

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DE RNAs
TELOMÉRICOS NÃO CODANTES EM
Leishmania major

Edna Gicela Ortiz Morea

BOTUCATU-SP

2018

Instituto de Biociências, UNESP, Campus de Botucatu
Seção Técnica de Pós-Graduação
Rua Professor Doutor Antonio Celso Wagner Zanin, 250, Botucatu, SP – CEP 18618-689
Telefone (14) 3880-0780 posgraduacao@ibb.unesp.br

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a),
o texto completo desta dissertação será disponibilizado
somente a partir de 23/03/2019.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"Julio de Mesquita Filho"
CAMPUS DE BOTUCATU
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA FUNÇÃO DE
RNAS TELOMÉRICOS NÃO CODANTES EM
Leishmania major

Estudante: Edna Gicela Ortiz Morea

Orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Co-Orientador: Elton Jose Vasconcelos

Co-orientador: Claus Maria Azzalin

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

BOTUCATU-SP

-2018

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

Morea, Edna Gicela Ortis.
Caracterização molecular da função de RNAs teloméricos não
codantes em *Leishmania major* / Edna Gicela Ortis Morea. -
Botucatu, 2018

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio
de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano
Coorientador: Claus Maria Assalin
Coorientador: Elton Jose Rosas de Vasconcelos
Capes: 20200005

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

Palavras-chave: *Leishmania major*; TER; TERRA; leishmaniose;
telômeros.

DEDICATÓRIA

A Deus, por sempre ficar ao meu lado, por que me fortalece e me guia na realização dos meus sonhos.

Aos meus pais Luis Eduardo Ortiz Cuellar e Maria Angela Morea Toledo pelo imenso apoio e amor, pela minha formação pessoal e acadêmica.

A minha irmã Karen Johana Ortiz Morea porque sempre está comigo me apoiando e dando forças.

A toda minha família pela ajuda psicológica durante várias fases deste trabalho, e especialmente minha querida avó Mercedes Toledo quem sempre me apoiou e ajudou.

AGRADECIMENTOS

A meus pais Maria Angela Morea Toledo e Luis Eduardo Ortiz Cuellar e minha irmã Karen Johana Ortiz Morea por estarem presentes me apoiando que cada fase de desenvolvimento do doutorado

À profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano, pela competência, ensinamento e pela oportunidade de realizar o Doutorado, me orientando e guiando durante a realização deste trabalho, estou muito grata por apostar em mim.

A Adriano Calore por me acompanhar em grande parte deste processo

A todos os integrantes do laboratório de Telômero pelo apoio, companheirismo e convívios: Alejandra Viviescas, Marina Roveri, Whisnayder Gentil, Alessandro Vassilievitch, Gabriel Arantes, Vitor da Silva, Camila Storti e especialmente a Cristiane de Santis pela força no meu português

Aos meus co-orientadores Claus Azzalin e Eltom Vasconcelos por estarem sempre disponíveis para sarar minhas dúvidas e questionamento

Aos meus amigos Eder Silva e Kerly Martinez por que sei que além da distância sempre estarão torcendo por mim

Aos meus familiares e amigos

Ao programa CAPES, pela concessão da bolsa de estudos por 30 meses.

Ao programa de pós-graduação em Genética.

Ao Instituto de Biociências de Botucatu da Universidade Estadual Paulista “Julho de Mesquita Filho” UNESP.

À FAPESP pela concessão da bolsa de estudos de Doutorado (processo FAPESP: 2016/06883-0) e bolsa BEPE (processo FAPESP: 2017/12987-5).

“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”

Louis Pasteur

“As espécies que sobrevivem não são as espécies mais fortes, nem as mais inteligentes,
e sim aquelas que se adaptam melhor às mudanças”

Charles Darwin

SUMÁRIO

Lista de figuras

Lista de tabelas

Resumo

Abstract

Página

<u>1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>1</u>
<u>1.1. O ciclo de vida dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> spp.....</u>	<u>1</u>
<u>1.2. Leishmaniose.....</u>	<u>2</u>
<u>1.3. Transcrição e processamento de RNA em <i>Leishmania</i> spp.....</u>	<u>4</u>
<u>1.4. Telômeros.....</u>	<u>5</u>
<u>1.5. Organização telomérica e subtelomérica de <i>Leishmania</i> spp.....</u>	<u>7</u>
<u>1.6. Long noncoding RNAs com função telomérica.....</u>	<u>9</u>
<u>1.6.1. TERRA (<i>Telomeric Repeat containing RNA</i>).....</u>	<u>10</u>
<u>1.6.1.1. Regulação da expressão do TERRA.....</u>	<u>11</u>
<u>1.6.2. RNA telomerase (TER).....</u>	<u>13</u>
<u>CAPÍTULO 1.....</u>	<u>16</u>
<u>2. CARACTERIZAÇÃO DO LONGO RNA TELOMÉRICO NÃO</u>	
<u>CODIFICADOR TERRA EM <i>Leishmania major</i>.....</u>	<u>16</u>
<u>2.1. INTRODUÇÃO.....</u>	<u>16</u>
<u>2.2. OBJETIVOS.....</u>	<u>19</u>
<u>2.2.1. Objetivo geral.....</u>	<u>19</u>
<u>2.2.2. Objetivos específicos.....</u>	<u>19</u>
<u>2.3. MATERIAL E MÉTODOS</u>	<u>20</u>
<u>2.3.1. Material biológico e condições de crescimento de <i>Leishmania major</i>.....</u>	<u>20</u>
<u>2.3.2. Caracterização do TERRA em <i>Leishmania major</i>.....</u>	<u>20</u>
<u>2.3.3. Análise <i>in silico</i> da presença do TERRA e/ou seus similares e ilhas CpGs</u>	
<u>putativas em <i>Leishmania major</i>.....</u>	<u>21</u>
<u>2.3.4. Northern blot.....</u>	<u>22</u>
<u>2.3.5. RNA-FISH.....</u>	<u>23</u>
<u>2.3.7. Análise da expressão do TERRA.....</u>	<u>23</u>

2.3.8. PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR) para validação de alterações na expressão das extremidades cromossômicas.....	24
2.3.6. Southern blot.....	25
2.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
2.4.1. Identificação e caracterização molecular de lncRNA do tipo TERRA em <i>L. major</i> baseados nos dados das bibliotecas SL-Seq.....	26
2.4.2. Classificação dos transcritos TERRA em <i>L. major</i> baseados nos dados das bibliotecas SL-Seq e ensaios de validação dos dados.....	39
2.4.3. Análise cromossomo-específico da transcrição do TERRA nas três formas de desenvolvimento de <i>L. major</i>	47
2.5. CONCLUSÃO.....	55
CAPÍTULO 2.....	56
3. CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DA ILHA CPG PUTATIVA LOCALIZADA NA REGIÃO SUBTELOMÉRICA DO CROMOSSOMO 10 EM <i>L. major</i>	56
3.1. INTRODUÇÃO.....	56
3.2. OBJETIVOS.....	58
3.2.1. Objetivo geral.....	58
3.2.2. Objetivos específicos.....	58
3.3. MATERIAL E MÉTODOS.....	59
3.3.1. Clonagem e sequenciamento do transcrito de TERRA e ilha CpG putativa da extremidade do braço direito do cromossomo 10.....	59
3.3.2. Análise de detecção de metilação nas ilhas CpGs putativas localizadas em região subtelomérica.....	59
3.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
3.5. CONCLUSÃO.....	66
CAPÍTULO 3.....	67
4. CARACTERIZAÇÃO DA FUNÇÃO DO TER EM <i>L. major</i>	67
4.1. INTRODUÇÃO.....	67
4.2. OBJETIVOS.....	69
4.2.1. Objetivo geral.....	69
4.2.2. Objetivos específicos.....	69
4.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	70

4.3.1. Material biológico e condições de crescimento de <i>Leishmania major</i>	70
4.3.2. Transformação genética de <i>Leishmania major</i>	70
4.3.3. Análises <i>in silico</i> do TER em bibliotecas de SL-Seq.....	70
4.3.4. Construção do cassete de expressão contendo o TER de <i>L. major</i>	70
4.3.5. Construção do plasmídeo para edição gênica do RNA TER via CRISPR-Cas9.....	71
4.3.6. Padronização e utilização dos oligonucleotídeos antisense do tipo <i>morpholinos</i> para <i>knockdown</i> do TER.....	72
4.4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	75
4.4.1. Caracterização da função do TER.....	75
4.4.2. Inibição da maturação do transcrito TER (<i>knockdown</i>).....	77
4.5. CONCLUSÃO.....	80
5. REFERÊNCIAS.....	81
6. ANEXOS.....	89
Anexo 1. Resultados normalizados em RPKM das extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> obtidos das análises nas bibliotecas SL-Seq.....	89
Anexo 2. Resultados do diagrama de Venn.....	91
Anexo 3. Sequência de nucleotídeos de uma parte do transcrito TERRA de <i>L. major</i> originado do braço direito do cromossomo 10.....	92
Anexo 4. Sequência de nucleotídeos da ilha CpG putativa presente em posição subtelomérica no braço direito do cromossomo 10.....	92
Anexo 5. Sequência de nucleotídeos do componente TER de <i>L. major</i> (LeishTER).....	93
8. APÊNDICE E MATERIAL SUPLEMENTAR.....	94
Tabela suplementar 1. Iniciadores e sondas utilizados neste trabalho.....	94
Apêndice 1. Artigo publicado em: BBA General Subjects como autor principal.....	95
Apêndice 2. Capítulo de livro publicado como colaboradora.....	96
Apêndice 3. Relatório de estágio no exterior com bolsa BEPE da FAPESP.....	97

LISTA DE FIGURAS

Página

Figura 1.1. Esquema do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	2
Figure 1.2. Transcrição policistrônica e maturação do mRNA em trypanosomatídeos.....	5
Figura 1.3. Elongação dos telômeros pelo complexo telomerase.....	7
Figure 1.4. Modelo da organização das extremidades cromossômicas em <i>L. major</i>	8
Figura 1.5. Transcriptoma telomérico.....	9
Figure 1.6. Predição da estrutura secundária de TER em <i>L. major</i>	15
Figure 2.1. Resumo da metodologia SL-Seq para análise de transcritos maduros nas três formas de desenvolvimento de <i>L. major</i>	21
Figura 2.1. Número de sinais SL em cada uma das extremidades cromossômicas nas três formas de desenvolvimento de <i>L. major</i>	29
Figura 2.2. Esquema de uma extremidade cromossômica com presença de mais de um sinal de SL.....	32
Figura 2.3. Tamanho dos transcritos TERRA em cada uma das extremidades com sinal SL, nas três formas de desenvolvimento do parasito.....	33
Figura 2.4. Diagrama de Venn mostrando a expressão comum e diferenciada dos transcritos nas extremidades cromossômicas dos 36 cromossomos de <i>L. major</i>	37
Figura 2.5. Transcritos (RPKM) de cada uma das extremidades do braço esquerdo (A) e braço direito (B), nas três formas de desenvolvimento da <i>Leishmania</i>	39
Figura 2.6. Análise <i>in silico</i> das extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> na forma amastigota, promastigota e metacíclica baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB (vermelho), SL (sequência líder) (verde) e ilhas CpG putativas (azul).....	42
Figura 2.7. Transcritos TERRA detectados via Northern blot utilizando RNA total das formas amastigota, promastigota e metacíclica de <i>L. major</i>	43
Figura 2.8. Transcritos TERRA são detectados em formas promastigota de <i>L. major</i> após várias duplicações celulares.....	45
Figure 2.9. Localização subcelular do TERRA em formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> usando RNA-FISH.....	47
Figure 2.10. Detecção de transcritos da fita telomérica rica em G durante o ciclo de desenvolvimento de <i>L. major</i>	49

Figure 2.11. A maioria dos transcritos TERRA são poliadenilados nas três formas de desenvolvimento <i>L. major</i>	51
Figura 2.12. Perfil de restrição telomérica nas diferentes formas de desenvolvimento de <i>L. major</i> e em parasitas que acumularam várias duplicações celulares.....	54
Figura 3.1. Comparação entre as regiões subteloiméricas de cromossomos humanos e do cromossomo 10 de <i>L. major</i>	61
Figura 3.2. Blast do sequenciamento do TERRA transcrito a partir do braço direito do cromossomo 10.....	62
Figura 3.3. Clonagem da ilha CpG putativa presente na região subteloimérica do braço direito do cromossomo 10.....	63
Figure 3.4. Detecção de sítios de metilação nas ilhas CpGs putativas encontradas na região subteloimérica do braço direito do cromossomo 10.....	64
Figura 3.5. Sequenciamento de DNA da ilha CpG #61 putativa do cromossomo 10 da <i>L. major</i> das três formas de desenvolvimento (promastigota, metacíclica e amastigota) tratado com bissulfito de sódio para detecção da presença de m ⁵ C.....	65
Figura 4.1. Mapa do pLS7-LmTERT.....	72
Figura 4.2. Esquema de inibição da maturação do transcrito TER utilizando oligo <i>morpholinos</i>	74
Figura 4.3. Número de transcritos (RPKM) correspondentes aos componentes TER e TERT da telomerase de <i>L. major</i>	76
Figura 4.4. Clonagem do TER.....	77
Figura 4.5. Localização celular do <i>morpholino</i> controle em formas promastigotas de <i>L. major</i>	78
Figura 4.6. Localização celular do <i>morpholino</i> LmTER em formas promastigotas de <i>L. major</i>	79

LISTA DE TABELAS

Página

<u>Tabela 2.1.</u> Presença de CSB nas extremidades cromossômicas no genoma de <i>L. major</i>	27
<u>Tabela 2.2.</u> Presença de ilhas CpG putativas nas extremidades cromossômicas no genoma de <i>L. major</i>	27
<u>Tabela 2.3.</u> Presença de sinal SL nas extremidades cromossômicas das três formas de desenvolvimento de <i>L. major</i>	28
<u>Tabela 2.4.</u> Análise <i>in silico</i> das extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> na forma amastigota, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG.....	40
<u>Tabela 2.5.</u> Análise <i>in silico</i> das extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> na forma promastigota, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG.....	41
<u>Tabela 2.6.</u> Análise <i>in silico</i> das extremidades 36 cromossomos de <i>L. major</i> na forma metacíclica, baseados na presença (+) e ausência (-) de CSB, SL e CpG.....	41
<u>Tabela 2.7.</u> Características estruturais presentes nas extremidades dos 36 cromossomos de <i>L. major</i> braço esquerdo e direito). Presença (+) ou ausência (-) de SL, CSB ou putativas ilhas CpG.....	48

Resumo

Os protozoários do gênero *Leishmania* causam leishmaniose, uma doença tropical negligenciada, que se apresenta de diferentes formas clínicas e que acomete milhões de pessoas no Brasil e no mundo. Até o momento não existe nenhuma vacina ou tratamento eficientes para leishmaniose e por isso, estudos que contribuam para o entendimento da biologia e fisiologia do parasito podem fornecer uma possibilidade de encontrar novos alvos terapêuticos. Este é o caso dos telômeros, cuja função principal é manter a estabilidade do genoma que se perturbada pode afetar diretamente a proliferação ou multiplicação dos parasitos. Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas localizadas nas extremidades dos cromossomos, mantidos pela enzima telomerase. Eles são regulados por diversos processos entre os quais se encontram alguns longos RNAs não codificadores (lncRNA). Entre os lncRNAs com função telomérica está o TER (RNA Telomerase) o qual é um dos principais componentes do complexo telomerase, pois contém uma pequena sequência molde a qual é copiada pela telomerase durante a replicação dos telômeros, o TER foi recentemente identificado em *Leishmania* spp., porém se desconhece a sua função e biogênese. Outro RNA não codificante com função telomérica é o TERRA (Repetições Teloméricas contendo RNA), os quais são essenciais para a manutenção dos telômeros.

Até o momento, identificamos a presença do TERRA expressos a partir das extremidades cromossômicas nas diferentes fases de desenvolvimento (amastigota, promastigota e metacíclica) do parasito. Para isso, utilizamos bibliotecas SL-Seq independentes construídas a partir de RNA total das três formas do parasito, em busca de transcritos que apresentassem o sinal da sequência líder (SL) posicionada a montante das repetições subteloméricas, como um marco que determina o processo de maturação do RNA mensageiro. Além do sinal SL, foi identificada a existência de elementos subteloméricos conservados em *Leishmania*, denominados CSB (Conserved Sequence Boxes), e ilhas CpGs putativas. Usando esta abordagem nós encontramos 7 classes diferentes de extremidades cromossômicas em *L. major*. Os resultados obtidos *in silico* foram validados experimentalmente utilizando Northern blot e RT-PCR. Foi confirmada a existência de transcritos TERRA com tamanho e número variável e expressão diferenciada entre as diferentes formas de desenvolvimento. No entanto, esses transcritos foram identificados em alguns cromossomos e não em todos, confirmando os resultados obtidos *in silico*. Transcritos TERRA maduros poliadenilados originados de alguns

cromossomos também foram identificados nas três formas do parasito. Além disso, foi analisado o comprimento dos telômeros em um ciclo de desenvolvimento e nas fases promastigotas e metacíclicas mantidas *in vitro* até 6 repiques sucessivos (passagem 1-6). Os resultados mostraram que durante um ciclo de desenvolvimento as formas amastigotas apresentam telômero mais curtos que as formas promastigota e metacíclica derivadas da mesma, e que o tamanho dos telômeros diminui progressivamente nas formas promastigotas e metacíclicas delas derivadas, durante repiques sucessivos *in vitro*. Também observamos que nos parasitos que apresentam encurtamento progressivo dos telômeros se detecta aumento dos níveis de transcritos TERRA. Portanto, esses resultados sugerem que i) há regulação da expressão de TERRA em nível transcricional nos telômero durante o desenvolvimento de *L. major*, ii) o TERRA pode estar diretamente envolvido com a manutenção dos telômeros nesses parasitas, talvez regulando negativamente a atividade da telomerase e que iii) provavelmente as formas promastigotas e metacíclicas delas derivadas entram em senescência replicativa após vários ciclos de duplicação *in vitro*.

Em relação à identificação das ilhas CpGs putativas em posição subtelomérica, foram realizadas inicialmente análise de metilação de DNA baseado na utilização de enzimas de restrição bloqueadas por metilação. Os resultados sugerem que estas regiões podem estar metiladas, porém ensaios de tratamento de bissulfito seguido de sequenciamento não confirmaram estes achados.

Em relação ao componente RNA da telomerase, TER, para ajudar no entendimento da sua função na biologia do parasito, o gene foi inicialmente clonado e sequenciado para posteriormente ser subclonado em vetor de expressão em *Leishmania* spp. para realizar as análises funcionais. Um vetor utilizando a metodologia CRISPR/Cas9 para edição do TER no genoma de *L. major* foi desenhado e está em fase de construção. Também foi padronizada a utilização de oligonucleotídeos antisense do tipo morpholinos, como ferramenta capaz de abolir a maturação do mRNA TER. Esta metodologia é uma ferramenta muito importante para a realização de knockdown em *Leishmania* spp., pois somente poucas espécies destes parasitos possuem maquinaria de RNA de interferência.

Palavras chave: *Leishmania major*, Leishmaniose, Telômero, Ácido ribonucleico, Telomerase.

Abstract

Protozoan from *Leishmania* genus are the etiologic agents of leishmaniasis, a tropical disease that presents different clinical manifestations and affect million people in Brazil and in the world. There are no eficiente vacines nor treatment protocols against leishmaniasis, therefore, it is crucial to improve the knowledge about *Leishmania* molecular biology and physiology for the development of new therapies. Actually, telomeres have been considered potential molecular targets as they are responsible to maintain genome stability. *Leishmania* telomeres similarly to other eukaryotes, are nucleoprotein structures found at the end of the chromosomes maintained by telomerase. They can be regulated by different mechanisms such as the action of long non-coding telomeric RNAs (lncRNAs). Among the telomeric lncRNAs are the telomerase RNA component (TER) which is crucial for telomerase activity because it contains the template sequence that is copied by telomerase during telomere elongation. TER was recently identified in *Leishmania* although there is no information about its function and biogenesis. TERRA, the Telomere Repeat containing RNA is other telomeric RNA that it is involved with telomere length regulation telomere damage response and alterations in the composition of telomeric chromatin and is essential for telomere maintenance.

In this work, we identified TERRA transcripts in the three *Leishmania* developmental stages (amastigote, promastigote e metacyclic). We interrogate three independent SL-Seq libraries obtained from total RNA obtained from *Leishmania* developmental stages and search for transcripts that present the sequence leader (SL) signal located upstream the subtelomeric/telomeric repeats as a mark for mRNA maturation. In addition, we had also search the *L. major* genome for the presence of *Leishmania* specific subtelomeric elements, the Conserved Sequence Boxes (CSB) and putative subtelomeric CpG islands. Using this approach, we found 7 different types of chromosome ends in *L. major*. *In silico* results were validated using Northern blot and RT-PCR/RT-qPCR. We confirmed the existence of TERRA transcripts of variable length and size, which also present different expression profiles depending on the parasite life stage. Our analyses also revealed the existence of polyadenilated TERRA transcripts from some but not all chromosome ends.

In addition, telomere length analysis was done using parasites originated from a single developmental cycle and from promastigote and metacyclic forms maintained *in vitro* for up to 6 successive replicas in culture. The results showed that during a single

developmental cycle amastigote forms present shorter telomeres than promastigotes and metacyclic derived there from. In addition telomeres length progressively shorten in promastigote and derived metacyclic during successive *in vitro* cultivation, or after increasing population doubling. We also observed that parasites showing progressive telomeres shortening have increased levels of TERRA transcripts.

Therefore, these results suggest that i) TERRA expression is probably regulated at the transcriptional level during *L. major* development, ii) TERRA may be directly involved in parasite telomere maintenance, probably acting as a negative regulator of telomerase activity, and iii) probably promastigotes and derived metacyclic forms enter into replicative senescence after several population derived therefrom enter into replicative senescence after several population doubling cycles *in vitro*.

To identified putatives CpG islands at subtelomeric position, we first performed digestion of DNA with methylation sensitive restriction enzymes. Although these results suggested the existence of methylated DNA at the subtelomeric putative CpG islands, bisulfite treatment followed by DNA sequencing did not confirm these findings.

We had also initiate functional studies about a *L. major* TER component. We cloned, sequenced and subcloned TER gene (leishTER) in a *Leishmania* expression vector. In addition, we also design a CRISPR/Cas9 system to genetic edit the *L. major* TER in the parasite genome. And finally, we have standardized the use of antisense morpholine oligonucleotides as a tool to inhibit the maturation of the *Leishmania* TER component. This later approache will be valuable to study the functions of genes encoding protein and lncRNA in these protozoa, since only a few *Leishmania* species present the RNA interference machinery.

Key words: *Leishmania major*, Leishmaniosis, Telomere, Ribonucleic acid, Telomerase

1. INTRODUÇÃO

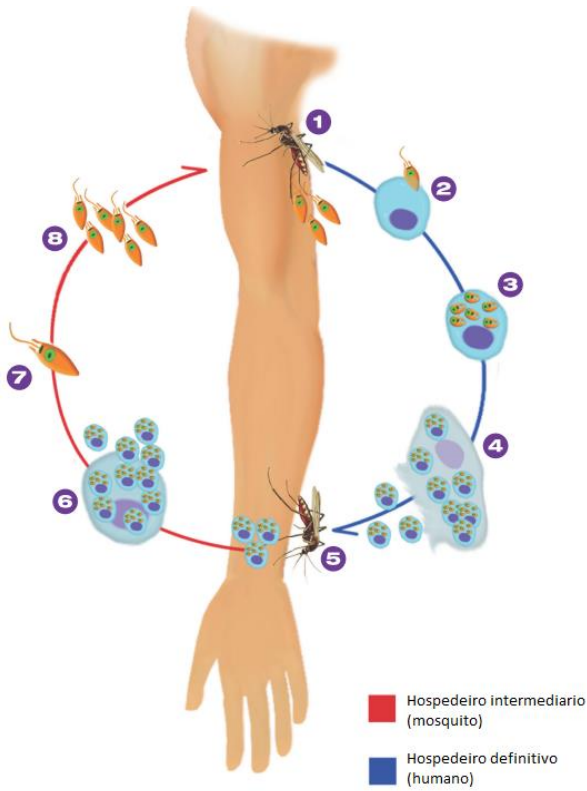
1.1. O ciclo de vida dos parasitos do gênero *Leishmania* spp.

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, que se distingue dos demais eucariotos principalmente pela presença do cinetoplasto, uma estrutura em forma de disco, rica em DNA, localizada na única mitocôndria que está associada à base dos flagelos. As *Leishmania* spp. pertencem à família Trypanosomatidae, e este gênero compreende parasitos dimórficos, os quais apresentam três estágios morfológicos de desenvolvimento durante seu ciclo de vida ou ciclo biológico, considerado heteroxênico. A forma amastigota é a forma intracelular, encontrada no interior de células do sistema fagocítico mononuclear do mamífero (hiraces, roedores, canídeos e humanos), considerado hospedeiro vertebrado ou definitivo. Estas formas se apresentam no formato esférico, possuem um núcleo localizado em uma das extremidades, um cinetoplasto e um flagelo inaparente. Durante o repasto sanguíneo, insetos do gênero *Phlebotomus* (Velho mundo) e *Lutzomyia* (Novo mundo) (hospedeiro intermediário) ingerem formas amastigotas as quais, após 12 a 18 horas se transformam em promastigotas no sistema digestivo do inseto. Promastigotas são formas curtas, ovóides e apenas ligeiramente móveis, que nas seguintes 30 a 60 horas, se multiplicam rapidamente e em seguida se transformam em uma forma longa, mais fina e ativamente movel denominada nectomonadas. Estes, nas próximas 60-72 horas são encontrados na porção do intestino médio do inseto. Após 7-10 dias nectomonadas migram à válvula faríngea do inseto, onde ocorre a metaciclo-gênese, que se refere à diferenciação dos promastigotas em metacíclicos. As formas metacíclicas, são curtas, delgadas, altamente móveis com um flagelo pelo menos com o dobro do tamanho da célula e não apresentam divisão. Acredita-se que apenas esta forma seja levada à pele quando o flebotomíneo infectado faz o repasto sanguíneo. As diferentes formas da fase promastigota possuem um flagelo na região anterior, são alongadas (aspecto fusiforme ou piriforme) com o núcleo geralmente na região central e o cinetoplasto é localizado na região anterior (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003; KILLICK-KENDRICK; MOLYNEUX; ASHFORD, 1974; NEVES et al., 2000; REY, 2001; SACKS; KAMHAWI, 2001; SACKS; PERKINS, 1984) (Fig. 1.1).

Além das modificações morfológicas ocorridas durante seu ciclo de vida, nos hospedeiros invertebrado e vertebrado, todas as espécies de *Leishmania* spp. também apresentam diferenças no metabolismo e na expressão gênica (BARRETT et al., 2003;

DILLON et al., 2015; GULL, 2001; INBAR et al., 2017; JOHNSTON et al., 1999; SIMPSON et al., 2004).

A



B

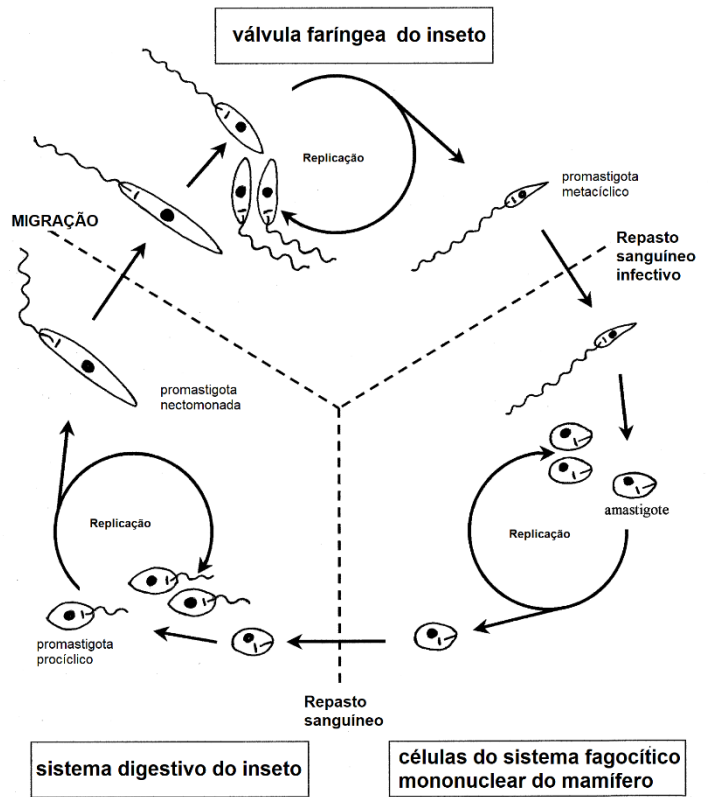


Figura 1.1. Esquema do ciclo de vida de *Leishmania* spp. A) 1. O inseto injeta promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo; 2. promastigotas metacíclicas infectam macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares; 3. Promastigotas se transformam em amastigotas dentro de macrófagos; 4. Multiplicação das amastigotas dentro de macrófagos. 5. e 6. Inseto ingere amastigotas de macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo; 7. No tubo digestivo do inseto amastigotas se transformam em promastigotas; 8. Promastigotas se dividem e migram para a probóscide do inseto onde se transformam em promastigotas metacíclicas. (Figura extraída de (PREVENTION, [s.d.]; VERMELHO et al., 2017). B) Ciclo no inseto vetor (figura retirada de (GOSSAGE; ROGERS; BATES, 2003)).

4.5. CONCLUSÃO

Neste capítulo podemos sugerir que os níveis de transcritos TER nas três fases de desenvolvimento em *L. major* não apresentam diferenças significativas quando comparado a outros organismos. Para contribuir com o entendimento da função do TER foram desenvolvidas metodologias em *Leishmania* para diminuir ou abolir a expressão do TER mediante o uso de morpholinos e o sistema CRISPR0/Cas9. Porém, ainda estamos na fase de início das análises e ainda não foi possível se obter resultados suficientes que demonstrem a função do TER em *L. major*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGAMI, R.; SHAPIRA, M. Nucleotide sequence of the spliced leader RNA gene from *Leishmania mexicana amazonensis*. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 7, p. 1804, 11 abr. 1992.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 31, n. 2, p. 109–118, 1 fev. 2012.

ARORA, R. et al. RNaseH1 regulates TERRA-telomeric DNA hybrids and telomere maintenance in ALT tumour cells. **Nature communications**, v. 5, p. 5220, 21 out. 2014.

ARORA, R.; AZZALIN, C. M. Telomere elongation chooses TERRA alternatives. **RNA Biology**, v. 12, n. 9, p. 938–941, 2 set. 2015.

ARORA, R.; BRUN, C. M. C.; AZZALIN, C. M. TERRA: Long Noncoding RNA at Eukaryotic Telomeres. In: [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 2011. p. 65–94.

AUTEXIER, C.; LUE, N. F. The Structure and Function of Telomerase Reverse Transcriptase. **Annual Review of Biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 493–517, jun. 2006.

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.

AZZALIN, C. M.; LINGNER, J. Telomere functions grounding on TERRA firma. **Trends in Cell Biology**, v. 25, n. 1, p. 29–36, jan. 2015.

BAH, A. et al. The telomeric transcriptome of *Schizosaccharomyces pombe*. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 2995–3005, abr. 2012.

BAHLER, J. et al. Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. **Yeast**, v. 14, n. 10, p. 943–951, jul. 1998.

BALK, B. et al. Telomeric RNA-DNA hybrids affect telomere-length dynamics and senescence. **Nature structural & molecular biology**, v. 20, n. 10, p. 1199–205, 8 out. 2013.

BARBIÉRI, C. L.; DOINE, A. I.; FREYMULLER, E. Lysosomal depletion in macrophages from spleen and foot lesions of *Leishmania*-infected hamster. **Experimental Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 218–228, ago. 1990.

BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 362, n. 9394, p. 1469–1480, 1 nov. 2003.

BAUR, J. A. et al. Telomere Position Effect in Human Cells. **Science**, v. 292, n. 5524, p. 2075–2077, 15 jun. 2001.

BEATTIE, T. L. et al. Reconstitution of human telomerase activity in vitro. **Current biology : CB**, v. 8, n. 3, p. 177–80, 29 jan. 1998.

BERMAN, J. Recent Developments in Leishmaniasis: Epidemiology, Diagnosis, and Treatment. **Current infectious disease reports**, v. 7, n. 1, p. 33–38, jan. 2005.

BESTEIRO, S. et al. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of *Leishmania major*. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 16, p. 11384–96, 21 abr. 2006.

BLACKBURN, E. H. Telomeres and their synthesis. **Science (New York, N.Y.)**, v. 249, n. 4968, p. 489–90, 3 ago. 1990.

BLACKBURN, E. H. Cell biology: Shaggy mouse tales. **Nature**, v. 436, n. 7053, p. 922–923, 18 ago. 2005.

BLACKBURN, E. H.; COLLINS, K. Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 3, n. 5, 1 maio 2011.

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.

BLASCO, M. A. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 299–309, abr. 2007.

BLAST: Basic Local Alignment Search Tool. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

BORST, P. Discontinuous Transcription and Antigenic Variation in Trypanosomes. **Annual Review of Biochemistry**, v. 55, n. 1, p. 701–732, jun. 1986.

BOSOY, D. et al. Conserved N-terminal motifs of telomerase reverse transcriptase required for ribonucleoprotein assembly in vivo. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 6, p. 3882–90, 7 fev. 2003.

BRAULT, M.; D’SOUZA, Y.; AUTEXIER, C. Telomerase: evolution, structure and function. In: **Origin and Evolution of Telomeres**. [s.l.: s.n.]. p. 1–17.

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, 30 mar. 1999.

CHAN, S. R. W. L.; BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 359, n. 1441, p. 109–122, 29 jan. 2004.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, nov. 2007.

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

CHEN, J. L.; BLASCO, M. A.; GREIDER, C. W. Secondary structure of vertebrate telomerase RNA. **Cell**, v. 100, n. 5, p. 503–14, 3 mar. 2000.

CHEN, Y. et al. A Shared Docking Motif in TRF1 and TRF2 Used for Differential Recruitment of Telomeric Proteins. **Science**, v. 319, n. 5866, p. 1092–1096, 22 fev. 2008.

CHIANG, Y. J. et al. Expression of telomerase RNA template, but not telomerase reverse transcriptase, is limiting for telomere length maintenance in vivo. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 16, p. 7024–31, ago. 2004.

CHIURILLO, M. A. et al. Organization of telomeric and sub-telomeric regions of chromosomes from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 100, n. 2, p. 173–183, 25 maio 1999.

CHU, H. P. et al. TERRA RNA Antagonizes ATRX and Protects Telomeres. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 86–101.e16, 2017.

COLLINS, K.; GANDHI, L. The reverse transcriptase component of the *Tetrahymena* telomerase ribonucleoprotein complex. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 15, p. 8485–90, 21 jul. 1998.

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

CpG Islands. Disponível em: <http://www.bioinformatics.org/sms2/cpg_islands.html>. Acesso em: 15 ago. 2017.

CRISPR gRNA (guide RNA) Design Tool for Eukaryotic Pathogens. Disponível em: <<http://grna.ctegd.uga.edu/>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

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

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.

CUSANELLI, E.; ROMERO, C. A. P.; CHARTRAND, P. Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. **Molecular Cell**, v. 51, n. 6, p. 780–791, 26 set. 2013.

CUYPERS, B. et al. Multiplexed Spliced-Leader Sequencing: A high-throughput, selective method for RNA-seq in Trypanosomatids. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 3725, 16 dez. 2017.

DA SILVA, M. S. et al. In: DNA Replication and Mutation Nuclear DNA Replication in Trypanosomatid Protozoa. [s.d.].

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. 2802–6, nov. 1987.

DAS, S. et al. Unmethylated CpG motifs in the L. donovani DNA regulate TLR9-dependent delay of programmed cell death in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 97, n. 2, p. 363–378, 1 fev. 2015.

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.

DILLON, L. A. L. et al. Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during Leishmania major differentiation. **Nucleic acids research**, v. 43, n. 14, p. 6799–813, 18 ago. 2015.

DMITRIEV, P. V.; PETROV, A. V.; DONTSOVA, O. A. Yeast Telosome Complex: Components and Their Functions. **Biochemistry (Moscow)**, v. 68, n. 7, p. 718–734, 2003.

ECKHARDT, F. et al. DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. **Nature Genetics**, v. 38, n. 12, p. 1378–1385, 29 dez. 2006.

ESTELLER, M. Cancer epigenomics: DNA methylomes and histone-modification maps. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 4, p. 286–298, 6 abr. 2007.

FARNUNG, B. O.; GIULOTTO, E.; AZZALIN, C. M. Promoting transcription of chromosome ends. **Transcription**, v. 1, n. 3, p. 140–143, nov. 2010.

FLYNN, R. L. et al. Alternative lengthening of telomeres renders cancer cells hypersensitive to ATR inhibitors. **Science**, v. 347, n. 6219, p. 273–277, 16 jan. 2015.

FROMMER, M. et al. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 5, p. 1827–31, 1 mar. 1992.

FU, G.; BARKER, D. C. Rapid cloning of telomere-associated sequence using primer-tagged amplification. **BioTechniques**, v. 24, n. 3, p. 386–90, mar. 1998.

FU, G.; PERONA-WRIGHT, G.; BARKER, D. C. Leishmania braziliensis: Characterisation of a Complex Specific Subtelomeric Repeat Sequence and Its Use in the Detection of Parasites. **Experimental Parasitology**, v. 90, n. 3, p. 236–243, nov. 1998.

GARDINER-GARDEN, M.; FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **Journal of molecular biology**, v. 196, n. 2, p. 261–82, 20 jul. 1987.

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.

GIARDINI, M. A. et al. Telomere and Telomerase Biology. In: **Progress in molecular biology and translational science**. [s.l: s.n.]. v. 125p. 1–40.

GILSON, E.; GÉLI, V. How telomeres are replicated. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 10, p. 825–838, out. 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. 1027–34, 15 set. 2003.

GOTTSCHLING, D. E. et al. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible repression of Pol II transcription. **Cell**, v. 63, n. 4, p. 751–62, 16 nov. 1990.

GRAF, M. et al. Telomere Length Determines TERRA and R-Loop Regulation through the Cell Cycle. **Cell**, v. 170, n. 1, p. 72–85.e14, 2017.

GREENWOOD, J.; COOPER, J. P. Non-coding telomeric and subtelomeric transcripts are differentially regulated by telomeric and heterochromatin assembly factors in fission yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 7, p. 2956–2963, abr. 2012.

GREIDER, C. W. Telomere Length Regulation. **Annual Review of Biochemistry**, v. 65, n. 1, p. 337–365, jun. 1996.

GUEVARA, P. et al. Green fluorescent protein-tagged *Leishmania* in phlebotomine sand flies. **Journal of medical entomology**, v. 38, n. 1, p. 39–43, jan. 2001.

GULL, K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. **International journal for parasitology**, v. 31, n. 5–6, p. 443–52, 1 maio 2001.

GUPTA, C. L. et al. Cross talk between *Leishmania donovani* CpG DNA and Toll-like receptor 9: An immunoinformatics approach. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 459, n. 3, p. 424–429, 10 abr. 2015.

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, 2 maio 2013.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569–577, dez. 2007.

HENDERSON, E. R.; BLACKBURN, E. H. An overhanging 3' terminus is a conserved feature of telomeres. **Molecular and cellular biology**, v. 9, n. 1, p. 345–8, jan. 1989.

Home - NEB | New England Biolabs. Disponível em: <<https://international.neb.com/>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

HUG, N.; LINGNER, J. Telomere length homeostasis. **Chromosoma**, v. 115, n. 6, p. 413–425, 27 out. 2006.

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, 28 jun. 2011.

INBAR, E. et al. The Transcriptome of *Leishmania major* Developmental Stages in Their Natural Sand Fly Vector. **mBio**, v. 8, n. 2, p. e00029-17, 3 maio 2017.

JOHNSTON, D. A. et al. Genomics and the biology of parasites. **BioEssays**, v. 21, n. 2, p. 131–147, 12 fev. 1999.

KAPLER, G. M.; COBURN, C. M.; BEVERLEY, S. M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 3, p. 1084–94, mar. 1990.

KILLICK-KENDRICK, R.; MOLYNEUX, D. H.; ASHFORD, R. W. Ultrastructural observations on the attachment of *Leishmania* in the sandfly. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 68, n. 4, p. 269, 1974.

- KIM, N. W. et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. **Science (New York, N.Y.)**, v. 266, n. 5193, p. 2011–5, 23 dez. 1994.
- LANDER, E. S. et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860–921, 15 fev. 2001.
- LANDFEAR, S. M.; WIRTH, D. F. Structure of mRNA encoded by tubulin genes in *Leishmania enriettii*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 15, n. 1, p. 61–82, abr. 1985.
- LARSEN, F. et al. CpG islands as gene markers in the human genome. **Genomics**, v. 13, n. 4, p. 1095–107, ago. 1992.
- LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes & development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, jun. 1993.
- LIN, J. et al. A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 41, p. 14713–14718, 12 out. 2004.
- LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, dez. 2001.
- 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, set. 2012.
- LÓPEZ DE SILANES, I. et al. Identification of TERRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes. **Nature communications**, v. 5, p. 4723, 3 set. 2014.
- LUE, N. F. Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it? **BioEssays**, v. 26, n. 9, p. 955–962, set. 2004.
- LUKE, B. et al. The Rat1p 5' to 3' Exonuclease Degrades Telomeric Repeat-Containing RNA and Promotes Telomere Elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Molecular Cell**, v. 32, n. 4, p. 465–477, 21 nov. 2008.
- MAICHER, A. et al. Deregulated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. 14, p. 6649–6659, 2012.
- MEDINA-ACOSTA, E.; CROSS, G. A. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple “mini-prep” procedure. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 59, n. 2, p. 327–9, jun. 1993.
- MILLER, S. I.; LANDFEAR, S. M.; WIRTH, D. F. Cloning and characterization of a *Leishmania* gene encoding a RNA spliced leader sequence. **Nucleic acids research**, v. 14, n. 18, p. 7341–60, 25 set. 1986.
- MONTERO, J. J. et al. Telomeric RNAs are essential to maintain telomeres. **Nature Communications**, v. 7, p. 12534, 17 ago. 2016.
- MORAVEC, M. et al. TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. **EMBO reports**, v. 17, n. 7, p. 1–14, 2016.
- Morpholino Antisense Oligos | Gene Tools, LLC**. Disponível em: <http://www.gene-tools.com/morpholino_antisense_oligos>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- MORTAZAVI, A. et al. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. **Nature Methods**, v. 5, n. 7, p. 621–628, 30 jul. 2008.
- MOTTRAM LAB. **Leishmania Protocols for Dummies Nov16.pdf - Google Drive**. Disponível em: <<https://drive.google.com/file/d/0B5D4RaiMgCsKb0hBb0hxZ2VDRzg/view>>. Acesso em: 15 ago. 2017.
- MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496,

p. 1561–1577, out. 2005.

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.

NAWROCKI, E. P.; EDDY, S. R. Infernal 1.1: 100-fold faster RNA homology searches. **Bioinformatics**, v. 29, n. 22, p. 2933–2935, 15 nov. 2013.

NERGADZE, S. G. et al. CpG-island promoters drive transcription of human telomeres. **RNA**, v. 15, n. 12, p. 2186–2194, 1 dez. 2009.

NETO, 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, 2007.

NEVES, D. P. et al. **Parasitologia humana**. 10. ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

PARDUE, M. L. et al. Drosophila telomeres: new views on chromosome evolution. **Trends in genetics : TIG**, v. 12, n. 2, p. 48–52, fev. 1996.

PFEIFFER, V. et al. TERRA Promotes Telomere Shortening through Exonuclease 1–Mediated Resection of Chromosome Ends. **PLoS Genetics**, v. 8, n. 6, p. e1002747, 14 jun. 2012.

PFEIFFER, V. et al. The THO complex component Thp2 counteracts telomeric R-loops and telomere shortening. **The EMBO journal**, v. 32, n. 21, p. 2861–71, 30 out. 2013.

PONGER, L.; LI, W.-H. Evolutionary Diversification of DNA Methyltransferases in Eukaryotic Genomes. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 4, p. 1119–1128, abr. 2005.

PORRO, A. et al. Molecular Dissection of Telomeric Repeat-Containing RNA Biogenesis Unveils the Presence of Distinct and Multiple Regulatory Pathways. **Molecular and Cellular Biology**, v. 30, n. 20, p. 4808–4817, 15 out. 2010.

PREVENTION, C.-C. FOR D. C. AND. CDC - Leishmaniasis. [s.d.].

PRYDE, F. E.; GORHAM, H. C.; LOUIS, E. J. Chromosome ends: all the same under their caps. **Current opinion in genetics & development**, v. 7, n. 6, p. 822–8, dez. 1997.

RASTROJO, A. et al. The transcriptome of Leishmania major in the axenic promastigote stage: transcript annotation and relative expression levels by RNA-seq. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 223, 4 abr. 2013.

RAUCH, T. A. et al. A human B cell methylome at 100-base pair resolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 3, p. 671–678, 20 jan. 2009.

REIS-CUNHA, J. L. et al. Trypanosomatid Genome Organization and Ploidy. 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. 43.

REY, L. **Parasitologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

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

RUDENKO, G.; VAN DER PLOEG, L. H. Transcription of telomere repeats in protozoa. **The EMBO journal**, v. 8, n. 9, p. 2633–8, set. 1989.

RUTHERFORD, K. et al. Artemis: sequence visualization and annotation. **Bioinformatics**, v. 16, n. 10, p. 944–945, 1 out. 2000.

SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular Aspects of Parasite-Vector and Vector-Host Interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, n. 1, p. 453–483, out. 2001.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. **Science (New York, N.Y.)**, v. 223, n. 4643, p. 1417–9, 30 mar. 1984.

SANDHU, R. et al. A trans-spliced telomerase RNA dictates telomere synthesis in *Trypanosoma brucei*. **Cell Research**, v. 23, n. 4, p. 537–551, 12 abr. 2013.

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.

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, 13 fev. 2014.

SIMPSON, A. et al. Early Evolution within Kinetoplastids (Euglenozoa), and the Late Emergence of Trypanosomatids. **Protist**, v. 155, n. 4, p. 407–422, 1 dez. 2004.

SINGER-SAM, J. et al. Use of a HpaII-polymerase chain reaction assay to study DNA methylation in the P_{gk}-1 CpG island of mouse embryos at the time of X-chromosome inactivation. **Molecular and cellular biology**, v. 10, n. 9, p. 4987–9, set. 1990.

SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. Regulation of Telomerase by Telomeric Proteins. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 177–208, jun. 2004.

SnapGene | Software for everyday molecular biology. Disponível em: <<http://www.snapgene.com/>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

SoftBerry - CpGfinder HELP. Disponível em: <<http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=cpgfinder&group=help&subgroup=promoter>>. Acesso em: 18 ago. 2017.

STONE, M. D. et al. Stepwise protein-mediated RNA folding directs assembly of telomerase ribonucleoprotein. **Nature**, v. 446, n. 7134, p. 458–461, 22 mar. 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.

VASCONCELOS, E. J. R. et al. The Putative *Leishmania* Telomerase RNA (LeishTER) Undergoes Trans-Splicing and Contains a Conserved Template Sequence. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e112061, 12 nov. 2014.

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.

WEBER, M. et al. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. **Nature Genetics**, v. 37, n. 8, p. 853–862, 10 ago. 2005.

WHO | Leishmaniasis. **WHO**, 2017.

WRIGHT, W. E. et al. Normal human chromosomes have long G-rich telomeric overhangs at one end. **Genes & development**, v. 11, n. 21, p. 2801–9, 1 nov. 1997.

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

YU, T.-Y.; KAO, Y.; LIN, J.-J. Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 9, p. 3377–82, 4 mar. 2014.

ZAKIAN, V. A. Telomeres: beginning to understand the end. **Science (New York, N.Y.)**, v. 270, n. 5242, p. 1601–7, 8 dez. 1995.

ZAPPULLA, D. C.; CECH, T. R. From The Cover: Yeast telomerase RNA: A flexible scaffold for protein subunits. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 27, p. 10024–10029, 6 jul. 2004.

ZAPPULLA, D. C.; GOODRICH, K.; CECH, T. R. A miniature yeast telomerase RNA functions in vivo and reconstitutes activity in vitro. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 12, n. 12, p. 1072–1077, 20 dez. 2005.