



**MARCELO SANTOS DA SILVA**

**“Estresse oxidativo em *Leishmania amazonensis*:  
Do encurtamento dos telômeros ao deslocamento de LaRPA-1  
do complexo telomérico”**

**“Oxidative stress in *Leishmania amazonensis*:  
From telomere shortening to displacement of LaRPA-1 from  
telomeric complex”**

**CAMPINAS, 2014**



# UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

**MARCELO SANTOS DA SILVA**

**“Estresse oxidativo em *Leishmania amazonensis*:  
Do encurtamento dos telômeros ao deslocamento de LaRPA-1  
do complexo telomérico”**

**“Oxidative stress in *Leishmania amazonensis*:  
From telomere shortening to displacement of LaRPA-1 from  
telomeric complex”**

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Genética e Biologia Molecular, na área de Genética de Microorganismos.

Thesis presented to Biology Institute of the University of Campinas in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor in Genetics and Molecular Biology in the area of Genetics of Microorganisms.

Supervisor/Orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE A VERSÃO FINAL DA TESE DEFENDIDA PELO ALUNO MARCELO SANTOS DA SILVA, E ORIENTADO PELA PROF<sup>a</sup> DR<sup>a</sup> MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO.



---

Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

CAMPINAS, 2014

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca do Instituto de Biologia  
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

D26e Da Silva, Marcelo Santos, 1982-  
Estresse oxidativo em *Leishmania amazonensis* : do encurtamento dos telômeros ao deslocamento de LaRPA-1 do complexo telomérico / Marcelo Santos da Silva. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano.  
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Estresse oxidativo. 3. Encurtamento do telômero. 4. Reparo de DNA. 5. Proteínas de ligação a telômeros. I. Cano, Maria Isabel Nogueira. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Oxidative stress in *Leishmania amazonensis*: : from telomere shortening to displacement of LaRPA-1 from telomeric complex

**Palavras-chave em inglês:**

*Leishmania amazonensis*

Oxidative stress

Telomere shortening

DNA repair

Telomere-binding proteins

**Área de concentração:** Genética de Microorganismos

**Titulação:** Doutor em Genética e Biologia Molecular

**Banca examinadora:**

Maria Isabel Nogueira Cano [Orientador]

Jörg Kobarg

Maria Carolina Quartim Barbosa Elias Sabbaga

Mario Henrique de Barros

Júlio César Borges

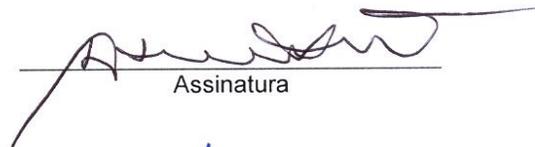
**Data de defesa:** 29-08-2014

**Programa de Pós-Graduação:** Genética e Biologia Molecular

Campinas, 29 de Agosto de 2014.

### Comissão Julgadora

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Isabel Nogueira Cano (Presidente)



Assinatura

Prof. Dr. Jörg Kobarg (titular)



Assinatura

Prof. Dr. Mário Henrique de Barros (titular)



Assinatura

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Carolina Q. B. Elias Sabbaga (titular)



Assinatura

Prof. Dr. Júlio César Borges (titular)



Assinatura

Prof. Dr. Hernandes Faustino Carvalho (suplente)

Assinatura

Prof. Dr. Wanderley Dias da Silveira (suplente)

Assinatura

Prof. Dr. Sérgio Schenkman (suplente)

Assinatura



## RESUMO

A leishmaniose é um espectro de doenças causadas por parasitos do gênero *Leishmania*, que afeta milhões de pessoas em todo o mundo. Durante a infecção, os parasitos usam diferentes estratégias para sobreviver as defesas do hospedeiro, incluindo superar a exposição intensa a espécies reativas de oxigênio (ROS), principais responsáveis por causar danos no DNA, sobretudo nos telômeros, induzindo instabilidade genômica, senescência e morte celular. Telômeros são estruturas nos terminais dos cromossomos compostos por sequências de DNA repetitivas e proteínas, cuja função é proteger as extremidades dos cromossomos, evitando fusões terminais e degradação nucleolítica. Neste trabalho nós induzimos estresse oxidativo agudo em formas promastigotas de *L. amazonensis* através do tratamento com 2 mM de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) por 1h, o qual foi capaz de aumentar os níveis de ROS intracelular, como demonstrado pela reação utilizando CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Além disso, o estresse oxidativo induziu danos no DNA, como mostrado por análise quantitativa de 8-oxodG e núcleos positivos para o ensaio TUNEL. Observamos também, através de parâmetros qualitativos e quantitativos (Southern blot, telomere-PCR e flow-FISH), que o estresse oxidativo, assim como em mamíferos, induziu encurtamento dos telômeros. Analisando a co-localização e interação proteína:DNA por FISH-IIF e ensaios ChIP, foi possível demonstrar que o estresse oxidativo causou erosão da extremidade 3'G *overhang*, fazendo com que a proteína LaRPA-1 perdesse seu sítio de interação nos telômeros. Além disso, pudemos observar uma maior afinidade de LaRPA-1 para com a fita telomérica rica em C, nesse caso uma região de simples-fita gerada dentro da dupla fita telomérica, provavelmente como consequência do reparo de DNA, sugerindo a participação de LaRPA-1 na resposta a danos oxidativos. Por análise de curvas de crescimento e incorporação de EdU, foi possível observar que o estresse oxidativo induziu diminuição acentuada no número de parasitos em cultura, enquanto os sobreviventes continuaram proliferando e replicando DNA. Observamos também que o estresse oxidativo agudo provocou *arrest* de ciclo celular na fase G2/M em parte da população em crescimento exponencial. Em conjunto, esses resultados sugerem a presença de um sistema muito eficiente de resposta a danos oxidativos no DNA telomérico, que permite que os parasitos sobrevivam e repliquem DNA mesmo após um estresse agudo.



## ABSTRACT

Leishmaniasis is a spectrum of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* that affects million people around the world. During infection, parasites use different strategies to survive host defenses including overcoming exposure to Reactive Oxygen Species (ROS), mainly responsible for causing DNA damage, especially at telomeres which frequently results in genome instability, senescence and cell death. Telomeres are chromosomes end termini structures composed by repetitive DNA coupled with proteins whose function is to protect chromosome ends and avoid end-fusion and nucleolytic degradation. In this work, we induced acute oxidative stress in promastigote forms of *Leishmania amazonensis* by treating parasites with 2mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 1 hour, which was able to increase intracellular ROS levels, as demonstrated by CM-H<sub>2</sub>DCFDA reaction. In addition, oxidative stress induced DNA damage, as confirmed by quantitative analysis of 8-oxodG and TUNEL-positive nuclei. We have also observed using qualitative and quantitative parameters (Southern blot, telomere-PCR and flow-FISH) that oxidative stress, as in mammals, induced telomere shortening. Analysing the protein:DNA co-localization and interaction by FISH-IIF and ChIP assays, it was possible to show that oxidative stress is able to induce erosion of the 3'G overhang, inducing a displacement of LaRPA-1 from its telomeric interaction site. In addition, we observed an increase in the affinity between LaRPA-1 and the telomeric C-rich strand, in this case, a single-strand region inside the double-strand telomeric DNA generated probably as a consequence of DNA repair, suggesting the participation of LaRPA-1 in oxidative DNA damage response. Analysis of growth curves and EdU incorporation showed that oxidative stress induced a decrease in the number of parasites in culture, while the survivors continued proliferating and replicating DNA. Moreover, as result of acute oxidative stress, part of the parasites in exponential growth shows a G2/M cell cycle arrest. Taken together, these results suggest the presence of a very efficient oxidative damage response in the telomeres that allows parasites to survive and to replicate DNA even after acute stress.



## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
LISTA DE FIGURAS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	xix
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 <i>Leishmania</i> e leishmaniose.....	2
1.2 Ciclo Biológico dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	3
1.3 Biologia molecular dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	5
1.4 O estresse oxidativo e o mecanismo de detoxificação peculiar dos Tripanossomatídeos.....	6
1.5 Mecanismos de reparo frente a situações de estresse (ênfase do estresse oxidativo.....	7
1.6 Características gerais dos telômeros.....	10
1.7 Composição da cromatina telomérica (complexos <i>shelterin</i> e CST).....	10
1.8 Fenômenos biológicos que causam encurtamento telomérico (telômeros disfuncionais).....	13
1.9 A proteína RPA e suas funções nos telômeros.....	14
1.10 A composição da cromatina telomérica de <i>L. amazonensis</i> e a função de LaRPA-1.....	15
2. OBJETIVOS.....	17
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3. METODOLOGIA.....	19
3.1 Cultura de parasitos e curva de crescimento celular.....	20
3.2 Obtenção da IC <sub>50</sub> para H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> através do método de redução de MTT.....	20
3.3 Análise do ROS intracelular utilizando citometria de fluxo.....	21
3.4 Extração de DNA genômico de <i>L. amazonensis</i> para ensaio HPLC/ECD.....	21
3.5 Hidrólise enzimática das amostras de DNA extraído para ensaio HPLC/ECD.....	21
3.6 Análise de 8-oxo dGuo através de HPLC/ECD.....	22
3.7 Análise do dano provocado ao DNA através do ensaio TUNEL.....	22
3.8 Extração de DNA genômico de <i>L. amazonensis</i> para <i>Southern Blot</i> e telomere-PCR.....	23
3.9 Digestão do DNA genômico e ensaio <i>Southern blot</i> para verificação do comprimento telomérico...	23
3.10 Estimativa dos TRFs dos cromossomos de <i>L. amazonensis</i> .....	24
3.11 Telomere-PCR para verificação do comprimento telomérico.....	24
3.12 Flow-FISH para verificação do comprimento telomérico.....	25
3.12.1 Avaliação dos parâmetros morfométricos.....	25
3.12.2 Análise das amostras.....	25
3.12.3 Aquisição de dados.....	25
3.12.4 Estratégia de análise.....	26
3.12.5 Estimativa do tamanho telomérico através de MESF.....	24
3.13 Enaio CHIP para verificação da interação <i>in vivo</i> entre LaRPA-1 e as fitas teloméricas C e G.....	27
3.14 Co-localização entre LaRPA-1 e as fitas teloméricas C e G por ensaio FISH-IIF sem	

desnaturação.....	29
3.15 Análise do conteúdo de DNA através de FACS.....	30
3.16 Ensaio de incorporação de EdU para verificação da replicação de DNA.....	30
3.17 Curva de crescimento.....	30
4. RESULTADOS.....	33
4.1 O tratamento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com 2 mM de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> por 1h (estresse oxidativo agudo) aumenta os níveis de ROS intracelular, causa oxidação das guaninas e, conseqüentemente, dano ao DNA.....	34
4.2 Estresse oxidativo agudo causa encurtamento telomérico em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .....	37
4.3 Estresse oxidativo agudo diminui a interação entre LaRPA-1 e o 3'G <i>overhang</i> e aumenta sua interação com a simples-fita telomérica rica em C.....	39
4.4 Estresse oxidativo agudo causa um <i>arrest</i> de ciclo celular em G2/M e elimina parte da população tratada propiciando uma seleção dos parasitos mais aptos.....	48
5. DISCUSSÃO.....	53
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS.....	59
7. REFERÊNCIAS.....	61
8. ANEXOS (produção bibliográfica durante período de doutorado).....	71
8.1 Capítulo de livro: Nuclear DNA replication in Trypanosomatid protozoa (capa e resumo).....	72
8.2 Capítulo de livro: Telomere and Telomerase Biology (capa e resumo).....	74
8.3 Artigo científico: The natural absence of RPA1N domain did not impair <i>Leishmania amazonensis</i> RPA-1 participation in DNA damage response and telomere protection.....	76
8.4 Artigo científico: <i>Leishmania amazonensis</i> promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle.....	89
8.5 Artigo científico: The putative <i>Leishmania</i> telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence –resumo (submetido).....	101
8.6 Artigo científico: Oxidative stress in <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> promastigotes causes telomere shortening and displacement of LaRPA-1 from 3' G-overhang – resumo (em preparação).....	102

## DEDICATÓRIA

“Existem dois tipos de sofredores: aqueles que sofrem da falta de vida, e os que sofrem da abundância excessiva da vida. Quando se pensa nisso, quase todo comportamento e atividade humana são, essencialmente, nada diferentes do comportamento animal. As mais avançadas tecnologias e artefatos levam-nos, no máximo, ao nível de um super-chimpanzé. Na verdade, o hiato entre Platão ou Nietzsche e o humano mediano é maior do que o que há entre o chimpanzé e o humano mediano. O reino do verdadeiro espírito livre, o artista verdadeiro, o santo, o filósofo, é raramente alcançado. Por que tão poucos? Quais são as barreiras que impedem as pessoas de alcançarem, minimamente, o seu verdadeiro potencial? A resposta a isso pode ser encontrada em outra pergunta, que é: Qual a característica humana mais universal? O medo ou a preguiça?”

(Richard Linklater – Waking Life)



## AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus e a minha mãe, por terem a paciência e o amor necessário pra saber lidar com um filho questionador e de personalidade forte. Agradeço por terem me ensinado tantas coisas através das dificuldades e superações diárias, fazendo com que eu me tornasse o que sou hoje: dono e senhor de meu próprio destino.

Agradeço sobretudo a Vivian, minha futura esposa, namorada, amiga, companheira, que por tanto tempo permanece ao meu lado com seu amor incondicional e força infinita, sempre me apoiando e incentivando, fazendo com que superássemos todas as dificuldades. Alegrias e tristezas, lágrimas e sorrisos foram o combustível para que amadurecêssemos nosso verdadeiro amor! Muito obrigado por estar ao meu lado hoje e sempre!

Obrigado a todos os melhores amigos que passaram por minha vida até hoje, sobretudo a BIO XLI, a melhor turma do universo! Chamo a atenção também para meus dois irmãos em espírito: Alan Dantas (Num) e Danilo Gargano. Vocês transformaram minha vida com seus ensinamentos, atenção e companheirismo, fazendo com que eu reconhecesse a presença de irmãos onde antes havia apenas melhores amigos.

Gostaria de agradecer também à professora/amiga Maria Isabel, por ter me proporcionado condições para crescer como pesquisador e principalmente como pessoa. Obrigada por todos os momentos de atenção, por todas as discussões e também por todas as oportunidades! Agradeço também a todos os colegas de laboratório e colaboradores pelos momentos de trabalho em equipe, por todo o companheirismo e amizade que me ofereceram durante todos esses anos! Um obrigado especial àqueles que se tornaram meus grandes amigos!

Gostaria de agradecer a Dra. Maria Teresa Teixeira que me co-orientou durante o estágio no IBPC, CNRS, Paris-França. Muito obrigado pelo acolhimento, pelo carinho, atenção e por todo o aprendizado. Um agradecimento especial também aos amigos Julien Soudet, Pascale Jolivet, Zhou Xu, Isabel Klonfamps, Kamar Serhal, Emilie Fallet, Aurélia Barascu e Laetitia Cavellini.

Gostaria de agradecer finalmente às agências financiadoras FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) pela concessão da bolsa de doutorado e pelo financiamento do projeto, e CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo financiamento de meu estágio sanduíche na França.



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Ciclo biológico de *Leishmania amazonensis*

**Figura 2.** Representação esquemática das principais vias envolvidas no reparo a danos oxidativos no DNA

**Figura 3.** Complexo *Shelterin* em humanos

**Figura 4.** Panorama atual dos telômeros de *Leishmania*

**Figura 5.** Esquema simplificado da técnica de telomere-PCR

**Figura 6.** Quantum™ FITC-5 MESF *beads*

**Figura 7.** Estresse oxidativo agudo aumenta os níveis de ROS intracelular, causa oxidação das guaninas e dano ao DNA em *L. amazonensis*

**Figura 8.** Estresse oxidativo agudo causa aparente encurtamento telomérico em formas promastigotas de *L. amazonensis*

**Figura 9.** Análise representativa dos parasitos *L. amazonensis* controle e tratados com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo método flow-FISH

**Figura 10.** Ensaio flow-FISH demonstra que o estresse oxidativo agudo causa encurtamento telomérico em *L. amazonensis*

**Figura 11.** Ensaio telomere-PCR sugere que o estresse oxidativo causa encurtamento telomérico.

**Figura 12.** Estresse oxidativo agudo diminui a interação entre LaRPA-1 e o 3' G *overhang* e propicia a interação entre LaRPA-1 e a simples-fita telomérica rica em C

**Figura 13.** Estresse oxidativo agudo diminui a interação entre LaRPA-1 e o 3' G-*overhang* e promove interação com a simples-fita telomérica rica em C

**Figura 14.** Representação esquemática da possível dinâmica de LaRPA-1 e dos telômeros após estresse oxidativo

**Figura 15.** O estresse oxidativo agudo não impede a multiplicação de *L. amazonensis*

**Figura 16.** O estresse oxidativo não impede a replicação do DNA em *L. amazonensis*

**Figura 17.** O estresse oxidativo agudo causa *arrest* de ciclo celular em G2/M após 4h

**Figura 18.** Representação esquemática da possível participação da proteína LaRPA-1 na via de reparo por MMR induzida por estresse oxidativo



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**8-oxo dGuo** ou **8-oxo dG** – 8-Oxo-2'-deoxyguanosine;

**BER** – *Base Excision Repair*;

**BLM** – *Bloom Syndrome*;

**bp** – *base pairs*;

**ChIP** – *Chromatin Immunoprecipitation*;

**CM-H<sub>2</sub>DCFDA** – chloromethyl derivative of H<sub>2</sub>DCFDA;

**CST** – complexo formado pelas proteínas Cdc13 (leveduras) ou Ctc1 (mamíferos) + Stn1 + Ten1;

**dCTP** ou **C** – desoxicitidina trifosfato;

**dGTP** ou **G** – desoxiguanosina trifosfato;

**DAPI** – 4',6-diamidino-2-phenylindole;

**DIC** – *Differential interference contrast*;

**DNA** – *Deoxyribonucleic Acid* (Ácido Desoxirribonucleico);

**dNTP** – desoxirribonucleosídeos trifosfato;

**EdU** – 5-ethynyl-2'-deoxyuridine;

**Est1** – Ever Shorter Telomeres 1;

**Exo1** – exonuclease 1;

**FACS** – *Fluorescence-Activated Cell Sorting*;

**FISH** – *Fluorescence in situ Hybridization*;

**FISH-IIF** – *Fluorescence in situ Hybridization + Indirect Immunofluorescence*;

**FITC** – Fluorescein-5-Isothiocyanate;

**Flow-FISH** – *Flow cytometer - Fluorescence in situ Hybridization*;

**FSC** – Forward-Scattered light;

**FSC-A** – Forward-Scattered light-area;

**FSC-H** – Forward-Scattered light-height;

**H<sub>2</sub>DCFDA** – 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate;

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** – Peróxido de hidrogênio;

**HIV** – *Human Immunodeficiency Virus* (Vírus da Imunodeficiência Humana);

**HPLC/ECD** – *High-Performance Liquid Chromatography-ElectroChemical Detection*;

**IC<sub>50</sub>** – Metade da concentração inibitória máxima;

**IP** – *Immunoprecipitation* (imunoprecipitação);

**kb** – kilopares de bases;

**kDNA** – *kinetoplast DNA* (DNA do cinetoplasto);

**Ku70 e Ku80** – heterodímeros identificados em pacientes com *polymyositis-scleroderma overlap syndrome*. A sigla Ku representa as iniciais do nome do primeiro paciente identificado;

**LaRbp38** – *Leishmania amazonensis* RNA binding protein 38;

**LaRPA1** – *Leishmania amazonensis* Replication Protein A-1;

**LaTBP1** – *Leishmania amazonensis* Telomere Binding Protein 1;

**LaTERT** – componente transcriptase reversa da telomerase de *L. amazonensis*;

**LaTRF** – *Leishmania amazonensis* TTAGGG Repeat-Binding Factor;

**LCTAS** – *Leishmania* Conserved Telomere-Associated Sequence;

**LDS 751** – corante de DNA usado em citometria de fluxo;

**LS** – células de *Leishmania*;

**M199** – Meio de cultivo para *Leishmania amazonensis*;

**MESF** – *Molar Equivalent Standard of Fluorescence*;  
**MFI** – *Median Fluorescence Intensity*;  
**MLH1** – *MutL homolog 1*;  
**MMR** – *Mismatch Repair*;  
**MTT** – *3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*;  
**MRE11** – *Meiotic Recombination 11*;  
**MSH 1-6** – *MutS protein homolog 1-6*;  
**MutL $\alpha$**  – *MLH1 and PMS2 proteins*;  
**MutS $\alpha$**  – *MSH2 and MSH6*;  
**NER** – *Nucleotide Excision Repair*;  
**nt** – *nucleotídeo*;  
**OB-fold** – *Oligonucleotide/oligosaccharide Binding-fold*;  
**PBS** – *Phosphate Buffer Saline*;  
**pb** – *pares de bases*;  
**PCNA** – *Proliferating Cell Nuclear Antigen*;  
**PCR** – *Polymerase Chain Reaction*;  
**PNA** – *Peptide Nucleic Acid*;  
**poli-A** – *Poli Adenine*;  
**POT1** – *Protection of Telomeres 1*;  
**Rad50** – *Radiation50 homolog (S. cerevisiae)*;  
**RAP1** – *Repressor/Activator Protein 1*;  
**Rbp38** – *RNA binding protein 38*;  
**RFC** – *Replication Factor C*;  
**RNA** – *Ribonucleic Acid (Ácido Ribonucleico)*;  
**RNase A** – *Ribonuclease A (Ribonuclease A)*;  
**RNI** – *Reactive Nitrogen Intermediates*;  
**RNS** – *Reactive Nitrogen Species*;  
**ROI** – *Reactive Oxygen Intermediates*;  
**ROS** – *Reactive Oxygen Species*;  
**RPA** – *Replication Protein A*;  
**SOD** – *Superoxide Dismutase*;  
**SSC** – *Side-scattered light*;  
**SSC-A** – *Side-scattered light-area*;  
**SSC-H** – *Side-scattered light-height*;  
**TAE** – *Tris-Acetato-EDTA*;  
**Taq DNA pol** – *Thermus aquaticus DNA polimerase*;  
**Taz1** – *proteína ortóloga da Tafazzin humana*;  
**TdT** – *Terminal deoxynucleotidyl Transferase*;  
**TE** – *Tris-EDTA*;  
**TIN2** – *TRF1-Interacting protein 2*;  
**T-loop** – *telomere loop*;  
**TPP1** – *TIN2 and POT1-interacting protein*;  
**TRF1** – *TTAGGG Repeat Binding Factor 1*;  
**TRF2** – *TTAGGG Repeat Binding Factor 2*;  
**TRFs** – *Terminal Restriction Fragments*;

**TUNEL** – *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labeling;*

**U** – *unit(s);*

**v/v** – *volume/volume;*

**WBC** – *White Blood Cells;*

**WHO** – *World Health Organization;*

**WRN** – *Werner Syndrom*



# 1. Introdução

---

## 1. Introdução

Nosso grupo de pesquisa produziu dois capítulos de livros (DA SILVA et al., 2012; GIARDINI et al., 2014) durante meu período de doutorado (janeiro de 2010 à agosto de 2014), os quais foram utilizados, juntos a outras fontes bibliográficas, para elaboração deste tópico. Os resumos, bem como os títulos desses capítulos, encontram-se no tópico ‘anexos’ ao final deste manuscrito.

### 1.1 *Leishmania* e leishmaniose

O termo leishmaniose refere-se a um conjunto heterogêneo de doenças causadas pela infecção de parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, pertencentes à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Neste grupo estão incluídos espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos), encontrados nas formas promastigotas, aderidas ao trato digestivo dos hospedeiros invertebrados ou flageladas livres, e amastigotas, sem flagelo livre, parasita intracelular que vive no interior de células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado. A reprodução ocorre por divisão binária simples em ambos os hospedeiros. Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande variedade de mamíferos, sendo mais comuns: roedores, canídeos e, sobretudo, humanos. Como hospedeiros invertebrados são identificados, exclusivamente, fêmeas de insetos hematófagos (flebotomíneos), da família *Psychodidae* e gênero *Lutzomyia* (conhecidos como mosquito palha no Brasil). A transmissão ocorre através da picada do inseto infectado, no momento da hematofagia (REY, 2001; NEVES, et al. 2005). Em humanos, os parasitos também podem ser transmitidos diretamente, de pessoa a pessoa, através do compartilhamento de agulhas infectadas, que muitas vezes é o caso da co-infecção *Leishmania*/HIV (WHO, 2014).

A doença em humanos pode se apresentar sob quatro formas clínicas, dependendo da espécie parasitária e do sistema imune celular do paciente: Leishmaniose cutânea, que provoca lesões na pele, principalmente no rosto, braços e pernas. Embora nesta forma haja uma tendência de cura espontânea, ela pode criar graves lesões e deixar cicatrizes permanentes. Após a recuperação ou tratamento bem sucedido, geralmente induz imunidade à re-infecção pela espécie de *Leishmania* que causou a doença. Leishmaniose cutânea difusa, que é uma forma clínica de difícil tratamento, caracterizando-se pela presença de lesões difusas não-ulceradas por toda a pele que se assemelham a lepra e não curam espontaneamente. Esta forma está especialmente relacionada a uma deficiência do sistema imunológico do paciente. Leishmaniose cutâneo-mucosa, também conhecida por ‘espúndia’ na América do Sul, é caracterizada por lesões destrutivas secundárias envolvendo mucosas e cartilagens. Causa graves lesões que podem desfigurar o rosto do paciente, destruindo as membranas mucosas do nariz, boca e garganta. Leishmaniose visceral, também conhecida como ‘calazar’, é caracterizada por febre irregular, perda de peso, inchaço do fígado e do baço e anemia. É a forma mais grave da leishmaniose e geralmente é fatal se não tratada. O período de incubação

pode ser de meses ou anos e, ao contrário das formas cutâneas de leishmaniose, envolve os órgãos internos (WHO, 2014).

As leishmanioses são comuns em regiões tropicais e estimativas indicam que essa doença aflige 12 milhões de pessoas, com 350 milhões de indivíduos em situação de risco. A ocorrência de 2 milhões de novos casos e 70.000 mortes por ano evidenciam a importância epidemiológica desta zoonose, e a ocorrência endêmica em 88 países, dos quais 16 são desenvolvidos e 72 estão em desenvolvimento, demonstra uma relação entre fatores socioeconômicos e incidência desta parasitose (WHO, 2014). No Brasil, a doença é considerada primariamente como uma zoonose com envolvimento secundário de seres humanos e ocorre em todas as regiões do país com predominância de casos nas regiões Norte e Nordeste. O parasito alvo deste estudo é a *L. amazonensis*, agente causal da leishmaniose cutânea e cutânea difusa no Brasil, porém, em algumas regiões, este parasito aparece como agente causal de todo o espectro da leishmaniose (BARRAL et al., 1991).

A prevenção e um controle eficaz das leishmanioses apresentam dificuldades em todo o mundo, pois as medidas que são empregadas para a redução da transmissão, o controle dos vetores e o tratamento farmacológico da infecção induzem o aparecimento de parasitos e vetores resistentes (JOHNSTON et al., 1999). Além disso, as principais drogas utilizadas no tratamento das leishmanioses (compostos antimoniais pentavalentes e diferentes formulações da anfotericina B) são consideradas eficazes, porém suas desvantagens incluem alta toxicidade, terapias prolongadas, baixa eficácia em algumas situações, administração parenteral e alto custo, como no caso da anfotericina B (HERWALDT, 1999; MURRAY et al., 2005).

Outro ponto é que as leishmanioses se comportam como uma das infecções oportunistas que acometem indivíduos infectados pelo vírus HIV. O aparecimento do primeiro caso de co-infecção com o HIV em 1985 e a evolução da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida para uma situação de pandemia mudaram a história natural das leishmanioses devido à grande sobreposição epidemiológica das duas doenças. A co-infecção com o vírus HIV diminui a resposta a terapias e leva a aumentos nas probabilidades de relapso e de progresso para a forma visceral. Concomitantemente, a leishmaniose visceral acelera o progresso clínico do HIV já que ambas as doenças afetam as células do sistema imunológico (WHO, 2014).

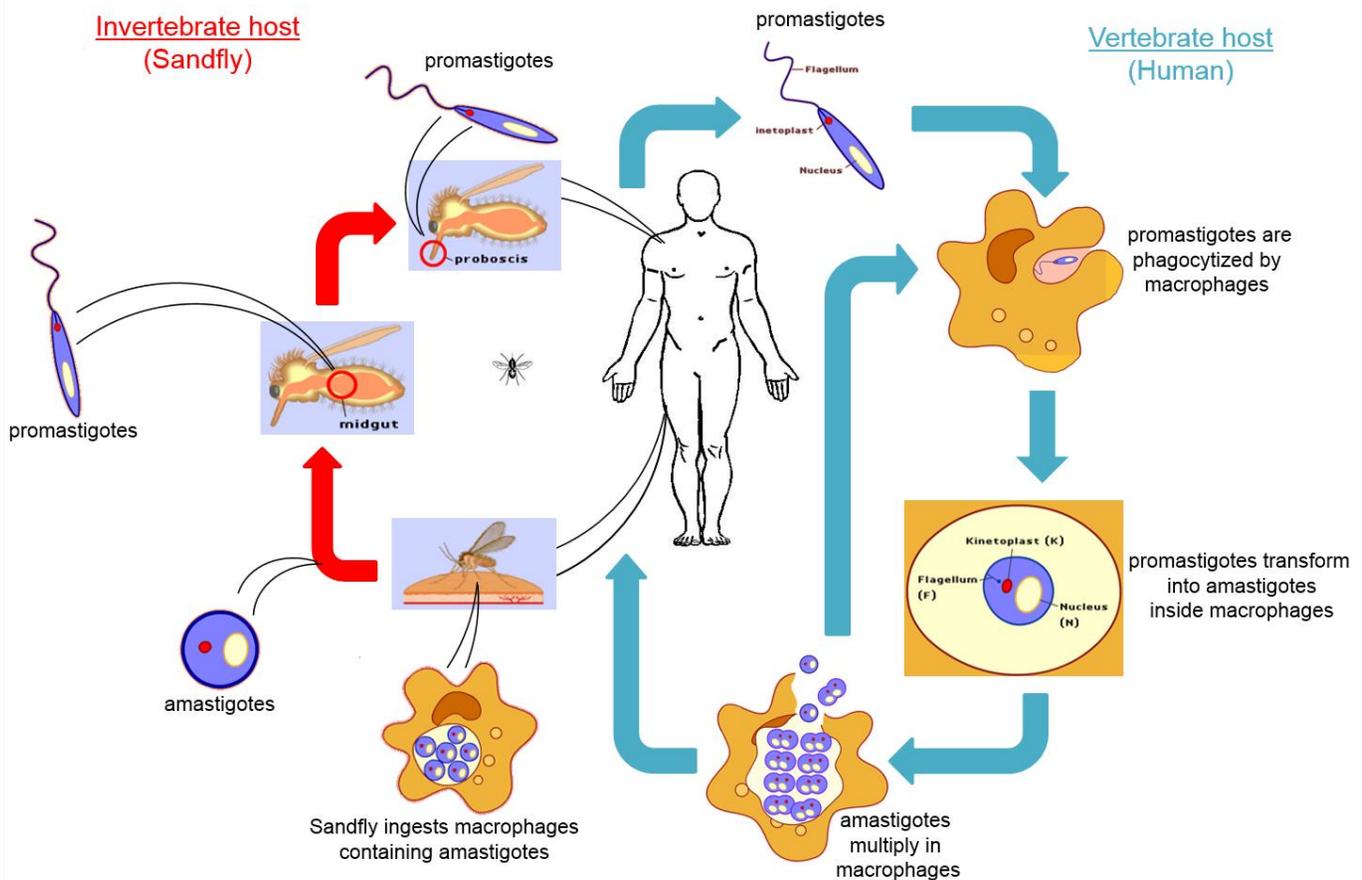
Por esses motivos, um maior conhecimento sobre a biologia celular e molecular destes protozoários poderá facilitar o descobrimento de novos alvos parasito-específicos para o desenvolvimento de vacinas e drogas eficazes para o tratamento e possível erradicação da doença.

## **1.2 Ciclo biológico dos parasitos do gênero *Leishmania***

Os parasitos do gênero *Leishmania* são caracterizados pela presença do cinetoplasto, uma organela especial rica em DNA mitocondrial (kDNA) que apresenta morfologia fusiforme (SIMPSON,

1987). Esses parasitos possuem duas formas morfológicas: promastigotas e amastigotas. As formas promastigotas (ou flageladas) são consideradas infectivas e proliferam dentro do sistema digestivo do inseto vetor onde evitam expulsão por adesão à parede do intestino do mesmo. Neste ambiente, os promastigotas procíclicos diferenciam-se em promastigotas metacíclicos, cessam o processo de divisão celular e migram para as partes bucais do inseto, que as injeta no hospedeiro durante a hematofagia (BASU e RAY, 2005).

Após a infecção, ocorre a internalização do parasito através da endocitose mediada por receptores na superfície de células do sistema fagocitário mononuclear, predominantemente macrófagos e, logo em seguida, os promastigotas metacíclicos transformam-se rapidamente em formas amastigotas, de formato esférico e flagelo curto, capazes de se desenvolver e multiplicar no meio ácido encontrado no vacúolo digestivo (NEVES, 2005). Com a intensa multiplicação, ocorre a lise da célula hospedeira, liberando os parasitos que voltam a infectar novas células do sistema fagocitário mononuclear. O ciclo se completa quando um mosquito flebotômíneo não infectado alimenta-se do sangue de um hospedeiro infectado e as formas amastigotas voltam a se diferenciar em promastigotas no intestino do inseto (BASU e RAY, 2005; OLIVIER et al., 2005; LANG et al., 2009). A figura 1 apresenta uma ilustração simplificada do ciclo biológico de *Leishmania amazonensis*.



**Figura 1. Ciclo biológico de *Leishmania amazonensis*.** Nessa imagem o hospedeiro vertebrado está sendo representado pelo homem enquanto o invertebrado pelo mosquito-palha. Extraído de DA SILVA et al., 2012.

Deste modo, a investigação e conhecimento sobre os processos biológicos que permitem que os parasitos se desenvolvam e se multipliquem em ambientes tão hostis quanto o vacúolo digestivo e o trato digestivo do inseto vetor é uma área atrativa e de fundamental importância para o desenvolvimento de estratégias anti-parasitárias.

### **1.3 Biologia molecular dos parasitos do gênero *Leishmania***

Parasitos do gênero *Leishmania* são organismos diplóides, assexuados, cujo genoma difere dos genomas típicos de eucariotos. Seu genoma nuclear contém aproximadamente 70 Mb que, dependendo da espécie, são organizados em 34 a 36 cromossomos lineares que variam de tamanho entre 0,35 e 3,0 Mb. A condensação cromossômica durante o ciclo mitótico não é observável, dificultando assim quaisquer tipos de análises citogenéticas (WINCKER et al., 1996; JOHNSTON et al., 1999; IVENS et al., 2005). Em condições de estresse nutricional ou seleção por drogas, *Leishmania* spp. podem amplificar segmentos específicos do genoma e transformá-los em minicromossomos. Apesar disso, os genomas das espécies do gênero *Leishmania* são muito similares entre si e estão organizados em áreas centrais bem conservadas com polimorfismos concentrados nas extremidades dos cromossomos (STILES et al., 1999). Os genes de *Leishmania* não apresentam íntrons e são transcritos em grupos gerando RNAs precursores policistrônicos, fenômeno comum em protozoários da ordem Kinetoplastida. O processamento envolve o acréscimo, por trans-splicing, de miniéxons com CAP 7-Metilguanossina na extremidade 5' de RNAs em maturação e adição de cauda poli-A, gerando assim mRNAs maduros. Devido à ausência de promotores gênicos individuais típicos, estima-se que a regulação gênica em *Leishmania* ocorra principalmente em nível pós-transcricional (STILES et al., 1999). Recentemente foi demonstrado que sítios de transcrição policistrônicos estão localizados próximos a histonas H3 acetiladas, indicando que este processo possa ser um tipo geral de regulação da transcrição em *Leishmania major* (THOMAS et al., 2009).

O genoma mitocondrial está contido no cinetoplasto, recebendo o nome de kDNA e representando a informação genética mitocondrial desses parasitos. É constituído por maxicírculos e minicírculos, que são moléculas que se concatenam formando uma rede compacta com replicação aparentemente autônoma. Essas moléculas contêm ao menos uma região conservada de 120 a 150 pares de base, razoavelmente homogênea entre os representantes de um mesmo gênero. Os maxicírculos codificam rRNA e mRNA de proteínas mitocondriais. Os minicírculos representam 95% da massa de kDNA, servem como molde para a transcrição dos maxicírculos e são bons substratos

para sondas moleculares (SIMPSON et al., 1987; DEGRAVE et al., 1994, PASSOS-SILVA et al., 2010).

O recente sequenciamento dos genomas de *Leishmania infantum* e de *Leishmania brasiliensis*, mostrou que a composição genética dessas duas espécies apresenta poucas diferenças quando comparado ao genoma de *Leishmania major* (IVENS et al., 2005; PEACOCK et al., 2007). Deste modo, pode-se concluir que poucos genes do parasita são importantes para determinar qual a forma clínica da leishmaniose será desenvolvida após a infecção. Além disso, talvez o genoma do infectado tenha um papel importante nas manifestações clínicas da doença (PEACOCK et al., 2007).

#### **1.4 O estresse oxidativo e o mecanismo de detoxificação peculiar dos Tripanossomatídeos**

Dentre todas as situações de estresse que podem afetar drasticamente uma célula e/ou organismo unicelular devemos chamar a atenção para o estresse oxidativo, o qual ocorre de maneira muito frequente no ambiente intracelular, mesmo em situações naturais. Podemos definir estresse oxidativo como uma condição biológica em que ocorre desequilíbrio entre a produção de ROS e a sua desintoxicação através de sistemas biológicos que as removam ou reparem os danos por elas causados (SIES, 1985). Todos os organismos vivos possuem um ambiente intracelular de natureza redutora, existindo um equilíbrio entre as formas oxidada e reduzida de várias moléculas, equilíbrio esse mantido por enzimas à custa de energia metabólica. Perturbações neste equilíbrio redox podem provocar a produção de peróxidos e radicais livres que danificam todos os componentes celulares, incluindo proteínas, lípidos e sobretudo o DNA (SIES, 1985; VALKO et al., 2005). Em mamíferos, a remoção e manutenção dos níveis de ROS intracelular dependem da ação integrada de um sistema de antioxidantes enzimáticos, dentre os quais podemos citar superóxidos desmutases (SOD), catalases e glutathione peroxidases (VALKO et al., 2005).

Em *Leishmania*, bem como nos protozoários tripanossomatídeos, a remoção de ROS, peróxidos tóxicos e a manutenção do nível de tiol intracelular são fundamentais para as reações de oxido-redução e dependem de um sistema constituído por uma enzima peculiar denominada tripanotiona. Esta enzima é um conjugado entre uma molécula de espermidina e duas moléculas de glutathione, sendo única e exclusiva dos tripanossomatídeos, o que os torna particularmente vulneráveis se por ventura esta enzima for bloqueada (HEBY et al., 2007; FAIRLAMB e CERAMI, 1992).

Normalmente uma célula é capaz de superar os efeitos nefastos do estresse oxidativo se as perturbações no equilíbrio redox forem pequenas, restabelecendo o equilíbrio normal intracelular, mas perturbações de maior escala podem levar a apoptose e morte celular (LENNON e al., 1991). Em *Leishmania* sp., embora saibamos que o estresse oxidativo induzido por diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> leve a perda da motilidade e fragmentação do DNA, semelhante à apoptose dos metazoários, ainda não conhecemos exatamente seus mecanismos de indução de morte celular, bem

como se parte da população consegue superar esse tipo de estresse devido à presença desse eficiente sistema de detoxificação composto principalmente pela tripanotiona (DAS et al, 2001; FUERTES et al., 2008).

### **1.5 Mecanismos de reparo frente a situações de estresse (ênfase no estresse oxidativo)**

Diferentes situações de estresse como, por exemplo, choque térmico, exposição a agentes químicos, radiação ultravioleta e estresse oxidativo causado por ROS podem causar danos em diversos componentes celulares, principalmente no mais sensível e importante deles, o DNA.

Em humanos, a exposição a diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e níveis variados de radiação ultravioleta causam o encurtamento rápido dos telômeros (região mais sensível à estresse oxidativo), que por sua vez induz o processo de apoptose (OPRESKO et al., 2005; DUAN et al., 2005; RAMIREZ et al., 2003). Em *Leishmania*, como já citado, também ocorre indução de um processo semelhante a apoptose quando as mesmas são submetidas a estresses causados por ROS, RNI e ROI (WILSON et al., 1994; DAS et al., 2001; MURRAY e NATHAN, 1999).

Com intuito de corrigir estes efeitos deletérios e manter uma baixa taxa de mutação espontânea, as células vivas desenvolveram uma série de sistemas enzimáticos que reparam o dano ao DNA. Existem diferentes tipos de danos ao DNA e os sistemas de reparo podem agir de diversas maneiras, as quais podemos citar: a) reversão direta do DNA danificado (através da ação de enzimas, como por exemplo a *fotoliase*), b) sistema de reparo dependente de homologia (reparo por excisão de base (BER), reparo por excisão de nucleotídeo (NER), reparo de mal pareamento ou *Mismatch* (MMR) e reparo pós-replicação) e c) reparo de quebras bifilamentares (junção de pontas não homólogas e recombinação homóloga) (GRIFFITHS et al., 2007). Esses sistemas de reparo são compostos por proteínas especializadas e enzimas que reconhecem danos a dupla-fita (como o complexo MRE11, proteínas do complexo Rad50, proteínas Ku70 e Ku80) e simples fita (interações entre a proteína RPA e endonucleases/exonucleases) (BRESSAN et al., 1999; KOWALCZYKOWSKI, 2000; LOMBARD et al., 2005).

Devemos chamar a atenção em especial para o reparo a danos oxidativos no DNA. Para lidar com esse tipo de dano alguns mecanismos intrincados com a finalidade de detectar e, posteriormente, reparar tais danos foram selecionados evolutivamente nas células eucarióticas. NER e BER são as duas principais vias responsáveis pelo reparo da maioria das lesões no DNA induzida por ROS. NER é um complexo mecanismo composto por múltiplas etapas, podendo atuar no reparo do DNA quando ele é danificado por ROS, criando uma grande distorção estrutural nessa molécula. Essencialmente, o NER envolve seis etapas principais: (i) o reconhecimento específico da base no DNA modificada por oxidação, como por exemplo 8-oxo-dG, mediada pela ação de fatores de reparo XP, XPA, XPC, proteína RPA, e recrutamento do fator de reparo/transcrição TFIIH, o qual contém seis polipeptídeos (XPB, XPD, XPG, and XPF-ERCC1 ) essenciais para esse processo de reparo; (ii) o

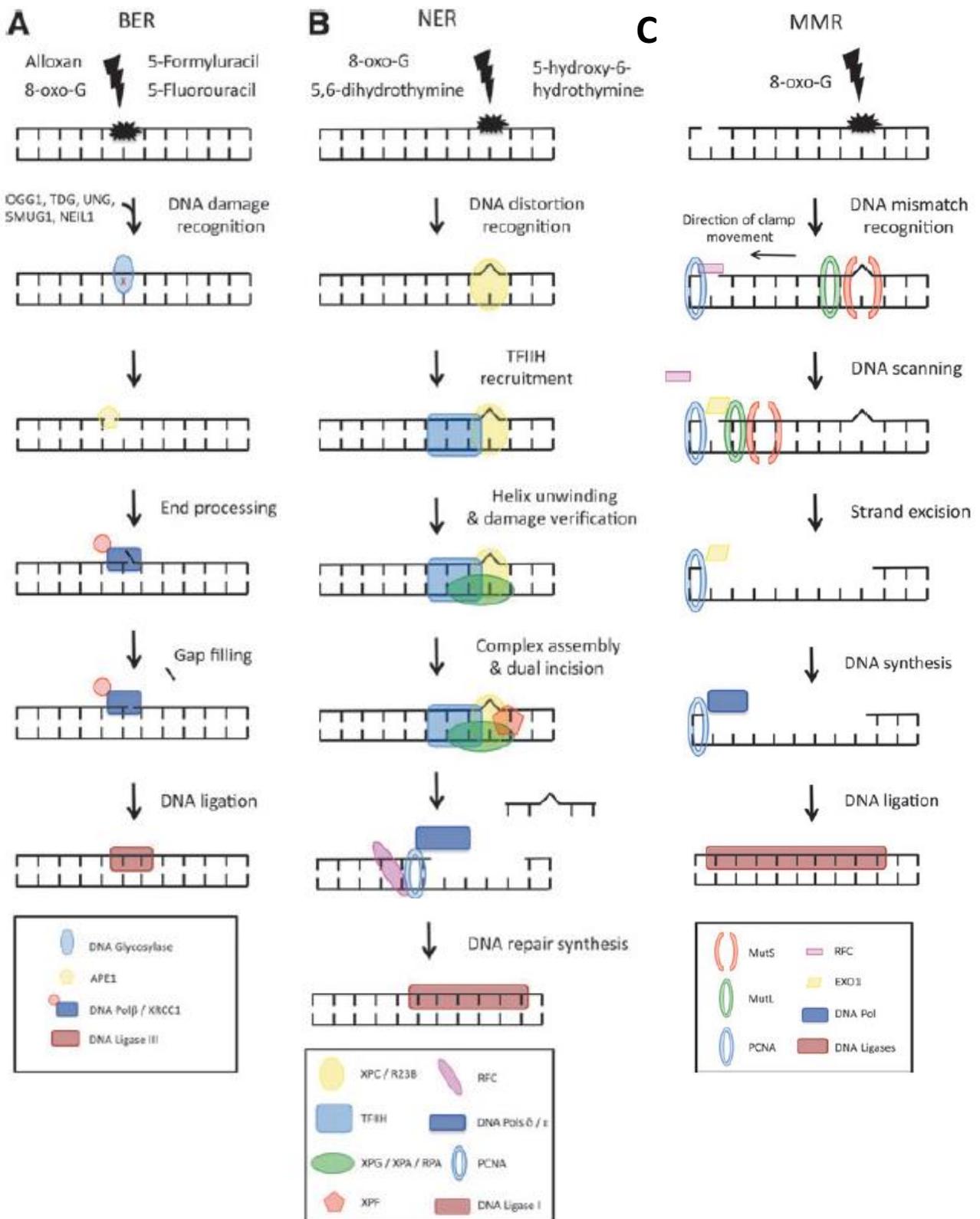
desenrolamento do DNA em torno do local danificado mediado pelas helicases XPB e XPD; (iii) incisões duplas delimitando o dano. Nesta fase, as subunidades XPG e XPF-ERCC1 são responsáveis pelas incisões 3' e 5', respectivamente. (iv) remoção subsequente do DNA danificado; (v) a síntese de reparo para preencher o *gap* resultante através da ação de RPC, PCNA e DNA polimerases utilizando a outra fita como molde, e por fim (vi), a ligação da fita recém-sintetizada pela DNA-ligase (Brierley and Martin, 2013 e figura 2B).

BER é uma versão mais simples do NER, sendo um modo de reparo operacional que age quando o dano oxidativo está restrito a apenas uma base. BER é essencialmente composto por quatro etapas e pode ser dividido em duas subvias: o *short-patch* e *long-patch*. Na via *long-patch*, até 13 nucleotídeos podem ser removidos e inseridos, enquanto que no *short-patch* envolve, na maioria das vezes, o preenchimento de um *gap* de nucleotídeo único. Focando na via *short-patch*, no primeiro passo, a base no DNA modificada por oxidação (como por exemplo 8-oxo-dG) é especificamente reconhecida e clivada por uma DNA glicosilase apropriada, como por exemplo OGG1. Ao mesmo tempo, a AP endonuclease se liga ao lado 5' da base para cortar a fita. Depois disso, a DNA polimerase  $\beta$  preenche o *gap* de um nucleotídeo e também libera o deoxyribose-fosfato (dRp) na porção 5'. Conseqüentemente, a DNA-ligase III/complexo XRCC1 chega ao local em que DNA ligase III sela o corte e a DNA polimerase  $\beta$  se dissocia do local. XRCC1 e DNA ligase III são então liberadas, deixando o DNA reparado (Brierley and Martin, 2013 e figura 2A).

Além de BER e NER, a complexa via MMR também tem mostrado desempenhar um papel importante na prevenção de mutações associadas com a lesão oxidativa do DNA, 8-oxo-dG. De maneira simplificada, a via MMR eucariótica pode ser dividida em dois grandes componentes, ambos funcionando como complexos heterodiméricos, com nomes originários de seus ortólogos em *E.coli*: MutS e MutL. MutS é composto basicamente pelos componentes MSH2, MSH3 e MSH6, enquanto MutL é composto por MLH1 e proteínas PMS1 e 2. Após instaurada a lesão oxidativa, MutS tem a capacidade de detectar a(s) base(s) oxidada(s) no DNA recrutando o complexo MutL. No modelo mais comum (chamado *sliding-clamp*), o complexo MutS/MutL deixam o local danificado e deslizam ao longo da dupla hélice de DNA para, eventualmente, encontrar um *gap* simples-fita ligado pelas proteínas acessórias PCNA e RFC. Esse encontro desloca RFC e permite o acesso de Exo1 ao DNA, degradando segmentos de até 250 nt em torno da lesão oxidativa, antes de ser inativado por MutL. O DNA oxidado é então retirado, seguido pela síntese de uma nova fita pela DNA polimerase. Por fim, a nova fita de DNA é ligada à cadeia já existente por uma DNA ligase (Brierley and Martin, 2013 e figura 2C). Vale a pena ressaltar que o complexo heterotrimérico ligante de DNA simples-fita chamado RPA já foi demonstrado participando ativamente em cada uma dessas três vias NER, BER e MMR (Ogi et al., 2010; DeMott et al., 1998; Guo et al., 2006).

Com isso, fica evidente que a capacidade de resistir a estresses ambientais é de extrema importância para todos os organismos, sendo ainda mais importante para aqueles causadores de

infecções, a julgar pela variação ambiental abrupta que esses organismos têm que suportar durante seu ciclo de desenvolvimento.



**Figura 2. Representação esquemática das principais vias envolvidas no reparo a danos oxidativos no DNA. A.** Reparo por Excisão de Bases (BER). **B.** Reparo por excisão de nucleotídeos (NER). **C.** Reparo por mal-pareamento ou *Mismatch* (MMR). A descrição detalhada de cada esquema está descrito no texto. Extraído de Brierley and Martin, 2013.

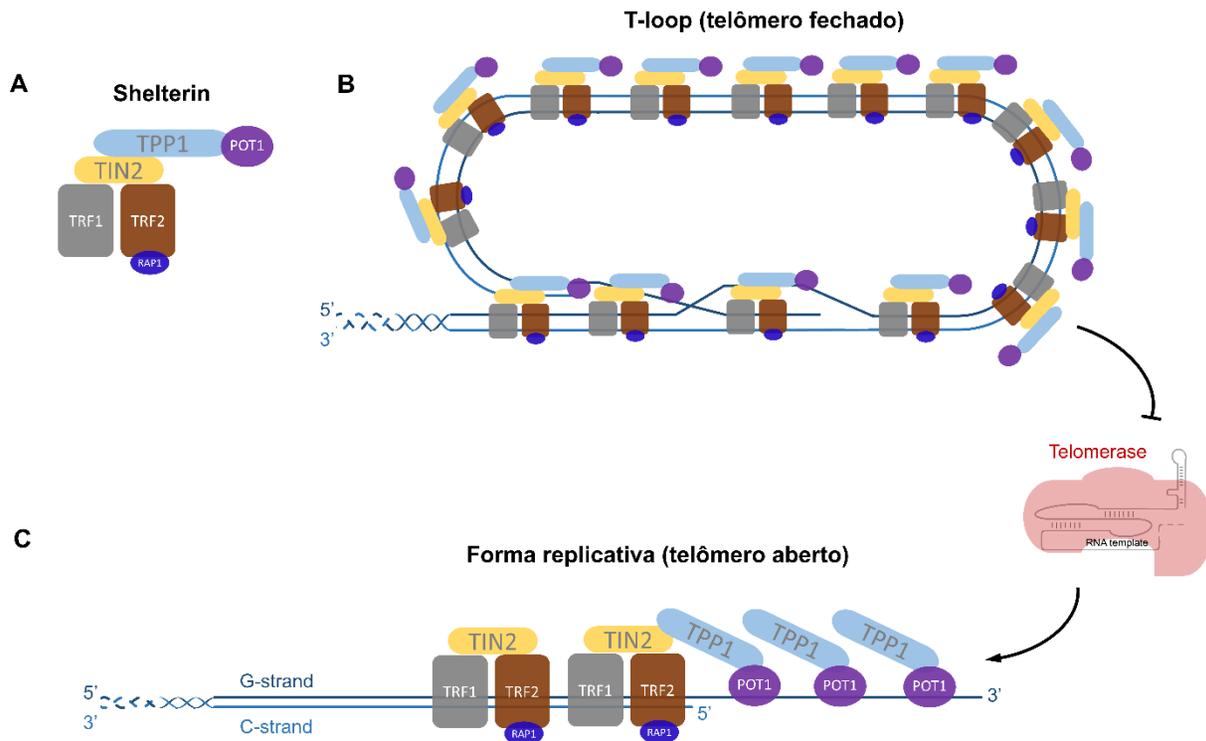
## 1.6 Características gerais dos telômeros

Uma possível estratégia para se estudar a biologia molecular de *Leishmania* é através dos telômeros e controle de sua manutenção. Telômeros são complexos de proteína-DNA localizados nas extremidades dos cromossomos. Entre suas principais funções destaca-se a proteção dos terminais cromossômicos, impedindo a fusão destes e a degradação cromossômica pela maquinaria de reparo (BLACKBURN, 1990). Consistem em sequências repetidas em *tandem* (no caso dos mamíferos e *Leishmania* são do tipo 5' TTAGGG 3'), terminando em uma protrusão 3' simples fita denominada 3' *G-overhang*, que é substrato para a elongação dos telômeros pela enzima telomerase e para a interação de proteínas teloméricas envolvidas na manutenção do tamanho e proteção dos terminais cromossômicos (KLOBUTCHER et al., 1981; BLACKBURN, 2001; SMOGORZEWSKA e DE LANGE, 2004; LIRA et al., 2007a). Em humanos, leveduras, protozoários ciliados e *Trypanosoma brucei* foi observado que esses terminais cromossômicos podem adquirir conformações em forma de laço (*t-loop*) ou em forma de uma estrutura denominada G-quadruplex ("G-quartet" ou G4 DNA), as quais parecem proteger os telômeros da ação da maquinaria de reparo da célula e impedir o acesso da telomerase ao terminal dos cromossomos alongados (MUÑOZ-JORDÁN et al., 2001; TEIXEIRA e GILSON, 2005; GILSON e GELI, 2007).

## 1.7 Composição da cromatina telomérica (complexos *shelterin* e CST)

Associadas aos telômeros e formando um grande complexo nucleoprotéico estão inúmeras proteínas que coordenam a dinâmica da estrutura telomérica. Tais proteínas constituem um complexo protéico responsável por manter a estabilidade do telômero e também por regular o acesso da telomerase (DMITRIEV et al., 2003; AUBERT e LANDSORP, 2008). Estes complexos protéicos são dinâmicos, podendo variar de acordo com o ciclo celular, idade da célula e estímulos externos (STEWART e WEINBERG, 2002; SMOGORZEWSKA e DE LANGE, 2004). Proteínas teloméricas podem ter associação direta ao DNA, a outras proteínas teloméricas, ou ainda ter associação a outros fatores, como os que compõem a maquinaria de reparo a danos ao DNA. As funções destas proteínas teloméricas variam, mas parecem estar associadas à região do telômero com a qual elas interagem. Complexos protéicos que se associam à fita simples do DNA telomérico participam no recrutamento da telomerase e influenciam a elongação telomérica. Por outro lado, complexos protéicos que se associam à fita dupla estão envolvidas na manutenção do *t-loop* e regulam a telomerase negativamente (DE LANGE, 2005; AUBERT e LANDSORP, 2008).

Em mamíferos o complexo multiprotéico de interação ao DNA telomérico, inicialmente denominado telossomo, é conhecido como *shelterin*, e recebeu esta denominação devido a sua função na proteção ao DNA telomérico (*shelter*, em português: abrigo, lugar de refúgio) (LIU, et al. 2004; DE LANGE, 2005). As proteínas que fazem parte do complexo *shelterin* possuem três características básicas: são abundantes nos telômeros, mas não se acumulam em outras partes da célula, estão presentes nos telômeros ao longo de todo o ciclo celular e têm função limitada aos telômeros. Não pertencer a *shelterin*, no entanto, não indica que a proteína não possua função telomérica. Significa apenas que a proteína não apresenta alguma das características citadas acima (DE LANGE, 2005). A figura 3 apresenta uma representação esquemática da dinâmica de atuação do complexo *shelterin* em humanos.



**Figura 3. Complexo *Shelterin* em humanos.** A) O complexo shelterin em humanos é formado pelas proteínas TRF1, TRF2, RAP1, TIN2, TPP1 e POT1. B) Na forma de *t-loop* (telômero fechado) ou forma não-replicativa, as proteínas TPP1 e POT1 formam um complexo com o DNA telomérico via TIN2 e TRF1/2 e a telomerase tem seu acesso bloqueado aos telômeros. C) Na forma replicativa (telômero aberto), o complexo TPP1/POT1 recruta e estimula a atividade enzimática da telomerase em telômeros curtos (Adaptado de GIARDINI et. al., 2014).

Recentemente, foi demonstrada a existência de outro complexo telomérico semelhante ao complexo CST, identificado primeiramente em linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*, denominado CST-like em vertebrados, mamíferos, fungos filamentosos e plantas. Em leveduras de brotamento,

CST é um complexo heterotrimérico constituído pelas proteínas Cdc13, Stn1 e Ten1, que se associa a fita telomérica rica em G, mais precisamente na porção telomérica 3'G *overhang* e tem a função de modular a função da telomerase e da maquinaria de replicação de DNA, participando assim da replicação nos terminais dos cromossomos (PENNOCK et al., 2001; GAO et al., 2007).

Nos complexos CST-like, ortólogos das proteínas Stn1 e Ten1 foram identificados, embora a proteína que cumpre função semelhante a Cdc13 (denominada proteína Ctc1), não compartilhe similaridade de sequência com Cdc13. As proteínas de ambos complexos, CST de *S. cerevisiae* (ScCST) e CST-like, apresentam domínios *OB-fold* envolvidos nas interações com a simples fita de DNA (ssDNA) e com outras proteínas (CHEN et al., 2012). No entanto, o complexo CST-like em humanos (hCST) apresenta funções ligeiramente diferentes quando comparado ao ScCST, como por exemplo: proteger os telômeros contra a indução de uma resposta a danos no DNA, estimular a DNA pol  $\alpha$  aumentando sua afinidade com o DNA molde e, finalizando a atividade da telomerase, como recentemente descrito (CASTEEL et al., 2009; MIYAKE et al., 2009; CHEN et al., 2012;). Além disso, o complexo CST de mamíferos se liga especificamente a porção telomérica 3'G *overhang* de um modo dependente de tamanho e se liga a porções de ssDNA maiores do que 50 nt de forma independente de sequência (WAN et al., 2009; CHEN et al., 2012; MIYAKE et al., 2009). Em mamíferos, a ligação de CST ao ssDNA telomérico requer o complexo heterotrimérico intacto, uma vez que os componentes CST não tem atividade de ligação ao DNA de forma independente (CHEN et al., 2013). Esta é uma grande diferença quando comparado ao ScCST, onde Cdc13 pode se ligar ao 3'G *overhang* na ausência dos seus parceiros, principalmente para mediar o recrutamento de telomerase (PENNOCK et al., 2001; BIANCHI et al., 2004; GIRAUD-PANIS et al., 2010).

Quando comparamos o complexo CST com o complexo *shelterin*, a visão predominante é que estes dois telômeros distintos evoluíram de forma independente, *shelterin* em vertebrados e CST em leveduras, mas descobertas recentes levantaram novas questões sobre a composição dos telômeros e seus mecanismos de regulação em eucariotos. Estudos envolvendo hCST mostraram que a eliminação da porção C-terminal de Ctc1 elimina sua interação com Stn1 e consequente associação com os telômeros (CHEN et al., 2012; CHEN et al., 2013). Além disso, a eliminação do 3'G *overhang* telomérico, o qual é sítio de interação para os componentes *shelterin* POT1-TPP1 aumenta a associação de hCST com os telômeros, sugerindo que os dois complexos competem pela ligação do 3'G *overhang* (CHEN et al., 2012). Além das interações entre hCST e o DNA telomérico, as interações entre as proteínas POT1-TPP1 e o hCST podem regular o acesso aos telômeros de ambos os complexos, evidenciando uma relação íntima entre o complexo CST e os componentes *shelterin* POT1-TPP1 (WAN et al., 2009; CHEN et al., 2013).

O ponto mais curioso sobre o complexo CST é a sua alta similaridade com um outro complexo de proteínas denominado RPA, cujo homólogo em *L. amazonensis* (LaRPA-1) é alvo deste trabalho. Como veremos mais adiante, RPA é um complexo heterotrimérico que se liga a ssDNA através de

uma série de domínios OB-fold, sendo essencial em vários processos do metabolismo de DNA como por exemplo replicação, reparo, recombinação homóloga e manutenção dos telômeros (LONGHESE et al., 1994, WOLD, 1997, SMITH et al., 2000, SAKAGUCHI et al., 2008). Estudos genéticos e estruturais recentes revelaram que os componentes de ScCST contém domínios OB-fold organizados de forma muito semelhante ao complexo RPA, sugerindo que ScCST é mais estreitamente relacionado com RPA do que aos componentes *shelterin* POT1-TPP1, mesmo que ambos tenham preferência por interagir com a ssDNA (SAKAGUCHI et al., 2008; SUN et al., 2009).

Outro ponto curioso é que, em humanos, POT1-TPP1 não tem a capacidade de impedir de modo eficiente a interação de RPA com o ssDNA telomérico, sugerindo que estas proteínas competem pela ligação ao 3' *overhang*, assim como ocorre entre POT1-TPP1 e o complexo CST (GIARDINI et al., 2014). Essa é mais uma evidência que sugere a grande proximidade entre o complexo RPA e o complexo CST. Em conjunto, essas evidências sugerem que estes complexos são muito conservados na escala filogenética e agem de forma orquestrada na manutenção e promoção da estabilidade dos telômeros nos mais diversos organismos.

### **1.8 Fenômenos biológicos que causam encurtamento telomérico (telômeros disfuncionais)**

Na maioria dos metazoários, determinados tipos de células apresentam encurtamento natural dos telômeros, os quais podem se tornar disfuncionais durante o envelhecimento celular. Isto acontece principalmente devido à perda da atividade da telomerase, como é o caso das células somáticas humanas. Neste caso, quando os telômeros estão criticamente curtos, uma resposta celular é disparada sinalizando para a célula parar o ciclo celular e senescer. Esse processo indica que essas células atingiram seu limite de capacidade de proliferação, conhecido como limite de Hayflick (GIARDINI et al., 2014).

A importância de uma estrutura telomérica intacta é destacada pelo fato de que telômeros disfuncionais formados por componentes mutantes da cromatina telomérica podem se recombinar ou se fundir, levando a grandes rearranjos genômicos. Um exemplo disto ocorre com a perda dos componentes *shelterin* POT1 ou TRF2 o que leva à ativação de quinases de *checkpoint* ATR/ATM nos telômeros, provocando diferentes respostas a danos ao DNA e uma grande variedade de fenótipos celulares aberrantes (GIARDINI et al., 2014).

Telômeros disfuncionais podem surgir também como consequência de outros mecanismos, como por exemplo, mutações nos componentes da telomerase, deleção de outros componentes dos complexos teloméricos e estresse dos mais variados tipos. Em fibroblastos humanos constatou-se que o estresse oxidativo induz perda de DNA telomérico e reduz bruscamente a interação dos componentes *shelterin* TRF1 e TRF2, demonstrando que o dano oxidativo exerce efeito deletério nos telômeros por perturbar a associação de proteínas responsáveis pela manutenção dos mesmos (OPRESKO et al., 2005; GIARDINI et al., 2014).

Em tripanosomatídeos (*T. brucei*), a deleção da telomerase causa encurtamento telomérico e esse encurtamento, ou até mesmo a completa deleção dos telômeros, não inibe a proliferação celular, embora induza a perda progressiva de DNA nas extremidades. Além disso, não há parada do ciclo celular, e os parasitos conseguem manter e segregarem os cromossomos com telômeros danificados ou ausentes, indicando ausência de *checkpoint* celular que ative outras maquinarias, como a de reparo a danos no DNA (GLOVER et al., 2007). Estudos indicam que nestes parasitos a manutenção do comprimento telomérico é tamanho-dependente, assim como ocorre em *S. cerevisiae* (HORN et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2004). Ou seja, telômeros curtos são estendidos mais rapidamente do que telômeros normais, e quando esses telômeros curtos se tornam longos, sua taxa de extensão declina (HORN et al., 2000). Isso ocorre, provavelmente, devido ao aumento ou diminuição dos sítios de ligação das proteínas teloméricas (e.g. componentes *shelterin* e/ou CST) que controlam o recrutamento da holoenzima telomerase.

### 1.9 A proteína RPA e suas funções nos telômeros

Como já mencionado anteriormente, a proteína ligante de DNA simples-fita RPA (*Replication Protein A*) é bastante conservada na escala evolutiva entre os eucariotos. Na maioria deles, RPA é composta por 3 subunidades (RPA-1, RPA-2 e RPA-3) que interagem formando um complexo heterotrimérico, apresentando múltiplas funções no metabolismo do DNA (LONGHESE et al., 1994, WOLD, 1997, SMITH et al., 2000, SAKAGUCHI et al., 2008).

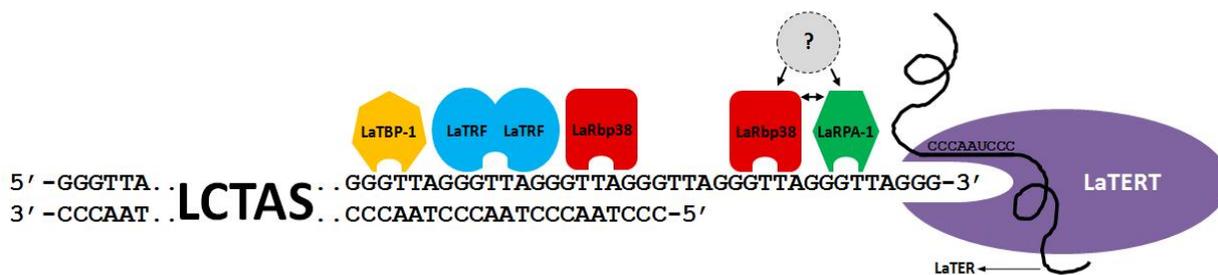
A proteína RPA-1 apresenta funções essenciais na manutenção dos telômeros de vários eucariotos, sobretudo a capacidade de recrutar a enzima telomerase (SMITH et al., 2000, SCHRAMKE et al., 2004, KIBE et al., 2007, KOBAYASHI et al., 2010). Em leveduras, esta habilidade é mediada por sua interação com a proteína Est1, ativando a telomerase para telômeros curtos na fase S do ciclo celular (SCHRAMKE et al., 2004). Em humanos, RPA aparece ocasionalmente nos telômeros durante a fase S do ciclo celular, levando-nos a especular se, em semelhança às leveduras, também existe uma interação direta entre as maquinarias de replicação e a maquinaria telomérica (VERDUN e KARLSEDER, 2006; CHAI et al., 2006). Além disso, RPA também interfere na regulação dos telômeros através de interações com outras proteínas. Ela é capaz de estimular a atividade das helicases WRN (*Werner syndrome*) e BLM (*Bloom syndrome*), encontradas em complexos que promovem a desnaturação da dupla-fita telomérica recoberta com TRF2, sugerindo que todas estas proteínas atuam em uma mesma via nos terminais cromossômicos (OPRESKO et al., 2002). Em leveduras de fissão mutantes para a proteína RPA, ocorre encurtamento gradual de telômeros. Quando esta mutação é combinada com outra no gene que codifica para o homólogo de TRF2 neste organismo (TAZ1), observa-se rápida erosão e instabilidade das extremidades cromossômicas (KIBE et al., 2007). Este mesmo fenótipo de instabilidade com perda abrupta dos telômeros é observado em mutantes duplos para o gene da POT1. Já a superexpressão de POT1 no

mutante de levedura para os genes de RPA e TAZ1 suprime a perda dos telômeros, restabelecendo a estabilidade telomérica, sugerindo alguma ligação entre o mecanismo de ação de POT1 com as proteínas RPA e TAZ1 (KIBE et al., 2007).

Em leveduras e humanos, pesquisadores demonstraram a participação de RPA em várias maquinarias de reparo a danos ao DNA, como por exemplo MMR (MODRICH, 2006), NER (BUSCHTA-HEDAYAT et al., 1999), BER (OTTERLEI et al., 1999) e reparo por recombinação homóloga (PARK et al., 1996; HAYS et al., 1998). A participação de RPA no reparo a danos ao DNA causado por estresse oxidativo também já foi evidenciada por outros autores (THERIOT, 2010; HEGDE, 2013; BRIERLEY e MARTIN, 2013). Isso demonstra uma alta relação entre RPA e a resposta a danos no DNA, sugerindo que o papel de RPA nessas maquinarias é essencial.

### 1.10 A composição da cromatina telomérica de *L. amazonensis* e a função de LaRPA-1

Em *Leishmania amazonensis* foi detectado a existência de três complexos protéicos que se associam *in vitro* ao DNA telomérico simples fita rico em G (FERNÁNDEZ et al., 2004). Em nosso laboratório, além da enzima telomerase (LaTERT) e de seu componente RNA (LaTER), responsáveis pela alongação dos terminais cromossômicos, duas proteínas que compõem dois desses complexos foram identificadas interagindo e co-localizando com os telômeros do parasita *in vivo* (GIARDINI et al., 2006; LIRA et al., 2007b; SIQUEIRA-NETO et al., 2007; VASCONCELOS et al., submetido). São elas: a proteína LaRbp38 (*Leishmania amazonensis* RNA binding protein 38) e a proteína ligante de DNA simples-fita alvo deste estudo, LaRPA-1 (FERNÁNDEZ et al., 2004). Também foram identificadas proteínas que se associam *in vitro* e *in vivo* à dupla-fita telomérica, dentre as quais estão LaTBP1 (*Leishmania amazonensis* Telomere Binding Protein 1), LaRbp38 (LIRA et al., 2007b e 2007c) e LaTRF (*Leishmania amazonensis* TTAGGG Repeat Binding Factor) (DA SILVA et al., 2010). A figura 4 apresenta o panorama atual da composição dos telômeros de *Leishmania amazonensis*.



**Figura 4. Panorama atual dos telômeros de *Leishmania*.** O DNA telomérico é composto por uma porção dupla-fita, formado pela repetição TTAGGG em *tandem*, seqüências subteloiméricas (LCTAS - *Leishmania* Conserved Telomere Associated Sequences) e uma protrusão 3'G-overhang. As formas coloridas representam as proteínas já identificadas interagindo com o DNA telomérico na forma de dupla fita: LaTRF, LaTBP1, LaRBP38 e simples fita: LaRBP38, LaRPA-1 e a enzima telomerase (LaTERT) com seu componente RNA intrínscio (LaTER) contendo o modelo reverso da sequência telomérica. Extraído de DA SILVA et al., 2012.

Apesar de compartilhar características estruturais com as RPA de outros eucariotos, as RPA-1 de vários protozoários, incluindo LaRPA-1, não possuem o domínio RPA-70 N de interação com proteínas da maquinaria de recombinação. A ausência deste domínio na proteína LaRPA-1, no entanto, não impede que ela participe da maquinaria de reparo a danos ao DNA, sobretudo quando esse dano ocasiona quebra de DNA na forma de dupla fita, como já foi mostrado por nosso grupo de pesquisa (DA SILVEIRA et al., 2013).

Em contrapartida, LaRPA-1 e seus ortólogos em outros protozoários apresentam os outros três domínios *OB-fold* característicos de RPA-1, sendo denominados em humanos DBD-A, DBD-B e DBD-C. O domínio *OB-fold* 1 (semelhante a DBD-A) de LaRPA-1, é o domínio de interação com o ssDNA telomérico (WOLD, 1997; JACOBS et al., 1999; SIQUEIRA-NETO et al., 2007; DA SILVEIRA et al., 2013).

Como já mencionado anteriormente, não existem ortólogos a nenhum dos componentes do complexo CST ou CST-like, nem do componente *shelterin* POT1 nos genomas de *Leishmania* e de outros tripanosomatídeos (dados não mostrados). Cdc13 é exclusiva de leveduras, enquanto POT1 e suas isoformas são conservadas em praticamente todos os eucariotos (SHAKIROV et al., 2009). Deste modo, a inexistência destas proteínas em *Leishmania* sugere que LaRPA-1 possa cumprir a função destas proteínas nos telômeros do parasita. Além disso, como nos telômeros de *Leishmania* LaRPA-1 aparece isolada das outras duas subunidades, é possível que ela desempenhe funções exclusivas nos terminais dos cromossomos e que estas possam ser diferentes das descritas para as RPA em outros eucariotos.

Para desvendar algumas das funções de LaRPA-1 em *Leishmania amazonensis*, estudamos a dinâmica de interações dessa proteína em parasitos submetidos à estresse oxidativo agudo. Deste modo, pretendemos entender se existe alguma relação entre a maquinaria telomérica e a eficiente maquinaria de reparo a danos ao DNA nesses parasitos, uma vez que os telômeros estão entre as regiões mais sensíveis a estresse oxidativo no genoma devido sua alta concentração de guaninas e presença de sítios 5'-GGG-3' (KAWANISHI e OIKAWA, 2004; RICHTER e VON ZGLINICK, 2007). Assim, um maior conhecimento das interações entre essa proteína e os telômeros, e sua dinâmica de atuação frente a estresse oxidativo, auxiliará a compreensão de possíveis alterações na composição da maquinaria telomérica de *Leishmania* na presença de agentes agressores durante seu ciclo de desenvolvimento. Isto pode vir a facilitar a descoberta de novos alvos antiparasitários e auxiliar futuras estratégias para a erradicação das leishmanioses, já que os telômeros estão diretamente relacionados à manutenção cromossômica e viabilidade celular.

## **2. Objetivos**

---

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Analisar a dinâmica do DNA telomérico e da proteína LaRPA-1 em formas promastigotas de *L. amazonensis* submetidas à estresse oxidativo agudo causado pelo tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

### **2.2 Objetivos específicos**

- Estipular a concentração ideal de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> que causa estresse oxidativo agudo nas formas promastigotas de *L. amazonensis*;

- Analisar os possíveis efeitos no ambiente intracelular de *L. amazonensis* (sobretudo no DNA) causado pelo estresse oxidativo agudo;

- Verificar se o estresse oxidativo agudo causa alterações no tamanho dos telômeros do parasita, utilizando diferentes metodologias;

- Analisar as possíveis alterações na dinâmica de interação da proteína LaRPA-1 com o DNA telomérico e outras proteínas após estresse oxidativo agudo;

- Analisar a proliferação dos parasitos submetidos ao estresse oxidativo por análise do ciclo celular, da replicação de DNA e do perfil de curvas de crescimento.

## **3. Metodologia**

---

### 3. Metodologia

#### 3.1 Cultura de parasitos e curva de crescimento celular

Os parasitos da espécie *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269, na forma promastigota, foram cultivados em fase mid-log de crescimento a 27°C em meio “199 (Earle)” (Cultilab), pH 7.4, suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) e 1X solução de antibióticos com antimicótico (penicilina/estreptomicina, Cultilab).

Para a curva de crescimento o cultivo celular foi iniciado na concentração de  $(1.10^6)$  parasitos/mL) e o tratamento com 2mM  $H_2O_2$  por 1h (estresse oxidativo) foi efetuado na fase exponencial ( $\sim 1.10^7$  parasitos/mL).

#### 3.2 Obtenção da $IC_{50}$ para $H_2O_2$ através do método de redução de MTT

Para determinação da  $IC_{50}$  do  $H_2O_2$  para *L. amazonensis* foi utilizado o método colorimétrico de redução de MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (MOSMANN, 1983). Este é um teste colorimétrico para a medição da atividade de enzimas que reduzem o corante MTT para cristais de formazan, proporcionando uma coloração arroxeada, o que permite avaliar a viabilidade e a proliferação das células, já que a redução do corante ocorre na mitocôndria de células em proliferação.

A concentração da solução estoque de  $H_2O_2$  (Dinâmica) foi determinada através de espectrometria a 240nm ( $1M A_{240nm} = 0,81$ ). Culturas de 1ml contendo aproximadamente  $1 \times 10^7$  parasitos foram tratadas com concentrações variadas de  $H_2O_2$  (0,1 mM, 0,25 mM, 0,5 mM, 0,75 mM, 1,0 mM, 2,0 mM e 3,0 mM) por 1 hora. Alíquotas das culturas (aprox.  $2 \times 10^6$  parasitos) foram centrifugadas 2.500 rpm por 5 minutos e as células foram ressuspensas em 200  $\mu$ l de 0,3 mg/ml MTT diluído em PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM  $Na_2HPO_4$ , 2 mM  $KH_2PO_4$ , pH 7.4) e incubadas em temperatura ambiente por 1,5 horas. Após este período foi adicionado 200  $\mu$ l de SDS 10% (em HCl 10 mM), as células foram homogeneizadas em agitador e incubadas por 15 minutos para lise celular e completa dissolução dos cristais de formazan gerados pelas células vivas. Amostras de 100  $\mu$ l foram retiradas de cada tubo e depositadas em placas de ELISA com fundo em U (Greiner Bio-one). A solução de MTT/sol de lise (v/v) foi utilizada como branco para as medidas espectrofotométricas. Valores de absorbância referentes à produção de formazan foram medidos em espectrofotômetro (Multiskan EX, Labsystems) a 540nm. A  $IC_{50}$  foi definida como a concentração de  $H_2O_2$  que inibiu a conversão do MTT para cristais formazan em cerca de 50% dos parasitos nas culturas testadas. Esse ensaio foi realizado em hexaplicata (6 experimentos independentes) para os grupos controle e tratados com  $H_2O_2$ . Em paralelo ao ensaio MTT, foram retiradas amostras da cultura e feitas contagens do número de parasitos em câmara de Neubauer (dados não mostrados).

### 3.3 Análise do ROS intracelular utilizando citometria de fluxo

Após determinação do  $IC_{50}$   $H_2O_2$  = 2,5 mM por 1h, resolvemos trabalhar com uma concentração de  $H_2O_2$  próxima a esse valor (2 mM por 1h) para provocar um estresse oxidativo agudo nos parasitos. Para verificação do nível de ROS intracelular, prosseguimos com o tratamento com 2 mM de  $H_2O_2$  por 1h diretamente em culturas de *L. amazonensis* contendo aproximadamente  $5 \times 10^7$  parasitos/ml em fase mid log de crescimento. Em seguida os parasitos foram lavados duas vezes com PBS 1X, separados em frascos contendo  $3 \times 10^7$  parasitos e ressuspensos em 2  $\mu$ M do reagente CM- $H_2$ DCFDA durante 30 min a 26 °C. Logo em seguida os parasitos foram lavados novamente em PBS 1X e ressuspensos em meio de cultura M199 fresco por 20 min a 26 °C. Em seguida os parasitos foram lavados em PBS 1X, fixados em formaldeído 1% durante 5 min e analisados utilizando-se citometria de fluxo (BD - Accuri C6 flow cytometer) através da contagem de 10.000 células por amostra (Controle e 2 mM  $H_2O_2$ ) e utilização do programa BD Accuri C6 software (BD Biosciences). As amostras foram quantificadas através de plotagens em histogramas (número de eventos x *FL1-Area*) e os gráficos de dispersão (*SSC-Height* x *FSC-Area* e *FSC-Area* x *FSC-Height*) foram utilizados para remoção de agregados inespecíficos. Estes ensaios foram realizados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Sérgio Schenkman, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

### 3.4 Extração de DNA genômico de *L. amazonensis* para ensaio HPLC/ECD

Culturas de *L. amazonensis* contendo aproximadamente  $5 \times 10^8$  parasitos/ml em fase mid log de crescimento foram tratadas nas diferentes condições de estudo e para extração do DNA genômico foi utilizado o método caotrópico NaI, como propoerto por Wang et al.,1994, com algumas modificações. Os parasitos foram centrifugados a 2000 g, lavados em tampão PBS 1X e ressuspensos em solução contendo 0,2M Tris, pH 8.0, 10mM EDTA, pH 8.0, 0,5% SDS, 50  $\mu$ g/mL proteinase K e 0,15 mM mesylato de deferoxamina. Essa mistura foi incubada por 12h a 37 °C com agitação suave. Em seguida foi adicionado à solução RNase A para concentração final de 0,5  $\mu$ g/ $\mu$ L. Então a reação foi incubada a 37°C por 30 minutos. Em seguida essa solução foi centrifugada a 2000 g durante 10 min e a fase líquida foi recolhida e 1 mL de 7,6 M NaI foi adicionado a ela, seguindo-se da adição de 1 mL de isopropanol 100%. O conteúdo foi misturado por inversão e o precipitado (DNA) foi recolhido por centrifugação a 5000 g durante 15 min. Em seguida prosseguimos com a lavagem, utilizando 1 mL de isopropanol 40% (v/v), seguido por 1 mL de etanol 70 % (v/v). O DNA foi então ressuspensão em 0,1 mM mesylato de deferoxamina. A concentração das amostras de DNA foi estimada utilizando-se espectrofotômetro a 260 nm.

### **3.5 Hidrólise enzimática das amostras de DNA extraído para ensaio HPLC/ECD**

Para hidrólise de 100 µg de DNA, 2 µL de 1M de tampão acetato de sódio (pH 5.0) e 1 U de nuclease P1 foram adicionados às amostras, as quais foram incubadas a 37 °C por 30 min. Em seguida 10 µL de 1M tampão tris-HCl (pH 7.4), 100 mM de acetato de magnésio e 3 U de fosfatase alcalina foram adicionados e as reações foram incubadas a 37 °C por 1h. Esse mesmo procedimento foi aplicado para as amostras analisadas quanto a presença de 8-oxodGuo e também para as amostras que foram analisadas quanto a presença de dGuo. As enzimas utilizadas no processo de hidrólise foram eliminadas pela adição de um volume de clorofórmio após a incubação e a quantidade de DNA utilizada variou entre 90 e 200 µg para ambas as análises.

### **3.6 Análise de 8-oxo dGuo através de HPLC/ECD**

As amostras (90-200 µg) de DNA hidrolizado foram injetadas em sistema HPLC/ECD (modelo Shimadzu LC-10 AD pump, Shimadzu, Tokyo, Japão) conectado a uma coluna analítica de fase reversa apolar Luna C18 (250 mm x 4,6 mm i.d., 5 µm) (Phenomenex, Torrance, CA) a qual foi mantida a 25 °C em compartimento CTO-10AS VP (Shimadzu, Tokyo, Japão). O eluente isocrático utilizado foi 25 mM de tampão KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 5.5) e 8% metanol sob um fluxo de 1 mL/min. A detecção coulométrica foi realizada através do detector Coulochem II (ESA, Chelmsford, MA, USA) e a detecção espectrofotométrica foi realizada pelo detector Shimadzu SPD-10A (Shimadzu, Tokyo, Japão). O potencial do eletrodo foi ajustado para 280 mV para detecção de 8-oxodGuo. A eluição de nucleosídeos não-modificados foi monitorada simultaneamente pelo detector Shimadzu SPD-10AV/VP UV ajustado para 254 nm. O software Shimadzu Class-LC10 1.6 foi utilizado para calcular as áreas dos picos. A razão molar entre 8-oxodGuo e dGuo em cada amostra de DNA foi determinada através da detecção coulométrica de 8-oxodGuo a 280 mV e detecção da absorbância de dGuo a 254 nm em cada injeção.

Vale ressaltar que os ensaios utilizando HPLC/ECD apresentados foram realizados em colaboração com o laboratório da Profa. Dra. Marisa Helena G. de Medeiros, no Instituto de Química, USP, São Paulo.

### **3.7 Análise do dano provocado ao DNA através do ensaio TUNEL**

Aproximadamente 1.10<sup>6</sup> parasitos em fase mid-log de crescimento tratados nas diferentes condições de estudo foram centrifugados, lavados com PBS 1X e fixados em formaldeído 1% durante 5 min. Os parasitos foram então centrifugados, lavados novamente com PBS 1X e permeabilizados pela adição do detergente Triton X-100 0,1% diluído em PBS 1X durante 5 min a temperatura ambiente. Logo em seguida foi adicionado Glicina 0,1M diluída em PBS 1X (para retirada total de grupos aldeídos remanescentes), deixando os parasitos incubando por mais 5 min. Após este período de incubação, os parasitos foram lavados novamente com PBS 1X e então adicionados

delicadamente em uma lâmina pré-preparada com poli-L-lisina. Após estarem fixados na lâmina com poli-L-lisina, prosseguimos com protocolo pré-estabelecido para células em suspensão fornecido pelo fabricante do kit utilizado (Apoptosis Detection System, Fluorescein – Promega).

Ao final do processo descrito no protocolo do kit, adicionamos 5 µL de Vectashield (suplementado com DAPI) - Vector. A lâmina foi então selada com lamínula de vidro e incubada por 24h à -20°C para posterior observação em microscópio de fluorescência. Devemos ressaltar que o kit utilizado foi inicialmente desenvolvido para detecção de células em apoptose, mas houve a necessidade de modificação do protocolo inicial, através da permeabilização das células (devido a estrutura e composição das membranas de células em apoptose) para detecção apenas do DNA danificado, sendo que, com essa modificação, as células não necessitam mais estar em apoptose para serem analisadas. A imagem exposta na figura representa um conjunto previamente analisado de 10 imagens com aproximadamente 20 células em cada uma delas.

### **3.8 Extração de DNA genômico de *L. amazonensis* para ensaio Southern blot e telomere-PCR**

O DNA genômico foi extraído de parasitos, na forma promastigota, originados de culturas em fase exponencial de crescimento. Estes foram separados do meio de cultura por centrifugação, lavados em tampão PBS 1X contendo 2% de glicose e sedimentados por centrifugação a 10.000 rpm por 30 segundos. Para proceder com a lise celular, os sedimentos foram suspensos em solução contendo 10 mM Tris-HCL pH 7,5, 5 mM EDTA pH 8,0, 100 mM cloreto de lítio e 0.1% Triton X-100. A mistura foi incubada por 5 min a temperatura ambiente com agitação suave, seguido de 2-3 extrações com fenol:clorofórmio (v/v) e fenol:clorofórmio:álcool isoamílico (25:24:1) e precipitação com etanol absoluto na presença de 0,3 M de acetato de sódio pH 5,2. Os ácidos nucléicos precipitados foram ressuspendidos em TE (Tris-HCl 10 mM pH 7,5, EDTA 1mM pH 8,0) e tratados com 10µg de RNase A por 15 min a 37°C, seguido de extração com fenol:clorofórmio:álcool isoamílico, precipitação do DNA com 0,3 M de acetato de sódio pH 5,2 e etanol absoluto e centrifugação a 10.000 rpm por 30 minutos. Os sedimentos foram lavados com 75% etanol gelado e suspensos em tampão TE. A qualidade da extração e a concentração de DNA foram estimadas utilizando-se corrida eletroforética em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) em 0,5X TAE (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA) e por dosagem da DO<sub>260</sub> nm em espectrofotômetro com luz UV (Sambrook & Russel, 2001).

### **3.9 Digestão do DNA genômico e ensaio Southern blot para verificação do comprimento telomérico**

Para isolar o telômero do restante do DNA genômico nós realizamos digestões com a enzima *Afa* I (37 °C durante 12h), fracionamos o DNA digerido em um gel de agarose 1%, transferimos (por capitalidade) o DNA para uma membrana Hybond N+ (GE Healthcare) e prosseguimos com a

hibridização e lavagens, segundo especificações do fabricante, utilizando o kit de marcação a frio *Telo TAGGG telomere length assay* (Roche). Para cada amostra de DNA genômico foi utilizado 2,5 µg de DNA, o qual foi digerido com 6U da enzima *Afa I*.

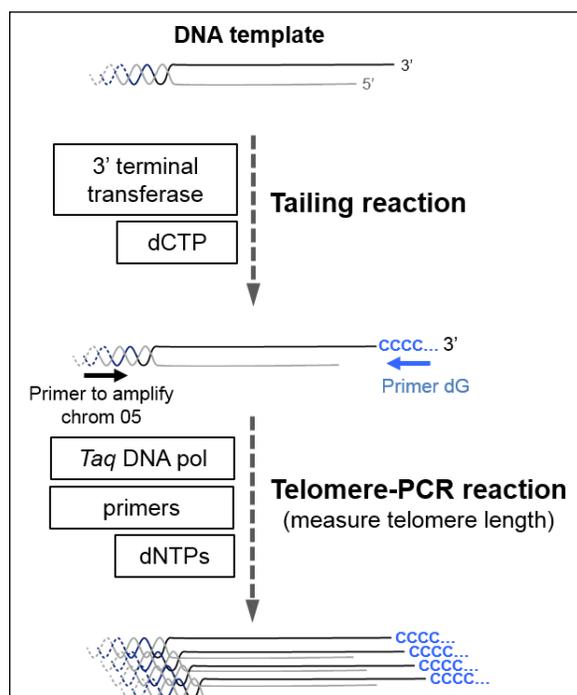
Essa metodologia é uma descrição sucinta e adaptada do protocolo proposto por CONTE e CANO, 2005.

### 3.10 Estimativa dos TRFs dos cromossomos de *L. amazonensis*

A medida quantitativa do tamanho dos fragmentos de DNA foi realizada por meio da detecção do sinal quimioluminescente pelo fotodocumentador ImageQuant (GE Healthcare Life Science). A média do TRF em kb foi calculada pela fórmula  $\Sigma(\text{OD}_i) / \Sigma(\text{OD}_i / L_i)$ , onde  $\text{OD}_i$  representa o sinal quimioluminescente e  $L_i$  o tamanho do TRF na posição  $i$  da membrana (CONTE e CANO, 2005).

### 3.11 Telomere-PCR para verificação do comprimento telomérico

O DNA genômico total (30-100 ng) de parasitos tratados e não tratados com  $\text{H}_2\text{O}_2$  foi utilizado para reação de telomere-PCR como descrito por FORSTEMANN et al., 2000 e TEIXEIRA et al., 2004. Descrevendo brevemente, o DNA genômico foi desnaturado e uma cauda poli-C foi adicionado na extremidade 3' através da presença de dCTP e atividade da enzima TdT (Invitrogen). Os telômeros foram então amplificados utilizando-se um primer (5'-CGGGTCTACGTATAGTTGCG-3') que hibridiza especificamente na região sutelomérica do cromossomo 5 e com um primer (5'-GGGGGGGGGG-3') complementar à cauda poli-C. Para amplificação do cromossomo 18, o primer (5'-ATGCGCATGCTGCTGAC-3') específico para a região telomérica desse cromossomo foi utilizado. A figura 5 apresenta um esquema simplificado da técnica.



**Figura 5. Esquema simplificado da técnica de telomere-PCR.** O DNA molde (*DNA template*) utilizado passa por uma reação cujo principal agente é a enzima TdT, denominada *tailing reaction*, recebendo uma cauda poli-C. Depois disso uma reação de PCR convencional (*telomere-PCR reaction*) é realizada utilizando-se primers específicos para determinados cromossomos em conjunto com um primer dG que hibridizará na cauda poli-C adicionada anteriormente.

Vale ressaltar que a técnica de telomere-PCR foi desenvolvida durante doutorado sanduiche em colaboração com o laboratório da Dra. Maria Teresa Teixeira, IBPC-CNRS, Paris, França.

### **3.12 Flow-FISH para verificação do comprimento telomérico**

#### 3.12.1 Avaliação dos parâmetros morfométricos

O padrão de granulosidade e tamanho (SSC x FSC) dos parasitos *L. amazonensis* foi avaliado após etapas de hibridização com a sonda telomérica. Os padrões morfométricos foram avaliados após tratamento com 70% de formamida, necessário para a etapa de hibridização com a sonda telomérica. A viabilidade celular foi determinada com LDS 751. Foram adquiridos 40.000 eventos para cada amostra.

#### 3.12.2 Análise das amostras

Para cada grupo de amostras, os parasitos *L. amazonensis* (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e controle) e os leucócitos humanos foram ressuspensos em solução PBS 1X contendo 10% de SBF/DNase (1µg/mL) e contados em câmara de Neubauer.

Alíquotas contendo  $0,5 \times 10^6$  parasitos *L. amazonensis* em fase exponencial (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e controle) foram colocadas em 8 tubos em replicata (A<sub>c</sub>, B<sub>c</sub>, C<sub>c</sub>, D<sub>c</sub> para controle e A<sub>t</sub>, B<sub>t</sub>, C<sub>t</sub>, D<sub>t</sub> para tratado com 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), contendo cada um  $1 \times 10^6$  leucócitos em volume final aproximado de 50µL. Nos tubos A<sub>c</sub>, A<sub>t</sub> e B<sub>c</sub> e B<sub>t</sub> foram adicionados 500µL de solução de hibridização contendo uma sonda peptídeo de ácido nucléico (PNA) (CCCTAA)<sub>3</sub> conjugada com FITC e nos tubos C<sub>c</sub>, C<sub>t</sub> e D<sub>c</sub>, D<sub>t</sub> foram adicionados 500µL da solução de hibridização sem sonda (controle não marcado). Todos os tubos foram homogeneizados e deixados em temperatura ambiente por 10 minutos protegidos da luz. Logo em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria à 82°C por 15 minutos e mantidas em temperatura ambiente *overnight* (16h-18h) para desnaturação do DNA e hibridização com a sonda telomérica. As amostras foram lavadas com solução do kit Telomere PNA kit/FITC (Dako) e processadas de acordo com as instruções do fabricante. As células foram centrifugadas, ressuspensas em 400µL de solução LDS 751 (200 mg/µL) e incubadas a 4 °C por 30-90 minutos. As amostras foram mantidas sob proteção da luz à 2-8°C até aquisição dos dados pelo citômetro de fluxo.

### 3.12.3 Aquisição de dados

Em cada amostra, as células em suspensão foram avaliadas quanto aos parâmetros tamanho (FSC-*Forward Scatter*), granulosidade (SSC-*Side Scatter*) e intensidade de fluorescência média (MFI). Os detectores de FSC e SSC foram ajustados para aquisição em escala linear e os canais de fluorescência em escala logarítmica (canal FL1) e linear (canal FL3). No canal FL1 foi detectada a fluorescência emitida pela sonda PNA telomérica conjugada ao isotiocianato de fluoresceína – FITC (512nm – 558nm) e em FL3 (665nm – 695nm) a emitida pelo marcador de DNA LDS 751, ambos excitados pelo laser 488nm. Para cada amostra foram adquiridos 40.000 eventos.

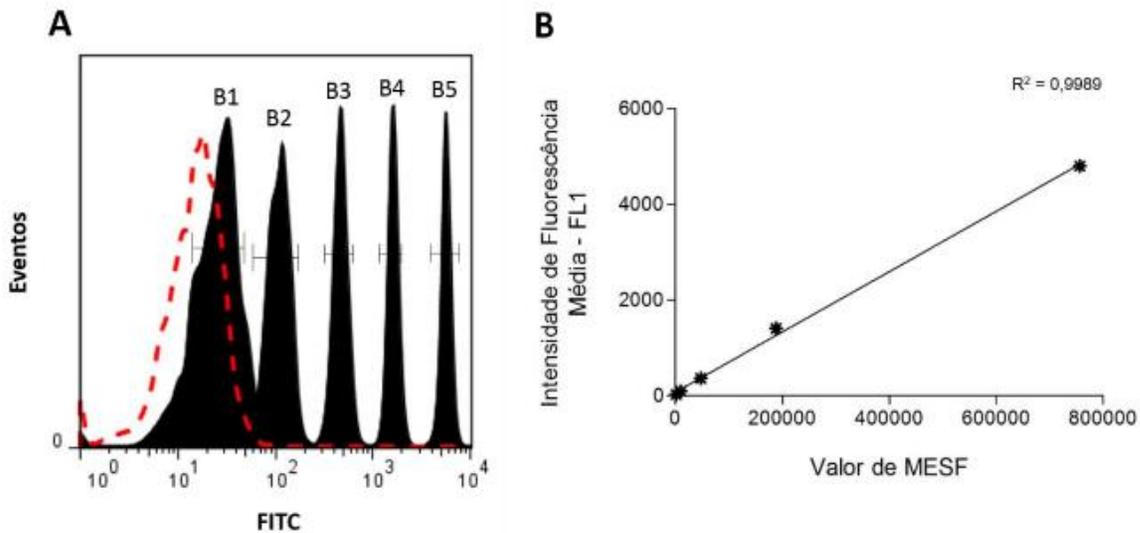
### 3.12.4 Estratégia de análise

A análise inicial consistiu na avaliação dos parâmetros morfométricos das células por meio do *dotplot* FSC x SSC. *Gates* foram utilizados para selecionar populações de interesse e excluir agregados e partículas. Após remoção dos agregados, duas populações foram selecionadas com base nos parâmetros LDS 751-H x FSC-A: *L. amazonensis*, células de marcação intermediária com LDS 751, e os leucócitos (controle interno), células de baixa marcação com LDS 751 e maior tamanho.

Para cada grupo de amostras (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e controle), 4 replicatas foram analisadas quanto aos parâmetros LDS 751-Height x FSC-Area e intensidade de emissão de fluorescência em FL1-FITC. Foi avaliada a MFI do canal FL1 das populações de *L. amazonensis* (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e controle) e leucócitos nas amostras A<sub>c</sub>, A<sub>t</sub> e B<sub>c</sub>, B<sub>t</sub> (hibridizadas com a sonda telomérica) e nas amostras C<sub>c</sub>, C<sub>t</sub> e D<sub>c</sub>, D<sub>t</sub> (controles não marcados). Estes últimos foram utilizados para determinar a autofluorescência das células. A análise dos dados foi realizada utilizando-se o software *FlowJo* v.7.6.5.

### 3.12.5 Estimativa do tamanho telomérico através de MESF

Antes da aquisição das amostras, o citômetro foi calibrado com o kit de MESF *beads* (*Molar Equivalent Standard of Fluorescence*), conforme descrito em 3.1.2. O kit é composto por 5 populações de esferas de tamanhos semelhante que são conjugadas a uma quantidade conhecida de moléculas FITC. Quando analisadas, cada população fornece um valor de intensidade média de fluorescência referente a quantidade de fluorocromo conjugada à elas. A calibração do canal FL1-FITC com essas *beads* fornece uma curva que permite a correlação entre o valor de intensidade de fluorescência (MIF) e número de moléculas de fluorocromo (MESF) (figura 6).



**Figura 6. Quantum™ FITC-5 MESF beads.** **A)** Histograma com as Quantum™ FITC-5 MESF beads. Regiões B1-B5 correspondem aos 5 picos referentes às populações conjugadas aos fluorocromos FITC e o histograma pontilhado em vermelho corresponde às *beads* não-marcadas; **B)** Calibração do canal FL1-FITC do citômetro de fluxo (JSAN). Os pontos na curva correspondem ao valor de MFI gerado pelo citômetro para cada população de bead. O valor de MESF de cada população é lote-específico e determinado pelo fabricante.

O número de moléculas de FITC conjugadas à sonda telomérica é conhecido. Deste modo, a curva gerada pelas MESF *beads* estabelece uma relação proporcional entre o número de sondas hibridizadas e o tamanho dos telômeros, ou seja, quanto maior o valor de MESF, maior os telômeros.

Para obtenção do valor de MESF, é necessário determinar o valor médio de MFI de cada amostra analisada. Para isso, as replicatas correspondentes a cada amostra foram analisadas em pares compostos por um tubo contendo a sonda telomérica e pelo controle não marcado. O valor médio de MFI de cada par de amostra foi obtido subtraindo a intensidade de fluorescência em FL1 do controle não marcado (autofluorescência) da fluorescência obtida no mesmo canal correspondente à amostra marcada com a sonda telomérica (figura 8 D e H). A partir do valor médio de MFI, o valor de MESF foi calculado pelo software Quantum™ FITC MESF (Bangs Laboratory) por meio de uma regressão linear (KAPOOR e TELFORD, 2004).

Vale ressaltar que os ensaios utilizando a técnica de flow-FISH foram realizados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Rodrigo Tocantins Calado, no laboratório de hematologia, USP, Ribeirão Preto.

### 3.13 Ensaio CHIP para verificação da interação *in vivo* entre LaRPA-1 e as fitas teloméricas ricas em C e G

Aproximadamente 1.10<sup>8</sup> parasitos (não tratados (controle) e tratados com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1 hora), provenientes de uma cultura de *L. amazonensis* em fase *mid* log de crescimento, foram fixados (*crosslink*) com formaldeído a 1% em meio de cultura durante 30 min a temperatura ambiente. A

reação de *crosslink* foi parada por incubação com 125 mM de glicina, durante 5 min. As células foram então lavadas em PBS 1X e resuspensas em tampão de lise (25 mM Tris-HCl, 2 mM de EDTA, 0,0275 % de SDS, 0,5 mM phenylmethylsulfonyl fluoride e 1X inibidor de protease, pH 8.0). As células foram rompidas por sonicação e o DNA foi fragmentado de forma a obtermos fragmentos de cromatina com 0,2 - 0,5 kb, os quais foram separados por centrifugação a 14.000 g durante 10 min a 4° C.

Como controle, alíquotas correspondendo a 10 % do input (porcentagem do número total de células utilizadas em cada imunoprecipitação) foram separadas. O sobrenadante foi diluído sete vezes em tampão de imunoprecipitação (25 mM Tris-HCl, 0,01 % SDS, 0,6 % Triton X-100, 2 mM EDTA, 175 mM de NaCl, 10 % de glicerol e 1X inibidor de protease, pH 8.0) e, em seguida, pré-clareado com 30 µl de proteína A-Sepharose durante 2 h a 4° C sob leve agitação.

O sobrenadante foi recolhido por centrifugação, aliqotado em partes iguais (3 partes) e incubado por 12h a 4° C com 40 de µl de soro policlonal anti-LaRPA-1 (uma parte), sob leve agitação. Antes da realização do ensaio ChIP, a especificidade do soro anti-LaRPA-1 foi testada em ensaios Western blot, que confirmou que ele reconhece apenas uma banda em extratos protéicos totais de *L. amazonensis* (dados não mostrados). Como controle, as demais partes da cromatina foram imunoprecipitadas com 40 µl de soro pré-imune (uma parte) e incubada na ausência de anticorpos (uma parte).

*Beads* de Proteína A-Sepharose foram adicionados às suspensões de cromatinas imunoprecipitadas e cada mistura foi incubada durante 3 h a 4° C. Em seguida cada mistura foi lavada uma vez a 4° C com 1 X tampão low salt (20 mM Tris-HCl, 0,1 % de SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM de EDTA, 0,15 M de NaCl, pH 8.0), seguido por três lavagens com 1 X tampão high salt (20 mM Tris-HCl, 0,1 % SDS, 1 % Triton X-100, 2 mM de EDTA, 0,5 M NaCl, pH 8.0), uma lavagem com tampão de lítio (10 mM Tris-HCl, 0,25 M LiCl, 1 % NP-40, 1 mM EDTA, 1 % sodium deoxycholate, pH 8.0) e duas lavagens com 1 X tampão Tris-EDTA (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0). A cromatina imunoprecipitada foi eluída a partir das *beads* com tampão de eluição (1% SDS, NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M), misturando por 15 min a 4° C. Para reverter o *crosslink*, amostras do input foram incubadas com 0,3 M NaCl durante pelo menos 4 h a 65° C. Em etapas subsequentes, as reações de input foram tratados como as amostras imunoprecipitadas. As amostras foram suplementadas com 25 mM Tris-HCl (pH 7.4) e EDTA 1 mM (pH 8.0) e incubadas com 20 µg de RNase A durante 30 min a 37° C, seguido de digestão com 40 µg de proteinase K durante 1 hora a 37° C. O DNA foi extraído uma vez com fenol/clorofórmio (v/v), precipitado com isopropanol, lavado com etanol 70% e ressuspensão em água.

Após a realização do ensaio, os produtos do ensaio foram desnaturados a 95° C por 5 min, aplicados em aparelho do tipo Dot-Blot (Bio-Dot SF – Bio-Rad), transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Bio-Rad) e reveladas utilizando-se sondas marcadas com fósforo radioativo <sup>32</sup>P (TelC e

telG) para detecção respectiva das fitas teloméricas ricas em G e em C. Como controle de especificidade foi utilizado uma sonda de DNA marcada radioativamente ( $\gamma$ -ATP  $^{32}\text{P}$ ) complementar à uma região presente exclusivamente no DNA do cinetoplasto (kDNA).

### **3.14 Co-localização entre LaRPA-1 e as fitas teloméricas C e G por ensaio FISH-IIF sem desnaturação**

Inicialmente procedemos com o ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI) onde amostras tratadas com 2mM de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por 1h e não tratadas (controle), contendo aproximadamente  $1.10^6$  parasitos em fase mid-log de crescimento cada, foram centrifugadas, lavadas com PBS 1X e fixadas em formaldeído 1% durante 5 min. As amostras foram então novamente centrifugadas, lavadas com PBS 1X e permeabilizadas pela adição do detergente Triton X-100 0,1% diluído em PBS 1X durante 5 min a temperatura ambiente. Logo em seguida, foram incubadas durante mais 5 min na presença de Glicina 0,1M diluída em PBS 1X (para retirada total de grupos aldeídos remanescentes). Em seguida, foram novamente centrifugadas e incubadas por 12 h à 4°C com o soro anti-LaRPA-1 diluído em PBS 1X + 4% BSA na proporção 1:4000. Logo após, as amostras foram lavadas com PBS 1X e incubadas em ambiente escuro por 4 h à 4°C com o anticorpo secundário Alexa Fluor 555 diluído em PBS 1X + 4% BSA na proporção 1:4000. Após este período de incubação, foram lavadas novamente com PBS 1X e então adicionadas delicadamente em lâminas pré-preparadas com poli-L-lisina. Após os parasitos terem aderido às lâminas, as mesmas foram lavadas novamente de maneira exaustiva com PBS 1X e, logo em seguida, procedemos com o ensaio FISH.

O ensaio FISH foi realizado utilizando-se algumas soluções do kit Telomere-PNA FISH (DAKO), e sondas PNA FITC específicas para hibridização na fita C telomérica (sonda telC) e na fita G telomérica (sonda telG). Após fixação dos parasitos na lâmina com *poli-L-lisina* e lavagem com PBS 1X, eles foram desidratados de maneira seriada mergulhando-se a lâmina, respectivamente, nas soluções: etanol 70%, etanol 85% e etanol 90%. Em seguida, após a secagem da lâmina, adicionou-se uma *frame* adesiva, deixando uma região central onde se concentrou a maior quantidade de parasitos. Nesta região central da *frame*, adicionou-se 10  $\mu\text{L}$  da sonda telomérica FITC (PNA) (telC ou telG) e, em seguida, a *frame* adesiva foi fechada com uma lamínula plástica, tomando-se cuidado para que não houvesse formação de bolhas de ar. A reação de hibridização com as sondas teloméricas foi realizada sem desnaturação, durante 2h a 4°C. Em seguida, os parasitos foram incubados em *Wash Solution* a 25°C por 5 min e seguimos com o procedimento de desidratação dos mesmos, mergulhando-se novamente as lâminas seqüencialmente nas soluções de etanol 70%, etanol 85% e etanol 90%. Após secagem da lâmina a temperatura ambiente, a lamínula plástica foi retirada junto com a *frame* adesiva, e foi adicionado 5  $\mu\text{L}$  de Vectashield suplementado com DAPI (Vector). A lâmina foi então selada com lamínula de vidro e incubada por 24h à -20°C para posterior observação em microscópio de fluorescência (Nikon 80i). Os parasitos que foram hibridizados com a

sonda telG foram tratados com RNase A (10 µg/µL) a 37° C durante 30 min após aplicação na lâmina. Devemos ressaltar que após a adição do anticorpo secundário, todas as etapas seguintes foram realizadas em local com total ausência de luz e as imagens mostradas nas figuras 12A e B representam um conjunto previamente analisado de aproximadamente 50 células.

### **3.15 Análise do conteúdo de DNA através de FACS**

Para verificação do conteúdo de DNA nos dois diferentes grupos (controle e tratados com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h) através de citometria de fluxo pelo método FACS, utilizamos o kit Cycletest Plus (BD Biosciences) segundo especificações do fabricante. Os parasitos foram coletados antes e após 1h, 4h, 8h e 20h de estresse oxidativo. As amostras foram analisadas em citômetro de fluxo (FACSCalibur – BD).

Vale ressaltar que os ensaios utilizando a técnica de FACS e citometria de fluxo foram realizados em colaboração com o laboratório do Prof. Dr. Rodrigo Tocantins Calado, no laboratório de hematologia, USP, Ribeirão Preto.

### **3.16 Ensaio de incorporação de EdU para verificação da replicação de DNA**

Para verificação da replicação do DNA nos grupos controle e tratado, prosseguimos com a incorporação de 20 mM de EdU diretamente em culturas de *L. amazonensis* contendo aproximadamente 5x10<sup>7</sup> parasitos/ml em fase mid log de crescimento. As culturas permaneceram sob a presença de EdU por 14h (2 ciclos celulares) para garantir uma completa incorporação. Em seguida os parasitos foram centrifugados, lavados com PBS 1X e fixados em formaldeído 1% durante 5 min. Os parasitos foram então novamente centrifugados, lavados com PBS 1X e permeabilizados pela adição do detergente Triton X-100 0,1% diluído em PBS 1X durante 5 min a temperatura ambiente. Os parasitos foram então incubadas durante mais 5 min na presença de Glicina 0,1M diluída em PBS 1X (para retirada total de grupos aldeídos remanescentes), centrifugados, lavados e incubados por 2 h a temperatura ambiente com a reação de ciclo-adição (1 µM CuSO<sub>4</sub>, 100 mM ácido ascórbico e 10 µM azida fluorescente 488 diluídos em PBS 1X). Após este período de incubação, as amostras foram lavadas novamente com PBS 1X e então adicionadas delicadamente em lâminas pré-preparadas com poli-L-lisina. Após os parasitos terem aderido às lâminas, as mesmas foram lavadas de maneira exaustiva com PBS 1X e, logo em seguida, foi adicionado 5 µL de Vectashield suplementado com DAPI (Vector). As lâminas foram então seladas com lamínula de vidro e incubadas por 24h à -20°C para posterior observação em microscópio de fluorescência (Nikon 80i). Vale ressaltar que este ensaio é uma adaptação do ensaio desenvolvido por SALIC e MITCHISON (2008).

### **3.17 Curva de crescimento**

Iniciamos o cultivo em duas garrafas contendo em cada uma  $1 \times 10^6$  células/mL em meio M199 a 28° C. A multiplicação celular foi acompanhada a cada 12h até as mesmas atingirem fase exponencial de crescimento (após 96h). Na fase exponencial, realizamos o tratamento com 2 mM  $H_2O_2$  por 1h em uma das garrafas, deixando a outra sem tratamento (controle). Logo em seguida, retiramos amostras para realização da contagem no número de células e removemos o meio M199 de ambas as garrafas, ressuspendendo-as em meio M199 fresco. A partir desse momento retomamos a contagem do número de células a cada 12h, até 120h após o tratamento. A contagem do número de células foi realizada utilizando-se câmara de Neubauer (Precicolor - HBG) e microscópio invertido (Nikon Eclipse TS100). O experimento foi realizado em triplicata e de maneira independente.



## **4. Resultados**

---

## 4. Resultados

Além dos capítulos de livros mencionados no tópico 'Introdução', nosso grupo de pesquisa produziu quatro artigos científicos (DA SILVEIRA et al., 2013; DA SILVA et al., 2013, VASCONCELOS et al., 2014 (submetido) e DA SILVA et al., (em preparação)) durante meu período de doutorado (janeiro de 2010 à agosto de 2014), os quais fazem parte integral de toda a pesquisa produzida neste período, sobretudo a contida nesta tese. Os resumos, bem como os títulos desses artigos científicos, encontram-se no tópico 'anexos' ao final deste manuscrito e também constam nas referências bibliográficas.

### 4.1 O tratamento de formas promastigotas de *L. amazonensis* com 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h (estresse oxidativo agudo) aumenta os níveis de ROS intracelular, causa oxidação das guaninas e, conseqüentemente, dano ao DNA.

Tomando como base a definição de estresse oxidativo citada anteriormente na introdução, podemos definir estresse oxidativo agudo como um grande e pontual desequilíbrio entre a produção de ROS e a sua desintoxicação. Eventualmente, a maneira mais fácil para causar tal desequilíbrio seria aumentar a quantidade de ROS. Para isso nós utilizamos peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), que é um tipo de ROS e principal responsável por causar dano oxidativo, sendo amplamente utilizado pelos mais diversos grupos de pesquisa (WILSON et al., 1994; DAS et al., 2001; OPRESKO et al., 2005; DUAN et al., 2005).

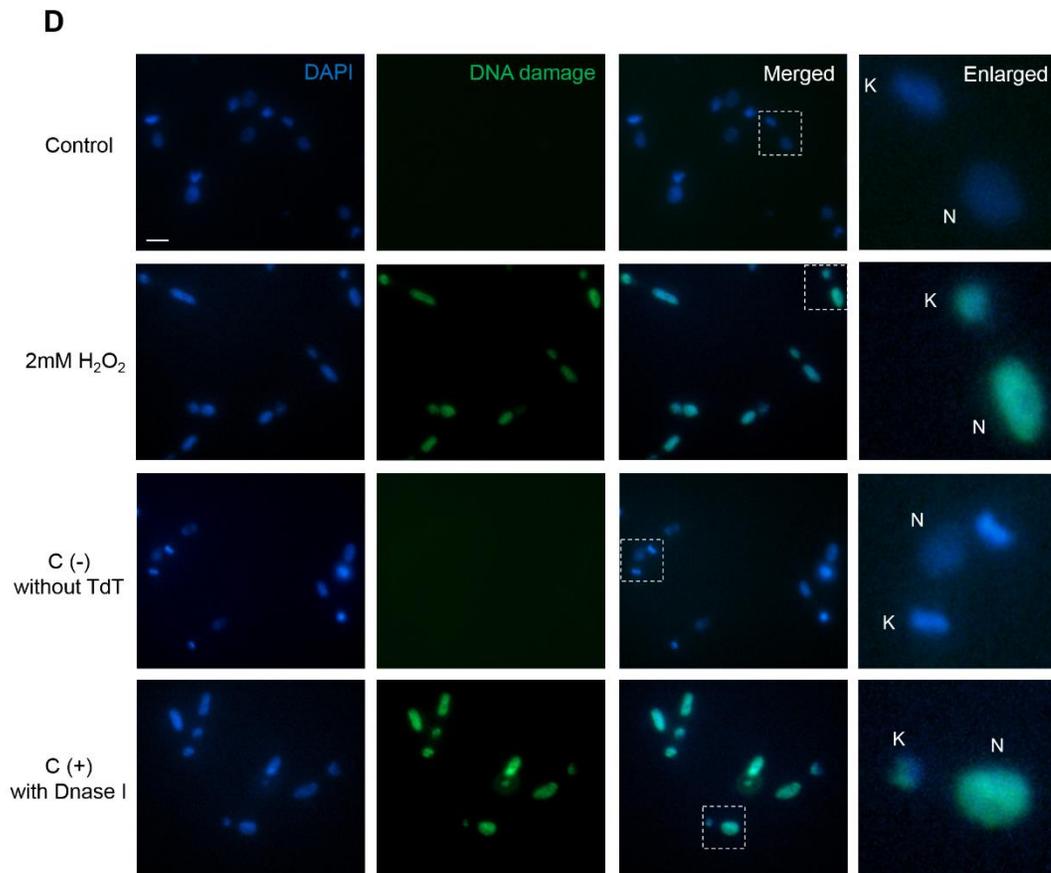
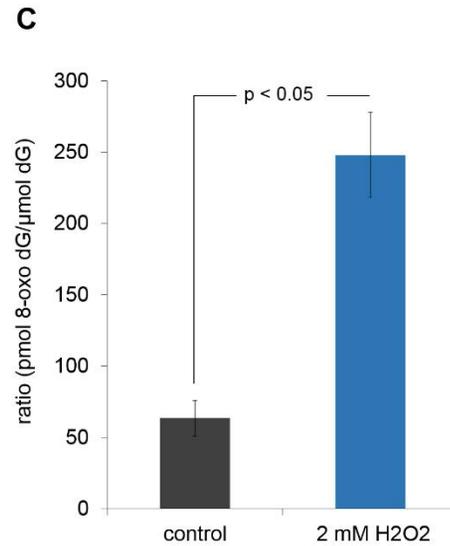
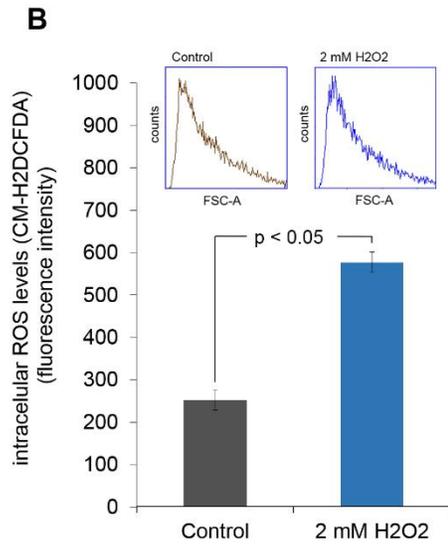
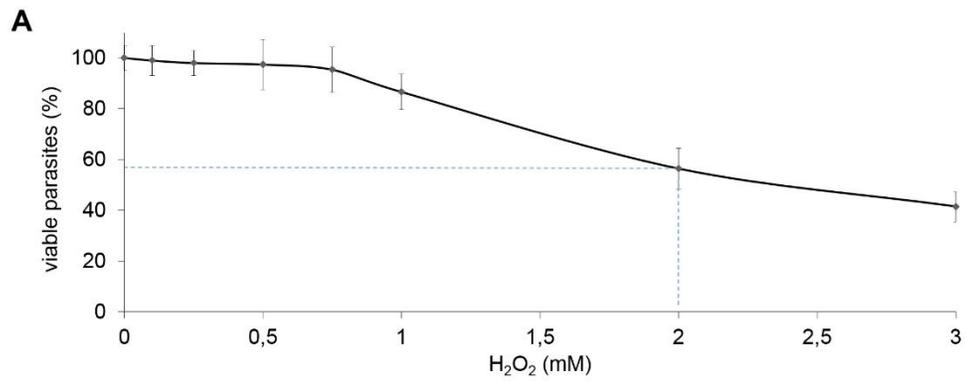
A figura 7A apresenta os resultados do teste colorimétrico de redução do MTT para tratamento com diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1h. Os resultados representam uma média de seis experimentos independentes, sendo o desvio padrão representado pelas barras. Estimou-se o IC<sub>50</sub> do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para formas promastigotas de *L. amazonensis* em torno de 2,5 mM. Deste modo, optamos por induzir estresse oxidativo agudo utilizando uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> próxima à IC<sub>50</sub> (2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h), de forma a causar um grande aumento nos níveis de ROS intracelular, mas ao mesmo tempo manter parte dos parasitos vivos.

Após a indução desse estresse, os parasitos foram submetidos à incorporação de CM-H<sub>2</sub>DCFDA. O CM-H<sub>2</sub>DCFDA é um derivado clorometílico do H<sub>2</sub>DCFDA, útil como um indicador de espécies reativas de oxigênio (ROS) em células vivas. O CM-H<sub>2</sub>DCFDA difunde passivamente nas células, onde os grupos acetato são clivados por esterases intracelulares e seu grupo clorometil tiol-reativo reage com a tripanotiona intracelular. A oxidação subsequente produz um produto fluorescente que fica preso no interior da célula, possibilitando assim a quantificação de ROS através de citometria de fluxo. A figura 7B apresenta uma quantificação dos níveis de ROS intracelular nas amostras controle e nos parasitos tratados com 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h, obtidos a partir da área dos histogramas (número de eventos x *FSC-area*) mostrados logo acima das barras, indicando um aumento na intensidade de fluorescência de ~ 250 u.a. (controle em cinza) para ~ 550 u.a. (tratado

em azul). Isso demonstra que, após o tratamento com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h, os níveis de ROS no interior das células de *L. amazonensis* aumentou significativamente ( $p < 0.05$  utilizando-se *Student's T test*).

Para verificarmos se o estresse oxidativo agudo e consequente aumento nos níveis de ROS intracelular causavam oxidação diferencial do DNA genômico desses parasitos, realizamos uma extração de DNA através do método caotrópico, digestão dos nucleotídeos e posterior análise através de HPLC/ECD para observação de possíveis oxidações diferenciais nas guaninas presentes no DNA genômico, uma vez que essas bases nitrogenadas são mais sensíveis à estresse oxidativo do que as demais (KAWANISHI e OIKAWA, 2004). A figura 7C apresenta a razão entre as guaninas oxidadas e não oxidadas em ensaios realizados com os grupos controle e tratados com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h, demonstrando que o estresse oxidativo induzido pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, além de aumentar os níveis de ROS intracelular, induz uma oxidação diferencial do DNA genômico, sobretudo nas guaninas ( $p < 0.05$  utilizando-se *Student's T test*).

Além disso, para verificarmos se essa oxidação diferencial observada era suficiente para causar danos ao DNA realizamos o ensaio TUNEL nos grupos controle e tratados com com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h. O ensaio TUNEL baseia-se na transferência de nucleotídeos marcados com fluoresceína pela enzima Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) em locais que apresentem extremidades 3'-OH livre, como por exemplo quebra de DNA. Para acesso da enzima TdT e dos nucleotídeos marcados no núcleo dos parasitos, os mesmos tiveram que ser permeabilizados através da adição de Triton 0,1%. A figura 7D apresenta imagens de fluorescência dos grupos de parasitos *L. amazonensis* controle e tratados com 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h e também os grupos controles do ensaio, ou seja, parasitos que sofreram tratamento com DNase I (controle C(+)) e parasitos que não foram tratados com a enzima TdT (controle C(-)). Comparando as imagens dos parasitos controle aos tratados, podemos observar que o tratamento com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h é bastante severo para o DNA desses parasitos, pois os danos causados no mesmo são similares ao controle (+).

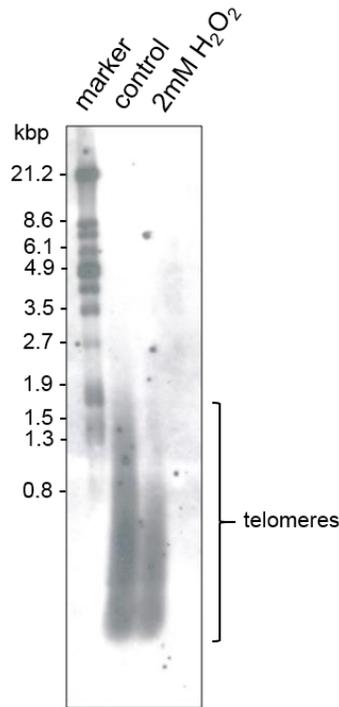


**Figura 7. Estresse oxidativo agudo aumenta os níveis de ROS intracelular, causa oxidação das guaninas e dano ao DNA em *L. amazonensis*.** **A)** Ensaio de viabilidade celular através da redução de MTT para verificação do IC<sub>50</sub> do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 1h. Podemos observar que o IC<sub>50</sub> do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> é aproximadamente 2,5 mM. Deste modo, para causar um estresse oxidativo agudo, decidimos tratar os parasitos *L. amazonensis* com a concentração de 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h (linha tracejada azul). **B)** Ensaio de incorporação de CM-H<sub>2</sub>DCFDA demonstrando um aumento dos níveis de ROS intracelular (quantificados através da intensidade de fluorescência) após estresse oxidativo agudo ( $p < 0.05$  utilizando-se *Student's T test*). Os valores absolutos referem-se à área dos gráficos menores apresentados acima de cada barra e foram obtidos utilizando-se o software BD Accuri C6. Os resultados representam uma média de 3 experimentos independentes, sendo que em cada um deles analisou-se 10,000 eventos. O desvio padrão é representado pelas barras. **C)** Quantificação de guaninas oxidadas através de HPLC/ECD demonstrando que o estresse oxidativo agudo propicia um aumento na oxidação diferencial nas guaninas ( $p < 0.05$  utilizando-se *Student's T test*). Os resultados apresentados representam uma média de 3 experimentos independentes, sendo o desvio padrão representado pelas barras. **D)** Ensaio TUNEL demonstrando que o estresse oxidativo agudo causa dano ao DNA. As imagens foram organizadas em quatro colunas (DAPI, *DNA damage*, *Merged* e *Enlarged*) com amostras representativas de parasitos tratados nas diferentes condições indicadas. A primeira coluna mostra os parasitos corados com DAPI (azul). A segunda coluna apresenta o dano causado ao DNA – *DNA damage* (verde). A terceira coluna apresenta a sobreposição das imagens (*Merged*) e a quarta coluna apresenta um parasito representativo de cada tratamento em aumento (*Enlarged*), onde K = kinetoplasto e N = núcleo. A barra corresponde ao tamanho de 2 µm. A sobreposição das imagens foi realizada utilizando-se o software NIS elements (v.Ar 3.10).

Deste modo, o conjunto de imagens apresentados na figura 7 sugere que estresse oxidativo agudo em formas promastigotas de *L. amazonensis*, causado pelo tratamento com 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h (valor próximo ao IC<sub>50</sub>) induz um aumento nos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) no interior das células. Esse aumento de ROS intracelular propicia uma oxidação diferencial no DNA genômico, sobretudo nas guaninas, causando como consequência danos à molécula de DNA.

#### **4.2 Estresse oxidativo agudo causa encurtamento telomérico em formas promastigotas de *L. amazonensis***

Alterações no tamanho dos telômeros e também na dinâmica de proteínas que ligam a região telomérica após estresse oxidativo já foram demonstradas por alguns autores em outros organismos (OPRESKO, 2005; VON ZGLINICKI, 2000). Para confirmarmos se essa hipótese também seria verdadeira para as formas promastigotas dos parasitos *L. amazonensis*, prosseguimos com a realização de ensaio *Southern Blot* telomérico utilizando o kit Telo TAGGG telomere length assay (Roche), o qual possibilita a utilização de sondas marcadas com *digoxigenin* (DIG), eliminando o uso de material radioativo. Para isolar o telômero do restante do material genômico, realizamos digestão com a enzima *Afa I*, a qual possui sítio de reconhecimento muito próximo à região telomérica, como já mostrado por CONTE e CANO (2005). A figura 8 apresenta o resultado desse ensaio onde podemos observar os telômeros dos grupos controle (não-tratados) e que sofreram estresse oxidativo agudo (2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



**Figura 8. Estresse oxidativo agudo causa aparente encurtamento telomérico em formas promastigotas de *L. amazonensis*.** Ensaio *Southern Blot* (gel agarose 0,8 %) de formas promastigotas de *L. amazonensis* mostrando um discreto encurtamento telomérico após tratamento com 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *Marker* representa o padrão de peso molecular DIG molecular weight (Roche), *control* representa o grupo controle (não tratado) e 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> o grupo que sofreu estresse oxidativo. Em cada linha foi aplicado 2,5 µg de DNA digerido com 6U na enzima *Afa I*.

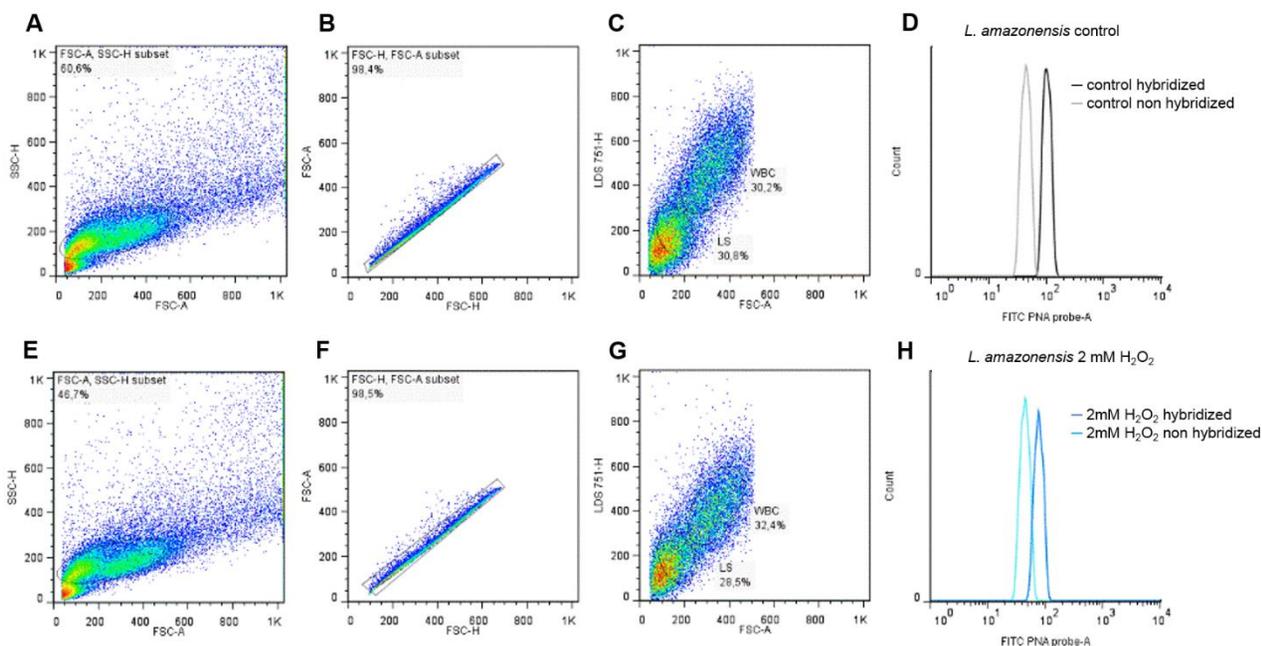
Após realizarmos a análise padrão TRF (*Telomere Restriction Fragments*), estimamos os valores do comprimento telomérico de 1,6 kb para o grupo de *L. amazonensis* controle e 1,4 kb para o grupo e *L. amazonensis* que sofreu estresse oxidativo. Esse resultado, em conjunto com os outros resultados que serão apresentados a seguir, sugerem que o estresse oxidativo causa encurtamento telomérico em formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Além da técnica padrão *Southern blot* para quantificação telomérica, também utilizamos uma técnica mais precisa e sensível denominada *flow-FISH*. O *flow-FISH* é a combinação da citometria de fluxo com a técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (*FISH*). Sondas (CCCTAA)<sub>3</sub> conjugadas ao fluorocromo isotiocianato de fluoresceína (FITC) são hibridizadas às repetições teloméricas de células em suspensão e analisadas quanto às suas características morfométricas e fluorescentes. O citômetro de fluxo possui um sistema óptico e eletrônico que permite avaliar a emissão de fluorescência, bem como a dispersão de raios laser incidentes sobre uma célula, possibilitando a análise de três parâmetros: tamanho (FSC-*Forward Scatter*), complexidade interna ou granulosidade (SSC-*Side Scatter*) e emissão de fluorescência.

Para garantir uma análise precisa, nós incluímos um controle interno de células com comprimento telomérico conhecido (leucócitos humanos) para ser processado juntamente com as amostras dos parasitos (controle e tratados). Os leucócitos humanos são facilmente distinguidos dos

parasitos devido às diferenças nos parâmetros celulares citados anteriormente, fornecendo assim um ponto de referência para medida dos telômeros a partir da detecção de fluorescência pelo citômetro e contribuindo para a precisão e eficiência da técnica.

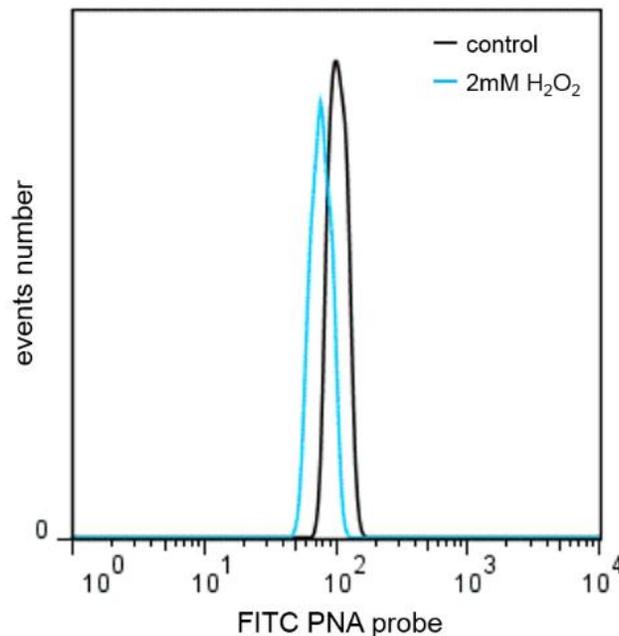
A figura 9 apresenta dois conjuntos gráficos representando os parasitos não tratados (controle) (figura 9 A-D) e tratados com 2 mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 9 E-H), ambos na presença de leucócitos humanos como controle interno. Em A e E temos os parâmetros morfométricos (SSC-height x FSC-area) e em B e F temos (FSC-area x FSC-height), os quais foram utilizados para discriminar células simples (*singlets*) de agregados, partículas e/ou células duplas (*doublets*). Em C e G temos a análise com relação ao tamanho (FSC-A) e intensidade de fluorescência pelo corante de DNA LDS 751 (FSC-area x LDS 751-height). Após fixarmos os *gates* de acordo com o padrão celular pré-estabelecido de cada população, fizemos uma sobreposição dos histogramas de fluorescência em FITC das populações de *L. amazonensis* cujos telômeros foram hibridizados com a sonda telomérica em comparação com os não hibridizados (figura 9 D, H). A diferença entre os picos (populações dos parasitos hibridizados e não hibridizados) representa a intensidade média de fluorescência emitida pela sonda telomérica, a qual é proporcional ao tamanho dos telômeros.



**Figura 9. Análise representativa dos parasitos *L. amazonensis* controle e tratados com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelo método flow-FISH.** Em A-D temos o grupo de parasitos controle + leucócitos humanos e em E-H temos o grupo de parasitos tratados (2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) + leucócitos humanos. **A e E)** Parâmetros morfométricos FSC-Height x SSC-Area com *gate* R1 para exclusão de agregados/partículas. **B e F)** Parâmetros morfométricos FSC-Area x FSC-Height da população R1 com *gate* R2 para exclusão de *debris*. **C e G)** Análise da população R2 quanto a intensidade de fluorescência e tamanho (FSC-A) com *gate* LS e WBC para seleção das células de *L. amazonensis*. **D e H)** Sobreposição dos histogramas de fluorescência das populações de *L. amazonensis* (controle e tratados) hibridizadas com a sonda telomérica (preto e azul) e não hibridizadas (cinza e azul claro). Os dados foram analisados utilizando-se o software *FlowJo* v.7.6.5.

A partir da caracterização das propriedades morfológicas foi possível distinguir e analisar separadamente as células de controle interno (leucócitos humanos) e os parasitos *L. amazonensis*, presentes em uma única amostra (figura 9). Para cada subpopulação selecionada, a fluorescência média emitida pela sonda telomérica foi calculada após subtração da autofluorescência da fluorescência total detectada em FL1 (figura 9 D, H).

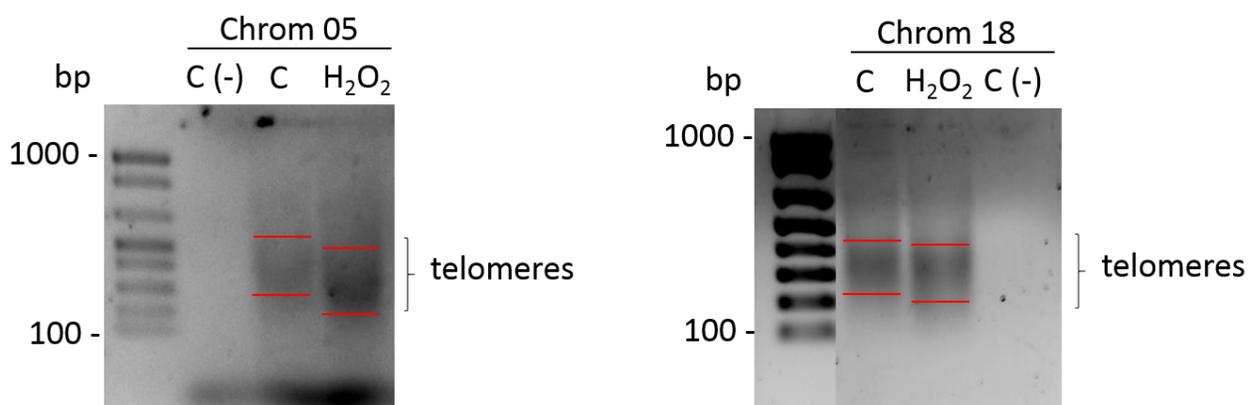
A figura 10 apresenta uma sobreposição entre os histogramas de fluorescência em FITC das duas populações de *L. amazonensis* (controle e 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) hibridizadas com a sonda telomérica, mostrados na figura 9 D, H. Cada pico representa a intensidade média de fluorescência emitida pela sonda telomérica proporcional ao tamanho dos telômeros. A diferença entre os picos representa a diferença entre o comprimento telomérico das duas populações analisadas: controle (em preto) e tratado com 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (em azul).



**Figura 10. Ensaio flow-FISH demonstra que o estresse oxidativo agudo causa encurtamento telomérico em *L. amazonensis*.** Sobreposição dos histogramas de fluorescência em FITC das duas populações de *L. amazonensis* (controle em preto; tratado em azul) hibridizadas com sonda telomérica. A diferença entre os picos representa a diferença entre o comprimento telomérico das duas populações analisadas. Os dados foram analisados utilizando-se o software *FlowJo* v.7.6.5.

Após determinar o valor médio de MFI de cada amostra analisada e transformando-os em valores de fluorescência MESF segundo os cálculos estabelecidos por BAERLOCHER et al. (2006), chegamos a conclusão que o grupo de parasitos *L. amazonensis* controle apresenta um valor médio de MESF de 5794 u.a., enquanto o grupo que sofreu estresse oxidativo apresenta um valor médio de MESF de 3729 u.a. Deste modo, podemos sugerir que o estresse oxidativo agudo induzido pelo tratamento com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, causou um encurtamento telomérico.

Além do ensaio padrão *Southern Blot* e o ensaio sofisticado flow-FISH para verificação do comprimento telomérico, nós também utilizamos o ensaio denominado telomere-PCR, o qual é altamente específico e preciso para amplificação telomérica de cromossomos individuais e foi objeto alvo de aprendizado durante estágio sanduiche no *Institute de Biologie Physico Chimique*, CNRS, Paris, França. Após amplificação, os telômeros foram fracionados em gel de agarose 1%. A figura 11 apresenta o resultado do ensaio telomere-PCR onde os *amplicons* formam um arraste no gel (linhas C e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), sendo que nos parasitos que sofreram estresse oxidativo podemos observar um discreto encurtamento telomérico, mais acentuado no cromossomo 5 que no cromossomo 18, quando comparados aos controles não tratados.



**Figura 11. Ensaio telomere-PCR sugere que o estresse oxidativo causa encurtamento telomérico.** O produto do ensaio telomere-PCR (utilizando-se primers para amplificação dos cromossomos 05 e 18) foi fracionado em gel de agarose 1%, onde podemos observar bandas que correspondem aos telômeros (200 – 500 bp). Os parasitos que sofreram estresse oxidativo aparentemente apresentam um encurtamento telomérico quando comparado ao controle (C). C(-) representa o controle negativo da reação, onde a reação de amplificação foi realizada na ausência de DNA. As barras vermelhas indicam o início e o fim do *smear* telomérico.

Embora preliminar, este ensaio nos deixou curiosos em relação ao tamanho telomérico em cada cromossomo e também à diferença sutil no encurtamento telomérico após estresse oxidativo apresentada por esses cromossomos (05 e 18). Essa diferença nos leva a especular que cada cromossomo apresenta telômeros peculiares em relação ao tamanho e comportamento após estresse, assim como já mostrado em outros organismos (TEIXEIRA et al., 2004; FALLET et al., 2014).

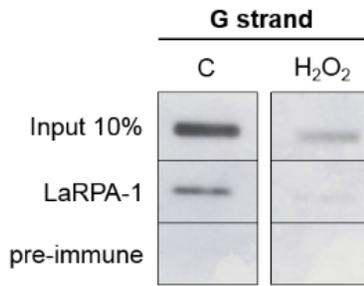
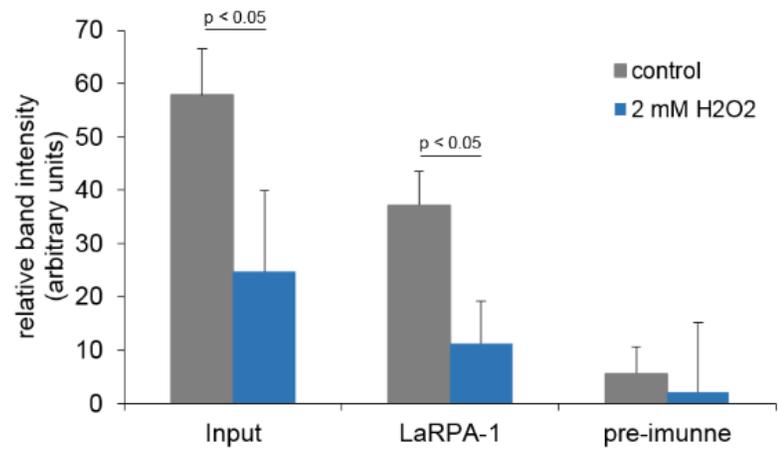
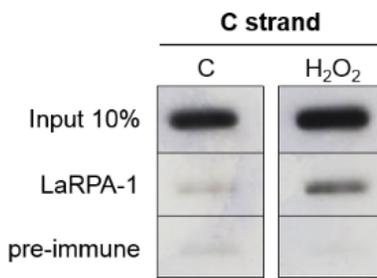
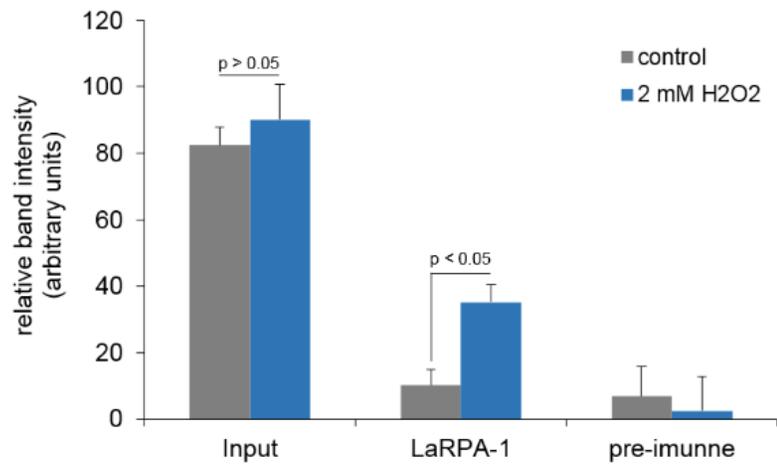
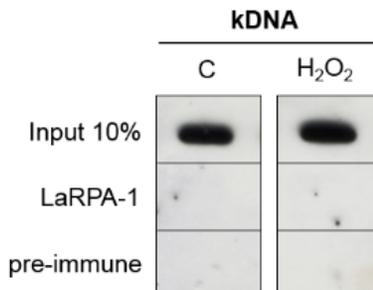
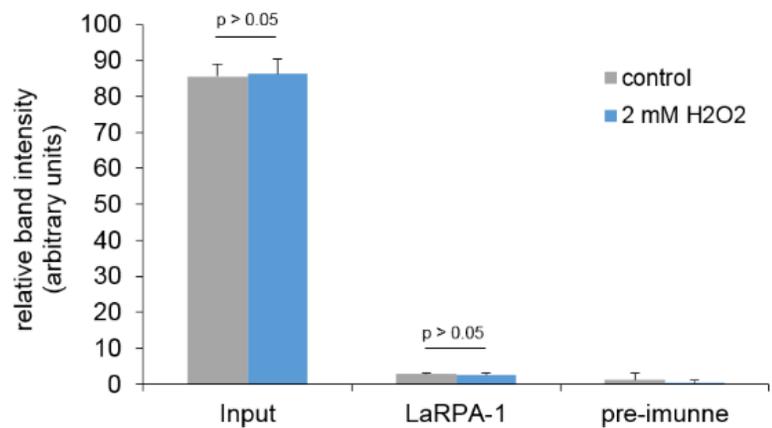
Esses resultados em conjunto (*Southern Blot*, flow-FISH e telomere-PCR), fornecem fortes indícios que suportam a hipótese de que o estresse oxidativo agudo causa encurtamento telomérico em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Como já mencionado anteriormente, isso também corrobora os resultados obtidos por outros pesquisadores utilizando células humanas, as quais

possuem a mesma sequência telomérica que *Leishmania spp.* (TTAGGG)<sub>n</sub>, embora ainda não se conheça exatamente o processo que gera a perda de nucleotídeos na região telomérica causado pelo estresse oxidativo (VON ZGLINICKI, 2000; OPRESKO et al., 2005).

#### **4.3 Estresse oxidativo agudo diminui a interação entre LaRPA-1 e o 3' G overhang e aumenta interação entre LaRPA-1 e a simples-fita telomérica rica em C.**

Como já mencionado anteriormente, LaRPA-1 possui afinidade a simples fita telomérica rica em G (SIQUEIRA-NETO et al., 2007, DA SILVEIRA et al., 2013). Deste modo, em condições normais, LaRPA-1 liga-se a porção simples fita dos telômeros denominada 3' G *overhang*. Como já vimos anteriormente que o estresse oxidativo causa encurtamento telomérico, espera-se a perda deste sítio de interação para LaRPA-1 em parasitos que sofreram tratamento. Para confirmarmos essa hipótese, realizamos um ensaio *in vivo* de imunoprecipitação de cromatina (ChIP) para verificarmos se após estresse oxidativo seria possível visualizar uma diminuição na quantidade de DNA telomérico imunoprecipitado pelo soro anti-LaRPA-1. Isto indiretamente comprovaria, não apenas a diminuição de sítios para a interação de LaRPA-1, como também alterações na quantidade de DNA telomérico nos parasitos tratados.

As figuras 12A e C apresentam um *dot-blot* contendo cromatina de  $1.10^8$  parasitos do grupo controle (C) e de  $1.10^8$  parasitos do grupo que sofreu estresse oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), imunoprecipitadas com soro anti-LaRPA-1 e soro pré-imune usado como controle do experimento. A primeira linha de cada figura apresenta a cromatina correspondente a 10% do número total de parasitos utilizado inicialmente no ensaio (input 10%). O *dot-blot* foi revelado utilizando-se sondas marcadas radioativamente ( $\gamma$ ATP <sup>32</sup>P) as quais são capazes de reconhecer separadamente as fitas teloméricas ricas em G (figura 12A) e rica em C (figura 12C). Para demonstrar a especificidade do ensaio, o DNA presente na cromatina imunoprecipitada com soro anti-LaRPA-1 e soro pré-imune também foi revelado utilizando-se uma sonda específica para reconhecimento do DNA do cinetoplasto (kDNA) (figura 12E). Cada *dot-blot* apresentado (figuras 12A, C e E) é representativo de três ensaios ChIP realizados independentemente. As figuras 12B, D e F apresentam gráficos com as médias das intensidades de sinal das hibridizações mostradas respectivamente nas figuras 12A, C e E. A quantificação da intensidade de sinal foi realizada utilizando-se o software ImageJ 1.47t e a análise estatística foi realizada utilizando-se Student's *T* test.

**A****B****C****D****E****F**

**Figura 12. Estresse oxidativo agudo diminui a interação entre LaRPA-1 e o 3' G overhang e propicia a interação entre LaRPA-1 e a simples-fita telomérica rica em C.** **A)** Resultado do ensaio ChIP revelado utilizando-se sonda de DNA telomérico para reconhecimento da fita rica em G. A diminuição na intensidade de sinal das bandas (inclusive no input 10%) reflete o encurtamento telomérico após estresse oxidativo. **B)** Gráfico mostrando uma média das intensidades de sinal relativas às bandas apresentadas em A. **C)** Resultado do ensaio ChIP revelado utilizando-se sonda de DNA telomérico para reconhecimento da fita rica em C. Podemos observar que LaRPA-1 imunoprecipitou uma maior quantidade de cromatina após estresse oxidativo. **D)** Gráfico mostrando uma média das intensidades de sinal relativas às bandas apresentadas em C. **E)** Resultado do ensaio ChIP revelado utilizando sonda de kDNA para verificação da especificidade do ensaio. **F)** Gráfico mostrando uma média das intensidades de sinal relativas às bandas apresentadas em E. Os gráficos apresentam a quantificação média de três experimentos independentes. Os desvios-padrão são representados pelas barras. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se *Student's T test*.

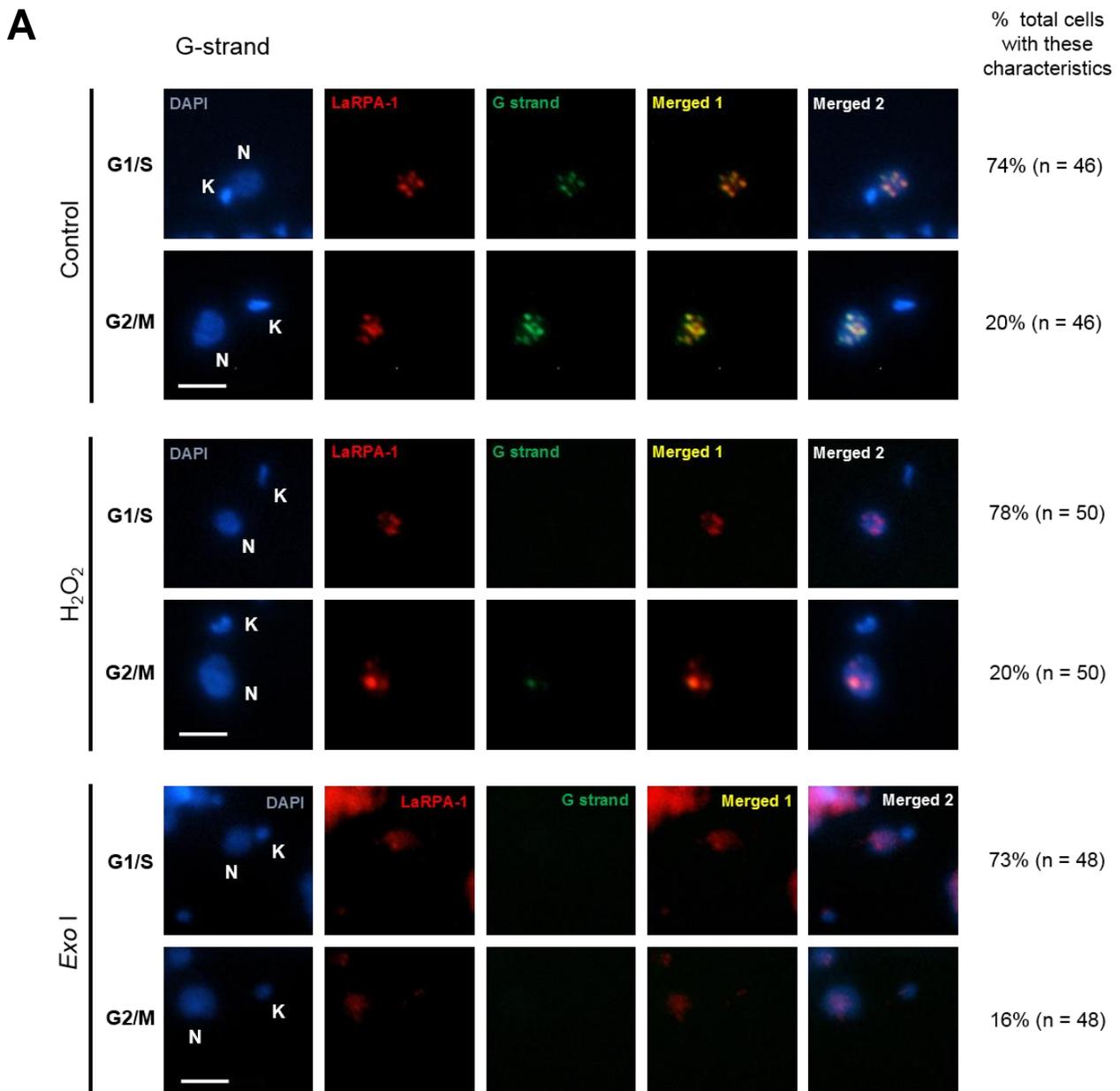
Ao observarmos a intensidade das bandas relativas às cromatinas imunoprecipitadas utilizando soro anti-LaRPA-1, podemos concluir que ocorreu uma diminuição da interação entre LaRPA-1 e a fita telomérica rica em G, nos parasitos que sofreram estresse oxidativo, comparado ao controle não tratado (figuras 12A e 12B). Vale ressaltar que, a intensidade das bandas referentes ao *input* (DNA total não imunoprecipitado) hibridizadas com a sonda que reconhece a fita rica em G também diminuiu em relação ao controle não tratado. Juntos estes resultados sugerem que ocorreu encurtamento da fita telomérica rica em G, induzido provavelmente pelo estresse oxidativo, e conseqüentemente diminuiu o número de sítios de interação para a proteína LaRPA-1, justificando a diminuição de repetições teloméricas imunoprecipitadas pelo soro anti-LaRPA-1.

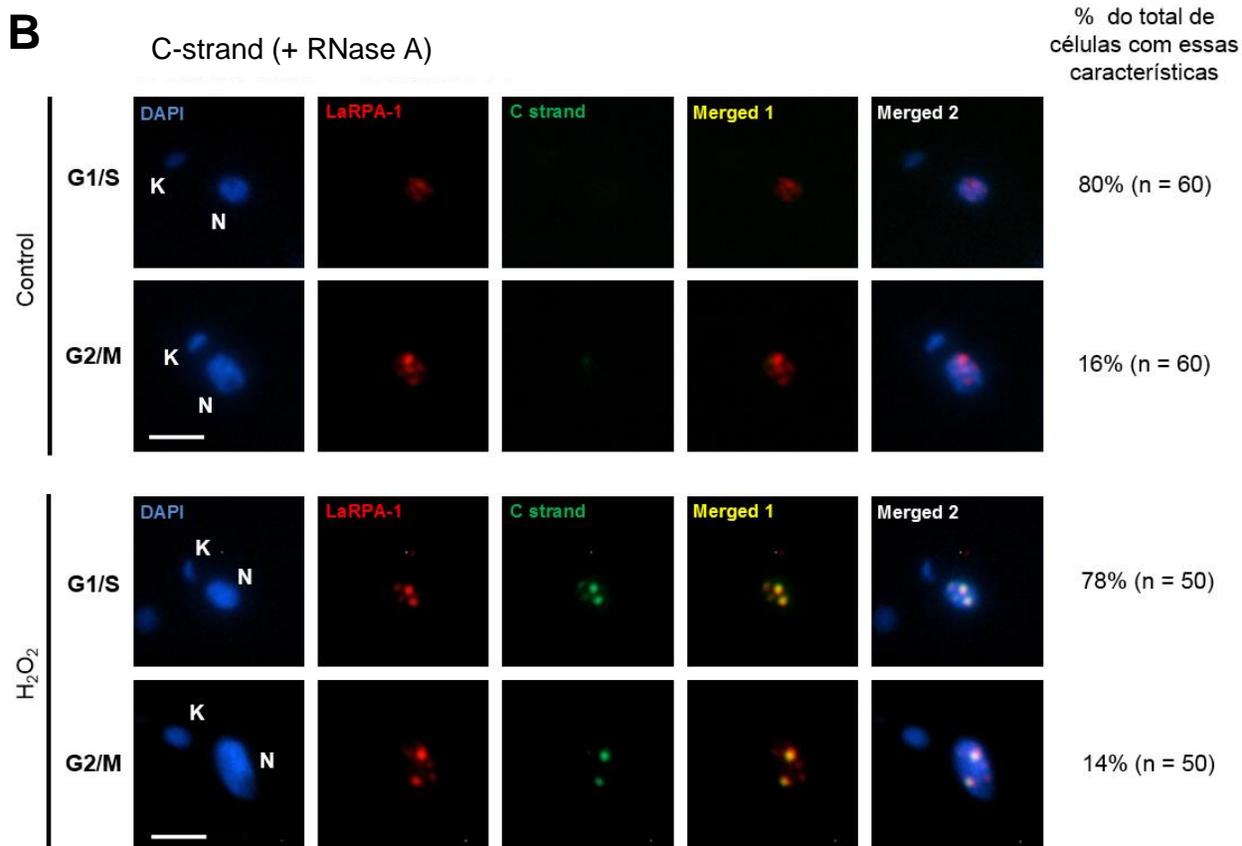
O contrário é observado quando se usa sonda que reconhece a fita rica em C (figuras 12 C e 12D) ou seja, curiosamente, mais cromatina imunoprecipitada com soro anti-LaRPA-1 aparece interagindo com a fita C telomérica em parasitos que sofreram estresse oxidativo, comparando-se com os controles não tratados. Estes resultados sugerem que, após estresse oxidativo, LaRPA-1 perde sítios de interação na porção 3' G *overhang* e passa a interagir com a simples-fita telomérica rica em C. Naturalmente, a fita telomérica rica em C é uma região de dupla-fita mas, como LaRPA-1 é sabidamente uma proteína ligante de ssDNA (SIQUEIRA-NETO et al., 2007, DA SILVEIRA et al., 2013), suspeitamos que após estresse oxidativo agudo haja a formação de uma porção simples-fita rica em C, a qual é utilizada como sítio de interação para LaRPA-1.

Para obtermos mais evidências que corroborem esses resultados, nós realizamos um ensaio FISH-IIF sem desnaturação do DNA utilizando, assim como no ensaio ChIP, sondas teloméricas para reconhecimento das fitas teloméricas C e G: telC para reconhecimento da fita G e telG para reconhecimento da fita C (figura 13). Assim, na presença da sonda telC e ausência de estresse oxidativo, haveria o reconhecimento apenas do 3' G *overhang*. Como controle do ensaio utilizamos a enzima exonuclease I, capaz de digerir terminais ssDNA na direção 3' → 5', comumente usado em ensaios para determinar a presença de terminais 3'G-*overhang* nos telômeros (PFEIFFER e LINGNER, 2012). A figura 13A apresenta uma imagem representativa da maioria das células nas fases G1/S e G2/M, na presença da sonda telC, antes e após estresse oxidativo e também após o

tratamento com Exo I. A figura 13B apresenta uma imagem representativa da maioria das células nas fases G1/S e G2/M, na presença da sonda telG antes e após estresse oxidativo. Para prevenir resultados falso positivos, neste caso, as células foram previamente tratadas com RNase A.

Para realização deste ensaio nós procuramos coletar parasitos nas diferentes fases do ciclo celular (G1/S e G2/M), baseando-se na morfologia e diâmetro das organelas que contém DNA (núcleo e cinetoplasto) (DA SILVA et al., 2013). Isto foi necessário pois, resultados preliminares do nosso grupo mostram que tanto a LaRPA-1 quanto os telômeros, apresentam distribuição nuclear diferencial de acordo com a fase do ciclo celular (dados não publicados).



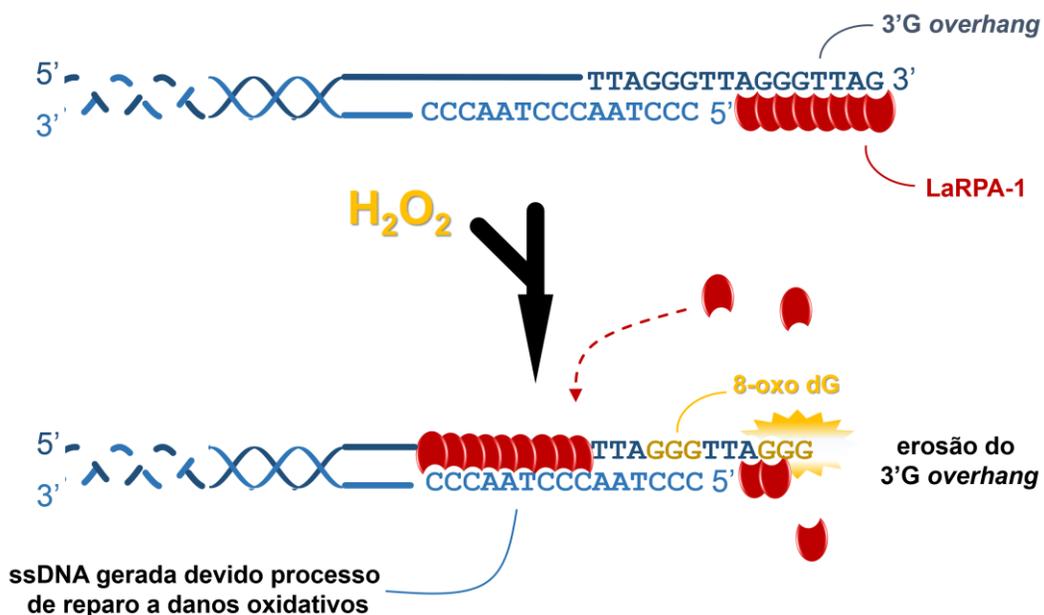


**Figura 13. Estresse oxidativo agudo diminui a interação entre LaRPA-1 e o 3' *G-overhang* e promove interação com a simples-fita telomérica rica em C. A)** Ensaio realizado com a sonda telC. **B)** Ensaio realizado com a sonda telG e tratamento com RNase. As imagens foram organizadas em 5 painéis: DAPI (azul), LaRPA-1 (vermelho), telômeros (verde), Merged 1 (sobreposição entre LaRPA-1 e telômero) e Merged 2 (sobreposição entre DAPI, LaRPA-1 e telômero), com imagens representativas de parasitos tratados (2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h) e não-tratados (controle) nas principais fases do ciclo celular (G1/S e G2/M). A barra corresponde ao tamanho de 2µm e as imagens foram capturadas aleatoriamente. As imagens são representativas de células que apresentavam essa mesma característica. A sobreposição das imagens foi realizada utilizando-se o software NIS elements (v.Ar 3.10).

A figura 13A apresenta a hibridização com a sonda tel C onde, na ausência de estresse oxidativo (control), podemos observar a sobreposição entre o 3'G *overhang* e LaRPA-1, tanto nas fases G1/S como em G2/M. Na presença de estresse, o sinal telomérico (3'G *overhang*) da maioria das células desaparece, porém o sinal de LaRPA-1 permanece e até mesmo aumenta. Esse resultado corrobora o resultado apresentado pelo ensaio ChIP, ou seja, provavelmente o estresse oxidativo está ocasionando o encurtamento do 3'G *overhang*. Embora haja a presença de um fraco sinal correspondente ao 3'G *overhang* na fase G2/M das células que sofreram estresse oxidativo, este é muito inferior quando comparado à células, nessa mesma fase, que não sofreram estresse. Um fenótipo celular semelhante ao das células que sofreram estresse oxidativo é observado após o tratamento com Exo I, correspondendo com o esperado, uma vez que essa enzima remove a porção 3'G *overhang*.

A figura 13B apresenta resultados obtidos na presença da sonda TelG. Como essa sonda possui sequência complementar à fita C telomérica, ela estaria apta a reconhecer o RNA da telomerase (chamado LaTER, *L. amazonensis* telomerase RNA) (VASCONCELOS et al., 2014 – em submissão), gerando resultados falso-positivos. Para evitar isso, nós tratamos as células com RNase A para eliminação de RNAs (inclusive LaTER) que poderiam interferir no resultado. Deste modo, na ausência de estresse oxidativo não há reconhecimento da fita telomérica C e também de nenhuma outra molécula, por exemplo o componente LaTER (figura 13B). Porém, na presença de estresse oxidativo podemos observar uma sobreposição entre LaRPA-1 e o sinal telomérico, nesse caso a simples-fita rica em C gerada, provavelmente, pela maquinaria de reparo em resposta às lesões oxidativas. Mais uma vez, esse resultado corrobora os resultados obtidos no ensaio ChIP.

A figura 14 apresenta, de maneira simplificada, um esquema que ilustra nossa hipótese em relação à dinâmica do DNA telomérico e da proteína LaRPA-1 após estresse oxidativo.



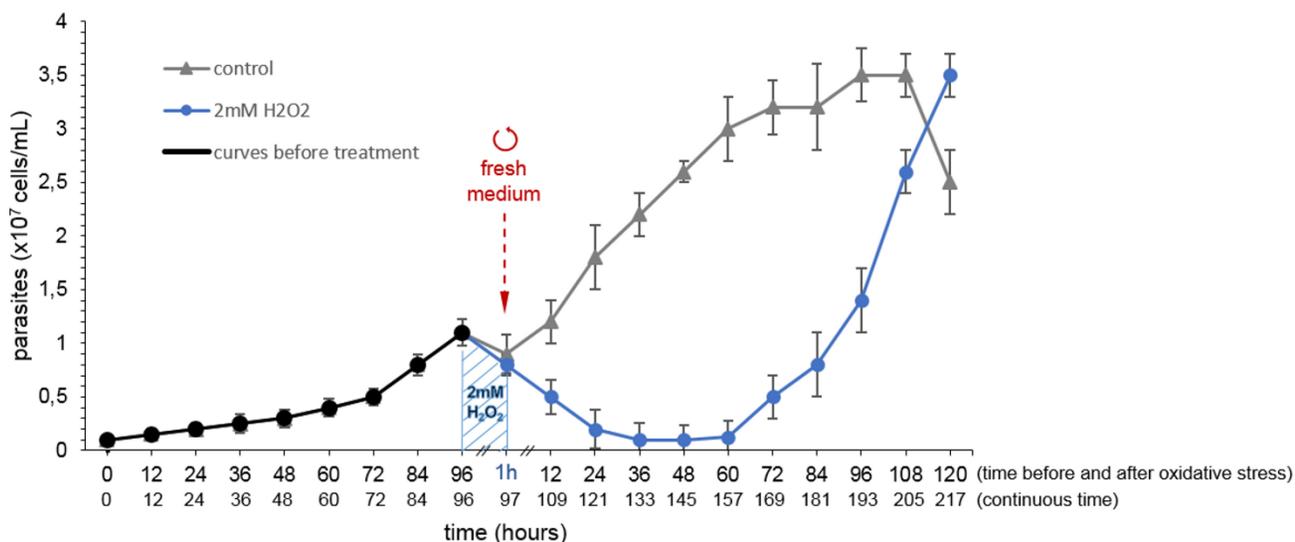
**Figura 14. Representação esquemática da possível dinâmica de LaRPA-1 e dos telômeros após estresse oxidativo.** O tratamento com  $H_2O_2$  induz dano oxidativo principalmente nos telômeros, causando encurtamento e dissociação de LaRPA-1 que perde seu sítio de interação preferencial, o 3'G overhang. Como consequência da ação de uma possível maquinaria de reparo a danos oxidativos, ocorre a remoção da fita de DNA que contém o dano oxidativo (fita rica em G) e consequente ligação de LaRPA-1, que passa a interagir e proteger a simples fita telomérica rica em C.

Vale ressaltar que lesões oxidativas no DNA (sobretudo nas guaninas), são reparadas frequentemente pelas maquinarias de BER e NER, além da maquinaria de MMR (Brierley and Martin, 2013). Essa última gera segmentos de DNA simples fita que podem ser recobertos pela proteína RPA, responsável por estimular a síntese de DNA, além de proteger a simples-fita gerada contra o ataque de endonucleases (RAMILO et al., 2002; MODRICH, 2006).

#### 4.4 Estresse oxidativo agudo elimina parte da população tratada propiciando uma seleção dos parasitos mais resistentes

Até o momento nós pudemos observar que o estresse oxidativo agudo em formas promastigotas de *L. amazonensis* induz dano no DNA, encurtamento telomérico, dissociação de LaRPA-1 do 3'G *overhang* e induz a interação de LaRPA-1 com a simples-fita telomérica rica em C, gerada provavelmente em decorrência de processo de reparo a danos oxidativos na região telomérica. Sabemos que o encurtamento telomérico, em eucariotos superiores, culmina em senescencia replicativa e morte celular (GIARDINI et al., 2014), porém em *Leishmania* spp. ainda não temos conhecimento algum sobre esses fatos. Deste modo, decidimos analisar os fenômenos envolvidos com a proliferação celular em toda a população que passou por estresse oxidativo agudo.

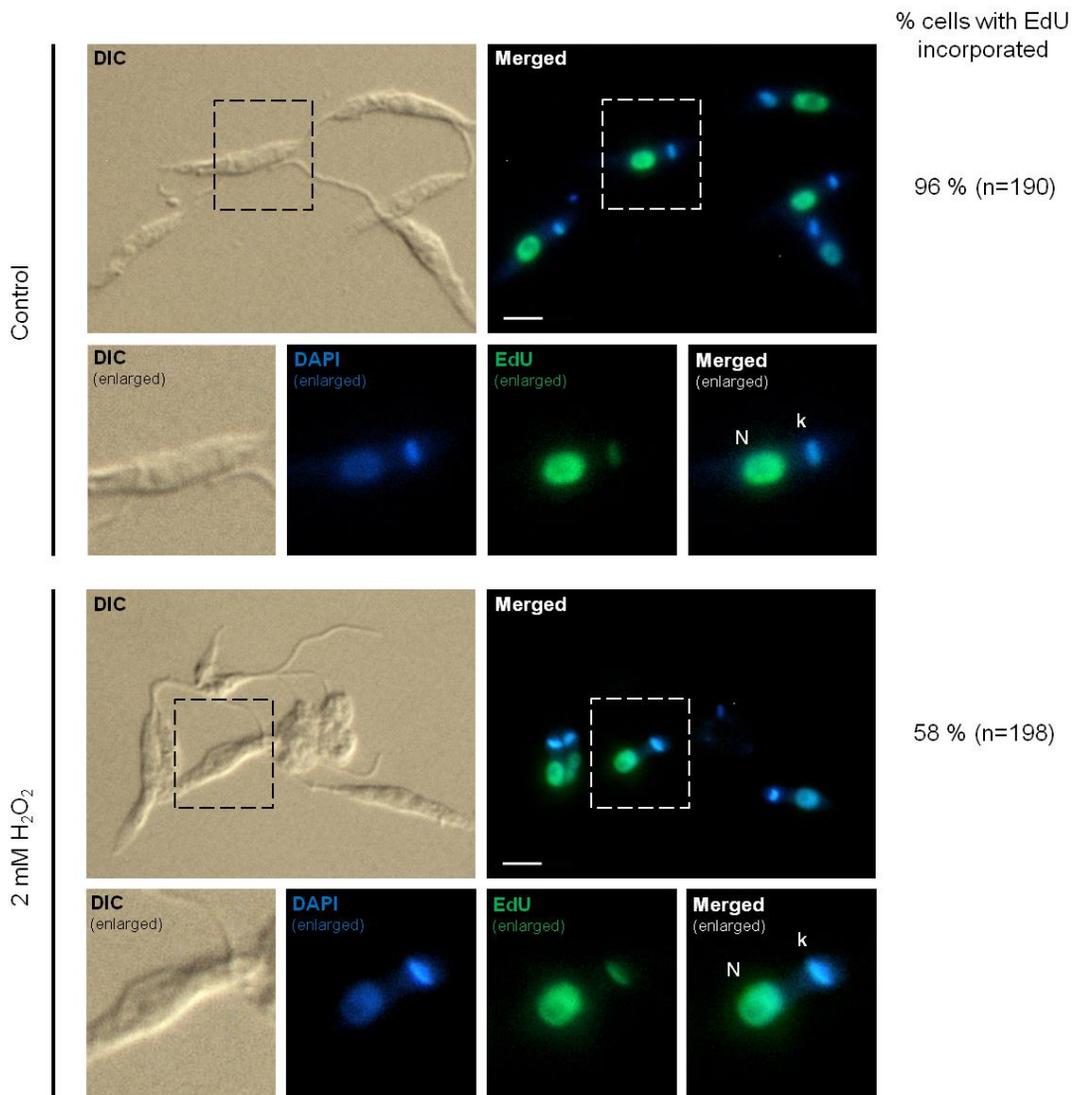
A figura 15 apresenta a média de três curvas de crescimento (controle e tratado, totalizando 06 curvas) de formas promastigotas de *L. amazonensis* iniciadas com  $1.10^6$  parasitos/mL. Prosseguimos verificando a concentração celular (nº parasitos/mL) a cada 12h até os parasitos atingirem a fase exponencial ( $\sim 1.10^7$  parasitos/mL). Nesse momento efetuamos o tratamento com 2mM  $H_2O_2$  por 1h em um dos conjuntos (03 curvas de parasitos tratados) e logo em seguida trocamos o meio de cultura por meio fresco em ambos conjuntos de curvas (controle e tratado). Nesse ponto realizamos uma nova contagem dos parasitos e, a partir de então, prosseguimos com contagens a cada 12h até 120h após o estresse oxidativo.



**Figura 15. O estresse oxidativo agudo não impede a multiplicação de *L. amazonensis*.** Curva de crescimento dos grupos controle e tratado (antes e após estresse oxidativo agudo). Embora após o estresse (2mM  $H_2O_2$ ) haja uma diminuição do número de parasitos, principalmente até 48h, os mesmos continuam se multiplicando, atingindo novamente a fase exponencial após 84h. *Fresh medium* (em vermelho) indica centrifugação e adição de meio fresco em ambos os grupos (controle e 2mM  $H_2O_2$ ). As linhas em preto indicam os grupos antes do tratamento. As linhas em cinza indicam o grupo controle e as linhas em azul indicam o grupo tratado. Os valores apresentados no gráfico indicam uma média de três experimentos realizados independentemente. O desvio padrão é representado pelas barras.

De uma forma geral, as curvas de crescimento mostrada na figura 15 indicam que, embora haja uma diminuição acentuada no número de parasitos das curvas de parasitos tratados, os sobreviventes continuam se multiplicando, sugerindo uma rápida recuperação após estresse oxidativo agudo. A diminuição acentuada já era esperada, pois a concentração de  $H_2O_2$  utilizada para causar estresse oxidativo é muito próxima à  $IC_{50}$ .

Em seguida fomos analisar se o estresse oxidativo agudo poderia provocar alterações visíveis na replicação do DNA nessas populações. Para isso utilizamos ensaio de incorporação de EdU para os grupos controle e tratado com  $H_2O_2$ . A figura 16 apresenta dois conjuntos de imagens (Controle e 2 mM  $H_2O_2$ ) onde uma célula de cada campo foi selecionada e aumentada (*enlarged*) para representar a maioria. Podemos observar separadamente a morfologia das células (DIC), as organelas que contém DNA coradas com DAPI (azul) e as células que incorporaram EdU (verde), bem como a sobreposição das imagens (Merged).



**Figura 16. O estresse oxidativo agudo não impede a replicação do DNA em *L. amazonensis*.** Os parasitos foram submetidos à incorporação de EdU durante 14h, que gera um produto fluorescente quando na presença de  $\text{Cu}^{2+}$ , ácido ascórbico e azida 488. A figura apresenta um campo com células controle (onde o EdU incorporou em 96% das células) e um campo com células que sofreram estresse oxidativo (onde houve 58% de incorporação de EdU). Uma célula de cada campo foi destacada para representar a maioria. (N) são núcleos e (K) cinetoplastos. A barra corresponde ao tamanho de 2  $\mu\text{m}$ . As células foram capturadas aleatoriamente e a sobreposição das imagens foi realizada utilizando-se o software NIS elements (v.Ar 3.10).

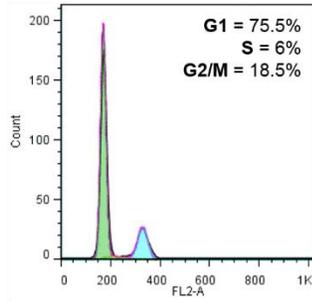
Podemos observar que, mesmo após o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$ , parte da população (58%) permanece replicando DNA enquanto o restante das células (42%) mostrou alterações na morfologia e não incorporou EdU (dados não mostrados). A discrepância no percentual de células que apresentam incorporação de EdU no grupo tratado (58%) em relação ao grupo controle (96%) pode ser explicada, assim como na figura 15, pelo fato da concentração de  $\text{H}_2\text{O}_2$  utilizada ser muito próxima à  $\text{IC}_{50}$ , causando a morte de aproximadamente 50% das células (figura 7). Assim, como parte da população de parasitos morre após o tratamento, a incorporação de EdU é realizada apenas pelos sobreviventes.

Esse resultado em conjunto com o resultado mostrado na figura 15 sugere que o estresse oxidativo agudo, apesar de causar morte em parte da população, não impede que os sobreviventes continuem se proliferando e replicando DNA.

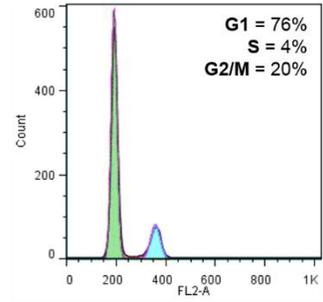
Para finalizar, resolvemos verificar se o estresse oxidativo (responsável por causar dano no DNA e encurtamento telomérico) estaria provocando também *arrest* de ciclo celular nos parasitos sobreviventes. Para isso resolvemos analisar as células sobreviventes dos dois grupos de parasitos (controle e tratado) em relação ao conteúdo de DNA por FACS (*Fluorescence-Activated Cell Sorting*) utilizando citometria de fluxo, metodologia que foi previamente estabelecida por DA SILVA et al., (2013).

A figura 17 apresenta dois conjuntos de gráficos (controle e tratado com 2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) onde podemos observar o conteúdo de DNA obtido a partir da área dos histogramas (número de eventos x *FL2-area*) indicando indiretamente a fase do ciclo celular (G1, S ou G2/M) que os parasitos se encontram. Ao lado de cada gráfico está indicado o tempo que as amostras foram coletadas (0h, 1h, 4h, 8h e 20h). Em ambos os grupos (controle e tratado), as amostras 4h, 8h e 20h foram coletadas após a troca do meio de cultura por meio fresco (sem  $\text{H}_2\text{O}_2$ ). A linha azul indica a remoção de  $\text{H}_2\text{O}_2$  do meio de cultura e adição de meio fresco. Em cada coleta analisou-se 20.000 eventos. Os *gates* foram estabelecidos de forma a selecionar a população de interesse e separá-las das células em processo de morte celular.

0h (without oxidative stress)

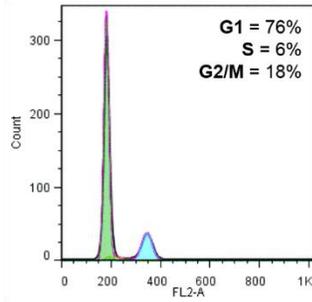


0h (control)

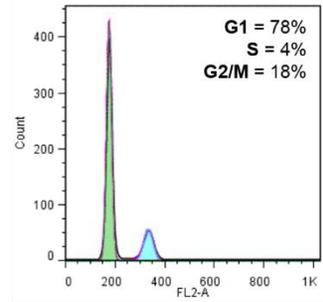


1h (after oxidative stress)

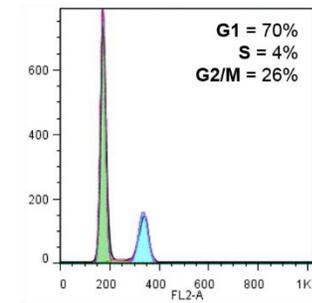
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release  
(add of fresh medium)



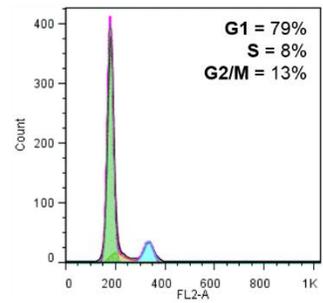
1h (control)



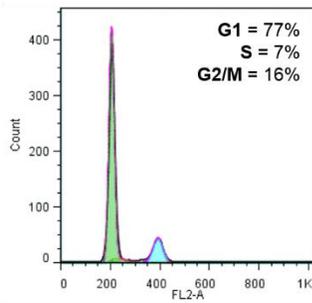
4h (after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release)



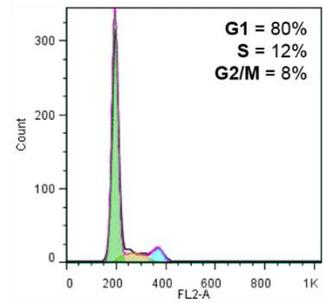
4h (control)



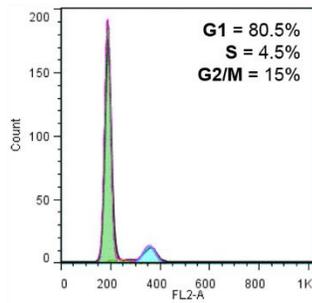
8h (after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release)



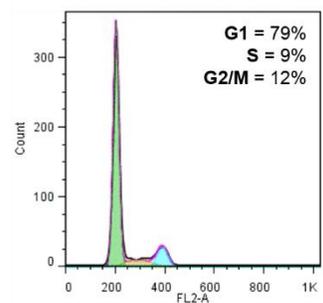
8h (control)



20h (after H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> release)



20h (control)



**Figura 17. Nos parasitos sobreviventes, o estresse oxidativo agudo causa *arrest* de ciclo celular em G2/M após 4h.** Ensaio FACS utilizando como marcador de DNA iodeto de propídeo. Os gráficos apresentados na coluna da esquerda representam os parasitos que sofreram estresse oxidativo e os apresentados na coluna da direita representam os parasitos controle. No grupo que sofreu estresse oxidativo as amostras foram coletadas antes do estresse (0h), após 1h na presença de 2mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, após 4h, 8h e 20h da remoção do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *release*). Os mesmos períodos foram utilizados para o grupo controle, porém sem a presença de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. A linha azul representa a remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e adição de meio fresco (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *release and add fresh medium*). Em cada gráfico analisou-se 20.000 eventos.

Primeiramente foram obtidos os perfis das populações parasitárias no tempo 0h (controle e antes do estresse oxidativo) e no tempo 1h (controle e após estresse oxidativo). Podemos observar que os perfis de conteúdo de DNA são muito semelhantes nessas populações ou seja, após o tratamento com 2mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h não há diferenças aparentes no conteúdo de DNA desses parasitos.

Após 4h da remoção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, podemos observar um *arrest* de ciclo celular em G2/M em parte dos parasitos sobreviventes (26%) que sofreram estresse oxidativo. Isso fica evidente quando comparamos os percentuais de células em G2/M dos grupos controle (13%) e tratado (26%) nesse mesmo período. Este número praticamente dobrou em relação ao controle e esta proporção permaneceu até 8h após a retirada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do meio de cultura (figura 17). Nota-se que, após 20h da retirada do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, a população sobrevivente que recebeu tratamento apresenta perfil de conteúdo de DNA muito similar ao controle, sugerindo que essas células conseguiram transpor um estresse agudo.

Em conjunto, esses resultados sugerem que o estresse oxidativo agudo propiciou a seleção dos parasitos mais aptos, ou seja, aqueles que se recuperaram de maneira rápida conseguindo sobreviver após tal evento. Essa rápida recuperação dos sobreviventes, provavelmente através da ação eficaz da maquinaria de reparo a danos oxidativos no DNA, pode representar um importante mecanismo envolvido tanto na sobrevivência como na propagação dessa espécie de *Leishmania*.

## **5. Discussão**

---

## 5. Discussão

Durante seu ciclo de vida, *L. amazonensis* é obrigado a sobreviver e superar a inospitalidade de diferentes ambientes, estando sujeito as mais variadas formas de estresse, como por exemplo aumento e diminuição de pH e temperatura, ataque do sistema imune do hospedeiro, estresse oxidativo, entre outros (OLIVIER et al., 2005; SHIO e OLIVIER, 2010). Mesmo apresentando diversos mecanismos para driblar esses obstáculos (SHIO e OLIVIER, 2010), provavelmente o processo adaptativo sofrido por esse parasito inclui a seleção de uma maquinaria eficiente de proteção e reparo de DNA, uma vez que esses obstáculos promovem a geração de moléculas que podem exercer um efeito nefasto no DNA, sobretudo nos telômeros, como por exemplo ROS (TUON et al., 2008; PASSOS-SILVA et al., 2010). Nesse estudo nós investigamos o comportamento dos telômeros de formas promastigotas de *L. amazonensis* após estresse oxidativo agudo, uma vez que a região telomérica, rica em sequências GGG, é mais sensível à oxidação do que o restante do DNA, pois essas sequências são facilmente oxidadas devido à conformação dos orbitais moleculares nessa estrutura (VON ZGLINICK, 2002; KAWANISHI e OIKAWA, 2004).

Ensaio de viabilidade celular nos permitiram estimar o IC<sub>50</sub> para H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como 2,5 mM. Assim, resolvemos utilizar a concentração de 2 mM para causar um estresse oxidativo imediato e intenso no DNA desses parasitos, mesmo sabendo que essa concentração eliminaria parte da população tratada. Embora 2 mM seja uma concentração elevada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparado a outros estudos envolvendo estresse oxidativo em células de mamíferos (COYLE e KADER, 2007) e tripanossomatídeos (FINZI et al., 2004), o curto período de tratamento (1h) contrabalança essa elevada concentração. Vale ressaltar aqui que foram realizados testes utilizando-se períodos menores e maiores de incubação com 2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, mas a que melhor atendeu nossas expectativas em relação à indução de um estresse oxidativo agudo foi 1h.

Após induzirmos estresse oxidativo agudo nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, observamos um aumento dos níveis de ROS intracelular na população tratada utilizando a sonda fluorescente CM-H<sub>2</sub>DCFDA. Alguns autores criticam a utilização de CM-H<sub>2</sub>DCFDA para quantificação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular através de microscopia de fluorescência e/ou citometria de fluxo (KALYANARAMAN et al., 2012) mas, em conjunto com outros métodos e ciente das limitações, CM-H<sub>2</sub>DCFDA continua sendo bastante utilizado para estimar a presença de ROS intracelular (FAN e LI, 2014). Para nos certificarmos de que o tratamento com 2mM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 1h realmente estava alterando o ambiente intracelular, não utilizamos apenas CM-H<sub>2</sub>DCFDA, mas também análises por HPLC-ECD e ensaio TUNEL onde pudemos constatar, respectivamente, um aumento dos níveis de 8-oxodG e a presença de dano no DNA dos parasitos que sofreram estresse oxidativo causado pelo tratamento com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (figura 7). Esses resultados corroboram os obtidos por outros grupos de pesquisa em tripanossomatídeos, onde diferentes concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziram um aumento dos níveis de 8-oxodG (CAMPOS et al., 2011) e danos no DNA (FINZI et al., 2004). Nestes casos, os que

passaram por estresse oxidativo apresentaram perda de motilidade e fragmentação do DNA, características semelhantes a apoptose em metazoários. Porém, ainda não há um consenso sobre apoptose e morte celular programada em protozoários tripanosomatídeos (FUERTES et al., 2008). Vale destacar que alguns autores propõem que as características que indicam morte celular programada nesses protozoários não ocorrem na população como um todo, e sugerem a presença de um mecanismo de seleção dos parasitos mais aptos (DEBRABANT et al., 2003; DEBRABANT e NAKHASI, 2003; FUERTES et al., 2008).

Nós também observamos através de diferentes metodologias que o estresse oxidativo causa um encurtamento telomérico significativo em formas promastigotas de *L. amazonensis* (figuras 8, 10, 11). Esse mesmo fenômeno também já foi observado em células de mamíferos, especialmente em humanos, em resposta aos mais diversos fatores ambientais. O resultado, na maioria das vezes, leva ao desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio produzidas e sua eliminação, culminando nos fenótipos de senescência, apoptose e/ou morte celular programada (VON ZGLINICK, 2002; KURTZ et al., 2004; TCHIRKOV e LANSDORP, 2003; EPEL et al., 2004). Esses mesmos fenótipos são observadas em células que perderam a atividade de telomerase onde, diferentemente do encurtamento telomérico abrupto proporcionado pelo estresse oxidativo, observamos um encurtamento telomérico ao longo de vários ciclos celulares (BEKAERT et al., 2005; OESEBURG et al., 2010). Isto confirma que os telômeros são verdadeiros relógios biológicos, tanto nos organismos pluricelulares como nos unicelulares, controlando o tempo de vida celular através da indução da senescência, apoptose e/ou morte celular programada (EPEL et al., 2004; BEKAERT, 2005; OESEBURG et al., 2010).

Embora ainda não haja uma explicação contundente que explique detalhadamente o fenômeno de encurtamento telomérico abrupto devido ao estresse oxidativo, especula-se que o  $H_2O_2$  em conjunto com íons metálicos possa induzir quebra de DNA na região 5' da sequência telomérica 5'-GGG-3', desempenhando um papel crucial no aumento da taxa de encurtamento dos telômeros (KAWANISHI e OIKAWA, 2004; KURTZ et al., 2004). Isto corrobora a fragmentação de DNA observada anteriormente pelo ensaio TUNEL (figura 7D).

Nós também encontramos evidências de que o encurtamento telomérico ocorre primeiramente na região simples-fita 3'G *overhang*, fazendo com que a proteína ligante de DNA simples fita LaRPA-1 perca esse que é seu principal sítio de interação nos telômeros (figura 12A). Isto provavelmente ocorre devido a presença de telômeros curtos e ausência de alguns componentes *shelterin* e CST em *L. amazonensis*, impossibilitando assim a formação do t-loop. Esta é uma constatação inédita tanto na biologia molecular de tripanosomatídeos quanto nos eucariotos que apresentam telômeros curtos, pois não há nenhum relato sugerindo tal fenômeno como consequência de estresse oxidativo. Isso demonstra o quão pouco sabemos sobre a dinâmica dos telômeros nos eucariotos e nos incentiva a investigar com cautela essa região de fundamental importância celular.

Além disso, também encontramos evidências de que após estresse oxidativo, a proteína multifuncional LaRPA-1 é deslocada do 3'G overhang devido ao encurtamento do mesmo (figura 12A e 13A). Concomitantemente, nós pudemos observar um aumento da interação entre LaRPA-1 e a fita telomérica rica em C que, provavelmente como consequência do reparo ao dano oxidativo, fica temporariamente na forma de simples-fita (figura 12C e 13B). Neste caso, supomos que as maquinarias de reparo BER, NER e/ou MMR sejam ativadas em resposta ao dano oxidativo (BRIERLEY e MARTIN, 2013), sendo que em cada uma dessas maquinarias é gerado um fragmento de DNA simples-fita de tamanho diferente devido ao processo do reparo. Sabemos que se a maquinaria MMR for ativada, existe a possibilidade de atuação de LaRPA-1, uma vez que RPA em outros eucariotos desempenha um papel importante na regulação da atividade do complexo MutSα (MSH2 + MSH6) e Exo1, por sua interação a simples-fita gerada em decorrência da ação desse complexo, levando a diminuição da processividade do mesmo, o que resulta na degradação de aproximadamente 250 nucleotídeos, como já foi demonstrado em eucariotos superiores (IYER et al., 2006; MODRICH, 2006). Como o dano oxidativo afeta principalmente a sequência GGG (VON ZGLINICK, 2002; KAWANISHI e OIKAWA, 2004), é provável que a simples-fita gerada em consequência do reparo por MMR seja uma fita complementar à fita G telomérica, ou seja, uma simples-fita telomérica rica em C (AATCCC)<sub>n</sub>. Isto corrobora os resultados obtidos nos ensaios FISH-IIF realizados sem desnaturação do DNA e o ensaio CHIP (figuras 12 e 13), que sugerem um deslocamento de LaRPA-1 da região 3'G *overhang* e interação concomitante com a simples-fita telomérica rica em C gerada provavelmente após estresse oxidativo. Essa hipótese colocaria LaRPA-1 dentre as proteínas que desempenham um papel importante no reparo por Mismatch, a semelhança do que ocorre com seu homólogo nos eucariotos superiores (IYER et al., 2006; MODRICH, 2006).

Neste estudo nós também observamos que, após estresse oxidativo agudo causar morte de parte da população tratada, os parasitos sobreviventes continuaram se proliferando e replicando DNA (figuras 15 e 16), sugerindo uma atuação rápida e eficaz da maquinaria de reparo em resposta a danos oxidativos. Além disso, pudemos observar a presença de um *arrest* na fase G2/M do ciclo celular (figura 17), o qual é um importante *checkpoint* para verificação de danos no DNA para a maioria dos eucariotos (CUDDIHY e O'CONNELL, 2003). Em conjunto, esses resultados sugerem a presença de um sistema muito eficiente de resposta a danos oxidativos no DNA telomérico, permitindo que os parasitos mais resistentes a esse estresse (ou que sofreram menor quantidade de danos) sobrevivam e repliquem DNA mesmo após terem sofrido um estresse oxidativo agudo. Além disso, *in vivo* esse eficiente sistema de reparo a danos oxidativos poderia aumentar a sobrevivência do parasito dentro do hospedeiro e facilitar sua transmissão representando, deste modo, uma via envolvida tanto na sobrevivência como na propagação dessa espécie de *Leishmania*.

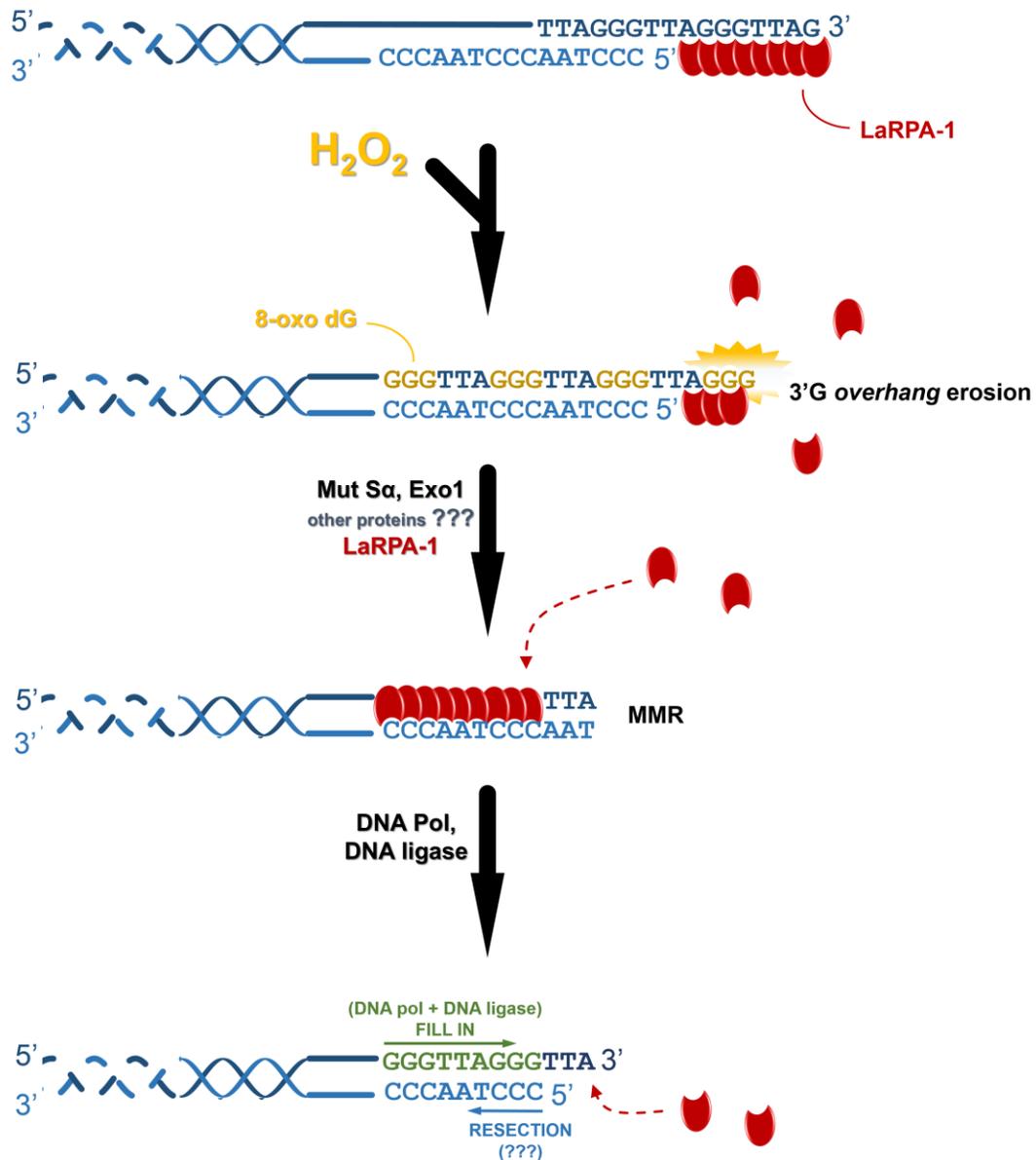
Vale a pena destacar que a resposta ao dano causado por estresse oxidativo nos eucariotos superiores envolve uma cascata de eventos, envolvendo proteínas de reconhecimento ao dano (DNA

glicosilases, complexos MutL $\alpha$ ) e proteínas que participam da maquinaria de reparo BER, NER e MMR, i.e. (endonucleases, exonucleases, complexos MutS $\alpha$ ) (BRIERLEY e MARTIN, 2013). Quando esse estresse está associado aos telômeros, frequentemente temos a formação do *t-loop* limitando o acesso de proteínas envolvidas na via de reparo. Esse impedimento de atuação dessas proteínas propicia o acúmulo de quebras de DNA na forma de simples fita e favorece o encurtamento telomérico (VON ZGLINICKI, 2000). Em parasitos do gênero *Leishmania*, a região telomérica varia entre 200 a 1000 bp (CONTE e CANO, 2005), demonstrando que os telômeros são relativamente curtos quando comparado aos eucariotos superiores (1500 a 10.000 bp em humanos, de acordo com o tipo celular) (IWAMA et al., 1998; SVENSON et al., 2011; SAMASSEKOU et al., 2010). Essa característica impossibilita fisicamente a formação da estrutura *t-loop*, assim como ocorre em *S. cerevisiae* (telômeros ~300 bp) (NANDAKUMAR e CECH, 2013), sugerindo que diante de estresse oxidativo esse parasito provavelmente se comporte de uma maneira muito peculiar, já que não há a formação do *t-loop* para limitar o acesso de proteínas de reparo. Em conjunto, essas explicações fornecem mais um indicativo de que a resposta ao dano oxidativo na região telomérica em *L. amazonensis* provavelmente ocorre de maneira rápida e eficaz.

Um ponto interessante sobre as proteínas RPA é que sua estrutura, constituída de vários domínios OB-fold, propicia uma ação multifuncional, evidenciado por sua participação nas mais variadas vias metabólicas do DNA (SAKAGUCHI et al., 2008). Em *L. amazonensis*, embora LaRPA-1 não apresente o domínio N-terminal RPA1-70 (também chamado de RPA1N), responsável principalmente pela interação com proteínas envolvidas no *check point* celular, a mesma foi evidenciada participando do reparo por recombinação homóloga nos telômeros, como consequência da indução de quebras de DNA na forma de dupla-fita (DA SILVEIRA et al., 2013). Os resultados apresentados nesta tese fornecem fortes indícios de que LaRPA-1 esteja participando de outra via de reparo, nesse caso reparo por mal pareamento (MMR) induzida em resposta ao estresse oxidativo agudo, a semelhança do que ocorre com seu homólogo nos eucariotos superiores (IYER et al., 2006; MODRICH, 2006). A figura 18 apresenta um diagrama completo onde propomos, de maneira sucinta, como se daria a participação da proteína LaRPA-1 na via de reparo por MMR induzida por estresse oxidativo em *L. amazonensis*.

Para finalizar, vale a pena lembrarmos que durante o ciclo de vida de *L. amazonensis*, este parasito fica sujeito a ação de uma grande variedade de moléculas tóxicas, sobretudo moléculas que geram danos oxidativos (e.g. ROS). Nossos resultados sugerem a existência de um sistema de resposta a danos oxidativos no DNA extremamente eficiente fazendo com que, mesmo após a indução do estresse, esse parasito consiga sobreviver e replicar DNA. Esse conhecimento, atrelado à pesquisas aplicadas, poderá facilitar o descobrimento de novos alvos parasita-específicos que desestabilizem, por exemplo, esse eficiente sistema de resposta a danos no DNA presente nesse

parasito. Isso contribuirá para o desenvolvimento de vacinas e drogas eficazes para o tratamento e a possível erradicação das leishmanioses.



**Figura 18. Representação esquemática da possível participação da proteína LaRPA-1 na via de reparo por MMR induzida por estresse oxidativo.** O tratamento com  $H_2O_2$  induz dano oxidativo principalmente nos telômeros, causando encurtamento e liberação de LaRPA-1 que perde seu sítio de interação preferencial, o 3'G *overhang*. Após o reconhecimento do dano pela maquinaria de reparo por MMR (complexo MutS $\alpha$  e Exo1) e possíveis proteínas acessórias, ocorre degradação do DNA oxidado e recrutamento de LaRPA-1 que passa a interagir com a fita telomérica rica em C, cumprindo seu papel de proteção. LaRPA-1 provavelmente regula a atividade do complexo MutS $\alpha$  e Exo1 e permite o acesso da maquinaria de replicação (DNA polimerase + DNA ligase) para síntese pós-reparo, da nova fita rica em G. O processo que gera a extremidade 3'G *overhang* denominado *resection* ainda permanece desconhecido em *Leishmania*, porém ele é importante para gerar o substrato para a ação futura da telomerase. Fill in = preenchimento, Exo1 = exonuclease I, MMR = mismatch repair, MutS $\alpha$  = complexo em mamífero formado pelas proteínas MSH2 e MSH6, cujos ortólogos em *Leishmania* recebem a mesma denominação.

## **6. Considerações Finais e Perspectivas**

---

## 6. Considerações Finais e Perspectivas

Como já citado anteriormente, a estreita semelhança entre os complexo CST de eucariotos superiores e o complexo RPA, e a ausência em *L. amazonensis* de ortólogos para proteínas descritas em outros eucariotos como ligantes da simples fita telomérica rica em G (ex: Cdc13, POT1), sugerem que a presença de LaRPA-1 é crucial na manutenção dos telômeros do parasita, onde provavelmente essa proteína cumpra funções análogas às proteínas mencionadas. Além disso, esse trabalho apresenta fortes evidências que sugerem um deslocamento de LaRPA-1 da extremidade simples fita dos telômeros (3'G *overhang*), e sua participação no reparo por *mal* pareamento (MMR), após os parasitos serem submetidos a estresse oxidativo. A participação da proteína LaRPA-1 em maquinarias de reparo, especialmente no MMR, é algo ainda relativamente novo, sendo estudado por poucos grupos de pesquisa, embora a participação de LaRPA-1 no reparo por recombinação homóloga já tenha sido evidenciado por nosso grupo. Para obtermos maiores evidências da presença de MMR nos telômeros e do envolvimento de LaRPA-1 nesta via, pretendemos realizar ensaios de imunoprecipitação de cromatina telomérica utilizando soros anti-PCNA e anti-MSH2 (componentes MMR). Também pretendemos realizar ensaios de infecção *in vivo* com os parasitos sobreviventes e novos ensaios de viabilidade celular para verificarmos se os sobreviventes são realmente mais aptos (resistentes) ao estresse oxidativo. Em conjunto, esses resultados fornecerão fortes evidências para aceitarmos ou refutarmos o modelo proposto nesse manuscrito.

## **7. Referências**

---

## 7. Referências

- . AUBERT, G. e LANSDORP, P.M. (2008). Telomeres and Aging. *Physiol. Rev.* 88, 557-579.
- . BARRAL, A., PEDRAL-SAMPAIO, D., GRIMALDI JUNIOR, G., et al. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg.* 44, 536-546.
- . BASU, M.K. e RAY, M. (2005). Macrophage and *Leishmania*: an unacceptable coexistence. *Crit Rev Microbiol* 31, 145-154.
- . BEKAERT, S. (2005) Telomere length: the biological clock reviewed. *Cell cycle*. Published in BTi.
- . BIANCHI, A., NEGRINI, S. e SHORE, D. (2004) Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Mol. Cell* 16, 139–146.
- . BLACKBURN, E.H. (1990). Telomeres and their synthesis. *Science.* 249(4968):489-490.
- . BLACKBURN, E.H. (2001). Switching and signaling at the telomere. *Cell*, 106, 661-673.
- . BRESSAN, D.A., BAXTER, B.K. e PETRINI, J.H. (1999) The Mre11-Rad50-Xrs2 protein complex facilitates homologous recombination-based double-strand break repair in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 7681-7687.
- . BRIERLEY, D.J. e MARTIN, S.A. (2013) Oxidative stress and the DNA mismatch repair pathway. *Antioxid Redox Signal.* 18(18):2420-8.
- . BUSCHTA-HEDAYAT, N., BUTERIN, T., HESS, M.T., MISSURA, M. e NAEGELI, H. (1999) Recognition of nonhybridizing base pairs during nucleotide excision repair of DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 6090–6095.
- .CAMPOS, P.C., SILVA, V.G., FURTADO, C., MACHADO-SILVA, A., DAROCHA, W.D. et al. (2011) Trypanosoma cruzi MSH2: Functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response. *Mol Biochem Parasitol.* 176(1):8-16.
- .CASTEEL, D.E., ZHUANG, S., ZENG, Y., PERRINO, F.W., BOSS, G.R., GOULIAN, M., PILZ, R.B. (2009) A DNA polymerase-alpha primase cofactor with homology to replication protein A-32 regulates DNA replication in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 284, 5807–5818.
- . CHAI, W., DU, Q., SHAY, J.W. e WRIGHT, W.E. (2006) Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Mol. Cell* 21, 427–435.
- . CHEN, L.Y., LINGNER, J. (2013) CST for the grand finale of telomere replication. *Nucleus.* 4(4):277-82.
- . CHEN, L.Y., REDON, S., LINGNER, J. (2012) The human CST complex is a terminator of telomerase activity. *Nature*, 488(7412):540-4.
- . CONTE, F.F. e CANO, M.I.N. (2005) Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int. J. Parasitol.* 35, 1435-1443.
- . COYLE, C.H., KADER, K.N. (2007) Mechanisms of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in endothelial cells exposed to physiologic shear stress. *ASAIO J.* 53(1):17-22.
- . CUDDIHY, A.R.; O'CONNELL, M.J. (2003) Cell-cycle responses to DNA damage in G<sub>2</sub>. *Int Rev Cytol.* 222:99-140.
- . DA SILVA, M.S., DA SILVEIRA, R.C.V., PEREZ, A.M., MONTEIRO, J.P., CALDERADO, S.G., DA CUNHA, J.P., ELIAS, M.C. e CANO, M.I.N. (2012) Nuclear DNA replication in trypanosomatid protozoa. In: DNA replication and mutation. 1ª edição. Ed Nova Science Publishers.

- . DA SILVA, M.S., MONTEIRO, J.P., NUNES, V.S., VASCONCELOS, E.J., PEREZ, A.M., FREITAS-JÚNIOR, L.H., ELIAS, M.C., CANO, M.I.N. (2013) *Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle. *PLoS One*. 8(11):e81397.
- . DA SILVA, M.S., PEREZ, A.M., DA SILVEIRA, R.C.V., DE MORAES, C.E., SIQUEIRA-NETO, J.L., FREITAS-JÚNIOR, L.H., CANO, M.I.N. (2010) The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiol*. 7;10:136.
- . DA SILVEIRA, R.C.V., DA SILVA, M.S., NUNES, V.S., PEREZ, A.M. e CANO M.I.N. (2013). The natural absence of RPA1N domain did not impair *Leishmania amazonensis* RPA-1 participation in DNA damage response and telomere protection. *Parasitology*, 140, 547–559.
- . DAS, M., MUKHERJEE, S.B. e SHAHA, C. (2001). Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci* 114, 2461-2469.
- . DEBRABANT, A. e NAKHASI, H. (2003) Programmed cell death in trypanosomatids: is it an altruistic mechanism for survival of the fittest? *Kinetoplastid Biol Dis*. 25;2(1):7.
- . DEBRABANT, A., LEE, N., BERTHOLET, S., DUNCAN, R. e NAKHASI, H.L. (2003) Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *International Journal for Parasitology*, 33:257-267.
- . DEGRAVE, W., FERNANDES, O., CAMPBELL, D., BOZZA, M., LOPES, U. (1994) Use of molecular probes and PCR for detection and typing of *Leishmania* - a mini-review., Rio de Janeiro, vol. 89(3): 463-469.
- . DE LANGE, T. (2005) Shelterin, the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development*, 19,2100-2110.
- . DEMOTT, M.S., ZIGMAN, S., BAMBARA, R.A. (1998) Replication protein A stimulates long patch DNA base excision repair. *J Biol Chem*. 273(42):27492-8.
- . DMITRIEV, P.V., PETROV, A.V., DONTSOVA, O.A. (2003). Yeast telosome complex, components and their functions. *Biochemistry* 68,718-34.
- . DUAN, J., ZHANG, Z. e TONG, T. (2005). Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 1407-1420.
- . EPEL, E.S., BLACKBURN, E.H., LIN, J., DHABHAR, F.S., ADLER, N.E., MORROW, J.D., CAWTHON, R.M. (2004) Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101(49):17312-5.
- . FAIRLAMB, A.H. e CERAMI, A. (1992) Metabolism and functions of trypanothione in the Kinetoplastida, *Annu Rev Microbiol*. 46:695-729.
- . FALLET, E. JOLIVET, P., SOUDET, J., LISBY, M., GILSON, E., TEIXEIRA, M.T. (2014) Length-dependent processing of telomeres in the absence of telomerase. *Nucleic Acids Res*. 42(6):3648-65.
- . FAN, L.M. e LI, J.M. (2014) Evaluation of methods of detecting cell reactive oxygen species production for drug screening and cell cycle studies *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. 70(1):40-47.
- . FERNÁNDEZ, M.F., CASTELLARI, R.R., CONTE, F.F., GOZZO, F.C., SABINO, A.A., PINHEIRO, H., NOVELLO, J.C., EBERLIN, M.N., CANO, M.I.N. (2004). Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur J Biochem*, 271,3050-63.
- . FERREIRA, A.L.A. e MATSUBARA, L.S. (1997). Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Rev Ass Med Brasil*, 43(1): 61-8.

- . FINZI, J.K., CHIAVEGATTO, C.W., CORAT, K.F., LOPEZ, J.A., CABRERA, O.G., MIELNICZKI-PEREIRA, A.A., COLLI, W., IVES, M.J., GADELHA, F.R. (2004) Trypanosoma cruzi response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol.* 133(1):37-43.
- . FISHER, T.S., TAGGART, A.K. e ZAKIAN, V.A. (2004). Cell cycle-dependent regulation of yeast telomerase by Ku. *Nat Struct Mol Biol* 11, 1198-1205.
- . FLYNN, R.L., CHANG S. e ZOU, L. (2012) RPA and POT1: Friends or foes at telomeres? *Cell Cycle* 11:4, 652-657.
- . FÖRSTEMANN K e LINGNER J. Molecular basis for telomere repeat divergence in budding yeast (2001). *Mol Cell Biol.* 21(21):7277-86.
- . FÖRSTEMANN, K., HÖSS, M., LINGNER J. (2000) Telomerase-dependent repeat divergence at the 3' ends of yeast telomeres. *Nucleic Acids Res*, 28(14):2690-4.
- . FUERTES, M.A., NGUEWA, P.A., CASTILLA, J., ALONSO, J. and Martín, J.M.P. (2008) Programmed Cell Death in Protozoa: An Evolutionary Point of View. The Example of Kinetoplastid Parasites. Ed. Landes Bioscience and Springer Science.
- . GAO, H., CERVANTES, R.B., MANDELL, E.K., OTERO, J.H., LUNDBLAD, V. (2007) RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nat Struct Mol Biol.* 14(3):208-14.
- . GIARDINI, M.A., SEGATTO, M., DA SILVA, M.S., NUNES, V.S. e CANO, M.I.N. (2014) Telomere and telomerase biology. *Prog Mol Biol Transl Sci.*125:1-40.
- . GIARDINI, M.A, LIRA, C.B, CONTE, F.F., CAMILLO, L.R., SIQUEIRA-NETO, J.L., RAMOS, C.H., CANO, M.I.N. (2006) The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*, gene cloning and characterization. *Parasitol Res.* 98, 447-54.
- . GIUDICE, A., CAMADA, I., LEOPOLDO, P.T. et al., (2007). Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. *BMC Infect Dis* 7, 7.
- . GILSON, E. e GELLI, V. (2007). How telomeres are replicated. *Nature Rev. Mol Cell Biol.* 8, 825-838.
- . GIRAUD-PANIS, M.J., TEIXEIRA, M.T., GÉLI, V., GILSON, E. (2010) CST Meets Shelterin to Keep Telomeres in Check. *Molecular Cell*, 39(5):665-76.
- .GLOVER, L., ALSFORD, S., BEATTIE, C. e HORN, D. (2007) Deletion of a trypanosome telomere leads to loss of silencing and progressive loss of terminal DNA in the absence of cell cycle arrest. *Nucleic Acids Res.* 35(3):872-80.
- . GRIFFITHS, A.J.F., MILLER, J.H., SUZUKI, D.T., LEWONTIN, R.C., GELBART, W.M., WESSLER, S.R., (2007) Introdução à Genética, 8ª edição, Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro.
- . GUO, S., ZHANG, Y., YUAN, F., GAO, Y., GU, L., WONG, I., LI, G.M. (2006) Regulation of replication protein A functions in DNA mismatch repair by phosphorylation. *J Biol Chem.* 281(31):21607-16.
- . HAYS, S.L., FIRMENICH, A.A., MASSEY, P., BANERJEE, R. E BERG, P. (1998) Studies of the interaction between Rad52 protein and the yeast single-stranded DNA binding protein RPA. *Mol Cell Biol* 18, 4400–4406.
- . HEBY, O., PERSSON, L., RENTALA, M. (2007) Targeting the polyamine biosynthetic enzymes: a promising approach to therapy of African sleeping sickness, Chagas' disease, and leishmaniasis. *Amino Acids*, 33(2), 359-66.
- . HEGDE, M.L., HEGDE, P.M., BELLOT, L.J., MANDAL, S.M., HAZRA, T.K., LI, G.M., BOLDOGH, I., TOMKINSON, A.E., MITRA, S. (2013) Prereplicative repair of oxidized bases in the human genome is

mediated by NEIL1 DNA glycosylase together with replication proteins. *Proc Natl Acad Sci USA*. 110(33):E3090-9.

. HERWALDT, B.L. (1999). Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191-1199.

. HORN, D., SPENCE, C., INGRAM, A.K. (2000) Telomere maintenance and length regulation in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*. 19(10):2332-9.

. IVENS, A.C., PEACOCK, C.S., WORTHEY, E.A., et al. (2005). The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 309, 436-442.

. IWAMA, H., OHYASHIKI, K., OHYASHIKI, J.H., HAYASHI, S., YAHATA, N., et al. (1998) Telomeric length and telomerase activity vary with age in peripheral blood cells obtained from normal individuals. *Hum Genet* 102: 397-402.

. IYER, R.R., PLUCIENNIK, A., BURDETT, V. e MODRICH, P.L. (2006) DNA Mismatch Repair: Functions and Mechanisms. *Chem. Rev.*, 106, 302-323.

. JACOBS, D.M., LIPTON, A.S., ISERN, N.G., DAUGHDRILL, G.W., LOWRY, D.F., GOMES, X., WOLD, M.S. (1999). Human replication protein A, global fold of the N-terminal RPA-70 domain reveals a basic cleft and flexible C-terminal linker. *J Biomol NMR*. 14,321-31.

. JOHNSTON, D.A., BLAXTER, M.L., DEGRAVE, W.M., FOSTER, J., IVENS, A.C. e MELVILLE, S.E. (1999) Genomics and the biology of parasites. *Bioessays* 21, 131-147.

. KALYANARAMAN, B., DARLEY-USMAR, V., DAVIES, K.J., DENNERY, P.A., FORMAN, H.J., GRISHAM, M.B., MANN, G.E., MOORE, K., ROBERTS, L.J., ISCHIROPOULOS, H. (2012) Measuring reactive oxygen and nitrogen species with fluorescent probes: challenges and limitations. *Free Radic Biol Med*. 52(1): 1-6.

. KAWANISHI S e OIKAWA S. (2004) Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Ann N Y Acad Sci.*, 1019:278-84.

. KAPOOR, V., TELFORD, W.G. (2004) Telomere length measurement by fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Methods Mol Biol*. 263:385-98.

. KIBE, T., ONO, Y., SATO, K., UENO, M. (2007). Fission Yeast Taz1 and RPA Are Synergistically Required to Prevent Rapid Telomere Loss. *Mol Biol Cell*.11, 246-251.

. KLOBUTCHER, L.A., SWANTON, M.T., DONINI, P., PRESCOTT, D.M. (1981) All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 78 (5),3015-9.

. KOBAYASHI, Y., SATO, K., KIBE, T., SEIMIYA, H., NAKAMURA, A., YUKAWA, M., TSUCHIYA, E., UENO, M. (2010) Expression of Mutant RPA in Human Cancer Cells Causes Telomere Shortening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 74(2), 90496-1-4.

. KOWALCZYKOWSKI, S. C. (2000). Some assembly required. *Nat Struct Biol* 7, 1087-1089.

. KURTZ, D.J. DECARY, S, HONG, Y., TRIVIER, E., AKHMEDOV, A., ERUSALIMSKY, J.D. (2004) Chronic oxidative stress compromises telomere integrity and accelerates the onset of senescence in human endothelial cells. *J Cell Sci*. 117 (Pt 11):2417-26.

. LANG, T., LECOEUR, H. e PRINA, E. (2009). Imaging Leishmania development in their host cells. *Trends Parasitol* 25, 464-473.

. LENNON, S., MARTIN, S., COTTER, T. (1991) Dose-dependent induction of apoptosis in human tumour cell lines by widely diverging stimuli. *Cell Prolif* 24 (2): 203-14.

. LIRA, C.B.B, GIARDINI, M.A., SIQUEIRA-NETO, J.L., CONTE, F.F., CANO, M.I.N. (2007a) Telomere Biology of Trypanosomatids, beginning to answer some questions. *Trends Parasitol*. 23, 357-362.

- . LIRA, C.B.B., SIQUEIRA-NETO, J.L., GIARDINI, M.A., WINCK, F.V., RAMOS, C.H.I. e CANO, M.I.N. (2007b). LaRbp38, a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res Comm*, 358, 854-860.
- . LIRA, C.B.B., SIQUEIRA-NETO, J.L., KHATER, L., CAGLIARI, T., PERONI, L., REIS, J.R., RAMOS, C., CANO, M.I.N. (2007c). 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, 399-409.
- . LIU, D., O'COONOR, M.S., QIN, J., SONGYANG, Z. (2004) Telosome, a Mammalian telomere-associated Complex Formed by Multiple Telomeric Proteins. *J. Biol. Chem.* 279,51338-51342.
- . LOMBARD, D.B., CHUA, K.F., MOSTOSLAVSKY, R., FRANCO, S., GOSTISSA, M. e ALT, F.W. (2005). DNA repair, genome stability, and aging. *Cell* 120, 497-512.
- . LONGHESE, M.P., PLEVANI, P., LUCCHINI, G. (1994). Replication factor A is required *in vivo* for DNA replication, repair, and recombination. *Mol Cell Biol.* 14,7884-90.
- . MIYAKE, Y., NAKAMURA, M., NABETANI, A., SHIMAMURA, S., TAMURA, M., YONEHARA, S., SAITO, M., ISHIKAWA, F. (2009) RPA-like mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 complex binds to single stranded DNA and protects telomeres independently of the Pot1 pathway. *Mol. Cell* 36, 193–206.
- . MODRICH, P. (2006) Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *J Biol Chem.* 281(41): 30305-30309.
- . MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays". *J. Immunol. Methods* 65, 55–63.
- . MUÑOZ-JORDAN, J.L., CROSS, G.A., DE LANGE, T., GRIFFITH, J.D. (2001). T-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J.* 20, 579-588.
- . MURRAY, H.W., BERMAN, J.D., DAVIES, C.R. e SARAVIA, N.G. (2005) Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.
- . MURRAY, H.W. e NATHAN, C.F. (1999). Macrophage microbicidal mechanisms *in vivo*: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. *J Exp Med* 189, 741-746.
- . NANDAKUMAR, J. e CECH, T.R. (2013) Finding the end: recruitment of telomerase to telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 14(2):69-82.
- . NEVES, D.P., MELO, A.L., GENARO, O. e LINARDI, P.M. (2005). *Parasitologia Humana*, 11a Edição. pp. 31-72, Ed. Atheneu.
- . OESEBURG, H., De BOER, R.A., VAN GILST, W.H., VAN DER HARST, P. (2010) Telomere biology in healthy aging and disease. *Pflugers Arch., Eur J Physiol* 459(2):259-68.
- . OGI, T., LIMSIRICHAIKUL, S., OVERMEER, R.M., VOLKER, M., TAKENAKA, K., CLONEY, R., NAKAZAWA, Y., NIIMI, A., MIKI, Y., JASPERS, N.G., MULLENDERS, L.H., YAMASHITA, S., FOUSTERI, M.I., LEHMANN, A.R. (2010) Three DNA polymerases, recruited by different mechanisms, carry out NER repair synthesis in human cells. *Mol Cell.* 37(5):714-27.
- . OLIVIER, M., GREGORY, D.J. e FORGET, G. (2005). Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol Rev* 18, 293-305.
- . OPRESKO, P.L., VON KOBBE, C., LAINE, J.P., HARRIGAN, J., HICKSON, I.D. e BOHR, V. (2002) Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and bloom Syndrome helicases. *J. Biol. Chem.*, 275, 41110-41119.
- . OPRESKO, P.L., FAN, J., DANZY, S., WILSON, D.M., BOHR, V.A. (2005) Oxidative damage in telomeric DNA disrupts recognition by TRF1 and TRF2. *Nucleic Acids Res.* 33(4):1230-9.

- . OTTERLEI, M., WARBRICK, E., NAGELHUS, T.A., HAUG, T., SLUPPHAUG, G., AKBARI, M., et al.,(1999). Post-replicative base excision repair in replication foci. *The EMBO Journal*, 18(13), 3834–3844.
- . PARK, M.S., LUDWIG, D.L., STIGGER, E.E., LEE, S.H. (1996) Physical interaction between human RAD52 and RPA is required for homologous recombination in mammalian cells. *J Biol Chem* 271, 18996–19000.
- . PASSOS-SILVA, D.G., RAJÃO, M.A., NASCIMENTO-DE-AGUIAR, P.H., Vieira-da-Rocha, J.P., Machado, C.R., Furtado, C. (2010) Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids*. 2010:840768.
- . PEACOCK, C.S., SEEGER, K., HARRIS, D., et al. (2007). Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat Genet* 39, 839-847.
- .PENNOCK, E., BUCKLEY, K. e LUNDBLAD, V. (2001) Cdc13 delivers separate complexes to the telomere for end protection and replication. *Cell* 104, 387–396.
- .PFEIFFER, V. e LINGNER, J. TERRA Promotes Telomere Shortening through Exonuclease 1–Mediated Resection of Chromosome Ends. *PLoS Genet*. 8(6):e1002747.
- . RAMILO, C., GU, L., GUO, S., ZHANG, X., PATRICK, S.M., TURCHI, J.J., LI, G.M. (2002) Partial reconstitution of human DNA mismatch repair in vitro: characterization of the role of human replication protein A. *Mol Cell Biol*. 22(7):2037-46.
- . RAMIREZ, R., CARRACEDO, J., JIMENEZ, R., CANELA, A., HERRERA, E., ALJAMA, P. e BLASCO, M. A. (2003). Massive telomere loss is an early event of DNA damage-induced apoptosis. *J Biol Chem* 278, 836-842.
- . REY, L. (2001). Parasitologia. 3ª edição. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan.
- . RICHTER, T. e VON ZGLINICKI, T. (2007) A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Exp Gerontol*. 42(11):1039-42.
- . SAMASSEKOU O., GADJI M., DROUIN R., YAN J. (2010) Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat*. 192(5):284-91.
- SAKAGUCHI, K., ISHIBASHI, T., UCHIYAMA, Y., IWABATA, K. (2008) The multi-replication protein A (RPA) system – a new perspective. *FEBS J*. 276(4):943-63.
- . SALIC, A., MITCHISON, T.J. (2008) A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(7):2415-20.
- . SCHAFER, F., BUETTNER, G. (2001) Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* 30 (11): 1191-212.
- . SCHRAMKE, V., LUCIANO, P., BREVET, V., GUILLOT, S., CORDA, Y., IONGHESE, M.P., GILSON, E. e GELI, V. (2004) RPA regulates telomerase action by providing est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics*, 36, 46-54.
- .SIMPSON, L. (1987) The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annual Review in Microbiology*, 41:363-82.
- . SIQUEIRA-NETO, J.L., LIRA, C.B.B., GIARDINI, M. A., KHATER, L., PEREZ, A.M., PERONI, L.A., DOS REIS, J.R.R., FREITAS-JUNIOR, L.H., RAMOS, C.H.I., CANO, M.I.N. (2007). *Leishmania* Replication Protein A-1 binds *in vivo* single-stranded telomeric DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun. Biochem. Biophys. Res. Commun.*, doi,10.1016/j.bbrc.2007.04.144.
- . SHAKIROV, E.V., SONG, X., JOSEPH, J.A. e SHIPPEN, D.E. (2009). POT1 proteins in green algae and land plants: DNA-binding properties and evidence of co-evolution with telomeric DNA. *Nucleic Acids Research* 37(22), 7455-7467.

- . SHIO, M.T., OLIVIER, M. (2010) Editorial: Leishmania survival mechanisms: the role of host phosphatases. *J. Leukoc. Biol.* 88(1), 1-3.
- . SIES, H. (1985) Oxidative stress: introductory remarks. In *Oxidative Stress*, H. Sies, Ed. London: Academic Press Inc. pp. 1-7.
- . SLUPPHAUG, G., KAVLI, B, KROKAN, H.E. (2003) The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. *Mutat Res.* 531(1-2):231-51.
- . SMITH, J., ZOU, H., ROTHSTEIN, R. (2000). Characterization of genetic interactions with RFA1, the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie* 82, 71-78.
- . SMOGORZEWSKA, A. e DE LANGE, T. (2004). Regulation of Telomerase by Telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 177-208.
- . STEWART, S.A. e WEINBERG, R.A. (2002). Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene* 21, 627-630.
- . STILES, J.K., HICOCK, P. I., SHAH, P.H. e MEADE, J.C. (1999) Genomic organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann Trop Med Parasitol* 93, 781-807.
- . SUN, J., YU, E.Y., Yang, Y., Confer, L.A., Sun, S.H., Wan, K., et al. (2009) Stn1-Ten1 is an Rpa2-Rpa3-like complex at telomeres. *Genes Dev.*, 23:2900-14.
- . SVENSON U., NORDFJÄLL K., BAIRD D, ROGER L., OSTERMAN P, HELLENIUS M., ROOS G. (2011) Blood Cell Telomere Length Is a Dynamic Feature, *PLoS One* 6 (6), e21485.
- . TCHIRKOV e LANSDORP (2003) Role of oxidative stress in telomere shortening in cultured fibroblasts from normal individuals and patients with ataxia-telangiectasia. *Hum Mol Gen.* 12(3):227-32.
- . TEIXEIRA, M.T., ARNERIC, M., SPERISEN, P. e LINGNER, J. (2004) Telomere Length Homeostasis Is Achieved via a Switch between Telomerase-Extendible and -Nonextendible States. *Cell*, Vol. 117, 323–335.
- . TEIXEIRA, M.T. e GILSON, E. (2005). Telomere maintenance, function and evolution: the yeast paradigm. *Chromosome Res* 13, 535-548.
- . THERIOT, C.A., HEGDE, M.L., HAZRA, T.K., MITRA, S. (2010). RPA physically interacts with the human DNA glycosylase NEIL1 to regulate excision of oxidative DNA base damage in primer-template structures. *DNA Repair (Amst)*, 4;9(6):643-52.
- . THOMAS, S., GREEN, A., STURM, N.R., CAMPBELL, D. A. e MYLER, P.J. (2009). Histone acetylations mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics* 10, 152.
- . TUON, F.F., NETO, V.A., AMATO, V.S. (2008) Leishmania: origin, evolution and future since the Precambrian. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 54(2):158-66.
- . VALKO, M., MORRIS, H., CRONIN, M. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12 (10): 1161-208.
- . VASCONCELOS, E.J., NUNES, V.S., DA SILVA, M.S., SEGATTO, M., MYLER, P.J. e CANO, M.I.N. (2014) The putative Leishmania telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence. *PLoS One* (submitted).
- . VERDUN, R.E. e KARLSEDER, J. (2006) The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* 127, 709–720.
- . VON ZGLINICKI, T. (2000) Role of Oxidative Stress in Telomere Length Regulation and Replicative Senescence. *Annals of the New York Academy of Sciences.* Vol 908, *Mol. and Cell. Ger.*, 99–110.
- . VON ZGLINICKI, T. (2002) Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences.* 27 (7), 339–344.

- .WAN, M., QIN, J., SONGYANG, Z., LIU, D. (2009) OB foldcontaining protein 1 (OBFC1), a human homolog of yeast Stn1, associates with TPP1 and is implicated in telomere length regulation. *J Biol Chem.* 284:26725-31.
- . WILSON, M.E., ANDERSEN, K.A. e BRITIGAN, B.E. (1994). Response of *Leishmania chagasi* promastigotes to oxidant stress. *Infect Immun* 62, 5133-5141.
- . WINCKER, P., RAVEL, C., BLAINEAU, C., PAGES, M., JAUFFRET, Y., DEDET, J.P., BASTIEN, P. (1996) The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Ac. Res.* 24:1688-1694.
- . WOLD, M.S. (1997) Replication Protein A: A heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* 66:61–92.
- . WORLD HEALTH ORGANIZATION (2014) Leishmaniasis: Magnitude of the Problem. In: *Leishmaniasis, Burden and distribution*. Available: [http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden\\_magnitude/en/](http://www.who.int/leishmaniasis/burden/magnitude/burden_magnitude/en/). Acessado em 15 de Abril de 2014.



## **8. Anexos**

(produção bibliográfica durante o período de doutorado)

---

## 8. ANEXOS

### 8.1 Capítulo de livro: *Nuclear DNA replication in Trypanosomatid protozoa* (capa e resumo)

In: DNA Replication and Mutation  
Editor: Raymond P. Leitner

ISBN: 978-1-61324-490-6  
© 2012 Nova Science Publishers, Inc.

The exclusive license for this PDF is limited to personal website use only. No part of this digital document may be reproduced, stored in a retrieval system or transmitted commercially in any form or by any means. The publisher has taken reasonable care in the preparation of this digital document, but makes no expressed or implied warranty of any kind and assumes no responsibility for any errors or omissions. No liability is assumed for incidental or consequential damages in connection with or arising out of information contained herein. This digital document is sold with the clear understanding that the publisher is not engaged in rendering legal, medical or any other professional services.

## *Chapter VII*

---

# **Nuclear DNA Replication in Trypanosomatid Protozoa**

---

*M. S. da Silva<sup>1</sup>, R. C. V. da Silveira<sup>1</sup>, A. M. Perez<sup>1</sup>,  
J. P. Monteiro<sup>1,2</sup>, S. G. Calderano<sup>3</sup>, J. P. da Cunha<sup>3</sup>,  
M. C. Elias<sup>3</sup> and M. I. N. Cano<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP,  
Botucatu, São Paulo, Brazil

<sup>2</sup>EMBRAPA-Caprinos e Ovinos, Sobral, Ceará, Brazil

<sup>3</sup>Laboratório de Toxinologia Aplicada, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil

## Abstract

The parasites belonging to the family Trypanosomatidae (order Kinetoplastida) are among the most primitive eukaryotes. Some trypanosomatids are the etiologic agents of neglected human pathologies such as South American and African trypanosomiasis and leishmaniasis. As a consequence of their ancient phylogenetic position, nuclear DNA replication in trypanosomatid protozoa shows conserved and non-conserved features. DNA replication in trypanosomatids initiates nearly simultaneously in the nucleus and in the genetic material of the single mitochondrion (or kinetoplast), suggesting that DNA synthesis is coordinately regulated in both organelles. In eukaryotes, nuclear DNA replication is preceded by assembly of the pre-replication complex, which is coordinated by the Origin Recognition Complex (ORC). However, in trypanosomatids, the pre-replication complex differs from other eukaryotes and is similar to *Archaea*. All of these parasites contain only one protein that recognizes the replication origins and is found in the nucleus throughout the cell cycle, which suggests that it is not involved in the control of replication initiation. In the S phase, DNA replication starts at these origins and, in trypanosomes, occurs mainly at the nuclear periphery. In *Leishmania* spp., from the beginning up to mid S phase, replication sites are spread throughout the nuclear space to form subnuclear foci of active DNA replication. From mid-to-late S phase, replication is restricted to sites at the nuclear periphery. Few nuclear DNA polymerases have been described in trypanosomatid protozoa, although putative members of all polymerase families are found in their genomes. Structural and functional analyses indicate that most of these polymerases are highly conserved, with some of them being involved in polymerase dimerization and the repair of DNA damage. Although there are no descriptions of DNA polymerase  $\delta$  in these protozoa, one of this protein's partners, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), is found in the nucleus throughout the cell cycle. Trypanosomatid PCNA forms distinct subnuclear foci in the S phase, whereas its distribution is more diffuse in the G2/M phase and in post-mitotic phase cells. This finding suggests that there may be phase-specific regulation of PCNA in the cell cycle. DNA replication in trypanosomatid telomeres is terminated by the action of telomerase. The biochemical properties of the trypanosomatid enzyme are conserved and resemble those described in other eukaryotes. *Leishmania* telomeres replicate late in S phase and at the beginning of G2 phase the chromosomes cluster at the nuclear periphery. Telomerase co-localizes with telomeres from the late S to G2 phases. These observations point to the existence of replication factories in trypanosomatids, the importance of which will be reviewed and discussed in this chapter.



# Telomere and Telomerase Biology

Miriam Aparecida Giardini, Marcela Segatto, Marcelo Santos da Silva,  
Vinícius Santana Nunes, Maria Isabel Nogueira Cano

Depto. de Genética, Instituto de Biociências, Univ. Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
UNESP-Botucatu, São Paulo, Brazil

## Contents

1. Introduction	2
2. The General Structure of Telomeric DNA	4
2.1 Telomere loops and G-quartets: Specialized structures at the ends of eukaryotic chromosomes	6
3. Replication of Telomeres	7
3.1 The telomerase RNP complex	8
3.2 Telomere replication in the absence of telomerase	17
4. Telomeric Chromatin: Implications for End Protection, Telomere Replication, and Telomere Length Regulation	19
4.1 CST: The major telomere end-binding complex on eukaryotic telomeres	20
4.2 Shelterin: A conserved, double-stranded, telomeric protein complex that associates with the telomere end-binding CST complex to maintain telomere homeostasis	23
5. TERRA: The Telomeric RNA Transcript	25
6. Consequences of Telomere Deprotection	26
Acknowledgments	29
References	29

**Abstract**

Telomeres are the physical ends of eukaryotic linear chromosomes. Telomeres form special structures that cap chromosome ends to prevent degradation by nucleolytic attack and to distinguish chromosome termini from DNA double-strand breaks. With few exceptions, telomeres are composed primarily of repetitive DNA associated with proteins that interact specifically with double- or single-stranded telomeric DNA or with each other, forming highly ordered and dynamic complexes involved in telomere maintenance and length regulation. In proliferative cells and unicellular organisms, telomeric DNA is replicated by the actions of telomerase, a specialized reverse transcriptase. In the absence of telomerase, some cells employ a recombination-based DNA replication pathway known as alternative lengthening of telomeres. However, mammalian somatic cells that naturally lack telomerase activity show telomere shortening with increasing age leading to cell cycle arrest and senescence. In another way, mutations or deletions of telomerase components can lead to inherited genetic disorders, and the depletion of telomeric proteins can elicit the action of distinct kinases-dependent DNA damage response, culminating in chromosomal abnormalities that are incompatible with life. In addition to the intricate network formed by the interrelationships among telomeric proteins, long noncoding RNAs that arise from subtelomeric regions, named telomeric repeat-containing RNA, are also implicated in telomerase regulation and telomere maintenance. The goal for the next years is to increase our knowledge about the mechanisms that regulate telomere homeostasis and the means by which their absence or defect can elicit telomere dysfunction, which generally results in gross genomic instability and genetic diseases.

### 8.3 Artigo científico: The natural absence of RPA1N domain did not impair *Leishmania amazonensis* RPA-1 participation in DNA damage response and telomere protection

## The natural absence of RPA1N domain did not impair *Leishmania amazonensis* RPA-1 participation in DNA damage response and telomere protection

RITA DE CÁSSIA VIVEIROS DA SILVEIRA§, MARCELO SANTOS DA SILVA§, VINÍCIUS SANTANA NUNES, ARINA MARINA PEREZ and MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO\*

*Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Botucatu, SP, 18618-970, Brazil*

(Received 19 July 2012; revised 28 September and 24 October 2012; accepted 24 October 2012; first published online 7 February 2013)

#### SUMMARY

We have previously shown that the subunit 1 of *Leishmania amazonensis* RPA (LaRPA-1) alone binds the G-rich telomeric strand and is structurally different from other RPA-1. It is analogous to telomere end-binding proteins described in model eukaryotes whose homologues were not identified in the protozoan's genome. Here we show that LaRPA-1 is involved with damage response and telomere protection although it lacks the RPA1N domain involved with the binding with multiple checkpoint proteins. We induced DNA double-strand breaks (DSBs) in *Leishmania* using phleomycin. Damage was confirmed by TUNEL-positive nuclei and triggered a G1/S cell cycle arrest that was accompanied by nuclear accumulation of LaRPA-1 and RAD51 in the S phase of hydroxyurea-synchronized parasites. DSBs also increased the levels of RAD51 in non-synchronized parasites and of LaRPA-1 and RAD51 in the S phase of synchronized cells. More LaRPA-1 appeared immunoprecipitating telomeres *in vivo* and associated in a complex containing RAD51, although this interaction needs more investigation. RAD51 apparently co-localized with few telomeric clusters but it did not immunoprecipitate telomeric DNA. These findings suggest that LaRPA-1 and RAD51 work together in response to DNA DSBs and at telomeres, upon damage, LaRPA-1 works probably to prevent loss of single-stranded DNA and to assume a capping function.

**Key words:** *Leishmania amazonensis*, DNA double-stranded break, LaRPA-1, RAD51, telomeres.

#### INTRODUCTION

*Leishmania* spp. are protozoa parasites among which are species that cause leishmaniasis, a disease that occurs in different clinical forms (cutaneous, mucocutaneous and visceral) and is endemic in many countries around the globe. Disease control and treatment are still inefficient and parasite drug resistance is a challenge since it may involve DNA amplification (Beverley *et al.* 1986; Grogl *et al.* 1989; Beverley, 1991; Ouellette *et al.* 2004; Berman, 2005). Therefore, efforts for the establishment of intensive research to better understand the molecular biology of these parasites are encouraged.

In most eukaryotes, replication protein A (RPA) is a heterotrimeric complex of single-stranded DNA-binding proteins that plays multiple roles in eukaryotic DNA metabolism, including telomere maintenance and DNA damage signalling (Wold, 1997; Schramke *et al.* 2004). RPA has high affinity for single-stranded DNA generated during replication and for damaged double-stranded DNA (Patrick and Turchi, 1999; Lao *et al.* 2000). This protein complex is required for each of the 4 major

DNA repair pathways, including the repair of DNA double-strand breaks (DSBs), a finding that suggests a surveillance function in the response to DNA damage (Wold, 1997). RPA has also been implicated in cell cycle checkpoint activation (Zou *et al.* 2006) since HeLa cells deficient in RPA are arrested at G2/M, have high levels of spontaneous DNA damage and show constitutive activation of checkpoint kinases (Dodson *et al.* 2004).

During the repair of DSBs by homologous recombination in yeast, RPA interacts with and modulates the activities of 2 members of the RAD52 epistasis group, namely proteins RAD51 and RAD52 (Sugiyama and Kowalczykowski, 2002; Stauffer and Chazin, 2004). In addition, the partial co-localization of RAD51 with RPA suggests that these nuclear foci are sites of DNA repair by homologous recombination (Golub *et al.* 1998). In mammals, RPA acts as a common intermediate for signalling DNA damage and for the subsequent recruitment and activation of damage response proteins at telomeres. The accumulation of RPA bound to single-stranded telomeric DNA occurs in the absence of single-stranded telomeric proteins or telomerase. In contrast, the presence of DNA-binding proteins inhibits the recruitment of RPA, nucleases, telomerase and checkpoint proteins (Longhese, 2008).

\* Corresponding author. E-mail: micano@ibb.unesp.br

§ These authors contributed equally to the paper.

In trypanosomatids, which includes *Leishmania* spp., knowledge about the roles played by RPA in DNA metabolism is very limited compared with model eukaryotes. Few reports show that the subunit 1 of RPA in *L. amazonensis* (LaRPA-1) binds and co-localizes with telomeres *in vivo* (Fernandez *et al.* 2004; Siqueira-Neto *et al.* 2007). LaRPA-1 is also structurally different from other RPA-1 but it shares many structural similarities with known conserved and RPA-like single-stranded telomere-binding proteins (e.g. POT1, CDC13 and OnTEBP) (Gao *et al.* 2007; Siqueira-Neto *et al.* 2007) whose homologues were not identified in the protozoan's genome. In this particular case, RPA-1 may have assumed an extra function at telomeres, analogous to the related telomere end-binding proteins such as POT1 in higher eukaryotes (Lira *et al.* 2007; Barrientos *et al.* 2008). To assess the role of LaRPA-1 in damage response, we induced DNA double-strand breaks in *Leishmania* promastigotes using phleomycin as the genotoxic agent. (Moore, 1988, 1989; McKean *et al.* 2001). In *T. brucei*, phleomycin induces *in vivo* the phosphorylation of a Tr<sup>130</sup> residue in the histone H2A, which seems to be a very early signal of the DSB damage response resembling  $\gamma$ H2A from other eukaryotes (Glover and Horn, 2012). It was also shown that *T. brucei*  $\gamma$ H2A foci co-localizes with the RAD51 recombinase and that these foci naturally occur during S and G2 phases or upon DSBs induced by chemicals or artificial meganuclease expression (Glover and Horn, 2012).

In the present study, we show that LaRPA-1 is involved in damage response and telomere protection upon phleomycin-induced damage, although it is structurally different from the RPA-1 described in other eukaryotes (Siqueira-Neto *et al.* 2007). Damage was confirmed by TUNEL-positive nuclei and triggered a G1/S cell cycle arrest concomitantly with the nuclear accumulation of LaRPA-1 and RAD51 in the S phase of hydroxyurea-synchronized cells. DSBs also increased the levels of RAD51 in non-synchronized parasites and of LaRPA-1 and RAD51 in the S phase of hydroxyurea-synchronized cells. At telomeres, more LaRPA-1 associated earlier with the G-rich telomeric strand, with a few foci showing an apparent co-localization of RAD51, although RAD51 did not immunoprecipitate telomeric DNA.

We speculate that in spite of being the major parasite telomere end-binding protein, LaRPA-1 together with RAD51 is involved in DSBs damage response and, at telomeres, upon damage, LaRPA-1 works probably to prevent loss of single-stranded DNA and to avoid a gross damage response. These results, although preliminary, are in agreement with an extra function of LaRPA-1 at parasite telomeres and may add new insights in the protozoa telomere biology field.

## MATERIALS AND METHODS

### *Parasite cultures and cell synchronization*

*Leishmania amazonensis* promastigotes (MHOM/BR/73/M2269) were grown in M199 (Cultilab) supplemented with 10% fetal calf serum (Cultilab), 25 mM. Hepes and a 1 $\times$  antibiotic/antimycotic solution (Cultilab) at 26 °C. *Leishmania amazonensis* cultures were synchronized by treating mid-log phase cultures ( $1.5 \times 10^7$  cells mL<sup>-1</sup>) with 5 mM hydroxyurea for 12 h, and released into drug-free M199 medium (da Silva *et al.* manuscript in preparation).

### *Determination of the IC<sub>50</sub> for phleomycin in promastigote forms of L. amazonensis*

Parasite cultures were incubated with 5–250  $\mu$ g of phleomycin mL<sup>-1</sup> at 1 h time-intervals up to 12 h and then 12 h later at 28 °C. At each time-interval, parasites treated and non-treated with the drug (controls) were fixed in 1% formaldehyde and the cells were counted in a haemocytometer.

A modification of the trypan blue exclusion test (Paland *et al.* 2009) was used to determine the number of non-viable *L. amazonensis* promastigotes in the presence of different concentrations of phleomycin and at different times (0, 1, 3 and 6 h); control cells received no drug. After each incubation, parasite cells were washed with 1 $\times$  PBS and incubated for 15 min at room temperature with 0.4% trypan blue (Gibco) in 1 $\times$  PBS. The cells were then washed in 1 $\times$  PBS and cell death was checked by reading the absorbance at a wavelength of 620 nm in an ELISA microplate reader (Multiscan Ex, Labsystems).

### *Cell sorter analysis*

HU-synchronized, phleomycin-treated and non-treated cells were harvested, washed in 1 $\times$  PBS, fixed in 1% formaldehyde and incubated with RNase A ( $10 \mu$ g mL<sup>-1</sup>) for 10 min at room temperature. To measure the DNA content, the cells were stained with propidium iodide ( $40 \mu$ g mL<sup>-1</sup>; Sigma, St Louis, MO, USA) and analysed with a FACScalibur flow cytometer (Becton and Dickson). Fluorescence was quantified with the CellFIT cell cycle analysis program. Twenty thousand events were analysed for each sample.

### *Preparation of L. amazonensis nuclear protein extracts*

Equal numbers of parasites were used to obtain nuclear extracts from non-treated and treated cultures at each time-point. Nuclear extracts were obtained according to the method of Fragaki *et al.* (2003), in the presence of protease and phosphatase inhibitors, with minor modifications. Briefly, extracts were prepared from  $3 \times 10^9$  cells on ice in 0.5 mL of

lysis buffer 1 (10 mM Hepes, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, 0.5% NP40, pH 7.5). After lysis, the parasites were centrifuged and the resulting supernatant was used as the cytoplasmic extract. The pellet containing nuclei was incubated for 20 min on ice with 0.1 mL of lysis buffer 2 (200 mM Hepes, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 840 mM KCl, 0.5 mM DTT, 25% glycerol, 0.2 mM EDTA, pH 8.0). After centrifugation (15 500 g, 15 min, 4 °C), the resulting supernatant was recovered, dialysed against lysis buffer 3 (the same as lysis buffer 2, except that KCl was 100 mM) and used as the nuclear extract.

#### Western blot and antibodies

Nuclear extracts (equivalent to 10<sup>7</sup> parasites/lane) from control and phleomycin-treated parasites were separated in 10–12% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad) in Tris-glycine-methanol (48 mM, 39 mM, 20%, v/v) at 16 °C. Western blots were developed using a goat anti-rabbit HRP-conjugate secondary antibody (Bio-Rad) and the enhanced chemiluminescence (ECL), according to the manufacturer's instructions (Millipore).

The homologous sera used to probe Western blot membranes and/or IP and IIF were the mouse polyclonal anti-LaRPA-1 serum (produced from full length recombinant LaRPA-1), the rabbit polyclonal anti-LaRPA-1 (Siqueira-Neto *et al.* 2007), and rabbit polyclonal anti-La  $\alpha$ -Tubulin and anti-LaNOP1 sera (both obtained from synthetic peptides, GenScript, data not shown).

The *Leishmania RAD51* gene (*LmjF28.0550*) encodes the protein RAD51, which is highly conserved in a variety of eukaryotes. The *Leishmania* spp. RAD51 and the mammalian RAD51 are about 74.5–84% similar and 63–78% identical (McKean *et al.* 2001; Genois *et al.* 2012 and TriTrypDB, <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). This high level of conservation allowed us to probe Western blots of *L. amazonensis* protein extracts with a polyclonal serum prepared from full-length human RAD51 expressed in *E. coli* (Ab46981, Abcam). However, in the *L. major* gene DB (<http://www.genedb.org/genedb/leish/index.jsp>) there are 3 genes annotated as homologues of *RAD51*: *LmjF28.0550* (encodes a putative 41.2 kDa protein), *LmjF33.2490* (encodes a putative 72.9 kDa protein) and *LmjF35.4890* (encodes the 39.5 kDa protein DMC1, *RAD51/dmc1*). The rabbit anti-human RAD51 serum (Abcam Ab46981) used to develop the immunoblots recognized only the 41.2 kDa *L. amazonensis* RAD51 protein homologue and no other protein band was revealed with this serum in all Western blots done during the preparation of this article. In agreement with our results, Genois *et al.* (2012) showed that an anti-human RAD51 serum also recognized in *L. infantum* extracts was a 41 kDa protein which is the predicted molecular weight for LiRAD51.

We also used the rabbit anti-human histone H2A (Abcam Ab530545) serum that recognizes 2 protein bands of approximately 13–14 kDa in *L. amazonensis* nuclear extracts (see Fig. 6). In the *L. major* genome database there is 1 gene annotated as histone H2A (gene DB *LmjF.21.0915*) and 6 others annotated as histone H2A putative genes (*LmjF.21.0920*, *LmjF.21.0930*, *LmjF.29.1720*, *LmjF.29.1730*, *LmjF.29.1740* and *LmjF.17.0280*). According to a search using Delta-Blastp (data not shown) the *Leishmania* H2A protein (gene DB *LmjF.21.0915*) shares approximately 45% identity with the human histone H2A type 1-A (GenBank Accession number NP\_734466) and also ~50% with other mammalian and vertebrate's histone H2A proteins. Thus, it is possible that both the anti-human RAD51 and the anti-human histone H2A sera that we used here recognize epitopes presented in the most conserved regions of the *Leishmania* RAD51 and H2A proteins, respectively.

#### Chromatin immunoprecipitation assay

Formaldehyde cross-linked chromatin was obtained from parasites (0.8 × 10<sup>8</sup> cells/experiment) treated with phleomycin (40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) for 1 and 3 h and from non-treated controls at the same time-points. Chromatin was immunoprecipitated with anti-LaRPA-1 and anti-RAD51 sera and DNA was extracted after reversal of the cross-linking. DNA samples were slot-blotted and hybridized with Tel1C [(CCCTAA)<sub>3</sub>], and kDNA (5'-TTTCGGCTCG-GGCGGTGAAAAGTGGGGGTTGGTGTAA-AAT-3') probes using an established protocol (Lira *et al.* 2007). Aliquots corresponding to 1% and 5–10% of the total number of cells used in each experiment (input) were tested separately. Control assays included mock experiments and experiments done with rabbit pre-immune serum. The amount of immunoprecipitated DNA was calculated according to the protocol of Lira *et al.* (2007).

#### Immunoprecipitation assays (IP)

Nuclear extracts from 1 × 10<sup>9</sup> log phase promastigotes treated with phleomycin (40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) for 1, 3 and 6 h and from non-treated controls were used for the immunoprecipitation (IP) assays, in conjunction with ~200  $\mu$ g of mouse anti-LaRPA-1 serum. The IP assays were done using Pierce<sup>®</sup> Crosslink immunoprecipitation kit according to the manufacturer's instructions. At the end of the assay, one-tenth of each eluate was fractionated in 10–12% SDS-PAGE followed by Western blot probed with the appropriate antisera and pre-immune serum as the control. Extracts from non-treated parasites were also immunoprecipitated and used as controls. The specificity of mouse anti-LaRPA-1 serum for IP

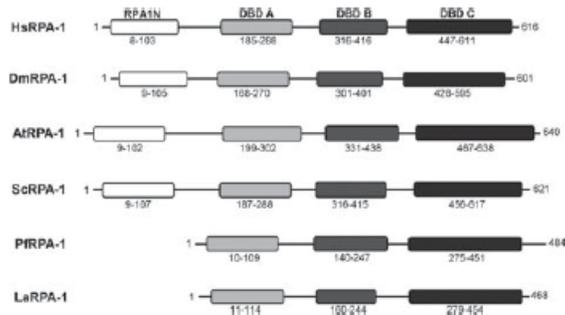


Fig. 1. LaRPA-1 lacks the N-terminal RPA1N domain. A diagram showing the localization of RPA1N, DBD-A, DBD-B and DBD-C structural domains in different RPA-1, based on CD database analysis. Numbers correspond to the position of the amino acid residues flanking each domain. Note that PfRPA-1 and LaRPA-1 lack the N-terminal RPA1N domain. *Homo sapiens* (HsRPA-1, GenBank Accession no. AAH18126), *Drosophila melanogaster* (DmRPA-1, GenBank Accession no. AAF54206), *Arabidopsis thaliana* (AtRPA-1, GenBank Accession no. AT2g06510), *Saccharomyces cerevisiae* (ScRPA-1, GenBank Accession no. CAA42420), *Plasmodium falciparum* (PfRPA-1, GenBank Accession no. CAD51733), *Leishmania amazonensis* (LaRPA-1, GenBank Accession no. AAR84278).

assays is shown in Supplementary Fig. S4, online version only.

#### Indirect immunofluorescence (IIF) and indirect immunofluorescence combined with fluorescence in situ hybridization (FISH-IIF)

The IIFs were done using previously described protocols (Siqueira-Neto *et al.* 2007; da Silva *et al.* 2010) with minor modifications. First,  $10^6$  promastigotes were washed in  $1\times$  PBS and fixed in 1% formaldehyde for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . After permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature, the cells were incubated with 0.1 M glycine. Specific proteins were detected by incubating the cells with the appropriate immune serum followed by washing 3 times with  $1\times$  PBS and incubation with goat anti-rabbit or anti-mouse IgG labelled with Alexa Fluor 488 or 555 (Invitrogen). The parasites were then attached to glass coverslips coated with 0.1% poly-L-lysine (Sigma). FISH was done using log phase *L. amazonensis* promastigotes and a telomere PNA FISH/FITC kit (Dako Cytomation), according to manufacturer's instructions. For IIF, the cells were washed in  $1\times$  PBS and fixed in 1% formaldehyde for 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . After permeabilization with 0.1% Triton X-100 for 10 min at room temperature, the cells were incubated with specific antibodies followed by incubation with goat anti-rabbit IgG coupled to Alexa Fluor 488 or 555 as the secondary antibody. Vectashield<sup>®</sup> mounting medium with DAPI (Vector Labs) was used to stain

nuclear and kinetoplast DNA for simple IIF and for the FISH-IIF assays. Images were analysed with a Nikon 80i fluorescence microscope and captured with a digital camera (Nikon). When necessary, images were superimposed using NIS elements software (v. Ar 3.10).

## RESULTS

### LaRPA-1 lacks the RPA1N domain involved with the binding to checkpoint proteins

We have previously shown that LaRPA-1 is co-purified with LaRbp38 and DNA polymerase alpha in telomerase-positive extracts (Fernandez *et al.* 2004). In addition, it co-immunoprecipitates telomeric DNA *in vivo* and co-localizes with telomeric DNA (Siqueira-Neto *et al.* 2007). But contrary to RPA-1 from other eukaryotes, LaRPA-1 has a truncated RFA-1 structural domain and it binds single-stranded DNA using a single but canonical oligonucleotide-oligosaccharide fold (OB fold) localized at its N-terminus (Fig. 1) (Siqueira-Neto *et al.* 2007). Here we performed a domain search with the Conserved Domains database (CDD) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>), in order to verify whether LaRPA-1 contains some of the conserved domains shared by other RPA-1. As shown in Fig. 1 and in Siqueira-Neto *et al.* (2007), LaRPA-1 and its counterparts from other protozoa (e.g. *Plasmodium falciparum*) share low sequence identities with other RPA-1 (18.2–32%) although it preserves the 3 putative and structurally conserved DNA-binding domains (DBD A–C) or OB fold domains (Fig. 1). In addition, RPA-1 from *Leishmania* spp. and from other trypanosomatids lacks the N-terminal RPA1N domain (Fig. 1 and Brown *et al.* 1992; Siqueira-Neto *et al.* 2007) responsible for interaction with multiple checkpoint proteins, including ATRIP, RAD9 and MRE11. In humans, disruption of these interactions causes hypersensitivity to both DNA damage and replication stress (Xu *et al.* 2008).

### DNA damage induced by phleomycin elicited a G1/S cell cycle arrest in *L. amazonensis* promastigotes

It is known that in *Saccharomyces cerevisiae*,  $50\ \mu\text{g mL}^{-1}$  of phleomycin for 60–120 min induces a checkpoint response that is controlled by the ATM-related TEL1 protein (Nakada *et al.* 2003) and that in most eukaryotes DNA DSBs (Moore, 1988; Povirk *et al.* 1989) are repaired by homologous recombination (HR) (Belenguer *et al.* 1995; Sugiyama and Kowalczykowski, 2002; Stauffer and Chazin, 2004). *Leishmania major* promastigotes exposed to  $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$  of phleomycin for 24–48 h also showed a damage response with detectable levels of the RAD51, a protein that commonly participates in

damage repair by HR. In addition, during phleomycin treatment parasites stopped growing, suggesting that the drug induced a possible cell cycle arrest (McKean *et al.* 2001). It is worth noting though that  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  is the drug concentration routinely used to select against non-transformed *L. major* promastigote cultures in genetic transfection experiments and is also the amount of drug able to kill the whole population of parasites in 3–4 days (Freedman and Beverley, 1993).

Thus, in order to verify the amount of drug that would elicit a damage response in promastigotes of *L. amazonensis*, we first tried to determine the  $\text{IC}_{50}$  of phleomycin, using the classic MTT (tetrazolium component) cell proliferation assay by incubating parasite cultures with a variety of drug concentrations  $5\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$  for a short period of time (0–12 h and 24 h). Unfortunately we did not succeed because the drug absorbs light in the same wavelength (570 nm) as the insoluble formazan produced during the reduction of MTT by the mitochondria of viable cells (data not shown). Thus, growth curves were done of *L. amazonensis* promastigotes grown in different concentrations of the drug (5, 40, 100 and  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Figure 2A shows that compared with the non-treated controls, incubation with  $40\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$  of phleomycin for up to 24 h reduced the number of parasites by 50–75% and no increase in parasite numbers was detected during the 24 h time-course, suggesting that at these concentrations the drug induced a growth arrest. In contrast, incubation with  $250 \mu\text{g mL}^{-1}$  of phleomycin for up to 11 h was able to kill the whole population of parasites. In this experiment, the control curves represent the growth of parasites not treated with the drug. In addition, and because up to  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  of phleomycin failed to kill 100% of the parasites in culture (Fig. 2A), the influence of the drug on *L. amazonensis* viability was examined by using a modification of the trypan blue exclusion test (Paland *et al.* 2009). As shown in the graph in Supplementary Fig. S1A (online version only), compared with the non-treated control, exposure of parasites to about  $10\text{--}500 \mu\text{g mL}^{-1}$  of phleomycin for up to 6 h resulted in a parasite mortality of 0–100%, respectively. Since ~50% of the parasites in the culture were viable in concentrations around  $10\text{--}100 \mu\text{g mL}^{-1}$  it was speculated that the DNA damage induced by the drug was probably rapidly repaired. Thus, we decided to perform most of the experiments shown here with  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  of phleomycin and within 0–6 h of incubation.

It was first examined whether parasite death was caused by phleomycin-induced DNA fragmentation. As shown by TUNEL-positive assay, after exposing parasites to  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  for up to 6 h around 96.8% of the examined cells presented fragmented DNA in the nucleus and in the kinetoplast (Fig. 2B and Supplementary Fig. S1B, online version only). We

also checked whether  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  phleomycin caused cell cycle arrest in *L. amazonensis* promastigotes. Figure 2C shows that exposure to phleomycin for 1–6 h caused accumulation of cells in G1 and loss of signal for S and G2/M cells, perhaps suggesting a delay in G1/S transition compared with the non-treated control. This resulted in a cell cycle arrest that persisted for up to 12 h (data not shown) and is signalled by the formation of nuclear foci containing LaRPA-1. The recombinase RAD51, a key component of the HR repair machinery, was also involved in this global response to phleomycin treatment (Fig. 3A–D). Indirect immunofluorescence (IIF) assays were done with non-synchronized parasites treated with phleomycin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 1 and 3 h, as well as with non-treated controls. Images were obtained in duplicate from cells with positive signals for both proteins and from different fields for each experiment. LaRPA-1 is commonly detected in the nucleus of proliferating cells, and after 1 h to 3 h of exposure to phleomycin, although the protein seems to reorganize in foci, we did not observe statically significant alterations in its fluorescence intensity (Fig. 3A–D). RAD51 was also detected in control parasites, but the staining was more diffuse and widespread than in phleomycin-treated parasites (Fig. 3A), which after 1 h of drug exposure, showed RAD51 distributed in a few nuclear foci (Fig. 3B) followed by a higher nuclear accumulation after 3 h of drug exposure (Fig. 3C).

Western blots of nuclear extracts from non-synchronized parasites treated with phleomycin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) indicated that after treatment no significant alterations in the amount of LaRPA-1 were detected (Fig. 4A–B). In contrast, there was a significant ( $P < 0.001$ ) increase in the levels of RAD51, which was gradual and time dependent (Fig. 4A–B), probably reflecting the role of RAD51 in the repair of DNA DSBs.

To determine whether the changes in protein location and accumulation could be followed during the parasite's cell cycle, cultures were synchronized with HU prior to treatment with phleomycin (Supplementary Fig. S2B, online version only). Figure 4C shows that phleomycin elicited discrete alterations in LaRPA-1 and RAD51 expression, principally at S phase, but induced a marked and significant ( $P < 0.001$ ) accumulation of both proteins in early ( $S_E$ ) and late S ( $S_L$ ) phase of HU-treated cells after 1 and 3 h, respectively (Fig. 5A–D); these findings partially confirmed those of Figs 3A–D and 4A–B.

We were also able to demonstrate that synchronization of the cultures with HU did not induce detectable levels of damaged DNA as shown by the TUNEL assay (Supplementary Fig. S2A, online version only). Thus, this indicates that the alterations detected in protein expression and accumulation were indeed a response to the DNA damage induced by

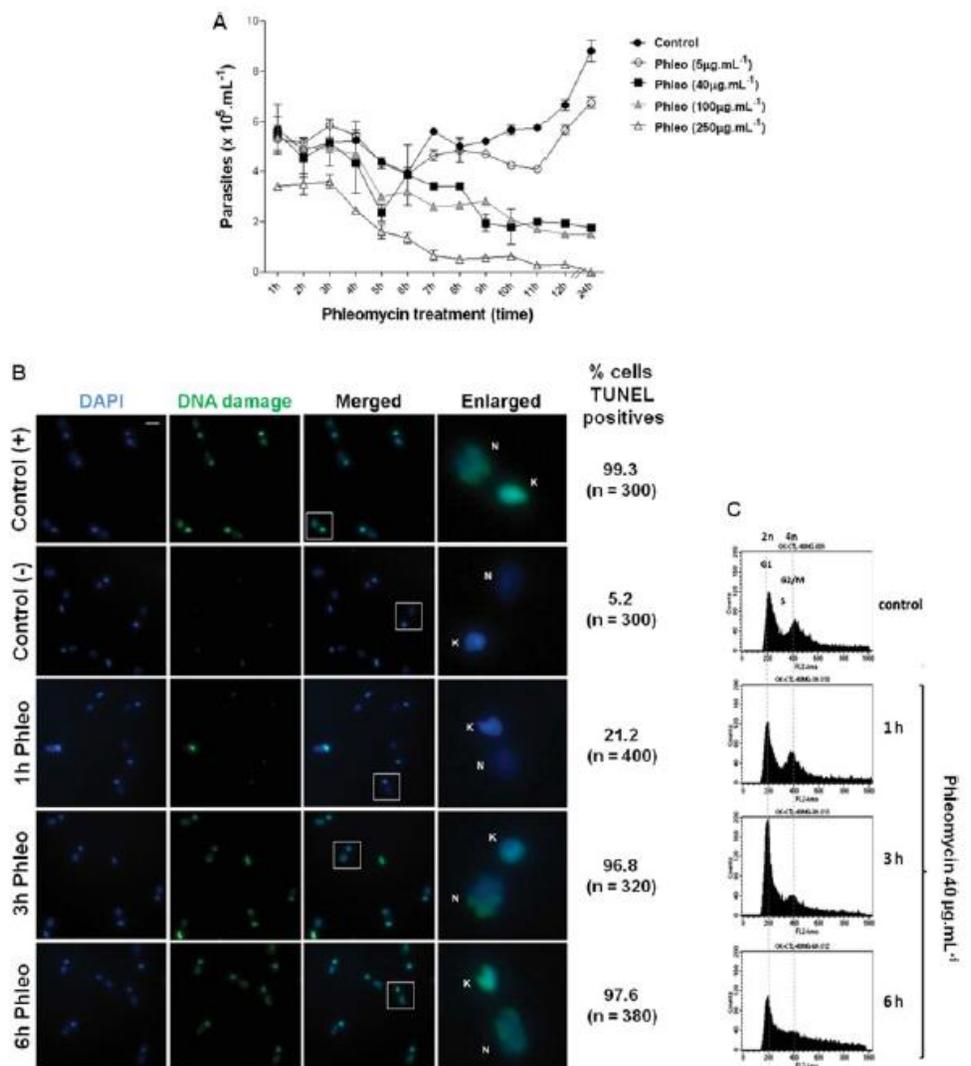


Fig. 2. Phleomycin induces DSBs and G1/S cell cycle arrest in *Leishmania amazonensis* promastigotes. (A) *L. amazonensis* wild-type promastigotes were exposed to different concentrations of phleomycin (5 (○), 40 (■), 100 (▲), 250 μg mL<sup>-1</sup> (△)) and cell density was monitored for 0–12 h and 12 h later (24 h). Parasites not treated with the drug were used as growth control (●). Error bars indicate SD of the mean of triplicates. (B) DNA damage was investigated in phleomycin-treated (Phleo-40 μg mL<sup>-1</sup>) or untreated cells (Control (-)) and analysed at 1, 3 and 6 h of drug exposure. DSBs on DNA (green) were detected by TUNEL assay. DNase I treatment was used as DNA damage positive control. DAPI (blue) was used to stain the nucleus (N) and kinetoplast (K). Scale bar represents 2 μm. (C) Histograms show the relative propidium iodide fluorescence, which is directly proportional to DNA content plotted against the number of events per channel (number of cells). Phleomycin-treated (40 μg mL<sup>-1</sup>) parasites (Phleo) were examined at various intervals up to 6 h. Each histogram represents data collected from 20 000 events per sample. The positions of G1 (2n), S and G2/M (4n) indicated in the panels were determined using CELLFit software (Becton Dickinson).

phleomycin. Together, these results suggest that LaRPA-1 and RAD51 participate in the global response of *L. amazonensis* to DNA DSBs.

#### *DNA damage induced a gradual increase in the levels of RAD51 and in the amount of RAD51 associated with LaRPA-1*

Immunoprecipitation assays were used to determine whether LaRPA-1 and RAD51 interact in cells with damaged DNA (Fig. 6). Mouse anti-LaRPA-1 serum

was used to immunoprecipitate nuclear extracts from control parasites and from parasites treated with phleomycin (40 μg mL<sup>-1</sup>). Immunoglobulin-free immunoprecipitates (1/10 of column eluates) and 10% of the column input were fractionated in 10% SDS-PAGE and analysed by Western blot with rabbit antisera raised against LaRPA-1 and RAD51; as the loading control we used an anti-histone H2A serum that recognized the highly conserved core of the *Leishmania* protein (see Materials and Methods section for details). This analysis showed that in

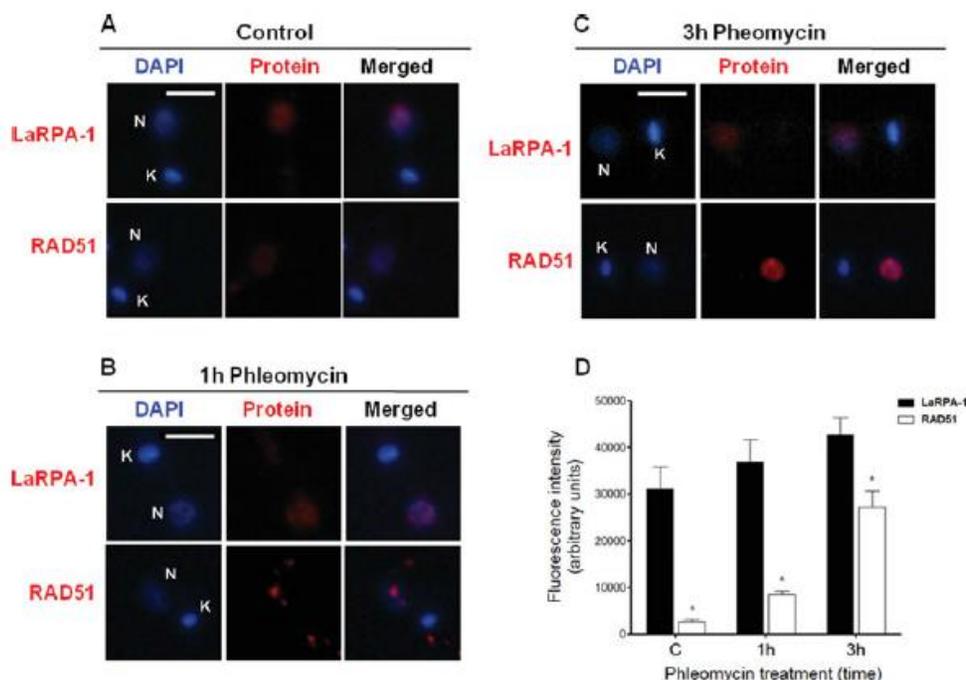


Fig. 3. Possible involvement of LaRPA-1 and RAD51 in the DNA DSBs response. In (A–C), LaRPA-1 and RAD51 proteins were detected by IIF (red) in parasites treated with phleomycin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 1 h and 3 h. Non-treated parasites were used as control. IIFs were performed using anti-LaRPA-1 and anti-human RAD51 sera. DNA in the nucleus (N) and kinetoplast (K) was stained with DAPI and bar represents  $2 \mu\text{m}$ . (D) Quantitative analysis of each protein based on the fluorescence intensity was assessed using NIS elements software. Images of cells ( $n = 50$ ) in duplicated experiments for each time-point were analysed. Error bars indicate s.d. of the mean of duplicates. (\*) Indicates  $P < 0.001$  calculated using two-way ANOVA, Bonferroni post-test (GraphPad Prism).

control cells LaRPA-1 was part of the same complex containing RAD51 and histone H2A and that upon damage, the levels of RAD51 in the extracts as the amount of RAD51 associated with LaRPA-1 gradually increased (Fig. 6, right). This result suggests that LaRPA-1 and RAD51 work in the same damage response pathway. Their association is probably necessary to signal and repair both phleomycin-induced DSBs and naturally occurring lesions, because LaRPA-1 and RAD51 immunoprecipitate even in extracts of parasites not exposed to chemical damage. Figure 6, left, shows input representing 10% of extracts loaded to the IP columns. Immunoprecipitates probed with rabbit pre-immune serum showed no positive interaction.

#### *LaRPA-1 is rapidly recruited to telomeres upon DNA damage*

As with bulk DNA, telomeric DNA needs to be repaired. Base excision repair, nucleotide excision repair and mismatch repair are presumably used to maintain the TTAGGG repeats. However, some forms of repair may have disastrous outcomes for telomeres. For example, non-homologous end-joining (NHEJ) of 2 telomeres creates a circular or dicentric chromosome. Homologous recombination (HR) between telomeres could result in aberrant

telomere length, and recombination of a telomere with an interstitial telomeric sequence could lead to deletions, inversions and translocations (de Lange, 2005). But fully functional telomeres do not elicit a DNA-damage response that is sufficient to stop cell proliferation (Khadaroo *et al.* 2009) and this also appears to be the case in *L. amazonensis* promastigotes (Fig. 7A–B).

To understand how LaRPA-1 and RAD51 participate in the response to DNA-induced damage at telomeres, an IIF assay was developed using anti-LaRPA-1 and anti-RAD51 sera combined with FISH using a PNA-telomere probe (Siqueira-Neto *et al.* 2007; Dossin *et al.* 2008). For this assay we captured a set of 10–12 overlaid images in duplicate and observed co-localization in almost every case. As shown in Fig. 7A, the amount of LaRPA-1 that co-localized with telomeric clusters was greater after 1–3 h of drug treatment than in the controls and in parasites exposed to phleomycin for 6 h. This finding suggests that LaRPA-1 is rapidly recruited to telomeres upon DNA damage. In contrast, only a few foci containing RAD51 apparently co-localized with telomeric clusters after 3 h of drug treatment (Fig. 7B) were detected. This result also indicates that in these experimental conditions most telomeres are covered by LaRPA-1, which probably protects these structures from a local DNA damage response.

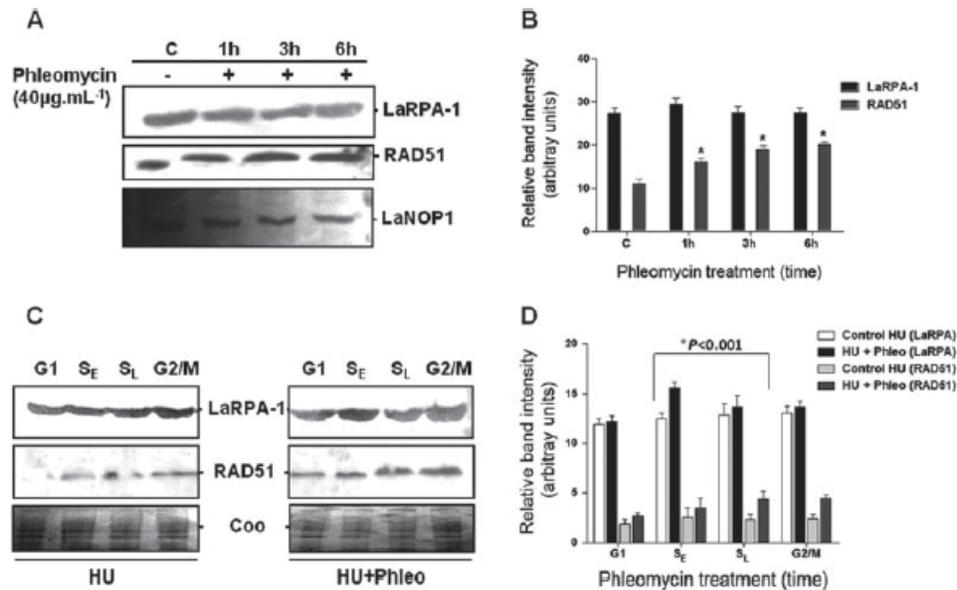


Fig. 4. DNA damage induced alterations in the expression levels of RAD51 in non-synchronized parasites and of LaRPA-1 and RAD51 in HU-synchronized parasites. (A) Western blot of nuclear extracts from  $10^7$  parasites/lane treated with phleomycin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 1, 3 and 6 h compared with non-treated controls (c). Membranes were probed with anti-LaRPA-1 (top) and anti-RAD51 (middle) sera. LaNOP-1 was used as the loading control (bottom). The graphs shown in (B) and (D) are the quantitative analyses of the Western blot assays in (A) and (C), respectively using ImageJ software (1.43u). Error bars indicate s.d. of the mean of duplicates. In (B)  $*P < 0.001$  was calculated for RAD51 results obtained from phleomycin-treated and the non-treated control, using two-way ANOVA, Bonferroni post-test (GraphPad Prism). (C) Western blot of nuclear extracts from: Left, HU-synchronized parasites (HU); Right, HU-synchronized parasites treated with phleomycin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (HU + Phleo). G1, S<sub>E</sub>, S<sub>L</sub> and G2/M indicate the cell cycle phases according to the CellFIT cell cycle analysis program. Membranes were probed with anti-LaRPA-1 (top) and anti-RAD51 (middle) sera. Coomassie (Coo) panels show loading control (bottom). In (D)  $*P < 0.001$  was calculated between data of phleomycin treated in early (S<sub>E</sub>) and late S (S<sub>L</sub>) phases and the non-treated control, using two-way ANOVA, Bonferroni post-test (GraphPad Prism).

In addition, it is presumed that only a few telomeres showed a mild response in which RAD51 might have displaced part of LaRPA-1 from the single-stranded DNA.

To confirm these findings, chromatin-immunoprecipitation assays were performed with samples from control and phleomycin-treated parasites (Fig. 8A–C). As shown in Fig. 8A, in control parasites the amount of G-rich telomeric DNA that co-immunoprecipitated with anti-LaRPA-1 relative to the input DNA was around  $\sim 0.9$ – $1.0\%$  in all samples (0, 1 h and 3 h). This is in agreement with previous results from our laboratory (Siqueira-Neto *et al.* 2007). In contrast, in phleomycin-treated parasites the amount of telomeric DNA that was immunoprecipitated by anti-LaRPA-1 (relative to the input DNA) in 3 h of treatment, increased to  $\sim 1.5\%$  compared with the controls. No telomeric DNA was immunoprecipitated with pre-immune serum or in mock experiments (Fig. 8A and C). In addition, anti-LaRPA-1 serum did not immunoprecipitate kDNA in control and drug-treated samples (Supplementary Fig. S3, online version only).

Contrary to anti-LaRPA-1, anti-RAD51 serum was not able to immunoprecipitate telomeric DNA in

control or in phleomycin-treated parasites (Fig. 8B, samples from 1 and 3 h respectively) (Fig. 8B), suggesting that the apparent co-localization of RAD51 with parasite telomeres using FISH-IIF (Fig. 7B) was not due to its interaction with telomeric LaRPA-1. Thus, the presumed contribution of RAD51 to telomere damage response in *Leishmania* needs more investigation.

These findings suggest that LaRPA-1 and RAD51 work together in response to DNA DSBs, and at telomeres, upon damage, LaRPA-1 works probably to prevent loss of single-stranded DNA and to assume a capping function.

#### DISCUSSION

The presence of DNA DSBs in a dividing cell is detected by cell-cycle surveillance mechanisms also known as checkpoint mechanisms. The occurrence of such breaks leads to the arrest of cell division at one of several points, although the level of damage that can be tolerated by different cell types varies markedly (Featherstone and Jackson, 1999). Single DSBs in the core of *T. brucei* chromosomes have been shown to trigger a robust DNA damage response and

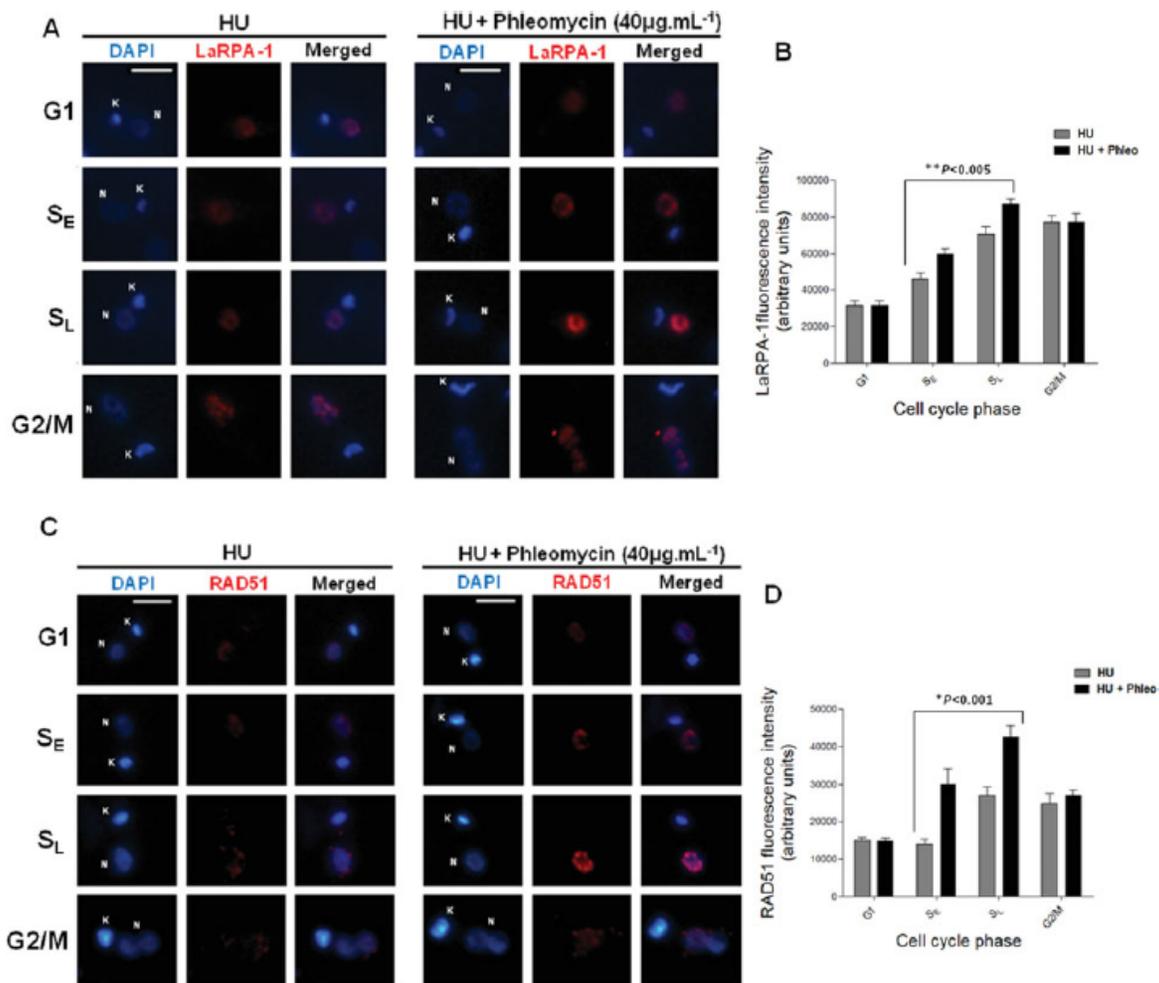


Fig. 5. Damage-induced accumulation of LaRPA-1 and RAD51 in S phase. In (A) and (B), changes in the levels of LaRPA-1 and RAD51 during *Leishmania amazonensis* cell cycle was assessed by IIF. The parasites were synchronized with HU and treated with phleomycin (40  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>) after which the cells were incubated with anti-LaRPA-1 (A) or anti-human RAD51 (B) sera. DNA in the nucleus (N) and kinetoplast (K) was stained with DAPI. Scale bar represents 2  $\mu$ m. In (B) and (D), graphs represent the quantitative analysis of the results shown in (A) and (C). The fluorescence intensity of each protein was determined using NIS elements software. Images of cells ( $n = 50$ ) at each cell cycle phase (G1, S and G2/M) were analysed, including the 2 different time-points in S phase: 1 h (S<sub>E</sub>) and 3 h (S<sub>L</sub>). Error bars indicate s.d. of the mean of duplicates. (\*) Indicates  $P < 0.001$  and (\*\*) indicates  $P < 0.005$  between data of phleomycin-treated and non-treated control in S<sub>E</sub> and S<sub>L</sub>, both calculated using two-way ANOVA, Bonferroni post-test (GraphPad Prism).

efficient repair via homologous recombination with allelic templates (Glover *et al.* 2008). It also induces the action of a  $\gamma$ H2A homologue, one of the earliest markers of DNA damage in eukaryotes (Glover and Horn, 2012).

The results described here suggest that, in *L. amazonensis*, DNA DSBs also triggered repair by activating the HR repair machinery that involves global and local actions of RPA-1 and RAD51. In other eukaryotes, DSBs repair initiates with long 3'-single-stranded DNA overhangs that are rapidly coated by RPA that acts as a sensor that binds with high affinity to single-stranded DNA. This protein: DNA complex recruits the recombinases RAD52 and RAD51 that interact with RPA to form an additional

complex that displaces RPA from single-stranded DNA to effectively initiate repair (Golub *et al.* 1998; Stauffer and Chazin, 2004; Lisby *et al.* 2010). In *T. brucei*, RAD51 has a role in homologous recombination during antigenic variation (McCulloch and Barry, 1999), a *T. cruzi* Rad51 has also been characterized (Regis-da-Silva *et al.* 2006) and shown to participate in HR repair of DSB induced by gamma-irradiation. The *L. major* and *L. infantum* RAD51 homologues are highly conserved, with activities similar to RAD51 from other eukaryotes (McKean *et al.* 2001; Genois *et al.* 2012). In contrast, the *Leishmania* spp. genome contains no homologues of RAD52 (data not shown) raising questions about the existence of a factor, other than RAD52, that

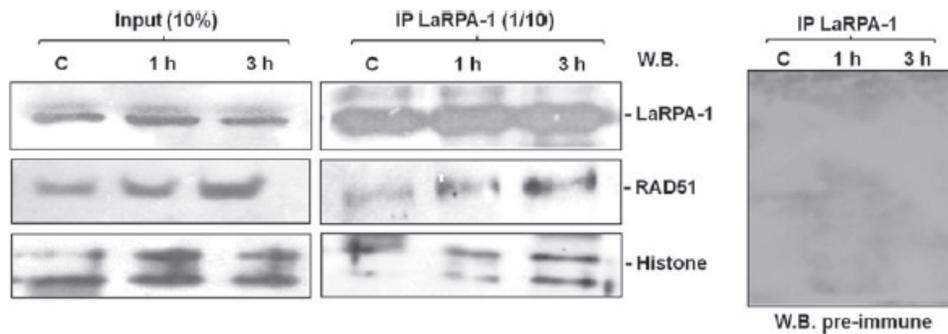


Fig. 6. Changes in LaRPA-1 protein forming-complexes upon damage. LaRPA-1 and RAD51 protein levels were assessed in Western blots of nuclear extracts from parasites treated with phleomycin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) for 1 and 3 h and non-treated controls (c). Extract samples were used in immunoprecipitation assays with mouse antiserum raised against LaRPA-1. One-tenth of each immunoprecipitate (IP, right) pool was analysed by Western blots probed with rabbit antisera raised against LaRPA-1, human RAD51 and human histone H2A. Input (left) represents 10% of extracts loaded to the IP columns. Rabbit pre-immune serum was used as control.

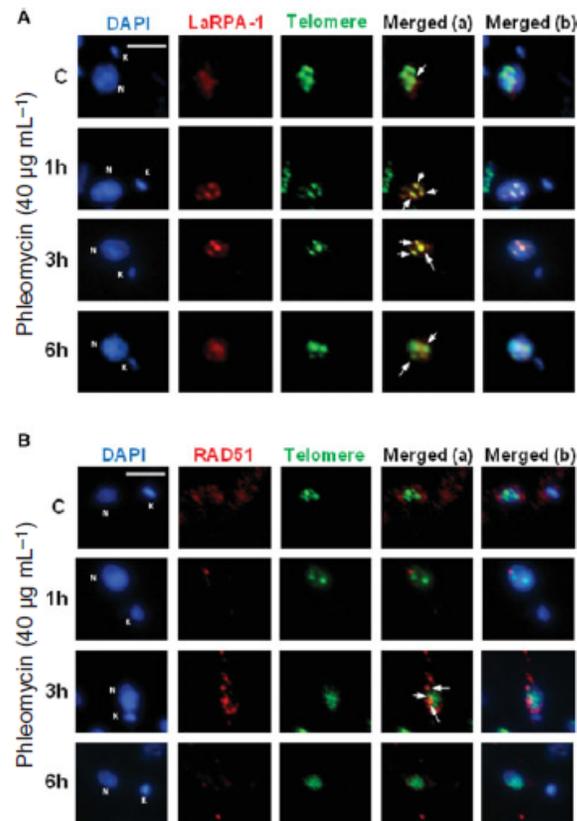


Fig. 7. LaRPA-1 is involved in the telomere response to damage. IIF of promastigote forms using (A) anti-LaRPA-1 (red) and (B) anti-RAD51 (red) serum were combined with FISH using a PNA-telomere probe (green). DAPI (blue) was used to stain DNA in the kinetoplast (K) and nucleus (N). Merged (a) combined images from IIF (red) and FISH (green) and merged (b) combined all images. These figures contain representative images showing the co-localization of LaRPA-1 and RAD51 with telomeric clusters in phleomycin-treated (for 1 h, 3 h and 6 h) and non-treated parasites (C, control). Scale bar represents  $2 \mu\text{m}$ .

recruits RAD51 to the RPA-bound single-stranded DNA complex. Also, whether in these protozoa this action can be performed directly by RAD51 without the help of another factor. Both of these hypotheses deserve investigation, although very recently, Genois *et al.* (2012) showed that the *L. infantum* BRCA2 homologue should be this missing candidate factor, as its interaction with RAD51 promotes homologous recombination at the genetic and biochemical level.

The concentration of phleomycin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) used here caused DNA DSBs in *L. amazonensis*, after a short time (1–3 h) of drug exposure, as revealed by TUNEL positive assay. This amount of drug is about 4 times higher than the concentration that induced a damage response in *L. major* promastigotes after 24–48 h of treatment ( $\sim 10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (McKean *et al.* 2001). Here we show that LaRPA-1 and RAD51 participates in the response to DNA damage induced by phleomycin in the nucleus, but DSBs were also clearly detected in the kDNA, although no co-localization of LaRPA-1 or RAD51 with kDNA could be found. In nuclear-damaged DNA, LaRPA-1 probably binds the exposed single-stranded DNA ends in DSBs and in the telomeric strands. Cell cycle arrest in the G1/S phase was also indicative of drug-induced DNA damage. Thus, if phleomycin-induced damage elicits a strong checkpoint in *L. amazonensis*, than the conserved HR repair mechanism would be expected to initially recruit RPA to protect single-stranded DNA and then RAD51 to repair the damage (Gasior *et al.* 2001). The results described here confirmed this hypothesis since, in non-synchronized cells, although not statistically significant, damage slightly increased LaRPA-1 fluorescence and induced foci formation, which was accompanied by a gradual accumulation of RAD51. An increase in the levels of RAD51 in nuclear extracts of asynchronous and the significant alterations in the levels of LaRPA-1 and RAD51 in the S phase of HU-synchronized cells, in

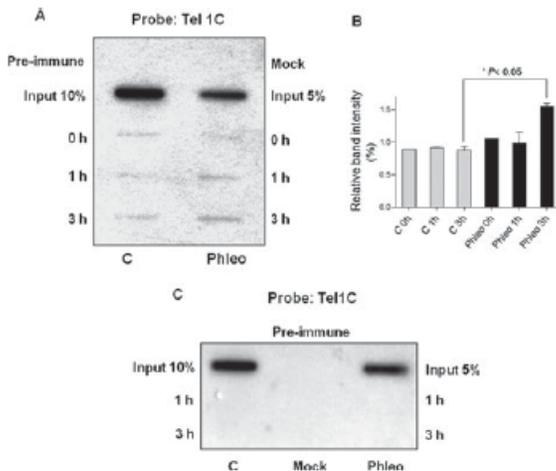


Fig. 8. More LaRPA-1 is recruited to telomeres upon DNA damage. (A) Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of DNA from asynchronous log phase promastigotes treated with phleomycin ( $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) and from non-treated controls (c) were immunoprecipitated with anti-LaRPA-1 or pre-immune serum. (B) The graph represents quantitative analysis of the immunoprecipitated telomeric DNA using ImageJ software (1.43u). Error bars indicate s.d. of the mean of duplicates. (\*) Indicates  $P < 0.05$  calculated using two-way ANOVA, Bonferroni post-test (GraphPad Prism). (C) The same ChIP assay shown in (A) was done with samples immunoprecipitated with anti-RAD51 or pre-immune serum. In (A) and (B), slot-blot were hybridized with 5' end-labelled Tel1C [(CCCTAA)<sub>3</sub>] probe. Control reactions were done without serum (mock). Total DNA (input) corresponded to 5 and 10% of the DNA cross-linked to chromatin in  $0.8 \times 10^8$  cells.

addition to nuclear accumulation of both proteins in the S phase, agree with the roles of these proteins in, respectively, signalling and damage repair. *In vivo*, more LaRPA-1 associated earlier with telomeres indicating a role for this protein in protecting (capping) parasite chromosome ends. Nevertheless, RAD51 was not immunoprecipitated with telomeric DNA, suggesting that the presence of LaRPA-1 was enough to protect telomeres and to avoid a gross local DNA damage response. Apart from its role in damage response and repair, in other eukaryotes, RAD51 is normally required for telomere maintenance and t-loop formation (Tarsounas *et al.* 2004; Verdun and Karlseder, 2006).

Although LaRPA-1 formed complexes with RAD51, with these proteins probably acting synergistically in response to damage, we cannot exclude the possibility that DNA damage led to a rapid global genomic response and to the formation of foci as a consequence of mild telomere dysfunction. Such telomere dysfunction is likely to be rapidly repaired since most of the parasites exposed to  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$  of phleomycin, showed no overt damage or dramatic cell cycle arrest or even death, but rather continued to grow. This finding strongly suggests that in

*L. amazonensis* the presence of LaRPA-1 may prevent the loss of single-stranded telomeric DNA and induces the recruitment of other unknown factors that help to protect the chromosome ends.

The functions played by RPA70 in DNA metabolism have been extensively studied in model organisms (Deng *et al.* 2007; Grudic *et al.* 2007; Haring and Wold 2007). This is the first report showing the involvement of RPA-1 from a pathogenic protozoan (LaRPA-1) in damage response and telomere protection. Unlike its counterparts in other eukaryotes, protozoa RPA-1 is a truncated protein that lacks the RPA1N domain involved with the recruitment of checkpoint proteins such as ATR. But the natural absence of RPA1N did not impair LaRPA-1 participation in damage response, suggesting that it uses other regions/domains to do these interactions or it recruits an unknown protein partner to play this role.

In yeast, there is a notable difference in the cellular responses to telomeres and DNA DSBs. Whereas telomeres are relatively inert and stable, DNA DSBs are immediately recognized by the MRX (Mre11/Rad50/Xrs2) complex, leading to Tel1 (ATM-related kinase) activation. A cascade of events occurs when resected 3' G-overhangs are coated by RPA, which in turn recruits Mec1 and checkpoint complexes, as well as RAD52 and RAD51 recombinases and downstream factors (Lisby *et al.* 2010). However, uncapped telomeres produced by one of the following: telomerase depletion, a pause in the replication fork or senescence, are recognized as DSBs. In a recent study using single cell analysis and chromatin immunoprecipitation, it was shown that the loss of telomerase is accompanied by an ordered recruitment of the nuclease Mre11, the telomere-end binding protein Cdc13, RPA, the ATRIP-like Ddc2 checkpoint protein and the recombination protein RAD52 (Khadaroo *et al.* 2009). The accidental collapse of a replication fork at a telomere and the subsequent early telomere damage response could also lead to the exposure of single-stranded DNA that would be recognized by Cdc13 and RPA, thereby recruiting telomerase to repair telomeres. In this case, only in the absence of telomerase would the recruitment of RAD52 serve as an alternative pathway to repair telomeres.

Kalocsay *et al.* (2009) showed that the persistence of DSBs can lead to DNA damage at the nuclear periphery in a process requiring RAD51 and histone variant H2AZ. Although we did not detect damage to *L. amazonensis* DNA at the nuclear periphery, our results showed that LaRPA-1 can also form complexes with RAD51 and histone H2A

(non-phosphorylated histone H2A) when parasites are treated with phleomycin. This finding suggests that these proteins can act together in response to DSBs.

The results described here indicate that phleomycin caused parasite cell-cycle arrest that altered the expression of RAD51 and the input of LaRPA-1, a possible DNA damage sensor and telomere protector (Siqueira-Neto *et al.* 2007). Addressing how LaRPA-1 and RAD51 can initiate different outcomes, depending on where the 'break' is on the chromosome, will be challenging.

Our findings also suggest that in *L. amazonensis* LaRPA-1 is required for DNA damage signalling even lacking the RPA1N domain, and that this function may be directly related to its single-stranded DNA binding activity. The observation that more LaRPA-1 was recruited to telomeric DNA and that most of the parasites survived DNA damage suggests that the presence of this protein may be sufficient to prevent overt DNA damage to telomeres. Although the precise molecular mechanisms that govern this phenomenon in *Leishmania* spp. remain unknown, we speculate that LaRPA-1 exerts a new capping function that prevents a gross response at parasite telomeres. This information is particularly important to direct future research and will help advance our understanding of conserved, as well as *Leishmania*-specific properties of telomere maintenance.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank E. Ledvinka Filho for help in estimating the IC<sub>50</sub> of phleomycin, M. A. Golim for help with the cell sorting analysis, colleagues in Dr Cano's laboratory for helpful discussions during this work, and Dr S. Hyslop for revising the English and critical reading of the manuscript.

#### FINANCIAL SUPPORT

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (grant no. 09/53336-0) and Conselho Nacional de Pesquisa, CNPq (grant no. 474425/2010-0). R.C.V.S. was supported by a doctoral fellowship from CNPq (Brazil) and M.S.S., A.M.P. and V.S.N. were supported by doctoral and post-doctoral fellowships from FAPESP (Brazil).

#### REFERENCES

Barrientos, K.S., Kendellen, M.F., Freibaum, B.D., Armbruster, B.N., Etheridge, K.T. and Counter, C.M. (2008). Distinct functions of POT1 at telomeres. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 5251–5264. doi: 10.1128/MCB.00048-08.

Belenguer, P., Oustrin, M.L., Tiraby, G. and Ducommun, B. (1995). Effects of phleomycin-induced DNA damage on the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle. *Yeast* **11**, 225–231. doi: 10.1002/yea.320110305.

Berman, J. (2005). Recent developments in leishmaniasis: epidemiology, diagnosis, and treatment. *Current Infectious Disease Reports* **7**, 33–38. doi: 10.1007/s11908-005-0021-1.

Beverley, S.M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. *Annual Review of Microbiology* **45**, 417–444. doi: 10.1146/annurev.mi.45.100191.002221.

Beverley, S.M., Ellenberger, T.E. and Cordingley, J.S. (1986). Primary structure of the gene encoding the bifunctional dihydrofolate reductase-thymidylate synthase of *Leishmania major*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **83**, 2584–2588. doi: 10.1073/pnas.83.8.2584.

Brown, L.M., Melendy, T. and Ray, D.S. (1992). Conservation of structure and function of DNA replication protein A in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **89**, 10227–10231. doi: 10.1073/pnas.89.21.10227.

da Silva, M.S., Perez, A.M., da Silveira, R.C., de Moraes, C.E., Siqueira-Neto, J.L., Freitas-Jr, L.H. and Cano, M.I.N. (2010). The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BioMed Central Microbiology* **10**, 136. doi: 10.1186/1471-2180-10-136.

de Lange, T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & Development* **19**, 2100–2110. doi: 10.1101/gad.1346005.

Deng, X., Habel, J.E., Kabaleswaran, V., Snell, E.H., Wold, M.S. and Borgstahl, G.E. (2007). Structure of the full-length human RPA14/32 complex gives insights into the mechanism of DNA binding and complex formation. *Journal of Molecular Biology* **374**, 865–876. doi: 10.1016/j.jmb.2007.09.074.

Dodson, G.E., Shi, Y. and Tibbets, R.S. (2004). DNA replication defects, spontaneous DNA damage, and ATM-dependent checkpoint activation in replication protein A-deficient cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 34010–34014. doi: 10.1074/jbc.C400242200.

Dossin, F. de M., Dufour, A., Dusch, E., Siqueira-Neto, J.L., Moraes, C.B., Yang, G.S., Cano, M.I.N., Genovesio, A. and Freitas-Junior, L.H. (2008). Automated nuclear analysis of *Leishmania major* telomeric clusters reveals changes in their organization during the parasite's life cycle. *Public Library of Science One* **3**, e2313. doi: 10.1371/journal.pone.0002313.

Featherstone, C. and Jackson, S.P. (1999). DNA double-strand break repair. *Current Biology* **9**, R759–R761. doi: 10.1371/journal.pone.0002313.

Fernandez, M.F., Castellari, R.R., Conte, F.F., Gozzo, F.C., Sabino, A.A., Pinheiro, H., Novello, J.C., Eberlin, M.N. and Cano, M.I.N. (2004). Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *European Journal of Biochemistry* **271**, 3050–3063. doi: 10.1111/j.1432-1033.2004.04237.x.

Fragaki, K., Ferrua, B., Mograbi, B., Waldispühl, J. and Kubar, J. (2003). A novel *Leishmania infantum* nuclear phosphoprotein Lepp12 which stimulates IL-1-beta synthesis in THP-1 transfectants. *BioMed Central Microbiology* **3**, 7. doi: 10.1186/1471-2180-3-7.

Freedman, D.J. and Beverley, S.M. (1993). Two more independent selectable markers for stable transfection of *Leishmania*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **62**, 37–44. doi: 10.1016/0166-6851(93)90175-W.

Gao, H., Cervantes, R.B., Mandell, E.K., Otero, J.H. and Lundblad, V. (2007). RPA-like proteins mediate yeast telomere function. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**, 208–214. doi: 10.1038/nsmb1205.

Gasior, S.L., Olivares, H., Ear, U., Hari, D.M., Weichselbaum, R. and Bishop, D.K. (2001). Assembly of RecA-like recombinases: distinct roles for mediator proteins in mitosis and meiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **98**, 8411–8418. doi: 10.1073/pnas.121046198.

Genois, M.-M., Mukherjee, A., Ubeda, J.M., Buisson, R., Paquet, E., Roy, G., Plourde, M., Coulombe, Y., Oueltte, M. and Masson, J.Y. (2012). Interactions between BRCA2 and RAD51 for promoting homologous recombination in *Leishmania infantum*. *Nucleic Acids Research* **40**, 6570–6584. doi: 10.1093/nar/gks306.

Glover, L. and Horn, D. (2012). Trypanosomal histone gammaH2A and the DNA damage response. *Molecular and Biochemical Parasitology* **183**, 78–83. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.01.008.

Glover, L., McCulloch, R. and Horn, D. (2008). Sequence homology and microhomology dominate chromosomal double-strand break repair in African trypanosomes. *Nucleic Acids Research* **36**, 2608–2618. doi: 10.1093/nar/gkn104.

Golub, E.I., Gupta, R.C., Haaf, T., Wold, M.S. and Radding, C.M. (1998). Interaction of human rad51 recombination protein with single-stranded DNA binding protein, RPA. *Nucleic Acids Research* **26**, 5388–5393. doi: 10.1093/nar/26.23.5388.

Grogl, M., Oduola, A.M., Cordero, L.D. and Kyle, D.E. (1989). *Leishmania* spp.: development of pentostam-resistant clones in vitro by discontinuous drug exposure. *Experimental Parasitology* **69**, 78–90. doi: 10.1016/0014-4894(89)90173-2.

Gruđić, A., Jul-Larsen, A., Haring, S.J., Wold, M.S., Lonning, P.E., Bjerkvig, R. and Boe, S.O. (2007). Replication protein A prevents

- accumulation of single-stranded telomeric DNA in cells that use alternative lengthening of telomeres. *Nucleic Acids Research* **35**, 7267–7278. doi: 10.1093/nar/gkm738.
- Haring, S. J. and Wold, M. S.** (2007). A common means to an end. *Nature Structural & Molecular Biology* **14**, 176–177. doi: 10.1038/nsmb0307-176.
- Kalocsay, M., Hiller, N. J. and Jentsch, S.** (2009). Chromosome-wide Rad51 spreading and SUMO-H2A.Z-dependent chromosome fixation in response to a persistent DNA double-strand break. *Molecular Cell* **33**, 335–343. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.016.
- Khadaroo, B., Teixeira, M. T., Luciano, P., Ecker-Boulet, N., Germann, S. M., Simon, M. N., Gallina, I., Abadallah, P., Gilson, E., Geli, V. and Lisby, M.** (2009). The DNA damage response at eroded telomeres and tethering to the nuclear pore complex. *Nature Cell Biology* **11**, 980–987. doi: 10.1038/ncb1910.
- Lao, Y., Gomes, X. V., Ren, Y., Taylor, J. S. and Wold, M. S.** (2000). Replication protein A interactions with DNA. III. Molecular basis of recognition of damaged DNA. *Biochemistry* **39**, 850–859. doi: 10.1021/bi991704s.
- Lira, C. B., Giardini, M. A., Siqueira-Neto, J. L., Conte, F. F. and Cano, M. I. N.** (2007). Telomere biology of trypanosomatids: beginning to answer some questions. *Trends in Parasitology* **23**, 357–362. doi: 10.1016/j.pt.2007.06.005.
- Lisby, M., Teixeira, M. T., Gilson, E. and Geli, V.** (2010). The fate of irreparable DNA double-strand breaks and eroded telomeres at the nuclear periphery. *Nucleus* **1**, 158–161. doi: 10.4161/nucl.1.2.11173.
- Longhese, M. P.** (2008). DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes & Development* **22**, 125–140. doi: 10.1101/gad.1626908.
- McCulloch, R. and Barry, J. D.** (1999). A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes & Development*, **13**, 2875–2888. doi: 10.1101/gad.13.21.2875.
- McKean, P. G., Keen, J. K., Smith, D. F. and Benson, F. E.** (2001). Identification and characterisation of a RAD51 gene from *Leishmania major*. *Molecular and Biochemical Parasitology* **115**, 209–216. doi: 10.1016/S0166-6851(01)00288-2.
- Moore, C. W.** (1988). Internucleosomal cleavage and chromosomal degradation by bleomycin and phleomycin in yeast. *Cancer Research* **48**, 6837–6843.
- Moore, C. W.** (1989). Cleavage of cellular and extracellular *Saccharomyces cerevisiae* DNA by bleomycin and phleomycin. *Cancer Research* **49**, 6935–6940.
- Nakada, D., Shimomura, T., Matsumoto, K. and Sugimoto, K.** (2003). The ATM-related Tel1 protein of *Saccharomyces cerevisiae* controls a checkpoint response following phleomycin treatment. *Nucleic Acids Research* **31**, 1715–1724. doi: 10.1093/nar/gkg252.
- Ouellete, M., Drummel-Smith, J. and Papadopoulou, B.** (2004). Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resistance Updates* **7**, 257–266. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.144.
- Paland, N., Kamer, I., Kogan-Sakin, I., Madar, S., Goldfinger, N. and Rotter, V.** (2009). Differential influence of normal and cancer-associated fibroblasts on the growth of human epithelial cells in an in vitro cocultivation model of prostate cancer. *Molecular Cancer Research* **7**, 1212–1223. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0073.
- Patrick, S. M. and Turchi, J. J.** (1999). Replication protein A (RPA) binding to duplex cisplatin-damaged DNA is mediated through the generation of single-stranded DNA. *Journal of Biological Chemistry* **274**, 14972–14978. doi: 10.1074/jbc.274.21.14972.
- Povirk, L. F., Han, Y. H. and Steighner, R. J.** (1989). Structure of bleomycin-induced DNA double-strand breaks: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions. *Biochemistry* **28**, 5808–5814.
- Regis-da-Silva, C. G., Freitas, J. M., Passos-Silva, D. G., Furtado, C., Augusto-Pinto, L., Pereira, M. T., DaRocha, W. D., Franco, G. R., Macedo, A. M., Hoffmann, J. S., Cazaux, C., Pena, S. D. J., Teixeira, S. M. R. and Machado, C. R.** (2006). Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Molecular and Biochemical Parasitology* **149**, 191–200. doi: 10.1016/j.molbio-para.2006.05.012.
- Schramke, V., Luciano, P., Brevet, V., Guillot, S., Corda, Y., Longhese, M. P., Gilson, E. and Geli, V.** (2004). RPA regulates telomerase action by providing Est1p access to chromosome ends. *Nature Genetics* **36**, 46–54. doi: 10.1158/1541-7786.MCR-09-0073.
- Siqueira-Neto, J. L., Lira, C. B. B., Giardini, M. A., Khater, L., Perez, A. M., Peroni, L. A., dos Reis, J. R., Freitas-Junior, L. H., Ramos, C. H. and Cano, M. I. N.** (2007). *Leishmania* replication protein A-1 binds in vivo single-stranded telomeric DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **358**, 417–423. doi: 10.1016/j.bbrc.2007.04.144.
- Stauffer, M. E. and Chazin, W. J.** (2004). Structural mechanisms of DNA replication, repair, and recombination. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 30915–30918. doi: 10.1074/jbc.R400015200.
- Sugiyama, T. and Kowalczykowski, S. C.** (2002). Rad52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate Rad51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 31663–31672. doi: 10.1074/jbc.R400015200.
- Tarsounas, M., Munoz, P., Claas, A., Smiraldo, P. G., Pittman, D. L., Blasco, M. A., and West, S. C.** (2004). Telomere maintenance requires the RAD51 D recombination/repair protein. *Cell* **117**, 337–347. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00337-X.
- Verdun, R. E. and Karlseder, J.** (2006). The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* **127**, 709–720. doi: 10.1016/j.cell.2006.09.034.
- Xu, X., Vaithiyalingam, S., Glick, G. G., Mordes, D. A., Chazin, W. J. and Cortez, D.** (2008). The basic cleft of RPA70N binds multiple checkpoint proteins, including RAD9, to regulate ATR signaling. *Molecular and Cellular Biology* **28**, 7345–7353. doi: 10.1128/MCB.01079-08.
- Wold, M. S.** (1997). Replication protein A: a heterotrimeric, single-stranded DNA-binding protein required for eukaryotic DNA metabolism. *Annual Review of Biochemistry* **66**, 61–92. doi: 10.1074/jbc.R400015200.
- Zou, Y., Liu, Y., Wu, X. and Shell, S. M.** (2006). Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *Journal of Cellular Physiology* **208**, 267–273. doi: 10.1128/MCB.01079-08.

## 8.4 Artigo científico: *Leishmania amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle

# *Leishmania amazonensis* Promastigotes Present Two Distinct Modes of Nucleus and Kinetoplast Segregation during Cell Cycle

Marcelo Santos da Silva<sup>1,2</sup>, Jomar Patricio Monteiro<sup>3</sup>, Vinicius Santana Nunes<sup>1</sup>, Elton José Vasconcelos<sup>4</sup>, Arina Marina Perez<sup>1</sup>, Lúcio de Holanda Freitas-Júnior<sup>5</sup>, Maria Carolina Elias<sup>6</sup>, Maria Isabel Nogueira Cano<sup>1\*</sup>

**1** Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Botucatu, São Paulo, Brazil, **2** Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, São Paulo, Brazil, **3** Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) Caprinos e Ovinos, Sobral, Ceará, Brazil, **4** Seattle Biomedical Research Institute, Seattle, Washington, United States of America, **5** Laboratório Nacional de Biociências (LNBio), Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais, Campinas, São Paulo, Brazil, **6** Center of Toxins, Immune Response and Cell Signaling (CeTICS), Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil

### Abstract

Here, we show the morphological events associated with organelle segregation and their timing in the cell cycle of a reference strain of *Leishmania* (*L.*) *amazonensis* promastigotes, the main causative agent of Tegumentary leishmaniasis in the Americas. We show evidences that during the cell cycle, *L. amazonensis* promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation, which occur in different temporal order in different proportions of cells. We used DAPI-staining and EdU-labeling to monitor the segregation of DNA-containing organelles and DNA replication in wild-type parasites. The emergence of a new flagellum was observed using a specific monoclonal antibody. The results show that *L. amazonensis* cell cycle division is peculiar, with 65% of the dividing cells duplicating the kinetoplast before the nucleus, and the remaining 35% doing the opposite or duplicating both organelles concomitantly. In both cases, the new flagellum appeared during S to G2 phase in 1N1K cells and thus before the segregation of both DNA-containing organelles; however, we could not determine the exact timing of flagellar synthesis. Most of these results were confirmed by the synchronization of parasites using hydroxyurea. Altogether, our data show that during the cell cycle of *L. amazonensis* promastigotes, similarly to *L. donovani*, the segregation of nucleus and kinetoplast do not follow a specific order, especially when compared to other trypanosomatids, reinforcing the idea that this characteristic seems to be species-specific and may represent differences in cellular biology among members of the *Leishmania* genus.

**Citation:** da Silva MS, Monteiro JP, Nunes VS, Vasconcelos EJ, Perez AM, et al. (2013) *Leishmania amazonensis* Promastigotes Present Two Distinct Modes of Nucleus and Kinetoplast Segregation during Cell Cycle. PLoS ONE 8(11): e81397. doi:10.1371/journal.pone.0081397

**Editor:** Dario S. Zamboni, University of São Paulo, Brazil

**Received:** June 6, 2013; **Accepted:** October 11, 2013; **Published:** November 21, 2013

**Copyright:** © 2013 da Silva et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, 2012/50263-5) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq,4744252010-0). MSS, AMP receive doctoral and VSN receive post-doctoral fellowships from FAPESP and EJV receive a financial support from CNPq (PDE 202223/2012-4). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing interests:** Dr. Maria Carolina Elias, one of the co-authors of the manuscript, is a PLOS ONE Editorial Board member. This does not alter the authors' adherence to all the PLOS ONE policies on sharing data and materials.

\* E-mail: micano@ibb.unesp.br

### Introduction

*Leishmania amazonensis*, a trypanosomatid protozoan, is the main causative agent of Tegumentary leishmaniasis in the Americas. Leishmaniasis is a spectrum of diseases with different clinical forms that affects approximately 350 million people around the globe. Recent data indicated that the disease is endemic in 98 countries, with more than 1.6 million new cases per year and over 20,000 deaths annually [1,2].

There are no effective vaccines for leishmaniasis, and the few available drugs are expensive and toxic to the host. In addition, the occurrence of drug-resistant parasites requires the establishment of intensive research to better understand the cellular and molecular biology of these parasites [3,4].

*Leishmania* spp. belongs to the Trypanosomatidae family, which includes digenetic parasites with complex life cycles and different developmental forms in vertebrate and invertebrate hosts. This peculiarity is central to successful parasite adaptation and the movement of these parasites between

vector and host. Their life cycle is characterized mainly by changes in cell shape, cell cycle, metabolism, surface coat, DNA replication and gene expression that, in this case, also have their peculiarities [5-9].

These protozoa contain a unique mitochondrion that has a dense kinetoplast region composed of a network of several thousand minicircles and a few dozen maxicircles, which form the kinetoplast DNA (kDNA) [10]. These protozoa also have a single flagellum connected to the kinetoplast basal body that emerges from a flagellar pocket, which is an invagination of the plasma membrane [11]. The length of the flagellum is tightly controlled throughout the life cycle of the parasite, especially in the promastigote form, where it is essential for mobility and survival inside the invertebrate host [12,13].

In trypanosomatids, the coordination of nuclear and kDNA replication throughout the cell cycle is dissimilar to higher eukaryotes where mitochondrial DNA replicates at any stage of the cell cycle [14,15]. Many authors have also described the existence of a pattern of segregation of the DNA-containing organelles (nucleus and kinetoplast) in the well studied *Trypanosoma brucei* [16], and also in *Trypanosoma cruzi* [17] and *L. tarentolae* [18]. In all of these protozoa cell cycle events follow this order: the flagellum is duplicated first, and the kinetoplast divides shortly before nuclear division, culminating with cytokinesis, which is also called post-mitosis. It was also shown that *L. donovani* and *L. mexicana*, were different from other trypanosomatids because they both segregate the kinetoplast after the onset of mitosis [19,20]. However, none of these studies demonstrated if these segregation patterns were fixed and thus shown by all cells within the studied populations or if there were different proportions of cells showing a more or less frequent pattern of segregation. Recently, some authors demonstrated the existence of cells within the same population of *L. donovani* [19] and *L. major* [21], showing not only different morphologies but also a non-fixed pattern of nucleus and kinetoplast segregation. For example in *L. donovani*, although the majority of cells segregate the kinetoplast after the nucleus, it was also observed that a small proportion of cells (about 20%) within the same population segregate the kinetoplast before the nucleus [19]. A deep description about the events occurring and the molecules involved in the cell cycle of *L. major* promastigotes revealed that both the timing of its cell cycle as well as the segregation of the kinetoplast, which occurs before the nucleus, are similar to that of *T. brucei*, although the authors detected the existence of a small proportion of cells showing different configurations, which were not considered in the cell cycle duration calculations [21]. Thus, it is more clear now that at least for some species of *Leishmania* [19-21], the order and timing of organelle segregation are not consensual and cannot be generalized, although the mechanisms that ensure proper organelle segregation in trypanosomatids have been extensively studied in relation to cell cycle control, including the establishment of networks of interaction between molecules [21,22] and the relationship between DNA replication and segregation of DNA-containing organelles [17,20,21].

The present article shows evidences that during the cell cycle, *L. amazonensis* promastigotes show two distinct modes

of nucleus and kinetoplast segregation, which occur in different temporal order and in different proportions of cells. Our results demonstrate that similarly to *L. donovani* [19], in the studied population we find cells segregating either the kinetoplast before nucleus or cells doing the opposite, although *L. amazonensis* shows a larger proportion of cells (65%) segregating the kinetoplast before the nucleus whereas in *L. donovani* the majority of cells (80%) segregate the kinetoplast after the nucleus [19]. Additionally, the timing for both organelle segregation and flagellum emergence differs from *L. amazonensis* and its phylogenetically closer species (e.g. *L. mexicana* and *L. donovani*), although they all have a similar population doubling time (about 7h) [19,20] this article. Therefore, our results reinforce the idea that cell cycle events involving the segregation of DNA-containing organelles seems to be species-specific and may represent differences in cellular biology among members of the *Leishmania* genus.

## Materials and Methods

### Cell growth

A pure culture of *L. amazonensis* promastigotes (MHOM/BR/1973/M2269) were grown at 27 °C in M199 medium (Cultilab) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (Cultilab), 25 mM HEPES and 1% (v/v) antibiotic/antimycotic solution (Cultilab).

### Cell cycle analysis

Formaldehyde-fixed and DAPI-stained exponentially growing promastigotes (~1,186 cells) were examined under a Nikon 80i fluorescent microscope (100x magnification) to observe the nucleus and kinetoplast and to estimate the duration of nuclear and kinetoplast mitosis/division (M/D, respectively) and post-mitosis/post-division (post-M/post-D), according to the Williams formula [23]:  $x = \frac{\ln(1-y/2)}{-\alpha}$ , where x is the cumulative time within the cycle until the end of the stage in question, y is the cumulative % of cells up to and including the stage in question (expressed as a fraction of one unit), and  $\alpha$  is the specific growth rate.

To estimate the duration of S phase, we used the Woodward and Gull formula [16]:  $S = \frac{1}{\alpha} \ln[L + e^{\alpha(Z)}] - (Z + t)$ , where L is the proportion of cells exhibiting EdU-labeled nuclei,  $\alpha = \ln 2/T$  (T = generation time expressed in hours),  $Z = G_2 + (M \text{ or } D) + (\text{post-M or post-D})$ , and t is the duration of the EdU labeling period in hours.

### EdU labeling

Exponentially growing promastigotes were incubated for a minimum of 1 h with the thymidine analog EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine). Parasite samples remained exposed to EdU, and cell samples were taken from the culture at time zero (after 1 h of incubation) and then every 5 min until we detected cells containing two EdU-labeled nuclei, which correspond to the period between the end of the  $S_N$  phase and the end of mitosis. EdU incorporation was detected using click chemistry and

azide labeled with Alexa Fluor 492, according to manufacturer instructions (Click-iT Edu Image kit, Invitrogen). Images were analyzed with a Nikon 80i fluorescence microscope and captured with a digital camera (DS-Fi1, Nikon).

### Indirect immunofluorescence (IIF)

EdU-labeled promastigotes cells were washed with 1X PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) and fixed in 1% (v/v) formaldehyde in 1X PBS for 5 min at room temperature. Cells were then treated with 0.1% Triton-X 100 in 1X PBS for 10 min and free aldehyde molecules were neutralized with 0.1 M glycine in 1X PBS for 10 min at room temperature. Fixed cells were washed with 1X PBS and incubated with the monoclonal antibody MAbAC (culture supernatant), which recognizes an unknown conserved trypanosomatid flagellar structure [24]. This antibody was raised by immunizing BALB/c mice with insoluble detergent extracts enriched in a cytoskeletal fraction of *T. cruzi* epimastigotes [24]. In the reaction, MAbAC was diluted (1:10) in blocking solution (4% (w/v) bovine serum albumin) and was incubated for 12 h at 4 °C. Goat anti-mouse IgG labeled with Alexa Fluor 555 (Invitrogen) was used as the secondary antibody. Cells were deposited on poly-L-lysine coated slides for 15 min, and VECTASHIELD® Mounting Medium with DAPI (Vector Labs) was used as the anti-fade mounting solution and to stain nuclear and kinetoplast DNA. For these experiments, images were analyzed with a Nikon 80i fluorescence microscope and captured with a digital camera (DS-Fi1, Nikon). When necessary, images were superimposed using NIS elements software (version Ar 3.10) or ImageJ software (version 1.43 u).

### Cell cycle synchronization

For HU-synchronization, parasites in mid-log phase were treated for 14 hours with 5 mM HU (Sigma) at 27 °C. Control cultures were incubated under identical conditions except that HU was absent. After HU treatment, synchronized and control parasites were harvested by centrifugation at 2,300 g for 5 minutes at 4 °C for the complete removal of HU, and the parasites were recovered in twice the original amount of fresh M199 supplemented medium. Samples containing approximately 2x10<sup>6</sup> parasites were collected hourly for 7 hours, harvested by centrifugation, washed in 1X PBS (0.14 M NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4), fixed in 1% formaldehyde for 5 minutes at room temperature, washed again and suspended in 1X PBS. Cells were permeabilized with 0.1% Triton-X 100 and incubated with 40 µg of RNase A (Invitrogen) for at least 2 hours at 37 °C. To measure the DNA content, the cells were stained with 40 µg/ml propidium iodide overnight (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) and were analyzed using the FACS Calibur (Becton Dickinson) and CELLQuest software (BD Biosciences) for data extraction. Flow cytometry data analysis was performed using WinMDI v2.8 (<http://facs.scripps.edu/software.html>) to construct histograms (events x FL2 area), scatter plots (FL2 area x FL2 width and SSC-Height x FSC-Height) and to determine synchronization percentages.

## Results

### The segregation of nucleus and kinetoplast in *Leishmania amazonensis* promastigotes occur in different temporal order in different proportions of cells

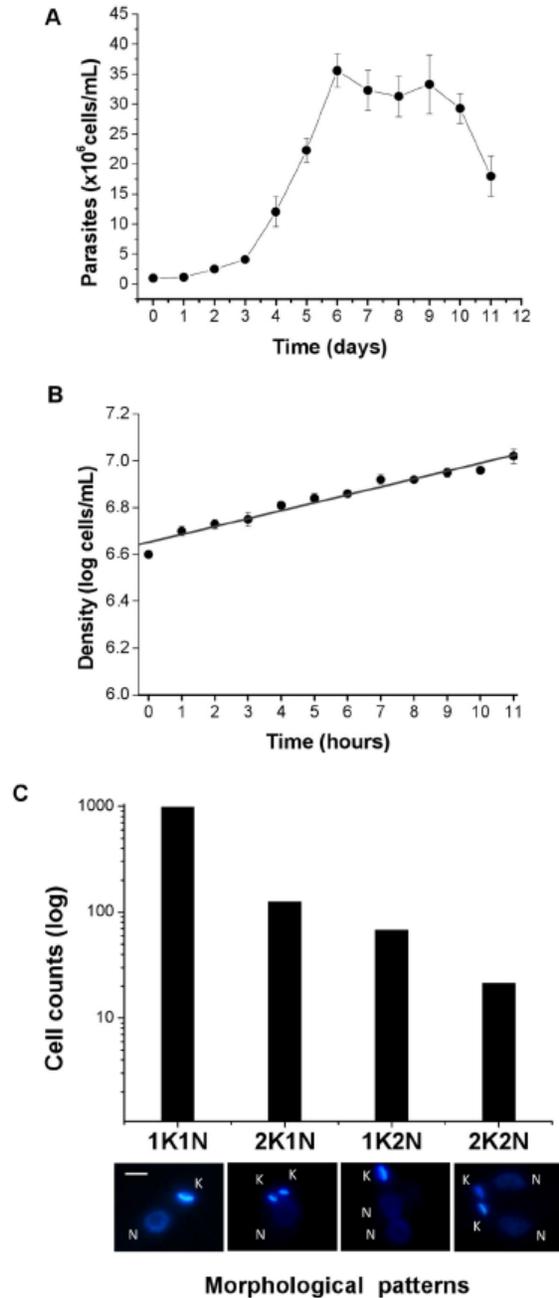
*Leishmania amazonensis* promastigotes were cultured in M199 medium supplemented with 10% fetal bovine serum at 28 °C, and exponentially growing cells (Figure 1A) were used for all experiments described in this article. To calculate *L. amazonensis* generation time, we used an initial inoculum of 5 x 10<sup>6</sup> cells.mL<sup>-1</sup>, and the counts were performed hourly using a Neubauer chamber (Figure 1B). Analysis of these counts resulted in an estimated generation time of 7 hours for *L. amazonensis* promastigotes (Figure 1B). This value was subsequently used to determine the duration of each cell cycle phase, with the concomitant morphological analyses shown below.

We examined 1,186 DAPI-stained wild-type *L. amazonensis* promastigotes in exponential growth and observed that most of them (973 cells) contained one kinetoplast and one nucleus (1K1N). Among the cells in division (191 cells), we observed two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation: one in which 125 cells, representing 65% of the 191 cells, segregated the kinetoplast before the nucleus and thus contained two kinetoplasts and one nucleus (2K1N), and the other, representing 66 cells, or the remaining 35% of the 191 cells, segregated the kinetoplast after the nucleus and had one kinetoplast and two nuclei (1K2N) (Figure 1C). The remaining 22 cells were in post-Mitosis/post-kinetoplast division (post-M/post-D) and had two kinetoplasts and two nuclei (2K2N) (Figure 1C).

### The new flagellum emerges during S/G<sup>2</sup> phase before the segregation of DNA-containing organelles

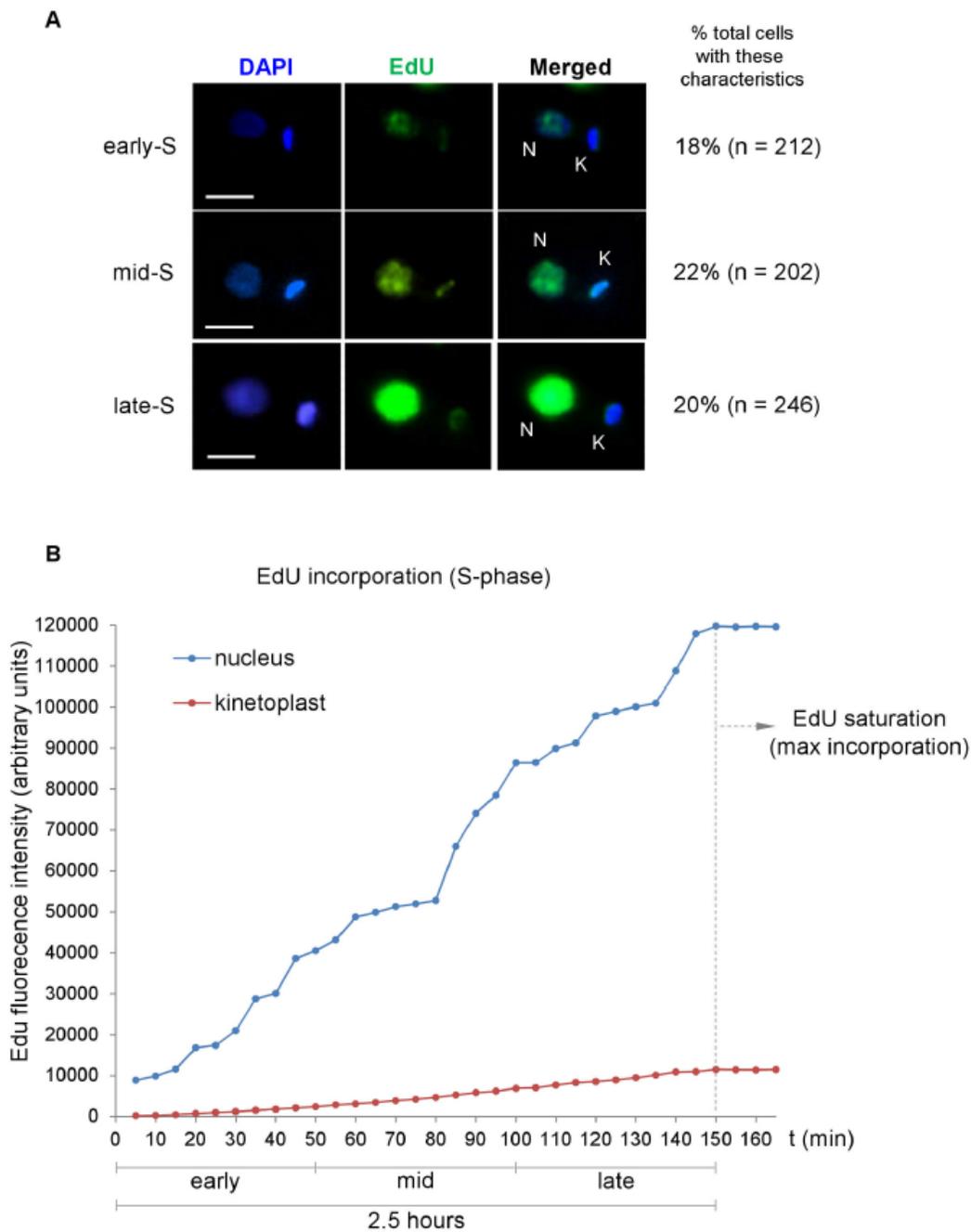
To estimate the timing of DNA replication in the nucleus and in the kinetoplast, *L. amazonensis* promastigotes were incubated with EdU (5-ethynyl-2'-deoxyuridine), and cell samples were observed every 5 minutes until the cells showed the strongest EdU fluorescent signals in both DNA-containing organelles (nucleus and kinetoplast). The images shown in Figure 2A are representative of cells in different stages of S phase (early, mid and late) and were chosen based mainly on morphology of DAPI-stained nucleus and kinetoplast and the increased fluorescence intensity of both EdU-labeled organelles, as estimated using NIS software (Figure 2B). This helped us estimate S phase duration as approximately 2.5 h, which agreed with the value obtained using the Woodward and Gull formula (see below) [16]. The results also showed that DNA replication in *L. amazonensis* promastigotes is an event that most likely occurs simultaneously in the nucleus and in the kinetoplast.

To estimate the timing for the emergence of a new flagellum from the cell body of *L. amazonensis* promastigotes, parasite cells were incubated with EdU followed by flagellum labeling with MAbAC (culture supernatant) [24]. For this experiment, parasites remained exposed to EdU, and cell samples were taken every 5 min followed by flagellum labeling. The collected images shown in Figure 3A are representative of *L.*



**Figure 1. Estimation of generation time and the profile of organelle segregation in *L. amazonensis* promastigotes.** Panel **A**) Typical growth curve of *L. amazonensis* promastigotes in M199 medium at 28 °C. Promastigotes grew logarithmically in the range  $1 \times 10^5$  to  $3.5 \times 10^7$  cells ml<sup>-1</sup>. Panel **B**) Cell density was measured hourly over 12 h. The generation time was calculated to be 7 h ( $r^2 = 0.983$ ). Errors bars indicate SD of three independent assays. Panel **C**) Distinct morphological patterns observed in exponentially growing *L. amazonensis* promastigote cultures. The data were obtained from 1,186 cells counted from three independent axenic cultures of wild-type *L. amazonensis* promastigotes. Images are representative of DAPI-stained cells showing different organelle segregation, 1K1N are cells not in division, 1K2N and 2K1N are cells in division, and 2K2N are cells in post-M/post-D. Images were captured using a Nikon 80i and NIS element v.3.0 Software. K = kinetoplast, N = nucleus. Bars = 2  $\mu$ m.

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.g001



**Figure 2. DNA replication occurs simultaneously in the nucleus and in the kinetoplast of *L. amazonensis* promastigotes.** Panel A) EdU incorporation was revealed by click chemistry using azide labeled with Alexa 594. DAPI was used to stain DNA in the kinetoplast (K) and in the nucleus (N). The images represent cells in early, mid and late S phase, determined by EdU incorporation and the morphology of DAPI-stained nucleus and kinetoplast. The column on the right shows the percentage of cells in the population that had the same characteristics. Bars, 2  $\mu$ m. Panel B) The amount of EdU-incorporation was estimated by fluorescence intensity using NIS elements v.3.0 software. The duration of S phase for each organelle was determined by morphology and increased fluorescence intensity, which was directly proportional to increased EdU incorporation. The maximum fluorescence intensity/incorporation (signaled as EdU saturation (max incorporation) indicated the end of S-phase for each DNA-containing organelle (approximately 120,000 a.u for nuclear DNA and approximately 10,000 a.u for kinetoplast DNA).

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.g002

*amazonensis* promastigotes in G<sub>1</sub>, S and S/G<sup>2</sup> cell cycle phases for nucleus and kinetoplast and were selected based on the morphology of DAPI-stained and EdU-labeled organelles and flagellum appearance using an indirect immunofluorescence (IIF) assay. We observed that the new flagellum protrudes during S/G<sup>2</sup> phase in 1N1K cells and thus before the segregation of both DNA-containing organelles as shown in Figure 3B and in other *Leishmania* species [20,21]. Although we could not determine the exact timing of flagellum appearance, not even if it emerged during S<sub>N</sub>/G<sub>2N</sub> or during S<sub>K</sub>/G<sub>2K</sub>, there is an estimation in Figure 4 based on the timing calculated for each kinetoplast and nuclear cell cycle event, which shows that it takes approximately 4.5 h (0.64 units of the cell cycle) within the 7 h cell cycle for a new flagellum to emerge from *L. amazonensis* promastigotes.

In summary, after examining 1,186 DAPI-stained cells, we observed that 191 cells (16.1% of the total) were in division (segregating one or both nucleus and kinetoplast) and had two flagella. Among these 191 cells, 65% (125 cells or 10.5% of the total) were 2K1N2F and 35% (66 cells or 5.6% of the total) were 1K2N2F, meaning that these cells did not end the cytokinesis, but they segregated the kinetoplast (D cells in Figures 3B and 3C) or the nuclei (M cells in Figures 3B and 3C). From the total of 1,186 cells, only 1.9% (22 cells) were in cytokinesis (post-M/post-D cells in Figures 3B and 3C). Thus, among the exponentially growing promastigotes of *L. amazonensis* we can observe cells with the same morphologies presented by both *L. mexicana* and *L. major* (1K1N1F, 1K1N2F, 2K1N2F, 1K2N2F, 2K2N2F) [20,21], although *L. amazonensis* differs from them in terms of the timing and proportion of cells that segregate the kinetoplast before or after the nucleus. The diagram shown in Figure 3C summarizes our findings and shows the proportions of these cell configurations in the studied population.

#### Estimation of cell cycle event timing in *L. amazonensis* promastigotes shows that DNA replication seems to be coordinated with the segregation of both DNA-containing organelles

To calculate the duration of M and post-M nuclear events, we used the values estimated for the population doubling time (Figure 1B) and for the proportion of cells within the 1,186 cells that have distinct N/K configurations, including the order and timing estimated for organelle segregation (Figures 1C and 3C).

The sum of cells with 1K2N2F (66 cells or 5.6% of the total) and 2K2N2F (22 cells or 1.9% of the total) configurations was used to estimate the duration of post-M phase, which was estimated to be 0.72 h or 0.1 units of the cell cycle using the Williams formula [23]. To estimate the duration of M phase, we used cells with the 2K1N2F configuration (125 cells or 10.5% of the total), which represented cells that did not reach the end of mitosis and thus had presented the nucleus in division but not yet segregated; additionally, cells with this configuration were considered mitotic by Ambit et al. (2011) [21]. Using the Williams formula [23], the duration of M phase was estimated to be 0.62 h or 0.09 units of the cell cycle (Table 1, Figures 3B, 3C and 4).

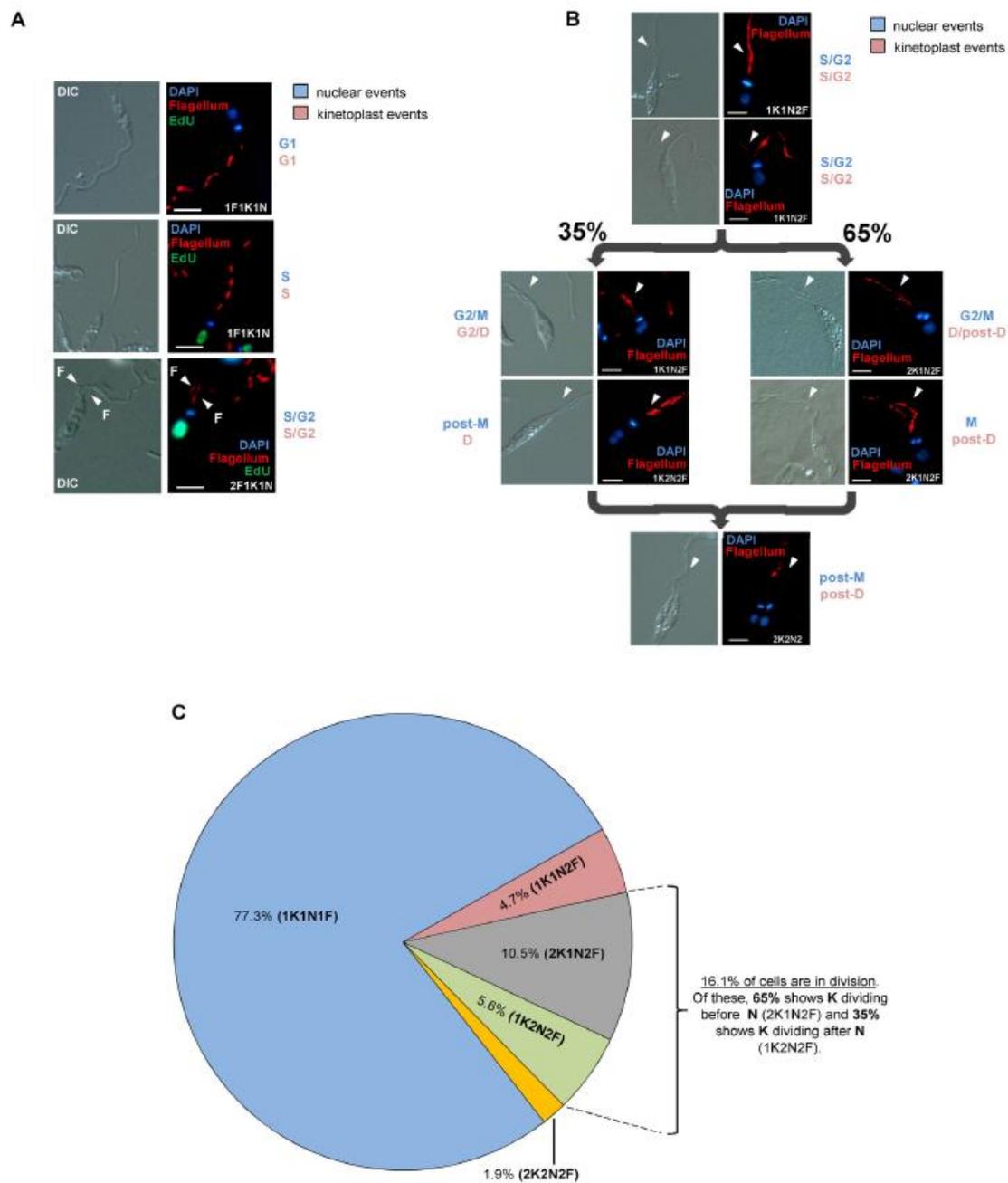
To estimate the duration of nuclear G<sub>2</sub> phase (G<sub>2N</sub>), *L. amazonensis* promastigotes were maintained in the presence of EdU until cells containing two EdU-labeled nuclei were observed (data not shown). The results showed that 1K2N or 2K2N cells were first detected 1.25 h after EdU incorporation, meaning that cells in the end of S phase took 1.25 h to go through G<sub>2</sub> phase and mitosis. Considering this finding and that the duration of M phase in *L. amazonensis* promastigotes is 0.62 h, we could estimate the duration of G<sub>2N</sub> as 0.63 h (0.09 units of the cell cycle) (Table 1 and Figure 4).

Using the values obtained for post-M, M and G<sub>2N</sub> and the proportion of cells that exhibited EdU-labeled nuclei after 1.25 h of EdU exposure (50% of cells), we were able to calculate the duration of S<sub>N</sub> phase; according to the Woodward and Gull formula [16] this was estimated to be 2.2 h or 0.32 units of the cell cycle. This value is similar to the time estimated for the duration of DNA replication in both DNA-containing organelles (2.5 h) using the fluorescence intensity of EdU-labeled cells (Figure 2B).

Finally, the duration of G<sub>1N</sub> phase was estimated to be 2.83 h (0.4 units of the cell cycle), calculated by taking the difference between the sums of the timings estimated for the other phases (S<sub>N</sub>+G<sub>2N</sub>+M+post-M) and the generation time (Table 1 and Figure 4). Therefore, in a 7 h cell cycle, the longest nuclear event was G<sub>1N</sub> phase followed by S<sub>N</sub> (2.2 h), post-M (0.72 h), G<sub>2N</sub> (0.63 h) and M (0.62 h).

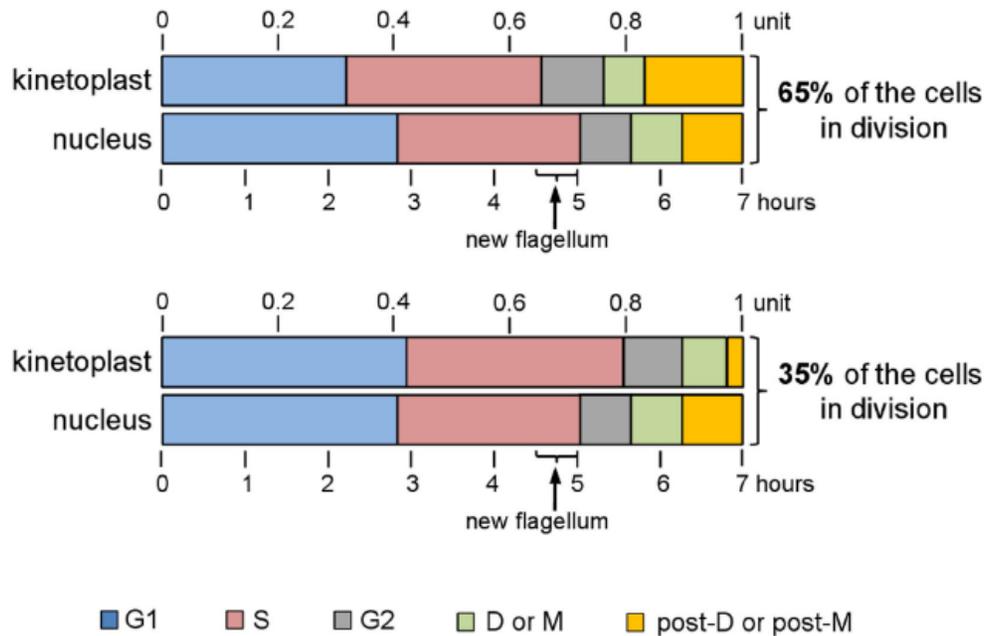
Using the same approaches described above, we could also estimate the timing of each cell cycle phase for the kinetoplast events. For this calculation, we also used that group of 191 cells from the total of 1,186 DAPI-stained cells, which were in division and a step before cytokinesis (Figure 3C). Within this group, we could observe that 65% of cells (125 cells) segregate the kinetoplast before the nucleus (2K1N), and the remaining 35% of the cells (66 cells) segregate the kinetoplast after the nucleus (1K2N) (Figures 3B and 3C). Summarizing our estimations, according to the percentage of cells in D or post-D and the population doubling time, the duration of both phases for 65% of cells that segregate the kinetoplast before the nucleus were 0.49 h (0.07 units of the cell cycle) and 1.18 h (0.17 units of the cell cycle), respectively, and for the 35% that do the opposite, durations were 0.53 h (0.08 units of the cell cycle) and 0.19 h (0.03 units of the cell cycle), respectively (Table 1 and Figure 4).

Based on the observations of cells containing two EdU-labeled kinetoplasts, as detected 1.25 h after the end of S<sub>K</sub> phase, the duration of G<sub>2K</sub> for 65% of cells was estimated to be 0.76 h (0.11 units of the cell cycle) and was 0.72 h (0.10 units of the cell cycle) for the other 35% of cells, which is in agreement with the late kinetoplast segregation observed within this group of cells (Table 1 and Figures 3B and 4). We then used the Woodward and Gull formula [16] to estimate the duration of S<sub>K</sub> as 2.35 h for 65% of cells (0.33 units of the cell cycle) and 2.61 h for 35% (0.37 units of the cell cycle) (Table 1 and Figure 4). The values obtained are also similar to the time estimated for kinetoplast DNA replication (2.5 h) using EdU fluorescence intensity (Figure 2B). Finally, the time estimated for G<sub>1K</sub> phase for 65% of cells was 2.2 h (0.32 units of the cell cycle) and was 2.95 h (0.42 units of the cell cycle) for 35% of



**Figure 3. Morphological patterns and flagellum emergence during the cell cycle of *L. amazonensis* promastigotes.** Panel **A**) The panel shows that a new flagellum emerges in S/G<sup>2</sup> phases of 1K1N cells before the segregation of both kinetoplast and nucleus. EdU label was used as mark of DNA replication in both DNA-containing organelles. Panel **B**) The panel shows nuclear (blue) and kinetoplast (pink) events and demonstrates differences in the percentage of cells that segregate the kinetoplast before and after the nucleus. We can also observe that organelle segregation takes place after the appearance of a new flagellum in S and G<sup>2</sup> phases of both organelles. In panels A and B, nuclear (blue) and kinetoplast (pink) events are, respectively labeled as G1, S, G<sup>2</sup>, M, D (kinetoplast division) and Post-M/Post-D (or cytokinesis). DIC (differential interference contrast), DAPI staining (blue), EdU labeling (green) and flagellum labeling with monoclonal antibody MAbAC (red). N = nucleus, K = kinetoplast. Bars = 2 μm. Panel **C**) The diagram represents a summary of the results shown in A and B.

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.g003



**Figure 4. Cell cycle periods and timings for *Leishmania amazonensis* promastigotes.** Summary of the calculated durations and sequences of the nuclear and kinetoplast events are separately represented for 65% of cells that divide the kinetoplast before the nucleus (top) and for the remaining 35% that do the opposite (bottom). The estimated timing for the appearance of a new flagellum is also noted. These calculations were based on the generation time for *L. amazonensis* promastigotes (7 h), which corresponds to one unit of the cell cycle.

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.g004

cells; these times were also calculated using the difference between the sums of the timings estimated for the other phases ( $S_k + G2_k + D + \text{post-D}$ ) and the generation time (Table 1 and Figure 4). Therefore, the greatest discrepancies among kinetoplast events in both cell configurations (2K1N and 2K2N) occurred in  $G1_k$  and post-D phases (Table 1 and Figure 4).

Altogether, the results indicate that in *L. amazonensis* promastigotes, the segregation of nucleus and kinetoplast parallels with DNA replication in both organelles, although segregation of these organelles occurs in a distinct temporal order in different proportions of cells within the population.

**HU-synchronized parasites have the same organelle segregation pattern observed in non-synchronized wild-type parasites**

To determine if the morphological patterns shown by wild-type *L. amazonensis* promastigotes are reproducible after synchronizing cells in culture, we treated exponentially growing parasites with hydroxyurea (HU). DNA content was estimated by cell sorter analysis using propidium iodide (Figure 5A), and the order of organelle segregation was observed during S phase using DAPI-stained cells (data not shown).

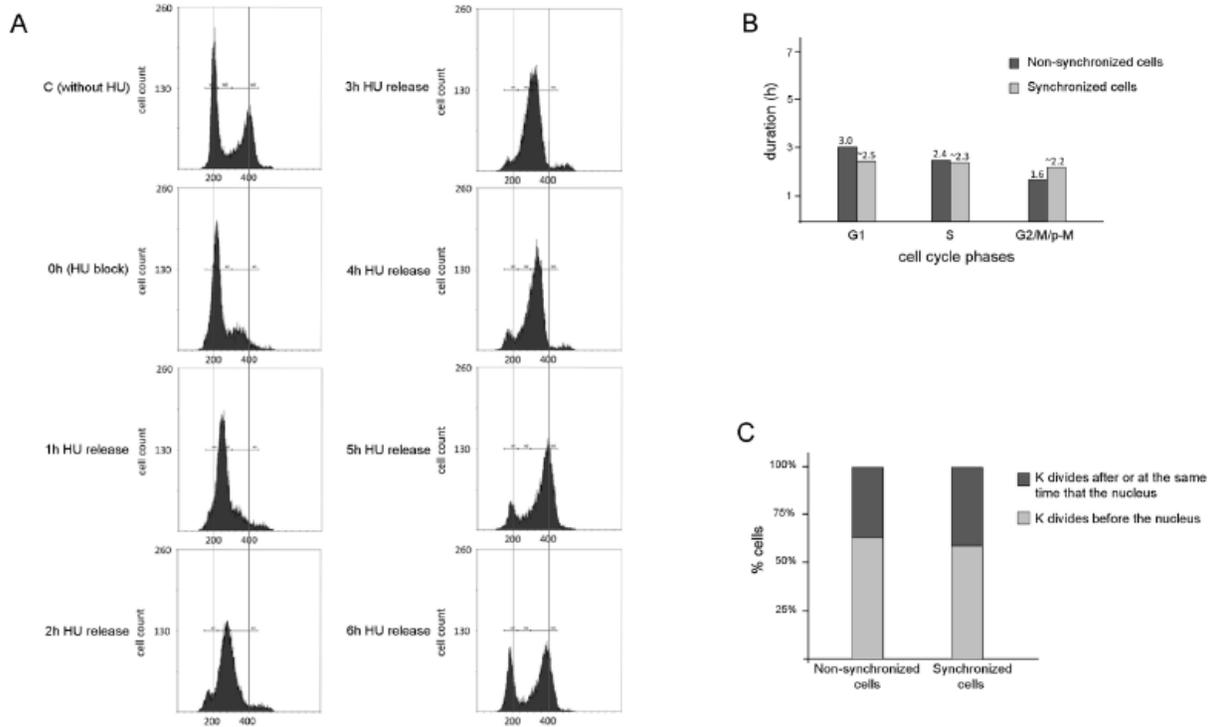
The synchronization of the *L. amazonensis* promastigote forms (approximately 60% of the cells) allowed us to estimate the timing of the main phases of the cell cycle ( $G1$ , S and  $G2/M$ ). According to cell sorter analysis (Figure 5A), the

**Table 1. Timing of organellar events.**

Nuclear events				
Stage	Proportion of cell cycle		Hours	
$G1_N$	0.40		2.83	
$S_N$	0.32		2.20	
$G2_N$	0.09		0.63	
M	0.09		0.62	
post-M	0.10		0.72	
Kinetoplast events				
Stage	Proportion of cell cycle		Hours	
	65 % of cells	35 % of cells	65 % of cells	35 % of cells
$G1_K$	0.32	0.42	2.22	2.95
$S_K$	0.33	0.37	2.35	2.61
$G2_K$	0.11	0.10	0.76	0.72
D	0.07	0.08	0.49	0.53
post-D	0.17	0.03	1.18	0.19

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.t001

duration of one promastigote cell cycle was approximately 7 hours. Here, we were able to detect an increase in propidium iodide fluorescence per cell as early as 1 hour after release from HU arrest. Using this approach, S phase was estimated as the time that fluorescence readings increased and cells



**Figure 5. HU-synchronized *L. amazonensis* promastigotes have the same behavior of organelle segregation as wild-type parasites.** Panel A) Histograms show DNA content per cell after propidium iodide staining and FACS analysis (20,000 total events counted per timepoint). The positions of G1, S, and G2/M, respectively, derived from the data using CellQuest software. Samples were harvested hourly after release from HU. Panel B) Graph shows a comparison of the timing estimated for nuclear + kinetoplast cell cycle phases (G1, S, G2/M/post-M) between non-synchronized and HU-synchronized cells. Panel C) Percentage (%) of HU-synchronized and of non-synchronized cells with differences in organelle segregation. In this assay we analyzed 1,186 non-synchronized cells used in most assays of this article and 1,020 synchronized cells which were harvested and analyzed (using DAPI staining) each 30 minutes after HU release up to the end of the cell cycle (around 4,5h after HU release). The percentage showed is related only to cells in division.

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.g005

reached 4n content, indicating that most cells reached double the initial fluorescence value in the histograms due to ongoing DNA replication. By this method, DNA replication (S phase) lasted for approximately 2.5 hours, G2/M/post-M for approximately 1.5 hours and G1 for approximately 3 hours (Figures 5A and Table 2). These values are all in perfect agreement with the values obtained for the nuclear events in non-synchronized wild-type parasites (Table 1 and Figure 5B) and reinforce the reliability of the data presented here. It is noteworthy that these estimations using FACS analysis are somewhat complicated because some cells remain attached to each other after cell cycle completion [20]. It is also important to recall that the concentration of HU used in these experiments does not cause DNA damage in *L. amazonensis* promastigotes [25], maintaining the order of each cell cycle phase, with an approximated number of cells in each phase and a similar proportion of cells segregating the kinetoplast

**Table 2. Results of FACS analysis.**

Time	G2 <sub>N</sub> /M/post-M and G2 <sub>K</sub> /D/		
	G1 <sub>N</sub> and G1 <sub>K</sub> (%)	S <sub>N</sub> and S <sub>K</sub> (%)	post-D (%)
C (without HU)	44.44 ± 0.8	12.22 ± 0.3	43.34 ± 0.5
0h (HU block)	45.84 ± 0.2	31.36 ± 4.4	22.8 ± 2.1
1h release	24.04 ± 4.5	54.18 ± 6.3	21.78 ± 2.9
2h release	17.54 ± 8.1	52.3 ± 2.3	30.16 ± 9.5
3h release	7.07 ± 1.3	28.28 ± 5.6	64.65 ± 5.7
4h release	8.4 ± 1.7	20.42 ± 6.5	71.18 ± 7.9
5h release	11.48 ± 2.7	14.74 ± 4.3	73.78 ± 4.5
6h release	23.19 ± 5.6	10.31 ± 1.7	66.5 ± 3.9

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.t002

either before (approximately 60%) or after the nucleus (approximately 40%) (Figures 5B and 5C).

**Table 3.** Organellar area ( $\mu\text{m}^2$ ) during S phase.

organelle	early-S (n=212)	mid-S (n=202)	late-S (n=246)
nucleus	3.71 $\pm$ 0.45	4.95 $\pm$ 0.78	6.45 $\pm$ 1.02
kinetoplast	1.03 $\pm$ 0.14	1.18 $\pm$ 0.17	1.58 $\pm$ 0.24

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.t003

## Discussion

The morphological events that accompany the cell cycle in trypanosomatids have been studied in detail in some species, and it appears that for some of them there was a general consensus on the order of events. In most organisms (e.g., *T. brucei*, *T. cruzi*, and *L. tarentolae*), the first event is the emergence of the new flagellum, followed by kinetoplast segregation, nuclear division and finally cytokinesis [17,18,26,27]. However, recent studies reveal peculiarities among different *Leishmania* species that require more investigation [19-21].

In the present study, DAPI staining and EdU labeling were used to observe changes in the morphology of both DNA-containing organelles and DNA replication in *L. amazonensis* promastigotes. It is worth noting that the phenomenon described here was repeatedly observed in both exponentially growing and HU-synchronized cultures even though DAPI-based analysis has considerable limitations that omit many details of the division of these organelles and is also a marker of late division, although not necessarily a good marker of mitosis or kinetoplast division initiation or completion [28]. EdU-labeling was used as marker to follow DNA replication in asynchronous cultures, and it helped us estimate the timing of the S-phase in both DNA-containing organelles by the measurement of their fluorescence intensity signal and area. We observed that the strongest fluorescent signal captured in both organelles accompanied changes in size and in organelle morphology (Table 3 and Figure 2A). For example, nuclei with the strongest fluorescent signal always had increased organellar area (Table 3), most likely indicating that they were approaching the end of  $S_N$  (late S phase/beginning of G2 phase). The kinetoplast morphology also changed from a small stick to a rounded morphology at late  $S_N$  when it also showed a strongest EdU fluorescent intensity signal (Figure 2A). Both events were accompanied by the emergence of the new flagellum from the cell body at late S phase (Figures 3A and 3B). It is also worth emphasizing that after examining ~1186 cells, the difference in the proportion of cells that have distinct behavior in organelle segregation were more evident from this point and beyond (late S phase/beginning of G2 phase) (Figures 3B and 3C).

Based on this information and the Williams [23] and Woodward and Gull [16] analyses, an interesting observation could be made. Our results show significant differences in the order and timing of *L. amazonensis* promastigote cell cycle events in comparison with other *Leishmania* species (e.g., *L. mexicana*, *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*) (Table 4), which somehow breaks a paradigm with respect to previous observations.

**Table 4.** Duration of the generation time and order of kinetoplast segregation in different trypanosomatids and experimental characteristics.

Organism	Generation time	Growth Medium	Temperature of growth	Kinetoplast segregation	Reference
<i>L. amazonensis</i>	7 h	M199	27 °C	BN (65 %) AN (35 %)	This article
<i>L. mexicana</i>	7.1h	M199	28 °C	AN	[20]
<i>L. major</i>	10.2 h	HOMEM	25 °C	BN	[21]
<i>L. donovani</i>	~7 h	M199	24 °C	BN (15-20 %) AN (80-85 %)	[19]
<i>L. infantum</i>	6 h	RPMI 1640	26 °C	ND	[38]
<i>L. tarentolae</i>	5 h	BHI	27 °C	BN	[18]
<i>T. cruzi</i>	24 h	LIT	28 °C	BN	[17]
<i>T. brucei</i>	8.65 h	SDM-79	27 °C	BN	[16]

BN = before nucleus; AN = after nucleus; ND = not determined

doi: 10.1371/journal.pone.0081397.t004

Comparisons among the most closely related *Leishmania* species (e.g., *L. amazonensis* and *L. mexicana*) and the more evolutionarily divergent (e. g. *L. tarentolae*, *L. major* and *L. donovani*) show that the timing for the emergence of the new flagellum and the division of both DNA-containing organelles is markedly different [18-21], with *L. amazonensis* and *L. donovani* showing in addition, different proportion of cells displaying two modes of segregation of the DNA-containing organelles. A large proportion of *L. amazonensis* dividing cells (65%) and 20% of *L. donovani* cells, similarly to *L. major* and *L. tarentolae* segregate the kinetoplast before nucleus and a smaller proportion of *L. amazonensis* cells (35%) behave like *L. mexicana* and 80% of *L. donovani* cells, as they segregate the kinetoplast after the nucleus (Table 4). Moreover, the emergence of the new flagellum in *L. amazonensis*, *L. major* and *L. tarentolae* occurs during  $S/G^2$  phase and thus, prior to both nuclear and kinetoplast division [18,21] this article, whereas in *L. mexicana* and *L. donovani*, nuclear division and flagellum growth occur prior to kinetoplast division, with the flagellum of *L. mexicana* continuously growing even in the next generation [19,20].

We must also call attention to the significant differences presented, even among the closest species, in cell cycle duration and the timing of each cell cycle phase (Table 4). The duration of one cell cycle of several trypanosomatids varies, with durations of 5 hours for *L. tarentolae*, 6h for *L. infantum*, 8.65 h for *T. brucei*, 10.2 h for *L. major* up to 24 hours for *T. cruzi*. *L. amazonensis*, *L. mexicana* and *L. donovani* present similar timings for cell cycle duration (around 7 h), which might be expected as they all belong to the subgenera *L. (Leishmania)* and are considered by some authors phylogenetically close [20,29-31]. In relation to the organellar segregation, among the studied trypanosomatids shown in Table 4, only *L. amazonensis* and *L. donovani* present different

proportion of cells segregating the kinetoplast either before (65% and 20%, respectively) or after (35% and 80%, respectively) the nucleus. Moreover, with the exception of *L. mexicana*, which segregates kinetoplast after the nucleus, and *L. infantum*, whose organelle segregation pattern was not determined, all other trypanosomatids, including *L. tarentolae* and *L. major*, were reported as segregating the kinetoplast before the nucleus (Table 4).

Thus, taken together all these information it is not possible to establish a relationship between the taxonomic proximity among the *Leishmania* species and the duration of cell cycle, timing for flagellum appearance and the pattern of organelle segregation. Therefore, we can conclude that in relation to the cell cycle events, each species has its own peculiarities, which may represent differences in cellular biology among members of the *Leishmania* genus. The results presented in this manuscript reinforce this hypothesis.

We speculate that these discrepancies or similarities in cell cycle duration and organelle segregation among trypanosomatids, may correspond to biological differences inherent to each species studied. For example, it was recently shown that in *T. brucei*, kinetoplast duplication and division, which occurs before nuclear segregation, is driven by cytoskeleton remodeling, with maxicircle segregation occurring as a late event during the cycle [16,32]. Thus, we hypothesize that this must be a rule among trypanosomatids, and in the case of *Leishmania* genus, the differences in organelle segregation could be due to an unknown peculiarity in the cytoskeleton remodeling machinery.

Therefore, our observations of the morphological and chronological events during the cell cycle of *L. amazonensis* promastigotes place this species in a peculiar classification. Here, it is worth recalling that among the *Leishmania* species that are human pathogens, *L. amazonensis* is able to cause the full clinical spectra of disease manifestations, ranging from cutaneous to mucosal or visceral involvement [33]. In this study we used a *Leishmania amazonensis* WHO reference strain, MHOM/BR/1973/M2269, isolated from a patient lesion, denoting that we worked with a genetically homogenous population. It is worth mentioning that clonality in natural populations of many species of *Leishmania* isolates is a common feature [34] and reinforces that the phenomenon

described here is inherent to *L. amazonensis* promastigotes. In addition, when we used HU-synchronized parasites, we confirmed the results observed in non-synchronized parasites, showing that *L. amazonensis* promastigotes behaves differently from other trypanosomatids in relation to reported patterns of organelle segregation (Figure 5). However, we know that in this case we favored nuclear events in detriment of the kinetoplast events by analyzing total DNA content by flow cytometry. But, comparison of the proportions of cells that divide the kinetoplast before and after or at the same time as the nucleus revealed no significant differences between synchronized and non-synchronized populations (Figure 5C).

Trypanosomatid cell cycle is an important field of study, as it presents many peculiarities that distinguish these parasites from their hosts, both morphologically and at the molecular level [35,36]. Furthermore, the establishment of a platform for the exploration of cell cycle-related events among pathogenic and genetically related *Leishmania* species is of high interest for the determination of potential drug targets and development of new therapies, such as the utilization of agents that impair cell division [35,37].

In conclusion, we characterized, for the first time, the features of the cell cycle and the timing of morphological events in *L. amazonensis* promastigotes, and the results reveal that this protozoan has its own cell cycle-related particularities that should be deeply investigated to better understand the biology of this important pathogen.

## Acknowledgements

We thank Professor Dr. Sergio Schenckman (UNIFESP, SP, Brazil) for kindly providing antibody MAbAC and Marjorie A. Golim (Unesp, Botucatu, Brazil) for helping us with the cell sorting analysis.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MSS JPM LHFJ MCE MINC. Performed the experiments: MSS JPM VSN AMP EJV. Analyzed the data: MSS JPM VSN MCE MINC. Contributed reagents/materials/analysis tools: MCE LHFJ MINC. Wrote the manuscript: MSS JPM MCE MINC.

## References

- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P et al. (2012) Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLOS ONE* 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671. PubMed: 22693548.
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27: 305-318. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.004. PubMed: 15225981.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT et al. (2008) Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103: 1-10. doi:10.1007/s00436-008-0943-2. PubMed: 18389282.
- Selvapandian A, Duncan R, Debrabant A, Lee N, Sreenivas G et al. (2006) Genetically modified live attenuated parasites as vaccines for leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123: 455-466. PubMed: 16778323.
- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC et al. (2003) The trypanosomiasis. *Lancet* 362: 1469–1480. doi:10.1016/S0140-6736(03)14694-6. PubMed: 14602444.
- da Silva MS, da Silveira RCV, Perez AM, Monteiro JP, Calderano SG et al. (2012) Nuclear DNA replication in trypanosomatid protozoa. In: RP Leitner. DNA replication and mutation. Nova Science Publishers. pp. 123-178.
- Gull K (2001) The biology of kinetoplastid parasites, insights and challenges from genomics and post-genomics. *Int J Parasitol* 31: 443-452. doi:10.1016/S0020-7519(01)00154-0. PubMed: 11334928.
- Johnston DA, Blaxter ML, Degraeve WM, Foster J, Ivens AC et al. (1999) Genomics and the biology of parasites. *Bioessays* 21: 131-147. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199902)21:2. PubMed: 10193187.
- Simpson AGB, Gill EE, Heather A, Callahan R, Litaker W et al. (2004) Early evolution within kinetoplastids (Euglenozoa) and the late emergence of trypanosomatids. *Protist* 155: 407-422. doi: 10.1078/1434461042650389. PubMed: 15648721.
- Passos-Silva DG, Rajão MA, Nascimento de Aguiar PH, Vieira-da-Rocha JP, Machado CR et al. (2010) Overview of DNA Repair in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei*, and *Leishmania major*. *J Nucleic Acids* 2010: 840768. PubMed: 20976268

11. Cuvillier A, Redon F, Antoine JC, Chardin P, DeVos T et al. (2000) LdARL-3A, a *Leishmania* promastigote-specific ADP-ribosylation factor-like protein, is essential for flagellum integrity. *J Cell Sci* 113: 2065-2074. PubMed: 10806117.
12. Cuvillier A, Miranda JC, Ambit A, Barral A, Merlin G (2003) Abortive infection of *Lutzomyia longipalpis* insect vectors by aflagellated LdARL-3A-Q70L overexpressing *Leishmania amazonensis* parasites. *Cell Microbiol* 5(10): 717-728. doi:10.1046/j.1462-5822.2003.00316.x. PubMed: 12969377.
13. Gluenz E, Ginger ML, McKean PG (2010) Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. *Curr Opin Microbiol* 13: 473-479. doi:10.1016/j.mib.2010.05.008. PubMed: 20541962.
14. Liu B, Liu Y, Motyka SA, Agbo EE, Englund PT (2005) Fellowship of the rings: the replication of kinetoplast DNA. *Trends Parasitol* 21(8): 363-369. doi:10.1016/j.pt.2005.06.008.
15. Shlomai J (2004) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Curr Mol Med* 4(6): 623-647. doi:10.2174/1566524043360096.
16. Woodward R, Gull K (1990) Timing of nuclear and kinetoplast DNA replication and early morphological events in the cell cycle of *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 95: 49-57. PubMed: 2190996.
17. Elias MC, da Cunha JP, de Faria FP, Mortara RA, Freymüller E et al. (2007) Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. *Protist* 158: 147-157. doi:10.1016/j.protis.2006.10.002. PubMed: 17185034.
18. Simpson L, Braly P (1970) Synchronization of *Leishmania tarentolae* by hydroxyurea. *J Protozool* 17: 511-517. doi:10.1111/j.1550-7408.1970.tb04719.x. PubMed: 4101133.
19. Minocha N, Kumar D, Rajanala K, Saha S (2011) Kinetoplast morphology and segregation pattern as a marker for cell cycle progression in *Leishmania donovani*. *J Eukaryot Microbiol* 58(3): 249-253. doi:10.1111/j.1550-7408.2011.00539.x. PubMed: 21401783.
20. Wheeler RJ, Gluenz E, Gull K (2011) The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. *Mol Microbiol* 79(3): 647-662. doi:10.1111/j.1365-2958.2010.07479.x. PubMed: 21255109.
21. Ambit A, Woods KL, Cull B, Coombs GH, Mottram JC (2011) Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. *Eukaryot Cell* 10(11): 1429-1438. doi:10.1128/EC.05118-11. PubMed: 21926331.
22. Tyers M (2004) Cell cycle goes global. *Curr Opin Cell Biol* 16(6): 602-613. doi:10.1016/j.ceb.2004.09.013. PubMed: 15530770.
23. Williams FM (1971) Dynamics of microbial populations. In: B Patten. *Systems analysis and simulation ecology*, Vol 1. Academic Press. pp. 247-262.
24. Godoy PD, Nogueira-Junior LA, Paes LS, Cornejo A, Martins RM et al. (2009) Trypanosome prereplication machinery contains a single functional *orc1/cdc6* protein, which is typical of Archaea. *Eukaryot Cell* 8(10): 1592-1603. doi:10.1128/EC.00161-09. PubMed: 19717742.
25. da Silveira RCV, da Silva MS, Nunes VS, Perez AM, Cano MIN (2013) The natural absence of RPA1N domain did not impair *Leishmania amazonensis* RPA-1 participation in DNA damage response and telomere protection. *Parasitology* 140(4): 547-559. doi:10.1017/S0031182012002028. PubMed: 23388105.
26. McKean PG (2003) Coordination of cell cycle and cytokinesis in *Trypanosoma brucei*. *Curr Opin Microbiol* 6: 600-607. doi:10.1016/j.mib.2003.10.010. PubMed: 14662356.
27. Shapiro TA, Englund PT (1995) The structure and replication of kinetoplast DNA. *Annu Rev Microbiol* 49: 117-143. doi:10.1146/annurev.mi.49.100195.001001.
28. Wheeler RJ, Gull K, Gluenz E (2012) Detailed interrogation of trypanosome cell biology via differential organelle staining and automated image analysis. *BMC Biol* 10: 1. doi: 10.1186/1741-7007-10-1. PubMed: 22214525.
29. Cupolillo E, Medina-Acosta E, Noyes H, Momen H, Grimaldi G Jr (2000) A revised classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitol Today* 16(4): 142-144. doi:10.1016/S0169-4758(99)01609-9. PubMed: 10725899.
30. Fraga J, Montalvo AM, De Doncker S, Dujardin JC, Van der Auwera G (2010) Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. *Infect Genet Evol* 10(2): 238-245. doi:10.1016/j.meegid.2009.11.007. PubMed: 19913110.
31. Noyes HA, Morrison DA, Chance ML, Ellis JT (2000) Evidence for a Neotropical Origin of *Leishmania*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 95(4): 575-578. PubMed: 10904417.
32. Gluenz E, Povelones ML, Englund PT, Gull K (2011) The kinetoplast duplication cycle in *Trypanosoma brucei* is orchestrated by cytoskeleton-mediated cell morphogenesis. *Mol Cell Biol* 31: 1012-1021. doi:10.1128/MCB.01176-10. PubMed: 21173163.
33. Barral A, Pedral-Sampaio D, Grimaldi Júnior G, Momen H, McMahon-Pratt D et al. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am J Trop Med Hyg* 44: 536-546. PubMed: 2063957.
34. Brenière SF, Telleria J, Bosseno MF, Buitrago R, Bastrenta B et al. (1999) Polymerase chain reaction-based identification of New World *Leishmania* species complexes by specific kDNA probes. *Acta Trop* 73(3): 283-293. PubMed: 10546846.
35. Hammarton TC, Mottram JC, Doerig C (2003) The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Prog Cell Cycle Res* 5: 91-101. PubMed: 14593704.
36. Ralston KS, Lerner AG, Diener DR, Hill KL (2006) Flagellar motility contributes to cytokinesis in *Trypanosoma brucei* and is modulated by an evolutionarily conserved dynein regulatory system. *Eukaryot Cell* 5: 696-711. doi:10.1128/EC.5.4.696-711.2006. PubMed: 16607017.
37. Borges VM, Lopes UG, De Souza W, Vannier-Santos MA (2005) Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Parasitol Res* 95: 90-96. doi:10.1007/s00436-004-1248-8. PubMed: 15592939.
38. Soto M, Iborra S, Quijada L, Folgueira C, Alonso C et al. (2004) Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. *Biochem J* 379: 617-625. doi:10.1042/BJ20031522. PubMed: 14766017.

**8.5 Artigo científico: The putative *Leishmania* telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence - resumo (submetido)**

**PLOS ONE**

**The putative *Leishmania* telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence**  
--Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Article Type:</b>	Research Article
<b>Full Title:</b>	The putative <i>Leishmania</i> telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence
<b>Short Title:</b>	<i>Leishmania</i> telomerase RNA (LeishTER)
<b>Corresponding Author:</b>	MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO, Ph.D. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho Botucatu, Sao Paulo BRAZIL
<b>Keywords:</b>	<i>Leishmania amazonensis</i> ; telomerase RNA component; telomerase; trans-splicing, poly adenylation
<b>Abstract:</b>	Telomerase RNAs (TERs) are highly divergent between species, varying in size and sequence composition. Here, we identify a candidate for the telomerase RNA component of <i>Leishmania</i> genus, which includes species that cause leishmaniasis, a neglected tropical disease. Merging a thorough computational screening combined with RNA-seq evidence, we mapped a non-coding RNA gene localized in a syntenic locus on chromosome 25 of five <i>Leishmania</i> species that shares partial synteny with both <i>Trypanosoma brucei</i> TER locus and a putative TER candidate-containing locus of <i>Crithidia fasciculata</i> . Using target-driven molecular biology approaches, we detected a ~2,100 nt transcript (LeishTER) that contains a 5' spliced leader (SL) cap, a putative 3' polyA tail and a predicted C/D box snoRNA domain. LeishTER is expressed at similar levels in the logarithmic and stationary growth phases of promastigote forms. A 5' SL capped LeishTER co-immunoprecipitated and co-localized with the telomerase protein component (TERT) in a cell cycle-dependent manner. Prediction of its secondary structure strongly suggests the existence of a bona fide single-stranded template sequence and a conserved C[U/C]GUCA motif-containing helix II, representing the template boundary element. This study paves the way for further investigations on the biogenesis of parasite TERT ribonucleoproteins (RNPs) and its role in parasite telomere biology.
<b>Order of Authors:</b>	Elton José R. Vasconcelos Vinícius S. Nunes Marcelo Santos da Silva Marcela Segatto Peter J. Myler MARIA ISABEL NOGUEIRA CANO, Ph.D.
<b>Suggested Reviewers:</b>	José Maria Requena Universidad Autónoma de Madrid jmrequena@cbm.uam.es Dr. Requena is an expert in <i>Leishmania</i> spp. molecular and cellular biology  Matt Berriman Wellcome Trust Sanger Institute mb4@sanger.ac.uk Dr. Berriman is an expert in genomics of neglected tropical disease parasites  Miguel A Chiurillo Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, School of Health Sciences in Barquesimeto, Venezuela mchiurillo@ucla.edu.ve Dr. Chiurillo is an expert in telomere biology of trypanosomatids  Maria Teresa Teixeira

## 8.6 Artigo científico: Oxidative stress in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes causes telomere shortening and displacement of LaRPA-1 from 3' G-overhang – resumo (em preparação)

### Oxidative stress in *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes causes telomere shortening and displacement of LaRPA-1 from 3' G-overhang

da Silva, M.S.<sup>1,2</sup>; Segatto, M.<sup>1</sup>; Gutierrez, F.<sup>3</sup>, Bispo, V.<sup>4</sup>, Augusto, L.<sup>5</sup>. Calado, R.T.<sup>3</sup> and Cano, M.I.N.<sup>1</sup>,

<sup>1</sup>Departamento de Genética, UNESP-Botucatu; <sup>2</sup>UNICAMP, Campinas; <sup>3</sup>Laboratório Hematologia, USP, Ribeirão Preto; <sup>4</sup>Departamento de Bioquímica, I.Q., USP; <sup>5</sup>Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, UNIFESP, São Paulo, Brazil.

Leishmaniasis is a spectrum of diseases caused by parasites of the genus *Leishmania* that affects million people around the world. During infection, parasites use different strategies to survive host defenses including overcoming exposure to Reactive Oxygen Species (ROS), mainly responsible for causing DNA damage, especially at telomeres which frequently results in genome instability, senescence and cell death. Telomeres are chromosomes end termini structures composed by repetitive DNA coupled with proteins whose function is to protect chromosome ends and avoid end-fusion and nucleolytic degradation. In this work, we induced acute oxidative stress in promastigote forms of *Leishmania amazonensis* by treating parasites with 2mM hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) for 1 hour, which was able to increase intracellular ROS levels, as demonstrated by CM-H<sub>2</sub>DCFDA reaction. In addition, oxidative stress induced DNA damage, as confirmed by quantitative analysis of 8-oxodG and TUNEL-positive nuclei. We have also observed using qualitative and quantitative parameters (Southern blot, telomere-PCR and flow-FISH) that oxidative stress, as in mammals, induced telomere shortening. Analysing the protein:DNA co-localization and interaction by FISH-IIF and ChIP assays, it was possible to show that oxidative stress is able to induce erosion of the 3'G overhang, inducing a displacement of LaRPA-1 from its telomeric interaction site. In addition, we observed an increase in the affinity between LaRPA-1 and the telomeric C-rich strand, in this case, a single-strand region inside the double-strand telomeric DNA generated probably as a consequence of DNA repair, suggesting the participation of LaRPA-1 in oxidative DNA damage response. Analysis of growth curves and EdU incorporation showed that oxidative stress induced a decrease in the number of parasites in culture, while the survivors continued proliferating and replicating DNA. Moreover, as result of acute oxidative stress, part of the parasites in exponential growth shows a G2/M cell cycle arrest. Taken together, these results suggest the presence of a very efficient oxidative damage response in the telomeres that allows parasites to survive and to replicate DNA even after acute stress.