

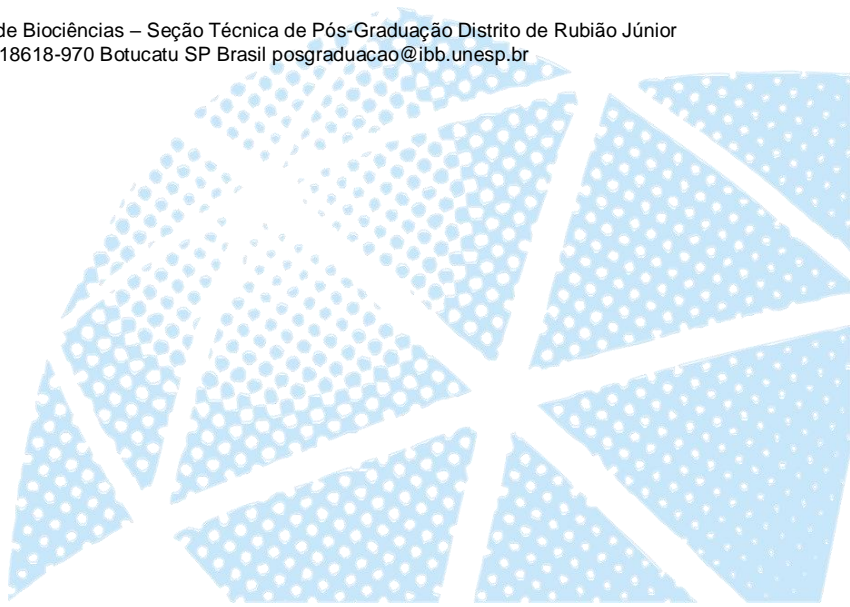
# **Análise dos efeitos da superexpressão do componente RNA da telomerase de *Leishmania major* (LeishTER)**

**Alessandro Cabral Vassilievitch**

**Botucatu – SP**

**2018**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação Distrito de Rubião Júnior  
s.n CEP 18618-970 Botucatu SP Brasil [posgraduacao@ibb.unesp.br](mailto:posgraduacao@ibb.unesp.br)



"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

**Análise dos efeitos da superexpressão do componente RNA da telomerase de  
*Leishmania major* (LeishTER)**

**Alessandro Cabral Vassilievitch**

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

**Co-Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Edna Gicela Ortiz Morea**

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

**Botucatu – SP**

**2018**

Instituto de Biociências – Seção Técnica de Pós-Graduação Distrito de Rubião Júnior s.n CEP 18618-970  
Botucatu SP Brasil posgraduacao@ibb.unesp.br



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

Vassilievitch, Alessandro Cabral.

Análise dos efeitos da superexpressão do componente RNA da telomerase de *Leishmania major* (LeishTER) / Alessandro Cabral Vassilievitch. - Botucatu, 2018

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

Orientador: Maria Isabel

Nogueira Cano Coorientador:

Edna Gicela Ortiz Morea Capes:  
20200005

1. *Leishmania major*. 2. Leishmaniose. 3. Telômero. 4. Acido ribonucleico. 5. Telomerase.

Palavras-chave: *Leishmania major*;  
Leishmaniose; RNA telomerase (LeishTER);  
Superexpressão.

## Sumário

Lista de Abreviações.....	ii
Resumo.....	iii
Abstract.....	iv
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 LEISHMANIOSE .....	1
1.2 <i>LEISHMANIA</i> SPP. ....	2
1.3 TELÔMEROS: ESTRUTURA E FUNÇÃO .....	5
1.4. O COMPONENTE TELOMERASE TRANSCRIPTASE REVERSA (TERT) .....	6
1.5. O COMPONENTE RNA DA TELOMERASE.....	7
1.5.1 A região do molde no TER (Template).....	9
1.5.2 O motivo TBE na hélice II do TER.....	9
1.5.3 Região do pseudoknot.....	9
1.5.4 STE (Stem Terminus Element) .....	10
1.6 CARACTERÍSTICAS DOS COMPONENTES MÍNIMOS DO COMPLEXO TELOMERASE DE TRYPANOSOMATÍDEOS.....	11
<b>2. OBJETIVO GERAL.....</b>	<b>13</b>
2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	13
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>14</b>
3.1 CULTURAS DE <i>LEISHMANIA MAJOR</i> NA FORMA PROMASTIGOTA.....	14
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>L. MAJOR</i> .....	14
3.3 CLONAGEM DO LEISHTER EM VETOR DE CLONAGEM .....	14
3.4 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PX63NEO-LEISHTER.....	16
3.5 DETERMINAÇÃO DO IC <sub>50</sub> DE G418 (GENETICINA) PARA FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. MAJOR</i> .....	18
3.6 TRANSFORMAÇÃO DE <i>L. MAJOR</i> COM PX63NEO E PX63NEO-LEISHTER POR ELETROPORAÇÃO .....	18
3.7 VALIDAÇÃO DOS CLONES DE <i>L. MAJOR</i> SUPEREXPRESSORES DE LEISHTER .....	19
3.8 CURVA DE CRESCIMENTO .....	21
3.9 SOUTHERN BLOT TELOMÉRICO PARA ANALISAR O PERFIL DE RESTRIÇÃO TELOMÉRICO (TRF, TELOMERE RESTRICTION FRAGMENT) DOS SUPEREXPRESSORES DE TER EM <i>L. MAJOR</i> . ....	21
3.10 COLORAÇÃO DE ORGANELAS CONTENDO ÁCIDOS NUCLEICOS USANDO DAPI .....	23
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>24</b>
4.1 CONSTRUÇÃO DO PLASMÍDEO PX6NEO-LEISHTER.....	24
4.2 DETERMINAÇÃO DO IC <sub>50</sub> DE G418 (GENETICINA) PARA FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>LEISHMANIA     MAJOR</i> .....	30
4.3 TRANSFEÇÃO DE <i>L. MAJOR</i> COM PX63NEO E PX63NEO-LEISHTER.....	31
4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE LEISHTER E TERT EM BIBLIOTECAS SL-SEQ .....	31
4.5 OBTENÇÃO DE <i>L. MAJOR</i> PROMASTIGOTAS SUPEREXPRESSANDO LEISHTER .....	32
4.6 VALIDAÇÃO DOS CLONES DE <i>L. MAJOR</i> SUPEREXPRESSORES DE LEISHTER .....	33
4.7 ANÁLISE FENOTÍPICA DO EFEITO DA SUPEREXPRESSÃO DE LEISHTER EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. MAJOR</i> .....	38
4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DOS PARASITOS SUPEREXPRESSORES .....	40
4.9 ANÁLISE DO PERFIL DE RESTRIÇÃO DOS TELÔMEROS .....	42
<b>5. CONCLUSÕES .....</b>	<b>44</b>
<b>6 .REFERÊNCIAS .....</b>	<b>45</b>
<b>7. ANEXOS.....</b>	<b>50</b>

## **Lista de Abreviações:**

**ICLc:** Índice composto de leishmaniose

***LeishTER:*** componente RNA da telomerase de *Leishmania major*.

***TbTER:*** componente RNA da telomerase de *Trypanosoma brucei*.

**LT:** Leishmaniose tegumentar.

**LM:** Leishmaniose mucocutânea.

**LV:** Leishmaniose visceral.

**TER:** componente RNA da telomerase

**TERT:** (Telomerase Reverse Transcriptase), telomerase transcriptase reversa,

**G418:** Geneticina

**RPN:** Ribonucleoproteína.

**TLC1:** Componente RNA da telomerase de *S. cerevisiae*.

**EST2:** (Ever Shorter Telomere 2) Nomenclatura usada para se referir a proteína TERT de *S. cerevisiae*.

**CR4/CR5:** Nomenclatura da região de interação com proteínas do RNA telomérico de *Homo sapiens*.

**hTR:** Nomenclatura do RNA telomérico em *Homo sapiens*.

**lncRNA:** RNA longo não codante (*Long non coding RNA*)

## Resumo

Parasitas do gênero *Leishmania* pertencem à família Trypanosomatidae, os quais causam a leishmaniose, doença tropical negligenciada, que pode se apresentar em três formas clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral. O Brasil é um dos países mais afetados pela doença, devido principalmente às condições socioeconômicas, às mudanças climáticas e ambientais. Pesquisas relacionadas à biologia da *Leishmania* contribuem para o entendimento dos mecanismos fisiológicos do parasito, e assim fornecem a possibilidade de encontrar novos alvos terapêuticos. O estudo dos telômeros de *Leishmania* se mostram promissores, já que estão relacionados com a estabilidade do genoma. Os telômeros estão localizados nas extremidades dos cromossomos e são responsáveis por proteger os cromossomos assegurando que a informação genética seja corretamente copiada durante a duplicação celular. Os telômeros são alongados por uma transcriptase reversa especializada denominada telomerase. A telomerase é uma ribonucleoproteína, constituída por duas subunidades, uma proteína com função de transcriptase reversa denominada TERT, e um componente RNA (TER) que contém a sequência do molde da repetição telomérica copiado pela TERT. Estudos recentes mostram que o TER possui outras funções além de conter apenas um molde para alongamento dos telômeros. Sua estrutura secundária possui domínios com funções de controle da inserção de nucleotídeos pelo TERT, reconhecimento da sequência e ligação de proteínas acessórias. Recentemente foi identificado e parcialmente caracterizado o componente TER da telomerase de *Leishmania* spp. (LeishTER), mas sua biogênese e funções ainda permanecem desconhecidas. No presente trabalho foi verificado que a superexpressão de LeishTER tem um efeito dominante negativo sobre o desenvolvimento, morfologia e crescimento do parasito. Os resultados mostram que a superexpressão do TER possui efeito drástico na proliferação dos parasitos, fazendo com que a densidade populacional apresente um declínio considerável durante o crescimento exponencial, culminando na morte celular sem que a população atinja a fase estacionária de crescimento. Além disso, pode-se observar uma discreta diminuição no tamanho dos telômeros desses parasitos. Concluimos que a superexpressão de LeishTER em *L. major* afeta o ciclo celular e o crescimento do parasito, provavelmente devido a impossibilidade dos parasitos em manterem seus telômeros adequadamente, embora mais estudos sejam necessários para elucidar como o excesso de LeishTER afeta mecanismos e processos celulares importantes para manter a homeostase do parasito.

**Palavras chave:** *Leishmania major*, Leishmaniose, RNA telomerase (LeishTER), Superexpressão

## Abstract

Parasites of the *Leishmania* genus belong to the Trypanosomatidae family, which present peculiar and particular characteristics. Among them are the species that cause leishmaniasis, a neglected tropical disease that can be expressed in three different clinical forms: cutaneous, mucocutaneous and visceral. Brazil is one of the most affected countries, due mainly to socioeconomic conditions, climate change and environmental alterations. Research related to the biology of *Leishmania* contributes to the understanding of the important physiological mechanisms of the parasite, and thus provide new therapeutic targets against the disease. The study of *Leishmania* telomeres appears promising since they related are to the genome stability. Telomeres are nucleoprotein structures located at the ends of the chromosomes and are responsible for protecting the chromosomes ensuring that the genetic information copied is correctly during cell duplication. DNA polymerase does not elongate telomeres as the rest of the genetic material, and thus maintained are by the action of a specialized reverse transcriptase named telomerase. Telomerase is a ribonucleoprotein minimally composed by two subunits, a protein with reverse transcriptase function TERT, and an RNA component (TER) that contains the telomeric repeat template sequence copied by TERT. Recent studies shown that TER has other functions besides being just a template for telomeres elongation. Its secondary structure has domains with control functions of nucleotide insertion by TERT, sequence recognition and attachment of accessory proteins. The TER component of *Leishmania* telomerase (LeishTER) has recently been identified and partially characterized, but known is nothing about its biogenesis and its functions. The present work aims to verify the effects of the overexpression of LeishTER on parasite development, morphology and telomere maintenance. Preliminary results shown here demonstrated that we were able to clone the gene in a cloning vector and to subclone the gene in a *Leishmania* expression vector. The results also show that the overexpression of the TER has a dominant negative effect over parasite's proliferation causing a rapid decline on population doubling inducing parasite death before they reach the stationary phase of growth. In addition, during the exponential growth there is a slight decrease in parasite telomere length. We conclude that the overexpression of LeishTER in *L. major* strongly affects parasite cell cycle probably by the impairment of telomere maintenance, although more studies are needed to elucidate the mechanisms and processes affected by the excess of this lncRNAs and why they are important to maintain parasite homeostasis.

**Key Words:** *Leishmania major*, Leishmaniasis, Telomerase RNA, super expression

## 1.Introdução

### 1.1 Leishmaniose

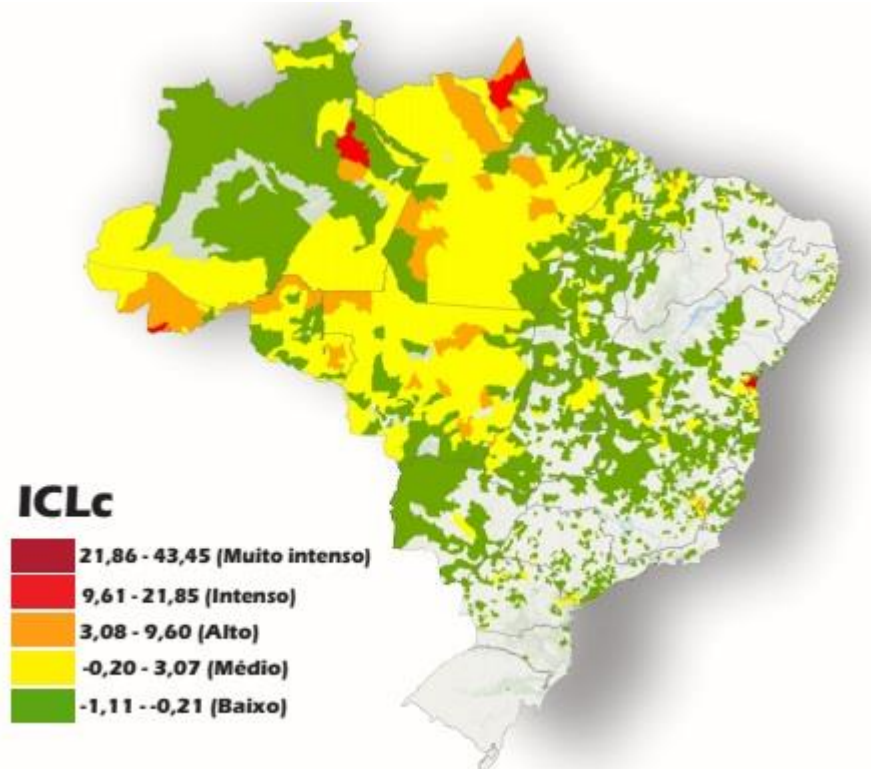
A leishmaniose é uma doença negligenciada encontrada em mais de 90 países nos trópicos, subtropicais e sul da Europa. Ações antrópicas como desmatamento e poluição têm contribuído para a expansão da doença, principalmente em áreas urbanas. (CDC, 2013)

A leishmaniose pode se manifestar de três formas clínicas distintas: leishmaniose tegumentar (LT), leishmaniose mucocutânea (LM) e leishmaniose visceral (LV). A primeira causa feridas e ulcerações na pele que provocam cicatrizes permanentes e possível debilidade, sendo a mais comum, com mais de dois terços dos novos casos distribuídos em 6 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Iran e Síria. A segunda causa destruição das mucosas do nariz, boca e garganta, afetando, principalmente, países da América do Sul como Bolívia, Brasil e Peru. A última, e mais grave entre elas, compromete o fígado, o baço e a medula, levando à morte caso não seja devidamente tratada; 90% dos casos desta forma clínica estão concentrados nos países Brasil, Ethiopia, India, Kenya, Somalia, Sudão do Sul e Sudão. (CDC, 2013; WHO, 2015)

Segundo *Centers for Diseases Control and Prevention*(CDC) (2013), não se tem dado a devida atenção para o crescimento da leishmaniose no mundo. A cada ano são estimados de 200.000 a 400.000 novos casos da LV e de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos de LT, sendo que o Brasil é um dos 5 países com mais novos casos por ano.

Segundo dados da Organização Panamericana de Saúde, em 2016, foram registrados 12.690 novos casos de LT e LM no Brasil, sendo 94% dos casos de leishmaniose tegumentar. Além disso, foi registrado um índice de letalidade de LV de 7,9%, o maior no continente americano. Quanto à transmissão da doença, calculada pelo Índice composto de leishmaniose (ICLc), a classificação foi considerada intensa, apresentando predominância nas regiões norte e centro-oeste do Brasil como mostra a figura 1. (OPAS; OMS, 2018)





**Figura 1: Índice composto de Leishmaniose (ICLc) no Brasil em 2016.** Extraído de: [http://www.panaftosa.org/leish/inf2016\\_pt/INFO\\_BRA\\_PORTUGUES\\_2016.pdf](http://www.panaftosa.org/leish/inf2016_pt/INFO_BRA_PORTUGUES_2016.pdf)

Atualmente diversas pesquisas estão sendo realizadas em busca de tratamentos e estratégias eficientes contra a leishmaniose, devido à necessidade de encontrar fármacos ou metodologias que proporcionem segurança para os pacientes e que possam combater ou prevenir esta doença (CHAPPUIS et al., 2007).

Os principais fármacos usados para o tratamento da leishmaniose são antimoniais pentavalentes e anfotericina b, porém já existem estudos que mostram que esses fármacos não são tão eficientes e que os parasitos podem adquirir resistência aos mesmos. (NÜHS et al., 2014)

## **1.2 *Leishmania* spp.**

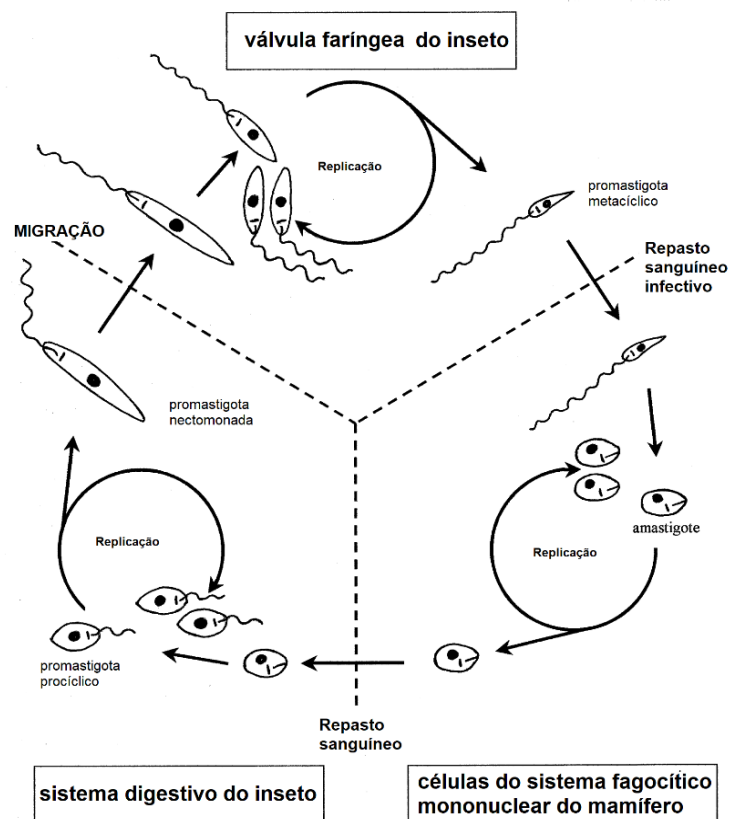
A leishmaniose é transmitida pela picada de insetos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo), infectados por parasitos do gênero *Leishmania*. Existem aproximadamente 20 espécies de parasitos, que são transmitidos por cerca de 30 espécies de flebotomíneos (CDC, 2013; WHO, 2015).

As *Leishmanias* são subdivididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. Os parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania* realizam a maturação estritamente nas porções média e anterior do intestino do *Phlebotomus*. Já os parasitos do subgênero *Viannia*, tem uma primeira fase na porção posterior e ao decorrer da maturação, alcançam as porções média e anterior do intestino do hospedeiro invertebrado. (LAINSON; WARD; SHAW, 1977; LAINSON, 2010)

No Brasil, foram identificadas sete espécies, seis delas pertencentes ao subgênero *Viannia* (V.) e uma do subgênero *Leishmania* (L.). Dentre elas, as espécies mais frequentes causadores de leishmaniose no Brasil são: *L. (V.) braziliensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L.(L.) amazonenses*. Recentemente, outras quatro espécies foram identificadas na região Norte e Nordeste: *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi*. (BRASIL, 2017)

Os parasitos do gênero *Leishmania* são heteroxênicos, precisando de dois hospedeiros para completar um ciclo de maturação, sendo estes hospedeiros um mamífero e um invertebrado. Durante seu desenvolvimento eles se apresentam basicamente em duas formas: promastigota e amastigota. A forma promastigota procíclica encontra-se no sistema digestivo dos insetos (hospedeiro intermediário), tem forma afunilada, cinetoplasto e um flagelo em uma das extremidades. Ao atingir a maturação, se transforma em promastigota metacíclica e migra para a probóscide. Os promastigotas metacíclicos, são injetados na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero durante o repasto sanguíneo do inseto e passam para o estágio amastigota após serem fagocitados por macrófagos do sistema fagocítico mononuclear. Os amastigotas apresentam-se no formato esférico com núcleo deslocado para as extremidades, um cinetoplasto e flagelo inaparente. (NEVES, 2011)

Na Figura 2 está exemplificado o ciclo de desenvolvimento do parasito dentro dos hospedeiros invertebrado (Phlebotomo) e vertebrado (mamífero). A figura mostra mais detalhadamente a classificação proposta por Gossage, Rogers e Bates, (2003), onde o promastigota procíclico, representa o parasito que apresenta alta proliferação celular, o promastigota nectomonada, que migra do sistema digestório do inseto para a probóscide onde se transforma em promastigotas leptomonadas e em seguida em metacíclicos, que são as formas infectivas e não proliferativas.



**Figura 2. Ciclo de desenvolvimento de *Leishmania* spp.** Demonstrando os diferentes estágios de desenvolvimento durante a passagem do parasito dentro do hospedeiro invertebrado (mosquito) e do hospedeiro vertebrado (mamífero) (Extraída de Gossage, Rogers e Bastes, 2003)

As diferentes espécies de *Leishmania* não são distinguíveis por microscopia ótica devido a sua grande semelhança fenotípica, porém, podem ser diferenciadas por técnicas moleculares, análise de isoenzimas, anticorpos monoclonais (CDC, 2013) e pela duração de seu ciclo celular na forma promastigota. Por exemplo, existem grandes diferenças na duração de um ciclo completo de replicação de formas promastigotas de duas espécies de *Leishmania* que causam a forma tegumentar da doença. Em *L. major*, agente causal da forma tegumentar no velho mundo, a duração do ciclo é de aproximadamente 10 horas, enquanto promastigotas de *L. amazonensis*, que causam a forma tegumentar da doença nas Américas, completam um ciclo celular em 7 horas. Além disso, elas também se diferem quanto ao tempo de divisão das organelas que contém DNA (núcleo e cinetoplasto, este último representa o DNA mitocondrial do parasito). Enquanto em *L. amazonensis* foi observado que 65% dos parasitos dividem o cinetoplasto depois do núcleo e 35% dos parasitos dividem o cinetoplasto antes do núcleo, em *L. major* o cinetoplasto sofre duplicação antes da divisão nuclear (AMBIT et al., 2011; DA SILVA et al., 2013).

Embora a regulação do ciclo celular desses parasitos ainda não esteja bem esclarecida, estes achados demonstram as diferenças biológicas intraespecíficas que reforçam a busca por novos alvos terapêuticos contra a leishmaniose. Um dos possíveis alvos terapêuticos são os telômeros, sendo uma de suas principais funções a manutenção da estabilidade genômica, vital para a homeostase e multiplicação celular. (SEKARAN; SOARES; JARSTFER, 2014)

### 1.3 Telômeros: Estrutura e Função

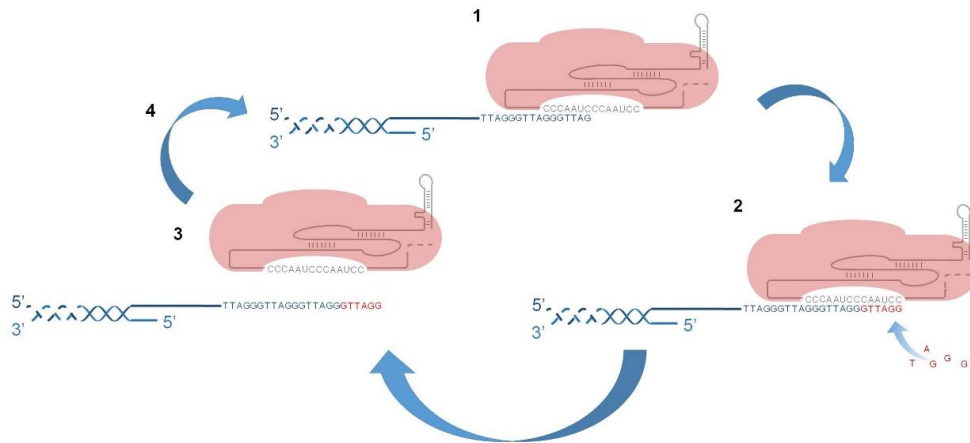
Telômeros são estruturas nucleoprotéicas localizadas nas extremidades dos cromossomos lineares, constituídos por repetições curtas em *tandem*, que em *Leishmania* spp. é composta por 6 nucleotídeos: TTAGGG. O telômero é caracterizado por uma fita rica em G, que se estende além da sua fita complementar, a fita rica em C, formando uma protusão em direção ao término do cromossomo, denominado 3' G-overhang (SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004; HUG; LINGNER, 2006). Estão presentes principalmente em eucariotos, já que células procariotas possuem geralmente DNA na forma circular. (CANO, 2001)

Os telômeros possuem, principalmente, função estrutural, prevenindo a degradação, translocação e recombinação, com intuito de proteger a informação genética para que ela possa ser repassada ao longo das múltiplas divisões celulares. São vitais para a finalização da replicação, assim como para a regulação do comprimento do DNA telomérico. Além disso, estão associados a outras funções como: manutenção da arquitetura nuclear, envelhecimento e regulação da transcrição. (PALM; DE LANGE, 2008)

A perda da sequência telomérica é comum em células já diferenciadas e ocorre toda vez que acontece replicação do DNA (problema do término da replicação do DNA). Porém, na natureza, existem diferentes mecanismos para compensar e evitar esse desgaste (BIESSMANN; MASON, 1997). Na maioria dos organismos, a síntese dos telômeros, é feita pela telomerase, uma ribonucleoproteína (RNP) especializada, com ação de transcriptase reversa, que utiliza a fita rica em G dos telômeros como substrato para a replicação dos mesmos. (SINGER; GOTTSCHLING, 1994).

Associadas à telomerase existem proteínas acessórias espécie-específicas que auxiliam na montagem do complexo RNP e na regulação da atividade e processividade (ZAPPULLA; CECH, 2006). A expressão dessas proteínas acessórias da telomerase é organismo-dependente e finamente regulada. (LINGNER, 1997)

Segundo Weinrich et al. (1997) a atividade basal do complexo RNP se dá pela ação de seus componentes mínimos, representados por suas subunidades catalíticas uma proteína especializada com função de transcriptase reversa, a telomerase transcriptase reversa (TERT) e um RNA não codante, o RNA telomerase (TER) (Fig. 3). Os dois componentes são de extrema importância também para a manutenção dos telômeros *in vivo*. (GREIDER; BLACKBURN, 1987)



**Figura 3. Ciclo de replicação dos telômeros pelo complexo RNP telomerase.** Primeiro o complexo telomerase interage com os telômeros a partir da associação do TER, com o terminal cromossômico simples fita 3' G-overhang (1). Em seguida a TERT adiciona nucleotídeos na extremidade 3' do DNA telomérico, utilizando o molde contido no TER, até que se complete uma repetição telomérica (2). Este processo é conhecido como adição progressiva de nucleotídeos (NAP). Então, o sítio ativo TERT se dissocia (3) e se transloca para reposicionar a extremidade 3' do molde na repetição telomérica recém-formada, reiniciando novo ciclo de elongação dos telômeros (4). Figura extraída de Giardini et al, (2014).

#### 1.4. O componente Telomerase Transcriptase Reversa (TERT)

O componente TERT é uma estrutura bem conservada, com tamanho variando de 900 a~1450 aminoácidos, contendo quatro domínios estruturais e funcionais: N-Terminal da TERT (TEN), domínio de ligação do RNA telomerase (TRBD), domínio transcriptase reversa (RT) e extensão C-terminal (CTE) (MASON; SCHULLER; SKORDALAKES, 2011). Na região amino-terminal, encontram-se os domínios exclusivos das telomerasas, os domínios TEN e TRBD (JACOBS; PODELL; CECH, 2006) que são fundamentais na interação com ácidos nucleicos e com outras proteínas do complexo telomerase (JANSSON et al., 2015). Na região carboxi-terminal, os domínios RT e CTE possuem similaridade estrutural aos das transcriptases reversas canônicas e estão associados com a catálise enzimática. O domínio RT possui alta conservação estrutural comparada as transcriptases reversas clássicas, apresentando a formação de regiões conhecidas como “dedos” (*fingers*) e “palma” (*palm*) da

proteína (GILLIS; SCHULLER; SKORDALAKES, 2008) e o CTE representa o “polegar” (*thumbs*), uma região menos conservada, mas também com importância na atividade enzimática. (HOFFMAN; RICE; SKORDALAKES, 2017)

### 1.5. O componente RNA da telomerase

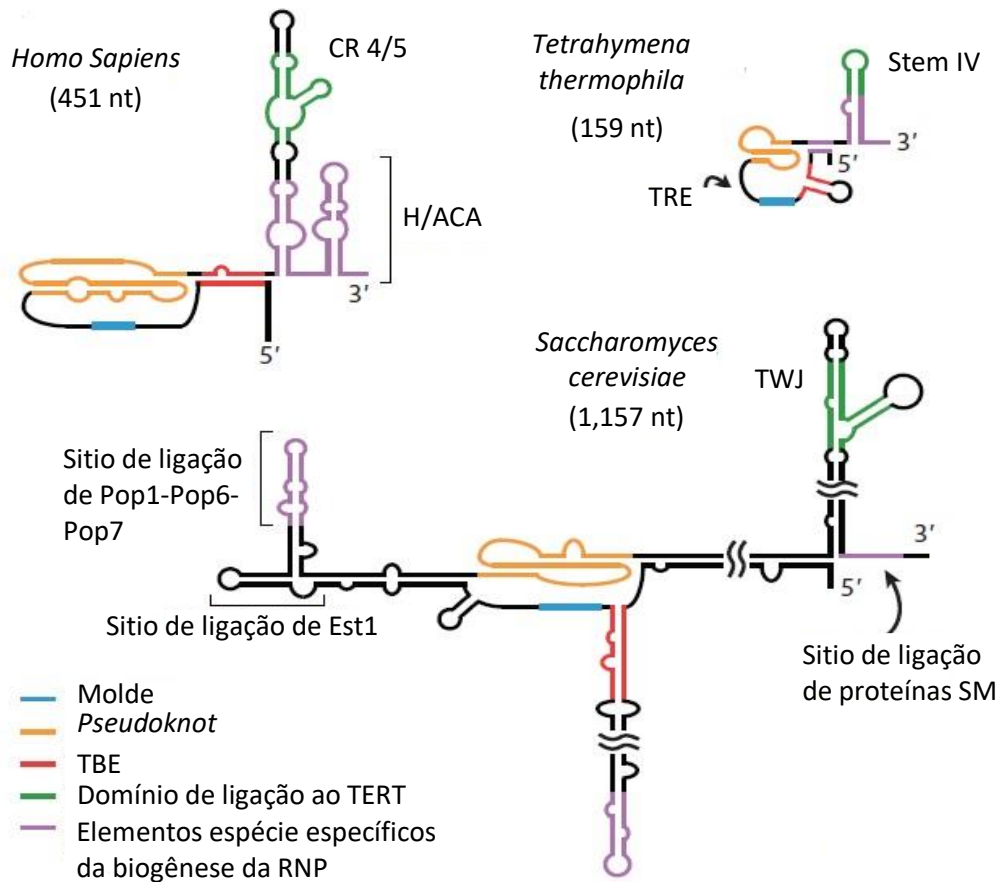
TER é um longo RNA não codificador considerado um dos principais componentes do complexo telomerase, pois contém a sequência molde que é copiada pelo componente TERT durante a replicação dos telômeros (GILSON; GÉLI, 2007; LONDOÑO-VALLEJO; WELLINGER, 2012). Além disso, o TER auxilia na montagem do complexo ribonucleoproteico (RNP) da telomerase. (ZAPPULLA; CECH, 2006; STONE et al., 2007)

Embora o TER seja conservado entre os organismos, seu tamanho e composição de sequência nucleotídica varia. O tamanho da sequência primária do TER pode variar de 47-209nt até 2.200nt em protozoários ciliados e em *Plasmodium falciparum* e *T. brucei* respectivamente (CHEN; GREIDER, 2004; BLACKBURN; COLLINS, 2011; GUPTA et al., 2013; SANDHU et al., 2013). Esta variabilidade sugere uma adaptação evolutiva de cada organismo para permitir maior rendimento do complexo RNP da telomerase. (BLACKBURN; COLLINS, 2011)

A base das atividades bioquímicas do TER e sua estrutura secundária são conservadas (CHEN; BLASCO; GREIDER, 2000; ZAPPULLA; GOODRICH; CECH, 2005) sendo que todos os TER encontrados até o momento possuem na porção 5' da molécula, elementos importantes para a catálise da telomerase como a região do molde, que consiste na sequência reversa complementar da repetição telomérica (LUE, 2004), o motivo TBE (*Template Boundary Element*), envolvido com a interação com a TERT (LAI; BA; MOSES, 2012), alguns possuem um *pseudoknot* envolvido com a montagem do complexo RNP e a maioria possui o motivo STE (Stem terminal Element) o qual está envolvido na estabilidade, localização celular do RNA, interação com a TERT e montagem do complexo. (WU et al., 2017) (Figura 4). Detalhes sobre essas estruturas estão descritas nos próximos subtópicos.

Foi observado em leveduras, que o TER também atua como um suporte flexível para o acoplamento de proteínas acessórias. Isto foi baseado em duas evidências: a primeira vem de um trabalho de Livengood, Cech e Zaug (2002) que mostra que grandes porções do RNA telomérico podem ser deletadas sem grandes perdas de função *in vivo*, e a segunda do trabalho de Seto et al., (2002) mostrando que o TER sofre diferenciação muito rapidamente, visto a

grande divergência das sequências TER em espécies do gênero *Saccharomyces spp.*, as quais compartilham somente 43% de identidade, sendo que a similaridade entre outros RNAs não codantes (U1, RNase P e 18srRNA) é da ordem de 82 e 99%, reforçando que grandes porções do TER podem estar relacionadas a interação com proteínas espécie-específicas.



**Figura 4. Esquema da estrutura secundária de TER.** Três organismos diferentes, evidenciando os quatro motivos conservados: *Template*, *TBE*, *pseudoknot* e *STE* (representado pelos elementos CR4/5 em *H. sapiens*, *Stem IV* em *T. thermophila*, e *TWJ* em *S. cerevisiae*). Figura extraída e traduzida de Wu. Et al., (2017).

Estudos sobre a função do TER se ativeram principalmente em desvendar a função de cada um de seus elementos estruturais, segundo descrito nos tópicos a seguir, porém, em *Saccharomyces cerevisiae*, a superexpressão do componente TER (TLC1), causa encurtamento dos telômeros e também desativa o silenciamento de genes posicionados em região telomérica (SINGER; GOTTSCHLING, 1994). Foi demonstrado que infecções por *Helicobacter pylori* aumentam os níveis de expressão do TER humano (hTR) na mucosa gástrica e essa expressão progride juntamente com a infecção, podendo levar ao surgimento de um carcinoma (HUR et al., 2000). Também encontraram o hTR superexpresso em tecido canceroso de esôfago e próstata, mostrando que a superexpressão do TER humano pode estar

envolvido na carcinogênese. Devido à alta expressão em tecidos cancerosos, o hTR mostra-se promissor como marcador molecular de carcinogênese em estágios iniciais. (ABRAHAM; MELTZER, 2017; HUR et al., 2017)

### **1.5.1 A região do molde no TER (Template)**

A região do molde é o centro catalítico da telomerase, sendo que, na maioria das espécies, é constituído por uma sequência contendo uma cópia e meia da repetição do DNA telomérico. O pareamento entre o molde e o DNA telomérico de fita simples é facilitado pela exposição do molde, na interação de TER-TERT. (WEBB; ZAKIAN, 2016). Deleções e mutações causadas nesta região no TER de *T. brucei* resultam em repetições teloméricas alteradas, ativando a maquinaria de reparo a danos no DNA e fusão dos terminais, evidenciando sua importância na atividade telomérica.

Mceachern Blackburn, (1995), com a inserção de uma sequência alterada no molde no TER de *K. lactis*, observaram que o tamanho dos telômeros aumentava, porém, os transformantes apresentavam baixa viabilidade, morfologia alterada e presença de agregados de células senescentes.

### **1.5.2 O motivo TBE na hélice II do TER**

Segundo Blackburn e Collins (2011), em alguns vertebrados e ciliados, o TBE encontra-se a uma curta distância do molde, posicionado no terminal 5' do TER, situado no centro ativo do TER, juntamente ao molde e ao *pseudoknot*. O TBE faz parte da hélice II localizada a montante do molde e tem a capacidade de interagir com o domínio TRBD da TERT.

Por meio de sequestro de nucleotídeos, o TBE previne que a replicação pela telomerase ultrapasse o término da sequência do molde evitando que a TERT insira bases nos telômeros, que não façam parte da repetição telomérica. (COLLINS, & MILLER, 2002)

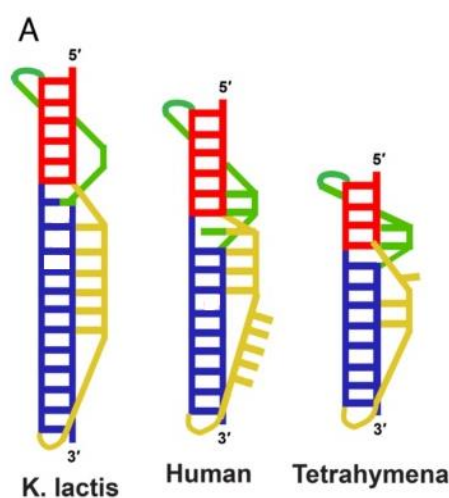
### **1.5.3 Região do *pseudoknot***

Segundo Webb e Zakian, (2016) o *pseudoknot* é uma tripla hélice dentro do centro da RNP, formado pelo emparelhamento de bases que formam uma alça. Mutações no *pseudoknot*



do TER de *K. lactis* produzem repetições teloméricas alteradas *in vivo*, mesmo sem alteração da atividade telomérica *in vitro* (COLLINS; MILLER, 2002)

Cash e Feigon (2017), com o estudo estrutural do *pseudoknot* do TER de *Tetrahymena thermophila*, observaram que o *pseudoknot* se localiza do lado oposto do template quando o TER se insere à TERT, ou seja, longe do centro catalítico do TER. Assim, uma hipótese seria que embora ele não seja um consenso e não esteja presente na estrutura de alguns TERT, o *pseudoknot* atua na montagem do complexo TERT-TER, sinalizando a posição correta de acoplamento. Assim como os outros motivos, o *pseudoknot* possui uma estrutura secundária muito semelhante entre os organismos que o possuem, como ilustrado na figura 5.



**Figura 5. Estrutura secundária da região do *Pseudoknot*.** Modelo do *pseudoknot* de *Klueveromyces lactis*, *Homo sapiens* e *Tetrahymena thermophila* (na ordem da esquerda para a direita), evidenciando em vermelho a Haste A, em azul a haste B, em amarelo o Loop A e em verde o Loop B, mostrando a alta similaridade entre as estruturas (Figura adaptada e extraída de Cash e Feigon, 2017)

#### 1.5.4 STE (*Stem Terminus Element*)

O STE foi descrito primeiramente em mamíferos, mostrando ser essencial para atividade da telomerase tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O STE, denominado de CR4/CR5 em humanos, possui uma sequência conservada entre vertebrados. São regiões mediadoras da interação do RNA telomérico com a proteína TERT. (MITCHELL; COLLINS, 2000)

Em ciliados, o TER não apresenta o CR4/CR5, mas sim uma região *Stem loop IV*. Por estar posicionado distante do centro catalítico de TER, Webb e Zakian (2016) propõe que alterações na posição de STE regulem a atividade da telomerase, afetando assim o centro ativo da enzima. A posição do STE no lado externo do complexo RNP, o torna um candidato

interessante para desenvolvimento de fármacos, já que a maior parte do TER fica associado a TERT. (ZEMORA; HANDL; WALDSICH, 2016)

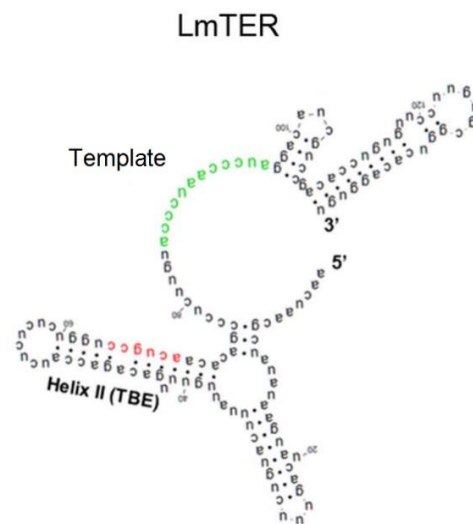
## **1.6 Características dos componentes mínimos do complexo telomerase de trypanosomatídeos**

A atividade enzimática da telomerase foi detectada primeiramente em extratos celulares de três espécies de *Leishmania* no estágio promastigota, assim como em estágios replicativos de *T. brucei* e *T. cruzi*. A atividade de polimerização das enzimas destes parasitos preenchem todos os critérios essenciais para a atividade da telomerase encontrada na maioria dos eucariotos (CANO et al., 1999; MUÑOZ et al., 2004; GIARDINI ET AL., 2011). Anos depois, Giardini et al., (2006) clonaram e caracterizaram o gene que codifica a telomerase de 4 espécies diferentes de *Leishmania* e mostraram que a mesma contém todos os domínios estruturais e funcionais encontradas nas TERTs de outros organismos, embora apresente substituições de aminoácidos que são características somente do gênero.

Mais tarde, a atividade de telomerase de *L. amazonensis* foi purificada a partir de um extrato proteico semi-purificado usando uma coluna de afinidade rica em DNA telomérico da fita G molde. Usando o ensaio clássico para detectar a atividade de telomerase, Cano et al. (1999) descreveu pela primeira vez parte da sequência do molde do TER de *T. brucei*. Recentemente, confirmou-se que essa sequência apresenta alta homologia com a sequência do molde encontrada no gene que codifica o TER de *T. brucei*. (SANDHU ET AL., 2013)

Um lncRNA candidato a TER de *Leishmania*, denominado LeishTER foi caracterizado por Vasconcelos et al., (2014) (Fig. 6). LeishTER foi encontrado em uma combinação de análises *in silico* com resultados de buscas por candidatos em três bibliotecas de RNA-seq fornecidas pelo Dr. Peter Myler (Washington University). O gene que o codifica foi mapeado em um locus sintênico no cromossomo 25 de cinco espécies de *Leishmania* que compartilham sintenia parcial com o locus TER de *T. brucei* e um locus contendo um candidato putativo a TER de *Crithidia fasciculata*. O transcrito de aproximadamente 2.100 nt (LeishTER) é modificado por *trans*-splicing e contém no cap 5' a sequência leader (SL, spliced leader) e uma cauda polyA no terminal 3', além de um domínio do tipo C/D box snoRNA. LeishTER é expresso em níveis similares em formas promastigotas crescendo em fase logarítmica e estacionária. A forma madura de LeishTER contendo o 5' SL cap co-precipita e co-localiza com o componente protéico da telomerase (TERT) de forma dependente da fase do ciclo celular. A predição da estrutura secundária de LeishTER sugere

fortemente a existência de uma sequência molde simples fita localizada próxima ao terminal 5' e um motivo conservado C[U/C]GUCA contido na hélice II, que representa o elemento TBE responsável por interagir com o domínio de interação com o RNA na telomerase (TRBD, *Telomerase RNA Binding Domain*).



**Figura 6. Modelo preditivo da estrutura secundária de LeishTER em *L. major*.** Esta figura apresenta a Hélice II contendo o motivo TBE 5'CCGUCA3' em vermelho, e a sequência molde (*template*) da repetição telomérica em verde (Figura extraída de Vasconcelos et al., 2014).

O presente trabalho visa iniciar estudos sobre a função de LeishTER e para isso propormos avaliar os efeitos da superexpressão de LeishTER sobre a morfologia e a proliferação celular de *Leishmania major*, assim como verificar se a superexpressão altera o tamanho dos telômeros do parasito.

## **2. Objetivo Geral**

Analisar os efeitos biológicos da superexpressão do componente RNA da telomerase de *Leishmania major*.

### **2.1 Objetivos Específicos**

- Subclonar o gene putativo LeishTER no plasmídeo pX63NEO
- Analisar os efeitos morfológicos e o perfil de crescimento de *Leishmania major* em linhagens superexpressando LeishTER
  - Verificar se a superexpressão de LeishTER afeta o tamanho dos telômeros em *Leishmania major*

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Culturas de *Leishmania major* na forma promastigota

Para todos os experimentos deste projeto, foi utilizada a espécie *Leishmania major* (MHOM/IL/1980/FRIEDLIN) cedida pelo CLIOC (coleção de *Leishmania* do Instituto Oswaldo Cruz) sob a sigla IOC/L2821. Formas promastigotas de *L. major* foram cultivadas em estufa B.O.D. incubadora com temperatura de 26°C, utilizando meio 199 1X pH 7,3. (Cultilab) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (Cultilab) inativado pelo calor (Kapler; Coburn; Beverley, 1990), 1X de antibióticos/antimicóticos (penicilina e estreptomicina)(Life Technologies,Gibco-BRL), 40 mM Hepes, 10 mM Adenina, 0,0001 % de Biotina e 0,0005% de Hemina. As culturas de *Leishmania* advindas da forma amastigota, ao passarem para a forma promastigota, foram consideradas como passagem 0 (P0). As culturas então, após 4 dias estando na fase logarítmica, se repicadas denominam-se passagem 1 (P1) e assim sucessivamente. Neste trabalho foram utilizadas culturas das passagens 4 (P4) e 7 (P7), pois contém formas promastigotas bem adaptadas ao meio de cultura. (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003;INBAR et al., 2017)

#### 3.2 Extração de DNA genômico de *L. major*

Para a obtenção de DNA genômico de promastigotas de *L. major* foi usado o método descrito em Mottram, (2008). O método consiste em centrifugação dos parasitos à 3000 rpm e duas lavagens de PBS 1x. Após as lavagens, procedeu-se a lise celular com tampão TELT (50 mM TRIS pH 8,0, 62,5 mM EDTA pH 9,2,5 M LiCl e 4% Triton x-100) contendo 50 µg/ml de proteinase K. A purificação dos ácidos nucleicos foi realizada usando-se extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1, v/v). As amostras foram então tratadas com RNase A (10 µg/µl) e quantificadas em espectrofotômetro a DO<sub>260nm</sub>.

#### 3.3 Clonagem do LeishTER em vetor de clonagem

Baseado na sequência putativa foi amplificado o LeishTER utilizando iniciadores específicos que contem sítios para as enzimas de restrição *SmaI* (TER-F) e *BglII* (TER-R) nas extremidades, (Tabela 1) para permitir que o mesmo fosse subclonado de forma direcional. Para a amplificação foi utilizado DNA genômico de *L. major* na forma promastigota, utilizando o kit comercial Platinum ® Taq DNA Polymerase (invitrogen)

**Tabela 1. Sequências dos iniciadores usados neste trabalho**

pX63NEO-F	5' CACCACCCTCAACCACCC 3'
pX63NEO-R	5'CAATACGCAAACCGCCTC 3'
TER 3-F	5'TGTACCCTAACCTAGGACATC 3'
TER 3-R	5' GATGTCCTAGGGTTAGGGTACA 3'
TER 5-R	5'CTGAACGTGAAATGCACCA 3'
M13-F	5'GTAAAACGACGGCCAG 3'
M13-R	5'CAGGAAACAGCTATGAC 3'
TER-F	5' TTTGACAGACCATCTCTCTCTGG 3'
TER-R	5' GGAGATGAGGGAAGACGAAG 3'
TER RT-F	5'GAGAACTAGCACGGCCACTC 3'
TER RT-R	5'GAGGATCGCGCTACAAAGTC 3'
RPN8-F	5'ATGAACCGCCGCAAGCT 3'
RPN8-R	5'GGCGCGACGATCTTTGATT 3'
TRY-F	5'GAGCGTCGGCATTTCAT 3'
TRY-R	5'CGATGGTGTTGTGGAAGTCACT 3'
AlfaTUB-F	5'CTCGTCGTTCTCTCGACATT 3'
AlfaTUB-R	5'CACAAGGTTCGTCTGGAACT 3'
DIG-TelC	5'CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA3'

\*Na tabela, F significa *Foward*, indicando que o iniciador é senso.

\*\*Na tabela, R significa *Reserve*, indicando que o iniciador é antisenso.

O fragmento contendo 2.100 pb, foi verificado através de electroforese em gel de agarose 1%, e 0,1µg/ml de brometo de etídeo e visualizado através de um transluminador com luz ultravioleta.

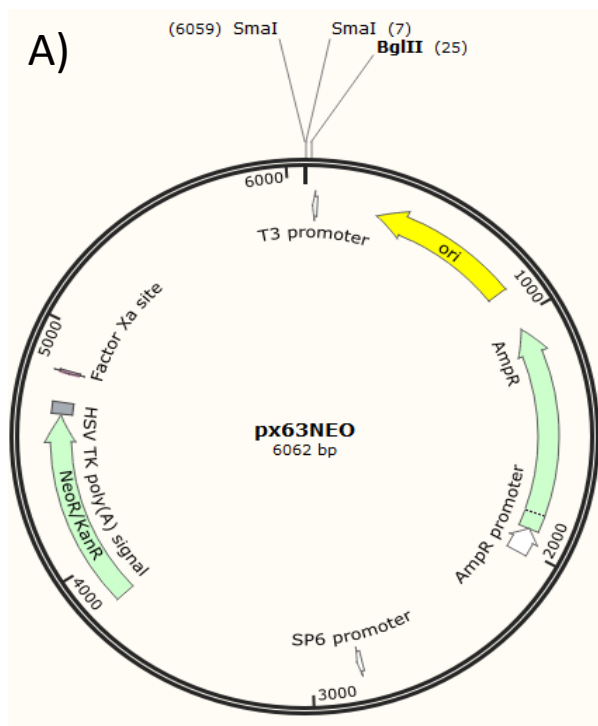
Após a confirmação do amplicon, o mesmo foi utilizado para clonagem no vetor pGEM-T Easy (Promega), seguindo as recomendações do fabricante, e em seguida o produto da clonagem foi usado para transformar bactérias *Escherichia coli* DH5α por eletroporação. As bactérias transformantes foram plaqueadas em placa de Petri contendo meio LB (Luria-Bertani) sólido e o antibiótico de seleção (100 µg/mL Ampicilina).

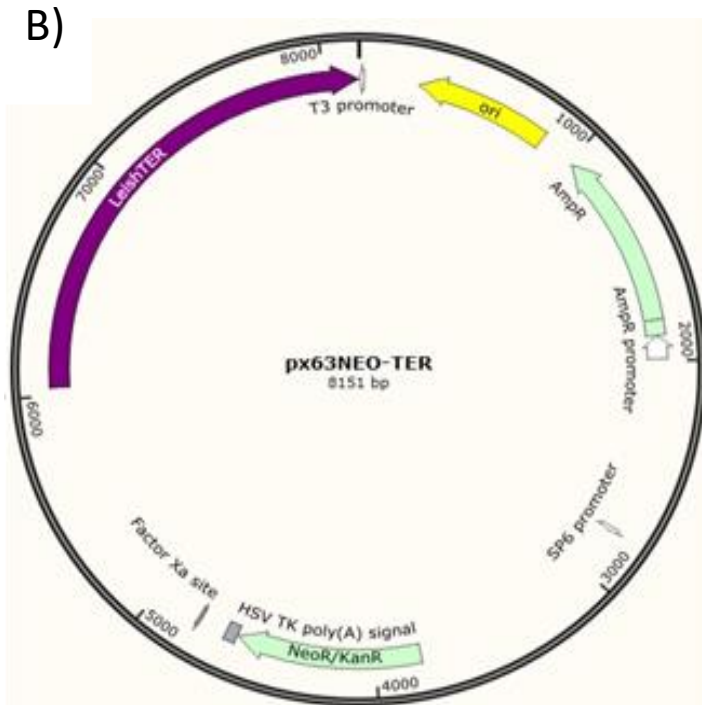
Posteriormente foi extraído DNA plasmidial dos clones recombinantes utilizando o kit comercial Plasmid Plus Midi Kit (Quiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Para confirmar a clonagem, foram realizadas análises de restrição e posteriormente o

sequenciamento do DNA pelo método Sanger. As sequências de nucleotídeos foram analisadas usando-se pareamento múltiplo e o banco de dados público NCBI utilizando a ferramenta Blast (<http://ncbi.nlm.nih.gov>).

### 3.4 Construção do plasmídeo pX63NEO-LeishTER

Para a realização da subclonagem direcional de LeishTER no vetor de expressão em *Leishmania* pX63NEO (LeBowitz et al., 1991), foi realizada uma digestão com as enzimas de restrição *SmaI* e *BglII* para a liberação do inserto LeishTER de 2.100 pb do vetor pGEM T-easy, e separadamente, DNA plasmidial de pX63NEO foi digerido com as mesmas enzimas, as quais estão presentes em seu sítio de clonagem. O fragmento liberado e o vetor pX63NEO foram separados em gel de agarose 0,7%, recortados do gel e purificados utilizando-se o PureLink™ Quick Gel Extraction KIT (Invitrogen). O vetor pX63NEO é um vetor de expressão em *Leishmania* que contém os sinais para maturação e processamento do RNAm no parasito, como os sítios de adição do mini-éxon e da cauda de poliadenilação contidos nas sequências DST e UST do gene dihidrifilato-redutase-timidilato sintase (DHFR-TS). O plasmídeo pX63NEO também confere resistência a neomicina, porém, neste trabalho para seleção dos clones superexpressores de LeishTER, foi usado um análogo de neomicina, aminoglycoside geneticin sulfate (G418), (Figura 7) (LEBOWITZ; COBURN; BEVERLEY, 1991).





**Figura 7. Mapa dos plasmídeos pX63NEO e pX63Neo-LeishTER.** A) Mapa do plasmídeo pX63Neo mostrando a posição dos sítios de clonagem *Sma*I e *Bgl*II, e do genes que conferem resistência a neomicina (NEO) e Ampicilina (Amp). B) Mapa do plasmídeo pX63NEO contendo o gene LeishTER (2.100 bp) subclonado nos sítios *Sma*I e *Bgl*II. Os mapas mostrados foram obtidos utilizando-se o programa SnapGene

O fragmento contendo o gene LeishTER foi ligado ao vetor pX63Neo ambos digeridos com as enzimas de restrição *Sma*I e *Bgl*II, usando a T4 DNA ligase (Invitrogen). Foram realizados ensaios de ligação usando-se a proporções de vetor e de inserto: 1:3. O sucesso da ligação foi verificado utilizando-se amplificação por PCR dos produtos de ligação com os iniciadores pX63NEO-F e TER 3-R (Tabela 1) gerando um amplicon de 180 pb.

O produto da ligação foi utilizado para transformar bactérias *E.coli* DH5 $\alpha$  via eletroporação. DNA plasmidial obtido por mini-prep foi usado para análise via digestão com as enzimas de restrição *Sma*I e *Bgl*II que liberam o inserto do vetor e em seguida, procedeu-se com o sequenciamento de DNA pelo método Sanger, usando os iniciadores pX6-F, TER 3-F e pX6-R.



### **3.5 Determinação do IC50 de G418 (Geneticina) para formas promastigotas de *L. major***

O ensaio de MTT (KAPLER; COBURN; BEVERLEY, 1990) foi realizado com formas promastigotas de *L. major* cultivadas em fase exponencial de crescimento, para estipular a quantidade necessária de antibiótico para selecionar os clones superexpressores de LeishTER.

Os parasitos na forma promastigota foram contados em câmara de Neubauer. A contagem foi realizada em microscópio invertido com contraste de fase, Nikon Eclipse. A quantidade inicial de inóculo usado no experimento foi de  $2 \times 10^5$  parasitos por ml de meio de cultura 199 suplementado.

Foram usadas as concentrações de 0,1, 1, 7, 3,4 e 5  $\mu\text{g}$  de G418 (Sigma) por ml de cultura de parasitos. O ensaio foi realizado em triplicata utilizando-se placa de ELISA (Sarstedt), e incubação a  $26^\circ\text{C}$  durante 24 horas. Após as 24 horas de exposição ao G418, as amostras foram transferidas para tubos de 1,5ml e centrifugadas a 2.800 rpm por 15 min. Após retirar o sobrenadante, foram adicionados 400 $\mu\text{L}$  de MTT 0,3mg/ml em PBS 1X. Os tubos foram deixados por 1 h e 30 minutos a temperatura ambiente. Após o período de incubação, foram adicionados 400 $\mu\text{L}$  de SDS 10% em 0,01M HCl seguido de incubação por 15 min.

Foram retirados então, de cada tubo, 100  $\mu\text{L}$  e depositados em uma placa de ELISA (Sarstedt) com fundo em U, para realizar a leitura de absorbância no comprimento de onda de 560nm usando espectrofotômetro Epoch (BioTek).

O IC50 foi estimado calculando-se as porcentagens de parasitos vivos em cada concentração do fármaco baseado na absorbância.

### **3.6 Transformação de *L. major* com pX63NEO e pX63NEO-LeishTER por eletroporação**

A transfecção de *L. major* foi realizada usando o *old method* descrito em Mottram, (2008), que consiste em misturar em cubeta de eletroporação de 0,2 mm (BioRad), aproximadamente  $2,5 \times 10^7$  promastigotas de passagem 4 (P4), em fase exponencial tardia de crescimento e, com 50  $\mu\text{g}$  de DNA plasmidial (pX63NEO vazio ou pX63NEO-LeishTER), na presença de tampão de eletroporação gelado. O equipamento utilizado para a transfecção foi o Gene Pulser XCell (BioRad), sendo ele configurado para um pulso a 0,45 Kvolts e capacitância de 500 $\mu\text{F}$ . Após a eletroporação, a cubeta foi deixada em gelo por 10 min. Atingido o tempo, o as células eletroporadas inoculadas em 5 ml de meio 199 contendo 20% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Cultilab) e mantido à  $26^\circ\text{C}$  por 24 horas. Posteriormente,

foram adicionados 60µg/ml de G418 ao meio contendo as células transformadas, com intuito de selecionar apenas as *L. major* que incorporaram o plasmídeo pX63NEO ou pX63NEO-LeishTER. As garrafas de cultura foram mantidas por 7 dias à 26°C.

Atingido uma semana, fez-se a contagem dos parasitos presentes nas garrafas de cultura. Estipulou-se o volume que corresponderia a 1.000 células, com finalidade de plaquear os parasitos para seleção de clones puros. Para plaquear os parasitos, placas com 50% Agar e 50% meio 199 suplementado contendo 40% (v/v) de soro fetal bovino inativado (Cultilab) foram confeccionadas. Após o plaqueamento de aproximadamente 1.000 células, as placas foram incubadas a 26 °C durante 7 dias.

Após o período de incubação, as placas foram verificadas e colônias correspondentes aos clones transformantes de *L. major* transfectados com pX63NEO e com o pX63NEO-LeishTER foram isolados e inoculados separadamente em garrafas de cultura contendo 5 ml de meio 199 e 60µg/ml de G418 a 26°C durante 7 dias.

### **3.7 Validação dos clones de *L. major* superexpressores de LeishTER**

DNA total dos clones transformantes de *L. major* transfectados com pX63NEO (PLI, PLII e PLIII) e pX63NEO-LeishTER (TER III, TER IV e TER V), correspondendo a passagem 7 (P7), foi extraído usando-se o método de Mottram (2008). Com intuito de verificar se os clones isolados apresentavam cópias dos plasmídeos pX63NEO e pX63NEO-LeishTER foram realizadas reações de PCR usando-se os iniciadores (Tabela 1) pX6 F e pX6 R e pX6 F e TER 5 R, respectivamente. Os amplicons esperados tinham o peso molecular aproximado de 213pb e 500 pb, respectivamente.

Foram escolhidos aleatoriamente 3 clones de cada uma das transformações para os ensaios que serão mostrados na tese.

Para confirmar a superexpressão de LeishTER, RNA total foi extraído de cada um dos 6 clones (transfectados com o plasmídeo pX63NEO: PLI, PLII e PLIII, e com pX63NEO-LeishTER: TER III, TER IV e TER V) e também de linhagem selvagem não transformada, usando Trizol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Para obtenção dos RNAs formas promastigotas de selvagens foram cultivadas durante 4 dias a 26 °C em 5 ml de meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino e os parasitos transfectados foram cultivados nas mesmas condições na presença de 60µg/ml de G418. Após a extração, a integridade dos RNAs foi checada por eletroforese em gel 1% agarose suplementado com 1%

Hipoclorito corado com 0,001% (v/v) de brometo de etídio, em tampão de corrida TAE 1x (40mM Tris-acetato; 1mM EDTA) com tensão constante de 110V.

Confirmada a integridade dos RNAs, 2µg de cada amostra foi tratado com 6U de *DNAse I* *Ambition* (Invitrogen), segundo as instruções do fabricante. A inativação da *DNAse I* foi realizada seguindo o protocolo de inativação por calor, que consiste em adicionar, em concentração final na amostra, 5mM de EDTA e posteriormente aquecer a amostra a 75°C por 10 min. A ausência de DNA nas amostras foi checada realizando-se reação de PCR com os iniciadores TER 3 F e TER 5 R que amplificam um fragmento de 347pb de LeishTER.

O primeiro tratamento com 6U de *DNAse I* só foi eficaz para eliminar DNA das amostras de RNA obtidas das triplicatas dos clones de *L. major* PLI, PLII e PLIII e de parasitos selvagens. Um novo tratamento com 8U de *DNAse I*, foi necessário e somente a triplicata do clone TER III, não apresentou amplificação após a reação de PCR.

Foram então feitas novas alíquotas de 2µg de RNA das triplicatas dos clones TER IV e TER V, usando-se para este tratamento 10U de *DNAse I*. Após o novo tratamento com 10U de *DNAse I*, a triplicata do clone transfectado com o plasmídeo pX63NEO-LeishTER, TER IV e uma das amostras da triplicata de TER V não apresentaram amplificação após a reação de PCR, confirmando que o tratamento com *DNAse I* foi eficaz. Foram então feitas novas alíquotas com 2µg de RNA das duas amostras pertencentes à triplicata do clone TER e um novo tratamento com *DNAse I* para essas amostras usando 16U da enzima. Desta vez, o resultado da reação de PCR, confirmou que o tratamento com *DNAse I* foi eficaz para estas amostras.

Em sequência, cDNA foi sintetizado a partir de todas as amostras de RNA que confirmadamente não tinham contaminação com DNA, usando-se *Improm-II*<sup>TM</sup> *Reverse transcription system* (Promega), segundo as instruções do fabricante. Alíquotas com 500ng das amostras de RNA foram misturadas com 50pmol de oligodT e incubadas à 70°C por 10 min. Ao final da incubação, as amostras foram resfriadas à 4°C por 10 min. Posteriormente foi adicionado um mix contendo a transcriptase reversa *Improm II*, seguindo as recomendações do fabricante (Promega). Uma reação de PCR usando-se os iniciadores TER RT F e TER RT R foi realizada para checagem da síntese do cDNA.

Após a síntese do cDNA, foram escolhidos 3 genes endógenos de *L. major* RPN8 (RPN8-F e RPN8-R), TryRed (TRY-F e TRY-R) e Alfa tubulina (AlfaTub-F e AlfaTub-R) (Tabela 1), que serviram para normalizar o RT-qPCR. Após ajustes as concentrações dos

oligonucleotídeos usadas nos ensaios foram TER RT- 400 nMol; RPN8- 500nMol; Alfa-tubulina- 400nMol e TryRed-300nMol. Todas as amostras foram testadas em duplicatas.

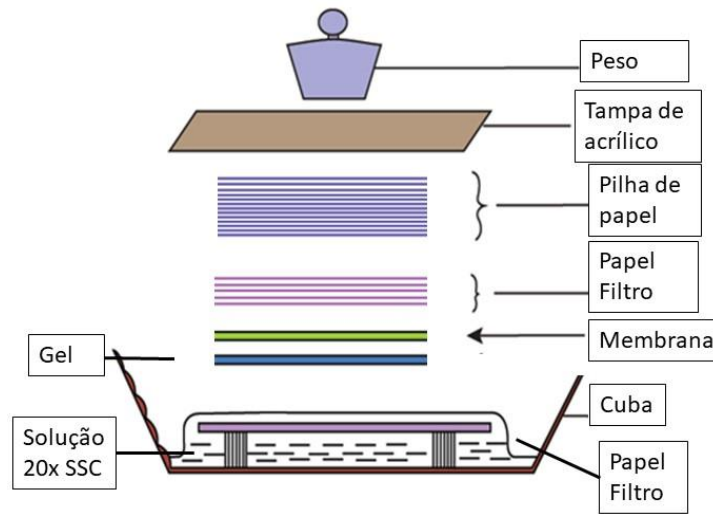
### **3.8 Curva de Crescimento**

Para realização das curvas, foram cultivadas formas promastigotas de *L. major*: selvagem em 5 ml de meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino, e formas promastigotas transfectadas com o plasmídeo pX63NEO e transfectadas com o plasmídeo pX63NEO-LeishTER em 5 ml de meio 199, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 60µg/ml de G418. Todos os parasitos utilizados estavam em passagem 7 (P7). Para confecção das curvas utilizou-se inóculo inicial de  $1 \times 10^6$  parasitos. O nº. de parasitos por mL de meio de cultura foi estimado a cada 24 hrs durante 7 dias consecutivos, usando-se contagem em câmara de Neubauer. Após o termino das contagens, os dados foram plotados em gráfico, usando-se a média dos valores das triplicatas.

### **3.9 Southern blot telomérico para analisar o perfil de restrição telomérico (TRF, *Telomere Restriction Fragment*) dos superexpressores de TER em *L. major*.**

DNAs genômicos foram obtidos de formas promastigotas, em passagem P8, de parasitos selvagens e dos clones transformados com pX63NEO e pX63NEO-LeishTER. 2 µg de cada DNA foram digeridos com a enzima de restrição *RsaI* (Promega). Como controle, 1 µg de cada DNA genômico digerido foi tratado com 2U da exonuclease *Bal31* (Fermentas) por 1h a 37 °C.

Os fragmentos de digestão foram separados em gel de agarose 0,8% com a 80V por 3 horas- 4 horas em tampão 1 X TAE. Para transferir as amostras para a membrana, o gel contendo o DNA digerido foi lavado duas vezes com água Milli-Q, duas vezes com solução desnaturante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) sob agitação leve, por 15 min cada, novamente com água Milli-Q e por último, solução de neutralização (0.5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7.5) por duas vezes de 15 minutos cada. Com isso a transferência foi montada segundo a Figura 8 utilizando a membrana de nylon Hybond N+ e solução 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate, pH 7.0) e foi deixado por 16 horas. Após a transferência, para fixar bem as amostras, a membrana foi exposta por 2 min a luz UV (120mJ).



**Figura 8. Representação de como montar a transferência para realização do Southern blot.** Adaptado do site <http://nptel.ac.in/courses/102103016/module3/lec28/2.html>

Em seguida, a membrana foi lavada duas vezes com solução 2X SSC e posteriormente foi incubado a 42°C por 30-60 minutos com solução de pré- hibridização (5X SSC, 0,1% sarcosil, 0,02% SDS). A solução de pré-hibridização foi descartada e junto com a solução de hibridização (5X SSC, 0,1% sarcosil, 0,02% SDS) foi adicionado 1µl da sonda telomérica DIG-TELC (Tabela 1) e incubado a 42°C por 16 horas.

Na sequência, a membrana foi preparada para o processo de revelação, para isso a solução de hibridização foi descartada e lavada sobre agitação com as seguintes soluções: duas vezes com o tampão de lavagem estrigente I (2× SSC, 0.1% SDS) na temperatura de 25°C, por 5 minutos cada uma, duas vezes com o tampão de lavagem estrigente II (0.2× SSC, 0.1% SDS) por 15- 20 minutos na temperatura de 50°C e tampão de lavagem (0,1 M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7,5 e 0,3 % Tween 20) por 5 minutos.

Depois a membrana foi incubada por 30 min sobre agitação com solução de bloqueio (1% do *Blotting-Grade Blocker* em tampão de ácido maleico- 0,1 M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7,5) e mais 30 minutos com a solução de bloqueio contendo o anticorpo anti- DIG na proporção 1:10.000. Posteriormente foi lavada duas vezes com tampão de lavagem por 15 minutos cada à 25°C, e incubada por 5 minutos com tampão de detecção (0,1 M Tris-HCl, 0,1M NaCl). Ao final a membrana foi exposta ao reagente de quimioluminescência CSPD (Roche) e o resultado da hibridização foi capturado expondo a membrana por 1 hora no G-BOX Chemi- XR5.

### **3.10 Coloração de organelas contendo ácidos nucleicos usando DAPI**

200µl de cada cultura de formas promastigotas de *L. major* selvagem, transfectados com o plasmídeo pX63NEO e transfectados com o plasmídeo pX63NEO-LeishTER. foram centrifugados à 2500 rpm por 5 min à 4°C. O sobrenadante foi descartado e o pellet foi lavado duas vezes com PBS 1x. Após as lavagens, as amostras foram ressuspensas delicadamente em 20µl de PBS 1X, e a essa suspensão foram adicionados 80µl de etanol 70% sob agitação constante em vortex. Posteriormente foram mantidas a temperatura 15-25°C por 10 minutos.

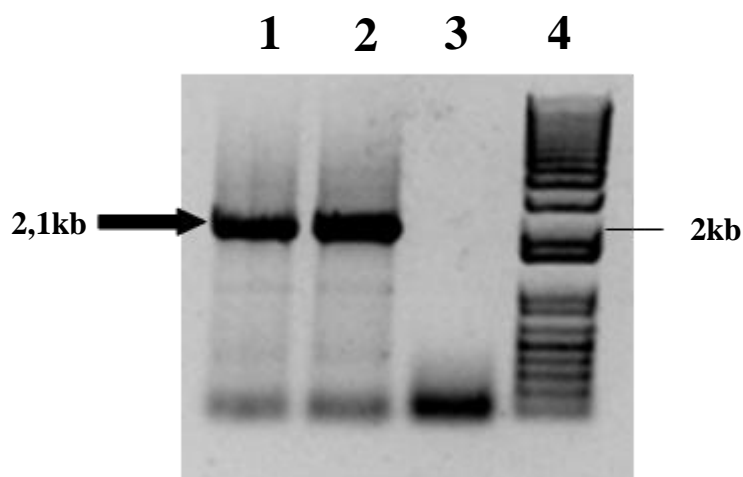
As células (10µl de cada suspensão) foram então depositadas em lâminas de microscopia previamente tratadas com poly-L-lisina (Sigma) e espalhadas com auxílio de uma lamínula. A elas foi adicionado 10µl de VECTASHIELD®*Mounting Medium* contendo DAPI (1,5µg/ml) para corar os ácidos nucleicos presentes no núcleo e no cinetoplasto.

As células foram analisadas usando microscópio de fluorescência (Nikon 80i) em aumento de 1000X com imersão. As imagens foram capturadas usando o programa NIS elements.

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Construção do plasmídeo pX6NEO-LeishTER

Com o intuito de clonar o gene que codifica o LeishTER, foi realizada a amplificação via PCR a partir de DNA genômico de formas promastigotas de *L. major* utilizando iniciadores específicos TER-F e TER-R (Tabela 1). Os iniciadores utilizados para amplificação contêm sítios para as enzimas de restrição *Sma*I e *Bgl*III (Fig. 9).

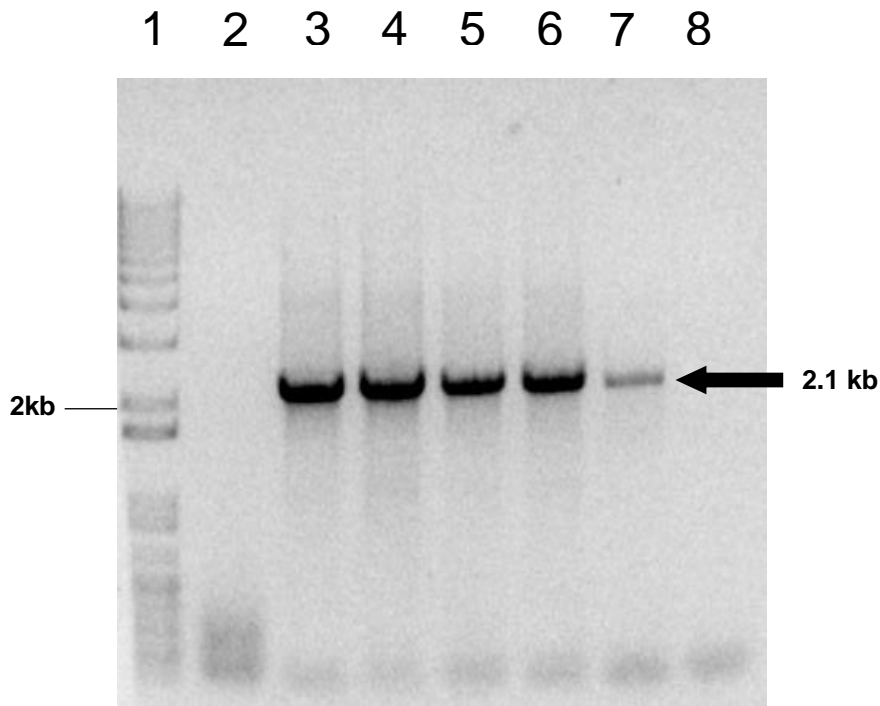


**Figura 9. Amplificação do gene LeishTER usando PCR.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. (Colunas 1 e 2), o produto de PCR de aproximadamente 2,1Kb correspondente ao gene LeishTER amplificado a partir de DNA genômico de formas promastigotas de *L. major*, (Coluna 3), controle negativo, reação de PCR realizada na ausência de DNA e (Coluna 4), marcador de peso molecular DNA 1kb plus (Invitrogen)

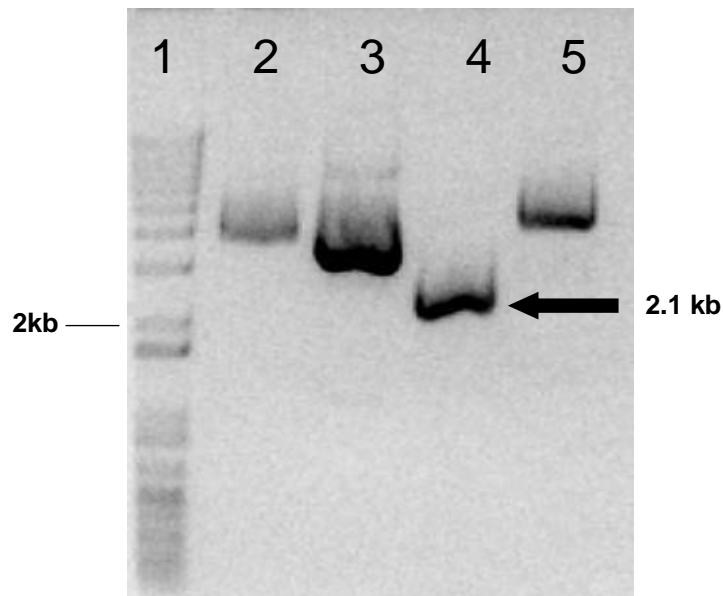
O produto de PCR contendo o LeishTER com tamanho estimado em ~2.1 Kb (Fig. 9, colunas 1 e 2), foi clonado em vetor pGemT-easy (Promega) e em seguida utilizado para transformar bactérias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$ . Usando os iniciadores M13-F e M13-R (Tabela 1), cujas sequências flanqueiam os sites de policlonagem do vetor foram realizados PCR de colônia para confirmar o sucesso da clonagem de LeishTER. Os resultados mostrados na Figura 10 (colunas 3-6) confirmam a clonagem de LeishTER no vetor pGem-T easy. Verifica-se que somente um dos clones (Fig. 10, coluna 2) não continha o DNA recombinante.

Além da PCR, a clonagem foi confirmada digerindo-se o plasmídeo recombinante separadamente com as enzimas *Sma*I e *Bgl*III que linearizam o plasmídeo (Fig. 11, coluna 2 e 5, respectivamente) e com ambas as enzimas para liberação do inserto de 2,1 Kb

correspondente ao LeishTER (Fig. 11, coluna 4). Esta parte do trabalho foi realizado em colaboração com o estudante de Iniciação Científica Luís Felipe Giandoni.



**Figura 10. Amplificação por PCR confirma a clonagem de LeishTER no vetor pGEM-T easy.** Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. (Coluna 1) Marcador de peso molecular 1kb DNA plus (Invitrogen), (Colunas 2-6) produto de PCR das colônias, (Coluna 7), produto da ligação usado para transformação usado como controle positivo e (Coluna 8), controle negativo, reação realizada na ausência de DNA.

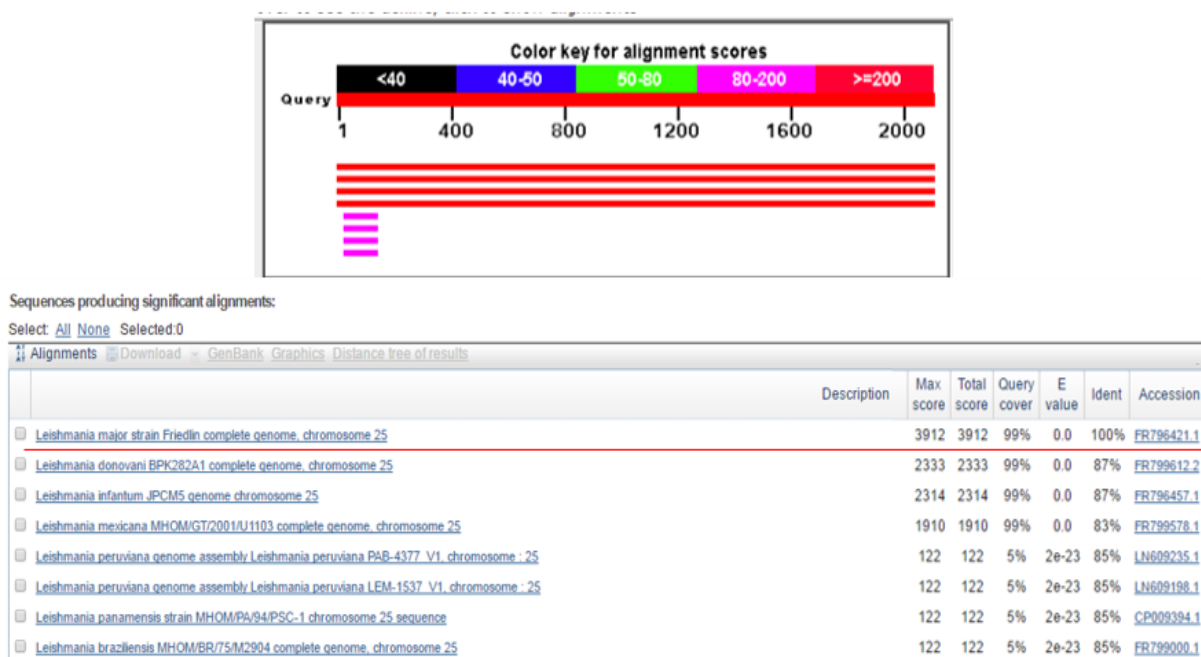


**Figura 11. Confirmação da clonagem de LeishTER no vetor de clonagem pGEM T-easy.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. (Coluna 1), Marcador de peso molecular 1Kb DNA plus, (Coluna 2),



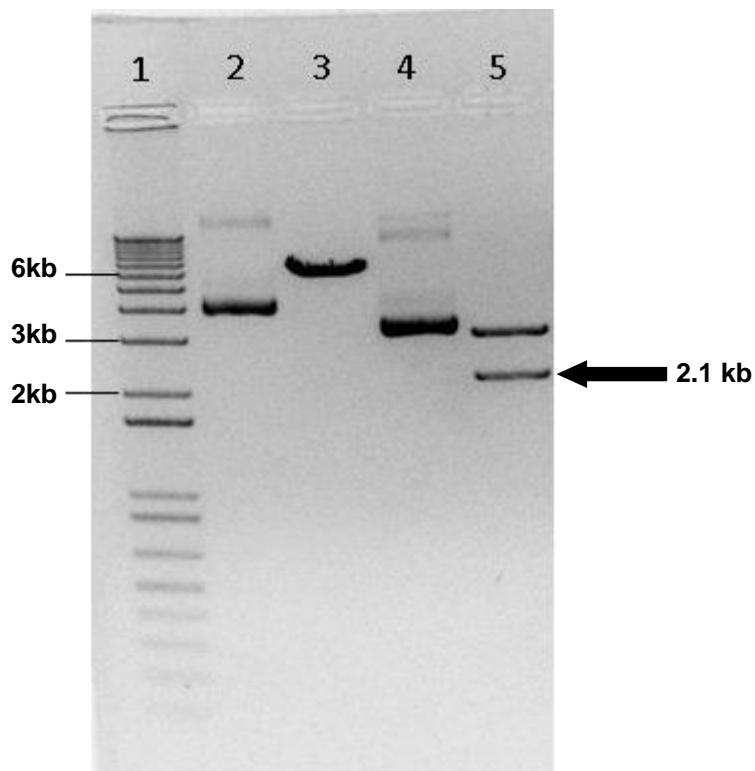
plasmídeo recombinante linearizado após digestão com *Sma*I, (Coluna 3), plasmídeo recombinante na forma circular, (Coluna 4), inserto LeishTER após purificação da digestão do plasmídeo com as enzimas *Sma*I e *Bgl*III e (Coluna 5), plasmídeo recombinante linearizado após digestão com *Bgl*III.

Confirmada a clonagem do LeishTER por análise de restrição do plasmídeo recombinante, o DNA plasmidial contendo LeishTER foi sequenciado pelo método Sanger (Anexo 1). Análise da sequência utilizando-se a ferramenta Blastn confirmou que o gene LeishTER, clonado no vetor pGemT-easy, está localizado no cromossomo 25 de *L. major* (Fig. 12), conforme descrito anteriormente por Vasconcelos et al. (2014). A sequência foi depositada no GenBank sob o número de acesso MF784563.



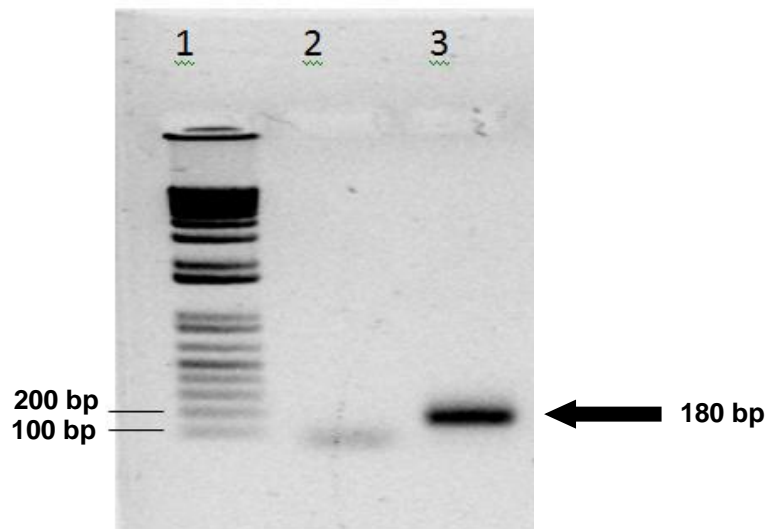
**Figura 12. Análise da sequência de nucleotídeos do clone recombinante que contém o gene LeishTER.** Esta análise foi realizada utilizando a ferramenta BLASTn. No genoma de *L. major* o locus LeishTER está mapeado no cromossomo 25 do parasito (Vasconcelos et al., 2014).

Após a confirmação da clonagem de LeishTER no plasmídeo pGEM-T Easy o gene foi subclonado no plasmídeo px63NEO (Fig. 13, Coluna 2). Para isso ambos os plasmídeos foram digeridos com as enzimas de restrição *Sma*I e *Bgl*III (Fig 13, Colunas 3 e 5). A confirmação das digestões foi realizada fracionando os produtos em gel de agarose 0,8%. A digestão do DNA plasmidial com as duas enzimas, libera do pGEM-T Easy o fragmento que contém o LeishTER que possui 2,1 Kb (Fig. 13, Coluna 5)



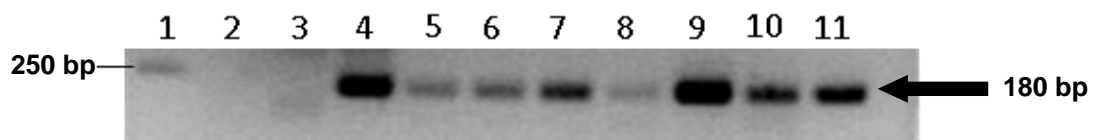
**Figura 13. Digestão do plasmídeo pGEM T-easy para liberação do inserto que contém LeishTER.** Gel de agarose 0,8%, corado com brometo de etídio, mostrando: (Coluna 1), Marcador de peso molecular 1Kb DNA plus, (Coluna 2), plasmídeo pX63NEO fechado, (Coluna3), plasmídeo pX63NEO digerido com *SmaI* e *BglII*, (Coluna 4), plasmídeo não digerido pGEM-T Easy contendo LeishTER , (Coluna 5), pGEM-T Easy com LeishTER digerido com as enzimas *SmaI* e *BglII*, liberando dois fragmentos um contendo um fragmento de 3Kkb referente ao pGem-T-easy sem o inserto e outro de 2.1 kb contendo LeishTER (flecha), respectivamente.

DNA plasmidial pX63NEO digerido com as enzimas *SmaI* e *BglII* e o inserto LeishTER, ambos purificados após digestão com enzimas de restrição, foram submetidos a reação de ligação. Uma reação de PCR usando os iniciadores pX63NEO-F e TER 3-R (Tabela 1), foi realizada com o intuito de verificar se as ligações foram bem-sucedidas. O amplicon esperado desta reação de PCR era de 180 pb (Fig. 14).



**Figura 14. Amplicons obtidos por PCR para confirmar o sucesso da ligação de LeishTER no plasmídeo pX63NEO.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, mostrando: (Coluna 1), Marcador de peso molecular 1kb DNA plus, (Coluna 2), controle negativo, reação de PCR realizada na ausência de DNA, (Coluna 3), reação de ligação (proporção 1:3,inserto para plasmídeo).

Estas ligações foram usadas para transformar por eletroporação, *E. coli* da cepa DH5- $\alpha$  eletrocompetentes. As colônias transformantes foram testadas via reação de PCR de colônia usando-se os iniciadores pX6-F e TER 3-R (Tabela 1) confirmando desta forma o sucesso da subclonagem como a amplificação de um fragmento do tamanho esperado (180pb). (Fig. 15)

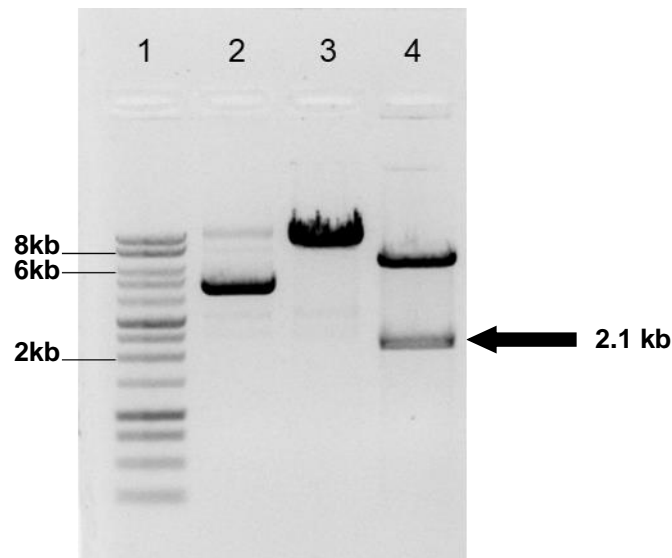


**Figura 15. Confirmação do sucesso da subclonagem de LeishTER no plasmídeo pX63NEO.** Gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, (Coluna 1) Marcador de peso molecular 1kb DNA plus, (Coluna 2) controle negativo, reação de PCR realizada na ausência de DNA, (Coluna 3) DNA do plasmídeo pX63NEO vazio, (Coluna 4) reação de ligação (proporção 1:3,inserto para plasmídeo), (Colunas 5-11) produto de PCR das colônias transformantes.

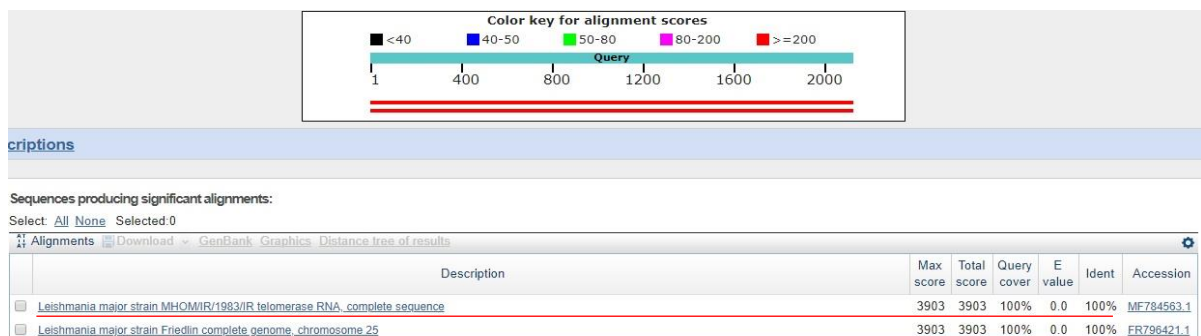
Dentre as colônias transformantes testadas, escolhemos para checar a de número 9 representada (Figura 15, coluna 9). A colônia foi isolada da placa e inoculada em meio de cultura LB líquido com o antibiótico de seleção para extração de DNA plasmidial. Após a extração de DNA plasmidial, foi realizada a dupla digestão do plasmídeo utilizando as

enzimas *SmaI* e *BglIII* com a intenção de liberar o inserto que corresponde a LeishTER (2, 1 Kb) do plasmídeo recombinante pX63NEO-LeishTER (Fig. 16, coluna 4).

O sucesso da subclonagem foi confirmado também por sequenciamento de DNA do plasmídeo recombinante pX63NEO-LeishTER e análise da sequência por BLASTn. O resultado mostrou que a sequência do inserto clonado apresenta 100% de identidade com a sequência descrita para o TER de *L. major*, situado no cromossomo 25 (Fig. 17).



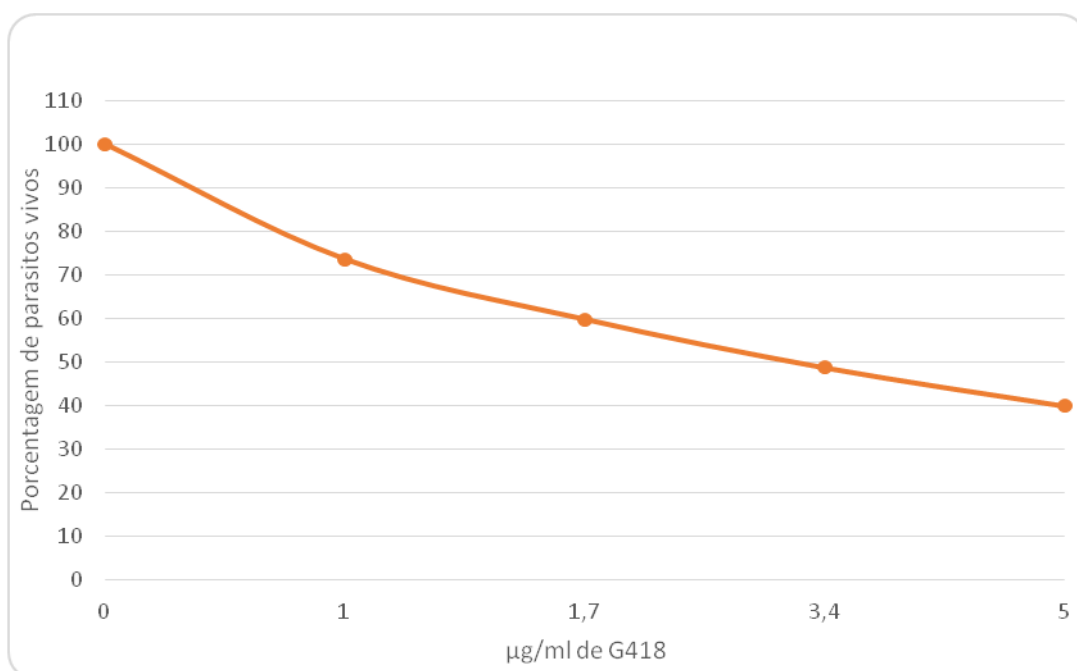
**Figura 16. Confirmação da subclonagem de LeishTER no plasmídeo px63NEO.** Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio. (coluna 1), Marcador de peso molecular 1Kb DNA plus, (coluna 2) plasmídeo pX63NEO-LeishTER fechado, (coluna 3) plasmídeo pX63NEO-LeishTER digerido com *SmaI* com tamanho aproximado de 8kb, como previsto na Fig. 7, e (coluna 4) pX63NEO-LeishTER digerido com *SmaI* e *BglIII*, liberando dois fragmentos, um com 6kb, correspondente ao plasmídeo vazio e outro com 2,1 kb, representando o LeishTER respectivamente.



**Figura 17. Análise da sequência de nucleotídeos do clone recombinante pX63NEO-LeishTER.** Esta análise foi realizada utilizando a ferramenta BLASTn. No genoma de *L. major* o lócus de LeishTER está mapeado no cromossomo 25 (Vasconcelos et al., 2014).

#### 4.2 Determinação do IC<sub>50</sub> de G418 (Geneticina) para formas promastigotas de *Leishmania major*

Para estimar a quantidade de G418 necessária para seleção dos clones que carregam os plasmídeos de interesse (pX63NEO vazio e pX63NEO-LeishTER), foi estimado o IC<sub>50</sub> para geneticina (G418) utilizando o ensaio de MTT (Tópico 3.6). Formas promastigotas de *L. major* foram expostas a diferentes concentrações do fármaco (0, 1, 1,7, 3,4 e 5 µg/mL). A média dos valores da absorbância de ensaios realizados em triplicatas foi calculada e, a partir desses valores, calculou-se a porcentagem de parasitos vivos para cada concentração do fármaco (Fig. 18).



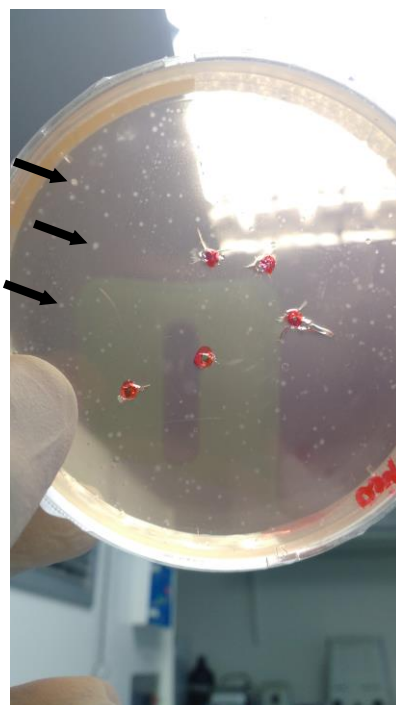
**Figura 18. Gráfico mostrando estimativa do IC<sub>50</sub> de geneticina (G418) para formas promastigotas de *L. major*.** Os ensaios foram realizados em triplicatas, incubando-se os parasitos com as concentrações de 0, 1, 1,7, 3,4 e 5 µg/mL de fármaco, em um período de 24 horas a 26 °C. O gráfico representa a porcentagem de parasitos viáveis na presença de diferentes concentrações do fármaco. Segundo ensaio de MTT o IC<sub>50</sub> para a geneticina foi estimado em 3,3 µg/mL.

Os resultados mostram que o valor estimado para o IC<sub>50</sub> de G418 para formas promastigotas de *L. major* é de 3,3 µg/mL. Desta forma, a quantidade de fármaco que será utilizada na seleção das linhagens puras superexpressoras de LeishTER é 20 vezes o valor de

IC50 encontrado para G418, pois assim aumentamos a pressão seletiva e confiabilidade dos clones isolados.

#### 4.3 Transfecção de *L. major* com pX63NEO e pX63NEO-LeishTER

Os plasmídeos pX63NEO e pX63NEO-LeishTER foram usados para transformar formas promastigotas de *L. major*, usando eletroporação segundo método de Mottram, (2008). Após a transformação, os transformantes foram plaqueados em meio 199 semi-sólido na presença de 60 µg/mL de G418 (Fig. 19).

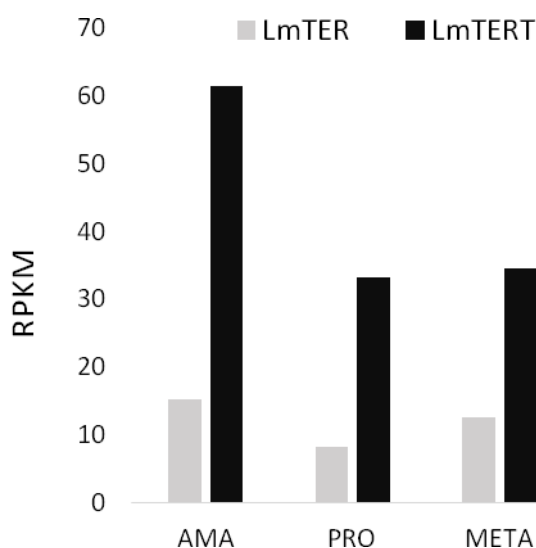


**Figura 19. Placa de Meio 199semi-solido contendo formas promastigotas de *L. major* transformadas com pX63NEO-LeishTER. Colônias de *Leishmania* portadoras de pX63NEO-LeishTER, indicadas pelas setas em preto.**

#### 4.4 Análise da expressão de LeishTER e TERT em bibliotecas SL-Seq

O TER é componente intrínseco do complexo telomerase, por isso foi realizada uma análise comparativa entre o número de transcritos do componente proteico TERT e o número de transcritos LeishTER (GenBank acc# MF784563) usando bibliotecas SL-seq independentes provenientes das três formas de desenvolvimento do parasito (Fig. 20). Os resultados mostraram que os transcritos TER são menos abundantes que transcritos TERT nas três formas de desenvolvimento do parasito, sendo mais expressos em amastigotas, na ordem

amastigota>metacíclicos>promastigota>. Como o controle de expressão gênica em *L. major* assim como em outros tripanosomatídeos é pós-transcricional (TEIXEIRA; VALENTE, 2016) é possível que os níveis de transcrição para transcritos TERT mostrados no gráfico da Figura 2, não indiquem que todos esses RNAs serão traduzidos para proteína, e no caso do TER que todos os transcritos TER serão maturados. Porém, a atividade telomerase detectada em extratos proteicos de formas promastigotas de *L. major* (CANO et al., 1999) e em extratos proteicos de *L. amazonensis* nas formas amastigota (dados não publicados) e promastigota (GIARDINI et al., 2011) indicam que baixos níveis de expressão de TER são suficientes para a ação do complexo telomerase.

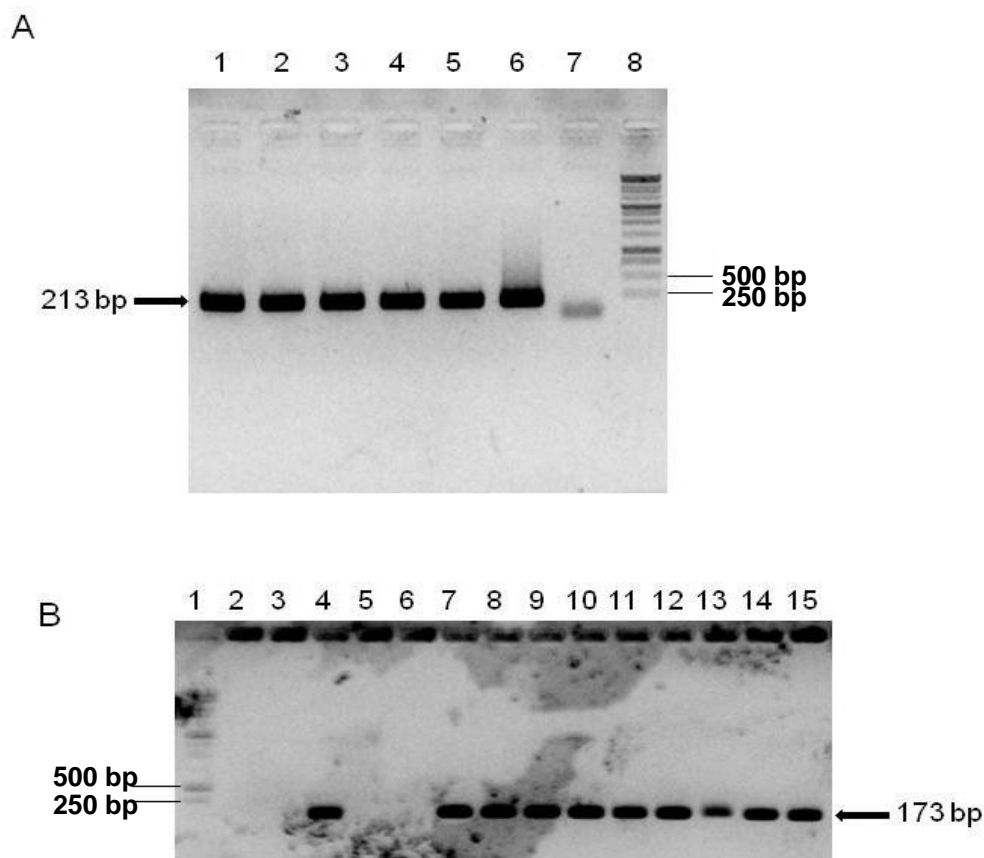


**Figura 20. Número de transcritos (RPKM) correspondentes aos componentes TER e TERT da telomerase de *L. major*.** As barras correspondem ao número de transcritos TER (cinza) e TERT (preto) nas três formas de desenvolvimento do parasito: amastigota (ama), promastigota (pro) e metacíclica (meta), calculados com base nos dados obtidos das bibliotecas SL-Seq.

#### 4.5 Obtenção de *L. major* promastigotas superexpressando LeishTER

Para confirmar o sucesso da transformação de *L. major* com os plasmídeos pX63NEO e pX63NEO -LeishTER, foi utilizado ensaio de PCR usando como molde DNA genômico extraído de cada clone estudado e os iniciadores pX6-F e pX6-R e (Figura 21 A, 1-5), que amplifica um fragmento de 213 pb presente somente no plasmídeo vazio, e os iniciadores pX6-F e TER 3-R que amplificam um fragmento de DNA de 173pb que contém sequências do plasmídeo e do gene LeishTER (Figura 21 B, 7-15). Reações realizadas com DNA

plasmidial pX63NEO e pX63NEO-LeishTER, DNA genômico de *L. major* selvagem e reações realizadas na ausência de DNA foram usadas como controle.



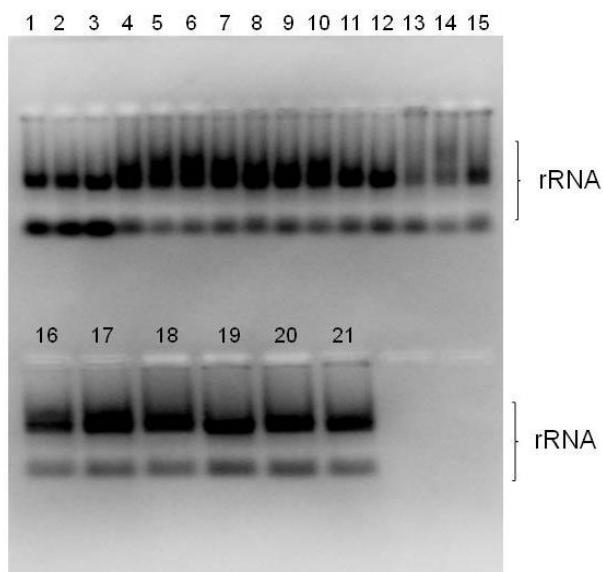
**Figura 21. Confirmação da transformação de *L. major* com os plasmídeos pX63NEO e pX63Neo-LeishTER.** A) Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR de 213pb amplificados a partir de DNA genômico extraído de clones puros isolados na forma promastigota, transformados com pX63NEO, usando os iniciadores pX6 F (Senso) e pX6 R (Antisenso). (Colunas 1-5) Clones de *L. major* transfectados com pX63NEO, (Coluna 6), DNA plasmidial pX63NEO, (Coluna 7) reação de PCR realizada na ausência de DNA e (Coluna 8) Marcador de peso molecular 1kb DNA plus (Invitrogen) B) Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando os produtos de PCR de 173pb amplificados a partir de DNA genômico extraídos de clones puros isolados na forma promastigota transformados com pX63NEO-LeishTER, usando os iniciadores pX6 F (Senso) e TER5 R (Antisenso). (Coluna 1) Marcador de peso molecular 1kb DNA plus (Invitrogen), (Coluna 2), reação de PCR realizada na ausência de DNA, (Coluna 3) DNA plasmidial pX63NEO, (Coluna 4) DNA plasmidial pX63NEO-LeishTER, (Coluna 5) DNA genômico de *L. major* selvagem, (Coluna 6) DNA genômico de *L. major* transfectada com pX63NEO, (Colunas 7-15) Clones de *L. major* transfectados com pX63NEO-LeishTER.

#### 4.6 Validação dos clones de *L. major* superexpressores de LeishTER

Confirmado o sucesso das transformações, foram obtidas amostras de RNA total de parasitos em fase exponencial de crescimento. Estes RNAs foram obtidos de triplicatas de



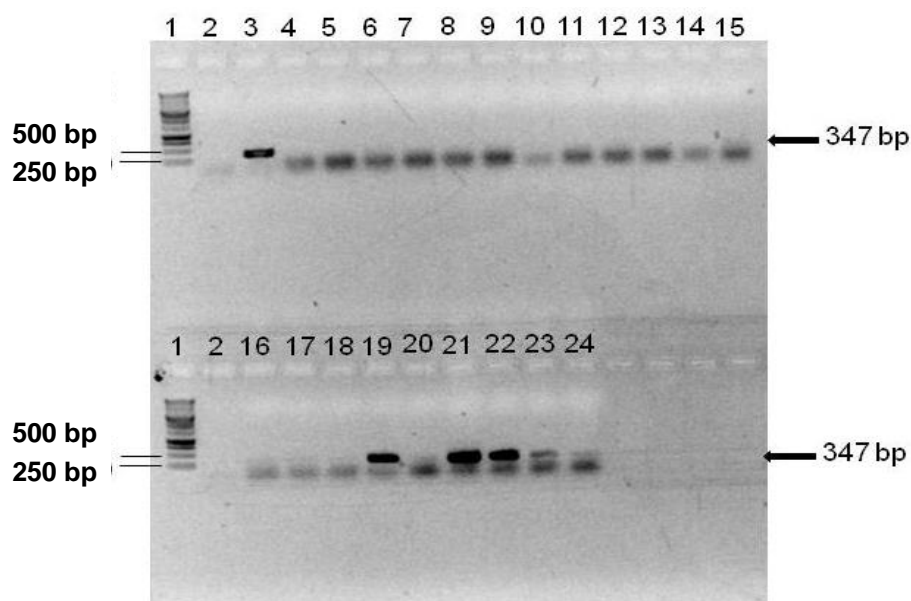
culturas de *L. major* selvagem (Fig. 22, colunas 1 a 3), de três clones transfectados com o plasmídeo pX63NEO (PLI, PLII e PLIII) (Fig. 22, colunas 4 a 15) e três clones transfectados com o plasmídeo pX63NEO-LeishTER (TER III, TER IV e TER V) (Fig. 22, colunas 16 a 21). A integridade dos RNAs foi checada em eletroforese em gel de agarose contendo 1% de hipoclorito de sódio.



**Figura 22. Checagem da integridade dos RNAs extraídos a partir dos clones de *L. major* transformados com pX63Neo e pX63Neo-LeishTERT.** Gel de agarose 1% com 1% Hipoclorito de sódio, corado com brometo de etídio. (Colunas 1-3) 1,5ug RNAs das amostras em triplicata de *L. major* selvagem, (Colunas 4-6) 1,5ug RNAs das amostras em triplicata de *L. major* PL-I, (Colunas 7-9) PL-II, (Colunas 10-12) PL-III, (Colunas 13-15) TER-III, (Colunas 16-18) TER-IV e (Colunas 19-21) TER V. rRNA, RNA ribossomal.

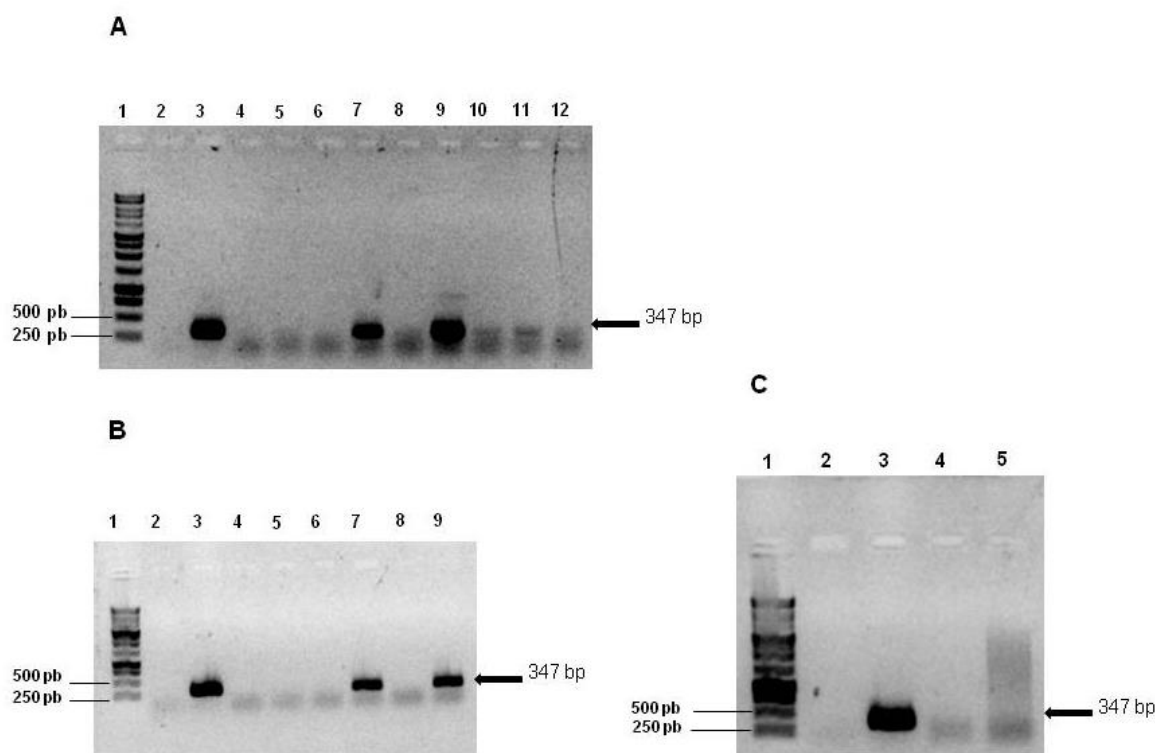
Como mostrado na Fig. 22 (colunas 1-21), todos os RNAs obtidos pela extração com Trizol, estão íntegros e aptos a serem tratados com *DNase I*.

Após a confirmação da integridade dos RNAs, foi realizado tratamento com *DNase I* (6U) e posteriormente realizada uma PCR para confirmar a ausência de contaminação de DNA genômico nas amostras, utilizando iniciadores específicos para a amplificação de um fragmento de 347 bp de LeishTER (TER 3 F e TER 5 R) (Figura 23).



**Figura 23. Reação de PCR para confirmar ausência de DNA nas amostras de RNA tratadas com *DNase I***. Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, contendo produtos de amplificação (347pb) usando os iniciadores TER 3 F e TER 5 R. (Coluna 1) Marcador de peso molecular 1Kb DNA plus (Invitrogen), (Coluna 2) reação de PCR sob ausência de DNA, (3) DNA de *L. major* Selvagem, (Colunas 4-6) RNAs das triplicatas de *L. major* Selvagem, (Colunas 7-9) RNAs das triplicatas de *L. major* PLI, (Colunas 10-12) PLII, (Colunas 13-15) PLIII, (Colunas 16-18) TER III, (Colunas 19-21) TER IV e (Colunas 22-24) TER V.

Os RNAs dos clones de *L. major* selvagem e transfectados com o plasmídeo pX63NEO (PLI, PLII e PLIII) não apresentaram amplificação após a reação de PCR, confirmando a ausência de DNA nas amostras (Fig. 23, colunas 4 a 15). Porém, os clones transfectados com o plasmídeo pX63NEO-LeishTER (TER III, TER IV e TER V) apresentaram amplificação após a reação de PCR, indicando que, mesmo após o tratamento com *DNase I*, a maioria das amostras ainda apresentava contaminação com DNA genômico (Fig. 23, colunas 16 a 24). Foram realizados outros tratamentos com 8U (Fig. 24A), 10U (Fig. 24B) e 16U (Fig. 24C) de *DNase I*, seguidos de confirmação via PCR utilizando os iniciadores TER 3 F e TER 5 R com amplicon esperado de 347 pb (Figura 25).



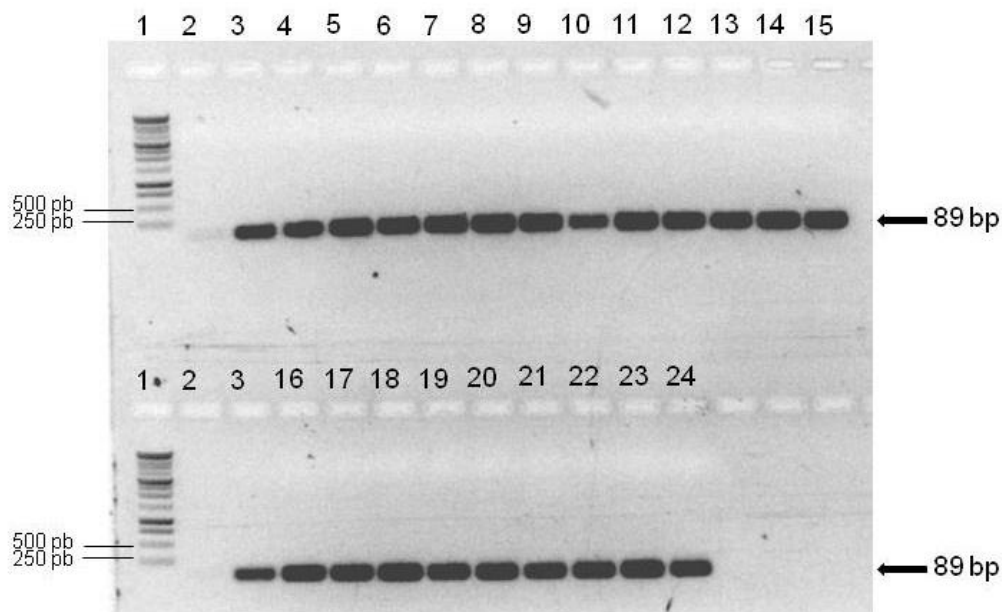
**Figura 24. Reação de PCR para confirmar ausência de contaminação com DNA nas amostras de RNA obtidas dos clones TER III, TER IV e TER V, após tratamento com 8 e 16U *DNase I*.** Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, contendo produtos de amplificação (347pb) usando os iniciadores TER 3 F e TER 5 R. (A) RNAs dos clones TERIII, IV e V tratados com 8U, onde somente as amostras de TER III não apresentaram amplificação (Colunas 4-6); (B) RNAs dos clones TER IV e V tratados com 10U, onde somente as amostras de TER IV e uma de TER V não apresentaram amplificação (Colunas 4-6, 8); (C) RNAs do clone TER V tratados com 16U (Colunas 4 e 5). Nos géis A, B e C, (Coluna 1) marcador de peso molecular 1kb DNA plus (Invitrogen)

Devido à alta concentração (8U,10U e16U) de *DNase I* para conseguir remover o DNA genômico das amostras dos clones TER III, TER IV e TER V, em especial o clone TER V (16U), acreditamos que a superexpressão do RNA telomérico possa estar interferindo de alguma forma no acesso da enzima ao DNA.

Como se trata de um RNA não codante, há grande possibilidade de existir funções de regulação gênica. Ainda não foram elucidados as formas de atuação dos RNAs longos não codantes (lncRNA), porém sabe-se que existem RNAs capazes de alterar a cromatina formando híbridos RNA:DNA (RINN; CHANG, 2012)

Após a confirmação de ausência de DNA genômico nas amostras de RNA, foi realizada a síntese da primeira fita de cDNA utilizando oligo dt. A síntese de cDNA foi

confirmada através da amplificação por PCR usando os iniciadores TER RT-F e TER RT-R, sendo esperado dessa reação, um amplicon com 89 pb (Fig. 25).



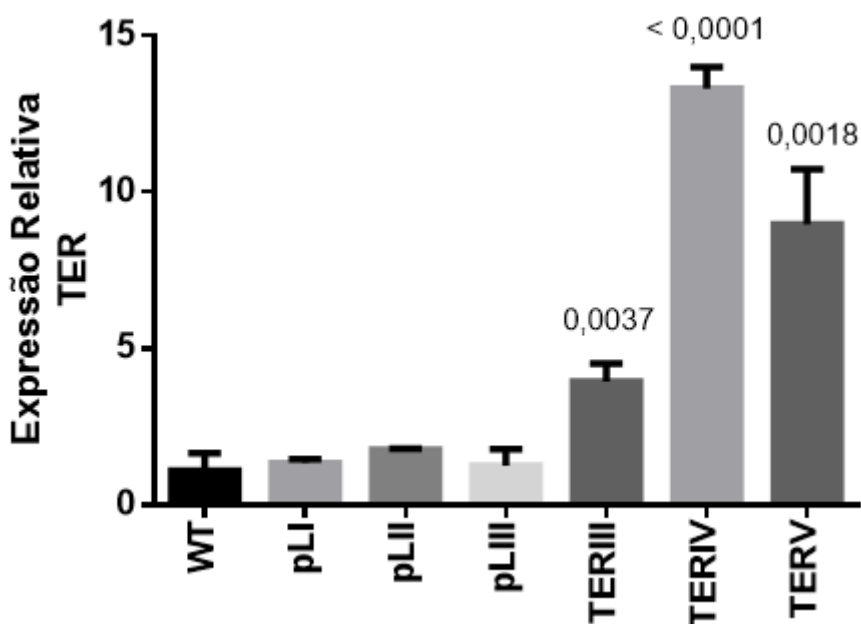
**Figura 25. Reação de PCR para confirmar síntese de cDNA a partir de RNAs obtidos dos clones de *L. major*.** Gel de agarose 1%, corado com brometo de etídio, mostrando o produto de 89pb resultante da amplificação dos cDNAs com os iniciadores TER RT-F e TER RT-R. (Coluna 1) Marcador de peso molecular 1Kb DNA plus (Invitrogen), (Coluna 2) reação de PCR na ausência de DNA, (Coluna 3) DNA de *L. major* selvagem, (Colunas 4-6) Triplicatas dos cDNAs obtidos de *L. major* selvagem (Colunas 7-9) Triplicatas dos cDNAs obtidos dos clones de *L. major* PLI, (Colunas 10-12) PLII, (Colunas 13-15) PLIII, (Colunas 16-18) TER III, (Colunas 19-21) TER IV e (Colunas 22-24) TER V.

Conforme mostrado na Fig. 25 foi possível amplificar um fragmento de 89 pb de LeishTER usando cDNAs dos clones puros de *L. major* transfectados com pX63Neo vazio, dos clones puros de *L. major* transfectados com pX63Neo-LeishTER, e de *L. major* selvagem, sintetizado a partir de oligo dT.

Para distinguir clones superexpressores de não superexpressores e de parasitos selvagens, realizou-se em seguida a análise quantitativa da expressão de LeishTER utilizando RT-qPCR.

O resultados confirmam que os níveis de transcritos leishTER são maiores nos clones TER III, TER IV e TER V (clones puros de *L. major* transformados com pX63NEO-LeishTER ) quando comparados aos dos clones PLI, PLII e PLIII (clones puros de *L. major* transformados com pX63NEO vazio ) e aos de *L. major* selvagem (Fig. 26). Os valores de *p* obtidos para expressão relativa de LeishTER foram significativos,  $p < 0,001$ . Podemos observar também que entre os clones TER III, TER IV e TER V há uma diferença marcante

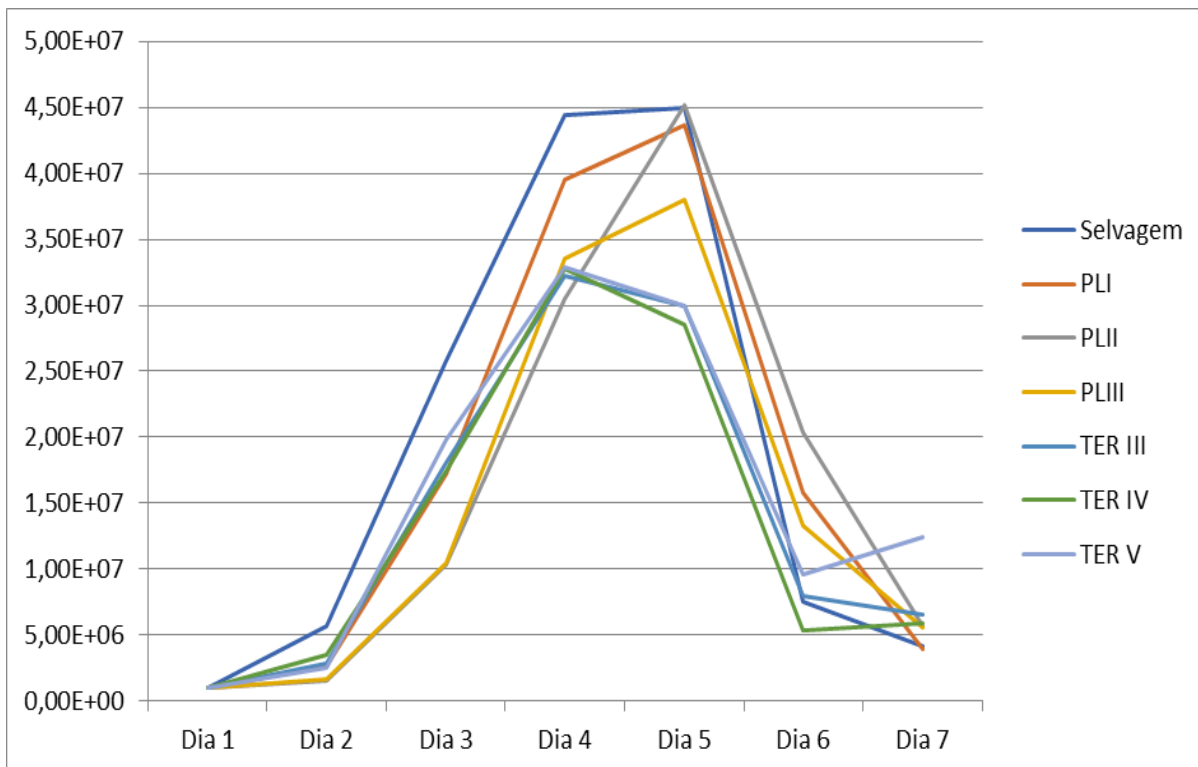
na expressão de LeishTER devido, provavelmente, a que os clones TER IV e TER V também mostraram variação da expressão dos genes endógenos usados como controle do ensaio. Estes resultados sugerem que a superexpressão de LeishTER pode ter causado algum distúrbio em outras maquinarias do parasito ou que os clones TER IV e TER V são resultantes de artefato técnico.



**Figura 26.** Gráfico representando expressão relativa do componente RNA telomérico. QR obtido por RT-qPCR de cDNA de *L. major*: selvagem (WT), clones puros de *L. major* transformados com pX63NEO (PLI, PLII e PLIII) e clones puros de *L. major* transformados com pX63NEO-LeishTER (TERIII, TERIV e TERV). Como genes endógenos foram utilizados RPN8, Tryred e AlphaTubulina. Os valores de *p* foram calculados em relação ao selvagem (WT) usando o teste estatístico *t-Student*. O gráfico foi criado com auxílio da ferramenta *GraphPad Prism 4.0*.

#### 4.7 Análise fenotípica do efeito da superexpressão de LeishTER em formas promastigotas de *L. major*

Com o objetivo de comparar fenotipicamente os clones superexpressores de LeishTER (TERIII, TERIV e TERV) em relação ao selvagem e aos transformados com pX63Neo vazio (PLI, PLII e PLIII), foram obtidas curvas de crescimento com contagens diárias de células durante 7 dias consecutivos (Fig.27). Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com a estudante de Iniciação Científica Ana Carolina Santos da Silveira.



**Figura 27. Análise das curvas de crescimento de formas promastigotas de *L. major* transformantes e selvagem.** Média dos valores das triplicatas obtidos das contagens diárias (cada 24h) de parasitos durante 7 dias consecutivos usando câmara de Neubauer. *L. major*: Selvagem, clones puros de *L. major* transformados com pX63NEO (PLI, PLII e PLIII) e clones puros de *L. major* transformados com pX63NEO-LeishTER (TERIII, TERIV e TERV). Os inóculos iniciais de todas as culturas foram de  $1 \times 10^6$  parasitos/ml.

Como mostrado na Fig. 27, há uma mudança no padrão de crescimento dos parasitos quando comparamos os superexpressores (TER III, TER IV e TER V) em relação aos controles transformados com pX63NEO (PLI, PLII e PLIII) e os parasitos selvagens. Os três clones superexpressores de LeishTER analisados atingem a fase exponencial de crescimento no quarto dia de cultivo, e com 1/3 a menos de células na cultura ( $3,0 \times 10^7$ ) se comparado aos selvagens que atingem o pico máximo da curva no quinto dia de crescimento com 1/3 a mais de células ( $4,5 \times 10^7$ ). Além disso, os clones superexpressores parecem não entrar em fase estacionária de crescimento como mostrado nas curvas dos parasitos selvagens (entre os dias 5 e 6 de cultivo), ao contrário, mostram um decréscimo abrupto no número de parasitos na cultura após o quarto dia de crescimento. Os controles transformados com pX63NEO (PLI, PLII e PLIII), por sua vez, apresentam dois picos de crescimento máximo em fase exponencial, um no quarto dia da curva ( $4,0 \times 10^7$ ) e outro no quinto dia quando conseguem atingir na fase exponencial o mesmo número de células que os selvagens ( $4,5 \times 10^7$ ). Provavelmente, isto se deve ao fato de estarem crescendo na presença de um agente de seleção, no caso o antibiótico G418, e por isso estão sob pressão seletiva. Fenômeno

semelhante já foi observado em transfectantes de *L. amazonensis* e *L. major* carregando pX63Neo vazio (SCHER et al., 2012; CODONHO et al., 2016).

Estes resultados sugerem que o aumento de transcritos TER tem efeito dominante negativo sobre a proliferação celular de formas promastigotas de *L. major*, causando provavelmente atraso no ciclo celular e morte prematura dos parasitos quando comparados aos controles.

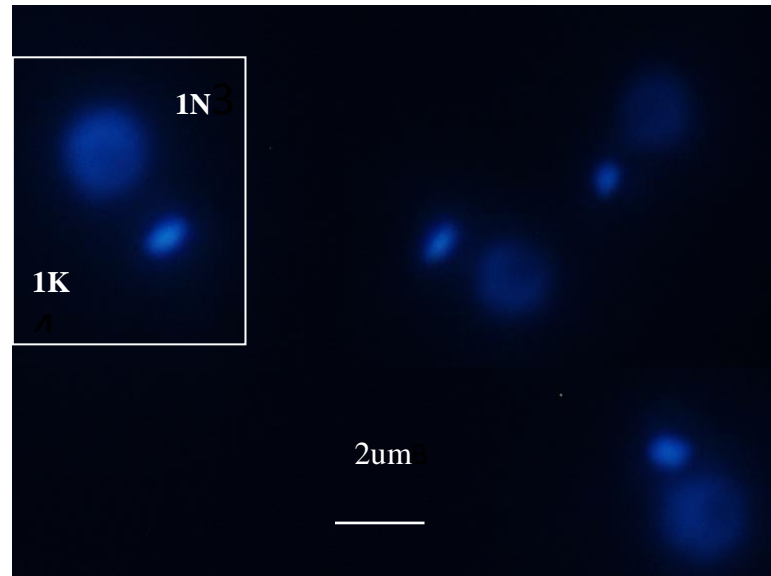
Esta é a primeira vez que se estuda o efeito da superexpressão de um longo RNA não codificador com função telomérica em *Leishmania*, por isso, para investigar se este efeito é devido a alterações no tamanho dos telômeros do parasito, realizamos ensaios morfológicos com o objetivo de verificar se as alterações no crescimento celular provocam alguma alteração nas organelas que contém DNA, e também de *Southern blot* telomérico, para observar possíveis alterações nos tamanhos dos telômeros que possam ter sido causadas pela superexpressão de LeishTER. É sabido que em *Saccharomyces cerevisiae*, a superexpressão do componente TER (TLC1), causa encurtamento dos telômeros e silenciamento de genes posicionados em região telomérica (SINGER; GOTTSCHLING, 1994).

#### **4.8 Análise morfológica dos parasitos superexpressores**

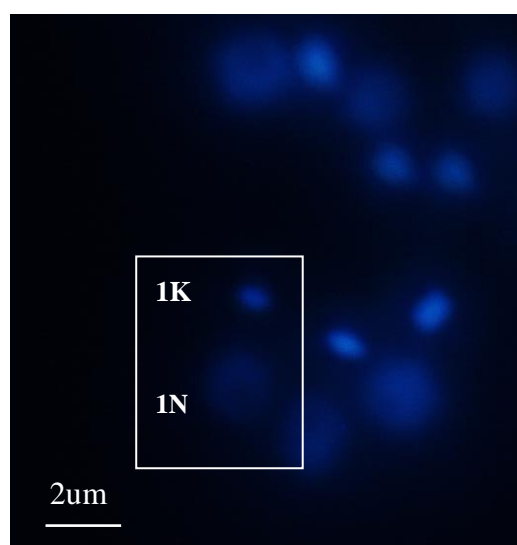
Segundo AMBIT et al. (2011), em uma cultura em crescimento exponencial de formas promastigotas de *L. major* selvagem, assíncrona em relação ao ciclo celular, 81,8% dos parasitos encontra-se com 1 cinetoplasto e 1 núcleo (1K1N). Conformações 2K1N aparecem em muito menor quantidade na população e correspondem a menos de 0,6% do total de parasitos nas culturas.

A análise de formas promastigotas em fase exponencial de crescimento obtidas de *L. major* selvagem (Figura 28) e dos clones transfectados com plasmídeo vazio (PL I) (Figura 29) e superexpressor (TER III)(Figura 30) coradas com DAPI mostram que, após a análise de 10 campos das lâminas contendo os parasitos controles (selvagem e PL I), a maioria encontrava-se com a conformação 1K1N (Figs. 28 e 29). Entretanto, na lâmina contendo os parasitos superexpressores observa-se uma proporção razoável de parasitos 1N2K e 1N (Figura 30), sugerindo fortemente que estes apresentam algum tipo de atraso na divisão dessas organelas, provavelmente causado pela superexpressão do TER. Isto pode explicar, em partes, as alterações de crescimento apresentadas pelos clones superexpressores, como mostrado na Fig. 27.

Pretendemos realizar novas análises morfológicas destes clones e de outros que ainda não foram analisados para confirmar se este fenótipo se repete. Também analisaremos o perfil de ciclo celular para verificar se ocorre “arrest” em alguma fase do ciclo que seja responsável pelos fenótipos observados.

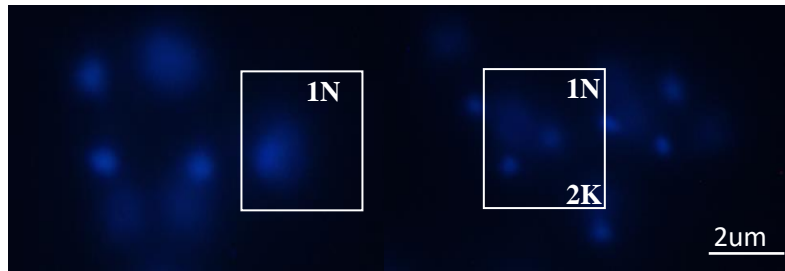


**Figura 28. *L. major* selvagem em conformação 1N1K.** Imagem representativa de 10 campos analisados contendo formas promastigotas coradas com DAPI visualizados em microscópio de fluorescência Nikon 80i, em imersão e aumento de 100X. As imagens foram capturadas usando o programa NIS Elements.



**Figura 29. Clone PL I de *L. major* em conformação 1N1K.** Imagem representativa de 10 campos analisados contendo formas promastigotas coradas com DAPI visualizados e microscópio de fluorescência.

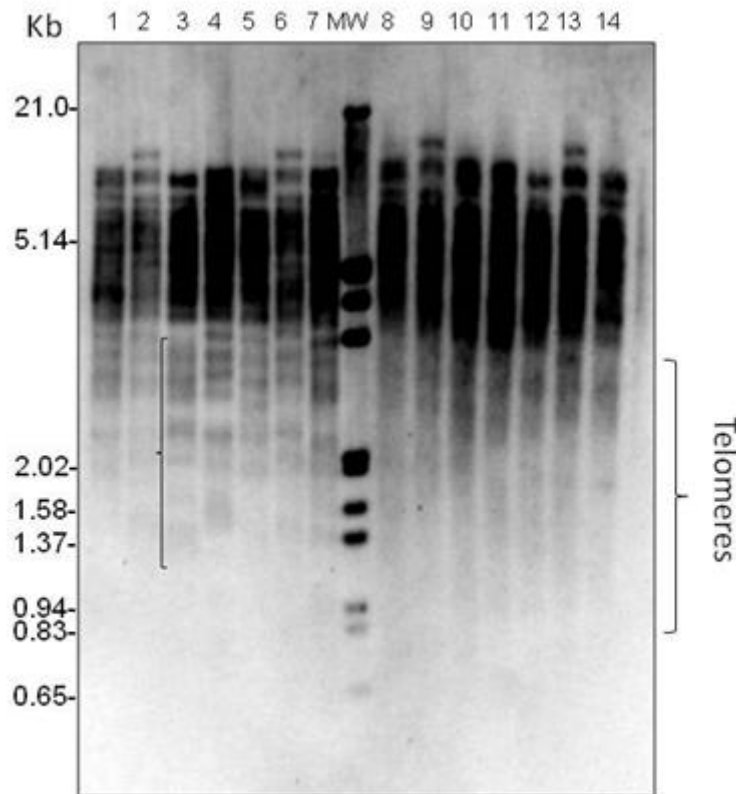




**Figura 30.** Clone superexpressor (TER III) de LeishTER em conformação 1N2K e 1N. Imagem representativa de 10 campos analisados contendo formas promastigotas coradas com DAPI visualizados em microscópio de fluorescência.

#### **4.9 Análise do perfil de restrição dos telômeros**

Para verificar se os parasitos superexpressores de LeishTER apresentavam alterações no tamanho dos telômeros, foi realizado um *Southern Blot* telomérico com DNA genômico obtido dos clones superexpressores (TERIII, TERIV, TERV), dos controles transformados com pX63NEO (PLI, PLII e PLIII) e de parasitos selvagens digeridos com a enzima de restrição *RsaI* (Figura 31). Ensaio de digestão com a exonuclease *Bal31* (CONTE; CANO, 2005) foram realizados para mostrar quais dos fragmentos hibridizados correspondem a DNA telomérico.



**Figura 31. Southern telomérico de clones superexpressores de LeishTER.** Foi utilizado 1 µg de DNA genômico de cada amostra, digerido com *RsaI* (Colunas 1-7). (Coluna 1) Clone V superexpressor, (Coluna 2) Clone IV superexpressor, (Coluna 3) Clone III superexpressor, (Coluna 4) PL III, (Coluna 5) PL II, (Coluna 6) PL I, (Coluna 7) *L. major* selvagem. 1 µg de DNA genômico de cada amostra foi digerido com *RsaI* e posteriormente tratado com exonuclease *Bal31* para mostrar quais dos fragmentos de restrição hibridizados correspondem aos terminais de cromossomos e estão em posição telomérica (Colunas 8-14). (Coluna 8) *L. major* selvagem, (Coluna 9) PL I, (Coluna 10) PL II, (Coluna 11) PL III, (Coluna 12) Clone III superexpressor, (Coluna 13) Clone IV superexpressor, (Coluna 14) Clone V superexpressor. O Southern blot foi hibridizado com a sonda DIG-TELC e revelado por quimioluminescência usando anticorpo anti-DIG e CSPD (Roche). As chaves indicam a posição dos fragmentos teloméricos. DNA Molecular Weight Marker III, DIG-labeled (Sigma-Aldrich) foi usado como marcador molecular (MW).

Os resultados mostram uma pequena diminuição no tamanho dos fragmentos de restrição telomérico  $\leq 3$  kb no clone superexpressor TERIII, em relação aos outros clones e aos controles transformados com pX63NEO e o selvagem. Pretendemos repetir esse ensaio analisando o perfil de restrição telomérico desses mesmos parasitos durante uma curva de crescimento e de parasitos com diferentes duplicações celulares.

## 5. Conclusões

Neste trabalho iniciamos a caracterização molecular do componente RNA da telomerase de *L. major* (LeishTER) (Vasconcelos et al., 2014). Inicialmente clonamos o gene que codifica o LeishTER, sequenciamos e subclonamos o mesmo em vetor de expressão em *Leishmania*, pX63NEO (LEBOWITZ et al., 1991) de forma a obter plasmídeos recombinantes pX63NEO-LeishTER. Formas promastigotas do parasito em fase exponencial de crescimento foram transformadas tanto com o plasmídeo pX63NEO vazio, usado como controle, quanto com o pX63NEO-LeishTER usando eletroporação. Em seguida, obtivemos clones puros de parasitos transformados com cada um dos plasmídeos e três populações clonais mais parasitos selvagens, avaliados quanto ao crescimento em curvas de crescimento, expressão do transcrito LeishTER e tamanho dos telômeros. Os parasitos superexpressando LeishTER (transformados com pX63NEO-LeishTER) mostraram alteração no padrão de proliferação celular quando comparados aos controles transformados com pX63NEO e os parasitos selvagens. Eles não atingem o pico máximo da curva, ou seja, não atingem o mesmo número de parasitos que as culturas selvagem e transformadas com pX63NEO e também não entram em fase estacionária de crescimento.

Foi observado, também, uma maior quantidade de conformações “raras” quando analisada a morfologia dos parasitos por coloração do núcleo e do cinetoplasto. Configurações 1N2K e até mesmo 1N foram visualizadas somente nos parasitos superexpressores, comparadas aos controles onde a maioria apresentou configuração 1N1K. A análise do *Southern blot* telomérico também mostrou discreta diminuição em fragmentos teloméricos  $\leq$  3kb em um dos clones superexpressores quando comparado aos controles e ao selvagem. Portanto, embora ainda preliminares, estes resultados mostram que possivelmente a superexpressão do LeishTER pode provocar alterações não somente no crescimento e divisão de organelas que contém DNA, como também na manutenção dos telômeros dos parasitos, sugerindo um efeito dominante negativo sobre a ação do gene LeishTER selvagem.

## 6 .Referências

- ABRAHAM, J. M.; MELTZER, S. J. Long Noncoding RNAs in the Pathogenesis of Barrett's Esophagus and Esophageal Carcinoma. **Gastroenterology**, v. 153, n. 1, p. 27–34, 2017.
- AMBIT, A. et al. Morphological events during the cell cycle of leishmania major. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 11, p. 1429–1438, 2011.
- BIESSMANN, H.; MASON, J. M. Chromosoma Focus Telomere maintenance without telomerase. **Chromosoma**, v. 106, n. 2, p. 63–69, 1997.
- BLACKBURN, E. H.; COLLINS, K. Telomerase: An RNP enzyme synthesizes DNA. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 3, n. 5, p. 1–9, 2011.
- BRASIL, M. DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].
- CANO, M. I. et al. Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3616–21, 1999.
- CANO, M. I. N. Telomere biology of Trypanosomatids: More questions than answers. **Trends in Parasitology**, v. 17, n. 9, p. 425–429, 2001.
- CASH, D. D.; FEIGON, J. Structure and folding of the Tetrahymena telomerase RNA pseudoknot. **Nucleic Acids Research**, v. 45, n. 1, p. 482–495, 2017.
- CENTER OF DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Leishmaniasis, Epidemiology and Risk Factors. 2013.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, 2007.
- CHEN, J.-L.; GREIDER, C. W. An emerging consensus for telomerase RNA structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14683–14684, 2004.
- CHEN, J. L.; BLASCO, M. A.; GREIDER, C. W. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 503–514, 2000.
- CHEN, Y. et al. Structure of stem-loop IV of Tetrahymena telomerase RNA. **The EMBO journal**, v. 25, n. 13, p. 3156–66, 2006.
- CODONHO, B. S. et al. HSP70 of Leishmania amazonensis alters resistance to different stresses and mitochondrial bioenergetics. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 7, p. 460–468, 2016.
- COLLINS, K.; MILLER, M. C. Telomerase recognizes its template by using an adjacent RNA motif.

**Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 10, p. 6585–90, 2002.

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, 2005.

DA SILVA, M. S. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

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, 2006.

GIARDINI, M. A. et al. *Leishmania amazonensis*: Partial purification and study of the biochemical properties of the telomerase reverse transcriptase activity from promastigote-stage. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 243–248, jan. 2011.

GILLIS, A. J.; SCHULLER, A. P.; SKORDALAKES, E. Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. **Nature**, v. 455, n. 7213, p. 633–637, 2008.

GILSON, E.; GÉLI, V. How telomeres are replicated. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 825–838, 2007.

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. 1027–1034, 2003.

GREIDER, C. W.; BLACKBURN, E. H. The telomere terminal transferase of tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. **Cell**, v. 51, n. 6, p. 887–898, 1987.

GUPTA, S. K. et al. The *Trypanosoma brucei* telomerase RNA (TER) homologue binds core proteins of the C/D snoRNA family. **FEBS Letters**, v. 587, n. 9, p. 1399–1404, 2013.

HOFFMAN, H.; RICE, C.; SKORDALAKES, E. Structural analysis reveals the deleterious effects of telomerase mutations in bone marrow failure syndromes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 11, p. 4593–4601, 2017.

HUG, N.; LINGNER, J. Telomere length homeostasis. **Chromosoma**, v. 115, n. 6, p. 413–425, 2006.

HUR, K. et al. Overexpression of human telomerase RNA in *Helicobacter pylori*-infected human gastric mucosa. **Japanese journal of cancer research : Gann**, v. 91, n. 11, p. 1148–1153, 2000.

HUR, K. et al. Live-cell imaging of budding yeast telomerase RNA and TERRA. **Methods**, v. 153, n.

1, p. 46–53, 2017.

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. 218–225, 2006.

JANSSON, L. I. et al. Structural basis of template-boundary definition in Tetrahymena telomerase. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 22, n. 11, p. 883–888, 2015.

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, 1990.

LAI, A. C. W.; BA, A. N. N.; MOSES, A. M. Predicting kinase substrates using conservation of local motif density. **Bioinformatics**, v. 28, n. 7, p. 962–969, 2012.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, p. 13–32, 2010.

LAINSON, R.; WARD, R. D.; SHAW, J. J. *Leishmania* in phlebotomid sandflies: VI. Importance of hindgut development in distinguishing between parasites of the *Leishmania mexicana* and *L. braziliensis* complexes. **Proceedings of the Royal Society of London - Biological Sciences**, v. 199, n. 1135, p. 309–320, 1977.

LEBOWITZ, J. H.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Simultaneous transient expression assays of the trypanosomatid parasite *Leishmania* using  $\beta$ -galactosidase and  $\beta$ -glucuronidase as reporter enzymes. **Gene**, v. 103, n. 1, p. 119–123, 1991.

LINGNER, J. Reverse Transcriptase Motifs in the Catalytic Subunit of Telomerase. **Science**, v. 276, n. 5312, p. 561–567, 1997.

LIVENGOOD, A. J.; CECH, T. R.; ZAUG, A. J. Essential regions of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase RNA: separate elements for Est1p and Est2p interaction. **Molecular and cellular biology**, v. 22, n. 7, p. 2366–74, 2002.

LONDOÑO-VALLEJO, J. A.; WELLINGER, R. J. Telomeres and telomerase dance to the rhythm of the cell cycle. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 37, n. 9, p. 391–399, 2012.

LUE, N. F. Adding to the ends: What makes telomerase processive and how important is it? **BioEssays**, v. 26, n. 9, p. 955–962, 2004.

MARUSÍĆ, L. et al. Reprogramming of telomerase by expression of mutant telomerase RNA template in human cells leads to altered telomeres that correlate with reduced cell viability. **Molecular and**

- cellular biology**, v. 17, n. 11, p. 6394–401, 1997.
- MASON, M.; SCHULLER, A.; SKORDALAKES, E. Telomerase structure function. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 21, n. 1, p. 92–100, 2011.
- MCEACHERN, M. J.; BLACKBURN, E. H. Runaway telomere elongation caused by telomerase RNA gene mutations. **Nature**, v. 376, n. 6539, p. 403–9, 1995.
- MITCHELL, J. R.; COLLINS, K. Human Telomerase Activation Requires Two Independent Interactions between Telomerase RNA and Telomerase Reverse Transcriptase. **Molecular Cell**, v. 6, n. 2, p. 361–371, 2000.
- MOTTRAM, J. Protocols for handling and working with Leishmania species. **Mottram laboratory**, p. 2–31, 2008.
- MUÑOZ, D. P. et al. Biochemical properties of Trypanosoma cruzi telomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 17, p. 3616–21, 2004.
- NEVES, D. P. ET AL. **Parasitologia Humana**. 12 ed. Atheneu, p.41-83, 2011.
- NÜHS, A. et al. A novel marker, ARM58, confers antimony resistance to Leishmania spp. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 4, n. 1, p. 37–47, 2014.
- OPAS; OMS. Leishmanioses. Informe Epidemiológico das Américas 2018. 2018.
- PALM, W.; DE LANGE, T. How Shelterin Protects Mammalian Telomeres. **Annual Review of Genetics**, v. 42, n. 1, p. 301–334, 2008.
- RINN, J. L.; CHANG, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. **Annual Review of Biochemistry**, v. 81, n. 1, p. 145–166, 2012.
- SANDHU, R. et al. A trans-spliced telomerase RNA dictates telomere synthesis in Trypanosoma brucei. **Cell Research**, v. 23, n. 4, p. 537–551, 2013.
- SCHER, R. et al. **Characterization of anti-silencing factor 1 in Leishmania major**. [s.l: s.n.]. v. 107
- SEKARAN, V.; SOARES, J.; JARSTFER, M. B. Telomere maintenance as a target for drug discovery. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 3, p. 521–538, 2014.
- SINGER, M. S.; GOTTSCHLING, D. E. TLC1: template RNA component of Saccharomyces cerevisiae telomerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 266, n. 5184, p. 404–409, 1994.
- SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 177–208, 2004.
- STONE, M. D. et al. Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase

ribonucleoprotein. **Nature**, v. 446, n. 7134, p. 458–461, 2007.

TEIXEIRA, S. M. R.; VALENTE, B. M. Mechanisms Controlling Gene Expression in Trypanosomatids. In: SILVA, M. S. DA; CANO, M. I. N. (Eds.). . **Frontiers in Parasitology (Volume 1) Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids**. [s.l: s.n.]. p. 30.

TZFATI, Y. Template Boundary in a Yeast Telomerase Specified by RNA Structure. **Science**, v. 288, n. 5467, p. 863–867, 2000.

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, 2014.

WEBB, C. J.; ZAKIAN, V. A. **Telomerase RNA is more than a DNA template**. [s.l: s.n.]. v. 6286

WEINRICH, S. L. et al. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. **Nature Genetics**, v. 17, n. 4, p. 498–502, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Leishmaniasis Epidemiology. 2015.

WU, R. A. et al. Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. **Annual Review of Biochemistry**, v. 86, n. 1, p. 439–460, 2017.

ZAPPULLA, D. C.; CECH, T. R. RNA as a flexible scaffold for proteins: Yeast telomerase and beyond. **Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology**, v. 71, p. 217–224, 2006.

ZAPPULLA, D. C.; GOODRICH, K.; CECH, T. R. A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 12, n. 12, p. 1072–1077, 2005.

ZEMORA, G.; HANDL, S.; WALDSICH, C. Human telomerase reverse transcriptase binds to a pre-organized hTR in vivo exposing its template. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. 1, p. 413–425, 2016.



## 7. Anexos

Anexo 1: Sequência do Gene putativo do componente RNA da telomerase de *Leishmania major* (LeishTER)

GenBank acc#MF784563

```
ggglttg acag accatctctctctg gtcgtcaaca cagccctcttg accctaaccctagg acatcg tcga cacctgtgtt  
cctgtg cgggtcac aggtgt cgc atcgcctg cctcctcgttttctccctctctgtctctgttctctg cctcg cctgtc acc  
gtcatc gccccg agtcc attac ctg tgc gtc gtc atgg cgg tggatggcggc ggagg tggtagaa gggatcagt  
ga ctg tg aagaaag gatgagtgggagtcg gaaag aagagg aagggcagag ctggccccgtg tgcgtgcctgtctgtct  
gtgtgcctgtacgtg cgtatgtgtgtgcgtgtgtgtggtgtgcattcactgtcagtcacg acgtctgtacg catgc  
agacaag caccacacg ggagattgctctgttg atgatg gctctggctg ctgctgtgctgtgatagcgtgtgtgcg  
tactgtgtcatctccgcagtg aaagtattcctgttctctgcccatcggcgtgttctgtg cgcg gatcccttca ctctg  
atatatg catgca cgtgtctg ctttg tttcctgctcctgctcctcaccactgcgcatcgcacc aatcgcg actct  
gtgtctgt catgtctgctcctgtctcag cacg cgtgcgc cgcacacta tgcgg ccttcatc gctcaa cgg ctctttcc  
gtttcg cacctgtgccctcagg agcg cgtaacgacg cctaag cacaca ccgtcacgcagaa tcagaccc caccg cgtg  
attg caag cgatcgcggcctcactcagcagtcgag gtcgggc aacgg gcg cagtcggctctccttctc atttgctttca  
gtatgctggccttctc gccgtcgggtgagg gttt atgtgtgtgtcgtg cggg cgtgtg gtc caccac catgga ctg tg agaac  
tagcaccg cca ctacgg catgca cacatacacgac cacgtg cacgtg cacacg cgcgtg caccgactttgta ggcgga  
tctcgcg cctccagtg cgc cacttg cgtctctctcgtgtg ctttctctctctctacctac atctgca tgcgtg cga tgttg  
catg caaag aacaggatggaag tgg aagtgggga aggttcacgtgacgca aagagag aagag accgg ggaag cgttt  
tcag aggcg ggtg cgcacacgtg cgc gctgtctg tgcgtgtgtgtgtgt catgtcaagcca ccttagca aatagggg a  
gggtgg aggtgttactgtgtcacttgctcgtcgc atcga ctg cccgg cgtatccg tgtcgg caag catgtgtgtg gatct  
gtgcaatactgtgtgttgggggtgtcttgcgtg cttgag accgagggg gtcgga acgag tgg tgg aggggg ccacggctg  
ccctg atgtg acgcccgcacga gaaga agagg aggggtgggtagc atgaggcctgtgatgatggtcggtgga  
agaggtg atg cgag agaatcgg ggtg agaagg ggctag ctgggtg ggaagacgctcgtgtg atgtgtgtgtgtgtg  
cccgtctcgtgtg agagggg ggcg ggaag caga cgccgggtgataggc agggctctgtgtgtgtgtgga tggg cgcg  
ag aatgaa aggaaa gccaatg cgc gagaag aactgtgactga gcatgtcatctgag aaagtgagg ggtg gtc atg  
caaag agggc acag acga cggag aagtggcgtg cactgcgtgtctgtcc acgtatgtgtgtg cgt atatgtct  
atgtgtgg gtc cgcgag agtctgtg cttgctg gatg ccgaatcgc cggcagc cgtgtcctgtggtatg gagctg ccc  
cttctc ccttttatcgac gccacg ctg cgggtccctc gatgca ctgtgcg agtctgataagg cga aagagag tgg ggg  
agg ggc aacg agcgg cgctc ctgggtgcgtc caaatgcgcatgtgtgtctg ttgagg aaggag atg agggga ag  
acgattc acgtga cgcaag agag aagag accg ggaagcgtttc agag gcgg gtc cgcacacgtgcgg cgtgtctgt  
gctgtgtgtgtgtgcatgcaaacccac cttagca aataggggag gtcg gagggtttactgtgtcc actg cctgtcgcac  
gcaactgcccgcgctatccgtgtcggc aagc atgtgtcgtatctgtgca atactgtgtgttg ggggtttctcgtgtcctgag  
accga ggggtcg gaacg agtgggtgagggg gccacg gctgc cctgatgtgtcacg cgcgtacga gaaga agagg  
gag ggtg ggtgagcatg aggcctggatg atg gtc cgggtgag aggtgatcgc agaga atcgggtgagaag gggct  
ag ctg gtc ggaagtaacgtcgtgtgtatgtgtgtgtgtgtgt ccgtctcgtgtggag aggggg cggg aagcagacg  
gccggtgataggc agggctcgtgtgtgtgtgtgtgtgtg agaatgtaagga aagc caag atg cggag aagaa  
ctgtgactg agcatgtcatctgaga aagtgagggtg gtc atg caaag agggg cacagacg accg agaagtggtcgtg  
cactg cgtgtctgtc cacgtatgtgtg cgtatcgtatgtgtgtgtgtgtggg gcg cgag agttc gctggtctgt cgtggt  
gccga atg cgcgga gccgtgctctgtg gtatggag ctgcccctctcccg ttttatcg acgcacgctgc ggttccctc  
gatgcactgtgagctg ata aggcgaaaag agagtggggg agggg caacgagcggcg ctctggtg gtcgtctca ag  
atcgc catgtgtgtcctgtg gaggaa gggag atgag ggaag acga
```