

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Júlio de Mesquita Filho"
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNA LONGO NÃO CODIFICANTE TERRA E O
PERFIL DE RESTRIÇÃO TELOMÉRICA EM *LEISHMANIA MAJOR***

LEILANE SILVA DE OLIVEIRA

BOTUCATU – SP

2023

LEILANE SILVA DE OLIVEIRA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO RNA LONGO NÃO CODIFICANTE TERRA E O
PERFIL DE RESTRIÇÃO TELOMÉRICA EM *LEISHMANIA MAJOR***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Instituto de Biociências, Campus de Botucatu,
UNESP, para obtenção de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano

Coorientador: Beatriz Cristina Dias de Oliveira

BOTUCATU – SP

2023

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

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: MARIA CAROLINA A. CRUZ E SANTOS-CRB 8/10188

Oliveira, Leilane Silva de.

Análise da expressão do RNA longo não codificante TERRA e o perfil de restrição telomérica em *Leishmania major* / Leilane Silva de Oliveira. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano

Coorientador: Beatriz Cristina Dias de Oliveira

Capes: 20202008

1. *Leishmania major*. 2. Leishmaniose. 3. Telômero. 4. RNA Longo não Codificante.

Palavras-chave: *Leishmania major*; Leishmaniose; TERRA; Telômero; lncRNA.

SUMÁRIO

1. RESUMO	5
2. INTRODUÇÃO	6
3. METODOLOGIA	11
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	14
5. CONCLUSÃO	18
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	19

1. RESUMO

As leishmanioses compreendem o espectro de infecções parasitárias provocadas por parasitos do gênero *Leishmania*, estando presente em mais de 90 países e atingindo mais de 12 milhões de pessoas no mundo, de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS). Não obstante, os tratamentos disponíveis para os quadros de leishmaniose se mostram pouco efetivos, e até o momento não há nenhuma vacina disponível. Logo, devido a carência de tratamentos e profilaxias eficientes a busca por novos alvos terapêuticos se torna imprescindível. Os telômeros, estruturas nucleoproteicas localizadas nas extremidades dos cromossomos lineares, podem ser um potencial alvo para intervenções, devido ao seu papel essencial na manutenção da estabilidade genômica nos eucariotos. Em *Leishmania*, os telômeros são formados por sequências de DNA repetidas em *tandem* do tipo 5'-TTAGGG-3'. Além disso, um aspecto importante a se notar sobre os telômeros em *Leishmania* é que eles possuem uma timina modificada denominada base J (β -d-glucosyl-hydroxymethyluracil). Estudos recentes realizados por nosso grupo de pesquisa mostram que a diferença entre os níveis de base J nos telômeros podem influenciar a expressão de RNAs longos não codificantes, conhecidos como TERRA (telomeric repeat-containing RNA). Em *Leishmania spp.* a expressão dos transcritos TERRA varia de acordo com a forma de vida dos parasitos e com o tempo de duplicação da população. Dessa forma, este projeto teve como objetivo avaliar a expressão dos transcritos TERRA dos cromossomos 10, 20 e 29 ao longo das passagens de *Leishmania major* em culturas axênicas e comparar com seu respectivo perfil de restrição telomérica. Obtivemos sucesso com os perfis de restrição telomérica de *Leishmania major*, apesar de não ter sido possível observar diferença significativa entre os tamanhos dos fragmentos nas passagens estudadas. Conseguimos confirmar que TERRAs provenientes de cromossomos diferentes possuem alterações claras de expressão entre si, porém a diferença de expressão entre as passagens analisadas não foi esclarecida.

Palavras-chave: *Leishmania major*, Leishmaniose, Telômero, lncRNA, TERRA.

2. INTRODUÇÃO

Os parasitos do gênero *Leishmania* spp.

Os membros do gênero *Leishmania* fazem parte da família Trypanosomatidae ordem Kinetoplastida [1] que se diferenciam dos demais organismos eucariotos graças à presença do cinetoplasto, uma estrutura especializada dentro da mitocôndria que armazena o DNA mitocondrial (kDNA) [2]. O kDNA nada mais é que uma rede de mini e maxicírculos compreendendo cerca de 30% de todo material genético celular. Os maxicírculos são similares ao DNA mitocondrial encontrado nos demais eucariotos, codificando proteínas, RNAs ribossomais e componentes presentes na cadeia respiratória. Enquanto isso os minicírculos são estruturas heterogêneas presentes em variadas cópias codificando RNAs guias que serão utilizados na edição dos transcritos dos maxicírculos [3]. O cinetoplasto posiciona-se rente ao corpo basal do flagelo e a sua posição relativa ao núcleo irá variar de acordo com os estágios do ciclo vital destes parasitos [4]. Além do cinetoplasto, os organismos desta ordem apresentam outras heterogêneas características: como a existência de organelas em cópia única, transcrição policistônica, o mecanismo de trans-splicing e a ocorrência de base J [5,6].

Mesmo majoritariamente os organismos incluídos na família *Trypanosomatidae* sejam classificados como parasitos monogenéticos, isto é, seu ciclo de vida ocorre parasitando apenas um hospedeiro, o gênero *Leishmania* spp. conta com um ciclo de vida digenético parasitando hospedeiros vertebrados e invertebrados [7]. A partir da morfologia é possível diferenciar as formas de vida desses organismos com base na localização do flagelo [8]. Formas amastigotas não possuem flagelos evidentes e são exclusivamente encontradas no interior da célula hospedeiro, parasitando apenas células do sistema monocítico fagocitário. As formas promastigotas possuem flagelos aparentes e formas alongadas, sendo possível encontra-las no aparelho digestivo vetor flebotomíneo onde será capaz de eventualmente se transformar em formas promastigotas metacíclica. Essas últimas formas também possuem flagelos perceptíveis, porém, sua capacidade de proliferação é anulada sendo justamente as formas infectivas desses parasitos [9].

Observando justamente o ciclo de vida destes parasitos, a Figura 1 exemplifica as etapas do ciclo de vida destes parasitos, no hospedeiro vertebrado (seres humanos e outros mamíferos) e no hospedeiro invertebrado (insetos flebotomíneos), este último denominado como vetor. O ciclo se inicia com o repasto sanguíneo de uma fêmea de um flebotomíneo em um hospedeiro vertebrado infectado. Ao longo a captação de sangue pelo inseto há a ingestão de macrófagos infectados com as formas amastigotas de *Leishmania* spp., que então se diferenciam para a forma promastigota procíclica no sistema digestório do inseto. A seguir, formas promastigotas procíclicas seguirão pelo processo de metaciclogênese e se diferenciam nas formas metacíclicas [10]. No próximo repasto sanguíneo haverá então a inoculação no hospedeiro mamífero das formas promastigotas metacíclicas que serão fagocitadas por neutrófilos e

macrófagos. Dentro dos macrófagos há então a diferenciação para a forma amastigota, permitindo assim a continuidade do ciclo.

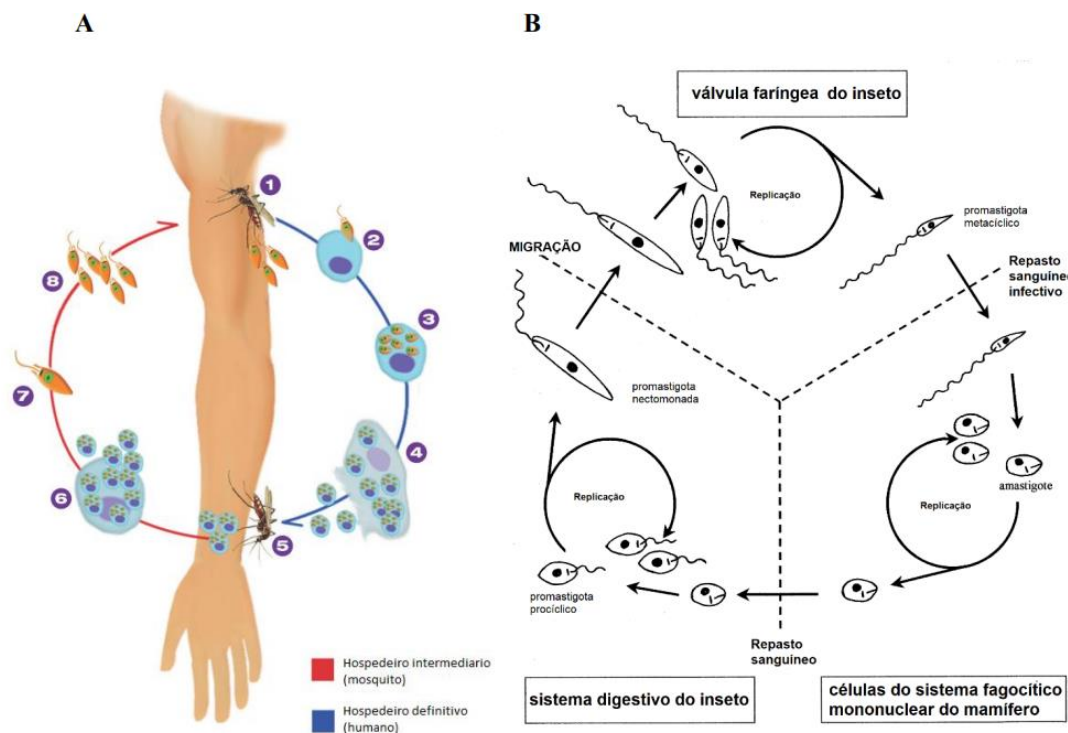


Figura 1. Representação do ciclo de vida de *Leishmania* spp. **A)** 1. Durante o repasto sanguíneo o inseto injeta formas promastigotas metacíclicas no local da picada; 2. Essas formas promastigotas metacíclicas infectam macrófagos e outras células que realizam fagocitose; 3. Dentro dos macrófagos e outras células fagocíticas, as formas metacíclicas se diferenciam em amastigotas; 4. Formas amastigotas se multiplicam dentro da célula hospedeira; 5. E 6. Em novo repasto sanguíneo as formas amastigotas são ingeridas pelo inseto; 7. No sistema digestivo do inseto, formas amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas; 8. Promastigotas procíclicas se multiplicam e migram para a probóscide do inseto onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas. Figura extraída de VERMELHO et al., 2017 [54]. **B)** Ciclo no vetor (inseto). Figura extraída de GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003 [55].

Leishmanioses

As leishmanioses são um espectro de patologias parasitárias causadas por organismos pertencentes ao gênero *Leishmania* spp.. Essas doenças são encontradas em cerca de 90 países tropicais e subtropicais, sendo mais recorrente em áreas rurais [11]. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), aproximadamente um milhão de casos de leishmaniose cutânea e 100 mil de leishmaniose visceral são registrados a cada ano [12]. As crescentes mudanças climáticas como desmatamento para plantio e agropecuária, urbanização e desvio de rios para irrigação podem amplificar a área de dispersão dos vetores, insetos flebotomíneos [13]. Atualmente são identificadas cerca de 20 espécies categorizadas como pertencentes ao gênero *Leishmania* que possuem potencial patogênico ao homem. A transmissão ocorre a partir de aproximadamente 30 espécies de flebotomíneos dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*

[14]. Além dos humanos, animais silvestres e domésticos também estão sujeitos à infecção por esses parasitos.

As leishmanioses possuem uma miríade de manifestações clínicas determinadas pela espécie do parasito e pelo estado imunológico do hospedeiro. Em linha geral, as formas clínicas da doença podem ser separadas em três grupos: leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) [15]. A LC é identificada por úlceras pontuais nas zonas expostas à picada do inseto, podendo causar cicatrizes permanentes ou não, a depender da espécie parasitária. Podem flutuar na sua gravidade e duração, frequentemente são autocuráveis [16]. A LMC é definida através de lesões que atingem parcial ou totalmente as mucosas como faringe, laringe, nariz e boca. Possui capacidade de ser letal caso não haja tratamento no tempo correto, e é identificada pela perda de peso, febre e anemia [17]. Finalmente, a LV, também é conhecida como calazar, é a forma mais grave que atinge principalmente crianças e adultos jovens. Seus sintomas variam entre febre alta e prolongada, esplenomegalia e hepatomegalia (crescimento do baço e fígado, respectivamente), anemia e perda de peso. Se não tratada, pode levar à morte [18].

Os tratamentos e profilaxias disponíveis atualmente para pacientes diagnosticados com algum dos tipos de leishmaniose são pouco eficientes. Os antimoniais pentavalentes que são usados a mais de 60 anos como uma primeira alternativa de tratamento se mostram altamente tóxicos e com diversos efeitos colaterais ao paciente, além de propiciar um ambiente ideal para a seleção de parasitos resistentes [19]. Outros tratamentos alternativos como o uso de miltefosina e anfotericina B não apresentam eficiência satisfatória, logo que, o primeiro exhibe alta taxa de teratogenicidade e o segundo é inviável dado o seu alto custo [20]. A carência de uma vacina, tratamentos e profilaxias para a prevenção da leishmaniose torna fundamental a busca para novos alvos terapêuticos.

Telômeros e a dinâmica telomérica

Telômeros e telomerase

Os telômeros são estruturas nucleoproteicas constituídas por proteínas e sequências de DNA repetitivas não codificantes, presentes nas extremidades dos cromossomos lineares [21]. O DNA telomérico é composto de uma região dupla fita, sendo uma das fitas rica em citosina e a outra em guanina, e uma porção final simples fita (rica em guanina). Essa porção final em conformidade de simples fita é denominada de 3'*G-overhang*. As proteínas do complexo *shelterin*, por exemplo, são responsáveis pela proteção do DNA telomérico, já que impedem o reconhecimento deste pela maquinaria de reparo de DNA [22].

É sabido que a cada ciclo de divisão celular há um encurtamento da porção dos telômeros, devido à limitação da DNA polimerase em finalizar a replicação da fita descontínua do DNA [23]. Este encurtamento progressivo, quando atinge um nível crítico, leva à perdas de DNA e sequências gênicas

que podem induzir a senescência ou morte celular [24]. Deste modo, a manutenção dos telômeros é essencial para que a célula continue o processo de divisão celular [23].

Em *Leishmania* spp., os telômeros possuem sequências curtas em tandem de 5' TTAGGG 3' [25, 26] com a exceção da espécie *Leishmania braziliensis* que apresenta uma sequência incomum de 5'-CCTAACCCGTGGA-3' nos finais de seus cromossomos [27]. Em *L. amazonensis*, atualmente o tripanossomatídeos com o perfil telomérico mais bem investigado, o 3' *overhang* possui um tamanho aproximado de 12 nucleotídeos (5'-GTTAGGGTTAGG-3') [28]. Nessa espécie, várias proteínas teloméricas foram identificadas, incluindo as proteínas de ligação A1 (LaRPA-1) e a proteína similar à calmodulina (LCaLA), que interagem com a telomerase e o 3' *overhang*; LaRBP38 que se liga ao RNA; proteína fator de ligação da repetição telomérica (LaTRF) e proteína de ligação dos telômeros 1 (LaTBP1) que se associam com a fita dupla do DNA telomérico [29, 30, 31, 32]. Em *Leishmania major* o 3' *overhang* tem por volta de 9 nucleotídeos 5' -GGTTAGGGT- 3' [33] aumentando aproximadamente 1 par de base a cada duplicação da população em cultura. Também já foi observado o aumento sofrido pelos telômeros de promastigotas procíclicas de *L. amazonensis* durante passagens contínuas [34], enquanto as informações na literatura são escassas em relação a composição das extremidades dos cromossomos de *L. infantum*.

Um detalhe importante a ser notado sobre os telômeros em *Leishmania* é a presença da base J (β -d-glucosyl-hydroxymethyluracil), uma timina modificada que atua como um marcador epigenético controlando a ação da RNA polimerase II e cuja presença impede a clivagem do DNA por endonucleases de restrição [35]. Essa timina hipermodificada está presente em diversos tripanossomatídeos e na maioria deles essa base foi caracterizada espalhada em diferentes regiões de seus cromossomos, exceto algumas espécies de *Leishmania* como *L. major* onde 98% das bases J são encontradas em regiões teloméricas e subteloméricas [36,37,38]. Vale mencionar que a presença de base J predominantemente nos telômeros resulta em um perfil telomérico com bandas acima de 3000 pares de base, uma vez que a não clivagem do DNA em posição subtelomérica, impede a separação das extremidades dos cromossomos [39]. Estudos recentes [39] sugerem que níveis diferentes de base J nos telômeros podem modular a transcrição do TERRA. Na maioria dos organismos já investigados, incluindo *Leishmania*, a manutenção do telômeros ocorre por ação do complexo ribonucleoproteico (RNP) telomerase, que é responsável pela adição de nucleotídeos nas extremidades dos cromossomos [40, 41]. A telomerase possui dois componentes essenciais: a proteína transcriptase reversa da telomerase (TERT ou e Est2 em leveduras), que adiciona as sequências teloméricas na região 3'G-*overhang*, e o RNA não codificador (TER, TERC ou Tlc1 em leveduras). O TER contém a sequência molde para que a TERT sintetize as novas sequências teloméricas durante a fase S do ciclo celular [42].

O complexo ribonucleoproteico (RNP) telomerase foi identificado em vários tripanossomatídeos e suas propriedades bioquímicas e de síntese se mostrou similar a maioria dos eucariotos [43]. Em

Leishmania spp., a telomerase também é composta pelo componente proteico TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) e o RNA, TER (Telomerase RNA). Como essas moléculas são únicas em sequência de nucleotídeos, se assemelhando somente pela presença de alguns elementos de estrutura secundária, o TER de *Leishmania* (*LeishTER*) além de ser um dos maiores TER descritos até o momento, apresenta potencial para ser alvo para desenho de fármacos anti-parasitários.

TERRA

O TERRA (Telomeric Repeat Containing TERRA) é um RNA longo não codificante transcrito a partir da fita telomérica rica em C. Recentemente, evidências foram encontradas de que é possível que lncRNAs poderiam controlar a atividade telomérica [44, 45]. Em mamíferos, os transcritos TERRAs possuem por volta de 100bp a 9kb, com repetições tipo 5' UUAGGG 3' e estão presentes em diferentes tipos de eucariotos como humanos, peixes, roedores e leveduras, denotando sua provável conservação evolutiva [44, 45, 46]. O TERRA está diretamente envolvido na regulação do comprimento e composição telomérica assim como sua integridade. Apesar de bem descrito, não é claro o que define o número de moléculas do TERRA no ambiente celular. Sua transcrição varia conforme o estado de desenvolvimento e fase do ciclo celular, se há ou não atividade tumoral, com o comprimento dos telômeros e a composição da cromatina telomérica [47–49]. Na espécie humana como também em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*, foram observadas a formação de híbridos TERRA contendo DNA telomérico e RNA, formando uma estrutura tipo R-loop. Muitos transcritos originando esses chamados R-loops aumentam a possibilidade de formação de quebras na dupla fita causando distúrbios e comprometendo a integridade dos telômeros e regiões subteloméricas [30, 50,51].

O objetivo desse projeto previu estudar o perfil de restrição telomérica em *L. major* e comparar com a expressão do lncRNA TERRA proveniente dos cromossomos 10, 20 e 29. Esse estudo foi realizado utilizando as formas promastigotas procíclicas, as quais foram obtidas de culturas axênicas.

3. METODOLOGIA

Cultivo celular das espécies de *Leishmania* spp.

Neste projeto foi utilizada uma espécie de *Leishmania* spp.: *L. major* (MHOM/IL/1980/Friedlin). As formas promastigotas foram cultivadas à 26°C em meio de cultura comercial M199 1X, pH 7,3 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado pelo calor (Cultilab) e na presença dos antibióticos penicilina (1000 U/mL) e estreptomicina (10.000 µg/mL).

Análise dos telômeros por Southern blot

Extração do DNA genômico

A extração do DNA das formas promastigotas foi feita na fase exponencial da cultura, utilizando o kit DNeasy Blood & Tissue (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante. Após, as amostras foram tratadas com RNase A (100µg/µl) ThermoFisher. A constatação da pureza e sua quantificação realizadas por espectrofotometria de absorção (OD_{260nm}) através do equipamento Epoch (Biotek). A integridade do DNA extraído foi constatada por verificação em gel de agarose 1%.

Southern blot telomérico

DNA genômico de *L. major* (1 µg) das passagens 5, 10, 15 e 20 foi digerido com 5U de *RsaI* (Roche) a 37 °C - overnight. Os DNAs digeridos foram fracionados em gel de agarose a 0,8% em tampão TAE 1X e transferidos para membrana de nylon Amersham Hybond-N+ (GE Healthcare). A membrana foi hibridizada com a sonda TELC marcada com DIG (Tabela 1) e a sonda Alfa-tubulina marcada com DIG como controle de *loading* (Tabela 1). Os sinais de hibridização foram revelados usando soro de coelho anti-DIG (Roche) e CSPD (Roche). A localização dos Fragmentos de Restrição Telomérica (TRF) no blot foi comparada com o marcador de peso molecular “DNA molecular weight marker VII DIG-labeled” (Roche) para obter a média de TRF.

Tabela 1. Iniciadores utilizados

Iniciadores	Sequência
SubChro.10di-F	5´ CACACCGTGAACGCAAGGAAAC 3´
SubChro.10di-R	5´ TCCGTGGTGGTGC GTTCT 3´
SubChro.20es-F	5´ CACTCTCGACGCCGACCTA 3´
SubChro.20es-R	5´ ACTTCGCCCATCATATCAGC 3´
SubChro.29di-F	5´ ATGGGGATTAAGGGAAGCAC 3´
SubChro.29di-R	5´ CCCGTACCCGTACCTTATCC 3´
RPN8-F	5´ ATGAACCGCCGCAAGCT 3´
RPN8-R	5´ GCGCGGACGACGATCTTTGATT 3´
DIG-labelled telomeric probe (TELC)	5´ CCCTAACCTAACCTAACCTAACCTAA 3´
Alpha.tubulin-F	5´CGAACAACCTACGCTCGTGGC 3´
Alpha.tubulin-R	5´ GCCACCCACAGCGTGGAACA 3´
DIG-labelled alpha-tubulin probe	5´CGAACAACCTACGCTCGTGGCCACTACACGATCGGCAAGGAGATCGTCGAC CTTGCGCTGGACCGCATTCGCAAGCTGGCGGACAACTGCACTGGTCTCCAGG GCTTTATGGTGTTCACGCCTGTGGGTGTG GC 3´

Análise da expressão de transcritos TERRA

Extração de RNA

RNA total foi extraído a partir de 3×10^8 células utilizando TRIzol (Invitrogen) seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, as amostras foram tratadas com DNase I *Amplification* Grade (Invitrogen), de acordo com as diretrizes do fabricante para que o DNA genômico fosse removido totalmente. Tanto a pureza quanto a concentração das amostras extraídas foram avaliadas por espectrofotometria de absorção ($OD_{260\text{ nm}}$) utilizando o equipamento Epoch (BioTek).

Síntese de cDNA

1µg de RNA foi submetido à síntese de cDNA utilizando o kit iScript™ *Reverse Transcription Supermix* for RT-qPCR, de acordo com as recomendações do fabricante (Bio-Rad).

RT-PCR e RT-qPCR

Para os ensaios de RT-PCR, cDNA de *L. major* nas passagens 5, 10, 15 e 20 foram submetidos à PCR usando goTaq master mix (Promega) de acordo com as instruções do fabricante e iniciadores

específicos para as regiões subteloméricas dos cromossomos 10 - braço direito, 20 - braço esquerdo, 29 – braço direito (Tabela 1). Como controle de *loading* foi amplificada uma região do gene que codifica a subunidade 8 não-ATPase do proteassoma 19S (RPN8) (*LmjF.32.0390*) (Tabela 1) [28, 52].

Os ensaios de RT-qPCR foram realizados em triplicata técnica utilizando cDNA, iTaq Universal SYBR® Green Supermix (BioRad) e 0,5 µM de cada iniciador específico para a região subtelomérica dos cromossomos citados acima (Tabela 1). Os resultados foram normalizados utilizando o gene endógeno que codifica RPN8 [28]. As RT-qPCRs foram realizadas em reações de 10 µL, e os valores de *cycle threshold* (Ct) foram obtidos no sistema StepOne™ Real-Time PCR (Applied Biosystems) usando as configurações padrão. Os dados brutos foram tratados utilizando o método Δ Ct. As análises estatísticas foram realizadas usando o GraphPad Prism versão 8.0.2.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os perfis de restrição telomérica obtidos por Southern Blot não diferem entre passagens

Conforme ilustrado na Fig 2, o DNA genômico extraído de culturas axênicas nas passagens 5, 10, 15 e 20 de *L. major* (Fig 2A) foi submetido a digestão com a enzima *AfaI*, seguida pela aplicação da técnica de Southern blot, conforme descrito por CONTE & CANO (2005) [28]. Nos fragmentos teloméricos obtidos de *L. major* podemos observar tamanhos superiores a 3000 pb, o que corresponde com o esperado para essa espécie [39]. Isso se dá devido a presença da base J (β -d-glucosyl-hydroxymethyluracil) que impede a clivagem do DNA por enzimas de restrição em sítios teloméricos e subteloméricos [33], resultando nos fragmentos notados na figura.

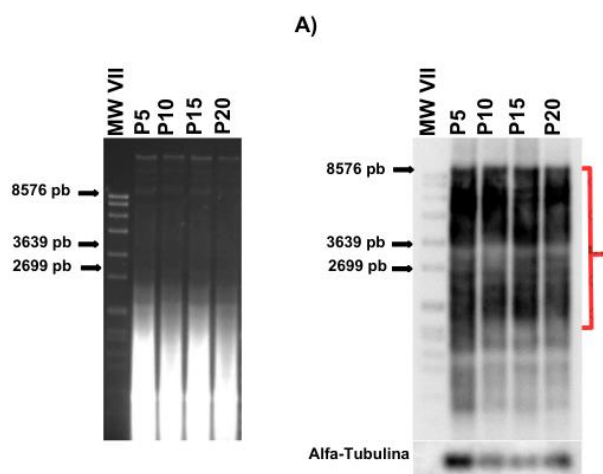


Figura 2. Análise do perfil de restrição telomérica de formas promastigotas procíclicas de *L. major* durante passagens contínuas *in vitro*. DNA genômico de *L. major* (A) extraído nas passagens 5, 10, 15 e 20, foi digerido com *RsaI* (5U). Os fragmentos de DNA foram separados em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (A – painel esquerdo) e hibridizados com uma sonda telomérica marcada com DIG (5'-TTAGGG3') e com uma sonda alfa-tubulina marcada com DIG como controle de carregamento (A – painel direito). Anticorpo anti-DIG covalentemente acoplado à fosfatase alcalina (Roche) e CSPD (Roche) foram usados para a detecção quimiluminescente (A – painel direito). MW - DNA molecular weight marker VII DIG-labeled (Roche).

A expressão dos TERRAs 10, 20 e 29 variam entre si mas não entre as passagens analisadas

RT-PCR (Fig 3) e RT-qPCRs (Fig 4) foram realizados utilizando RNAs extraídos de culturas axênicas de *L. major* nas passagens 5, 10, 15 e 20.

Na Fig 3 cDNAs obtidos a partir de amplificação de RNA total com iniciadores cromossomo-específicos referentes aos três TERRAs analisados nesse estudo (Tabela 1): TERRA10 (braço direito) ~84pb, TERRA20 (braço esquerdo) ~220pb, TERRA29 (braço direito) ~155pb e como controle o gene

da a subunidade 8 não-ATPase do proteassoma 19S (RPN8) ~50pb (Fig 3A-D) (Tabela 1). Os resultados das amplificações mostram que há diferença de expressão dos TERRAs provenientes de cromossomos distintos, onde o TERRA referente ao cromossomo 20 se mostra como o mais expresso neste ensaio quando comparado com os TERRAs dos cromossomos 10 e 29. Verifica-se também que a maioria dos TERRA parecem ser mais expressos na P5, embora esse dado necessite ser validado por RTqPCR (veja adiante). Nas demais passagens não se verifica alteração na expressão dos mesmos. Esses resultados corroboram os obtidos anteriormente [39], onde se observa esse exato padrão de expressão dos TERRAs ao longo das passagens.

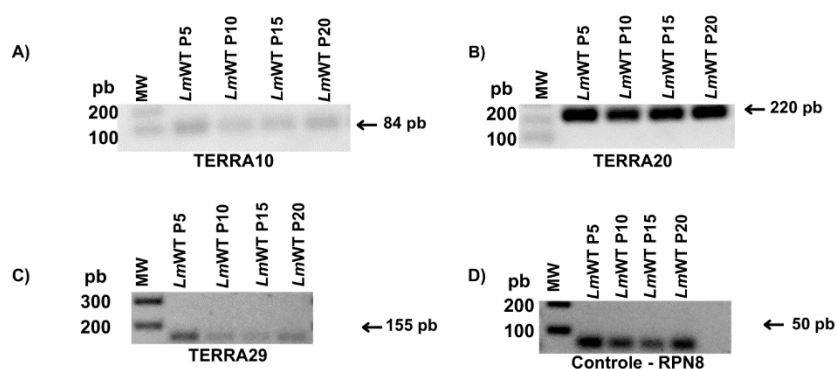


Figura 3. RT-PCRs realizados com RNAs extraídos de *L. major* das passagens 5, 10, 15 e 20. cDNAs obtidos a partir de RNA total de formas promastigotas do parasito nas passagens 5, 10,15,20, utilizando-se pares de iniciadores específicos (Tabela 1). Os produtos de amplificação foram fracionados em gel de agarose 2% corado por brometo de etídeo. MW – Marcador de peso molecular 1kb Plus (Invitrogen) **A)** TERRA expresso a partir do cromossomo 10 (~84 pb); **B)** TERRA originado do cromossomo 20 (~220pb); **C)** TERRA referente ao cromossomo 29 (~155pb); **D)** O gene que codifica a subunidade 8 não-ATPase do proteassoma 19S (RPN8) foi utilizando como controle do experimento.

Em seguida foi realizado uma RT-qPCR (Fig 4) para verificar as alterações de expressão dos TERRAs, mostradas na Fig 3 (A-D). O ensaio foi realizado utilizando RNA total e os mesmos iniciadores cromossomo-específicos mencionados anteriormente (Tabela 1). Como é possível verificar os resultados obtidos no ensaio de RT-qPCR confirmam que existe diferença na expressão entre os TERRA analisados, que o TERRA 20 (braço esquerdo) é mais expresso nas passagens analisadas e que a diferença de expressão dos TERRA na P5 mostrado na Fig. 3 (A-D), não é estatisticamente significativa.

Na Fig. 5 está mostrada a análise da expressão dos diferentes TERRA realizada por Morea *et al* (2021) [39] em 03 bibliotecas RNAseq das três formas do parasito. Os resultados aqui obtidos confirmam os mostrados no HeatMap (Fig. 5), mostrando a expressão diferencial do TERRAs originados de distintos cromossomos. Apesar disso, não foi possível neste estudo, identificar disparidades significativas entre as passagens analisadas.

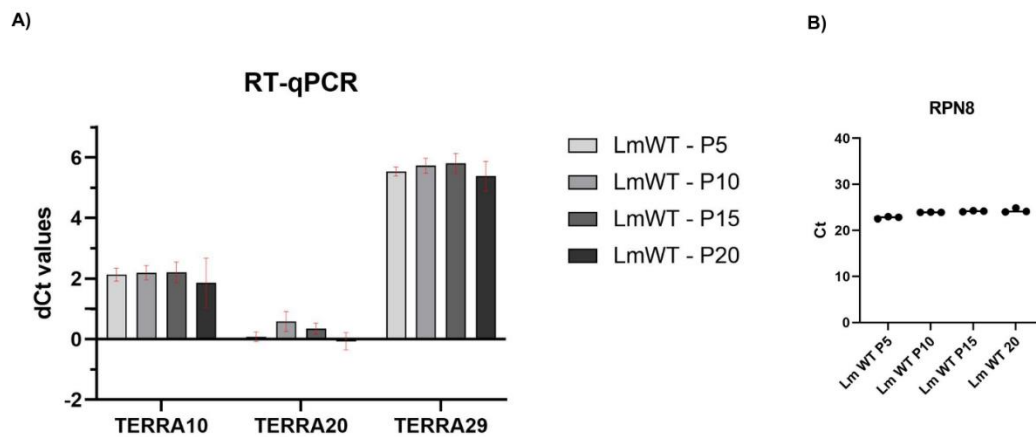


Figura 4. RT-qPCR: cDNA obtido a partir do RNA de *L. major* na forma de promastigotas próclicas nas passagens 5, 10, 15 e 20 foram amplificados através da técnica de RT-qPCR utilizando iniciadores cromossomo-específicos (Tabela 1) **(A)**. RPN8 **(B)** foi escolhido como gene normalizador. O resultado deste ensaio se relaciona diretamente com aqueles obtidos na Fig. 3, mostrando que o TERRA proveniente do cromossomo 20 (braço esquerdo) é o mais expresso entre os TERRAs analisados, seguido do TERRA 10 (braço direito) e do TERRA 29 (braço direito).

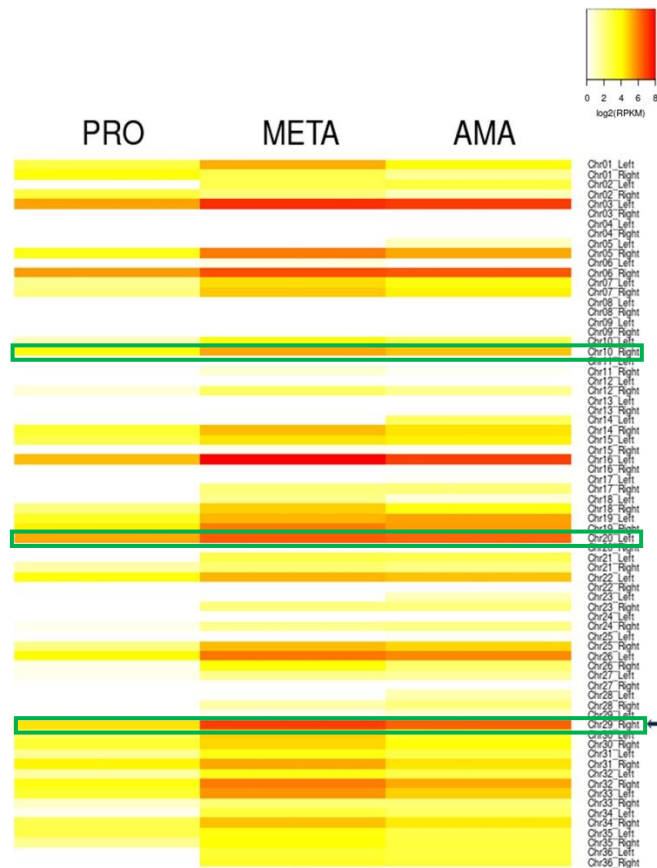


Figura 5. RPKMs (*Reads Per Kilobase per Million mapped reads*) calculados em todos os três estágios de *Leishmania*. Após análise de três diferentes bibliotecas SL-Seq de *L. major* (PRO- promastigota, AMA- amastigota e META- metacíclica), os resultados dos transcritos TERRA foram plotados utilizando *R Programming Environment* (versão 3.45.2). A identificação dos TERRAs em destaque, relacionados aos cromossomos 10 (braço direito), 20 (braço esquerdo) e 29 (braço direito) na fase procíclica promastigota em coloração verde, revela claramente uma concordância consistente com os resultados exibidos nas Figuras 3 e 4. Este achado robustece a consistência e replicabilidade dos dados previamente apresentados (Figura retirada de (Morea et al., 2021) [39]).

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados expostos, neste trabalho obtivemos com sucesso os perfis de restrição telomérica de *L. major*, apesar de não ter sido possível observar diferenças significativas do perfil telomérico entre as passagens escolhidas, os resultados abrem caminho para perspectivas promissoras. Também foi possível analisar a expressão de TERRAs originados de diferentes cromossomos na fase promastigota procíclica dos parasitos ao longo das contínuas passagens *in vitro*, corroborando com resultados anteriores já obtidos por nosso grupo (Morea et al., 2021) [39]. É de nosso objetivo dar continuidade a estas análises, avaliando tanto o perfil de restrição telomérico por Southern blot e Flow FISH como a expressão do TERRA, em passagens mais longínquas. Também queremos adicionar ao nosso trabalho análises com parasitos na forma metacíclica (forma infectiva), a fim de ter uma compreensão mais aprofundada acerca da dinâmica complexa que rege os telômeros desses organismos.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. SILVA, C. G. et al. Ultraestrutura de Parasitos do Gênero *Leishmania*. In: *Leishmanioses do continente americano*. [s.l.] Editora FIOCRUZ, 2014. p. 53–67.
2. CAVALCANTI, D. P.; DE SOUZA, W. The kinetoplast of trypanosomatids: From early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. *Scanning*, 2018. DOI: 10.1155/2018/9603051.
3. APHASIZHEV, R.; APHASIZHEVA, I. Mitochondrial RNA editing in trypanosomes: small RNAs in control. *Biochimie*, v. 100, p. 125–131, 2014. DOI: 10.1016/J.BIOCHI.2014.01.003.
4. HOARE, C. A.; WALLACE, F. G. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: A new terminology [48]. *Nature*, v. 212, p. 1385–1386, 1966. DOI: 10.1038/2121385A0.
5. CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. *Open Biol.*, v. 9, 2019. DOI: 10.1098/rsob.190072.
6. BORST, P.; SABATINI, R. Base J: Discovery, Biosynthesis, and Possible Functions. 2008. DOI: 10.1146/annurev.micro.62.081307.162750.
7. SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biol.*, v. 7, 2017. DOI: 10.1098/RSOB.170165.
8. WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol. Microbiol.*, v. 79, p. 647–662, 2011. DOI: 10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x.
9. DA SILVA, R.; SACKS, D. L. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and Immunity*, v. 55, n. 11, p. 2802–2806, nov. 1987.
10. ZAKAI, H. A.; CHANCE, M. L.; BATES, P. A. In vitro stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Parasitology*, v. 116, pt. 4, p. 305–309, 1998. DOI: 10.1017/S0031182097002382.
11. ALVAR, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One*, v. 7, 2012. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0035671.
12. ORGANIZATION, W.H. World Health Organization. Leishmaniasis Key Facts. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>> (Acesso em: 15 out, 2023).
13. ORGANIZATION, W.H. World Health Organization. Leishmaniasis Fact Sheets. 2022. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>>. (Acesso em: 18 out, 2023).
14. AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 10, 2016. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0004349.

15. GÜRAN, M. An Overview of Leishmaniasis: Historic to Future Perspectives. *Vectors and Vector-Borne Zoonotic Diseases*, 2018. DOI: 10.5772/INTECHOPEN.81643.
16. GALVIS-OVALLOS, F. et al. Leishmanioses no Brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. In: *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários*. [s.l.] Stricto Sensu Editora, 2020. p. 227–255.
17. PACE, D. Leishmaniasis. *Journal of Infection*, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 1 nov. 2014.
18. NASCIMENTO, A. F. S. C. DO; SANTOS, D. O. Leishmanioses como doenças negligenciadas: um panorama complexo. In: *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários*. [s.l.] Stricto Sensu Editora, 2020. p. 214–226.
19. CARREGAL, V. M. et al. Combination oral therapy against *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice using nanoassemblies made from amphiphilic antimony(V) complex incorporating miltefosine. *Parasitol. Res.*, v. 118, p. 3077–3084, 2019. DOI: 10.1007/S00436-019-06419-2
20. SUNDAR, S. et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: an open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. *Lancet*, v. 377, p. 477–486, 2011. DOI: 10.1016/S0140-6736(10)62050-8
21. BLACKBURN, E. H.; GALL, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *Journal of molecular biology*, v. 120, n. 1, p. 33–53, 25 mar. 1978.
22. DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 15 set. 2005.
23. HARLEY, C. B.; FUTCHER, A. B.; GREIDER, C. W. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*, v. 345, p. 458–460, 1990. DOI: 10.1038/345458A0.
24. HEMANN, M. T.; STRONG, M. A.; HAO, L. Y.; GREIDER, C. W. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell*, v. 107, p. 67–77, 2001. DOI: 10.1016/S0092-8674(01)00504-9.
25. CANO, M. I. N. Telomere Biology of Trypanosomatids: More Questions than Answers. *Trends Parasitol.*, v. 17, p. 425–429, 2001.
26. CHIURILLO, M. A. et al. Cloning and Characterization of *Leishmania Donovanii* Telomeres. *Exp. Parasitol.*, v. 94, p. 248–258, 2000.
27. FU, G.; BAKER, D. C. Characterisation of *Leishmania* Telomeres Reveals Unusual Telomeric Repeats and Conserved Telomere Associated Sequence. *Nucleic Acids Res.*, v. 26, p. 2161–2167, 1998.
28. CONTE, F. F.; CANO, M. I. N. Genomic Organization of Telomeric and Subtelomeric Sequences of *Leishmania (Leishmania) Amazonensis*. *Int. J. Parasitol.*, v. 35, p. 1435–1443, 2005.

29. A, C. B. B. et al. LaTBP1: A *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates in vivo with telomeres and GT-rich DNA using a Myb-like domain. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, v. 465, n. 2, p. 399-209, 15 set. 2009.
30. MOREA, E. G. O. et al. A calmodulin-like protein (LCALA) is a new *Leishmania amazonensis* candidate for telomere end-binding protein. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, v. 1861, n. 11, p. 2583–2597, 1 nov. 2017.
31. O, J. L. S. et al. *Leishmania* replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 358, n. 2, p. 417–423, 29 jun. 2007.
32. DA SILVA, M. S. et al. The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiology*, v. 10, n. 1, p. 136, 2010.
33. BAH, A.; WISCHNEWSKI, H.; SHCHEPACHEV, V.; AZZALIN, C. M. The telomeric transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nucleic Acids Res.*, v. 40, p. 2995, 2012. DOI: 10.1093/NAR/GKR1153
34. OLIVEIRA, B. C. D. et al. Possible Involvement of Hsp90 in the Regulation of Telomere Length and Telomerase Activity During *Leishmania amazonensis* Developmental Cycle and Population Proliferation. *Front. Cell Dev. Biol.*, 2021.
35. VAN LEEUWEN, F. et al. β -D-Glucosyl-Hydroxymethyluracil Is a Conserved DNA Modification in Kinetoplastid Protozoans and Is Abundant in Their Telomeres. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 95, p. 2366–2371, 1998.
36. VAN LEEUWEN, F. et al. Localization of the Modified Base J in Telomeric VSG Gene Expression Sites of *Trypanosoma Brucei*. *Genes Dev.*, v. 11, p. 3232–3241, 1997.
37. BORST, P.; SABATINI, R. Base J: Discovery, Biosynthesis, and Possible Functions. *Annu. Rev. Microbiol.*, v. 62, p. 235–25, 2008.
38. GENEST, P. A.; BORST, P. Analysis of Telomere Length Variation in *Leishmania* over Time. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 151, p. 213–215, 2007.
39. MOREA, E. G. O. et al. Exploring TERRA During *Leishmania* major Developmental Cycle and Continuous in vitro Passages. *Int. J. Biol. Macromol.*, v. 174, p. 573–586, 2021.
40. BLACKBURN, E. H. Telomeres and their synthesis. *Science (New York, N.Y.)*, v. 249, n. 4968, p. 489–90, 3 ago. **1990**.
41. GREIDER, C. W. Telomere Length Regulation. *Annual Review of Biochemistry*, v. 65, n. 1, p. 337–365, jun. **1996**.
42. HOCINE, S.; SINGER, R. H. A date with telomerase: Pick you up at S phase. *Mol. Cell*, v. 44, p. 685, 2011. DOI: 10.1016/J.MOLCEL.2011.11.013.
43. CANO, M. I. N.; DUNGAN, J. M.; AGABIAN, N.; BLACKBURN, E. H. Telomerase in Kinetoplastid Parasitic Protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 96, p. 3616–3621, 1999.

44. AZZALIN, C. M. et al. Telomeric Repeat Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science*, v. 318, n. 5851, p. 798–801, 2 Nov. **2007**.
45. SCHOEFTNER, S.; BLASCO, M. A. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature Cell Biology*, v. 10, n. 2, p. 228–236, 23 fev. **2008**.
46. IGLESIAS, N. et al. Subtelomeric repetitive elements determine TERRA regulation by Rap1/Rif and Rap1/Sir complexes in yeast. *EMBO Reports*, v. 12, n. 6, p. 587–593, jun. 2011.
47. AZZALIN, C. M.; LINGNER, J. Telomere functions grounding on TERRA firma. *Trends in Cell Biology*, v. 25, p. 29–36, 2015. DOI: 10.1016/J.TCB.2014.08.007
48. ARORA, R.; BRUN, C. M. C.; AZZALIN, C. M. TERRA: Long Noncoding RNA at Eukaryotic Telomeres. *Progress in Molecular and Subcellular Biology*, v. 51, p. 65–94, 2011. DOI: 10.1007/978-3-642-16502-3_4.
49. MONTERO, J. J.; LÓPEZ DE SILANES, I.; GRANÃ, O.; BLASCO, M. A. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. *Nature Communications*, v. 7, p. 1–13, 2016. DOI: 10.1038/ncomms12534.
50. CUSANELLI, E.; CHARTRAND, P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Frontiers in genetics*, v. 6, p. 143, **2015**.
51. NANAVATY, V. et al. Trypanosoma brucei RAP1 maintains telomere and subtelomere integrity by suppressing TERRA and telomeric RNA:DNA hybrids. *Nucleic acids research*, v. 45, n. 10, p. 5785–5796, 2 jun. **2017**.
52. INBAR, E.; HUGHITT, V. K.; DILLON, L. A.; GHOSH, K.; EL-SAYED, N. M.; SACKS, D. L. The Transcriptome of Leishmania major Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector. *mBio*, v. 8, n. 2, e00029-17, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/mBio.00029-17>.
53. ASSIS, L. H. C. et al. Cell Cycle, Telomeres, and Telomerase in Leishmania spp.: What Do We Know So Far? *Cells*, v. 10, n. 11, p. 3195, 2021. DOI: 10.3390/cells10113195.
54. VERMELHO, A. B. et al. Carbonic anhydrases from Trypanosoma and Leishmania as anti-protozoan drug targets. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, v. 25, n. 5, p. 1543–1555, mar. 2017
55. GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of Leishmania in sand flies: implications for understanding the life cycle. *International journal for parasitology*, v. 33, n. 10, p. 1027–34, 15 set. 2003.