

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta tese será disponibilizado somente a partir de 25/01/2025.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



ESTUDOS SOBRE O EFEITO DO NOCAUTE E DA
SUPEREXPRESSÃO DO COMPONENTE RNA DA
TELOMERASE (*LeishTER*) NOS TELÔMEROS, NO
DESENVOLVIMENTO E NA SOBREVIVÊNCIA DE *Leishmania major*

BEATRIZ CRISTINA DIAS DE OLIVEIRA

BOTUCATU, SP
2024



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Botucatu



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

ESTUDOS SOBRE O EFEITO DO NOCAUTE E DA
SUPEREXPRESSÃO DO COMPONENTE RNA DA
TELOMERASE (*LeishTER*) NOS TELÔMEROS, NO
DESENVOLVIMENTO E NA SOBREVIVÊNCIA DE *Leishmania major*

NOME DO CANDIDATO: BEATRIZ CRISTINA DIAS DE OLIVEIRA

ORIENTADOR: MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO

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

**BOTUCATU, SP
2024**

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, Beatriz Cristina Dias de.

Estudos sobre o efeito do nocaute e da superexpressão do componente RNA da telomerase (*LeishTER*) nos telômeros, no desenvolvimento e na sobrevivência de *Leishmania major* / Beatriz Cristina Dias de Oliveira. - Botucatu, 2024

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano
Capes: 20202008

1. Telomerase. 2. Telômero. 3. Autofagia. 4. Fatores de virulência. 5. *Leishmania major*.

Palavras-chave: Autofagia; Baixo índice de infectividade; Encurtamento dos telômeros; L. major TER nocaute; SHAPE-MaP.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA TESE DE DOUTORADO DE BEATRIZ CRISTINA DIAS DE OLIVEIRA, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 25 dias do mês de janeiro do ano de 2024, às 09:00 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação do Instituto de Biociências, realizou-se a defesa de TESE DE DOUTORADO de BEATRIZ CRISTINA DIAS DE OLIVEIRA, intitulada **Estudos sobre o efeito do nocaute e da superexpressão do componente RNA da telomerase (*LeishTER*) nos telômeros, no desenvolvimento e na sobrevivência de *Leishmania major***. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Profa. Dra. MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Ciências Químicas e Biológicas / Instituto de Biociências UNESP Câmpus de Botucatu, Assistant Professor NOELIA MARINA LANDER MANFREDI (Participação por Parecer Circunstanciado) do(a) Biological Sciences / University of Cincinnati, Senior Bioinformatics Research Officer ELTON JOSE ROSAS DE VASCONCELOS (Participação Virtual) do(a) LeedsOmics – Faculty of Biological Sciences / University of Leeds, Prof^a. Dr^a. CAROLINA BORSOI MORAES HOLANDA DE FREITAS (Participação Virtual) do(a) Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, Prof. Dr. GUILHERME TARGINO VALENTE (Participação Presencial) do(a) Laboratório de Biotecnologia Aplicada / Faculdade de Medicina de Botucatu - Unesp. Após a exposição pela doutoranda e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, a discente recebeu o conceito final: APROVADO. Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Profa. Dra. MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO



Documento assinado digitalmente
MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO
Data: 25/01/2024 17:25:54-0300
Verifique em <https://validar.itl.gov.br>

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu avô, José Chrispim da Silva, que plantou a sementinha da pós-graduação em minha cabeça com um de seus poemas. À minha mãe que sempre enfatizou que a coisa mais valiosa que ela poderia proporcionar a mim e a minha irmã era o estudo, pois isso ninguém tira de nós. E aos meus sobrinhos, Carolina, Eduardo e Gael que representam o futuro e a esperança em minha vida.

Eu amo vocês.

Agradecimentos

Durante todo esse período de pós-graduação tive a sorte de ter ao meu lado pessoas que de alguma forma deixaram essa caminhada mais leve. Dessa forma não poderia deixar de destacar meus mais profundos agradecimentos:

À Deus, por guiar meus passos e por me abençoar durante todo meu caminho.

À minha família, por todo apoio e incentivo aos estudos, pelos ensinamentos e pelo amor. Em especial agradeço minha mãe Sol, meu pai Cláudio, minha irmã Aline, meus sobrinhos Carolina e Eduardo, meu cunhado Ricardo e meu vô Zé. Essas pessoas tiveram um papel muito importante na minha formação, seja na vida pessoal como na profissional. Estiveram sempre me apoiando e torcendo por mim. Minha conquista também é de vocês. E aos meus doguinhos, Floquinho e Belinha, que me alegravam toda vez que eu chegava em casa cansada e estressada.

Ao meu esposo, Victor de Oliveira Esteves por me apoiar desde o início e por sempre ter acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava. Obrigada por sempre me falar o quanto tinha orgulho de mim, pelas massagens nos meus ombros e braços cansados do trabalho, e por entender que em muitos dias o que eu queria era apenas dormir e comer. Você é um dos pilares da minha vida e seu apoio foi fundamental.

À minha segunda família, Oliveira e Esteves, que me acolheram de braços abertos. Uma grande, alegre e amorosa família.

Aos meus amigos, que ao longo da jornada escutaram minhas reclamações e vibraram com minhas vitórias. Em especial aos meus amigos do LabTelo, com os quais compartilhei minhas frustrações, alegrias, bancada, soluções e experimentos.

À minha orientadora, Dra. Maria Isabel Nogueira Cano, que me acolheu em seu laboratório de braços abertos, e que durante todos esses anos sempre me incentivou a voar alto, a dar o meu melhor e a não desistir. Posso dizer que tive muita sorte de ter a Bel como orientadora, pois ela realmente me orientou, me desafiou, me ajudou, confiou em meu trabalho e sempre se fez presente. Tenho uma profunda admiração pela profissional que ela é, pelo coração gigante que possui e pelo senso de justiça.

À UNESP e ao Instituto de Biociências de Botucatu. Sempre foi meu sonho fazer parte dessa instituição, e esse sonho se tornou realidade na pós-graduação. Foram anos incríveis, com profissionais excelentes que contribuíram para minha formação.

Ao Chakrabarti's lab da University of North Carolina at Charlotte (UNCC) por me receberem durante seis meses de estágio. Em especial ao Dr. Kausik Chakrabarti pelos muitos ensinamentos.

Às agências de fomento que tornaram possível minha jornada acadêmica: ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), processo nº 143311/2019-0 - GM/GD-Cotas do Programa de Pós-Graduação, pelo apoio durante os 4 meses de mestrado, que antecedeu a transição para o doutorado direto; à CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) – Código de Financiamento 001, processo nº 88887.470062/2019-00, pelo suporte nos dois primeiros meses de doutorado; e à FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), processo nº 2019/25985-6, pela concessão de bolsa no país, e processo nº 2022/05039-1, pela concessão de bolsa de estágio no exterior (BEPE). Expresso minha sincera gratidão e reconhecimento a essas agências, cujo apoio é fundamental para o avanço científico do nosso país. Que continuem sendo reconhecidas e valorizadas por seu papel essencial na promoção da pesquisa e do desenvolvimento científico.

Epígrafe

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

Louis Pasteur

Resumo

Parasitos do gênero *Leishmania* causam leishmaniose, uma doença tropical negligenciada que afeta pessoas em todo o mundo. A doença apresenta diferentes manifestações clínicas, alta taxa de incidência e vai desde lesões auto curáveis até a forma letal, conhecida como leishmaniose visceral. Apesar de muitos esforços, até agora não existem vacinas e protocolos de tratamento eficientes disponíveis e, portanto, encontrar novos alvos terapêuticos é crucial. Os telômeros, extremidades físicas dos cromossomos de eucariotos, são essenciais para manter a estabilidade do genoma e têm sido considerados alvos potenciais contra parasitos. Em *Leishmania* spp. os telômeros são compostos por repetições conservadas do tipo TTAGGG, mantidas pela telomerase, uma ribonucleoproteína minimamente composta pelos componentes TERT (transcriptase reversa da telomerase) e TER (RNA da telomerase). Na maioria dos eucariotos o TER é uma molécula única e contém a sequência molde copiada pela TERT durante a elongação dos telômeros. Sua estrutura secundária contém domínios com funções de controle da inserção de nucleotídeos pela TERT, reconhecimento da sequência telomérica e de ligação com proteínas acessórias. Em 2014 nosso grupo identificou e caracterizou parcialmente o componente TER da telomerase de *Leishmania* (*LeishTER*). O presente trabalho visa desvendar os papéis biológicos desempenhados pelo componente TER de *Leishmania major* (*LeishTER*) na homeostase do parasito. Para isso obtivemos uma linhagem celular knockout (*LmTER*^{-/-}) que apresentou alterações no perfil de proliferação do parasito, divisão celular e replicação do DNA, principalmente nas primeiras passagens in vitro. Durante o crescimento contínuo, *LmTER*^{-/-} apresentou *arrest* parcial do ciclo celular G0/G1, encurtamento progressivo dos telômeros e maior porcentagem de fosforilação da histona γ H2A. Além disso, alterações ultraestruturais características da autofagia foram detectadas sem que as células apresentassem danos no DNA ou fenótipos de apoptose. *LmTER*^{-/-} promastigotas diferenciam-se em metacíclicos apresentando índice de infectividade *in vitro* menor que o controle *Lm007*. Curiosamente, o addback de *LeishTER* não retornou o comprimento dos telômeros aos níveis do tipo selvagem, corroborando resultados preliminares que mostram que a expressão episomal de TER, semelhante à sua ablação, tem um efeito negativo dominante na vida do parasito, o que pode ser um potencial alvo terapêutico contra a leishmaniose. Além disso, resultados preliminares que visam acessar a estrutura secundária de *LeishTER* através da acilação seletiva de 2'-hidroxila analisada por extensão de primer e perfil mutacional (SHAPE MaP) com o uso de 2-metilnicotínico imidazolide (NAI) confirmaram algumas estruturas já descritas pelo nosso grupo, incluindo a Hélice II (TBE), o molde e a hélice proximal ao modelo (TPH). A estrutura inicial de ~100 nt de *LeishTER* se assemelhou à de TbTR (TER de *Trypanosoma brucei*), com um motivo 5' CCGUCA 3' na extremidade 3' proximal a TBE, similar a TBE de *Tetrahymena thermophila*. Nucleotídeos na base de TPH mostraram baixa reatividade, indicando rigidez, enquanto o ápice apresentou reatividade. O molde de *LeishTER* compreende principalmente elementos de cadeia simples, exceto por alguns nucleotídeos que sugerem envolvimento em interações de longo alcance ou transitórias. Entretanto, experimentos adicionais são necessários para confirmação e uma compreensão completa da estrutura de *LeishTER*.

Palavras-chave: *L. major* TER nocaute; alteração da proliferação; encurtamento dos telômeros; sinalização de danos ao DNA; autofagia; baixo índice de infectividade; CRISPR/Cas9; SHAPE-MaP.

Abstract

Parasites of the genus *Leishmania* cause leishmaniasis, a neglected tropical disease that affects people worldwide. The disease has different clinical manifestations, a high incidence rate and ranges from self-healing lesions to the lethal form known as visceral leishmaniasis. Despite many efforts, until now there are no vaccines and efficient treatment protocols available and therefore finding new therapeutic targets is crucial. Telomeres, the physical ends of eukaryotic chromosomes, are essential for maintaining genome stability and have been considered potential targets against parasites. In *Leishmania* spp. telomeres are composed of conserved TTAGGG-like repeats maintained by telomerase, a ribonucleoprotein minimally composed of TERT (telomerase reverse transcriptase) and TER (telomerase RNA) components. In most eukaryotes, TER is a single molecule and contains the template sequence copied by TERT during telomere elongation. Its secondary structure contains domains with functions to control the insertion of nucleotides by TERT, recognition of the telomeric sequence and binding with accessory proteins. In 2014 our group identified and partially characterized the TER component of *Leishmania* telomerase (*LeishTER*). The present work aims to unravel the biological roles played by the TER component of *Leishmania major* (*LeishTER*) in the parasite's homeostasis. For this, we obtained a knockout cell line (*LmTER*^{-/-}) that showed alterations in the profile of parasite proliferation, cell division and DNA replication, mainly in the first passages in vitro. During continuous growth, *LmTER*^{-/-} showed partial arrest of the G0/G1 cell cycle, progressive telomere shortening and a higher percentage of histone γ H2A phosphorylation. Furthermore, ultrastructural alterations characteristic of autophagy were detected without the cells showing DNA damage or apoptosis phenotypes. *LmTER*^{-/-} promastigotes differentiate into metacyclics with an *in vitro* infectivity index lower than the *Lm007* control. Interestingly, the *LeishTER* addback did not return telomere length to wild-type levels, corroborating preliminary results showing that episomal TER expression, similar to its ablation, has a dominant negative effect on parasite lifespan, which may be a potential therapeutic target against leishmaniasis. Additionally, preliminary results aiming to access the secondary structure of *LeishTER* through selective 2'-hydroxyl acylation analyzed by primer extension and mutational profiling (SHAPE MaP) using 2-methyl nicotinic imidazolide (NAI) confirmed some structures previously described by our group, including Helix II (TBE), the template, and the template proximal helix (TPH). The initial structure of ~100 nt of *LeishTER* closely resembled that of *TbTR* (*Trypanosoma brucei* TER), with a 5' CCGUCA 3' motif at the 3' end proximal to TBE, similar to TBE in *Tetrahymena thermophila*. Nucleotides at the TPH base showed low reactivity, indicating rigidity, while the apex exhibited reactivity. The *LeishTER* template mainly comprised single-stranded elements, except for a few nucleotides suggesting involvement in long-range or transient interactions. However, additional experiments are needed for confirmation and a comprehensive understanding of the *LeishTER* structure.

Keywords: *L. major* TER knockout; alteration of proliferation; telomere shortening; DNA damage signaling; autophagy; low infectivity rate; CRISPR/Cas9; SHAPE-MaP.

Resumo para a sociedade

Vocês já ouviram falar das leishmanioses? Elas são doenças causadas por um ser vivo bem pequeno impossível de observar a olho nu, chamado *Leishmania*. Esses organismos são parasitas e são transmitidos através da picada do mosquito palha infectado. Existem vários tipos de leishmanioses, como por exemplo: leishmaniose cutânea, caracterizada por feridas na pele; e a leishmaniose visceral que ataca órgãos muito importantes para nossa sobrevivência, como o fígado e o baço, podendo levar a morte. O tipo de leishmaniose que a pessoa infectada pode desenvolver depende de como está seu sistema imunológico e qual tipo de *Leishmania* a infectou. Além disso, a leishmaniose é considerada uma zoonose que afeta principalmente cães domésticos, os quais atuam como reservatórios da doença. A Organização Mundial da Saúde declarou as leishmanioses como doenças de grande impacto e importância, porém elas ainda são negligenciadas, ou seja, mesmo afetando milhões de pessoas no mundo, incluindo o Brasil, ainda não há vacinas nem tratamentos eficazes para combatê-las.

Dessa forma, é importante estudar esses parasitos para tentar encontrar um de seus pontos fracos que possam ser utilizados para lutar contra eles. Apesar da *Leishmania* ser um organismo unicelular e diferente de nós humanos em muitos aspectos, nós compartilhamos muitas coisas em comum. Então, para criar um medicamento ou uma vacina eficaz, precisamos tomar cuidado para encontrar algo que ataque apenas a *Leishmania* e que não faça mal aos seres humanos.

Pensando nisso, nós no Laboratório de Telômeros estudamos os telômeros e a telomerase de *Leishmania* como potenciais alvos terapêuticos. Mas o que são telômeros e telomerase?

Você já deve ter ouvido falar do DNA, nosso material genético. O DNA é como um livro de receitas. Nele há todas as informações necessárias para fazer você ser você. Ele é o centro de informações das nossas células (pequenos “blocos” que constroem nosso corpo). O DNA em nossas células, assim como na *Leishmania* estão organizados em moléculas lineares denominadas cromossomos. E assim como um livro possui capa, nosso DNA também tem uma “capa” para protegê-lo, chamada de “Telômeros”. Esses telômeros ficam nas pontas dos cromossomos protegendo todas as informações contidas nele. Porém, assim como as capas dos livros vão se desgastando ao longo do tempo, os telômeros também vão, e nesse caso seu desgaste causa seu encurtamento. Se esses telômeros ficarem bem curtos, isso pode ser um problema para a célula, já que seu centro de informações, o DNA, ficará desprotegido, com possibilidade de perdê-los. Para tentar resolver essa situação, temos a participação de uma personagem muito importante, a telomerase. Ela funciona como uma máquina de alongar telômeros e consegue produzir mais telômeros nas pontas do DNA, ajudando-o a recuperar o que estava sendo perdido/desgastado.

Essa telomerase é composta por algumas peças: uma peça se chama TERT e a outra se chama TER. A TERT é quem coloca a “mão na massa” e produz mais telômeros, enquanto o TER tem um molde que a TERT utiliza para essa produção. É como se a TERT fosse a boleira e o TER a forma do bolo. E da mesma forma que há várias formas de bolo, essa peça chamada de TER também varia muito, sendo exclusiva em cada ser vivo. Ou seja, TER de *Leishmania* é diferente do TER de humanos, apesar de terem a mesma função. E com isso, ele pode ser o “ponto fraco” que procuramos para combater a *Leishmania* e consequentemente as leishmanioses.

Sabendo disso, o meu projeto de doutorado busca estudar:

- Os efeitos que a retirada e a produção em excesso do TER causa nos telômeros de *Leishmania*, e como isso afeta o desenvolvimento e o seu poder de infecção;
- Analisar a estrutura do TER de *Leishmania*.

Para tentar responder essas perguntas, muitos experimentos foram realizados, e chegamos aos seguintes resultados: a ausência do TER influencia no tamanho dos telômeros de forma negativa, ou seja, ao longo do tempo os telômeros das *Leishmanias* que não tem o TER vão encurtando, e isso prejudica seu crescimento populacional. Além disso, identificamos mudanças nas estruturas interiores da célula de *Leishmania*, mas sem afetar o material genético. As *Leishmanias* com telômeros curtos também apresentaram um baixo poder de infecção quando comparada com as *Leishmanias* controles (aquelas que ainda possuem o TER e telômeros intactos). Também verificamos que a superprodução do TER nas *Leishmanias* acaba tendo um efeito dominante negativo, o que significa que sua superprodução atrapalha o funcionamento normal da *Leishmania*, fazendo com que ela apresente características similares as *Leishmania* que não possuem o TER.

Ainda temos resultados preliminares, porém ao analisarmos uma parte da estrutura do TER vimos que ele se parece com o TER de outro parasito chamado *Trypanosoma brucei*, causador da doença do sono. Porém, mais pesquisas estão em andamento para desvendar a estrutura completa do TER de *Leishmania*.

Assim, esses achados indicam que o componente TER se destaca como um alvo promissor na busca por medicamentos inovadores contra a leishmaniose

A PESQUISA QUE EU FAÇO

Estudos sobre o efeito do nocaute e da superexpressão do componente RNA da telomerase (LeishTER) nos telômeros, no desenvolvimento e na sobrevivência de *Leishmania major*

PARA TODO MUNDO ENTENDER:

O que pode acontecer quando existe muita ou nenhuma telomerase, uma proteína que ajuda a manter as pontas do DNA, no parasita que causa a doença Leishmaniose

Beatriz Cristina Dias de Oliveira
(PPG C. Biológicas - Genética)

AgDC

Instituto de Biociências
Unesp Botucatu

ANOS

Card gerado na disciplina de “Divulgação Científica”

Lista de figuras

1 Introdução

Figura 1. Principais formas do parasito do gênero <i>Leishmania</i> nos diferentes ambientes durante o ciclo de desenvolvimento.....	18
Figura 2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.....	19
Figura 3. Mapa mundial contendo dados reportados de países e territórios sobre o estado de endemicidade das leishmanioses.....	20
Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose.....	22
Figura 5. Representação dos telômeros de <i>Leishmania</i> spp.....	24
Figura 6. Replicação semiconservativa do DNA telomérico e seu processamento.....	26
Figura 7. Ação da telomerase nos telômeros.....	27
Figura 8. Estrutura primária do componente TERT.....	29
Figura 9. Esquema da estrutura secundaria do TER de humanos, <i>S. cerevisiae</i> e <i>T. thermophila</i>	31
Figura 10. Modelo da estrutura predita para o TER de <i>L. major</i> (<i>LeishTER</i>) e TER de <i>T. brucei</i> (<i>TbTER</i>).....	32

3.1 Capítulo 1 - *The impact of knocking out the Leishmania major telomerase RNA (*LeishTER*): from altered cell proliferation to decreased parasite infectivity*

Fig 1. Knockout of <i>LeishTER</i> induces growth defects and arrest in the G0/G1 phase, mainly at early passages.....	44
Fig 2. Ablation of <i>LeishTER</i> causes telomere shortening in <i>LmTER</i> ^{-/-} during continuous in vitro passages.....	47
Fig 3. Lower expression of TERRA29 was observed in <i>LmTER</i> ^{-/-} at P50.....	48
Fig 4. The addback of <i>LeishTER</i> has a dominant negative effect and did not restore the telomere length to the <i>Lm007</i> level.....	50
Fig 5. <i>LmTER</i> ^{-/-} shows higher phosphorylation of histone γ H2A, although no other DNA damage or apoptosis signal was detected.....	52
Fig 6. <i>LmTER</i> ^{-/-} exhibits intracellular alterations that indicate an autophagic process...	54

Fig 7. <i>LmTER</i> ^{-/-} retains the ability to transform into metacyclic form, but its in vitro infectivity index is compromised.....	56
S1 Fig. Epissomal expression of Cas9 does not interfere with proliferation and cell cycle progression in <i>L. major</i>	81
S2 Fig. Generation of <i>LeishTER</i> double knockout (<i>LmTER</i> ^{-/-}) was successfully achieved.....	83
S3 Fig. The creation of a <i>LeishTER</i> overexpressor lineage, known as <i>LmpXTER</i> , has a dominant negative effect on the parasite similar to the depletion of <i>LeishTER</i>	85
S4 Fig. The reduced infectivity of BMDM by <i>LmTER</i> ^{-/-} was validated through a subsequent in vitro experiment using RAW 264.7 cells.....	87
 3.2 Capítulo 2 - Structural assessment of the core domains of <i>Leishmania major</i> telomerase RNA (<i>LeishTER</i>)	
Figure 1. Strategy to map the entire <i>LeishTER</i> sequence.....	103
Figure 2. Confirmation of <i>LeishTER</i> expression in <i>LmWT</i> cells.....	106
Figure 3. Confirmation of the presence of pTB007 plasmid in the <i>Lm007</i> population...	106
Figure 4. Quality analysis of the pre-made libraries.....	107
Figure 5. Quality analysis of the sequencing data.....	109
Figure 6. SHAPE-MaP reactivity profiles.....	110
Figure 7. Histograms generated by ShapeMapper indicate the success of the NAI treatment.....	111
Figure 8. Predicted <i>LeishTER</i> secondary structure obtained in-silico and by chemical probing.....	113
 3.3 Capítulo 3 - Geração de linhagem de <i>Leishmania major</i> duplo nocaute para o TER e para a TERT	
Figura 1. Mapas esquemáticos do locus da TERT antes e depois do nocaute e confirmação via PCR e RT-PCR do nocaute da TERT.....	128
Figura 2. Confirmação do nocaute do gene da TERT por sequenciamento Sanger.....	129

Lista de tabelas

3.1 Capítulo 1 - *The impact of knocking out the Leishmania major telomerase RNA (LeishTER): from altered cell proliferation to decreased parasite infectivity*

S1 Table. Oligonucleotide sequences.....	88
S2 Table. Flow-FISH (MESF $\pm$ SD analysis) of <i>Lm007</i> , <i>LmTER</i> ^{-/-} , <i>LmpXØ</i> and <i>LmpXTER</i> cells.....	91
S3 Table. In Vitro Infectivity Assessment of <i>LmTER</i> ^{-/-} , <i>Lm007</i> (P5 and P50), and <i>LmAddBack</i> (P50) on Balb/c Bone Marrow-Derived Macrophages (BMDM).....	92

3.2 Capítulo 2 - *Structural assessment of the core domains of Leishmania major telomerase RNA (LeishTER)*

Table 1. Concentration and purity of pre-made libraries.....	107
Table S1. Oligonucleotide sequences.....	116
Table S2. Information about the TruSeq barcodes.....	116

3.3 Capítulo 3 - *Geração de linhagem de Leishmania major duplo nocaute para o TER e para a TERT*

Tabela 1. Sequência dos moldes sgRNAs utilizados.....	126
Tabela 2. Sequência dos iniciadores utilizados.....	127

Sumário

1 Introdução.....	17
1.1 O parasito <i>Leishmania</i> spp. e as leishmanioses.....	17
1.2 Ciclo biológico dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i>	18
1.3 As leishmanioses.....	20
1.4 Telômeros e telomerase.....	23
1.4.1 Telômeros.....	23
1.4.2 Telomerase.....	26
1.4.2.1 O componente Transcriptase Reversa da Telomerase (TERT).....	28
1.4.2.2 O componente RNA da telomerase (TER).....	29
1.4.2.2.1 TER em organismos modelos.....	29
1.4.2.2.2 TER de protozoários.....	31
1.4.2.2.3 Comprometimento da ação do componente RNA da telomerase causa o encurtamento progressivo dos telômeros.....	32
1.5 Caracterização da estrutura secundária de <i>LeishTER</i> através de SHAPE-MaP.....	33
1.6 Justificativa para a investigação do RNA da Telomerase em <i>Leishmania</i>	34
2 Objetivos.....	35
2.1 Geral.....	35
2.2 Específicos.....	35
2.3 Suplementares.....	35
3 Materiais, métodos, resultados e discussão: introdução aos capítulos.....	36
3.1 Capítulo 1 - <i>The impact of knocking out the <u>Leishmania major</u> telomerase RNA (LeishTER): from altered cell proliferation to decreased parasite infectivity</i>	37
3.2 Capítulo 2 - <i>Structural assessment of the core domains of <u>Leishmania major</u> telomerase RNA (LeishTER)</i>	94
3.3 Capítulo 3 - <i>Geração de linhagem de <u>Leishmania major</u> duplo nocaute para o TER e para a TERT</i>	122
4 Conclusões.....	134

5 Referências.....	135
Apêndice 1. Artigo publicado em: Frontiers in Cell and Developmental Biology.....	145
Apêndice 2. Capítulo de livro publicado em: Human Genome Structure, Function and Clinical Considerations.....	146
Apêndice 3. Artigo publicado em: Cells.....	147
Apêndice 4. Capítulo de livro publicado em: Methods in Molecular Biology.....	148
Apêndice 5. Preprint publicado em: BioRxiv.....	149
Apêndice 6. Preprint publicado em: BioRxiv.....	150

1 Introdução

1.1 O parasito *Leishmania* spp. e as leishmanioses

O gênero *Leishmania* recebe esse nome em homenagem a Major William Leishman, que em 1903 descreveu detalhadamente características de corpúsculos ovais, os quais ele acreditava se tratar de resíduos de tripanossomas, encontrados no baço *post-mortem* pertencente a um soldado que havia morrido em decorrência da “kala-zar”, uma febre negra popularmente conhecida na Índia. A descoberta de uma nova espécie e um novo gênero se concretizou após os estudos de Leishman serem analisados juntamente aos estudos do Capitão Charles Donovan por Major Ross que após observar as amostras, chegou à conclusão que não se tratava de fragmentos de tripanossomas e sim de uma nova espécie de organismo, o qual nomeou de *Leishmania donovani*, criando assim o gênero *Leishmania* (Cupolillo et al., 2014; Ross, 1903).

Desde então mais de 50 espécies de *Leishmania* foram descritas e classificadas. As espécies que infectam o ser humano são divididas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (Pacheco e Carvalho-Costa, 2014), sendo o subgênero *Viannia* restrito ao Novo Mundo, e o subgênero *Leishmania* presente tanto no Velho Mundo como no Novo Mundo (Akhoundi et al. 2016; Kerr, 2000; Lainson e Shaw, 1987).

Os parasitos do gênero *Leishmania* pertencem a família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida (Silva et al., 2014) que também engloba outros parasitos de importância médica como *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*, causadores das doenças de Chagas e do sono, respectivamente. Organismos pertencentes a ordem Kinetoplastida se diferenciam dos demais eucariotos pela presença de cinetoplasto, o qual está localizado dentro da única mitocôndria do parasito, que contém DNA mitocondrial em alto número de cópias (kDNA) (Neves, 2005; Silva et al., 2014).

As *Leishmanias* são parasitos digenéticos, os quais necessitam de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado para completar seu ciclo de desenvolvimento (Cupolillo et al., 2014; Silva et al., 2014). Durante o ciclo, os parasitos passam por três principais estágios de desenvolvimento morfollogicamente distintos, sendo eles:

- Promastigota procíclica: possui alta capacidade proliferativa, é alongada, extracelular, possui um flagelo para auxiliar na mobilidade e encontra-se no trato digestório do hospedeiro invertebrado (insetos das espécies *Lutzomyia* ou *Phlebotomus*), popularmente conhecido como mosquito-palha (Fig. 1) (Neves, 2005; Silva et al., 2014).

- Promastigota metacíclica: é a forma infectante do parasito sendo transmitida aos hospedeiros vertebrados durante o repasto sanguíneo da fêmea do inseto. Embora possua características similares à promastigota procíclica, seu corpo é menos alongado e seu flagelo mais longo, além de não serem proliferativas, ou seja, não se dividem. As metacíclicas podem ser encontradas no trato digestivo anterior do inseto (Fig. 1) (da Silva e Sacks, 1987; Lainson e Shaw, 1987; Neves, 2005).
- Amastigota: encontrada no meio intracelular do hospedeiro vertebrado, é altamente proliferativa, arredondada e seu flagelo é inaparente, pois não se exterioriza (Fig. 1) (Neves, 2005; Silva et al., 2014).

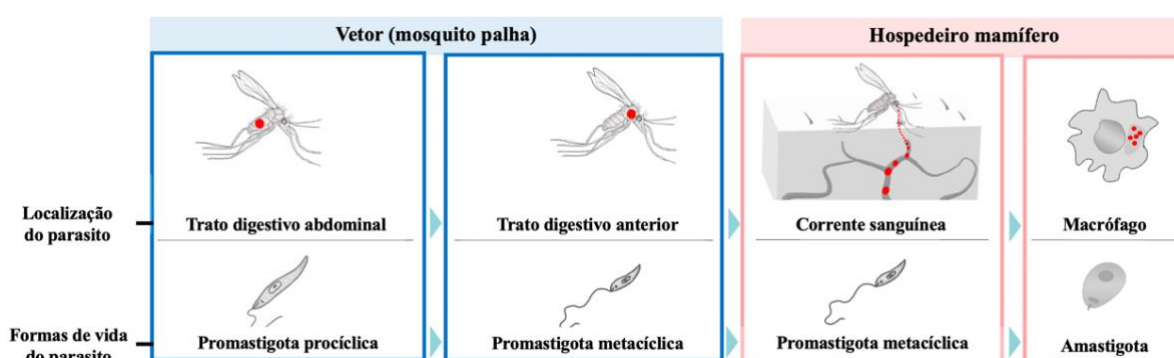


Figura 5. Principais formas do parasito do gênero *Leishmania* nos diferentes ambientes durante o ciclo de desenvolvimento. Imagem extraída e traduzida de Karamysheva et al. (2020).

A capacidade que o parasito possui de se diferenciar, deve-se principalmente a alterações da expressão gênica ocasionada devido ao estresse causado por mudanças como diferença de temperatura, pH e nutrientes, no meio onde se encontra o parasito (Karamysheva et al. 2020).

1.2 Ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania*

Durante a hematofagia do inseto (flebotomíneo) infectado, o parasito na sua forma metacíclica penetra na pele do hospedeiro mamífero sendo fagocitado por neutrófilos e depois por macrófagos periféricos recrutados no local da lesão. Uma vez dentro do macrófago, o parasito se diferencia na forma amastigota, e começa a se multiplicar por fissões binárias sucessivas, os quais após causarem o rompimento da membrana do macrófago, são liberados na corrente sanguínea, podendo infectar novas células, ou serem sugados por uma nova fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (Chappuis et al., 2007). Dentro do inseto, os parasitos na forma amastigota se agrupam, e após aproximadamente 12 horas, eles começam a

se diferenciar em promastigotas procíclicas (Morea et al., 2021), os quais migram para o epitélio do trato digestório e começam a se multiplicar sucessivamente por divisão binária, aderindo ao epitélio pelo flagelo. Alguns parasitos podem ser eliminados com as fezes do mosquito, e os demais migram para a região anterior do intestino até a válvula estomodeal, onde se concentram e passam pela diferenciação celular denominada metaciclogênese, em que o tamanho do corpo celular diminui e o flagelo aumenta. As formas promastigotas metacíclicas resultantes dessa transformação, são extremamente móveis e infectivas e migram para a probóscide do inseto sendo regurgitadas e transmitidas ao hospedeiro vertebrado através da picada, reiniciando um novo ciclo de transmissão (Fig. 2) (Neves, 2005). Todo o ciclo de desenvolvimento do parasito pode ser replicado *in vitro* em culturas axênicas (Bates, 1994), facilitando a manipulação e estudos sobre a biologia, desenvolvimento e interações do parasito com o meio e seus hospedeiros.

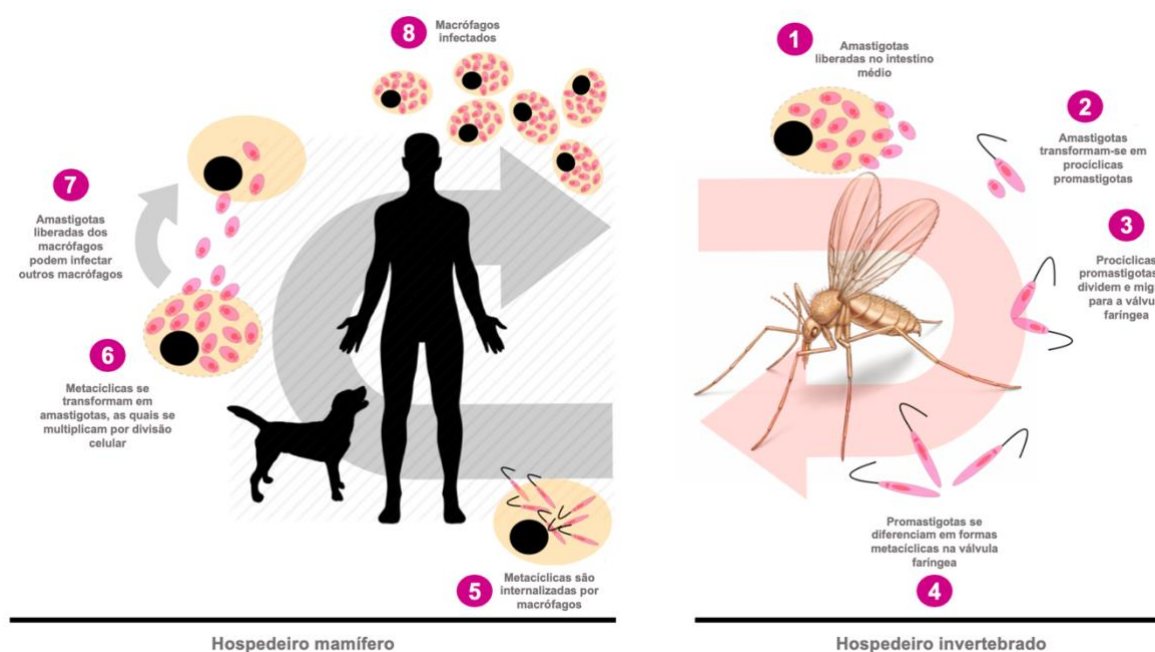


Figura 6. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Durante o repasto sanguíneo, insetos fêmeas das espécies *Lutzomya* (Velho Mundo) ou *Phlebotominae* (Novo Mundo), infectados com parasitos do gênero *Leishmania*, regurgitam as formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro mamífero. Estas são fagocitadas por macrófagos e dentro da célula se diferenciam em amastigotas. As amastigotas se multiplicam e causam a *lise* celular podendo infectar outras células do hospedeiro ou ser absorvidas durante a hematofagia por outros insetos. Uma vez dentro do inseto, as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, as quais se dividem e se diferenciam em metacíclicas, migrando para a probóscide do mosquito, sendo regurgitadas durante o repasto sanguíneo e assim, reiniciando o ciclo. Imagem extraída e traduzida de Assis et al. (2021).

1.3 As leishmanioses

As *Leishmanias* têm uma grande importância médica, uma vez que causam leishmanioses, endêmicas em mais de 80 países (Fig. 3A e 3B) e caracterizadas pela sua complexidade e diversidade (Desjeux, 1992; WHO, 2021; Pace, 2014). Embora seja considerada pela Organização Mundial da Saúde doenças tropicais de grande impacto em países subdesenvolvidos, elas também podem ser encontradas em países desenvolvidos como França, Grécia e Itália (Chappuis et al., 2007; Nascimento e Santos, 2020; Pace, 2014).



Figura 7. Mapa mundial contendo dados reportados de países e territórios sobre o estado de endemidade das leishmanioses. a) Endemidade da leishmaniose cutânea em 2021; b) Endemidade da leishmaniose visceral em 2021. Em vermelho: países endêmicos; em rosa: casos previamente reportados; em branco: não há casos autóctones relatados; em cinza: não aplicável. (Fonte: http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html).

Atualmente sabe-se que aproximadamente 20 espécies de protozoários flagelados do gênero *Leishmania* são patogênicas para o ser humano (Chappuis et al., 2007; Desjeux, 1992; Nascimento e Santos, 2020), cuja transmissão ocorre por aproximadamente 30 espécies de insetos do gênero *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Desjeux, 1992; Steck, 1974). Além do ser humano, animais domésticos e silvestres também podem ser

infectados, tornando-se reservatórios da doença, o que destaca sua importância veterinária (Desjeux, 1992).

As diversas manifestações clínicas das leishmanioses podem variar de acordo com a interação entre a espécie infectante e o sistema imune do organismo infectado (Pace, 2014; Reithinger et al., 2007), podendo ficar restritas ao local da picada ou induzir metástase via sistema linfóide do hospedeiro (Steck, 1974). Os tipos de leishmanioses são diferenciados pelas suas características clínicas e epidemiológicas, onde podemos destacar cinco grupos principais:

- Leishmaniose cutânea (LC): caracterizada por lesões pontuais na pele onde ocorreu a picada. Elas podem variar no grau de severidade e duração, e em muitos casos a cura pode ocorrer sem a necessidade de tratamento (Fig. 4A) (Chappuis et al., 2007; Desjeux, 1992; Galvis-Ovallos et al., 2020).

- Leishmaniose cutânea difusa (LCD): manifesta-se através de lesões espalhadas pela pele cuja severidade depende da condição imunológica do paciente (Fig. 4B) (Carregal et al., 2019).

- Leishmaniose mucocutânea (LMC): caracteriza-se pelas lesões nas mucosas do nariz, boca, faringe e laringe, o que pode levar a destruição do septo nasal, e outras estruturas da nasofaringe (Fig. 4C) (Chappuis et al., 2007; Desjeux, 1992; Pace, 2014).

- Leishmaniose visceral (LV): também conhecida como leishmaniose calazar, é a manifestação mais severa da doença e foi descrita pela primeira vez na Índia. Entre os sintomas dessa doença podemos destacar a febre prolongada, hepatomegalia e esplenomegalia (aumento do fígado e do baço, respectivamente), pancitopenia, anemia, perda de peso e quando não tratada pode levar a morte (Fig. 4D) (Chappuis et al., 2007; Desjeux, 1992; Galvis-Ovallos et al., 2020; Nascimento e Santos, 2020).

- Leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC): considerada uma complicação da leishmaniose visceral, ela pode se manifestar meses ou até anos após o término do tratamento da LV, sendo caracterizada por erupções cutânea, pápulas ou nódulos na pele. Esse tipo de manifestação é mais comumente observado em regiões da África e Ásia (Fig. 4E) (OP, 2020; Pace, 2014).

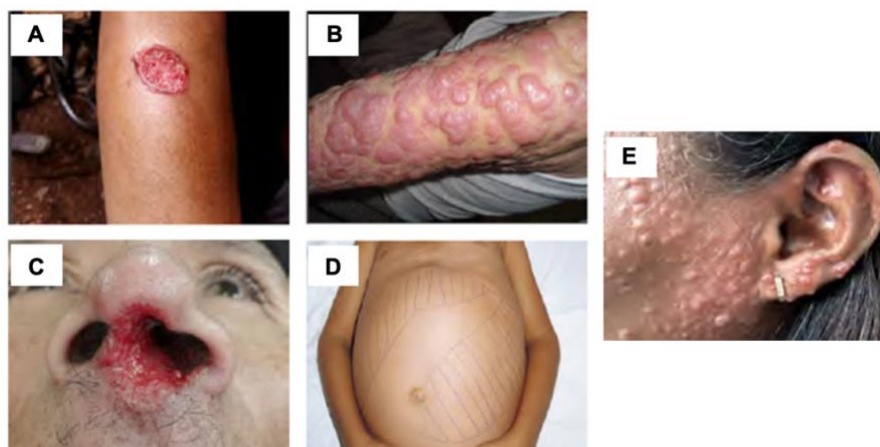


Figura 8. Manifestações clínicas da leishmaniose. a) Leishmaniose cutânea; b) Leishmaniose cutânea difusa; c) Leishmaniose mucocutânea; d) Leishmaniose calazar, e) Leishmaniose dérmica pós-calazar. Fonte: Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales.

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAs), 90% dos casos de leishmaniose visceral estão concentrados no Brasil, Índia, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Quênia; e 75% dos novos casos de leishmanioses cutâneas no mundo ocorrem em cinco países: Afeganistão, Brasil, Iran, Iraque e Síria. Já as leishmanioses mucocutâneas ocorrem majoritariamente na América, se destacando Brasil, Bolívia e Peru (Reithinger et al., 2007). Aproximadamente 30 mil novos casos de leishmaniose visceral e um milhão de casos de leishmaniose cutânea são registrados anualmente e entre 20.000 a 30.000 mortes ocorrem por ano (OPAs, 2020).

Os tratamentos disponíveis para leishmanioses baseiam-se principalmente no uso de antimoniais pentavalentes (Carregal et al., 2019; Nascimento e Santos, 2020), embora apresentem alta toxicidade causando efeitos colaterais indesejados, e além de desenvolver resistência do parasito ao fármaco, eles vêm sendo utilizados há mais de 60 anos como tratamentos de primeira linha (Reis-Cunha et al., 2016). Outros medicamentos alternativos para tratar as leishmanioses incluem a anfotericina B e a miltefosina, sendo o primeiro um medicamento de alto custo o que o torna inviável em muitos países, e o segundo possui ação teratogênica, o que restringe seu uso (Nascimento e Santos, 2020; Reis-Cunha et al., 2016). Como não há protocolos eficazes de tratamento e profilaxia disponíveis, torna-se crucial encontrar novos alvos terapêuticos para combater a doença (Carregal et al., 2019).

1.4 Telômeros e telomerase

1.4.1 Telômeros

Telômeros, do grego “telos” que significa fim e “meros” parte, são estruturas nucleoproteicas presentes nas extremidades de cromossomos lineares (Xu, 2011), formadas por sequências curtas de DNA não codificante repetidas em *tandem*, as quais possuem uma alta conservação entre os eucariotos (Blackburn, 1991; Griffiths et al., 2016). Sequências do tipo 5' TTAGGG 3' compõem os telômeros de vertebrados e protozoários tripanosomatídeos, incluindo *Leishmania* (Cano, 2001). Os telômeros caracterizam-se pela presença de uma fita rica em G, que se estende além da sua fita complementar rica em C, formando assim uma protusão conhecida como 3' G – *overhang* (Blackburn et al., 2015).

Nos terminais cromossômicos há sítios específicos de interação com proteínas teloméricas, tanto no DNA simples-fita como no dupla-fita, formando uma estrutura nucleoproteica dinâmica (Dmitriev et al., 2003). Essas proteínas, que podem interagir diretamente com o DNA ou se associarem a outras proteínas teloméricas, aparentemente influenciam no tamanho, estabilidade e proteção dos telômeros (Dmitriev et al., 2003; Fernandes et al., 2020). Em humanos, essas proteínas formam o complexo *shelterin*, composto por: TRF1 e TRF2, *Protection of telomeres 1* (POT1), TRF1-e TRF2-*Interacting Nuclear protein 2* (TIN2), *Repressor / Activator Protein 1* (RAP1) e TIN2 e POT1 *interacting Protein 1* (TPP1). Já em *Leishmania amazonensis*, tripanosomatídeo com complexo telomérico melhor caracterizado, podemos destacar algumas proteínas que interagem com a telomerase e com a fita simples de DNA rica em G: proteína de ligação de RNA 38 (LaRBP38), as proteínas de replicação A1 (LaRPA-1) e “calmodulin-like protein” (LCaLA) (Lira et al., 2007; Morea et al., 2017; Neto et al., 2007) e as proteínas que se associam com a dupla fita de DNA telomérico: proteína de ligação de telômeros 1 (LaTBP1) (Lira et al., 2007) e a proteína fator de ligação a repetição telomérica (LaTRF) (da Silva et al., 2010) (Fig. 5).

Além das proteínas do complexo telomérico, RNAs longos não codificantes conhecidos como TERRA (*Telomere Repeat containing RNA*) (Fig.5) foram caracterizados em diversos organismos modelos como humanos, camundongos e leveduras de brotamento (*S. cerevisiae*) (Azzalin et al., 2007; Schoeftner & Blasco, 2008; Luke et al., 2008). A transcrição desses RNAs se inicia nas regiões subteloméricas e continua até as extremidades dos cromossomos, resultando em variabilidade na porção 5' da molécula e conservação na região 3', composta por repetições teloméricas (Rivosecchi et al., 2024). Entre as funções atribuídas aos TERRAs, podemos destacar sua importância na regulação telomérica e estabilidade auxiliando na regulação da estrutura da cromatina telomérica, na replicação do DNA nos telômeros, no

processamento das extremidades cromossômicas e na atividade da telomerase (Rivosecchi et al., 2024). Ademais, os TERRAs podem formar híbridos de DNA:RNA denominados R-loops e assumir a estrutura de RNA G4 (rG4), os quais facilitam interações com proteínas associadas ao TERRA. Já os R-loops também podem facilitar a recombinação homóloga nos telômeros, contribuindo para a estabilidade telomérica por meio de mecanismos alternativos de alongamento telomérico (ALT) (Rivosecchi et al., 2024). Transcritos TERRA também foram caracterizados em *T. brucei* e *Leishmania* spp. e em ambos os casos eles parecem também estar envolvidos com a manutenção dos telômeros (Damasceno et al., 2017; Morea et al., 2021).

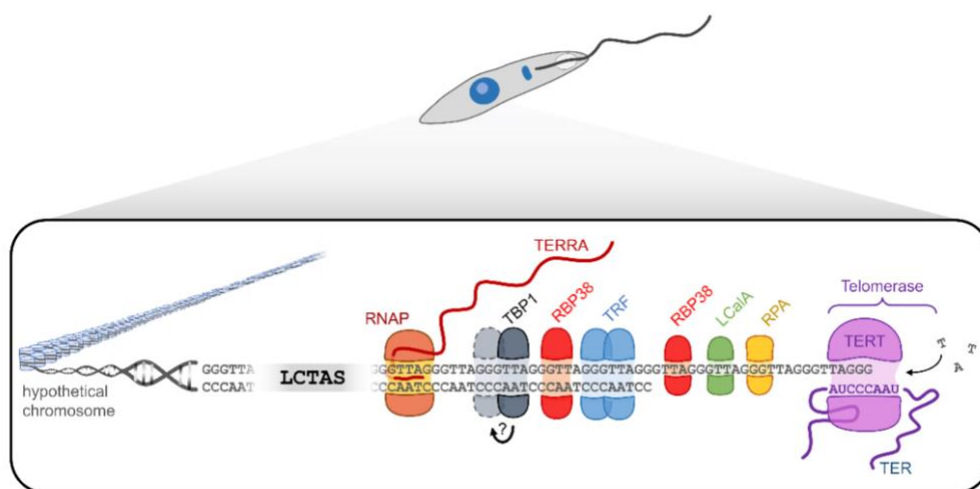


Figura 5. Representação dos telômeros de *Leishmania* spp. Os telômeros de *Leishmania* são formados por regiões subteloméricas (LCTAS), DNA dupla fita e simples fita, formando o último uma protusão conhecida como 3' G overhang e proteínas associadas (TBP1, RBP38, TRF, LCalA, RPA). RNAs longos não codificantes TERRA são transcritos a partir dos telômeros e estão envolvidos com a regulação do tamanho dos telômeros, os quais podem ser alongados através da ação da enzima telomerase, composta principalmente pelo componente TERT e TER. Imagem extraída de Assis et al. (2021).

O complexo telomérico possui funções fundamentais na estabilidade do genoma, prevenindo que as extremidades cromossômicas sejam reconhecidas como quebra de DNA em dupla fita, impedindo assim, que ocorra degradação do material genético, recombinação e fusão dos terminais cromossômicos. Danos na estrutura telomérica ou a depleção de proteínas que compõe esta maquinaria, podem levar a célula ao estado de senescência ou apoptose (Blackburn et al., 2015; Eisenberg, 2011). Fenômeno semelhante é observado normalmente em células somáticas humanas que apresentam perda gradual dos telômeros após sucessivas duplicações (Barbé-Tuana et al., 2021; Giardini et al., 2014).

Estas perdas ocorrem devido a uma inabilidade da DNA polimerase em completar a síntese de moléculas lineares (Ohki e Ishikawa, 2004). Este fenômeno é conhecido como “end

replication problem”, em português “problema do final da replicação” (Fig. 6) (Chan e Blackburn, 2004; Eisenberg, 2011; Olovnikov, 1973; Watson, 1972), na qual a DNA polimerase, que apresenta síntese de modo direcional ($5' - 3'$), não consegue realizar uma síntese regular na fita descontínua do DNA, a qual é orientada no sentido $3' - 5'$. Dessa forma, faz-se necessário a síntese repetida de iniciadores RNA na região 5' do local de iniciação, de modo que a DNA polimerase consiga sintetizar novas sequências (fragmentos de Okazaki), de forma descontínua (Griffiths et al., 2016; Martínez e Blasco, 2015). Neste caso, o último iniciador envolvido na replicação da fita descontínua, próximo da extremidade 3', ao ser removido, não é repostado pela DNA polimerase deixando um intervalo na fita complementar (Griffiths et al., 2016; Martínez e Blasco, 2015). Isto gera uma protrusão simples fita na extremidade telomérica conhecida como 3' *G-overhang* (fita rica em G) (Martínez e Blasco, 2015). Também é sabido que mesmo as fitas de síntese contínua, ao final da replicação são processadas por nucleases, como Apollo and Exo I, as quais promovem a ressecção do terminal da fita contínua (fita telomérica rica em C) de forma a gerar um terminal 3' *G-overhang* também nessa fita (Fig. 6) (Martínez e Blasco, 2015; Wu et al., 2012). Desta maneira, o encurtamento dos telômeros pode ocorrer nos terminais 3' das duas fitas do DNA. Assim, quando as células com telômeros curtos atingem o número máximo de divisões celulares, conhecido como “limite de Hayflick”, elas entram no estado de senescência replicativa (Chan e Blackburn, 2004; Eisenberg, 2011; Olovnikov, 1973; Watson, 1972). Além da divisão celular, outros fatores endógenos e exógenos podem influenciar o encurtamento dos telômeros tais como estresse oxidativo causado por processos metabólicos, ação de nucleases e agentes físicos ou químicos (Blackburn et al., 2015; Eisenberg, 2011). Por outro lado, sabe-se que eucariotos unicelulares, células germinativas, células tronco embrionárias e células somáticas altamente proliferativas conseguem manter o tamanho dos telômeros por ação de uma enzima especializada em adicionar repetições teloméricas nas extremidades 3' *G overhang*, conhecida como telomerase (Autexier e Lue, 2006).

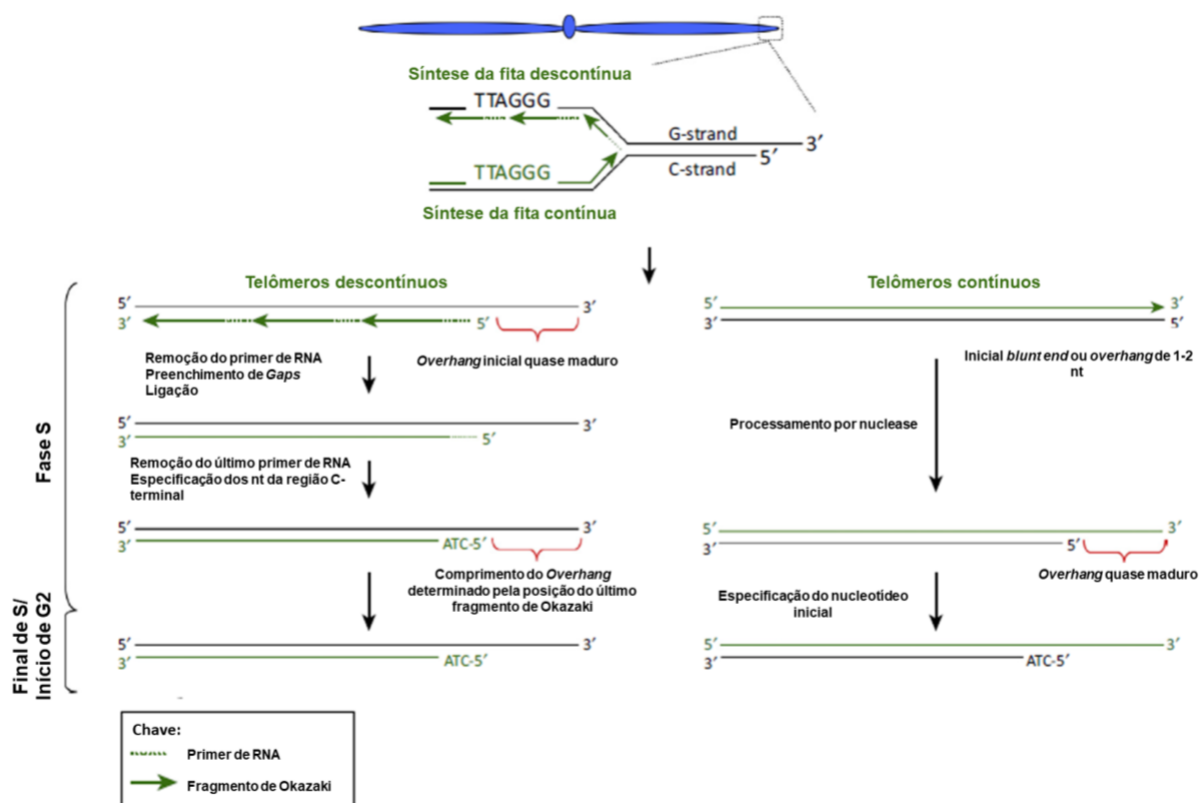


Figura 6. Replicação semiconservativa do DNA telomérico e seu processamento. A replicação semiconservativa do DNA telomérico ocorre por meio da maquinaria de replicação convencional, onde a fita contínua e a fita descontínua são sintetizadas pela DNA polimerase de modo unidirecional (5' – 3'). O início da síntese depende de um primer de RNA (linhas pontilhadas verde), o qual confere um grupo -OH livre na extremidade 3' para que a DNA polimerase possa começar a síntese da nova fita. Devido ao sentido da fita descontínua (3' – 5'), é necessário a síntese de vários primers de RNA durante sua replicação, que servem como iniciadores para a síntese dos fragmentos de Okazaki. Esses primers são degradados e repostos por DNA, exceto o último primer, que não pode ser substituído. O primer final de RNA na fita descontínua não é terminal, mas posicionado aleatoriamente 70-100 nucleotídeos (nt) das extremidades e, portanto, as protusões da fita G já exibem um tamanho quase maduro imediatamente após a replicação, onde fica evidente a especificidade da sequência na extremidade 5' da fita C (ATC 5'). Já a síntese da fita contínua resulta em extremidades cegas (*blunt ends*) ou apresentam uma saliência de 1 ou 2-nt consistentes com o conceito de que a máquina de replicação se esgota e se dissocia dos terminais cromossômicos. A fita gerada durante a síntese contínua é processada por nucleases 1–2 h após a replicação do telômero, para gerar uma protrusão 3' G-overhang e as fitas ricas em C adquirem a especificação ATC 5' no final da fase S / G2. Imagem extraída e traduzida de Martínez e Blasco (2015).

1.4.2 Telomerase

A possibilidade de uma célula resolver o problema do encurtamento dos telômeros através da adição de repetições teloméricas na extremidade 3' rica em G dos cromossomos foi descoberta em 1978 por Elizabeth Blackburn e Joseph Gall, ao estudarem o ciliado unicelular *Tetrahymena thermophila*. Depois foi confirmada em 1985 por Blackburn & Grieder, quando descobriram que esse processo era realizado por uma enzima, nomeada primeiramente de *telomere terminal transferase*, e posteriormente de telomerase.

A telomerase é um complexo ribonucleoproteico (RNP) com função de transcriptase reversa, possuindo um núcleo catalítico composto por uma subunidade proteica conhecida como transcriptase reversa da telomerase (TERT), que possui a função de adicionar as repetições teloméricas na extremidade 3' *G-overhang*, e a subunidade RNA da telomerase (TER), um RNA longo não codificante, que contém o molde utilizado pela TERT para realizar a síntese de novas repetições teloméricas além de auxiliar na processividade da enzima (Fig. 7). Embora esses dois componentes sejam suficientes para a replicação telomérica *in vitro* (Collins, 1999), *in vivo*, a telomerase contém proteínas acessórias espécie-específicas que auxiliam na biogênese e na regulação da atividade da enzima (Lue, 2004; Webb and Zakian, 2016). Como exemplos podemos citar as subunidades da telomerase de leveduras, a Est1p e Est3p, ambas importantes para o funcionamento da enzima *in vivo* (Giardini et al., 2014). Est1p interage com Cdc13 (proteína ligante do terminal 3' *G-overhang*) recrutando a telomerase para alongar os terminais dos cromossomos (Giardini et al., 2014; Yang et al., 2006). Em humanos, a proteína EST1A, ortóloga à Est1p, está relacionada tanto com a proteção das extremidades cromossômicas como pela elongação telomérica (Giardini et al., 2014). Outros exemplos de proteínas acessórias do complexo telomerase estão descritas na seção 1.4.2.2.1.

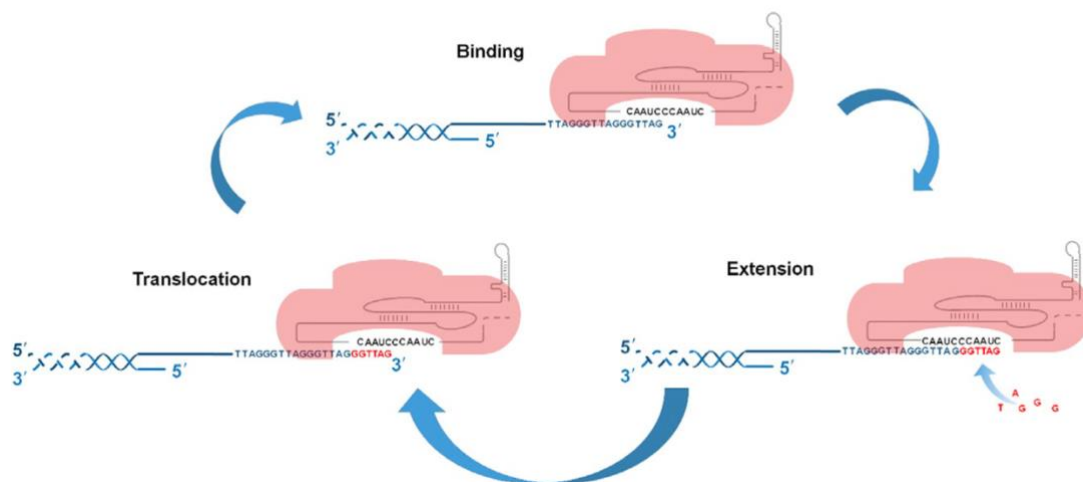


Figura 7. Ação da telomerase nos telômeros. Na etapa de ligação (*binding*), a TERT interage com a repetição telomérica e permite que o componente TER se acople a protusão 3'G. Em seguida, a TERT sintetiza uma cópia de repetição telomérica na extremidade 3'OH do DNA telomérico utilizando o molde contido no TER (*extension* - extensão). Ao término da adição de uma repetição, a TERT se desloca e se reposiciona em relação a repetição telomérica (*translocation* - translocação) para dar início a um novo ciclo de amplificação. Imagem extraída de Giardini et al., 2014).

Além da telomerase, há outros métodos alternativos para alongar telômeros (ALT, *Alternative Lengthening of Telomeres*), os quais utilizam a maquinaria de recombinação homóloga, de forma que uma fita de DNA homólogo é utilizada como molde para o alongamento de outra fita (Autexier e Lue, 2006; Podlevsky e Chen, 2016; Xu, 2011).

1.4.2.1 O componente Transcriptase Reversa da Telomerase (TERT)

O componente TERT é uma DNA polimerase dependente de RNA, com função de transcriptase reversa, a qual utiliza o grupo 3'-OH presente no 3' G-*Overhang* como iniciador da síntese de novas sequências teloméricas (Autexier e Lue, 2006). A TERT é altamente conservada entre os diferentes grupos de organismos, e apresenta quatro domínios estruturais e funcionais e 11 motivos canônicos, onde alguns são únicos das TERTs e outros conservados entre as transcriptases reversas (Fig. 8) (Autexier e Lue, 2006; Zhang et al., 2011). Entre os domínios exclusivos das TERT pode-se citar os domínios funcionais N-Terminal (TEN - *Telomerase Essential N-terminal*) e o domínio de ligação ao RNA da telomerase (TRBD - *Telomerase RNA Binding Domain*), ambos encontrados na região amino-terminal da TERT (Autexier e Lue, 2006), que além de serem exclusivos das telomerases, também são essenciais na interação com ácidos nucleicos (DNA telomérico e o TER) e com proteínas do complexo telomerase (Jacobs et al., 2006).

O domínio transcriptase reversa (RT - *Reverse Transcriptase*), está presente na região mais próxima ao carboxi-terminal, e é similar as transcriptases reversas clássicas em relação a estrutura, estando associado com a catálise enzimática. O domínio RT apresenta alta conservação estrutural contendo todos os motivos específicos das RTs (1, 2 e A-E), compreendidos dentro dos sub-domínios conhecidos como “dedos” (*fingers*) e “palma da mão” (*palm*), no qual o primeiro é responsável pela interação com ácido nucleico e o segundo contém o sítio catalítico da enzima (Hukezalie e Wong, 2013). O domínio CTE (*C-Terminal Extention*) representa o “polegar” (*thumb*) e apesar de ser importante na atividade enzimática, é uma região menos conservada entre os organismos de diferentes espécies, o que sugere que ele possui função espécie-específica (Barbé-Tuana et al., 2021; Hukezalie e Wong, 2013).

A TERT de tripanosomatídeos, apresenta alta similaridade de sequência entre as espécies de *Leishmania* (em torno de 85 a 95%), e quando comparado ao componente TERT de outros organismos pode-se notar que ela apresenta características estruturais conservadas e substituições em resíduos de aminoácidos específicos ao gênero (Giardini et al., 2006). Assim como as TERTs de outros organismos, a de *Leishmania* é capaz de adicionar repetições teloméricas, nesse caso TTAGGG, na extremidade 3' da fita telomérica rica em G (Cano et al., 1999; Giardini et al., 2006; Giardini et al., 2011).



Figura 8. Estrutura primária do componente TERT. Na região amino-terminal estão representados os domínios TEN e TRBD, essenciais na interação da TERT com ácidos nucleicos (DNA e RNA). Na fração carboxi-terminal estão representados os domínios RT e CTE, sendo ambos importantes na atividade enzimática da telomerase. Os motivos conservados presentes em cada domínio (GQ, CP, QFP, T, 1, 2, A, B', C, D E) estão mostrados. Imagem adaptada de Giardini et al. (2014).

1.4.2.2 O componente RNA da telomerase (TER)

1.4.2.2.1 TER em organismos modelos

TER é um RNA longo não codificante que possui a sequência reversa complementar da repetição telomérica utilizada como molde pela TERT durante a síntese de DNA telomérico (Gilson e Géli, 2007). Além de ser importante na montagem do complexo ribonucleoproteico da telomerase, ele também auxilia na processividade da enzima (Sandhu et al., 2013; Zappulla e Cech, 2006). Portanto, mutações no TER podem prejudicar a interação TER-TERT levando ao encurtamento dos telômeros (Lin et al., 2004; Lue, 2004).

Embora os principais elementos da estrutura secundária do TER sejam conservados entre diversas espécies, o tamanho e a composição da sequência variam (Theimer e Feigon, 2006). A sequência primária pode variar de 150 nt em protozoários ciliados, a 450 nt em humanos, 1300 nt em leveduras de brotamento e ≥ 2100 -2200 nt em *Leishmania* e *Plasmodium* (Blackburn e Collins, 2011; Chen e Greider, 2004; Vasconcelos et al., 2014).

Entre os elementos estruturais conservados pode-se citar o motivo TBE (*Template Boundary Element*) (Fig. 9), presente na porção 5' da molécula (Giardini et al., 2014) que fornece um local com alta afinidade de ligação com o domínio TRBD da TERT (Blackburn e Collins, 2011; Collins, 1999). O TBE também impede que a transcrição reversa pela TERT ocorra além do molde, também presente na porção 5' da molécula, próximo ao motivo TBE (Webb e Zakian, 2016). A região do molde (Fig. 9), na maioria dos organismos, é constituído por uma cópia e meia da sequência reversa da repetição telomérica, complementar a sequência do 3' *G-overhang* usado como substrato pela TERT para a adição de nucleotídeos nos telômeros (Lai et al., 2012). A interação TERT-TER expõe o molde contido no TER, facilitando o pareamento dele com a fita simples rica em G do DNA telomérico (3' *G-overhang*) (Webb e Zakian, 2016). Mutações ou deleções na sequência molde podem afetar a ação da telomerase causando encurtamento dos telômeros, conforme observado em *Saccharomyces cerevisiae* (Singer e Gottschling, 1994).

Outras regiões importantes para a interação TERT-TER são o *pseudoknot* e o STE (*Stem Terminus Element*) (Fig. 9). O *pseudoknot*, caracterizado como tripla hélice dentro do complexo RNP, forma o domínio central envolvido na interação com a TERT, juntamente com o motivo TBE e o molde, estando envolvidos, na montagem do complexo telomerase e sua atividade (Webb e Zakian, 2016; Wu et al., 2017). O STE, também denominado de CR4/CR5 em humanos e TWJ (*three-way junction*) em *S. cerevisiae*, também está relacionado com a interação TERT-TER (Webb e Zakian, 2016).

Ademais, dependendo do organismo, o TER pode se ligar a outras proteínas acessórias importantes para o funcionamento da telomerase *in vivo*, como é o caso da interação do TER (TLC1) com subunidades do heterodímero KU em *Saccharomyces cerevisiae*, que promove a síntese *de novo* de repetições teloméricas nos terminais cromossômicos (Giardini et al., 2014). Em *Tetrahymena thermophila*, a proteína p65, membro da *LARP7 family*, se liga no *stem IV* do componente TER (Fig. 9) auxiliando na sua biogênese, tornando-se fundamental para a montagem do complexo telomerase *in vivo* (Jiang et al., 2013).

Já em seres humanos, o componente TER possui um domínio adicional, o domínio H/ACA box, presente na porção 3' do TER (Fig. 9), o qual contém o motivo CAB que interage com as proteínas acessórias DKC1, GAR1, NOP10 e NHP2 (Barbé-Tuana et al., 2021; Giardini et al., 2014), que auxiliam na montagem do complexo *in vivo*, o qual é então recrutado para os telômeros pela proteína TPP1 (*POT1 interacting protein 1*), integrante do complexo *shelterin*, sendo transportado pela proteína TCAB1 (*Telomere Cajal Body protein 1*) até os telômeros (Barbé-Tuana et al., 2021). Vale ressaltar que o domínio H/ACA box além de estar relacionado com a interação de proteínas acessórias, ele também é importante para a biogênese e estabilidade do TER, além de auxiliar na atividade da telomerase (Barbé-Tuana et al., 2021).

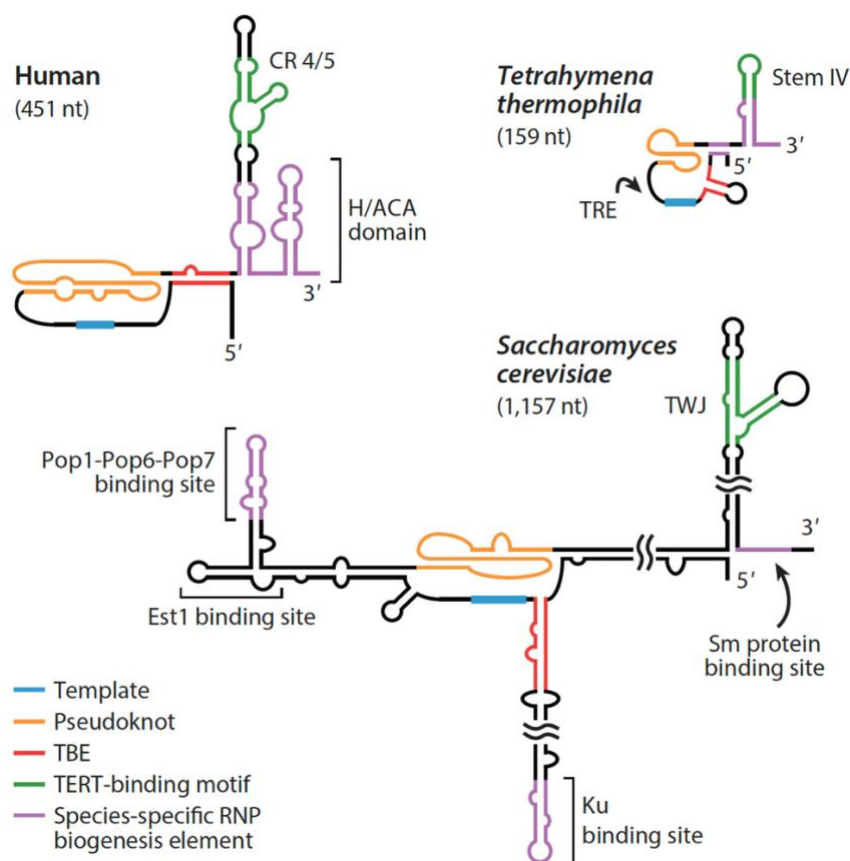


Figura 9. Esquema da estrutura secundária do TER de humanos, *S. cerevisiae* e *T. thermophila*. Os TERs compartilham estruturas funcionais conservadas como o molde (azul), pseudoknot (laranja), motivo TBE (vermelho) e domínio de ligação à TERT (correspondente a CR 4/5 em *H. sapiens*, Stem IV em *T. thermophila*, e TWJ em *S. cerevisiae*) (verde). Em roxo, pode-se observar os sítios de ligação do TER às proteínas envolvidas na biogênese da telomerase. Imagem extraída de Wu, et al. (2017).

1.4.2.2.2 TER de protozoários

Em *Tetrahymena* o componente TER (159 nt) é transcrito pela RNA polimerase III e possui dois domínios principais: molde/pseudoknot e *stem loop* 4 (atuando como STE de ciliados) (Cash e Feigon, 2017; Greider e Blackburn, 1989). A sequência do molde é caracterizada como 5' CAACCCCAA 3' (Greider e Blackburn, 1989). Além disso, os ciliados também possuem o *Template recognition element* (TRE), o qual está localizado na porção 3' do molde, e é utilizado pela TERT para direcionar corretamente a transcrição reversa (Fig. 9) (Cash e Feigon, 2017).

Já no protozoário flagelado *T. brucei*, TER possui ~900 nt (Fig. 9), é processado por *trans-splicing* e poliadenilado. *TbTER* interage com proteínas centrais do BOX C/D snoRNA e se associa à *methyltransferase-associated protein* (MTAP) (Gupta et al., 2013). O silenciamento ou mesmo nocaute de *TbTER*, levam ao encurtamento progressivo dos telômeros indicando que o TER é fundamental para o funcionamento da telomerase e consequentemente na manutenção dos telômeros em *T. brucei* (Gupta et al., 2013; Sandhu et al., 2013).

Em *Leishmania major* o componente TER caracterizado pelo nosso grupo de pesquisa (Fig. 10) (Vasconcelos et al., 2014), é codificado por um gene de cópia única, localizado no cromossomo 25. O gene também é transcrito pela RNA polimerase II o que difere dos TERs de ciliados, os quais são transcritos pela RNA polimerase III, como descrito acima (Greider e Blackburn, 1989). Em *Leishmania*, o transcrito gerado tem aproximadamente ~2100 nt, o qual é processado por *trans-splicing*, o que confere a molécula madura um 5' *spliced leader* (SL) *cap*, e uma cauda 3' poli-A comum a maioria dos TER de eucariotos (Barbé-Tuana et al., 2021; Vasconcelos et al., 2014). Segundo análises realizadas por Vasconcelos et al. (2014), a sequência do molde em *LeishTER* é 5' ACCUAACCCUA 3' localizada próximo ao motivo TBE que é altamente conservado entre os eucariotos (Podlevsky e Chen, 2016; Sandhu et al., 2013). Além desses elementos, *LeishTER* também apresenta um BOX C/D snoRNA compartilhado com o TER de outros organismos que indica que a biogênese desse RNA pode ser conservada (Gupta et al., 2013; Vasconcelos et al., 2014). Ademais, em *Leishmania major*, evidenciou-se que *LeishTER* imunoprecipita com a TERT, co-localizando-se tanto com a TERT quanto com os telômeros no núcleo do parasito. (Vasconcelos et al., 2014).

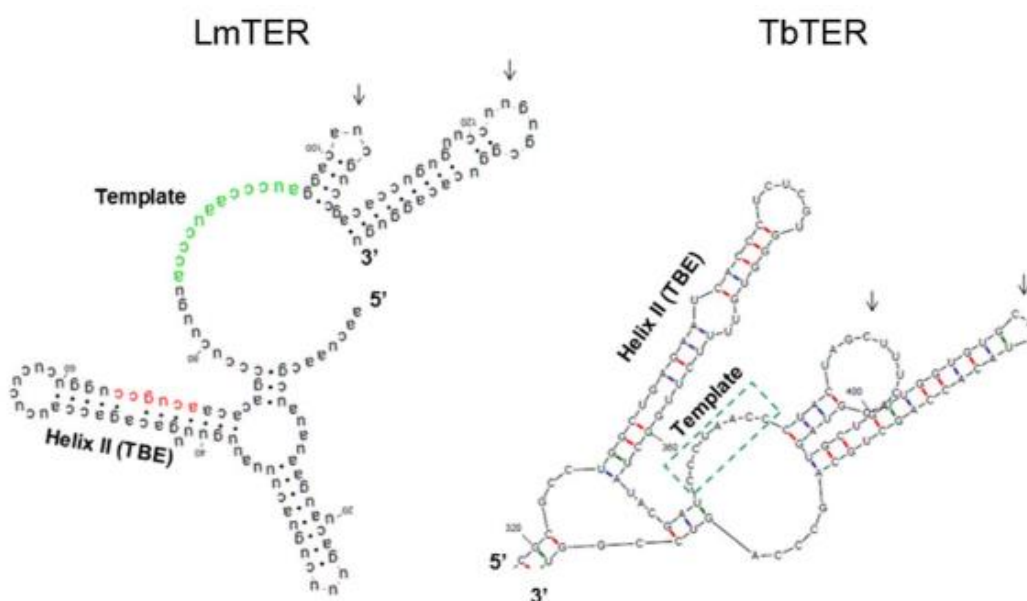


Figura 10. Modelo da estrutura predita para o TER de *L. major* (*LeishTER*) e TER de *T. brucei* (*TbTER*). Presença da Helix II (TBE) e a sequência do molde (*template*) utilizado pela TERT. As setas indicam as semelhanças entre as estruturas em forma de gancho imediatamente a jusante do modelo em ambos os TERs. Imagem extraída de Vasconcelos et al. (2014).

1.4.2.2.3 Comprometimento da ação do componente RNA da telomerase causa o encurtamento progressivo dos telômeros

Para compreender melhor o funcionamento da telomerase vários estudos foram realizados. Dentre esses estudos, podemos ressaltar aqueles envolvendo o componente RNA da telomerase, como forma de melhor caracterizar sua importância no complexo RNP. Estudos com organismos modelos (*Saccharomyces cerevisiae*, células imortalizadas HeLa e camundongos) e organismos mais próximos evolutivamente de *Leishmania* spp. (*Trypanosoma brucei*) mostraram que a remoção, superexpressão ou o comprometimento da ação do TER causa o encurtamento progressivo dos telômeros. Estes estudos evidenciam que apesar da divergência em sequência e tamanho, TER possui função conservada entre os eucariotos, no que diz respeito à sua importância na formação do complexo telomerase e manutenção dos telômeros (Blasco, 2001; Feng et al., 1995; Sandhu et al., 2013; Singer e Gottschling, 1994).

Além disso, sabe-se que muitas telomeropatias humanas podem estar associadas com mutações no TER, tais como: a) disceratose congênita autossômica dominante que causa leucoplasia em mucosas, pigmentação reticulada da pele e distrofia ungueal; b) anemia aplástica, caracterizada pela supressão da produção de células sanguíneas devido a destruição de células tronco hematopoética e c) fibrose pulmonar idiopática, que causa rigidez dos tecidos pulmonares podendo levar à morte (Armanios e Blackburn, 2012; Barbé-Tuana et al., 2021).

1.5 Caracterização da estrutura secundária de *Leish*TER através de SHAPE-MaP

Uma abordagem para investigar a estrutura secundária de uma molécula de RNA é a técnica denominada SHAPE-MaP (Acilação Seletiva de 2'-Hidroxila analisada por Extensão de Primer e Perfil Mutacional). Essa metodologia fornece esclarecimentos sobre a flexibilidade e reatividade de nucleotídeos individuais na cadeia de RNA, pois as sondas químicas utilizadas reagem com o RNA, induzindo modificações mapeáveis na molécula (STROBEL et al., 2018). Dentre as sondas químicas disponíveis, destaca-se o 2-metilnicotínico imidazolid (NAI), que atua de forma generalista, modificando a espinha dorsal do RNA por meio da acilação do grupo 2'-hidroxila da ribose de nucleotídeos flexíveis (STROBEL et al., 2018).

Considerando que a maior parte dos dados sobre a estrutura de *Leish*TER foi obtida predominantemente por meio de previsões de modelagem estrutural *in silico*, torna-se imperativo buscar alternativas para esclarecer as estruturas do domínio central de *Leish*TER e, posteriormente, compará-las com os resultados previamente obtidos. Essas informações não apenas aprimoram nossa compreensão da estrutura molecular, mas também têm o potencial de contribuir para o estudo do complexo telomerase, identificando regiões de interação com outras proteínas do complexo além da TERT.

1.6 Justificativa para a investigação do RNA da Telomerase em *Leishmania*

Apesar da significativa relevância da leishmaniose em âmbito global, ela continua sendo uma doença tropical negligenciada, carecendo de profilaxia e tratamentos eficazes, conforme ressaltado anteriormente (Carregal et al., 2019). Diante desse cenário, torna-se imperativo aprofundar a compreensão da biologia molecular do parasito, visando identificar novos alvos terapêuticos.

A investigação do RNA da telomerase de *Leishmania* é essencial para desvendar os mecanismos moleculares pelos quais o parasito assegura a integridade dos telômeros, sendo esta capacidade importante para a estabilidade genômica. Uma característica do RNA da telomerase é que apesar de possuir uma função conservada, sua sequência e tamanho variam entre as espécies (Theimer e Feigon, 2006), sendo este componente considerado espécie-específico, o que o torna um interessante alvo terapêutico. Desta forma, ao compreender melhor sua função e estrutura, podemos obter percepções valiosas para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas contra a leishmaniose.

Em suma, o conhecimento adquirido sobre o RNA da telomerase de *Leishmania* auxiliará na compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na sua biogênese e do complexo ribonucleoproteico da telomerase e no enriquecimento do conhecimento sobre a importância dos telômeros na sobrevivência do parasito.

4 Conclusões

- A ausência de *LeishTER* causou encurtamento dos telômeros e comprometeu a proliferação dos parasitos, levando os mesmos a um estado semelhante a senescência replicativa, o que sublinha a importância de *LeishTER* na sobrevivência do parasito. Aqui ressaltam-se que a ausência de *LeishTER* induziu alterações morfológicas e ativação de processos autofágicos, indicando adaptações celulares para manter a homeostase, sem evidências de apoptose. Embora a capacidade de transformação na forma infectiva metacíclica tenha sido preservada, a infectividade dos parasitos mutantes foi reduzida, sugerindo uma associação entre telômeros mais curtos e menor infectividade. Essas descobertas respaldam a noção de que a ausência de *LeishTER* é de certa forma deletéria para *Leishmania*. Além disso, a superexpressão de *LeishTER* teve um efeito dominante negativo nos parasitos, gerando fenótipos semelhantes aos observados nas linhagens duplo nocaute para *LeishTER*. Esses resultados evidenciam a importância da telomerase na sobrevivência e infectividade desses parasitos, abrindo caminho para investigações adicionais sobre os mecanismos moleculares subjacentes e suas possíveis implicações como potenciais alvos no tratamento da leishmaniose.

- A técnica SHAPE-MaP usando NAI mostrou-se uma abordagem bem-sucedida para investigar a estrutura secundária de *LeishTER*. Os resultados preliminares confirmaram a presença de estruturas previamente preditas *in silico*, incluindo a Hélice II (TBE) e o molde, e mostram conservação da estrutura secundária do *LeishTER* com a de *TbTR*. Atualmente novos experimentos estão sendo conduzidos e esperamos desvendar em breve a estrutura secundária completa de *LeishTER*.

- Estudos preliminares realizados nesse trabalho demonstraram que tanto o gene *TER* quanto o gene *TERT* não são essenciais para a sobrevivência do parasito, possibilitando a obtenção de linhagens nocautes para ambos os alelos de cada gene sem causar sua morte imediata. No entanto, é crucial investigar a longevidade desses parasitos em cultura e as suas possíveis implicações biológicas, comparando esses resultados com linhagens que têm apenas um dos genes ausentes.

- Em síntese, os resultados obtidos ressaltam a importância do RNA da telomerase na manutenção dos telômeros, no crescimento celular e na capacidade infectiva de *Leishmania major*. Esses achados ampliam a compreensão do papel da telomerase na biologia do parasito e abrem caminhos para investigações futuras sobre a longevidade desses parasitos, bem como a presença ou ausência de mecanismos alternativos de alongamento telomérico por meio de recombinação homóloga.

5 Referências

AKHOUNDI, M., KUHLS, K., CANNET, A., VOTÝPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P., & SERENO, D. (2016). A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLoS neglected tropical diseases*, 10(3), e0004349. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004349>

ARMANIOS, M., & BLACKBURN, E. H. (2012). The telomere syndromes. *Nature reviews. Genetics*, 13(10), 693–704. <https://doi.org/10.1038/nrg3246>

ASSIS, L. H. C., ANDRADE-SILVA, D., SHIBURAH, M. E., DE OLIVEIRA, B. C. D., PAIVA, S. C., ABUCHERY, B. E., FERRI, Y. G., FONTES, V. S., DE OLIVEIRA, L. S., DA SILVA, M. S., & CANO, M. I. N. (2021). Cell Cycle, Telomeres, and Telomerase in *Leishmania* spp.: What Do We Know So Far?. *Cells*, 10(11), 3195. <https://doi.org/10.3390/cells10113195>

AUTEXIER, C., & LUE, N. F. (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annual review of biochemistry*, 75, 493–517. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142412>

AZZALIN, C. M., REICHENBACH, P., KHORIAULI, L., GIULOTTO, E., & LINGNER, J. (2007). Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* (New York, N.Y.), 318(5851), 798–801. <https://doi.org/10.1126/science.1147182>

BARBÉ-TUANA, F., GRUN, L. K., PIERDONÁ, V., DE OLIVEIRA, B. C. D., PAIVA, S. C., SHIBURAH, M. E., ... & CANO, M. I. N. (2021). Human Chromosome Telomeres. In *Human Genome Structure, Function and Clinical Considerations* (pp. 207-243). Cham: Springer International Publishing.

BATES P. A. (1994). Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. *Parasitology*, 108 (Pt1), 1–9. <https://doi.org/10.1017/s0031182000078458>

BLACKBURN E. H. (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*, 350(6319), 569–573. <https://doi.org/10.1038/350569a0>

BLACKBURN, E. H., & COLLINS, K. (2011). Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(5), a003558. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a003558>

BLACKBURN, E. H., EPEL, E. S., & LIN, J. (2015). Human telomere biology: A contributory and interactive factor in aging, disease risks, and protection. *Science (New York, N.Y.)*, 350(6265), 1193–1198. <https://doi.org/10.1126/science.aab3389>

BLASCO, M. A. (2001). *The telomerase knockout mouse. Advances in Cell Aging and Gerontology*, 151–165. doi:10.1016/s1566-3124(01)08008-7

CANO, M. I., DUNGAN, J. M., AGABIAN, N., & BLACKBURN, E. H. (1999). Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(7), 3616–3621. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3616>

CANO M. I. (2001). Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. *Trends in parasitology*, 17(9), 425–429. [https://doi.org/10.1016/s1471-4922\(01\)02014-1](https://doi.org/10.1016/s1471-4922(01)02014-1)

CARREGAL, V. M., LANZA, J. S., SOUZA, D. M., ISLAM, A., DEMICHELI, C., FUJIWARA, R. T., RIVAS, L., & FRÉZARD, F. (2019). Combination oral therapy against *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice using nanoassemblies made from amphiphilic antimony(V) complex incorporating miltefosine. *Parasitology research*, 118(10), 3077–3084. <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06419-2>

CASH, D. D., & FEIGON, J. (2017). Structure and folding of the Tetrahymena telomerase RNA pseudoknot. *Nucleic acids research*, 45(1), 482–495. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1153>

CHAN, S. R., & BLACKBURN, E. H. (2004). Telomeres and telomerase. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, 359(1441), 109–121. <https://doi.org/10.1098/rstb.2003.1370>

CHAPPUIS, F., SUNDAR, S., HAILU, A., GHALIB, H., RIJAL, S., PEELING, R. W., ALVAR, J., & BOELAERT, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature reviews. Microbiology*, 5(11), 873–882. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748>

CHEN, J. L., & GREIDER, C. W. (2004). An emerging consensus for telomerase RNA structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14683–14684. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406204101>

COLLINS K. (1999). Ciliate telomerase biochemistry. *Annual review of biochemistry*, 68, 187–218. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.187>

CUPOLILLO, E.; BOITÉ, M. C.; PORROZZI, R. (2014). Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: *Leishmanioses do continente americano*. Editora FIOCRUZ. p. 39–51.

da SILVA, M. S., PEREZ, A. M., DA SILVEIRA, R.DEC., DE MORAES, C. E., SIQUEIRA-NETO, J. L., FREITAS, L.DEH., JR, & CANO, M. I. (2010). The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC microbiology*, 10, 136. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-136>

DA SILVA, R., & SACKS, D. L. (1987). Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infection and immunity*, 55(11), 2802–2806. <https://doi.org/10.1128/iai.55.11.2802-2806.1987>

DAMASCENO, J. D., SILVA, G., TSCHUDI, C., & TOSI, L. R. (2017). Evidence for regulated expression of Telomeric Repeat-containing RNAs (TERRA) in parasitic trypanosomatids. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 112(8), 572–576. <https://doi.org/10.1590/0074-02760170054>

DESJEUX P. (1992). Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. *World health statistics quarterly. Rapport trimestriel de statistiques sanitaires mondiales*, 45(2-3), 267–275.

DMITRIEV, P. V., PETROV, A. V., & DONTSOVA, O. A. (2003). Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry. Biokhimiia*, 68(7), 718–734. <https://doi.org/10.1023/a:1025022630840>

EISENBERG D. T. (2011). An evolutionary review of human telomere biology: the thrifty telomere hypothesis and notes on potential adaptive paternal effects. *American journal of human biology : the official journal of the Human Biology Council*, 23(2), 149–167. <https://doi.org/10.1002/ajhb.21127>

FENG, J., FUNK, W. D., WANG, S. S., WEINRICH, S. L., AVILION, A. A., CHIU, C. P., ADAMS, R. R., CHANG, E., ALLSOPP, R. C., & YU, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science (New York, N.Y.)*, 269(5228), 1236–1241. <https://doi.org/10.1126/science.7544491>

FERNANDES, C. A. H., MOREA, E. G. O., DOS SANTOS, G. A., DA SILVA, V. L., VIEIRA, M. R., VIVIESCAS, M. A., CHATAIN, J., VADEL, A., SAINTOMÉ, C., FONTES, M. R. M., & CANO, M. I. N. (2020). A multi-approach analysis highlights the relevance of RPA-1 as a telomere end-binding protein (TEBP) in *Leishmania amazonensis*. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1864(7), 129607. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2020.129607>

GALVIS OVALLOS, F., SILVA, R. A., SILVA, V. G. D., SÁBIO, P. B., & GALATI, E. A. B. (2020). Leishmanioses no Brasil: aspectos epidemiológicos, desafios e perspectivas. *Atualidades em medicina tropical no Brasil: protozoários*. Stricto Sensus Editora, 2020. p. 227–255.

GIARDINI, M. A., LIRA, C. B., CONTE, F. F., CAMILLO, L. R., DE SIQUEIRA NETO, J. L., RAMOS, C. H., & CANO, M. I. (2006). The putative telomerase reverse transcriptase

component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitology research*, 98(5), 447–454. <https://doi.org/10.1007/s00436-005-0036-4>

GIARDINI, M. A., SEGATTO, M., DA SILVA, M. S., NUNES, V. S., & CANO, M. I. (2014). Telomere and telomerase biology. *Progress in molecular biology and translational science*, 125, 1–40. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397898-1.00001-3>

GILSON, E., & GÉLI, V. (2007). How telomeres are replicated. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(10), 825–838. <https://doi.org/10.1038/nrm2259>

GREIDER, C. W., & BLACKBURN, E. H. (1989). A telomeric sequence in the RNA of Tetrahymena telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature*, 337(6205), 331–337. <https://doi.org/10.1038/337331a0>

GRIFFITHS, A. J. F.; WESSLER, S. R.; CARROLL, S. B.; DOEBLEY, J. (2016) Introdução à genética. Editora Guanabara Koogan, 11^a edição.

GUPTA, S. K., KOLET, L., DONIGER, T., BISWAS, V. K., UNGER, R., TZFATI, Y., & MICHAELI, S. (2013). The Trypanosoma brucei telomerase RNA (TER) homologue binds core proteins of the C/D snoRNA family. *FEBS letters*, 587(9), 1399–1404. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.03.017>

HUKEZALIE, K. R., & WONG, J. M. (2013). Structure-function relationship and biogenesis regulation of the human telomerase holoenzyme. *The FEBS journal*, 280(14), 3194–3204. <https://doi.org/10.1111/febs.12272>

JACOBS, S. A., PODELL, E. R., & CECH, T. R. (2006). Crystal structure of the essential N-terminal domain of telomerase reverse transcriptase. *Nature structural & molecular biology*, 13(3), 218–225. <https://doi.org/10.1038/nsmb1054>

JIANG, J., MIRACCO, E. J., HONG, K., ECKERT, B., CHAN, H., CASH, D. D., MIN, B., ZHOU, Z. H., COLLINS, K., & FEIGON, J. (2013). The architecture of Tetrahymena telomerase holoenzyme. *Nature*, 496(7444), 187–192. <https://doi.org/10.1038/nature12062>

KARAMYSHEVA, Z. N., GUTIERREZ GUARNIZO, S. A., & KARAMYSHEV, A. L. (2020). Regulation of Translation in the Protozoan Parasite *Leishmania*. *International journal of molecular sciences*, 21(8), 2981. <https://doi.org/10.3390/ijms21082981>

KERR S. F. (2000). Palaeartic origin of *Leishmania*. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95(1), 75–80. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762000000100011>

LAI, A. C., NGUYEN BA, A. N., & MOSES, A. M. (2012). Predicting kinase substrates using conservation of local motif density. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 28(7), 962–969. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts060>

LAINSON, R.; SHAW, J. J. (1987). Evolution, classification and geographical distribution. In: *The leishmaniasis in Biology and Medicine* . Academic Press, v. 1p. 2–120.

LIN, J., LY, H., HUSSAIN, A., ABRAHAM, M., PEARL, S., TZFATI, Y., PARSLow, T. G., & BLACKBURN, E. H. (2004). A universal telomerase RNA core structure includes structured motifs required for binding the telomerase reverse transcriptase protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(41), 14713–14718. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405879101>

LIRA, C. B., DE SIQUEIRA NETO, J. L., KHATER, L., CAGLIARI, T. C., PERONI, L. A., DOS REIS, J. R., RAMOS, C. H., & CANO, M. I. (2007). 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*, 465(2), 399–409. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.06.020>

LUE N. F. (2004). Adding to the ends: what makes telomerase processive and how important is it?. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 26(9), 955–962. <https://doi.org/10.1002/bies.20093>

LUKE, B., PANZA, A., REDON, S., IGLESIAS, N., LI, Z., & LINGNER, J. (2008). The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere

elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular cell*, 32(4), 465–477.
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.10.019>

MARTÍNEZ, P., & BLASCO, M. A. (2015). Replicating through telomeres: a means to an end. *Trends in biochemical sciences*, 40(9), 504–515.
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2015.06.003>

MOREA, E. G. O., VIVIESCAS, M. A., FERNANDES, C. A. H., MATIOLI, F. F., LIRA, C. B. B., FERNANDEZ, M. F., MORAES, B. S., DA SILVA, M. S., STORTI, C. B., FONTES, M. R. M., & CANO, M. I. N. (2017). A calmodulin-like protein (LCALA) is a new *Leishmania amazonensis* candidate for telomere end-binding protein. *Biochimica et biophysica acta. General subjects*, 1861(11 Pt A), 2583–2597. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.011>

MOREA, E. G. O., VASCONCELOS, E. J. R., ALVES, C. S., GIORGIO, S., MYLER, P. J., LANGONI, H., AZZALIN, C. M., & CANO, M. I. N. (2021). Exploring TERRA during *Leishmania major* developmental cycle and continuous in vitro passages. *International journal of biological macromolecules*, 174, 573–586. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.01.192>

NASCIMENTO, A. F. S. C. DO; SANTOS, D. O. (2020). Leishmanioses como doenças negligenciadas: um panorama complexo. In: *Atualidades em Medicina Tropical no Brasil: Protozoários*. Stricto Sensu Editora, p. 214–226.

NETO, J. L., LIRA, C. B., GIARDINI, M. A., KHATER, L., PEREZ, A. M., PERONI, L. A., DOS REIS, J. R., FREITAS-JUNIOR, L. H., RAMOS, C. H., & CANO, M. I. (2007). *Leishmania* replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. *Biochemical and biophysical research communications*, 358(2), 417–423.
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.04.144>

NEVES, D. P. (2016). *Parasitologia Humana*. Editora Atheneu, 13. Ed., São Paulo.

OHKI, R., & ISHIKAWA, F. (2004). Telomere-bound TRF1 and TRF2 stall the replication fork at telomeric repeats. *Nucleic acids research*, 32(5), 1627–1637.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkh309>

OLOVNIKOV A. M. (1973). A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of theoretical biology*, 41(1), 181–190. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(73\)90198-7](https://doi.org/10.1016/0022-5193(73)90198-7)

ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. (2020). Atlas interactivo de leishmaniasis en las Américas: aspectos clínicos y diagnósticos diferenciales Organización Panamericana de la Salud. PALTEX..

PACE D. (2014). Leishmaniasis. *The Journal of infection*, 69 Suppl 1, S10–S18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

PACHECO, R. S.; CARVALHO-COSTA, F. A. (2014). Diversidade Genética em Parasitos do Gênero *Leishmania*: uma abordagem molecular. In: Leishmanioses do continente americano. [s.l.] Editora FIOCRUZ, p. 29–38.

PODLEVSKY, J. D., & CHEN, J. J. (2016). Evolutionary perspectives of telomerase RNA structure and function. *RNA biology*, 13(8), 720–732. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1205768>

REIS-CUNHA, J. L.; VALDIVIA, H. O.; CASTANHEIRA, D. . 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.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J. C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., & BROOKER, S. (2007). Cutaneous leishmaniasis. *The Lancet. Infectious diseases*, 7(9), 581–596. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(07\)70209-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(07)70209-8)

ROSS R. (1903). NOTE ON THE BODIES RECENTLY DESCRIBED BY LEISHMAN AND DONOVAN. *British medical journal*, 2(2237), 1261–1262. <https://doi.org/10.1136/bmj.2.2237.1261>

SANDHU, R., SANFORD, S., BASU, S., PARK, M., PANDYA, U. M., LI, B., & CHAKRABARTI, K. (2013). A trans-spliced telomerase RNA dictates telomere synthesis in *Trypanosoma brucei*. *Cell research*, 23(4), 537–551. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.35>

SCHOEFTNER, S., & BLASCO, M. A. (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nature cell biology*, 10(2), 228–236. <https://doi.org/10.1038/ncb1685>

SILVA, C. G.; SILVA, R. M. M.; DINIZ, V. A. CÔRTE-REAL, S. (2014). Ultraestrutura de Parasitos do Gênero *Leishmania*. In: Leishmanioses do continente americano. [s.l.] Editora FIOCRUZ,. p. 53–67.

SINGER, M. S., & GOTTSCHLING, D. E. (1994). TLC1: template RNA component of *Saccharomyces cerevisiae* telomerase. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5184), 404–409. <https://doi.org/10.1126/science.7545955>

STECK E. A. (1974). The leishmaniasis. *Progress in drug research. Fortschritte der Arzneimittelforschung. Progres des recherches pharmaceutiques*, 18, 289–351. https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7087-0_22

THEIMER, C. A., & FEIGON, J. (2006). Structure and function of telomerase RNA. *Current opinion in structural biology*, 16(3), 307–318. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.05.005>

VASCONCELOS, E. J., NUNES, V. S., DA SILVA, M. S., SEGATTO, M., MYLER, P. J., & CANO, M. I. (2014). The putative *Leishmania* telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence. *PloS one*, 9(11), e112061. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112061>

WATSON, J. D. (1972). Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature New Biology*, v. 239, n. 94, p. 197–201, out. 1972.

WEBB, C. J., & ZAKIAN, V. A. (2016). Telomerase RNA is more than a DNA template. *RNA biology*, 13(8), 683–689. <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1191725>

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Leishmaniasis, Available at: https://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/leishmaniasis/leishmaniasis.html.

WU, P., TAKAI, H., & DE LANGE, T. (2012). Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell*, 150(1), 39–52. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.026>

WU, R. A., UPTON, H. E., VOGAN, J. M., & COLLINS, K. (2017). Telomerase Mechanism of Telomere Synthesis. *Annual review of biochemistry*, 86, 439–460. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-061516-045019>

XU Y. (2011). Chemistry in human telomere biology: structure, function and targeting of telomere DNA/RNA. *Chemical Society reviews*, 40(5), 2719–2740. <https://doi.org/10.1039/c0cs00134a>

YANG, C. P., CHEN, Y. B., MENG, F. L., & ZHOU, J. Q. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* Est3p dimerizes in vitro and dimerization contributes to efficient telomere replication in vivo. *Nucleic acids research*, 34(2), 407–416. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj445>

ZAPPULLA, D. C., & CECHE, T. R. (2006). RNA as a flexible scaffold for proteins: yeast telomerase and beyond. *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*, 71, 217–224. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.011>

ZHANG, Q., KIM, N. K., & FEIGON, J. (2011). Architecture of human telomerase RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(51), 20325–20332. <https://doi.org/10.1073/pnas.1100279108>