LmTERT.

#### 4.1.6. Obtenção e confirmação de clones puros CRISPRs

Uma vez obtido o plasmídeo pLS7-LmTERT, como descrito anteriormente, e os clones CRISPRs, como descrito no tópico 3.7, o passo seguinte consistiu em caracterizar os clones CRISPRs por meio de PCR, com descrito no tópico 3.11. Assim, obteve-se aparentemente apenas um clone, dos 72 analisados, em que os homólogos do gene *LmTERT* foram editados (sem banda para *LmTERT* +), o clone 9 (Figura 38), e 4 clones confirmados como TERT +/+ (não possuem a versão mutada do gene da TERT), sendo eles o clone I, na primeira transfecção, e os clones 1, 12 e 14, na segunda (Figuras 37 e 38). Observou-se ainda, 20 clones, confirmados como TERT +/- (hemizigóticos), sendo eles os clones A, B, C, D, E, F, G, H e J, na primeira transfecção, e os clones 1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 e 13, na segunda. O DNA obtido para as PCRs dos clones do primeiro e do segundo evento de transfecção se deu por meio de extração de DNA genômico usando tampão TELT (tópico 3.8).



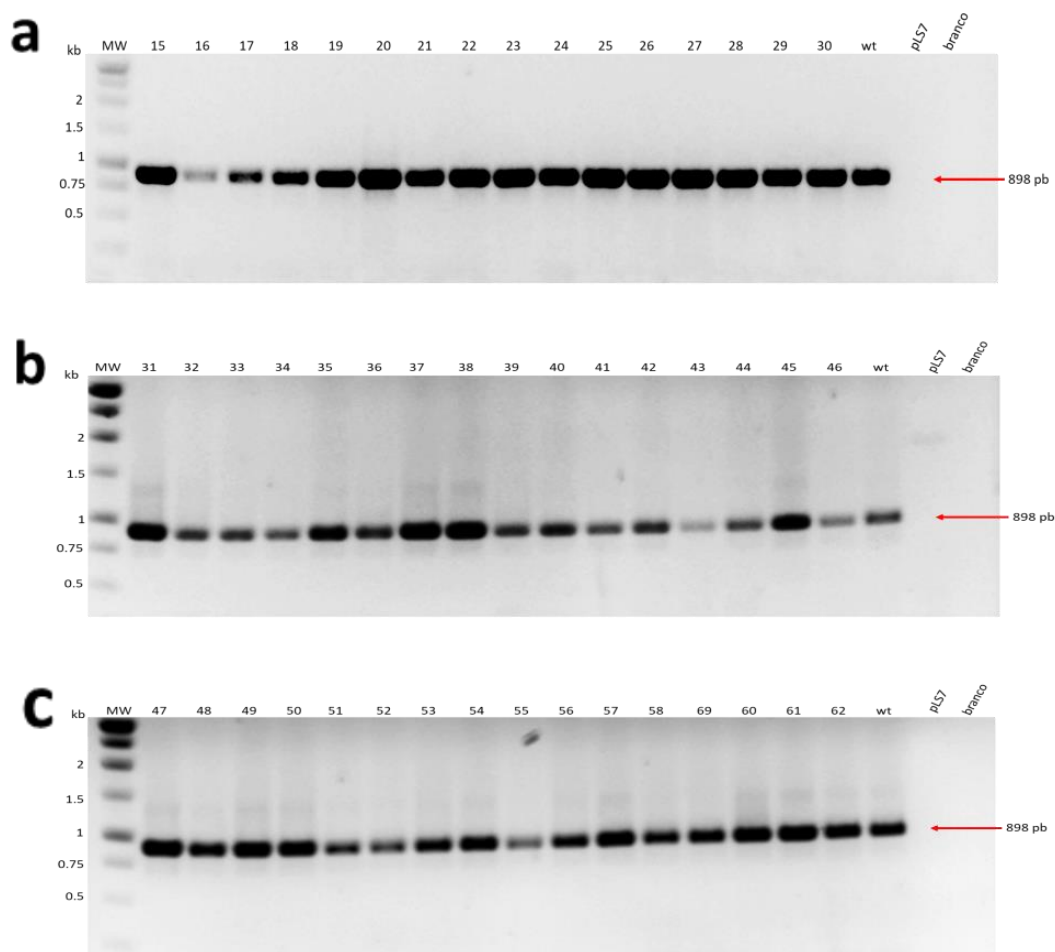
**Figura 37.** PCR para validação de 10 clones (A-J) obtidos da primeira transfecção: **a-** Produtos de PCR obtidos da amplificação do fragmento de 898 bp do gene *LmTERT* usando o conjunto de iniciadores III (anexo 1). **b-** Produtos de PCR obtidos da amplificação do fragmento de 1.577bp usando o conjunto de iniciadores IV (anexo 1), que corresponde ao cassete contendo o gene que confere resistência a puomicina inserido no locus do gene *LmTERT* no cromossomo 36. Como controle foi usado um clone selvagem (wt), o qual passou pelos mesmos processos de transfecção e seleção dos outros clones, e o plasmídeo pLS7-*LmTERT* e pTCAS9.



**Figura 38.** PCR para validação de 10 clones (A-J) obtidos da primeira transfecção: **a-** Produtos de PCR obtidos da amplificação do fragmento de 898 bp do gene *LmTERT* usando o conjunto de iniciadores III (anexo 1). **b-** Produtos de PCR obtidos da amplificação do fragmento de 1.577bp usando o conjunto de iniciadores IV (anexo 1), que corresponde ao cassete contendo o gene que confere resistência a puromicina inserido no lócus do gene *LmTERT* no cromossomo 36. Como controle foi usado um clone selvagem (wt), o qual passou pelos mesmos processos de transfecção e seleção dos outros clones, e o plasmídeo pLS7-*LmTERT* e pTCAS9.

A análise dos 48 clones restantes (terceira transfecção), surgiu como uma última tentativa de se obter, além do clone 9, outros clones TERT<sup>-/-</sup>. Para isso, realizou-se PCR apenas para checar a presença de um dos alelos selvagens do gene *LmTERT* (Figura 39), pois como mencionado no tópico 3.11, a presença da banda para o gene selvagem excluiria automaticamente aqueles clones que não são nocautes (TERT<sup>-/-</sup>). Para esta análise utilizou-se lisado celular como fonte de DNA para as PCRs, como descrito no tópico 3.10, onde resumidamente uma pequena quantidade de células (no máximo

300,000 células) foram lisadas e usadas diretamente para as PCRs sem passar pelos processos de extração química do DNA (ver tópico 3.10 para mais informação).



**Figura 39.** PCR para validação de 48 clones do terceiro evento de transfecção: Produtos de PCR obtidos da amplificação do fragmento de 898 bp do gene *LmTERT* usando o conjunto de iniciadores III (anexo 1). **a-** clones 15 a 30, **b-** clones 31 a 46 e **c-** clones 47 a 62. Como controle foi usado um clone selvagem (wt), o qual passou pelos mesmos processos de transfecção e seleção dos outros clones, e o plasmídeo pLS7-*LmTERT*.

Dessa forma, determinou-se que todos os clones CRISPRs da terceira transfecção apresentam pelo menos uma cópia da versão selvagem do gene *LmTERT* (Figuras 39-a; 39-b e 39-c) ou seja nenhum desses clones é nocaute (*TERT*  $-/-$ ), a imagem do clone 9. Aqui vale ressaltar que o controle wt (tipo selvagem), é um clone puro do tipo selvagem, isto implica em dizer que passou pelos mesmos processos de

transfecção e seleção dos outros clones com o diferencial de que não foi utilizado plasmídeos e nem fármacos em sua seleção.

Assim como observado por Sollelis et al (2015), cujo trabalho foi usado como base para se realizar este projeto, a existência de uma população de clones com genótipo misto sugere fortemente que a eficiência da metodologia CRISPR-Cas9 não é de 100%, usando esse sistema, sendo que os mesmos levantam dois pontos como prováveis causadores dessa incompleta eficiência: (i) o nível de expressão da endonuclease Cas9 poderia estar sendo heterogêneo na população, com algumas células tendo alta e outras tendo baixa expressão da enzima; (ii) a transcrição do sgRNA, a partir do pLS7, poderia estar sendo fraca em decorrência da utilização de promotores U6snRNA e sequências terminadoras mínimas (SOLLELIS et al., 2015).

Outro ponto para o qual Sollelis et al (2015) chama a atenção é para o fato de células não editadas (como em nosso caso os clones I, 1, 12 e 14 que são TERT +/+;) tenha sido capazes de resistir à seleção por puromicina, sendo a principal suspeita relacionada a presença de algum plasmídeo pLS7 na forma circular ou a inserção randômica do gene de resistência a puromicina em outros locais do genoma. Um ponto a se contrastar com o trabalho de Sollelis et al (2015) é que o pLS7 usado em suas transfecções foi linearizado por enzima de restrição *ScaI* e a linearização verificada em gel de agarose ao passo que o pLS7 usado neste trabalho (pLS7-LmTERT) foi usado na forma circular (SOLLELIS et al., 2015). Isso poderia aumentar a possibilidade de se observar clones capazes de sobreviver a seleção por puromicina sem que o gene de interesse tenha sido editado.

Um trabalho realizado por Beneke et al (2017), para edição gênica em tripanosomatídeos incluindo *L. major*, usando o sistema CRISPR-Cas9, traz alguns diferenças e refinamento da técnica para obtenção de células nocaute (-/-) para um gene de interesse. Resumidamente, o sistema em questão faz uso de promotores para T7 RNA Polimerase (RNA polimerase de bacteriófago) para expressão do sgRNA no interior do parasito sendo que o gene para a expressão dessa polimerase no parasito está inserido no mesmo plasmídeo usado para expressão da Cas9 (pTB007). Além disso, os fragmentos de DNA necessários para a recombinação homóloga, assim como a própria sequência de DNA usada pra transcrição do sgRNA pela T7 RNA Polimerase, são gerados in vitro por meio de PCR de uma forma fácil e modular a ponto de ser possível oferecer “moldes” de sgRNA para mais de um gene simultaneamente bem como

fragmentos de DNA, para recombinação homóloga, com variados tipos de marcadores de seleção. O uso de mais de um marcador de seleção nessa abordagem permite saber a curto prazo se um gene é ou não vital para a sobrevivência de um organismo (BENEKE et al., 2017).

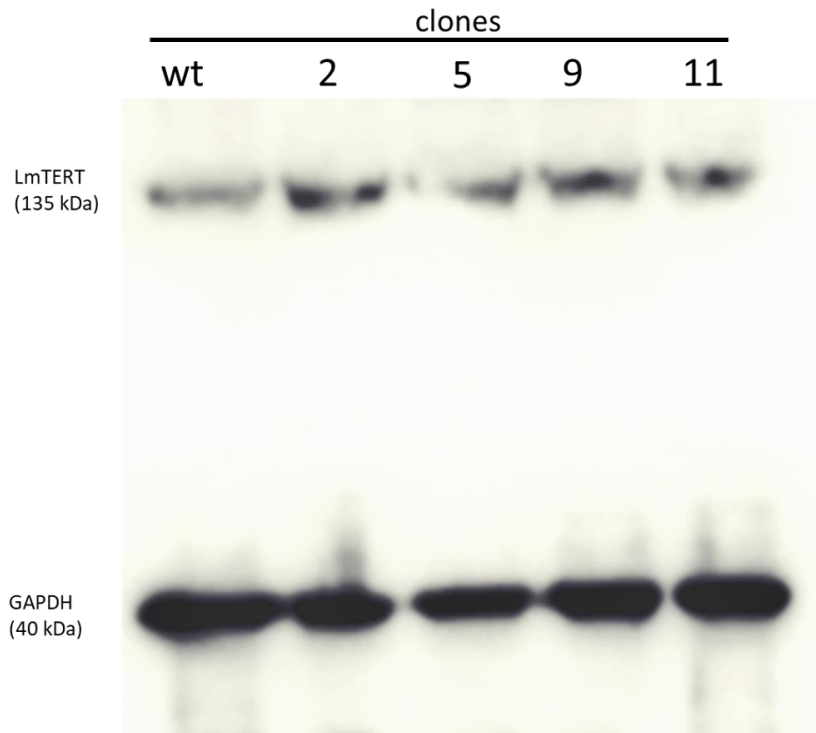
A abordagem de Beneke et al (2017) promete resolver três questões presentes na abordagem de Sollelis et al (2015): (i) a presença de plasmídeos na forma circular, com gene de resistência ao fármaco usado na seleção dos clones (pLS7), uma vez que o marcador de seleção estará em um fragmento de amplificação de PCR; (ii) o uso de promotor de baixa eficiência para expressão do sgRNA já que nesse caso o sgRNA tem um promotor de polimerase usada especificamente para sua expressão (T7 RNA Polimerase); (iii) impossibilidade de se saber, com certeza, o quão vital é um gene para o organismo, tendo em vista que a geração rápida de fragmentos de DNA, para as recombinações homólogas, com variados marcadores de seleção permite selecionar apenas clones com edição em todos os alelos do gene de interesse.

Um último ponto, a chamar a atenção neste trabalho, é que somente o clone 9, em meio a tantos selecionados, sofreu edição dos dois alelos do gene *LmTERT* (Figura 38). Daqui se conclui que ou a metodologia descrita por Sollelis et al (2015) não é completamente eficiente para gerar clones CRISPR nocaute, como exposto pelo mesmo, ou que a perda dos dois alelos do gene *LmTERT* seja letal para o parasito, sendo que ambas as suposições não são mutuamente exclusivas.

Para dar continuidade a caracterização desses clones, foram escolhidos um total de 4 clones do segundo evento de transfeção, sendo 3 heminocautes TERT +/- (clones 2, 5 e 11), o único clone nocaute TERT -/- (clone 9) mais um clone selvagem (clone wt), para um estudo mais detalhado do efeito da edição de alelos da TERT nesses clones.

#### **4.1.7. Análise por Western blot, da expressão da proteína LmTERT, nos clones CRISPRs**

Afim de observar a expressão da proteína TERT nos clones CRISPRs, em especial no clone 9, realizou-se Western blot desses clones (Figura 40) na passagem 4 (p4) como descrito no tópico 3.15.



**Figura 40** Western blot de 5 clones CRISPRs (wt, 2, 5, 9 e 11) da passagem 4 (p4), usando proteína endógena GAPDH (40kDa) como controle interno.

O resultado do Western blot, dos 5 clones CRISPRs (Figura 40), foi uma grande surpresa no que se refere ao clone 9, tendo em vista que, como descrito no tópico anterior, este clone apresenta os dois alelos *LmTERT* (*TERT*  $-/-$ ) editados, como confirmada por meio de PCR. Porém, este expressa a proteína LmTERT como mostrado no ensaio de Western blot (Figura 40). Isso lançou sobre os trabalhos realizados uma grande dúvida no que se refere a contaminação das PCRs e da cultura do clone 9, usada na obtenção do extrato proteico para o Western blot.

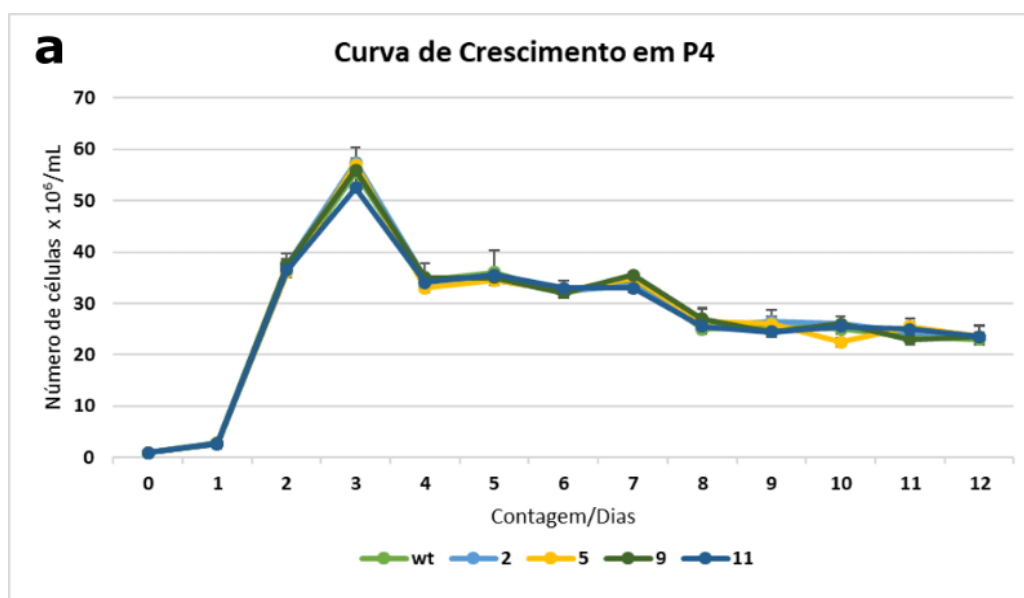
Assim, precisou-se realizar novamente alguns experimentos (dados não mostrados) tomando-se os devidos cuidados com relação a contaminações, logo, realizou-se as PCRs de todos os clones da segunda transfecção, como descrito no tópico 3.11, na qual o clone 9 foi encontrado, e obteve-se o mesmo resultado para todos os clones, incluindo o clone 9, ou seja, o gene *LmTERT* não pode ser identificado, por PCR, no genoma do clone 9.

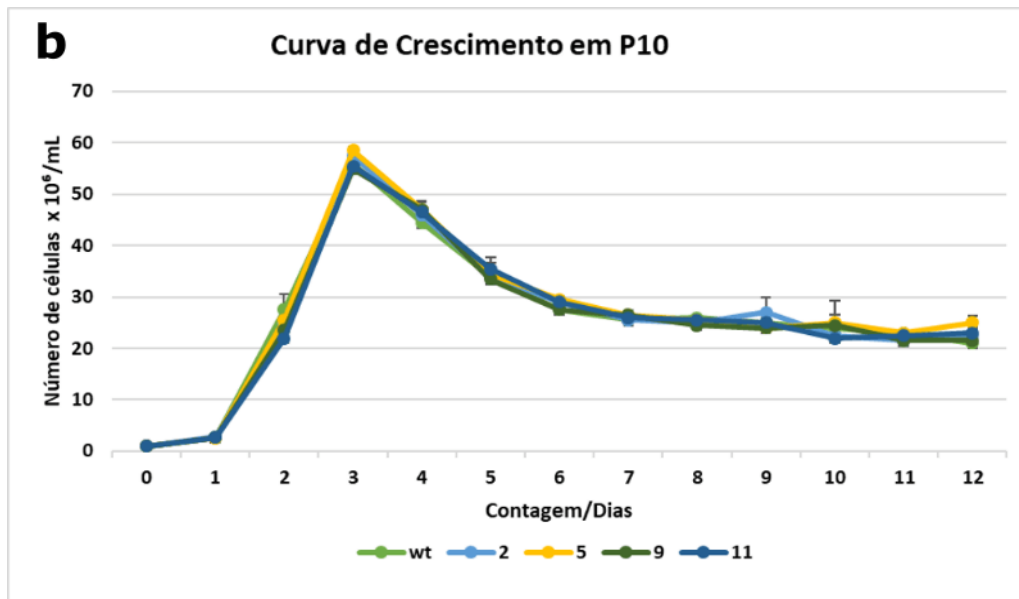
A repetição do Western blot também continuou mostrando que o clone 9 expressa a LmTERT mesmo utilizando outros extratos proteicos, sugerindo que o clone 9 não é nocaute para LmTERT. Mais análises precisariam ser feitas para se determinar o

verdadeiro genótipo deste clone, como por exemplo, Southern blot de DNA genômico ou de cromossomos do parasito separados por eletroforese de campo pulsado (PFGE), usando como sondas um fragmento do gene *LmTERT* e o fragmento do gene que confere resistência a puromicina, o que permitiria determinar, com certeza, se ocorreu ou não edição no locus *LmTERT*, se houve algum tipo de duplicação do gene *LmTERT* ou se o clone 9 é resultado de um artefato da técnica.

#### 4.1.8. Curva de crescimento dos clones CRISPRs

Com os clones puros escolhidos (tópico 4.1.6), o passo seguinte consistiu na realização de curvas de crescimentos desses clones, como descrito no tópico 3.13, afim de ser observar a presença ou ausência de alterações na taxa de crescimento dos parasitos com locus *LmTERT* editado. Considerando que o tamanho dos telômeros (números de repetições teloméricas) influencia diretamente a capacidade proliferativa das células e que a perda das repetições é proporcional ao número de divisões celulares (DREESEN; CROSS, 2006; GIARDINI et al., 2014), foram obtidas curvas de crescimento de parasitos que acumularam diferentes números de duplicações celulares (Figura 41). Neste ensaio, os clones CRISPRs usados estavam em passagens 4 e 10 (p4 e p10), ou seja, com ~148 e ~190 duplicações populacional, respectivamente





**Figura 41.** Curva de crescimento de clones CRISPR (wt, 2, 5, 9 e 11), em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino. A quantidade de parasitos/mL foi determinada por contagem a cada 24h, ao longo de 12 dias consecutivos, em câmara de Neubauer. **a-** curva de crescimento dos clones CRISPRs na passagem 4 (p4) e **b-** curva de crescimento dos clones CRISPRs na passagem 10 (p10). As barras representam os desvios padrões.

Normalmente, as curvas de crescimento são realizadas contando os parasitos diariamente por 5 a 7 dias consecutivos, porém, após cerca de 4-5 dias de cultivo em cultura, uma parte das formas promastigotas proliferativas ( $\pm 10\%$ ) começa a se transformar na forma infectiva metacíclica não proliferativa (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; MALLINSON; COOMBS, 1989). Sendo assim, culturas de *L. major* crescidas por um período maior que 7 dias serão compostas, na sua maioria, por formas promastigotas estacionárias e promastigotas metacíclicas (não proliferativa) (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; MALLINSON; COOMBS, 1989). A proposta foi verificar diferenças relacionadas ao: (i) crescimento celular nas fases exponencial, dias 0, 1, 2 e 3 (Figuras 41-a e 41- b); (ii) ao número de células em culturas ao se atingir o ponto máximo (ponto da curva de crescimento que representa o maior número de células em cultura), no terceiro dia, assim como o tempo para se alcançar esse ponto; (iii) ao tempo para as culturas entrarem na fase estacionária das curvas.

Foi possível observar que todos os clones analisados, incluindo o clone 9 (provável TERT -/-), não apresentam nenhuma diferença significativa no crescimento e nem nas fases da curva, quando comparados com o clone wt, em nenhuma das duas passagens analisadas (Figura 41). Isso nos leva a pressupor que a presença de uma única

cópia do gene *LmTERT* é mais que suficiente para permitir uma taxa de crescimento normal do parasito ou que a ausência de uma cópia desse gene não tem implicações visíveis na taxa de crescimento de *L. major*. Desta forma, pretende-se futuramente observar o comportamento dos mesmos após muitas duplicações celulares (p20 ou p50).

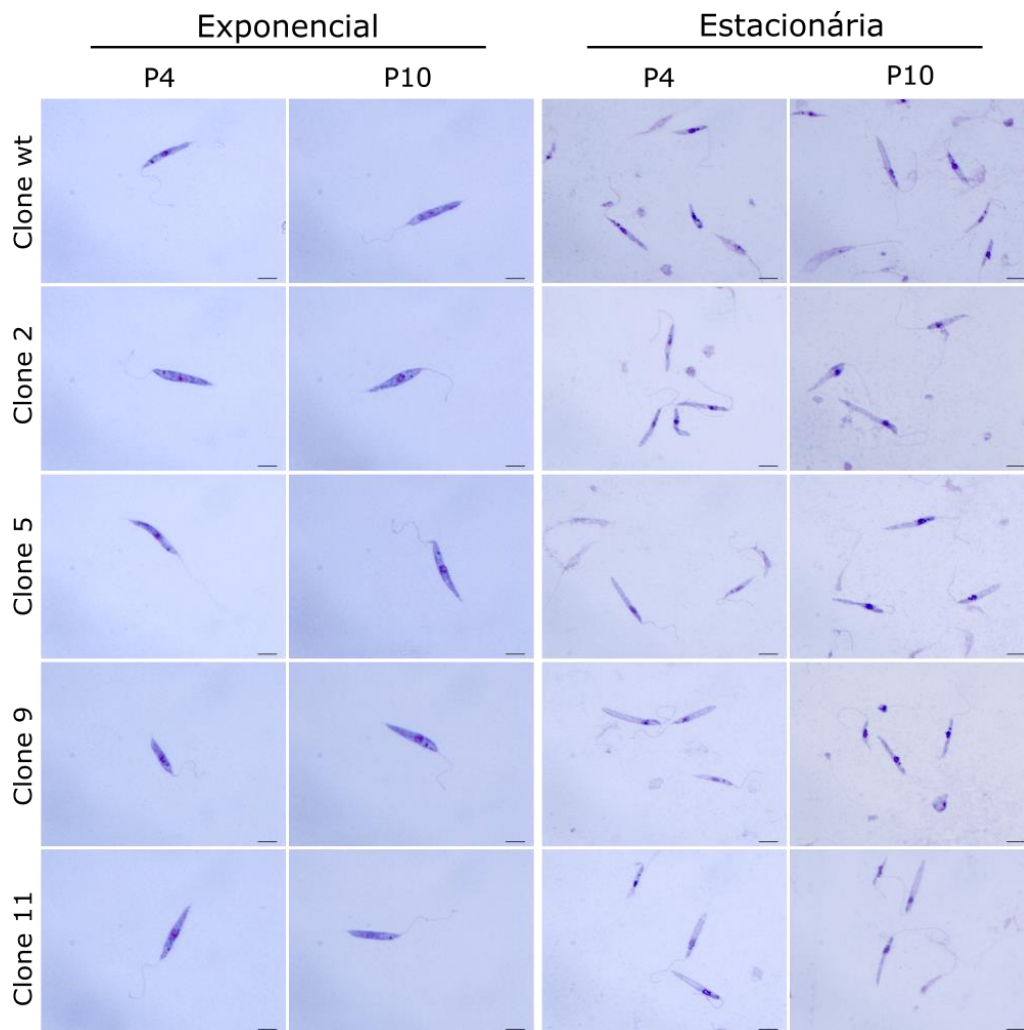
Dreesen e Cross (2006) demonstraram que formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*, nocaute para o gene *TERT* (*TERT* -/-), podem ser mantidos em cultura por um longo período (1 a 2,5 anos) sem alterações visíveis de sua taxa de duplicação. Além disso, eles observaram que o encurtamento significativo dos telômeros (40-200 pb), cujo tamanho médio normalmente está em torno de 15 kb e tendo uma taxa de perda de 3-6 pb por divisão celular, só foi visível depois de 2,5 anos dos parasitos em cultura. No entanto, tal encurtamento não causou nenhum efeito detectável de proliferação ou viabilidade celular, pois sem a telomerase esses parasitos utilizaram mecanismo alternativos para estabilizar os telômeros (DREESEN; CROSS, 2006; MUÑOZ-JORDÁN et al., 2001). Isso abre precedente para supormos que em *Leishmania*, a perda de repetições teloméricas pode não causar efeitos visíveis até que tal perda torne-se drástica. E se considerarmos que todos os clones CRISPRs obtidos são heminocautes (*TERT* +/-), essa perda de repetições pode nem mesmo vir à acontecer, embora não saibamos se uma única cópia do gene *LmTERT* é suficiente para manter o fenótipo do organismo.

#### **4.1.9. Análise morfológicas dos clones CRISPRs**

A presença de possíveis alterações morfológicas nos clones CRISPRs foi observada por meio da confecção de lâmina coradas com Giemsa (Figura 42), como descrito no tópico 3.18. Parasitos de duas passagens (p4 e p10), em fase exponencial e em fase estacionária de crescimento, foram isolados e analisados por microscopia ótica. Os resultados mostram que nenhuma alteração morfológica foi observada nesses parasitos e que os parasitos heminocaute (+/-) e nocaute (-/-) para o gene *LmTERT*, em fase exponencial, mantém sua capacidade de entrar em fase estacionária *in vitro*.

Portanto, a ausência parcial ou total do *LmTERT* não provoca, aparentemente, alterações morfológicas e nem altera a capacidade proliferativa desses organismos *in vitro*. Formas procíclicas de *T. brucei*, nocaute para *TERT* também não mostraram

evidentes alterações de crescimento e morfológicas nas primeiras 4 a 5 semanas após o nocaute do *TERT* e até 1 ano ou 2,5 anos, após sucessivas duplicações populacionais in vitro, embora tenham apresentado diferentes tipos de aberrações genômicas e encurtamento de telômeros (DREESEN; CROSS, 2006; DREESEN; LI; CROSS, 2005).

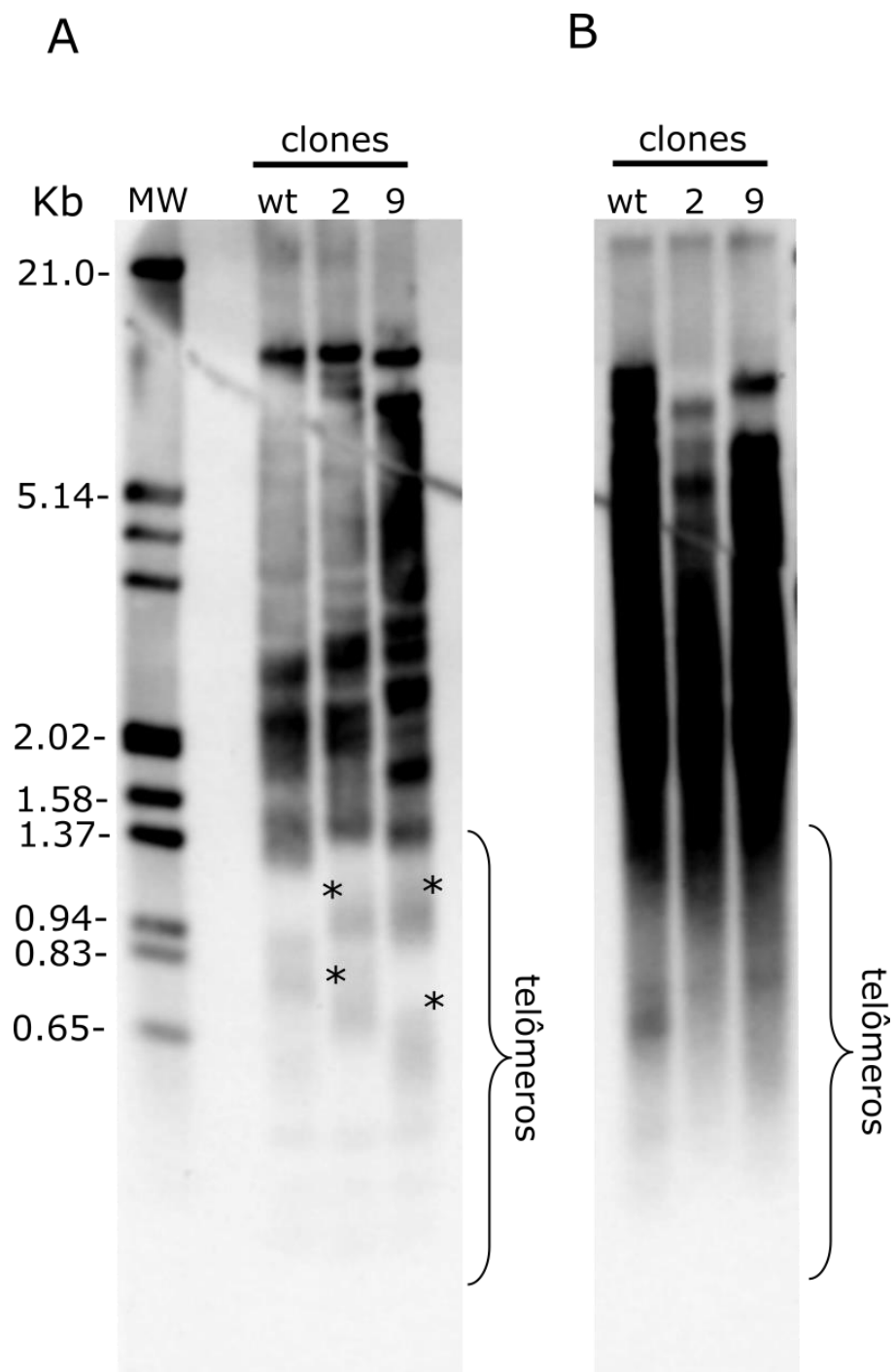


**Figura 42.** Prancha de lâminas de Giemsa de 5 clones CRISPRs (wt, 2, 5, 9 e 11) na passagem 4 (p4) e passagem 10 (p10) em fase exponencial (com 3 dias de cultivo) e fase estacionária (com 12 dias de cultivo). Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 3 $\mu$ m.

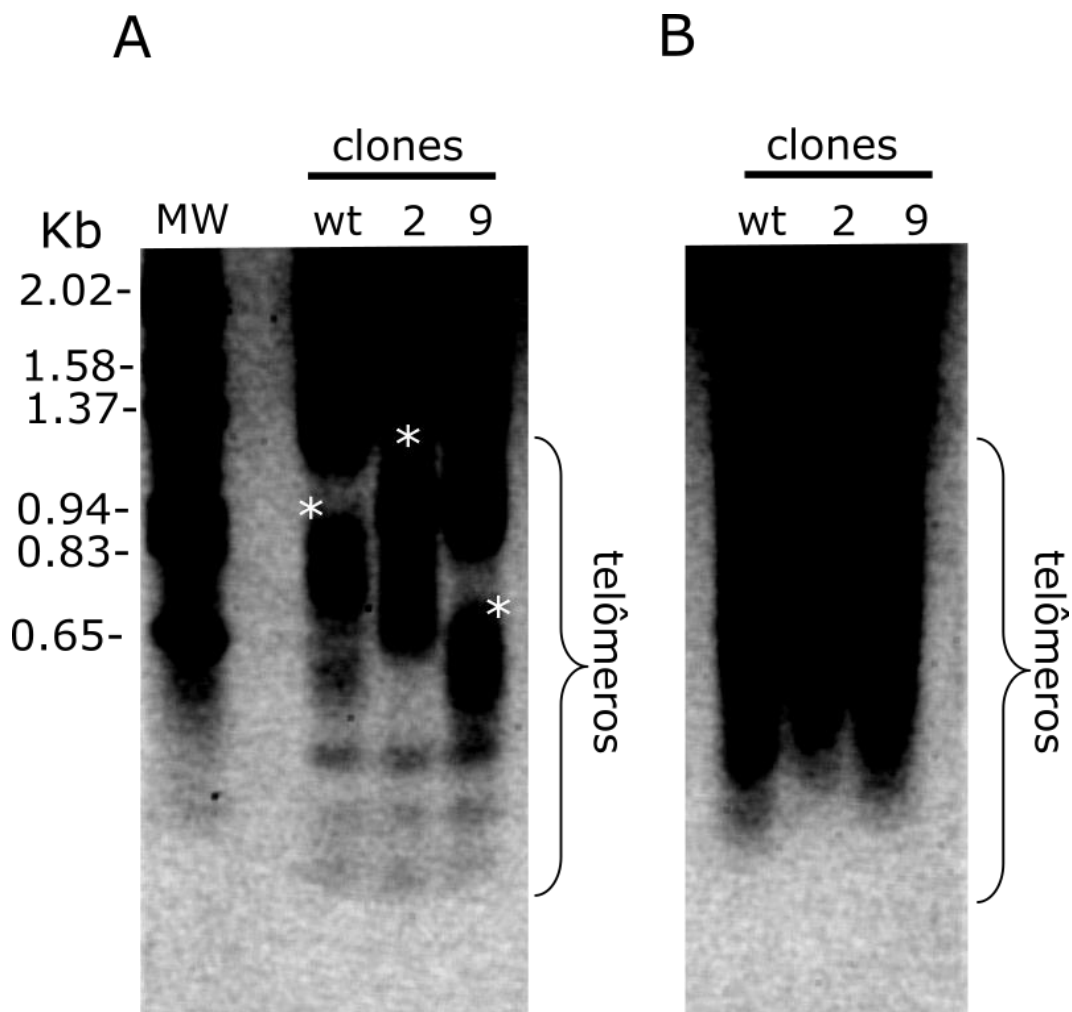
#### **4.1.10. Efeito do heminocaute e do nocaute de LmTERT na manutenção dos telômeros**

Deleção do gene que codifica a TERT em *T. brucei* resulta em encurtamento progressivo dos telômeros, observável em 5 a 7 semanas de cultivo sucessivo após o nocaute, com um encurtamento progressivo médio de 3 a 6 pb/duplicação populacional, ao passo que parasitos selvagens apresentam crescimento constante dos telômeros e sem limite aparente, a uma taxa média de 7 a 9 pb/duplicação populacional, durante a propagação contínua (repiques) em laboratório. Aparentemente, *T. brucei* deficiente para a telomerase (TERT<sup>-/-</sup>) pode manter o tamanho dos telômeros curtos estáveis por um mecanismo provavelmente independente de telomerase. Além disso, estes parasitos também apresentam rearranjos de cromossomos e perda de mini-cromossomos quando os telômeros ficam criticamente curtos. Após cerca de 1 ano em cultura ocorre uma redução considerável do sinal telomérico em Southern blot, com uma perda crítica após ~2,5 anos de propagação contínua destes mutantes, embora esse sinal ainda pareça visível (DREESEN; CROSS, 2006).

Sendo assim, examinou-se Southern blots teloméricos, realizado como descrito no tópico 3.16, do clone 2 (heminocaute) e clone 9 (nocaute), com aproximadamente 190 duplicações populacionais, usando como comparação um clone de CRISPR selvagem (wt), também com cerca de 190 duplicações populacionais (Figuras 43 e 44).



**Figura 43.** Perfil de restrição telomérica de parasitos nocaute e heminocaute para o gene *LmTERT* usando a metodologia CRISPR-Cas9. **MW**- DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled (Sigma-Aldrich); **wt**- clone selvagem de *L. major*; **2**- clone heminocaute de *L. major*; **9**- clone nocaute de *L. major*. **A**- digestão de DNA genômico dos clones CRISPRs com *RsaI*; **B**- digestão de DNA genômico dos clones CRISPRs com *RsaI*, previamente digerido com BAL-31. As chaves indicam a posição dos fragmentos teloméricos e os asteriscos indicam os fragmentos teloméricos que somente aparecem hibridizados nos clones mutantes.



**Figura 44.** Superexposição da figura 43, permitindo uma melhor observação do perfil de restrição telomérica de parasitos nocaute e heminocaute para o gene *LmTERT* usando a metodologia CRISPR-Cas9. **MW**- DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled (Sigma-Aldrich); **wt**- clone selvagem de *L. major*; **2**- clone heminocaute de *L. major*; **9**- clone nocaute de *L. major*. **A**- digestão de DNA genômico dos clones CRISPRs com *RsaI*; **B**- digestão de DNA genômico dos clones CRISPRs com *RsaI*, previamente digerido com BAL-31. As chaves indicam a posição dos fragmentos teloméricos e os asteriscos indicam os fragmentos teloméricos cujas posições são diferentes entre os clones.

Nossos resultados preliminares mostram que é possível observar diferenças no perfil de restrição telomérico entre os fragmentos menores que 1.3kb no clone 2 (heminocaute) e clone 9 (nocaute) em relação ao clone selvagem (wt). Sendo que se observa um acúmulo de fragmentos na faixa de 1kb (clone 2) e abaixo de 0.8 kb (clone 9), os quais não são visíveis no perfil telomérico do clone wt (Figuras 43-A e 44-B)

O desaparecimento dos fragmentos inferiores a 0,65 kb (Figura 44-B) e da diferença nos perfis de bandas entre os clones (Figuras 43-B), após digestão com

exonuclease BAL-31, nos permite afirmar que essas diferenças nos perfis de restrição observadas realmente se devem a diferenças nas regiões teloméricas e subteloméricas desse clones uma vez de a BAL-31 degrada essas regiões.

Pretendemos repetir esta análise do perfil telomérico, usando outros clones heminocaute e, mais adiante, caso se repitam esses resultados, tentar descobrir se estes fragmentos teloméricos observados tem alguma tipo de relação com mecanismos reparo a danos no DNA telomérico, como por exemplo recombinação homóloga ou junção de pontas não homólogas sendo que para isso utilizaremos ensaios de separação de cromossomos usando eletroforese de campo pulsado seguido de hibridização dos telômeros para observar algum tipo de aneuploidia ou translocação cromossomica e análise de expressão e imunolocalização de proteínas que tem função nessas maquinarias de reparo, como RAD51 por exemplo.

## **4.2. Inibição farmacológica da telomerase de *L. major*.**

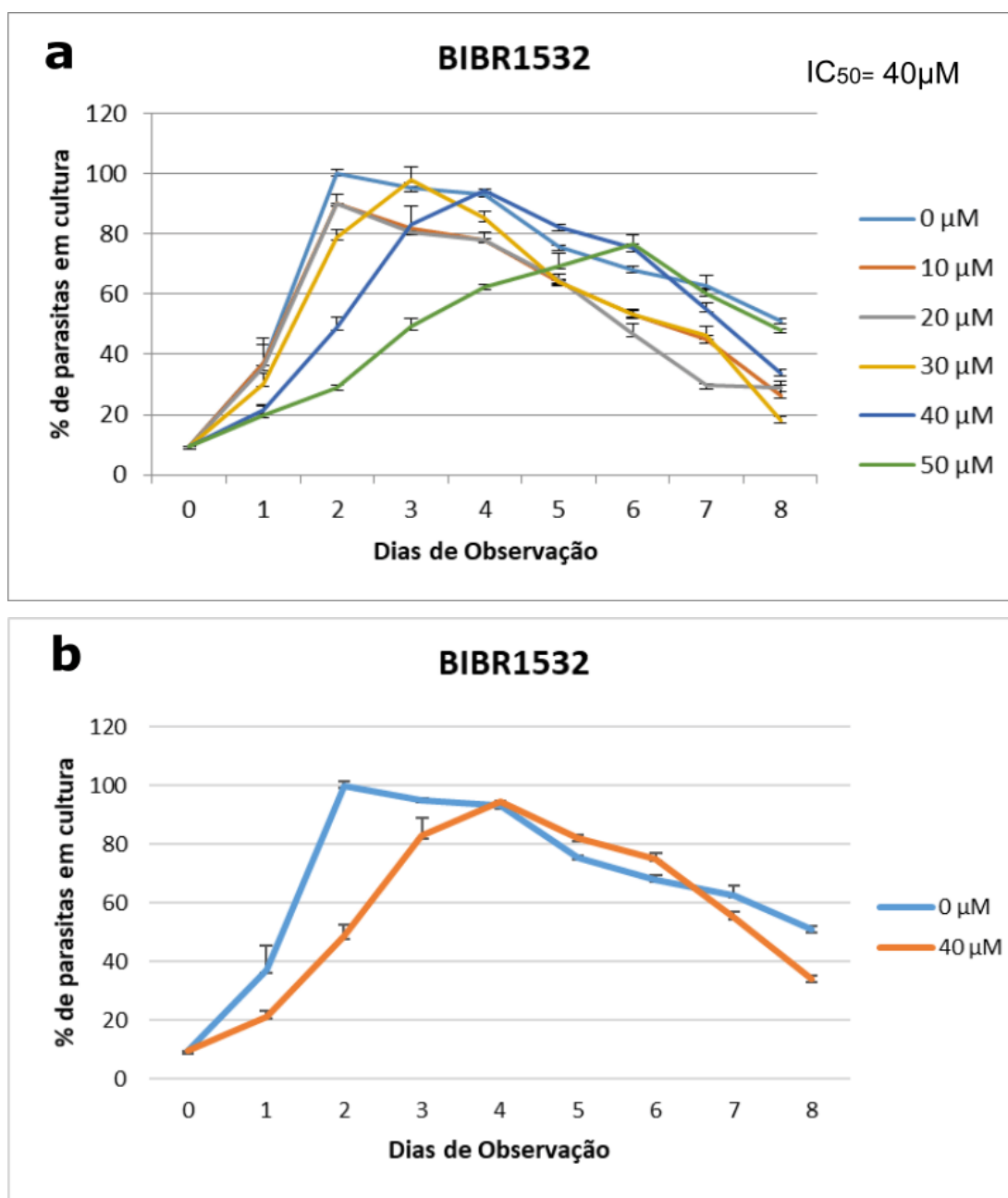
### **4.2.1. Determinação do IC<sub>50</sub> para o BIBR1532**

Como apresentado no tópico 1.8, o BIBR1532 é um inibidor sintético que age interferindo especificamente com a atividade da telomerase, com ação demonstrada em telomerase humana, de camundongo e de *Tribolium castaneum* (BASHASH et al., 2017; BRYAN et al., 2015; LAVANYA et al., 2018). Nosso grupo de pesquisa tem resultados prévios demonstrando efeito desse fármaco em *L. amazonensis* (tópico 1.8). Assim, para determinar a melhor concentração do inibidor a se utilizar nos tratamentos de culturas de *L. major*, levando em conta os experimentos pretendidos, determinou-se o IC<sub>50</sub> para esse inibidor, como descrito no tópico 3.5.

Um ponto a ser esclarecido é que os ensaios pilotos (dados não apresentados) mostraram que o BIBR1532 afetava a capacidade proliferativa de *L. major* durante a fase exponencial (até 3 dias de cultivo) com poucas ou nenhuma morte celular, caracterizada pela ausência de detritos oriundos de morte celular nas culturas em fase exponencial (com exceção de doses iguais ou superiores a 100 µM, dados não apresentados). Como o intuito inicial era observar efeitos na capacidade proliferativa

(fase exponencial) e nos telômeros dos parasitos, a dose a ser usada do inibido não poderia causar a morte imediata dos parasitas na fase exponencial de crescimento, mas, ainda assim, deveria apresentar um efeito considerável sobre a cultura tratada.

Dessa forma, como descrito no t3pico 3.5, culturas de *L. major* foram mantidas por 8 dias com diferentes concentrações de BIBR1532 (0, 10, 20, 30, 40 e 50  $\mu\text{M}$ ) e usado ensaio de MTT para determinar o efeito do inibidor sob os parasitos. Os dados gerados ao fim do experimento foram compilados e usados na montagem de gr3pficos (Figura 45).



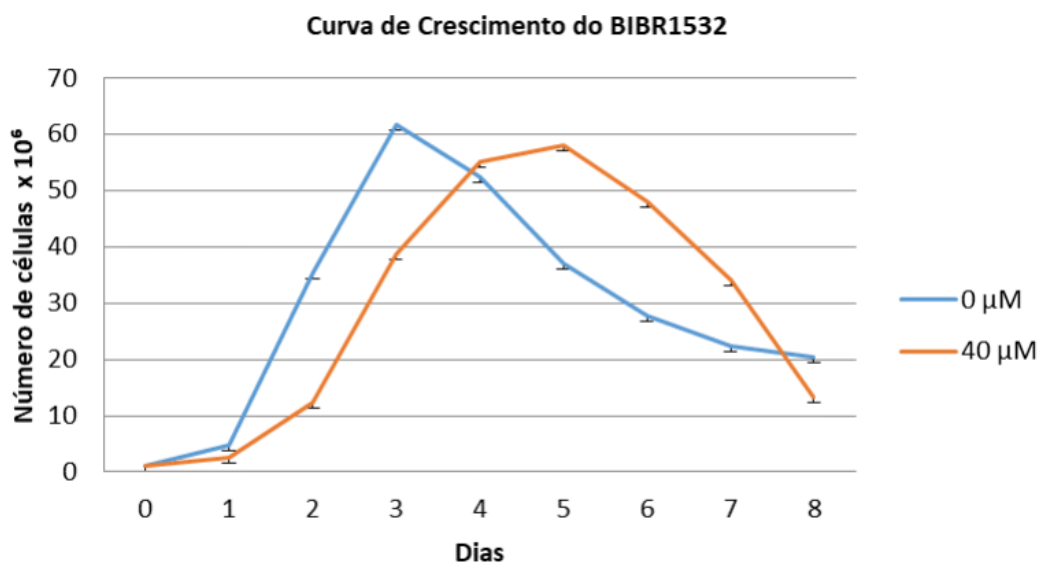
**Figura 45** Determinação do IC<sub>50</sub>, usando ensaio de MTT, do inibidor BIBR1532 sob *L. major* ao longo de 8 dias de cultivo em diferentes concentrações de inibidor (0, 10, 20, 30, 40 e 50 µM). **a**-gráfico das 6 concentrações diferentes do inibidor ao longo de 8 dias. **b**-gráfico da concentração escolhida (40 µM), para montagem de testes posteriores, e controle (0 µM), ao longo de 8 dias. Gráfico confeccionado no Excel. As barras representam os desvios padrões.

Uma vez montado o gráfico, foi possível observar um efeito dose dependente no crescimento das culturas nas diferentes concentrações testadas ao longo dos 8 dias, isso é, quanto maior a concentração de fármaco maior era o efeito na proliferação celular dos parasitos no que se refere ao número de células no ponto máximo, o tempo para esse ponto ser atingido, e a velocidade de morte após tal pico (Figura 45-a).

Com mencionado acima, para estudar efeitos da proliferação celular e nos telômeros seria preciso uma concentração de fármaco com um efeito considerável, mas que permitisse a proliferação celular, dessa forma a concentração de 40 µM foi escolhida, para os testes posteriores, onde se observa nessa concentração um montom máximo de células inferior à da cultura não tratada e que leva o dobro de tempo para ser alcançado (4 dias da tratada contra 2 dias da não tratada) e ainda tem uma taxa de morte maior que a da cultura não trata na fase estacionária com uma aparente tendência a morte total das células (Figura 45-b). Por coincidência, a concentração de 40 µM também seria o IC<sub>50</sub> se considerarmos a porcentagem de células em cultura, no segundo e no oitavo dia de cultivo, e o tempo para se atingir o ponto máximo da curva (Figura 45; a e b)

#### **4.2.2. Curva de crescimento de *L. major* tratada com BIBR1523**

Uma vez determinado o IC<sub>50</sub> do BIBR1532 (40 µM), o passo seguinte consistiu na confecção de uma curva de crescimento por contagem em câmara de Neubauer como descrito no tópico 3.13. Neste caso, 5mL cultura de *L. major*, com 1x10<sup>6</sup> células/mL, foi tratada com 40 µM de BIBR1532, a partir da solução estoque (100 mM), e incubadas por 8 dias a 26°C, com contagem diária em câmara de Neubauer. Juntamente com a cultura tratada foi utilizado também uma cultura não tratada como controle, estando ambas em triplicatas sendo a média utilizada na confecção de gráfico (Figura 46).



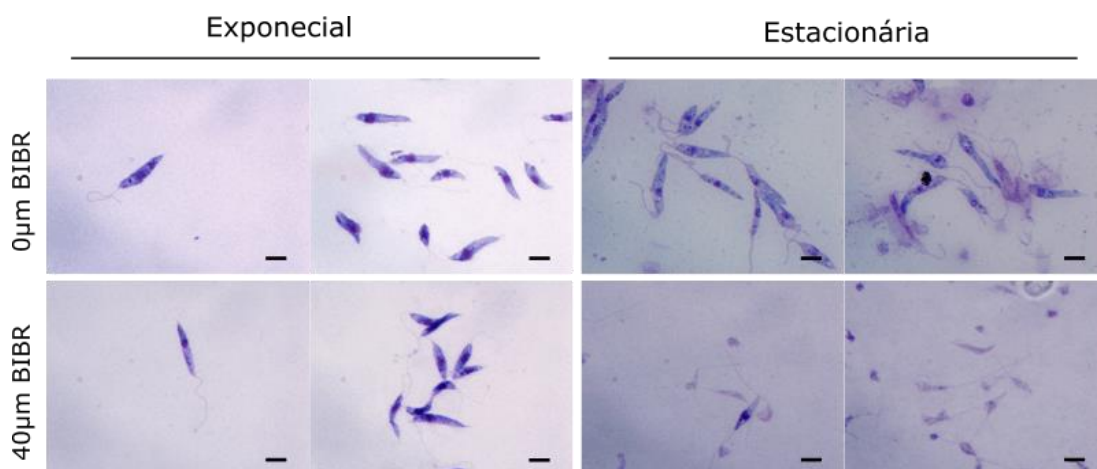
**Figura 46.** Curva de crescimento, por contagem em câmara de Neubauer, de *L. major* não tratada (azul) e tratada com 40 μM de BIBR1532 (vermelho), dada por número de parasitos x dia, ao longo de 8 dias com contagem diária. Gráfico criado no Excel. As barras representam os desvios padrões.

Com a confecção do gráfico (Figura 46), observou-se um efeito muito semelhante de quando foi determinado o IC<sub>50</sub> desse inibidor (tópico 4.2.1) em que a taxa de crescimento da cultura tratada é fortemente afetada pelo fármaco uma vez a fase exponencial de crescimento celular das culturas sem tratamento (controle) ocorre no terceiro dia de cultivo ao passo que das culturas tratadas (40μM) ocorre no quinto dia de cultivo, sendo o número máximo de células (ponto máximo) também diferente entre o tratamento ( $5,8 \times 10^7$ ) e o controle ( $6,1 \times 10^7$ ). O número de células ao fim do oitavo dia também é uma diferença a ser mencionada, sendo  $2 \times 10^7$  para o controle e  $1,3 \times 10^7$  para o tratamento com tendência à morte de todas as células em caso de cultivo por um período maior que o aqui estabelecido (dados não apresentados).

#### 4.2.3. Efeito do tratamento de *L. major* com BIBR1532

A presença de possíveis alterações morfológicas causadas pelo tratamento com 40μM de BIBR1532 foi observada por meio da confecção de lâmina coradas com Giemsa (Figura 47), como descrito no tópico 3.18, de duas fases da cultura dos parasitos, a fase exponencial (obtida ao se manter os parasitos em cultura por 3 dias), e a

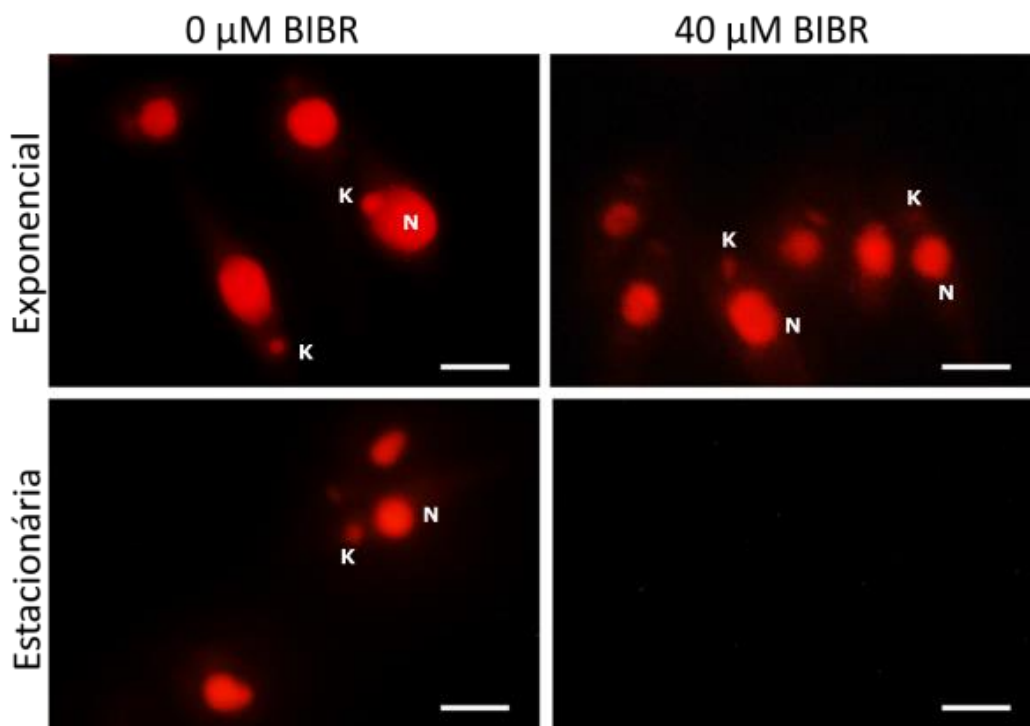
fase estacionária, (obtida ao se manter os parasitos em cultura por 12 dias) (ver tópico 3.13 para mais informação).



**Figura 47.** Coloração com Giemsa, de *L. major*, não tratada e tratada com 40  $\mu\text{M}$  de Bibr1532, em fase exponencial (com 3 dias de cultivo) e fase estacionária (com 12 dias de cultivo). Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 3  $\mu\text{m}$ .

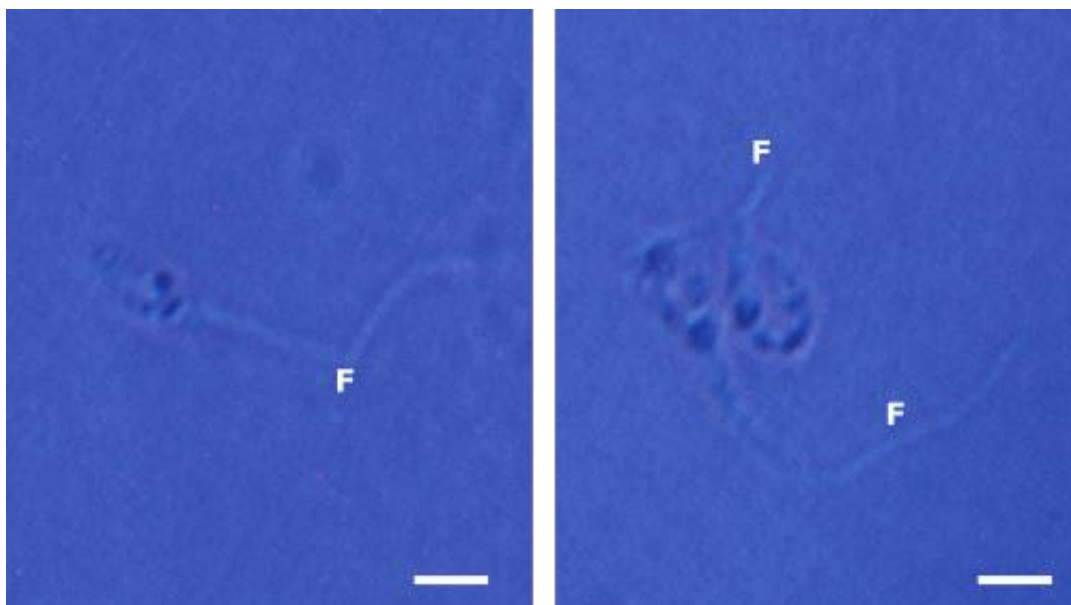
A coloração com Giemsa dos parasitos tratados com 40  $\mu\text{M}$  de Bibr1532 permitiu determinar que o fármaco não causa alterações morfológicas, visíveis no nível observado, em formas promastigotas proliferativas (parasitos da fase exponencial) de *L. major* quando comparadas com o controle (0  $\mu\text{M}$  de Bibr1532). No entanto, quando se tratar de parasitos em fase estacionária (12 dias de cultivo), o efeito do tratamento torna-se extremamente visível uma vez que se observa uma aparente morte de, praticamente, todos os parasitos em cultura, com algumas raras exceções. Exceções essas, que se comparadas aos parasitos não tratados e na mesma fase de cultivo (estacionária), aparentam ser menores (menos alongados que os não tratados), indicando prováveis alterações morfológicas nesses parasitos (Figura 47).

Esse tratamento com Bibr1532 também foi analisado por meio de coloração por iodeto de propídio (PI) (como descrito no tópico 3.19). Essa técnica de coloração objetivava a observação de possíveis alterações no núcleo e cinetoplasto dos parasitos, submetidos ao tratamento por Bibr1532 (Figura 48).



**Figura 48.** Coloração com iodeto de propídio (PI), de *L. major*, não tratada e tratada com 40  $\mu\text{M}$  de BIBR1532, em fase exponencial (com 3 dias de cultivo) e fase estacionária (com 12 dias de cultivo). N- núcleo; K- cinetoplasto. Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 2  $\mu\text{m}$ .

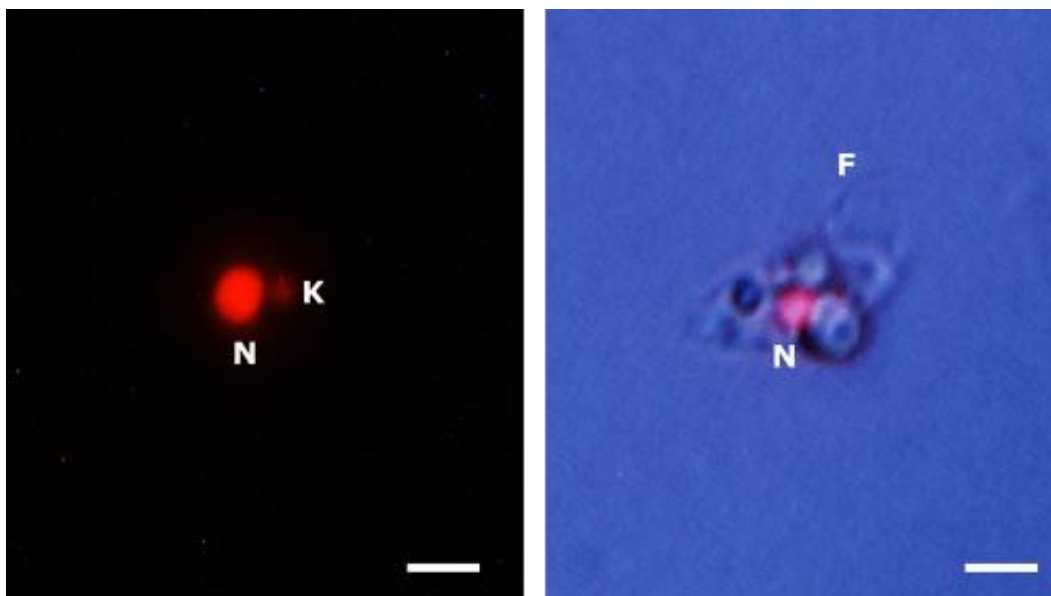
Essa técnica de coloração, assim como a coloração por Giemsa, não mostrou nenhuma alteração aparente nos parasitos tratados (40  $\mu\text{M}$  de BIBR1532) em fase exponencial (3 dias de cultivo), tanto com relação ao núcleo (N) como com relação ao cinetoplasto (K), quando comparado com parasitos não tratados e em mesma fase de crescimento. Já na fase estacionária (12 dias de cultivo), observamos que as células tratadas apareciam como “fantasmas” uma vez que não foi possível detectar as organelas ricas em DNA (núcleo e cinetoplasto) nesses parasitos por meio de PI, embora as “silhuetas” das células sejam visíveis na luz branca (Figura 49).



**Figura 49.** *L. major* tratada com 40  $\mu$ M de BIBR1532, em fase estacionária (com 12 dias de cultivo). Merge de coloração com PI e luz branca. F- flagelo. Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 2  $\mu$ m.

Assim como observado na coloração por Giemsa (Figura 47), é possível verificar por coloração com PI, a presença esporádica de células em fase estacionária, após tratamento com BIBR1532. Embora elas não apresentem, aparentemente, alterações morfológicas relacionadas ao núcleo (N) e cinetoplasto (K), do tipo ausência ou duplicações dessas organelas, sendo que outras alterações morfológicas pareçam estar presentes (Figura 50). Contudo, é necessário a aplicação de técnicas mais refinadas para checar essas prováveis alterações, nos parasitos remanescentes da fase estacionária, como microscopia eletrônica de transmissão (MET).

Aqui, vale pontuar que a manutenção de culturas de fase estacionária, tratadas com BIBR1532, por longos períodos (25 a 30 dias) resulta na morte de todos os parasitos (dados não apresentados), indicando que *L. major* provavelmente não desenvolve resistência a esse inibidor.



**Figura 50.** *L. major* tratada com 40  $\mu$ M de BIBR1532, em fase estacionária (com 12 dias de cultivo). Corada com PI (esquerda) e *merge* da coloração com PI e luz branca (direita). N- núcleo; K- cinetoplasto; F- flagelo. Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 2  $\mu$ m.

#### **4.2.4. Efeitos do tratamento contínuo, de *L. major* em fase exponencial, com BIBR1532**

Como mostrado no tópico anterior (tópico 4.2.3), é possível observar um forte efeito do BIBR1532 na fase estacionária em culturas de *L. major* e, também, que este inibidor telomerase específico afeta a capacidade proliferativa do parasito em fase exponencial, dependendo da dose usada. Assim, quisemos testar se a dose de 40  $\mu$ M de BIBR1532 causaria alterações morfológicas nos parasitos na fase exponencial caso o tempo de exposição ao inibidor, fosse por tempo contínuo. Para tal, foram realizados repiques (R) das culturas tratadas com BIBR1532 (Figura 51) de forma a evitar que estas entrassem em fase estacionária, sendo que tais repiques (R) eram também mantidos sob tratamento de 40  $\mu$ M de BIBR1532.

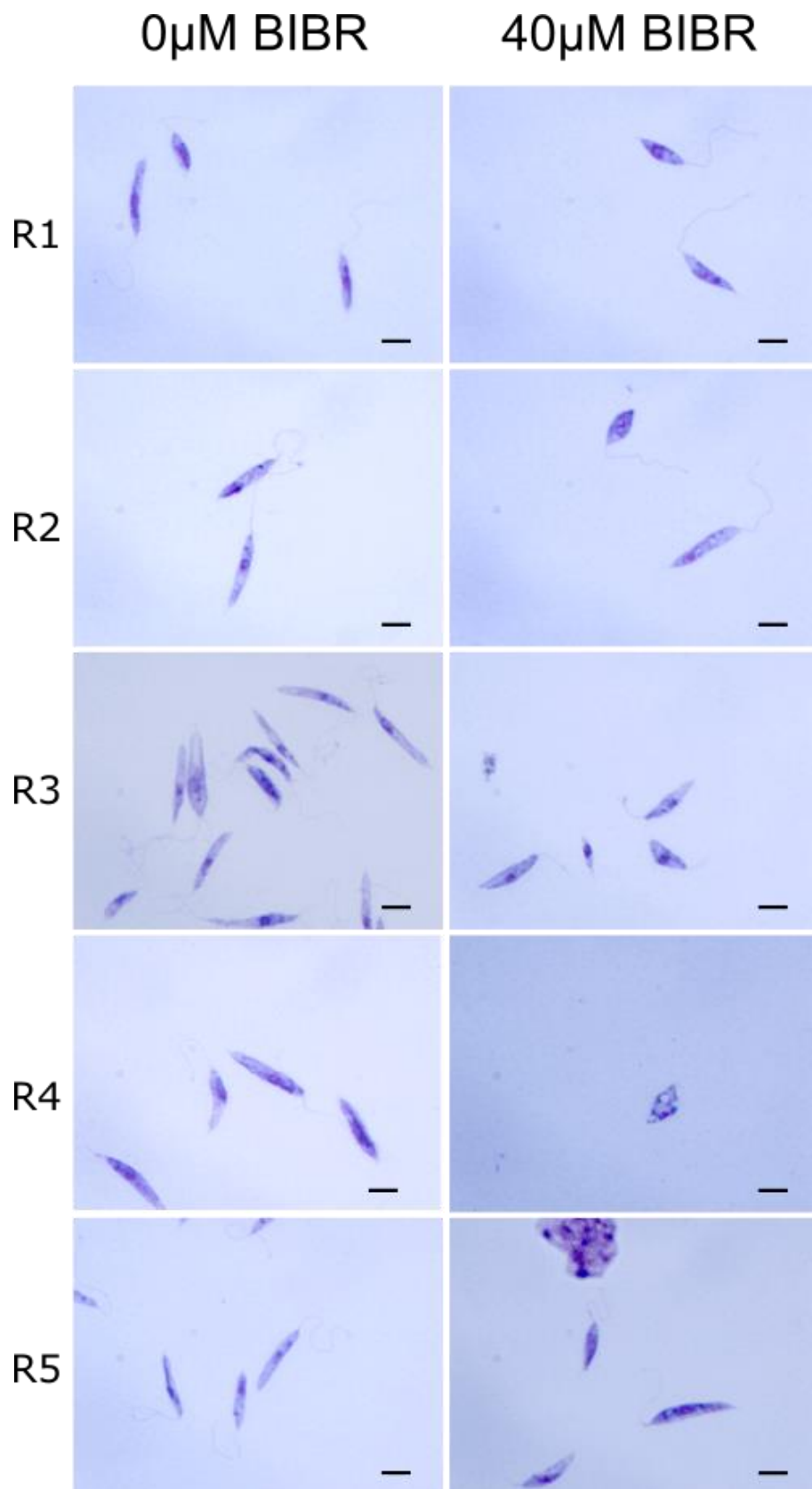
O critério utilizado para a realização dos repiques das culturas, foi puramente visual já que o BIBR1532 interfere na proliferação dos parasitos em fase exponencial. Por isso, com exceção dos parasitos não tratados que foram repicado a cada 3 dias, os parasitos em tratamento foram repicados a medida que as culturas ficavam densas, substituindo-se o meio antigo por meio de cultura M199/10% soro fetal bovino fresco

(como descrito no tópico 3.2), suplementado com 40  $\mu\text{M}$  de BIBR1532. A partir de então confeccionou-se lâminas usando coloração dos parasitos com Giemsa (Figura 52), como descrito no tópico 3.18, extração de DNA (como descrito no tópico 3.8) e realizou-se o repique.



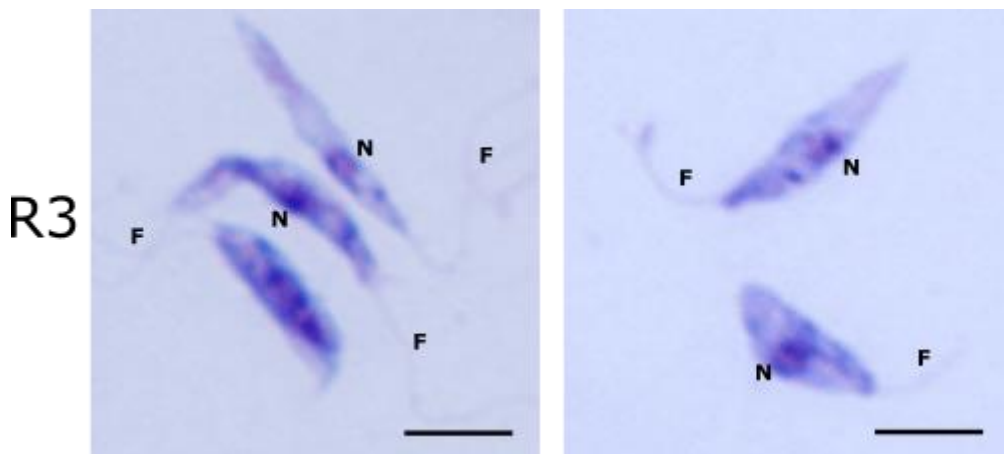
**Figura 51.** Esquema do ensaio para se observar o efeito do tratamento contínuo de BIBR1532 apenas sob *L. major* em fase exponencial. Feito um total de 5 repiques (R), sendo o R5 o único a não receber o tratamento com 40  $\mu\text{M}$  BIBR1532.

No total foram realizados cinco repiques (R1-R5) onde apenas no quinto repique (R5), os parasitas não foram mantidos na presença de BIBR1532. Como controle, usou-se cultura de *L. major* não tratada. O tempo de cultivo de cada repique foi de 3 dias para R1, 6 para R2, 9 para R3, 12 para R4 e 6 para R5.



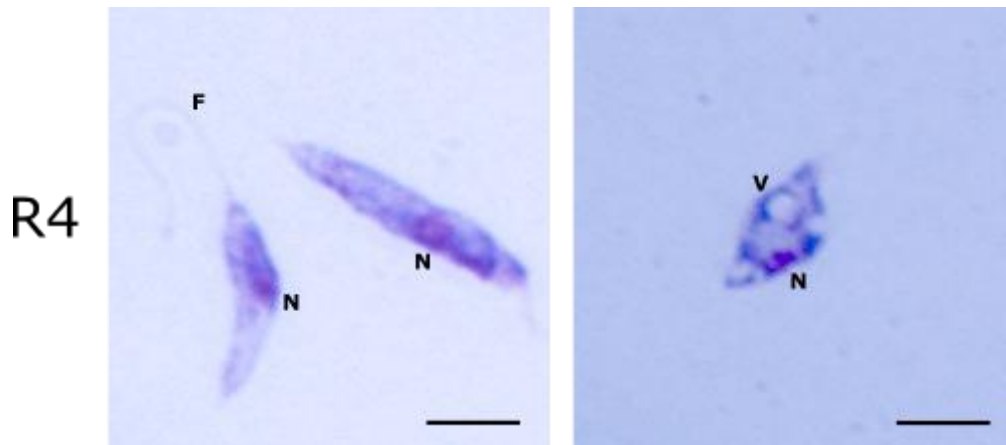
**Figura 52.** Coloração com Giemsa de *L. major*, não tratada e tratada com 40  $\mu$ M de BIBR1532, mantidos em fase exponencial, ao longo de 5 repiques (R1-R5). Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 3  $\mu$ m.

Os parasitos do primeiro e segundo repique (R1 e R2) de tratamento por BIBR1532, não apresentaram alterações morfológicas visíveis quando comparados com parasitos não tratados (Figura 52). Porém, no terceiro repique (R3) foi possível observar um truncamento no flagelo dos parasitos tratados com 40  $\mu$ M de BIBR1532 e diminuição do tamanho geral das células, quando comparadas com as células do repique não tratado por BIBR (Figura 53).

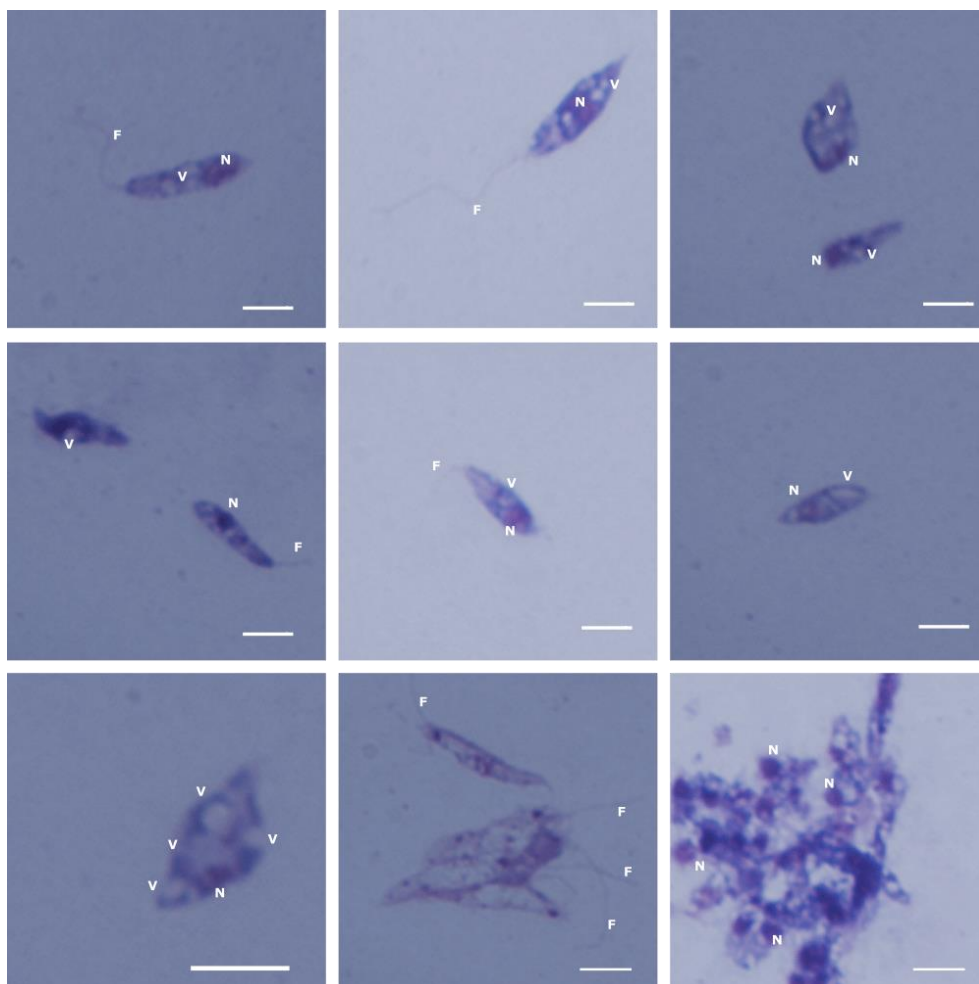


**Figura 53.** Coloração com Giemsa de *L. major*, mantidos em fase exponencial, no terceiro repique (R3). Não tratada (esquerda) e tratada (direita) com 40  $\mu$ M de BIBR1532. N- núcleo; F- flagelo. Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 3  $\mu$ m.

O quarto repique (R4), dos parasitos tratados com 40  $\mu$ M de BIBR1532, caracterizou-se pelo surgimento de vacúolos e diminuição mais acentuada do tamanho dos parasitos, surgimento de células com formato oval altamente vacuolizadas, truncamento ainda mais acentuado do flagelo, aumento de morte celular, em comparação com os parasitos não tratados. Observou-se ainda uma diminuição acentuada da capacidade proliferativa das culturas e início de morte celular (Figuras 54 e 55), onde o cultivo de >20 dias resultou em morte dos todos os parasitos sem aparente proliferação celular. Desta forma, o quinto repique (R5) foi realizado no décimo segundo dia de cultivo dos parasitos em R4.

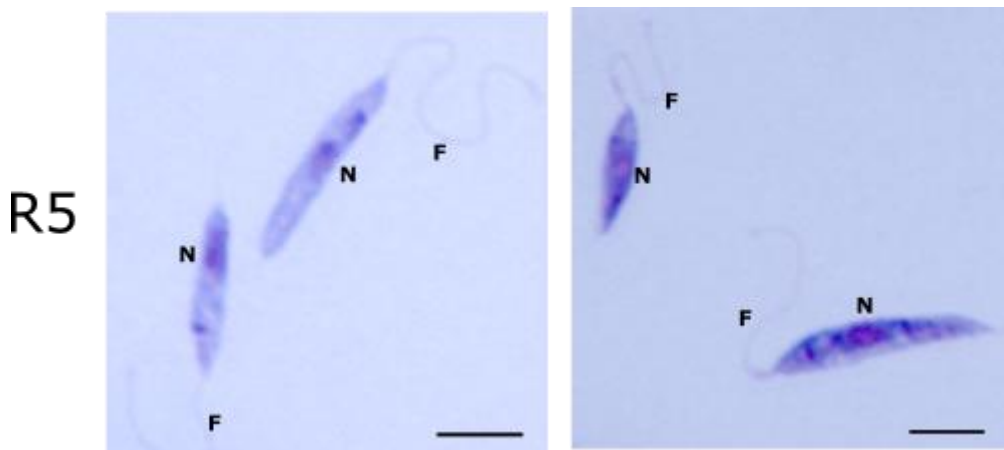


**Figura 54.** Coloração com Giemsa de *L. major*, mantida em fase exponencial, no quarto repique/tratamento (R4). Não tratada (esquerda) e tratada (direita) com 40  $\mu$ M de BIBR1532. N- núcleo; F- flagelo, V- vacúolo. Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 3  $\mu$ m.



**Figura 55.** Coloração com Giemsa de *L. major*, mantida em fase exponencial, tratada com 40  $\mu$ M de BIBR1532 no quarto repique (R4). N- núcleo; F- flagelo, V- vacúolo. Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 3  $\mu$ m.

No quinto repique (R5), o foi removido BIBR1532 do meio e esta cultura ficou marcada pela recuperação da capacidade proliferativa e, aparente, restauração da morfologia dos parasitos, tal qual aumento do tamanho celular e do flagelo e desaparecimento dos vacúolos (Figura 56). Embora não tenham sido estudados os aspectos moleculares decorrentes do tratamento prolongado por BIBR1532 e dessa recuperação, pretendemos repetir esse experimento de forma mais controlada de forma a realizar essas análises.



**Figura 56. Coloração com Giemsa de *L. major*, mantidos em fase exponencial, no quinto repique (R5).** A esquerda, repique da cultura usada como controle (sem tratamento). A esquerda, repique sem tratamento, da cultura mantida sob tratamento com BIBR1532 (40 µM) até R4. N- núcleo; F- flagelo. Aumento de 100x e barra de escala correspondente a 3 µm.

Pelos ensaios até o momento realizados, fica claro que o inibidor telomerase específico BIBR1532 tem ação sob *Leishmania major*, com prováveis efeitos secundários ainda não identificados, sendo que o uso de técnicas mais refinadas de análise, poderão vir a fornecer informações da real abrangência da ação desse inibidor nos parasitos.

Se levarmos em conta que o BIBR1532 é uma molécula telomerase específica (BRYAN et al., 2015) e que os telômeros, por sua vez, estão intimamente relacionados à viabilidade celular, a erosão dos telômeros, a senescência e morte dos parasitos seriam os efeitos mais prováveis de se observar nos tratamentos com esse inibidor (BASHASH et al., 2017; EL-DALY et al., 2005; KONG et al., 2015; LAVANYA et al., 2018; MUELLER et al., 2007), porém, foi observado em humanos e camundongos que o componente telomerase (TERT) tem uma gama de funções extratelméricas (além de

adicionar repetições teloméricas), como papel na regulação de expressão gênica, influência na proliferação celular independente de sua relação com comprimento dos telômeros, reparo de DNA, apoptose celular, organização de cromatina, maior resistência celular a fármacos e espécies de oxigênio reativos (ROS) e são ainda influenciadas pelo estresse célula de natureza variada, embora esses mecanismos e relações não sejam, ainda, totalmente esclarecidos (CAMPELO et al., 2015; JAISWAL; KUMAR; YADAVA, 2013; LING; WEN; ZHOU, 2012; MUZZA et al., 2016; RUBIO; DAVALOS; CAMPISI, 2004; SARETZKI, 2009; SARIN et al., 2005; ZHANG et al., 2017). Logo, a presença de BIBR1532 no ambiente celular pode afetar não somente a capacidade processiva da telomerase mas também algumas de suas funções extrateloméricas, como demonstrado no tratamento de células humana e de camundongos com esse inibidor (BERARDINELLI et al., 2017; LIPINSKA et al., 2017; MENG et al., 2012; PARSCH et al., 2008; TAHTOUH et al., 2015).

Assim, os efeitos e alterações morfológicas observados após o tratamento de *L. major* com BIBR1532 podem advir tanto de respostas celulares resultantes do encurtamento telomérico quanto do bloqueio das funções extrateloméricas da TERT ou uma combinação de ambos. Análises mais detalhadas e aprofundadas são necessárias para se compreender melhor os efeitos observados e sua natureza molecular, a começar pela determinação do tamanho dos telômeros por meio de FISH e Southern blot, e análises morfológicas usando microscopia eletrônica de transmissão (MEV e MET)

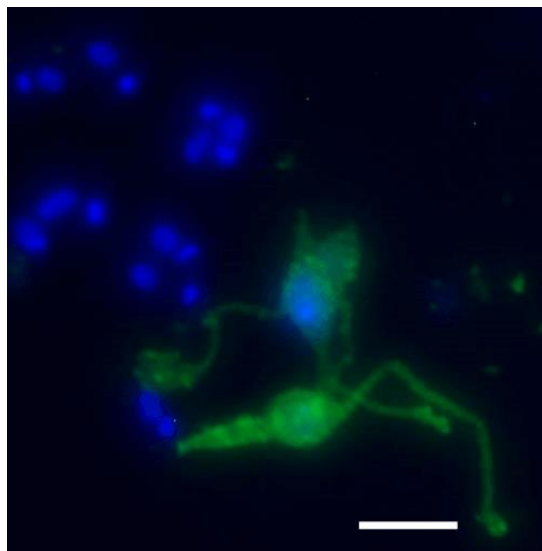
#### **4.3. Padronização da utilização de oligonucleotídeo *morpholino* antisense como ferramenta de bloqueio pós-transcricional em *L. major***

Esta metodologia está sendo padronizada para estudarmos a inibição da maturação de transcritos de diferentes genes em *Leishmania* sp., o que inclui os lncRNAs (longos RNAs não codantes) TERRA e TER. O intuito é o de inibir a maturação dos transcritos e com isso impossibilitá-los de cumprir suas funções para manter a homeostase telomérica do parasito.

*Morpholinos* são ácidos nucleicos artificiais que podem parear de forma complementar com sequências específicas de ácidos nucléicos naturais, e são atualmente usados para provocar o bloqueio sítio-específico da tradução, o *splicing* ou

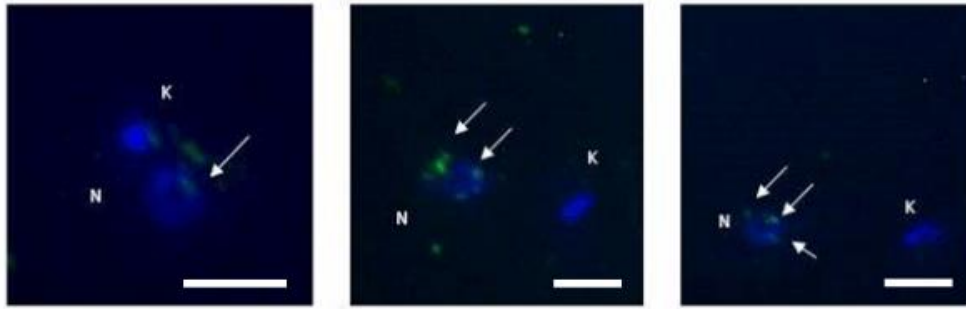
atividade de ribozimas em moléculas de RNA (“Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC”, [s.d.]). Como são artificiais, os *morpholinos* não são reconhecidos por enzimas ou proteínas sinalizadoras, nem degradados por nucleases ou reconhecidos pelo sistema imune, ou seja, são estáveis nas células. Em contraste com a maquinaria de interferência de RNA, os *morpholinos* não degradam o RNA, eles simplesmente impedem sua interação com o complexo enzimático até o RNA ser degradado de forma natural. Além disso, em *Leishmania* a utilização do RNA de interferência a fins de provocar o *knockdown* é inviável na maioria das espécies do gênero, por ausência dessa maquinaria (ROBINSON; BEVERLEY, 2003).

Antes de dar início aos ensaios funcionais, foi necessária a padronização desta metodologia. Para isso utilizamos  $2,5 \times 10^7$  células de *L. major*, em fase exponencial, as quais foram transfectadas com  $10 \mu\text{M}$  de oligonucleotídeo *morpholino* controle (Fluoresceinated standard control, 5'-CCTCTTACCTCAGTTACAATTTATA 3', Gene Tools), marcado com fluoresceína na posição 3'. As células foram coletadas a cada 6h após a transfecção, seguida de coloração do núcleo e cinetoplasto com DAPI, e análise em microscópio de fluorescência. Verificou-se que aproximadamente 24 horas após a transfecção, 30% a 40% dos parasitos transfectados apresentavam fluorescência verde difusa espalhada por toda a célula (Figura 57). Parasitos apresentando o mesmo perfil de marcação fluorescente foram encontrados até 72h após o evento de transfecção. Segundo o manual do fabricante, Gene Tools (“Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC”, ), caso o *morpholino* controle seja internalizado ele deve aparecer com fluorescência verde difusa por toda a célula. Portanto, apesar de não termos conseguido alta eficiência de transfecção, nosso protocolo de transfecção dos *morpholinos* controle via eletroporação foi realizada com sucesso em *L. major*, de fase exponencial (Figuras 57 e 58). Essa metodologia ainda está em fase de padronização, mas uma primeira análise, feita ao se contar o número de células com *morpholinos* em relação às células que não foram transfectadas, demonstra eficiência da internalização em *Leishmania*.



**Figura 57. Localização celular do *morpholino* controle em *L. major*.** O sinal verde demonstra a internalização dos *morpholinos* em *L. major* ~24 horas após a transfecção com 10  $\mu$ M de oligonucleotídeo controle. DAPI (azul) marca o núcleo e cinetoplasto das células. Imagens obtidas em aumento de 100X, utilizando microscópio de fluorescência Nikon 80i, capturadas usando o software NIS.

A Figura 57 demonstra as imagens obtidas no ensaio piloto realizado, utilizando-se o oligonucleotídeo Carboxi-fluoresceinated *LmTER morpholino* 5'GTCTGTCAAAGTGAAGAGGGGAAGGG3' cuja marcação com fluoresceína teve o intuito de auxiliar na localização subcelular do oligonucleotídeo após a transfecção dos parasitos com os mesmos. Nestes ensaios foram utilizadas as mesmas condições usadas para o *morpholino* controle. Parasitos *L. major* ( $2,5 \times 10^7$  células), em fase exponencial, foram transfectadas com 10  $\mu$ M do Carboxi-fluoresceinated *LmTER morpholino* e como controle as células foram transfectadas com o oligonucleotídeo *LmTER Inverted* (5'GGGAAGGGAGAAGTCAAAGTGTCTG 3'), não marcado com fluoresceína, já que o oligonucleotídeo *LmTER Inverted* é um importante controle que será utilizado nos ensaios funcionais, uma vez que ele não deve provocar inibição da maturação do TER. Após a transfecção, as células foram colocadas em cultura e coletadas a cada 6h, por 3 dias, e analisadas ao microscópio de fluorescência. Ao contrário do oligo *morpholino* controle cuja fluorescência aparece difusa por toda a célula, o *morpholino LmTER* aparece na forma de focos individuais dentro do núcleo (Figura 58) e em algumas células aparece também no citoplasma do parasito (não mostrado). Porém, à semelhança do que ocorreu com o oligo *morpholino* controle (Figura 58) somente 30 a 40% dos parasitos transfectados apresentaram sinais de fluorescência.



**Figura 58. Localização celular do *morpholino* LmTER em *L. major*.** O sinal verde dentro do núcleo dos parasitos demonstra a internalização dos *morpholinos* em *L. major* 24 horas após a transfecção com 10 $\mu$ M de oligonucleotídeo. DAPI (azul) marca o núcleo e cinetoplasto das células. Imagens obtidas em aumento de 100X, utilizando microscópio de fluorescência Nikon 80i, capturadas usando o software NIS.

Desta forma, os próximos passos serão tentar aumentar a eficiência de transfecção com oligonucleotídeo *morpholino* para proceder com os ensaios funcionais e verificar alteração de expressão de LmTER usando RT-PCR e RT-QPCR. Efeitos na morfologia e perfil de crescimento do parasito transfectado e alterações no tamanho dos telômeros também serão verificadas, já que o intuito deste ensaio é impedir que o componente RNA do complexo telomerase do parasito (LeishTER) possa atuar no complexo, inibindo indiretamente a atividade da enzima. Se bem-sucedida esta será uma ferramenta fundamental para a realização de ensaios *knockdown* em *Leishmania*.

## 5. Conclusões

De acordo com todos os resultados apresentados, concluímos que o uso da metodologia CRISPR-Cas9 é perfeitamente viável e de fácil aplicação para a nossa linha de pesquisa embora um refinamento da técnica seja necessário, especialmente para podermos determinar o quão vital um determinado gene é para o organismo, devendo-se mencionar que outro sistema usando a metodologia CRISPR-Cas9, especificamente para tripanosomatídeos, foi recentemente apresentados com a promessa de tais refinamentos e que estamos extremamente ansiosos para testar.

No que concerne aos efeitos do BIBR1532 sob *L. major*, concluímos que este inibidor telomerase específico tem, aparentemente, alta afinidade pela telomerase deste parasito, e que esta é de vital importância para sua sobrevivência e viabilidade, embora a real natureza e amplitude dos efeitos observados ainda devam ser analisados. Apesar do desenvolvimento de forma de combate a leishmaniose não seja um objetivo direto do nosso grupo de pesquisa, o BIBR1532 se apresentou como uma provável arma nessa luta e o componente TERT como um precioso alvo, embora testes pilotos in vivo tenham mostrado que informações, no que tange a forma de tratamento mais eficiente, taxa de absorção e comportamento dessa molécula devam ser buscadas.

## 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.

XIA, J. et al. Identification of functionally important domains in the N-terminal region of telomerase reverse transcriptase. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 14, p. 5196–207, jul. 2000.

ZHANG, Z. et al. Telomerase reverse transcriptase promotes chemoresistance by suppressing cisplatin-dependent apoptosis in osteosarcoma cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 7070, 1 dez. 2017.

## **7. Anexos**

**Anexo 1.** Iniciador utilizados para confirmar transfecção de *L. major* com o pTCAS9 e subclonagem das HRs no plasmídeo pLS7-LmTERT

Conjunto de Primer	Nome	Sequência	Tm/°C	Amplicom no pLS6 (pb)	Amplicom no pLS7 (pb)	Amplicom no pTCAS9 (pb)	Amplicom no TERT-wt (pb)	Amplicom no TERT-KO (pb)
I	M13-F	5' CAGGAAACAGCTATGAC 3'	50	1.455	852	-	-	-
	DHFR_R	5' ACCAGAACACGCCTCTCTGT 3'	65					
II	DHFR_F	5' GGTGATTTGAGCTGCTCTCC 3'	65	1.827	1.161	-	-	-
	T7 - R	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'	48					
III	PreHR1-F	5' CACTGCCACCTCTACAAGCA 3'	56	-	-	-	898	-
	Seed-R	5' CATAGCTGCGGGACCCAGGC 3'	72					
IV	PreHR1-F1	5' CGGCTCTCATGCTTCTACC 3'	65	-	-	-	-	1.577
	Puro-R	5' GGAAGAGTTCTTGACGCTCG 3'	60					
V	Cas9-F	5' GCCTATCCAGTTCGCTCAG 3'	60	-	-	127	-	-
	Cas9-R	5' GCCTATCCAGTTCGCTCAG 3'	60					

## Anexo 2. Sequência de nucleotídeos da região de homologia TERT-RH1

CCTCCATCTCACGTTTGCCGTAGAAACTGCATCTCCATCGCCCAGGGCCGCC  
GCAACGGCAGCGACACCGAGTGCTGCAGAGTTTCGGGCTTTGCGTGATGTG  
GTGCTGCCGCCAACCAATCGTTCCTGGTTGTCGTGTACGTGGCGCTGCACG  
CCTCTTCTTCCCCTCCGCCTACCACAGCACACGCATCCCCAACACCACCGAC  
ACCGGCACTGGGACGCGCTGCGTCTGCCACGGGGTTCGAGCGGCTTCGGCA  
GCCGCTGACCCATCAGACGGTGGCATCGTCAGCTCACGATACATGTATGAC  
ACGATGCAACCCCGCCGACCGACAGAACTCCTCCTGGTCGTGTCATCATTC  
GCGGGCAAGCACGGCAGCACTCGCGATCCCTGGCGTGCCTCCGCCTTTCGG  
CTTCTCTACACCAACACTTCTCATCGACCCCTCACCGAC

## Anexo 3. Sequência de nucleotídeos da região de homologia TERT-RH2

AGCGCTTTCTAGCGGCTCGGCAGTCTGCGTGCGACGTGTCGGCTGCCGAGGT  
GCGGGCCTGCGTTTTAACAGCACTTCATCGCACGATGCAAGCCAAGCTGAG  
GGTCCTACAGGCTCGCACCGTCTGCGTGGTGACCGCTCAGAGAGGGCGGAC  
ACCGAGAGGGACCTCTTTAAAAGGGCGGCGGAACCACTTTTGCTCCCACGA  
GGCATTGTCTGCTGGACGCAAGTGTGCGAGCGACGCCGCAAAGGTCGTAA  
TCGTGTCGTAAACACGCGTGTCTGCTTGCCTCCTTCTGGTGGCTGGCTGCC  
GCAGAGGTTGAGTCGCAGTGGCGCCGCTCCCTTAGCGCCCTGCACAGAGCA  
GCACCACGCCTTGGCGAAGCGCGCGGGCCGACCGCGCTTTCACCCTCACCG

GGAGCGTCGGCATCATTGCTGATGGACGATGGCCCTTTATCGATGCACGCG  
CGTGCGCTAAGCGCGACGCGACTCTCGCAGACTTGA

**Anexo 4.** Sequência de nucleotídeos da *Seed* para a TERT de *L. major*

AAAAGCACCGACTCGGTGCCACTTTTTCAAGTTGATAACGGACTAGCCTTAT  
TTAACTTGCTATTTCTAGCTCTAAAAC

**Anexo 5.** Sequência da TERT de *L. major*, (*Genbank*)

ATGTCCGCCTCGTTTCCATCAATTCCGGGCTTTGCCGGCCCACTGTCACTGA  
AAGCTTTCCTGGAAGAGTACTTTGGCCTCCATCTCACGTTTGCCGTAGAAAC  
TGCATCTCCATCGCCCAGGGCCGCCGCAACGGCAGCGACACCGAGTGCTGC  
AGAGTTTCGGGCTTTGCGTGATGTGGTGCTGCCGCCAACCAATCGTTCCTG  
GTTGTTCGTGTACGTGGCGCTGCACGCCTCTTCTTCCCCTCCGCCTACCACAG  
CACACGCATCCCCAACACCACCGACACCGGCACTGGGACGCGCTGCGTCTG  
CCACGGGGTTCGAGCGGCTTCGGCAGCCGCTGACCCATCAGACGGTGGCAT  
CGTCAGCTCACGATACATGTATGACACGATGCAACCCCGCCGACCGACAGA  
ACTCCTCCTGGTCGTCGTCATTCGCGGGCAAGCACGGCAGCACTCGCGA  
TCCCTGGCGTGCCTCCGCCTTTCGGCTTCTCTACACCAAACTTCTCATCGAC  
CCCTCACCGACGCTCTGTTGCGCCACCCGTGGTGGGCATCGTTTGCCGCCTG  
CCTGGGTCCCGCAGCTATGGGGTTTATCGAGATGTACTGCCCTATCGTTCTT  
CAGCTGGAGGCGATGGCTGGCGGGGTGCAGGTGCTCGGGCCTGCCCTGAAA  
CATACAGCATTTCGAGAGATCGTTTTCCGCGGCGGCGCCGTCATCGGAGATG  
AAGGGCCCGCTGCCACAGGGAAGCGGCTGTATCTTTCACGTGGCGTGAAG  
CGTGCCCTCGACACACGCGAATGCTCCGCGCCTCTGCCGCTTCAAAGCAA  
AGGCGTGTGGAGGCGCCGCAAAGGCGAAGGCCGGACGAAGGCTCCAGCG  
AGGGGTGCGCCCGGATAGCCGTCCATGTAGAGACGACCCCTTTTCCAGTTCC  
GTGAACCGCGCGGCGATGGCCGCCACCTGGGCGGCGCGTTGACACGCACC  
GATGTTCCGCGTACGCGACTCTACAGTGCGCGCATCTCGGATGGTGACGGC

GCCGGTGACGGAAGCGGCAGCGCGCTTCCGCTGCCAGCGGGCTTCCTCGAG  
GCTCAGTGGCTTCGCCGCCATCCACATAGTCTGCACCGCGCGCTGCAAGCCG  
CTCTGCCGAAGAGGGCGGCCTACGGGGCATCCACGCGGCGCTACTCGGTGG  
GTGCTAGCGAGAGGGGCACCGGGTGCACCAGTGTAGAGGACATCCCGATGT  
GGCACGTGACGCACGTCTTCCGTTGGTTAGTGCTGCAGCCCCCTCAGAGCAG  
CGCGGACGCGTCTCCGACAACCCACCGAAGTTCGACTTGCCGTCTCACCTG  
CGCCGTCTCCTGTCGACCGTTGTCGACCAGTGCAGTCGCTTGGATCTTCGCG  
GGGCCGCCCTAAAGCACACCGGCTACCTGGAGGAAGCCTTCCGTCGTCAGC  
AGCAAGGCGTGGAGCCGTGGGATGTGCAGCGGCTCTCCACCCCTGTCGATG  
TGGTGGTTTCCTACCTGCGCACACTGCTCTCCACTCTACGCTGGGCACCTTT  
GAAGGAGACCGATAACGGCTCGTTTTTGGGGACGCGATGCAGCCGGTAGCGA  
ACGTGTACTCGACGCGCTCATGAGGGCGGTGCGGGGCTGGCTGATCGCCGG  
CCGCCACGCCGTCTTTCCAGTCTCCCGCTTCTTGGACGGCGTGCCTGTGGCT  
CAGGTGCCGTGGCTGAACGGGTTCTACACCACGGCCCCCTTCGCTGCCGTTCC  
CAGCAGCGACTTCGTCCGCGGCTCGTCACGCGCGCCGCGAGCGTTCGCACG  
TGCAGCAGCGTGTTTGGCTTCAGTTTGCCTTGTTCCCTGACGCAGGACATACT  
GCCTTTCTTGCTGCGCGCGTCCTTCACGATCACGTGGAGTTCCAAGAATACG  
CACAACTTCTTTTTTCCCTGCAGTTGTGTGGCGTAGACTGGTCCGCCGAG  
AGGTGCGTCGCACTCGATCTTGTGGCGCCCCGCGTTCGCAGATGCCACTGGC  
CGGGGAAAGTGCTCGCAGAATCGGTGCTGAGCCTGCTGCTTTGTCCCTCGGC  
ACCGAGCGCGTGCGGAGGCGTGGTTACGGCTGCGCTCCTCACGCCTCACTC  
AGCGGTCTCCAAGGCATCTGCGGCCATTGCCGCACCGAGAGACGTATGGCG  
CGCCGTTCTGACTGGCGGAGCGTTGACGCATCGGGGCGCGCGCCACCCT  
TGCCACACGTGGCGGCGGTGCATCGTGCCTGTACGCTGGCGTTCGCTTCCGC  
CCTGACCGGCGCAAGCTTCGACCCATTGCCGTGGTGCAGCGCGTCCCTGC  
GGTCATTGAAAGAAATGGCGCGTGGCTCACCGAGCCCGTACAGCCACGCAA  
GTGCCATCGCACGCTTGTTGCGCAGACTAGGGTGCAGTGACACCGATGGTC  
AGCTGCCGGCGGCGACAGCGACACTGCTCAGGAGGGTGCAGGCACGCAGC  
CGTCACAACCGCCGTGCCGGCGTCCATCGCTTTCCCCACCCGCTGCCTCCGC  
ACCTTCCGCACAAGGCAGCATTGCGGGACGCACTGCGCTGCTTGGTAAGCG  
GAGTGGAGGAGCAGCGCGTGCGGGACGGTCTGCCGCGCCTGAGTAACCTCT  
CCCACCAAGACGAGTACGCAGAGCTGCGCAGTTTTTTCGAGGAGGTGCGGG  
GAAGGCACGCTCTGCTGTGCGAAGGTCCTGCGGGGACAGCGCCAGCGGTCT

CATCGGCGCCACCGCCGGGCTCGGCTGCCTGTTGTTTCGCACCTTACGTAC  
CCTCGTCCGCAGCGACGCCTCGCGTTGCTATGATAACTTACCACAAGAGCG  
GGTGCTCGCAGCAGTGGCGTCTCTGGTGAAGCATGACGCCTACCGCGTGCTT  
CGCTTTACCGCCATTCATGCCCTGGATGGCGAGGGAGCTTGCAGGGGTGGTT  
GCCTGCTCCGGCGCACCTTCACGACGCGCACCATCCCGTGCGCGGAGGCGG  
AGTGCGGGCGTCTGGCTCGAATTCCTCGCGGCCACATCTATTGGGAGGAGG  
AGGAGGAGGGGCACACACAGGGTGGGCTCCACACCACCGCTGCCGTTTCTC  
GCACAACCGACGCTAACCGCCGCTGCGGCGCGAACCTGATTTCCGGTGCCG  
CAGTCCGCGCACTCCTGAGTGAACACATACGTCACCACCTCGTTGTGGTGTC  
GGGAGGCAGCTTGTTTGAACAGCGCGTCGGCATTCTGCAGGGCTCCCCGGT  
GGCGATGCTCCTGTGCGACCGCCTCTTCTCCGACGTCGTGGACACCGCTCTG  
TCGGGTATCCTAAGCGAGCACGCGGAGCGGTCGCTGCTGCTGCGTCGGGTC  
GACGACGTGCTTGTTGCCACCACATCACCCGCTGCGGCGGAAAGGTGCCTA  
CGGGCGATGCAGTGCGGCTGGCCCTCTGTGGGGTACGTGAGCAACCCGAGC  
AAGTTAACGCTGTCGACGGCATGCGGCCGCCTCGTTCCTGGTGCGGTCTTC  
TCCTACACGACACGACGCTCGAGGTCAGCGTGGAGTGGCGACGTATTGGGG  
TTCTACTGGCGTCTCTCCGCGTCGGCGACCCCCACTACGTGCATCGTGGGGA  
TCACGATCCGTTGTACTIONGACGCAGCGCTTTCTTGCAGTGCTGCAGCTGCGT  
GTGGCTCCCACGGCACTGTGCGGCCGTATGAACTCCAAAACCCGTCAGCTG  
CAGACCTTCTACGAGGTTGGTCTGTTATGGAGCCGTGTAGTGCTGGAGAAG  
GTGCAGGAGGCGTTGCCGGTGGCGCGTAATCGCTGCGTGGCGGTGCTACTG  
CTGCGCCCCGCTCGCCGTATGCGTGGGTGCGCTGTGCCGGTTGCTGAGTGGTC  
ATCAGCGCTTTCTAGCGGCTCGGCAGTCTGCGTGCGACGTGTCGGCTGCCGA  
GGTGCGGGCCTGCGTTTTAACAGCACTTCATCGCACGATGCAAGCCAAGCT  
GAGGGTCCTACAGGCTCGCACCGTCTGCGTGGTGACCGCTCAGAGAGGGCG  
GACACCGAGAGGGACCTCTTTAAAAGGGCGGCGGAACCACTTTTGCTCCA  
CGAGGCATTGTCTGCTGGACGCAAGTGTTGCGAGCGACGCCGCAAAGGTGCG  
TAATCGTCGTCGTAACACGCGTGTCTGCTTGCCTCCTTCTGGTGGCTGGCT  
GCCGAGAGGTTGAGTCGCAGTGGCGCCGCTCCCTTAGCGCCCTGCACAGA  
GCAGCACACGCCTTGGCGAAGCGCGCGGGCCGACCGCGCTTTCACCCTCA  
CCGGGAGCGTCGGCATCATTGCTGATGGACGATGGCCCTTTATCGATGCAC  
GCGCGTGCGCTAAGCGCGACGCGACTCTCGCAGACTTGA