

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO –
CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE

Da Silveira, Rita de Cássia Viveiros.

Envolvimento da proteína Telomérica Replication Protein A-1 na
resposta a danos nos telômeros de *Leishmania amazonensis* (LaRPA-1)
/ Rita de Cássia Viveiros Da Silveira. – Botucatu : [s.n.], 2011

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de
Biociências de Botucatu

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano

Capes: 20202008

1. Leishmania. 2. Proteínas. 3. DNA.

Palavras-chave: LaRPA-1; Leishmania; Replication Protein A-1;
Telômero.

AGRADECIMENTOS:

Em primeiro lugar gostaria de agradecer a Deus pelas oportunidades obtidas ao longo da minha vida e que, mesmo diante de empecilhos, deu-me força para seguir adiante para que enfim pudesse chegar até este momento especial.

Agradeço toda minha família, a começar pelo meu pai Valdecy e meu avô Manoel, que, mesmo não estando presentes em vida, tenho certeza que sempre estiveram comigo, me guiando, me dando força para seguir em frente. À minha mãe Célia que caminhou ao meu lado, me ergueu em momentos difíceis, sempre me incentivou e fez tudo o que lhe foi possível para me ajudar. Á minha vó Cida, pelo carinho e por tanta ajuda. A minha irmã Thaisa e meu cunhado André que considero um irmão. Enfim, tios, tias, primos que sempre estiveram ao meu lado torcendo por mim.

Agradeço a professora Dr^a. Maria Isabel Cano pela orientação e por proporcionar condições para que eu pudesse desenvolver meu trabalho de doutorado e crescer como pessoa e cientista. Por ter tido paciência, e ter acreditado que eu podia crescer, e continuar me dando a oportunidade de fazer pós doutorado. Agradeço também a todos aqueles que participaram da minha formação como pesquisadora: professora Dr^a. Marília Rodrigues Pereira de Noronha, minha primeira orientadora, e Dr^a. Wilma Ap. Starke-buzetti, minha segunda orientadora, que me ensinou os primeiros passos em um laboratório. Aos colegas de graduação por todo carinho e pelos momentos inesquecíveis que passamos juntos, pela companhia nas madrugadas, estudando na sala 24h da faculdade de engenharia de Ilha Solteira, pela força nos estudos de matérias de exatas, Suelen, Gustavo, Luis Gustavo e Nina. Em especial á minha companheira de república Natália, pelos 5 anos de uma maravilhosa convivência. Aos meus amigos, Flávia, Fernando, Keka, Cecília, Fran, Norberto e Fabinho, por tantos momentos bons que tivemos, e que mesmo a distância continua fazendo parte do meu coração.

Aos meus amigos de Botucatu, os quais hoje considero como se fossem parte da minha família, que me dão força para continuar a árdua caminhada diária e que me proporcionam bons momentos, Portelinha, Jorge, Pança, Limão, Dori, Bruno, Ana Paula, Pit, Alessandra, Jú, Arina, Japa, Sabor, Carol, Pands, D bords, Chups, Girassol, Nikito, Rê (Cumbuca), Panda, entre tantos que não caberia nessa folha. Em especial as amigas de república Spiru, K-toxa, Codorna, Deva, Rafinha e, principalmente, a Fer que além de ter convivido comigo por mais tempo, tornou-se uma irmã querida. A D. Haidê minha mãezona daqui de Botucatu. Aos meus amigos distantes, Vinícius que sempre pude contar com sua ajuda para discutir experimentos e artigos; Erica minha amiga de infância que

me hospeda em sua casa quando vou para São Paulo fazer experimentos e cursos; a Val e o Sadia que proporcionam momentos de descontração e risadas nas horas mais estressantes.

Aos meus amigos e companheiro de laboratório, Arina, Marcelo, Richarlison, Rola, Douglas e Xiba, que tornam o ambiente de trabalho mais leve e prazeroso, além de terem contribuído e muito com este trabalho. Em especial ao Marcelo, sem o qual não teria conseguido as lindas imagens de fluorescência desta tese. E sem esquecer-se do Jomar que sempre vamos lembrar com muita alegria.

A Dr^a. Marjorie do Hemocentro, por me auxiliar no ensaio de citometria de fluxo. Aos amigos do laboratório Biogen. Aos funcionários do departamento de genética, microimunologia, parasitologia, principalmente ao Sr. Roberto, Valdir e Lula por me ajudar cuidar e infectar os ratos e camundongos.

Aos professores Dr^o. Eduardo Bagagli e Dr^o. Fábio F. Conte pelas sugestões e críticas apresentadas na banca prévia e por aceitarem a participar da banca de defesa, assim como a prof. Dr^o. Júlio César Borges e prof^a. Dr. Maria Célia Bertoline.

Agradeço o CNPq por conceder a minha bolsa de doutorado.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	i
AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE ABREVIACÕES	vii
RESUMO	xi
ABSTRACT	xii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Protozoários do gênero <i>Leishmania</i>	1
1.2. Ciclo biológico de parasitas do gênero <i>Leishmania</i> spp	2
1.3. A doença leishmaniose	3
1.4 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	5
1.5. A organização do genoma de parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	6
1.6. O complexo RPA	7
1.7. Características Gerais dos Telômeros	8
1.7.1. Proteínas Ligantes do Telômero	9
1.7.2. Proteínas que interagem com simples-fita telomérica rica em G	9
1.7.3. Proteínas que interagem com dupla-fita telomérica	10
1.7.4. Composição do complexo telomérico e organização de suas proteínas em mamíferos	11
1.7.5. Composição do complexo telomérico e organização de suas proteínas em leveduras	12
1.7.6 O complexo telomérico em <i>Leishmania amazonensis</i>	14
1.8. Função telomérica de componentes do complexo RPA	15
1.8.1. Envolvimento da RPA na resposta a danos no DNA telomérico	17
2. OBJETIVOS	19
3. METODOLOGIA	
3.1. Cultura de Parasitas	20

3.2. Produção de soro policlonal anti-LaRPA-1 em camundongos	21
3.3. Obtenção de extrato proteico total de formas promastigotas	22
3.4. Obtenção de extratos de frações subcelulares (núcleo e citoplasma) de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	22
3.5. Tratamento de extratos nucleares com fosfatase alcalina (CIAP)	23
3.6. Obtenção do IC50 para fleomicina	23
3.6.1. Curvas de crescimento obtidas de promastigotas tratados com diferentes concentrações de fleomicina	23
3.6.2. Teste de exclusão celular utilizando o corante azul de tripan	24
3.7. Tratamento dos parasitas com fleomicina, agente indutor de danos ao DNA	24
3.8. Expressão, renaturação e purificação da proteína recombinante LaRPA-1 obtida a partir de extratos de <i>E. coli</i>	24
3.9. Análise do conteúdo de DNA por Citometria de Fluxo (FACScalibur)	25
3.10. Imunolocalização de proteínas utilizando ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI)	26
3.11. Imunodeteção de proteínas por Western blotting	27
3.12. Sincronização da cultura de parasitas para análise da expressão das proteínas LaRPA-1, Rad51, γ H2Ax, durante o ciclo celular	27
3.13. Preparação de extrato de cromatina	28
3.14. Ensaio de Imunoprecipitação utilizando “Pierce ^R Crosslink immunoprecipitation Kit”	28
3.15. Imunofluorescência Indireta (IFI) combinado com hibridização fluorescente <i>in situ</i> , utilizando sonda telomérica (FISH)	29
3.16. Ensaio de Imunoprecipitação de Cromatina (ChIP)	29

4. RESULTADOS

4.1. LaRPA-1 sofre diferentes níveis de fosforilação durante o crescimento exponencial de formas promastigotas de <i>Leishmania</i> e quando submetida a tratamento com agente genotóxico (fleomicina)	30
4.2. Fleomicina induz parada de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> entre as fases G1/S do ciclo celular	32
4.3. Fleomicina induz danos ao DNA: possível envolvimento de LaRPA-1 e Rad51 na resposta aos danos no DNA	35
4.4. Fleomicina provoca alterações na expressão das proteínas LaRPA-1 e Rad51	39
4.5. A intensidade de fluorescência de LaRPA-1 e RAD51 aumenta durante a fase S do ciclo celular, em parasitas tratados com fleomicina	41

4.6. Maior quantidade de LaRPA-1 se associa ao DNA na presença de fleomicina	44
4.7. LaRPA-1 interage com RAD51 e telomerase, sugerindo possível participação destas proteínas na resposta a danos nos telômeros	46
4.8. LaRPA-1 e RAD51 são recrutadas para os telômeros em parasitas tratados com fleomicina	49
4.8.1 Co-localização da proteína LaRPA-1 e RAD51 nos telômeros quando os parasitas foram tratados com fleomicina	49
4.8.1 LaRPA -1 é recrutada para os telômeros em parasitas tratados com fleomicina	51
5. DISCUSSÃO	55
6. CONCLUSÕES	65
7. REFERÊNCIAS	

LISTA DE ABREVIATÓES

AIDS : Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATM: ataxia telangiectasia mutated

BER: *base excision repair*-

BL21(DE3)RP códon plus: linhagem de bactérias utilizada para hospedar vetores pET-28a(+);

BSA: albumina sérica bovina

CDC13: proteína ciclo de divisão celular ("cell division cycle 13")

Cdk :ciclina dependente kinase

ChIP :imunoprecipitação da cromatina

Ciap: fosfatase alcalina

CST: complexo hetero trimérico (CDC13, Stn1, Ten1)

Ctc-1: (*Conserved Telomere maintenance Component 1*)

DMSO: dimetilsulfóxido

DNA: ácido desoxirribonucléico

DNA-PKcs : DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit

DNase: desoxirribonuclease A

DSB- quebra de dupla fita de DNA

DTT: 1,4-ditiotreitol

E. coli: Escherichia coli

EDTA: ácido etileno diamino tetracético

ELISA: "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"

Est1: "ever short telomeres 1"

EtOH: etanol

FISH:hidridização fluorescente in situ

Fleo: Fleomicina

Hepes: ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfônico

γ H2Ax: histona H2A fosforilada

HU: hidroxiuréia

IC₅₀: concentração de droga capaz de provocar a morte em 50% dos indivíduos

IFI: imunofluorescência indireta

IP : imunoprecipitação

IP buffer: Tampão de imunoprecipitação

IPTG: isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

kDa: quilo Daltons

kDNA: DNA mitocondrial de Kinetoplastida (“kinetoplast DNA”)

LaRBP38: *Leishmania amazonensis* “RNA binding protein”

LaRPA-1: *Leishmania amazonensis* “replication protein” A-1

LaTBP1 : *Leishmania amazonensis telomere binding protein 1*”;

LaTel : seqüência de DNA dupla fita utilizada nos ensaios de EMSA

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

LTA: leishmaniose tegumentar americana

Mb: mega pares de base

MMR:*mismatch repair*

MMs: methyl methanesulfonate

MRN: complexo Mre11, Rad50 and Nbs1

mRNA: RNA mensageiro

MTT: 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide Mre11 meiotic recombination

Mre11: homolog A 11 (*S. cerevisiae*)

Nbs1: Nijmegen breakage syndrome 1

NHEJ: non-homologous end joining

NP-40: nonidet P-40

Nt: nucleotídeo

NER: *nucleotide excision repair*

OB-fold: "Oligonucleotide-oligosaccharide-binding fold"

OD: densidade óptica

OMS: Organização Mundial da Saúde

pb: par de bases

PBS: solução salina tamponada com fosfato

PCR: reação em cadeia da polimerase

peptide" nucleic acid (PNA)

pET-28a(+): vetor utilizado para expressão de proteínas heterólogas em bactérias *Escherichia coli*

POT1: proteína protetora dos telômeros ("protection of telomeres 1")

RAD 51: Recombinase homólogo de RecA de *E.coli*

RAP1: Receptor associated protein 1

RAP1: Repressor activator protein 1"

RBP38: "RNA binding protein 38"

RFA 1: "Replication factor 1" (subunidade 1 da proteína RPA)

RFA 2: "Replication factor 2" (subunidade 2 da proteína RPA)

RFLP: "restriction fragment length polymorphism")

RIF 1-2: "RAP-1 interacting factors 1-2"

RNA: ácido ribonucléico

RNase A: ribonuclease A

RPA: proteína de replicação A ("replication protein A")

RPA-1: proteína de replicação A-1 (subunidade 1)

RPA-2: proteína de replicação A-2 (subunidade 2)

RPA-3: proteína de replicação A-3 (subunidade 3)

rRNA: RNA ribossômico

SDS: dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Loading buffer: Tampão para correr amsotra de gel SDS-PAGE

SDS-PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

ATR: serine/threonine-protein kinase

SIR: proteína silenciadora e repressora

T.A.: temperatura ambiente

TE: tampão Tris - EDTA

TEP: "telomere end proteins"

TERT: componente protéico da telomerase ("telomerase reverse transcriptase")

TIN2: "TRF2 interacting factor 2"

T-loop: loop do telômero

TRF (1-2): "telomere repeat factor 1-2"

Tris: tris: hidroximetilaminometano

UV: ultravioleta

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-tiogalactopiranosídeo

XPF-ERCC1: Xeroderma Pigmentosum, complementation group F and Excision Repair Cross-Complementing

Resumo

Telômeros são complexos nucleoprotéicos nas extremidades dos cromossomos eucariotos. Consistem em sequências curtas repetidas em *tandem*, ricas em Guanina e na maioria dos eucariotos terminam em uma protrusão 3' simples-fita denominada "3' G-overhang". Estas estruturas terminais são responsáveis pela estabilidade do genoma, impedindo fusões e degradações por mecanismos de reparo celular. A replicação dos terminais dos cromossomos lineares é facilitada pela telomerase. A cromatina telomérica é composta por proteínas que se associam a dupla-fita telomérica e outras que se associam à região simples-fita e são denominadas membros da família TEP (*telomere end proteins*). Estas proteínas são responsáveis pela manutenção e alongação do comprimento dos telômeros, regulando o acesso e atividade da telomerase. A proteína RPA faz parte de um complexo de proteínas que se associam ao DNA na forma de simples fita. Estas proteínas estão envolvidas em vários eventos do metabolismo do DNA, incluindo reparo a danos, manutenção dos telômeros, entre outras funções. Em *Leishmania* spp., a subunidade RPA-1 (LaRPA-1) se associa e co-localiza *in vivo* nos telômeros. Em leveduras e humanos, a RPA também participa do recrutamento da telomerase e funciona como um sensor a danos ao DNA telomérico. Essa resposta ao dano expõe a simples-fita do DNA provocando a fosforilação de RPA através de proteínas quinases do tipo Mec1 em leveduras (ou ATR/ATM quinases em mamíferos), e do recrutamento para os telômeros da proteína CDC13 e proteínas do grupo epistático RAD52 para reparar os danos. Neste trabalho procurou-se determinar se em *Leishmania* a RPA-1 também está envolvida na resposta ao dano nos telômeros. Nossos primeiros resultados mostram que mesmo em elevadas doses de agente causador de dano no DNA, a fleomicina, o qual sabidamente que induz quebra no DNA na forma de dupla-fita (DSBs), não foi capaz de matar formas promastigotas de *L. amazonensis*. Em contraste, em doses abaixo do IC50, a droga induziu parada no ciclo celular na fase G1/S e levou a um processo rápido de recrutamento do sensor universal de quebra de DNA em dupla fita, a histona fosforilada γ H2Ax, seguido do acúmulo de RAD51 no núcleo desses parasitas. Nessas condições experimentais também se observaram leves alterações nos níveis de LaRPA-1 no núcleo dos parasitas tratados, quando se comparou aos controles. Assim como, em extratos nucleares de células não sincronizadas foi observado um leve aumento nos níveis de LaRPA-1 e RAD51 sugerindo que ocorreu provável resposta ao dano provocado no DNA. Em células sincronizadas com hidroxauréia, foi possível observar que a fleomicina induziu um acúmulo de LaRPA-1 e RAD51 no núcleo dos parasitas na fase S do ciclo celular, concordando com seus respectivos papéis de sinalizar e reparar o dano. Isto foi acompanhado por um aumento gradual na quantidade de LaRPA-1 ligada a cromatina. Além disso, danos induzidos pela fleomicina levaram ao recrutamento de LaRPA-1 e ao aparecimento de alguns focos de DNA telomérico associados com RAD51, sugerindo a formação de TIFs ("telomere-dysfunction induced foci"). Também foi possível detectar que durante o tratamento a LaRPA-1 forma complexos com a RAD51 e a telomerase, e maior quantidade de LaRPA-1 associada *in vivo* à fita telomérica rica em G, em comparação a fita telomérica rica em C. Isto sugere que em *Leishmania* spp., a presença de LaRPA-1 pode evitar perdas da simples-fita rica em G no DNA telomérico, e também provocar a ativação de uma resposta local.

Abstract

Telomeres are nucleoprotein complexes present at the termini of eukaryotic chromosomes. They consist of short tandem repeats of the canonical TTAGGG sequence forming a 3' G-overhang protrusion towards the end of the chromosome. Telomeres are responsible for genome stability and protect chromosome ends against degradation, fusion, recombination and recognition by the DNA damage machinery. They also facilitate the replication of the ends of linear chromosomes by telomerase. The telomeric chromatin is composed by proteins that bind the double-stranded and the single-stranded DNA. The latter are known as TEP, or telomere end protein, responsible for telomere capping and the maintenance of telomere length by regulating telomerase accessment and activity.

Replication protein A is a complex of single-stranded DNA-binding proteins implicated in many aspects of DNA metabolism, including DNA repair, recombination and telomere maintenance among other functions. In *Leishmania* the subunit RPA-1 (LaRPA-1) binds and co-localizes in vivo with telomeres. In yeast and humans telomeres, RPA also works as a telomerase recruiter and as a DNA damage sensor. The telomere damage response in yeast, expose ssDNA triggering RPA phosphorylation by Mec1 (ATR/ATM kinase homologue) and the recruitment of the telomere end protein CDC13 and proteins from the RAD52 epistasis group that would repair damage.

We intended to determine if in *Leishmania*, RPA-1 is also involved in telomere damage response. Our first results showed that even high doses of the DNA-damaging agent phleomycin, which is known to induce DNA DSBs producing a large number of DNA breaks, were unable to kill *L. mazonensis* promastigotes. In contrast, low doses of the drug induced G1/S cell cycle arrest and triggered a rapid recruitment of the DNA damage sensor histone gamma-H2Ax followed by a gradual accumulation of RAD51 in the nucleus of the parasites and an increase of LaRpa-1 fluorescence after 1h of drug treatment. A slightly increase in the levels of LaRPA-1 and RAD51 was also observed in nuclear extracts obtained from non-synchronized parasites after phleomycin treatment, suggesting that it occurred probably in response to DNA damage. In hydroxyurea-treated cells, it was more visible that phleomycin induced nuclear accumulation of both LaRPA-1 and RAD51 at S phase in concordance with their roles in signaling and repair damage. This was accompanied by a gradual increase in the amount of LaRPA-1 bound to chromatin. Moreover, upon phleomycin-induced damage, LaRPA-1 associated with RAD51 and telomerase, more LaRPA-1 was associated with telomeres and a few foci of RAD51 bound to telomeres was also detected, suggesting that phleomycin treatment lead to the formation of telomere-dysfunction induced foci. We could also detect that in vivo, more LaRPA-1 associated earlier with the G-rich telomeric strand, compared with the C-rich telomeric strand. This suggested that in *Leishmania* spp., the presence of LaRPA-1 may prevent loss of single-stranded telomeric DNA, and also elicit activation of a local response.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Protozoários do gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* compreende protozoários parasitas da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, e são caracterizados pela presença do cinetoplasto, que é uma organela especial bastante peculiar, apresentando morfologia fusiforme e sendo rica em DNA mitocondrial (kDNA) (SIMPSON, 1987). Atualmente, o gênero *Leishmania* é classificado em 3 sub-complexos: complexo *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania donovani*. Essa classificação baseia-se em características clínicas e epidemiológicas, apoiada por aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares (WHO, 1990). A *Leishmania* é um protozoário pleomórfico, que se reproduz por divisão binária, com um ciclo de vida digenético (heteroxênico), vivendo alternadamente em hospedeiros vertebrados e insetos vetores, estes últimos sendo responsáveis pela transmissão dos parasitas de um mamífero a outro (BASU; RAY, 2005;). As formas de reprodução são a amastigota (vertebrado) e promastigota (invertebrado) (Rev.SAÚDE SAÚDE, 2011). A transmissão é feita por insetos hematófagos flebotomíneos da família *Psychodidae* (mosquito palha, birigui ou tatuquiras), mais especificamente espécies dos gêneros *Lutzomyia* (Novo Mundo) e *Phlebotomus* (Velho Mundo). No Novo Mundo, são reconhecidas oito espécies de *Leishmanias* responsáveis pela doença no homem (GRIMALDI, et al, 1989), pertencentes ao subgênero *Viannia* (V) e *Leishmania* (L). A "*Leishmania (L) amazonensis*" (LAINSON; SHAW, 1972), objeto deste estudo, causa lesões cutâneas e eventualmente difusas (anérgicas) e ocorre desde a América Central até o norte, nordeste e sudeste da América do Sul. Os hospedeiros vertebrados são animais silvestres (roedores, gambá, tamanduá, tatu, canídeos, primatas e preguiça), animais domésticos (cães e equídeos); e o homem (NEVES, 2000; REY, 2001). Os reservatórios representam a principal fonte de infecção dos flebotomíneos que posteriormente transmitirão a doença ao homem. O cão doméstico é considerado o reservatório epidemiologicamente mais

importante para a leishmaniose visceral americana, causando a doença em outros cães e até mesmo no homem (MENDONÇA, 2010). Nos reservatórios silvestres, a infecção tende a ser benigna, tendendo para o equilíbrio da relação parasito-hospedeiro, sendo que muitas vezes a infecção é inaparente. Estabeleceu-se o conceito de que nestes hospedeiros ocorre um grande equilíbrio por ser uma associação muito antiga entre o parasito e o hospedeiro, enquanto que no caso do homem e animais domésticos esta associação é muito mais recente (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2011).

Neste último caso o parasito aparece como virulento, provocando grandes danos ao hospedeiro e levando até mesmo à morte (FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ, 2011).

1.2. Ciclo biológico de parasitas do gênero *Leishmania* spp.

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 (probóscide), que as injeta no hospedeiro durante a hematofagia (BASU; RAY, 2005).

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

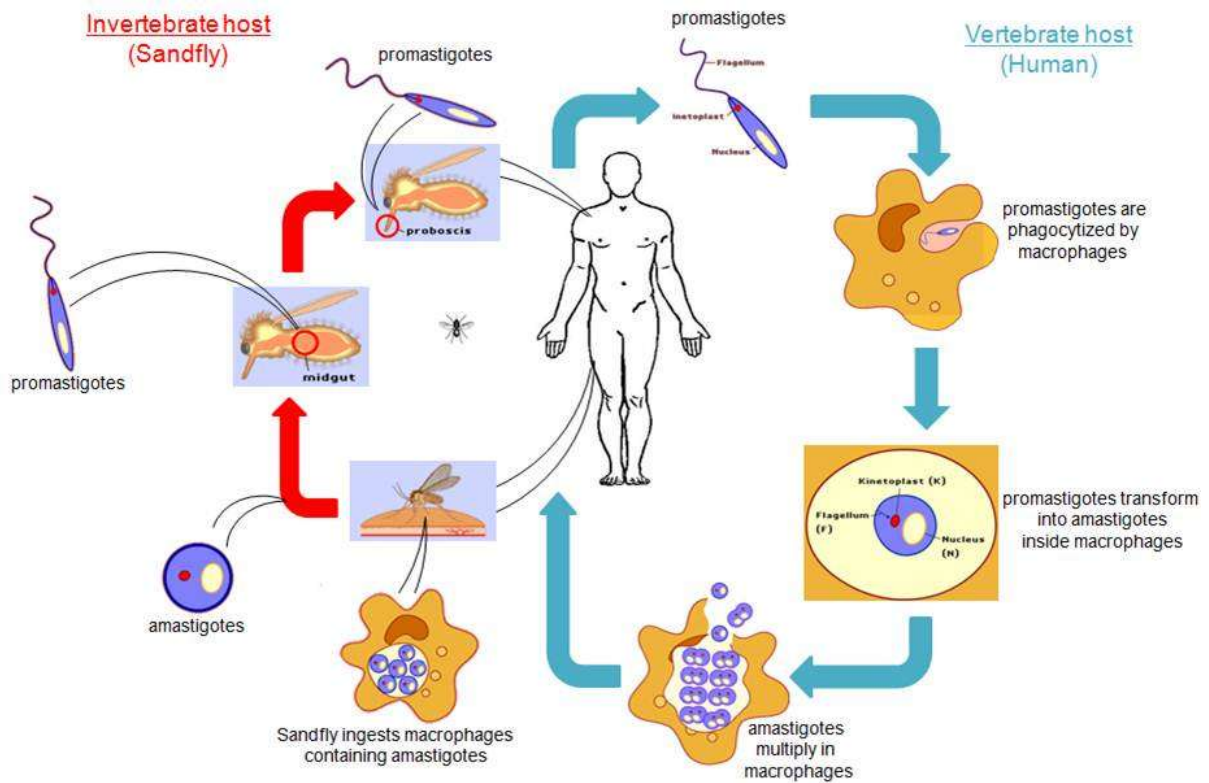


Figura 1. Ciclo biológico de *L. amazonensis*: imagens bi e tridimensionais de amostras fixadas no interior do inseto vetor (*Lutzomia*) e em reservatório natural (*Proechymis spp.*). (a) Promastigotas procíclicos no trato digestivo médio do inseto. (b) Promastigotas metacíclicos no trato digestivo anterior. (c) Promastigotas metacíclicos. (d, e, f, h, i) Macrófagos infectados. (g) Célula dendrítica infectada. (e, f) Promastigotas no fagossomo minutos após fagocitose. (f, h, i) Formação do vacúolo digestivo onde ocorre a transformação dos promastigotas metacíclicos em amastigotas e proliferação dos parasitas (LANG et al., 2009).

1.3. A doença Leishmaniose

Leishmanioses são zoonoses consideradas grandes problemas de saúde pública. Essa enfermidade pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie envolvida e da relação do parasita com o hospedeiro (LOPES, 2006). A leishmaniose mucocutânea ou cutâneo-mucosa apresenta formas que se complicam frequentemente com o aparecimento de lesões destrutivas nas mucosas do nariz, boca e faringe; as leishmanioses cutâneas produzem exclusivamente lesões cutâneas, ulcerosas ou não, porém restritas, a leishmaniose cutânea difusa com formas disseminadas cutâneas que se apresentam em indivíduos anérgicos ou, tardiamente, em

pacientes que haviam sido tratados anteriormente de Leishmaniose visceral, também denominada com calazar; a leishmaniose visceral ou calazar são formas viscerais em que os parasitas apresentam acentuado tropismo pelo sistema fagocítico mononuclear (SFM) do baço, do fígado e da medula óssea e dos tecidos linfóides (REY, 2002).

A leishmaniose é comum em regiões tropicais e, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 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, 2000).

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.

Um problema grave de saúde pública é o caso de co-infecção com o vírus HIV (CRUZ et al., 2006). Nesta situação onde o paciente se encontra imunodeprimido, a manifestação da leishmaniose se dá de forma muito mais agressiva e severa (PISCOPO; MALLIA, 2006). Mais de 2000 casos de co-infecção em 34 países foram notificados pela OMS. A OMS estima que 2 a 9% dos pacientes com o vírus HIV no Sudeste da Europa irão desenvolver leishmaniose visceral. Desde 1987 foram registrados dezenas de casos de co-infecção no Brasil. As leishmanioses podem modificar a progressão da doença pelo HIV, e a imunodepressão causada por este vírus facilita a progressão da doença (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004).

No Brasil, os medicamentos empregados no tratamento da leishmaniose visceral em humanos são os antimoniais pentavalentes e a anfotericina B (desoxicolato e lipossomal) (ALVAR J, CANAVATE C, GUTIERREZ-SOLAR B et al., 1997). A anfotericina B é a única opção no tratamento de gestantes e está indicada como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou tenham apresentado toxicidade ao uso dos antimoniais (BRASIL, 2006). Estes fármacos podem causar graves efeitos colaterais nos pacientes, como dores musculares e alterações nos batimentos

cardíacos, sendo que a anfotericina B lipossomal apresenta menor toxicidade, porém seu custo é elevado, dificultando seu uso em saúde pública (BRASIL. MINISTÉRIO, 2006). A chamada Leishvacin é uma vacina anti-leishmaniose, mas não é produzida em escala comercial, somente para a realizações de ensaios clínicos (MINAS FAZ CIÊNCIAS, 2008).

Os protocolos terapêuticos para cães no Brasil têm sido avaliados durante os últimos 4 anos, mas o tratamento de cães infectados não é recomendado devido ao risco potencial para a saúde pública (HOLLAND et al., 2008). Além disso, o prognóstico de cura da doença é muito reservado, podendo ocorrer recidivas (BARR, 2005). Em 2003, o uso da vacina para prevenção da leishmaniose foi liberada pelo Ministério da Agricultura, porém o Ministério da Saúde, responsável pelo controle da leishmaniose, ainda não autorizou seu uso como medida de proteção em massa (ZORZETTO, 2008). Desta forma, torna-se imprescindível a busca de novas ferramentas que contribuam de forma determinante e efetiva no combate e erradicação da mesma.

1.4. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

O parasita alvo deste estudo é o parasita *L. amazonensis*, agente causal da leishmaniose cutânea e cutânea difusa no Brasil, porém, em algumas regiões, este parasita aparece como agente causal de todo o espectro da leishmaniose (BARRAL et al., 1991). A doença LTA constitui um crescente problema de saúde pública. Sua importância levou a OMS a incluí-la entre as seis doenças infecciosas e parasitárias mais importante, pela sua ampla distribuição geográfica e também pelo número de pessoas atingidas anualmente (BASANO; CAMARGO, 2004), no entanto, mesmo essa doença sendo de grande importância epidemiológica, é considerada uma doença negligenciada, assim como todo o complexo de doenças provocadas por espécies de *leishmania*. Essas doenças são ignoradas pelas grandes indústrias farmacêuticas, isso se explica por elas atingirem majoritariamente as populações menos favorecidas. Desse modo, devido ao baixo poder aquisitivo dos doentes e em virtude dos recursos escassos dos países onde normalmente essas moléstias acontecem, a produção de remédios para enfrentá-las não geraria um lucro satisfatório para a iniciativa privada. Esse complexo de doenças leishmanioses também são relativamente pouco

conhecidas pela população em geral, assim como pelos profissionais de saúde, assim agravando o quadro (MENDONÇA, 2010). Estima-se que setenta e cinco por cento de todos os casos clínicos de leishmaniose, distribuídos por vários continentes, é do tipo cutânea, e os vinte e cinco por cento restantes são de casos de leishmaniose visceral (KAYE; BLACKWELLI, 2008). A doença tem ampla distribuição geográfica, encontrando-se por toda bacia amazônica, além de estados como Maranhão, Ceará, Bahia, Minas Gerais e Espírito Santo (NEVES, 2000; REY, 2002).

As medidas de controle preconizadas pelo Ministério da Saúde não tem sido totalmente efetivas, as doenças transmitidas por vetores biológicos associados a reservatórios domésticos e a aspectos ambientais são de difícil controle, quando aliado ao recente processo de urbanização da doença, o que promove conhecimento epidemiológico inadequado da doença nesses focos. O objetivo do controle das leishmanioses é interromper a cadeia de transmissão nos diferentes níveis. O Ministério da Saúde preconiza o diagnóstico precoce e o tratamento do paciente humano e a redução do contato homem-vetor através do uso de telas, mosquiteiros, repelentes tópicos e borrifação ambiental, além da identificação e eliminação do reservatório doméstico em áreas de leishmaniose (ALMEIDA, 2009.) Diante desta realidade, um maior conhecimento sobre a biologia celular e molecular destes protozoários poderá facilitar o descobrimento de novos alvos parasita-específicos para o desenvolvimento de vacinas e fármacos eficazes para a erradicação da doença.

1.5. A Organização do genoma de parasitas do gênero *Leishmania*

Leishmanias são organismos diplóides, assexuados, cujo genoma difere dos genomas típicos de eucariotos. Seu genoma nuclear contém aproximadamente 70 Mb 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. Os genomas das espécies do gênero *Leishmania*

são muito similares entre si e está organizado 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 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 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 e talvez o genoma do hospedeiro infectado tenha um papel importante nas manifestações clínicas da doença (PEACOCK et al., 2007).

1.6. O complexo protéico RPA

O complexo “Replication Protein A” (RPA) é uma proteína ligante de simples-fita de DNA, conservada na escala evolutiva entre organismos eucariotos. Ela é composta por 3 subunidades RPA1, RPA2 e RPA3 que interagem formando um complexo heterotrimérico. A proteína RPA apresenta funções essenciais, além disso, participa nos diferentes eventos do metabolismo do DNA, fazendo parte das maquinarias de replicação, reparo, recombinação, “checkpoints”, transcrição (LONGHESE et al., 1994, WOLD, 1997, SMITH et al., 2000), e regulação dos telômeros (SMITH et al., 2000, SCHRAMKE et al., 2004, KIBE et al., 2007, KOBAYASHI et al., 2010), sendo por tudo isso uma proteína chave para a coordenação do metabolismo de DNA nas células eucarióticas. A

subunidade 1 (RPA-1) apresenta 4 domínios de ligação ao DNA e a proteínas do tipo Oligonucleotides- oligosaccharide- binding fold (OB fold) (RPA1-70N, RPA1-A, RPA1-B e RPA1-C) de interação com o DNA (WOLD, 1997). O domínio RPA1-70N estimula a atividade da DNA polimerase alfa, interage com diversos ativadores de transcrição, incluindo o supressor de tumor p53 e ainda interage com proteínas das maquinarias de reparo, replicação e de “checkpoint” de dano ao DNA durante o ciclo celular (JACOBS et al., 1999). Os domínios Ob fold RPA1A e RPA1B interagem com a DNA simples fita (BOCHKAREVA et al., 2001). A Fig 2. traz uma representação estrutural da interação do domínio RPA1-A com uma fita de DNAsf. O domínio Ob fold RPA1C é necessário na trimerização da proteína e possui um domínio de ligação ao zinco (BOCHKAREVA et al., 2002).

A subunidade RPA-2 contém domínios Ob fold RPA-2D e RPA2-32C. O domínio Ob fold RPA2-D está envolvido na trimerização e onde se encontra o sítio de fosforilação, necessário para a função de recombinação, reparo e sinalização a danos no DNA. A RPA 3 ainda é pouco estudada, mas acredita-se que também executa um papel na trimerização (BOCHKAREVA ; BOCHKAREVA, 2004). Assim como observa-se em vários protozoários a RPA-1 de *Leishmania* (SIQUEIRA NETO et al., 2007), *Crithidia fasciculata* (BROWN et al., 1992), *Cryptosporidium parvum* (ZHU et al., 2000) e *Plasmodium falciparum* (VOSS et al., 2002), não possuem o domínio RPA-70 N. Visto que este domínio é responsável por formar complexos com outras proteínas, como as das maquinarias de reparo, recombinação e transcrição (JACOBS et al., 1999), especula-se de que forma nestes parasitas, a proteína RPA interage com proteínas destas maquinarias. Esta diferença sugere que nestes grupos de protozoários, a proteína RPA-1 pode atuar de forma diferente dos demais eucariotos e por isso, neste trabalho procuraremos testar essa hipótese buscando entre as proteínas parceiras da LaRPA-1, proteínas, por exemplo, da maquinaria de reparo de DNA.

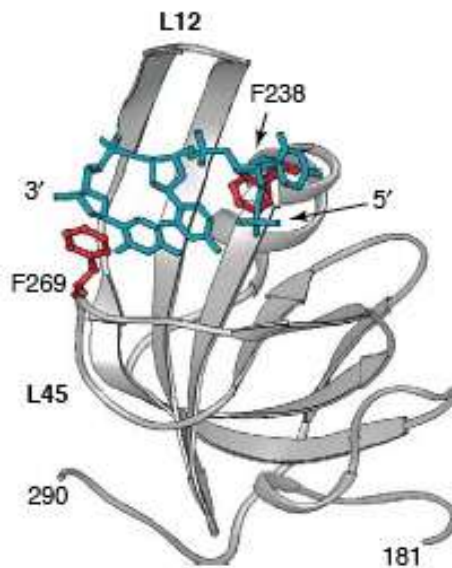


Figura 2: Interação do domínio OB fold da proteína RPA com o DNAsf. Estrutura do domínio RPA DBD-A interagindo com um DNAsf, destacando em vermelho os resíduos responsáveis pela interação. *Fonte: Bochkarev & Bochkareva, 2004*

1.7. Características Gerais dos Telômeros

Os telômeros são complexos nucleoprotéicos localizados nas extremidades dos cromossomos. Hermann Muller (1967) e Bárbara Mc Clintock (1992) foram os pioneiros a definir os telômeros como estruturas funcionais que protegem os terminais cromossômicos, impedindo a fusão dos terminais cromossômicos e a sua degradação pela maquinaria de reparo (CANO, 2006). Usualmente consistem em sequências repetidas em tandem, ricas em Guanina e na maioria dos eucariotos terminam em uma protrusão 3' simples fita denominada "3' G-overhang", que é substrato para a elongação dos telômeros pela telomerase (KLOBUTCHER et al, 1981; HENDERSON ;BLACKBURN, 1993; BLACKBURN, 2001) e para a interação de proteínas teloméricas envolvidas na manutenção do tamanho e proteção dos terminais cromossômicos (FERNÁNDEZ et al., 2004; EVANS; LUNDBLAD, 2000; SMOGORZEWSKA; de LANGE, 2004). Na maioria dos organismos, a telomerase é responsável pela replicação e manutenção telomérica.

Em humanos, protozoários ciliados e *T. brucei* esses terminais de cromossomos podem adquirir estruturas em forma de laço, denominadas t-loop, as quais parecem proteger a

extremidade dos telômeros contra a maquinaria de reparo da célula e impedir o acesso da telomerase ao terminal dos cromossomos alongados (GRIFFITH et al., 1999; MUÑOZ-JORDÁN et al., 2001).

1.7.1. Proteínas Ligantes dos Telômeros

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; LANSDORP, 2008). Estes complexos protéicos são dinâmicos, podendo variar de acordo com o ciclo celular, idade da célula e estímulos externos (STEWART; WEINBERG, 2002; SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004). Proteínas teloméricas podem ter associação diretamente 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 (SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004, DE LANGE, 2005). As funções destas proteínas teloméricas variam, mas parecem estar associadas à região do telômero com a qual elas interagem. Esses complexos protéicos podem se associar à fita simples do DNA telomérico participando no recrutamento da telomerase e influenciando na alongação telomérica, ou se associam à fita dupla participando da manutenção do *t-loop* e regulando a telomerase negativamente (DE LANGE, 2005; AUBERT; LANDSORP, 2008).

1.7.2. Proteínas que interagem com a simples-fita telomérica rica em G

As principais proteínas que se ligam somente à região simples-fita telomérica, são as proteínas membros da família TEP (*telomere end proteins*), que inclui as proteínas CDC13 (“*cell division cycle 3*”) de *S. cerevisiae*, a POT1 de vertebrados, plantas, protozoários ciliados e *S. pombe* e a TEBP (“*telomere end binding protein*”) de *Oxytricha nova* (CROY; WUTTKE, 2006). A CDC13 é a proteína responsável pela proteção da simples-fita telomérica de *S. cerevisiae* (NUGENT et al, 1996, ANDERSON et al., 2002, LIN; ZAKIAN, 1996). Nestes organismos a dupla fita do DNA telomérico é coberta por proteínas Rap1, que interagem com Rif1 e Rif2 (*Rap1 interacting factors 1 and 2*), as quais controlam negativamente a ação da telomerase, na fita simples do DNA telomérico as proteínas

Stn1 e Ten1, que interagem com CDC13, são importantes na regulação do tamanho dos telômeros, e apresentam similaridade com duas subunidades da proteína RPA (“replication protein A”, subunidades RPA-2 e RPA-3), atuando como regulador positivo da elongação telomérica, além de que resultados sugerem que a CDC13 recruta a telomerase ao terminal cromossômico via sua subunidade Est1 (“ever short telomeres 1”) (EVANS; LUNDBLAD, 1999, BIANCHI et al., 2004, TAGGART et al., 2002, SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004), sugerindo um mecanismo sinérgico entre RPA e CDC13 (SCHRAMKE et al., 2004). CDC13 também participa na replicação do DNA (BIANCHI; SHORE, 2007) e ainda pode impedir o acesso da telomerase ao terminal telomérico por um mecanismo ainda pouco conhecido (CHANDRA et al, 2001), atuando como reguladora negativa da elongação telomérica.

A proteína POT1, assim como outros membros da família TEP, também apresenta papel importante na proteção dos telômeros e regulação do tamanho destes, e é essencial para a proliferação celular. Por sua interação com a proteína TPP1 é capaz de recrutar a telomerase para o terminal telomérico aumentando a processividade da enzima (XIN et al., 2007, WANG et al., 2007). POT1 de humanos (hPot1) é capaz de favorecer a formação da estrutura de G-quadruplex (Fig.3) nos terminais teloméricos *in vitro* de forma semelhante ao complexo ternário TEBP (ZAUG et al., 2005). Esta atividade ainda não foi comprovada *in vivo*, hPOT1 ainda regula a atividade de nucleases na fita telomérica rica em “C”.

A TEBP (“telomere end-binding protein”) é mais uma proteína da família TEP, ela apresenta duas subunidades básicas (α e β) (PRICE; CECH, 1987, GOTTSCHLING; ZAKIAN, 1986, PRICE; CECH, 1989, FANG; CECH, 1993), que formam um dos dois complexos dimericos: TEBP- $\alpha\beta$ ou TEBP- α_2 (GRAY et al., 1991; FANG; CECH, 1993; RAGHURAMAN et al., 1989) com a fita telomérica rica em G. Esse complexo está envolvido com a proliferação celular, proteção do DNA contra ataques de nucleases

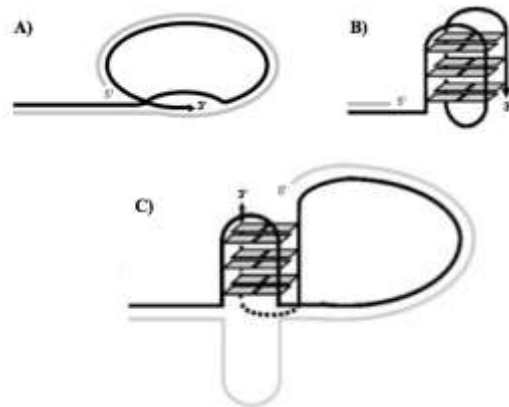


Figura 3: Representação esquemática das estruturas dos terminais teloméricos. Em A) está representado o T-loop, demonstrando o terminal 3' simples-fita invadindo a dupla-fita formando uma estrutura de loop. Em B) está representada a estrutura de G-quadruplex formada por 3 quartetos de interação entre guaninas na simples-fita telomérica. C) Figura apresentando um possível modelo de estrutura do terminal telomérico conforme se espera *in vivo*, com formação de T-loop e G-quadruplex. As orientações das terminações 5' e 3' estão indicadas nos esquemas. *Figura adaptada de Oganessian & Brian, 2007.*

1.7.3. Proteínas que interagem com a dupla-fita telomérica

Os complexos protéicos que se associam à fita dupla estão envolvidos na manutenção do *t-loop* e regulam a telomerase negativamente (DE LANGE, 2005; AUBERT; LANDSORP, 2008). A proteína Rap1 (“repressor activator protein 1”) nas leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Kluyveromyces lactis*, Taz1 (“telomere associated in *Schyzosaccharomyces pombe*”) em *S. pombe* e seus ortólogos TRF1 e TRF2 (“TTAGGG telomere repeat binding factor 1 and 2”) encontrados em humanos, plantas e protozoários (HUNG; LINGNER, 2006) são homólogos funcionais e se associam à região dupla-fita do DNA. Um dos mecanismos de proteção do telômero é feito através da associação de RAP1 com as proteínas RIF e SIR (WOTTON; SHORE, 1997; MORSE, 2000; DMITRIEV et al, 2003). A proteína humana TRF1 está diretamente relacionada à regulação do tamanho do telômero e ao controle do ciclo celular (VAN STEENSEL et al., 1998, SMITH; DE LANGE, 2000, SMOGORZEWSKA et al., 2000) enquanto TRF2 protege as extremidades teloméricas

contra a maquinaria de reparo, e tem sido associada com outra importante característica estrutural dos telômeros, o “t-loop” (DE LANGE, 2002, GRIFFITH et al., 1999).

1.7.4. Composição do complexo telomérico e organização de suas proteínas em mamíferos

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, escudo) (LIU, et al. 2004; DE LANGE, 2005). As principais proteínas integrantes deste complexo são TRF1, TRF2 e POT1 (“protection of telomeres”), que interagem diretamente com o DNA telomérico e suas proteínas associadas: TIN2 (“TRF1 interacting factor2”), TPP1 (TFRs and POT1 interacting factor”) e RAP1. TIN2 desempenha um papel chave no complexo recrutando TPP1/POT1 para TRF1 e TRF2 além de ser responsável por estabelecer a interação direta entre TRF1 e TRF2, contribuindo para a estabilização de TRF2 nos telômeros (LIU et al., 2004, YE et al., 2004). TPP1 interage tanto com POT1 quanto com TIN2 através de um domínio do tipo OB fold e forma heterodímeros com POT1, recrutando POT1 para os telômeros (GILSON; GELLI, 2007).

Essas proteínas atuam de forma dinâmica e desempenham papéis importantes para manter a estabilidade e o funcionamento das extremidades cromossômicas (DE LANGE, 2005). Essas proteínas 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 4 apresenta uma representação esquemática da dinâmica de atuação do complexo *shelterin* em humanos.

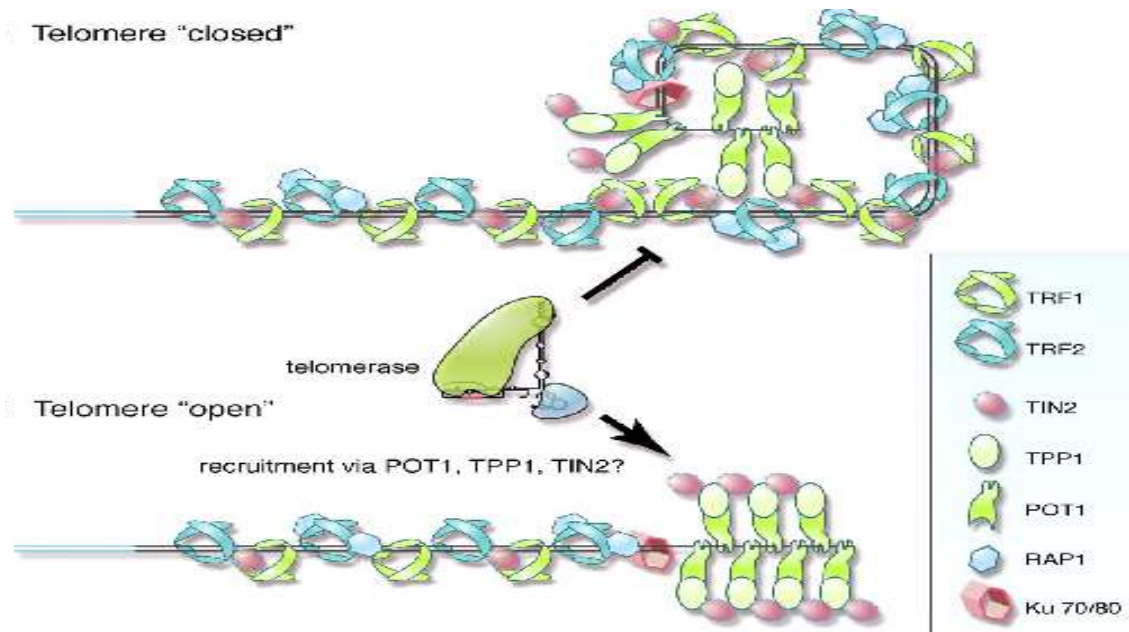


Figura 4. Complexo *shelterin* de humanos. A cromatina telomérica de mamíferos contém uma série de proteínas que interagem com DNA. Na forma de *t-loop* (telômero fechado) ou forma não-replicativa, as proteínas TPP1 e POT1 formam um complexo com o DNA telomérico via TIN2 e TRF1/2 e a telomerase tem seu acesso bloqueado aos telômeros. Na forma aberta ou forma replicativa, o complexo TPP1/POT1 recruta e estimula a atividade enzimática da telomerase em telômeros curtos (AUBERT; LANSDORP, 2008).

1.7.5. Composição do complexo telomérico e organização de suas proteínas em leveduras

Em leveduras um complexo recentemente denominado CST composto pelas proteínas CDC13, Stn1 e Ten1 funciona como regulador da atividade de telomerase (WELLINGER, 2009; GAO et al., 2007; SUN et al., 2009) (Fig.5A). As proteínas que compõem CST são consideradas proteínas *RPA-like*, pois compartilham alta semelhança com os componentes do complexo heterotrimérico RPA (*“replication protein A”*, subunidades RPA-1 RPA-2 e RPA-3), por conter domínios do tipo OB-fold de interação ao DNA telomérico simples fita rico em G (MIYAKE et al., 2009; SUN, et al., 2009; Wellinger, 2009). Além disso, partes da proteína Stn1 podem substituir funcionalmente a subunidade 2 da RPA, adicionando a idéia da existência de duas RPAs diferentes ou da presença de uma RPA telomérica em leveduras (GAO, 2007). O complexo CST pode interagir com DNA polimerase alfa e com a telomerase (TERT), e orquestrar a síntese de ambas as fitas teloméricas (WELLINGER, 2009) e ainda funciona independentemente de POT1 (Fig.5B), sendo que, a proteína CDC13, a semelhança de POT1 tem alta afinidade pela sequência telomérica rica em G (LIN; ZAKIAN, 1996).

A)

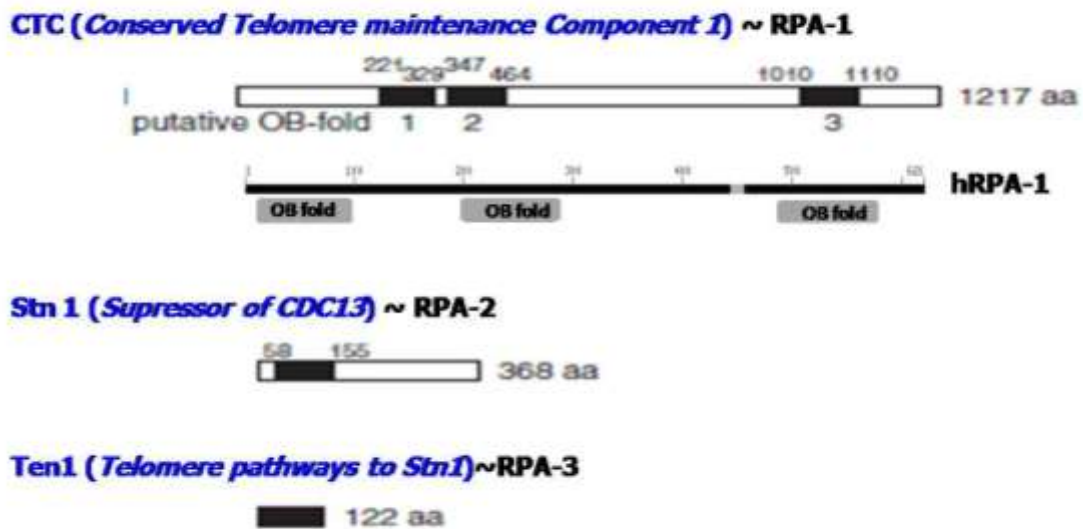


Fig.5 A. Estrutura de hCtc1, hStn1 e hTen1. Possíveis domínios OB fold estão indicados por caixas pretas. Para comparação experimental os domínios OB fold da subunidade RPA70, RPA32 e RPA14 estão indicados na caixa cinza. Fonte: (MIYAKE et al. 2009; WELLINGER, 2009).

No complexo CST de plantas e mamíferos, a proteína CDC13, é substituída por um novo componente telomérico denominado Ctc-1 (*Conserved Telomere maintenance Component 1*), a qual não é muito conservada entre as espécies (SUROVTSEVA et al., 2009; MIYAKE et al., 2009; WELLINGER, 2009). Nestes casos, parece que junto com o complexo *shelterin*, as CST, (CDC13-Stn1-Ten1 e Ctc-1-Stn1-Ten1) atuam independentemente e são co-responsáveis pela manutenção e estabilidade telomérica (MIYAKE et al., 2009; SUN, et al., 2009; WELLINGER, 2009).

B)

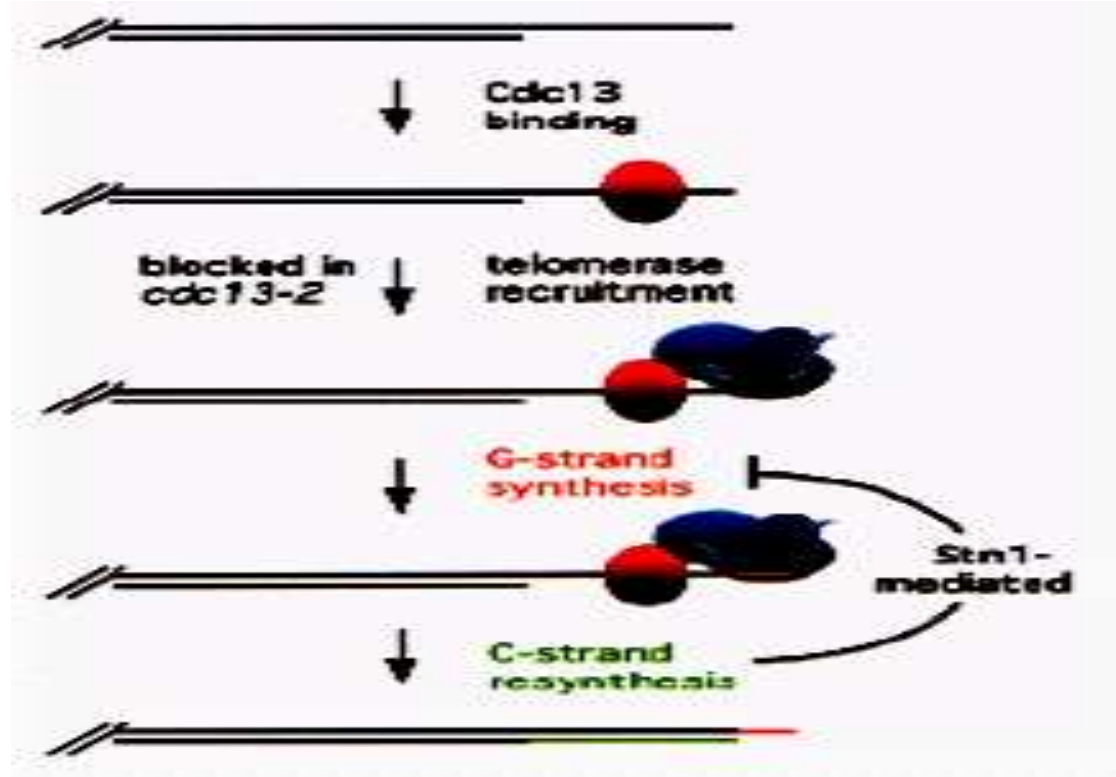


Fig.5B. Ação do complexo CST em leveduras de brotamento (*S. cerevisiae*). Cdc13 interage com a telomerase via EST1 e polimerase α ($pol\alpha$) orquestrando a síntese de ambas fitas teloméricas
Fonte:GAO et al., 2007.

1.7.6. O complexo telomérico de *Leishmania amazonensis*

Os telômeros de Kinetoplastida, assim como os de outros eucariotos, são compostos pela repetição em *tandem* da seqüência 5'-TTAGGG-3', sugerindo mecanismos básicos comuns para a manutenção dessas estruturas (CANO, 2001). Seu tamanho varia em nível cromossômico (CANO, 2001; CONTE; CANO, 2005). A estrutura de T-loop também já foi identificada em tripanosomatídeos (MUNOZ-JORDAN et al., 2001).

No entanto, por se tratar de um grupo divergente (dos demais eucariotos) na escala evolutiva (SIMPSON et al., 2004) é natural que existam particularidades na estrutura dos telômeros dos tripanosomatídeos.

Nos telômeros de *Leishmania amazonensis* foram detectadas a existência de 3 complexos protéicos que se associavam *in vitro* ao DNA simples fita telomérico desta mesma espécie (FERNÁNDEZ et al., 2004). Nas adjacências destas extremidades encontra-se a região subteloamérica denominada de LCTAS (“*Leishmania* conserved telomere-associated sequence”). Aí estão contidos blocos de seqüências conservadas (CSB1 e CSB2), os quais são considerados sítios

de ligação para proteínas teloméricas (FU; BARKER, 1998). Em nosso laboratório, duas proteínas que compõem dois desses complexos foram identificadas utilizando-se métodos bioquímicos. São elas as proteínas LaRBP38 e LaRPA-1 (FERNÁNDEZ et al., 2004). Ambas também interagem com os telômeros do parasita *in vivo* (LIRA et al., 2007a, SIQUEIRA NETO et al., 2007). Também já foram identificadas proteínas que se associam à dupla-fita telomérica desta espécie, como a LaTBP1, a LaRBP38 (LIRA et al., 2007b) e a LaTRF (DA SILVA et al., 2010) além da enzima telomerase responsável pela elongação dos terminais cromossômicos (CANO et al., 1999; GIARDINI et al., 2006, GIARDINI et al., 2010). A Fig. 6 mostra o panorama atual dos telômeros de *Leishmania*.



Figura 6. 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*) em direção a porção central do cromossomo e uma protrusão simples fita rica em G (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 contendo o molde hipotético da sequência telomérica de trianosomatídeos. (CANO et al., 1999; LIRA et al., 2007; DA SILVA et al., 2010; DA SILVA et al., *in preparation*).

1.8. Função telomérica de componentes do complexo RPA

A proteína RPA apresenta funções essenciais na manutenção dos telômeros (SMITH; ROTHSTEIN, 2000, DAHLEN et al., 2003, SCHRAMKE et al., 2004). Uma das principais funções é a capacidade de ativar a enzima telomerase (SCHRAMKE et al., 2004). Esta habilidade foi evidenciada em leveduras primeiramente, por sua atuação através da interação com a proteína Est1, que faz parte do complexo da telomerase em leveduras. Durante a fase S do ciclo celular, a proteína RPA recruta Est1 para o terminal telomérico, trazendo junto a telomerase que estará apta a alongar a simples-fita telomérica. Outra importante função de RPA nos telômeros está relacionada com a

capacidade desta proteína de desfazer a estrutura de G-quadruplex formada *in vitro* a partir da interação entre guaninas de uma fita simples de DNA (PAESCHKE et al., 2005, SALAS et al., 2006). Outras proteínas teloméricas como POT1 (ZAUG et al., 2005) e TEBP (FANG; CECH, 1993) também são capazes de desfazer esta estrutura de maneira semelhante a RPA. Ao se desfazer a estrutura de G-quadruplex, a telomerase passa a ter acesso ao terminal simples-fita telomérico, substrato para sua atividade enzimática de alongação dos telômeros. Desta maneira, a proteína RPA pode atuar de forma a permitir que o telômero possa ser alongado.

Além dessas funções a proteína RPA também interfere na regulação dos telômeros através de interações com outras proteínas. A proteína RPA é ainda capaz de estimular a atividade de helicases de WRN (*Werner syndrome*) e BLM (*Bloom syndrome*), encontradas em complexos que promovem a desnaturação da dupla-fita de DNA em regiões longas de dupla-fita telomérica previamente ligadas à proteína telomérica TRF2 *in vivo* (OPRESKO et al., 2002), sugerindo que todas estas proteínas atuam em uma mesma via nos terminais cromossômicos.

Em *S. pombe*, um mutante para a proteína homóloga a RPA apresentou um encurtamento gradual de telômeros. Quando esta mutação é combinada com outra no gene que codifica o homólogo de TRF2 neste organismo, a proteína TAZ1, observou-se rápida erosão das extremidades cromossômicas, fazendo com que os telômeros percam completamente a capacidade de se manterem estáveis (KIBE et al., 2007). Este mesmo fenótipo de instabilidade telomérica com perda abrupta dos telômeros é também observado em mutantes duplos para o gene da POT1. Foi observado ainda que a superexpressão de POT1 no mutante de levedura para os genes de RPA e TAZ1 suprimiu a perda dos telômeros, restabelecendo a estabilidade telomérica e sugerindo alguma ligação entre o mecanismo de ação de POT1 com as proteínas RPA e TAZ1 (KIBE et al., 2007).

Sabe-se ainda que as subunidades RPA-2 e RPA-3 não são co-purificadas com a RPA-1 nos telômeros de *L. amazonensis* (FERNÁNDEZ et al., 2004). Sugerindo então que a proteína LaRPA-1 atua de forma isolada nos telômeros de *L. amazonensis* sendo porém, possível que ela funcione como um trímero em outras maquinarias da célula, a exemplo da RPA de *C. fasciculata* (BROWN et al., 1992). Em *C. fasciculata*, assim como em humanos, a RPA foi encontrada como um trímero que

liga DNA simples fita através da subunidade maior (RPA-1), comprovando um alto grau de conservação entre as RPA encontradas na maquinaria de replicação de organismos divergentes. Sabendo que no genoma de *Leishmania* não há sequências homólogas às proteínas da família TEP, que inclui as proteínas que se ligam ao DNA simples fita telomérico: CDC13, POT1 e TEBP (CROY; WUTTKE, 2006). A LaRPA-1 entretanto, compartilha com as proteínas da família TEP, o domínio OB-fold de ligação ao DNA simples fita. Assim sendo, é possível que a proteína LaRPA-1 identificada *in vivo* em associação com os telômeros de *L. amazonensis* pode ser considerada o homólogo funcional destas proteínas. Isso foi demonstrado em nosso laboratório por meio de ensaios de imunoprecipitação de cromatina (SIQUEIRA NETO, et al., 2007).

1.8.1. Envolvimento da RPA na resposta a danos no DNA telomérico

A RPA é normalmente fosforilada durante o ciclo celular e depois de ter ocorrido dano ao DNA em diferentes organismos (BINZ, et al., 2004).

Segundo modelo proposto por Kowalczykowski (2000) a RPA coordena a resposta celular mediante danos na fita simples de DNA. Durante o mecanismo de reparo do DNA ou “stress” replicativo, a proteína RPA sofre uma hiperfosforilação sinalizando onde ocorreu o dano na fita de DNA, e assim interage com outras proteínas direcionando-as para uma via metabólica específica (ZOU et al., 2006), também atua sinalizando dano nos pontos de checagem do ciclo celular, e inibindo da progressão do ciclo celular, promovendo o reparo ou desencadeando a apoptose (KASTAN; BARTEK, 2004; SANCAR et al., 2004).

Sabe-se que a proteína RPA participa das 4 grandes vias de reparo do DNA: reparo por excisão do DNA (*nucleotide excision repair*-NER), reparo por excisão de base (*base excision repair*-BER), reparo por DNA não pareado (*mismatch repair* MMR) e reparo na quebra da dupla-fita (*double-strand break repair*-DSB) (WOLD, 1997). Essas vias de reparo agem formando complexos com proteínas especializadas. Por exemplo, a via NER-RPA interage com as endonucleases XPF-ERCC1 (Xeroderma Pigmentosum, complementation group F and Excision Repair Cross-Complementing 1), recrutando DNA polimerase para o complexo RPA – DNA simples fita para complementar o processo

de reparo (KOWALCZYKOWSKI, 2000). Sabe-se também, que durante o reparo de quebra do DNA na forma de dupla fita (DSBs), por recombinação homóloga, a RPA interage com dois membros do grupo epistático RAD52 (RAD51 e RAD52) (SUGIYANA et al., 2002, STAUFFER; CHAZIN, 2004), e durante o reparo de quebra de dupla fita por recombinação não homóloga e reparo por junção de pontas não pareadas (NHEJ), a RPA interage com proteínas kinases (DNA-PK) e co-localiza com proteínas do complexo MRN (Mre11, HUS1, Nbs1), o qual atua como um sensor, sinalizando onde ocorreu o dano (ROBISON et al., 2004).

Em leveduras de brotamento haplóides, a persistência de um único cromossomo quebrado leva a uma parada do ciclo celular em G2, através da ativação de uma resposta Rad9/Rad53 (MELO; TOCZYSKI, 2000). Também foi descrito em leveduras e humanos, uma vez ocorrido um dano, por ex, quebra de DNA na forma de dupla fita, a RPA interage com a proteína RAD51, participando do mecanismo de reparo por recombinação homóloga (STAUFFER; CHAZIN, 2004). Esta interação se dá via o N-terminal da proteína RAD51 e o domínio RPA-1. Parece que RAD51 ao se ligar a RPA, compete pelo sítio de interação com o DNA, deslocando a RPA da fita simples de DNA no início da recombinação homóloga (STAUFFER; CHAZIN, 2004).

Visto que o papel da RPA no metabolismo do DNA vai além de qualquer função isolada, o presente trabalho tem como objetivo compreender as interações de LaRPA-1 com outras proteínas, como as das maquinarias de replicação dos telômeros e as de reparo do DNA quebrado na forma de dupla fita. Para tal identificamos proteínas parceiras a RPA em parasitas cultivados em condições normais ou tratados com fleomicina, agente indutor de danos ao DNA (MCKEAN et al., 2001).

Na maioria dos eucariotos a RPA e suas parceiras coordenam interações específicas de proteínas nucleares mantendo uma dinâmica equilibrada entre as principais maquinarias que envolvem a manutenção genômica (BAE et al., 2001, ZOU; ELLEDGE, 2003). Além disso, normalmente, os telômeros mantêm-se em um estado protegido (*capped*) o qual não é reconhecido por proteínas dos complexos de resposta a danos ao DNA e reparo. Porém, proteínas que compõe as vias de reparo/recombinação e os “pontos de checagem” de ciclo celular, encontram-se paradoxalmente interagindo com telômeros funcionais, via seus interatores, as proteínas teloméricas,

a cada ciclo de divisão celular, seja em mamíferos ou leveduras. Estas proteínas estão intimamente envolvidas não só com a regulação dos telômeros, ou seja, com sua replicação e proteção, mas também com o processamento e modificação estrutural do DNA telomérico, que exigem a ação local das mesmas. Desta forma, fica cada vez mais claro que os telômeros podem ser temporariamente reconhecidos como quebras de DNA em dupla fita. E mais, que a diferença entre uma quebra no DNA e um telômero é menos óbvia do que se pensava anteriormente (LONGHESE, 2008).

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo principal identificar as possíveis proteínas parceiras de LaRPA-1 nos telômeros de *Leishmania amazonensis*. Devido às inúmeras participações das RPAs nas diferentes vias de metabolismo de DNA em outros eucariotos, inclusive os telômeros, propusemos que este estudo fosse realizado com parasitas em condições normais de cultivo e parasitas tratados com agentes genotóxicos. O intuito foi verificar se em *L. amazonensis* a proteína LaRPA-1, que sabidamente participa da maquinaria telomérica (SMITH; ROTHSTEIN, 2000, DAHLEN et al., 2003, SCHRAMKE et al., 2004 ; FERNÁNDEZ, 2004; SIQUEIRA-NETO, 2007) e que interage com a proteína LaRbp38 (DA SILVA et al., *in preparation*), pode participar da resposta a danos induzidos por agentes genotóxicos nos telômeros do parasita por alterações na expressão desta proteína ou de suas interações com o DNA telomérico e/ou com outras proteínas.

Para isto foram utilizadas as seguintes estratégias:

1. Análise de expressão de LaRPA-1 por Western blotting e imunofluorescência indireta.

Os parasitas utilizados nestes ensaios foram tratados com fleomicina e como controle utilizou-se parasitas não tratados

2. Análise das possíveis alterações na associação de LaRPA-1 com os telômeros em parasitas tratados com fleomicina, utilizando-se técnicas de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) usando soro anti-LaRPA-1 e as sondas de DNA telomérico rico em G e C, além de ensaios de hibridização *in situ* utilizando sonda telomérica.

3. Análise das possíveis alterações na associação de LaRPA-1 e/ou novas interações com proteínas, utilizando-se ensaios de co-imunoprecipitação seguido de análise por Western blotting usando soros específicos.

3. Metodologia

3.1. Cultura de Parasitas

Formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, cepa MHOM/BR/73/M2269 foram cultivadas a 28°C em meio “199 (Earle)” (Cutilab), suplementado com 10% soro fetal bovino e 1X solução de antibiótico e antimicótico (penicilina e estreptomicina)/Antimicótico (Anfotericina B), Cutilab.

Para a manutenção das características biológicas desses parasitas, formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* obtidos de cultura em fase exponencial foram inoculadas em hamsters e camundongos Balb/C, em ambos por via subcutânea (focinho e patas traseiras, respectivamente). Após o surgimento das lesões, os animais foram sacrificados em câmara de CO₂ e as formas amastigotas do parasita foram recuperadas das seguintes formas:

Em hamster, as lesões começaram a aparecer dois meses após o inóculo. As formas amastigotas foram recuperadas das lesões, em um ambiente totalmente asséptico, de duas maneiras: a) injetando-se PBS 1X (*phosphate buffered saline*) nas narinas do animal, e em seguida recuperando essa solução juntamente com as formas amastigotas dos parasitas. b) retirando-se a lesão com auxílio do bisturi e macerando o material para homogeneização e liberação dos amastigotas das células. Após a recuperação das formas amastigotas as mesmas foram inoculadas em meio de cultura 199, suplementado com 10% de soro fetal bovino contendo o dobro da mistura de antibióticos e antimicóticos e, aproximadamente após sete dias, todas as formas amastigotas já haviam se transformado em promastigotas.

Em camundongo Balb/C, as lesões surgiram aproximadamente 3 meses após o inóculo. As patas infectadas foram retiradas do animal e lavadas em álcool etílico 70%. Com o auxílio de uma tesoura foi retirada toda a infecção secundária em volta da lesão e o tecido foi macerado com auxílio

de um bisturi em solução PBS 1X estéril contendo uma mistura de antibióticos e antimicóticos (1X Penicilina/Estreptomicina, Cultilab). Em seguida, parte da solução contendo as formas amastigotas foi colocada em uma garrafa de cultura contendo meio 199, suplementado com 10% de soro fetal bovino e o dobro da mistura de antibióticos e antimicóticos, à temperatura ambiente, para permitir a transformação das formas amastigotas em promastigotas, aproximadamente após sete dias, todas as formas amastigotas já haviam se transformado em promastigotas. Parte desta cultura foi centrifugada a 1800 RPM por 10 min, o precipitado contendo os parasitas foi lavado 3 vezes com solução PBS 1X e utilizado para a preparação de extrato protéico para futuros experimentos.

3.2. Produção de soro policlonal anti-LaRPA-1 em camundongos

Para a produção de soro policlonal anti-LaRPA-1 em camundongos foram utilizados 4 camundongos fêmeas linhagem Hiah, com 3 meses de vida. As imunizações foram realizadas via subcutânea, inoculando-se 10 µg de proteína LaRPA-1 recombinante (LIRA et al., 2007d) misturada vol/vol com adjuvante completo de Freud (Sigma). Após 15 dias estes camundongos foram submetidos a uma nova imunização, inoculando-se por via subcutânea 34µg da proteína LaRPA-1 recombinante e adjuvante incompleto de Freud. Após 7 dias estes animais foram submetidos à sangria total, via ocular e realizou-se a titulação dos anticorpos por ensaio de ELISA, utilizando-se como antígeno a proteína LaRPA-1 recombinante (dados não mostrados) e Western blotting utilizando-se extrato protéico de núcleo do parasita. O ensaios Western blotting foram revelados com este soro anti-LaRPA-1, nas diluições, 1:100, 1:250, 1:500 e 1:1000 respectivamente. A melhor diluição do soro para ensaios de Western blotting em extratos de núcleo foi de 1:500 (dados não mostrados).

3.3. Obtenção de extrato protéico total de formas promastigotas

Para preparação do extrato total protéico, as células dos parasitas foram retiradas do meio de cultura por centrifugação (13000rpm por 10min), lavadas em PBS1X. As células foram rompidas utilizando tampão contendo 150 mM Tris-HCl pH 7,5, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0,1% SDS. Para

lisar 10^8 células foram necessário 200 μ l do tampão. Para melhorar a qualidade do extrato, foram adicionados a esse volume 1 μ l 1X de inibidor de proteases (Calbiochem) e adicionado ou não 10U de DNase (Amershan Pharmacia Biotech) e extrato parasitário foi incubado no gelo por 15 min e em seguida misturado fortemente com auxílio do vortex durante 10 segundos. Este procedimento foi repetido por 15 vezes. Por fim, o extrato foi centrifugado a 10.000 rpm durante 8 min. O sobrenadante contendo extrato protéico parasitário total foi recuperado e estocado no freezer a - 80°C. Utilizou-se o método de “Bradford” para dosagem de proteínas totais.

3.4. Obtenção de extratos de frações subcelulares (núcleo e citoplasma) de formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Os extratos de núcleo foram preparados de acordo com (FRAGAKI et. al., 2007) a partir de culturas de formas promastigotas em fase mid log de crescimento contendo aproximadamente de $1,5 \times 10^9$ a $3,0 \times 10^9$ células. Os parasitas foram lavados três vezes em 1X PBS por centrifugação (206 g) por 5 min. a 4° C e incubadas por 10 min no gelo em 0,5 ml de tampão de lise I (Hepes 10 mM, pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 10 mM, DTT 0,5 mM, NP40 0.5%, suplementado com 1X coquetel de inibidores de proteases). Após a incubação, o precipitado foi centrifugado (1.460 g) por 10 min. a 4° C e o sobrenadante resultante foi coletado e usado como extrato de citoplasma. O precipitado contendo o núcleo foi incubado por 20 min no gelo com 0,05 ml de tampão de lise II (Hepes 20 mM, pH 7.5, MgCl₂ 1.5 mM, KCl 840mM, DTT 0,5 mM, glicerol 25%, EDTA 0.2 mM, suplementado com 1X coquetel de inibidores de proteases) e então centrifugado (15.500 g) por 15 min. a 4° C. O sobrenadante resultante foi recuperado e usado como extrato nuclear. Os extratos das frações subcelulares (núcleo e citoplasma) foram armazenados no freezer a -80 °C.

3.5. Tratamento de extratos nucleares com fosfatase alcalina (CIAP)

Os extratos de núcleo de parasitas tratados ou não com fleomicina (Invivogen), agente causador de danos ao DNA, foram incubados com 20U de CIAP (*calif intestinal alkalyne phosphatase*,

Invitrogen) por 40min a 30°C. Estes extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE 10%, analisados por Western blotting.

3.6.Obtenção do IC₅₀ para fleomicina

3.6.1 . Curvas de crescimento obtidas de formas promastigotas tratados com diferentes concentrações de fleomicina.

Antes de iniciar os estudos com fleomicina, primeiramente realizamos uma curva de crescimento com os parasitas tratados com 10-100 µg/ml de fleomicina por 0 h, 1 h, 3 h e 6 h a 28 °C, após o período de incubação estes foram centrifugados, lavado em solução salina 1 x (PBS 1X), fixados em formaldeído 1% e contados em câmara de Neubauer. O mesmo procedimento foi realizado em parasitas não tratados com a droga, que foram utilizados como controle do experimento. As triplicatas deste ensaio foram plotadas em um gráfico usando o programa excell 2010. O desvio padrão da média de triplicatas foram estimados para cada concentração de droga e seus respectivos períodos de incubação.

3.6.2. Teste de exclusão celular utilizando o corante azul de tripan

Para o teste de viabilidade celular por exclusão utilizou-se o corante azul de tripan. Somente as células não viáveis se coram com azul de trypan; as células viáveis permanecem não coradas.

Assim, parasitas *L. amazonensis* em fase midi-log de crescimento foram tratadas ou não tratadas (C) com 10-100µg/ml de fleomicina por 0, 1, 3 e 6 h. Após o período de incubação essas células foram lavadas em solução salina (PBS 1X) em seguida foi adicionado às elas 0,4%de solução de corante azul de trypan (Gibco) diluído 1:1 em solução salina (PBS) (sigma, 1985) e incubadas 15min

à T.A. (temperatura ambiente). As células foram lavadas em PBS e realizou-se a quantificação em um leitor de Elisa (620nm).

3.7. Tratamento dos parasitas com fleomicina agente indutor de danos ao DNA

Baseado nos resultados obtidos na curva de crescimento e teste de viabilidade celular, com diferentes concentrações de fleomicina e baseado nos estudos de McKean, (2001), os parasitas foram tratados ou não (C) com fleomicina, em doses subletais (20-40µg/ml), por tempos variados. A expressão das proteínas LaRPA-1 e RAD51 foram analisadas por Western blotting utilizando-se extratos protéicos totais, extratos de núcleo e de extrato de cromatina (item 3.3, 3.4 e 3.5), revelados com soro policlonal anti- LaRPA-1 (SIQUEIRA NETO et al., 2007) e soro policlonal anti-RAD51 obtido a partir de proteína recombinante produzido em coelho (Ab46981, Abcam) , soro policlonal anti-Rbp38 (LIRA et al., 2007).

3.8. Expressão, renaturação e purificação da proteína recombinante LaRPA-1 obtida a partir de extratos de *E. coli*

Para a expressão e purificação da LaRPA-1 recombinante utilizou-se protocolo segundo Lira, et al., (2007d).

Para a expressão da LaRPA-1 clonada no vetor pET 28a+, foram utilizadas cepas de bactérias *E. coli* (BL21 RP “codon plus”) e indução com IPTG. As bactérias recombinantes transformadas com esse vetor foram inoculadas em meio LB contendo os antibióticos canamicina (50µg/ml) e cloranfenicol (30µg/ml) e cultivadas a 37°C sob agitação de 200 ciclos por minuto até atingirem DO_{600nm} entre 0,6 e 0,8, foi adicionado 1 mM de IPTG “overnight” para induzir a expressão da proteína. As células foram em seguida submetidas à centrifugação a 7.000 rpm por 10 minutos a 4°C e os precipitados foram ressuspensos em tampão de lise (Tris-HCl pH8, 50 mM, NaCl 50 mM, EDTA 10 mM) contendo lizozima (200µg/ml). O DNA das amostras foi quebrado mecanicamente utilizando-se sonicação (30s por 20 x), e os extratos foram centrifugados a 2400g durante 15min a 4°C. Os “pellets” foram ressuspensos em solução PWS (1M de Uréia; Triton X-100), sonicados e centrifugados novamente de forma a se obter os corpúsculos de inclusão onde estão contidos a LaRPA-1 insolúvel. Após a lise e lavagens dos “pellets”, este foram ressuspensos em tampão (20 mM Glicina pH 10, 20 mM NaCl), e as

proteínas foram desnaturadas na presença de 7M de uréia (concentração final) e 1mM β -mercaptoetanol.

Para a purificação da proteína LaRPA-1 as soluções contendo a proteína desnaturada com uréia foram fracionadas em coluna Q- sepharose previamente equilibrada com tampão A (20mM Glicina, 20mM NaCl, 7M Uréia, 71 μ L/L β mercaptoetanol, e as proteínas foram eluídas em gradiente constante de tampão B (20mM Glicina pH 10, 1M NaCl, 7M Uréia, 71 μ L/L β mercaptoetanol). Após a eluição da proteína nesta coluna, as frações que continham LaRPA-1 foram visualizadas em gel 10% SDS-PAGE corado com Coomassie e os eluatos foram agrupados para serem fracionados em coluna Hi Trap Chelating carregada com NiSO₄ e equilibrada em “Start Buffer” (20mM Tris-HCl, pH 7,0; 0,5 M NaCl; 7M Uréia; 71 μ L/L β mercaptoetanol). As frações contendo a proteína foram eluídas em concentração constante de “Elution buffer” (20mM Tris-HCl, pH7,0; 0,5 M NaCl; 7M Uréia; 71 μ L/L β mercaptoetanol) na presença de 0,5M Imidazol.

As frações de La RPA-1 coletadas na coluna Hit rap Chelating, foram dialisadas “over night” em tampão (20mM Tris-HCl pH7,0, 20mM NaCl) e 1mM β mercaptoetanol, para garantir que toda uréia, sal e imidazol fossem eliminados da mistura, mas a concentração de β mercaptoetanol será a mesma. No dia seguinte as amostras de La RPA-1 precipitada foram centrifugadas à 13.000rpm/15 min/4 °C, o pelete foi pesado na balança analítica e ressolubilizado em tampão 20mM Tris-HCl pH7,0, 20mM NaCl, heparina e uréia 7M final, ficando sobre agitação a 4°C por mais ou menos 7horas, nesse processo foram feitas 2 trocas deste tampão até que não restasse precipitados visíveis.

A amostra foi centrifugada a 13.000rpm à 4°C.

3.9. Análise do conteúdo de DNA por Citometria de Fluxo (FACSCalibur)

Cultura de *L. amazonensis* em fase mid log de crescimento foram tratadas ou não tratadas com 20 μ g/ml de fleomicina, nos tempos de incubação: 0 h, 1h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Após cada um desses períodos, 2 x 10⁶ células foram fixadas em formaldeído 1%, tratadas com 10 μ g de DNase-free RNase (USB). O DNA das células foi corado com 40 μ g/ml de iodeto de propídio (Sigma, St. Louise, MO, U.S.A), seguindo protocolo previamente padronizado no laboratório. A análise do conteúdo do

DNA das células destes parasitas foi realizada em um citômetro analítico FACSCalibur (Becton Dickinson), e o programa utilizado foi o CELL Quest através da plotagens em histogramas.

3.10. Imunolocalização de proteínas utilizando ensaio de Imunofluorescência Indireta (IFI)

Para os ensaios de imunofluorescência indireta, as lâminas foram previamente lavadas e tratadas com 0,1% de poli-lisina (Poly-L-lysine hydrobromide- Sigma). 10^6 parasitas na forma promastigota (*L. amazonensis*) tratados ou não com 40µg/ml de fleomicina por 0h, 1h e 3h, foram centrifugados a 5000 rpm, durante 5 min., descartado o sobrenadante, o as células foram ressuspensas em 1ml de PBS 1 X gelado e novamente centrifugado. Logo após os parasitas foram fixados em 400µl de fomalina 1%, em seguida lavados em PBS1X. Os parasitas foram permeabilizados durante 5 min. a temperatura ambiente na presença de 50µl de 0,1% Triton X-100 (Calbiochem) após o tempo de permeabilização foi adicionado 6ul glicina 0,1M por 5min. Essas células foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 5 min., o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado o anti- soro primário diluído em PBS na presença de 4% BSA. Foram utilizados os soros policlonais de coelho anti-LaRPA-1 (título 1:4000), soro anti RAD51(1:1000) e anti γH2Ax (1:1000), previamente titulados. Os parasitas foram incubados “overnight” a 4°C. Após esse período de incubação as células foram lavadas com PBS 1 X. e em seguida foram incubados à 4°C por 4 horas na ausência de luz, com o anticorpo secundário anti- IgG de coelho marcado com Alexa Fluor 555 (vermelho) na diluição 1:3000 em PBS1X + 4% BSA. Em seguida as células foram centrifugadas a 5000rpm, por 5min, lavadas com PBS 1X, e em seguida ressuspensas em 100ul de PBS1X, 20ul desta suspensão foram depositados nas lâminas. Em seguida as lâminas foram secas ao ar, seladas com 5 µl de Vectashield+DAPI (Vector) e lacradas com lamínula esmalte. As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X em imersão e analisadas através do programa Nis-Elements BR.

3.11. Imunodeteção de proteínas por Western blotting

Proteína recombinante LaRPA-1 (ítem 3.8) e proteínas nativas contidas nos extratos de núcleo e de cromatina de *L. amazonensis* (3.3, 3.4 e 3.5) foram fracionadas em géis SDS-PAGE 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose (BioRad e Immobilon- Millipore) em tampão de transferência (48 mM Tris Base, 39 mM glicina, 20% metanol) por 16 h a 4°C (SAMBROOK & RUSSEL, 2001), utilizando-se o Trans-Blot Cell (BioRAD). A detecção das proteínas foi realizada através da utilização dos soros primários: policlonal de coelho anti- LaRPA-1 (SIQUEIRA NETO et al., 2007), soro policlonal de humano anti-RAD51 (Ab46981, Abcam), soro policlonal de coelho anti-Rbp38 (LIRA et al., 2007) e como soro secundário utilizou-se anti-IgG de coelho conjugado HRP (BioRad), e para a revelação utilizou-se o kit immobilon™ Western chemiluminescent HRP substrate (Millipore).

3.12. Sincronização da cultura de parasitas para análise da expressão das proteínas LaRPA-1, RAD51 e histona γ H2Ax durante o ciclo celular

O procedimento usado para sincronizar culturas em crescimento exponencial de fomas promastigotas de *L. amazonensis* foi padronizado por da Silva et al., *in preparation*.

Culturas de três dias foram inoculadas com hidroxiuréia (HU) para concentração final de 400 μ g/ml, ficando incubadas por 12 h. Após o tratamento, os parasitas foram centrifugados à 2500 rpm por 15 minutos e descartado o meio com HU. Após os parasitas foram ressuspensos em dobro do volume original de meio de cultura fresco. Esses parasitas foram tratados ou não tratados (C) com 40 μ g/ml de fleomicina por 1,3, e 6 h. Amostras contendo mínimo de 2×10^6 parasitas foram coletadas ao longo dos tempos de incubação com droga. As células foram centrifugadas (5000 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 μ l de PBS 1x.

Após nova centrifugação (5000 rpm por 5 minutos) e descarte do sobrenadante as células foram fixadas utilizando 300 μ l de formaldeído 1%, diluído em PBS1X por 5 minutos à temperatura ambiente. O formaldeído foi removido após centrifugação (10000 rpm por 1 minuto) e as células foram lavadas com 200 μ l de PBS 1x seguido de nova centrifugação. Após a etapa de fixação foram

procedidas as mesmas etapas do protocolo de imunofluorescência que está descrito acima (item 3.10.).

3.13. Preparação de extratos de cromatina

Os extratos de cromatina foram preparados a partir de uma cultura de *L. amazonensis* em fase mid log de crescimento, utilizando-se 10^8 células. Para obtenção de proteínas associadas ao DNA (cromatina), os parasitas foram centrifugados por 10min à 3500rpm, e em seguida as células foram lavadas PBS 1x, e o precipitado foi ressuspenso em 100ul de tampão contendo: (10mM Tris-HCl pH 7,4, 100mM NaCl, 300mM Sacarose, 3mM MgCl₂, 50mM NaF, 1mM Na₃Vo₃, 0,1mM Inibidores de Protease, 0,1% Triton), após 10min. de incubação no gelo sob agitação, estes foram centrifugados à 3500rpm por 10min., e o sobrenadante foi coletado (Fração solúvel), e o precipitado foi tratado com 50U de DNase I (Sigma) por 30 min à temperatura ambiente em 1X tampão DNase I (10 mM Tris-HCl, pH8.0, 5 mM MgCl₂, 3 mM CaCl₂). A reação foi parada adicionando-se 2,5 mM de EDTA pH 8, as proteínas suspensas foram centrifugadas a 3.500rpm por 15 min e o sobrenadante contendo a cromatina foi utilizado para ensaios de Western blotting.

3.14. Ensaios de imunoprecipitação utilizando “Pierce^R Crosslink Immunoprecipitation Kit”

Para a realização do ensaio de imunoprecipitação (IP), primeiramente preparou-se extratos protéicos de núcleo a partir de cultura de *L. amazonensis* em fase mid log de crescimento (1×10^9) conforme (como descrito item 3.4) (FRAGAKI, 2007). Para preparação dos extratos os parasitas tratados ou não com 40µg/ml de fleomicina por 0 h, 1 h e 3 h. Esses extratos foram utilizados para o ensaio de imunoprecipitação. Este ensaio foi realizado utilizando o kit de imunoprecipitação Pierce^R Crosslink Immunoprecipitation Kit, esse kit oferece vantagem de reter os anticorpos à resina contendo a proteína A, e sendo assim permite a eluição da proteína de interesse sem os contaminantes eventuais como as cadeias leve e pesada dos anticorpos. O procedimento é realizado em uma coluna HandeeTM spin column juntamente com proteína A. Foi utilizado 200µg de soro policlonal anti-RPA-1 produzido em camundongo. 1/10 dos eluatos imunoprecipitados e 10% do input (extrato de núcleo que

nao foi imunoprecipitado) foram fracionados em gel SDS-PAGE e analisados por Western blotting revelados com anti-soros específicos para as proteínas em estudo.

Como controle do experimento utilizou-se soro pré-imune para revelação dos imunoprecipitados.

3.15. Imunofluorescência Indireta (IFI) combinada com hibridização fluorescente *in situ* utilizando sonda telomérica. (FISH).

Para o ensaio de FISH combinado com IFI, primeiramente os parasitas foram tratados ou não (C) com 40µg/ml de fleomicina por 1 h e 3 h, em seguida foram submetidos a um ensaio de IFI como descrito no item 3.13 e antes da etapa de selagem com Vectashield+DAPI, as laminas foram incubadas com uma sonda telomérica utilizando o kit Telomere PNA FISH Kit/FITC (Dako Cytomation) (DA SILVA et al., 2010). As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X e foram capturadas utilizando-se o programa Nis-Elements BR.

3.16. Ensaio de imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Para este experimento foram utilizados $8,0 \times 10^7$ células/experimento, provenientes de uma cultura de *L. amazonensis* em fase mid log de crescimento, tratados ou não com 20 µg/mL de fleomicina por 0 h, 1 h, 3 h e 6 h. Após esses períodos de incubações foram adicionados à cultura formaldeído 1% final e incubado por 30min, em seguida foi adicionado glicina 25mM por 5min. As incubações foram feitas sob agitação e em temperatura ambiente, centrifugados à 4000rpm por 10min, lavados em PBS 1x. Para lisar as célula, foi acrescentado ao pellet 1,2 ml de tampão lysis buffrer (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 0.002% SDS), e mais 1X protease inhibitor cocktail (Calbiochem). Para fragmentar as células foi empregado o uso do sonicador (35x com intervalo de 1min no gelo). A cromatina foi imunoprecipitada com anticorpo anti-La-RPA-1 e o DNA foi extraído com fenol-clorofórmio. As amostras de DNA foram espotadas no slot-blotted e hibridizada com as sondas telG [Tel6-(5'TTAGGG-3')₆] e tel C (-Tel 1[(CCCTAA)]₃, conforme protocolo

estabelecido (LIRA et al., 2007c). Como controle do experimento alíquotas correspondente a 1% e 5% do total de numeros de células (*input*), foram testadas separadamente. Foram também utilizados como controle o mock e soro pré-imune de coelho.

Para o ensaio de imunoprecipitação da cromatina utilizou-se o protocolo descrito em (LIRA, et al, 2007c).

4. Resultados

4.1. LaRPA-1 sofre diferentes níveis de fosforilação durante o crescimento exponencial de promastigotas de *Leishmania* e quando submetida a tratamento com agente genotóxico (fleomicina).

Tem sido relatado que as subunidades 1 e 3 da proteína RPA em humanos (RPA70 e RPA14) não são fosforiladas durante o ciclo celular, embora tenha sido observado nestas subunidades um baixo nível de fosforilação dependente de ciclina A/cdk1 e ciclina B/cdk1 *in vitro* (OAKLEY et al., 2003, BINZ et al., 2004). Já em *S. cerevisiae*, a subunidade maior da proteína RPA (RFA1) é fosforilada em respostas a agentes genotóxicos ao DNA, tais como MMs (Methyl methanesulfonate, HU(Hidroxiuréia) e radiação UV (OAKLEY et al, 2001).

Nossos resultados mostraram que LaRPA-1 sofre diferentes níveis de fosforilação durante o crescimento exponencial de promastigotas de *L. amazonensis* (Fig.7 e dados não mostrados). Notou-se por várias vezes que quando extratos protéicos totais e de núcleo de *L. amazonensis* eram submetidos a ensaios de Western blotting e revelados com soro policlonal de coelho anti-LaRPA-1 ou soro de camundongo anti-LaRPA-1, bandas de migração mais lenta que a LaRPA-1 eram reveladas (dados não mostrados). Essas bandas sugerem que LaRPA-1 talvez possa sofrer diferentes modificações pós-traducionais, por exemplo fosforilação. A Fig. 7 representa um Western blotting contendo extratos de núcleo de parasitas em fase mid log de crescimento, esses extratos foram tratados (linhas 3 e 4) ou não tratados (linhas 1 e 2) com inibidor de fosfatase, e tratados (linhas 2 e 4) ou não (linhas 1 e 3) com fosfatase alcalina (*calf intestinal alkaline phosphatase* – CIAP). A Fig. 7B mostra os extratos de núcleo tratados com 20µg/ml de fleomicina preparados com inibidor de

fosfatase e em seguida tratados com CIAP. Esses extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE 10%, e submetidos a ensaios de Western blotting revelados com soro anti-LaRPA-1. Observou-se que as bandas que sugeriam ser formas fosforiladas da LaRPA-1 eram abolidas quando os extratos nucleares eram tratados com CIAP (Fig.7A linhas 2 e 4), o que não ocorria quando os extratos não eram tratados com CIAP (Fig.7 linhas, 1 e 3). Isto indica que a LaRPA-1 sofre diferentes níveis de fosforilação. Um outro fato interessante foi observado, quando os extratos de núcleo com ou sem inibidor de fosfatase foram tratados com CIAP, houve uma intensificação na banda de 51kDa, sendo menos intensa na presença de inibidor de fosfatase, confirmando que a proteína nativa LaRPA-1 (51kDa) sofre esta modificação pós – tradução durante o crescimento exponencial do parasitas. O mesmo efeito foi visualizado quando os parasitas foram tratados com a fleomicina e os extratos preparados na presença do inibidor de fosfatase e também tratados com CIAP, notou-se uma intensificação na banda de 51kDa, além da intensificação de formas hiperfosforiladas após 6 horas de indução de dano, sugerindo que assim como outros eucariotos a LaRPA-1 sofre naturalmente fosforilação e hiperfosforilação na presença de dano (BINZ et al., 2004).

Fig.7

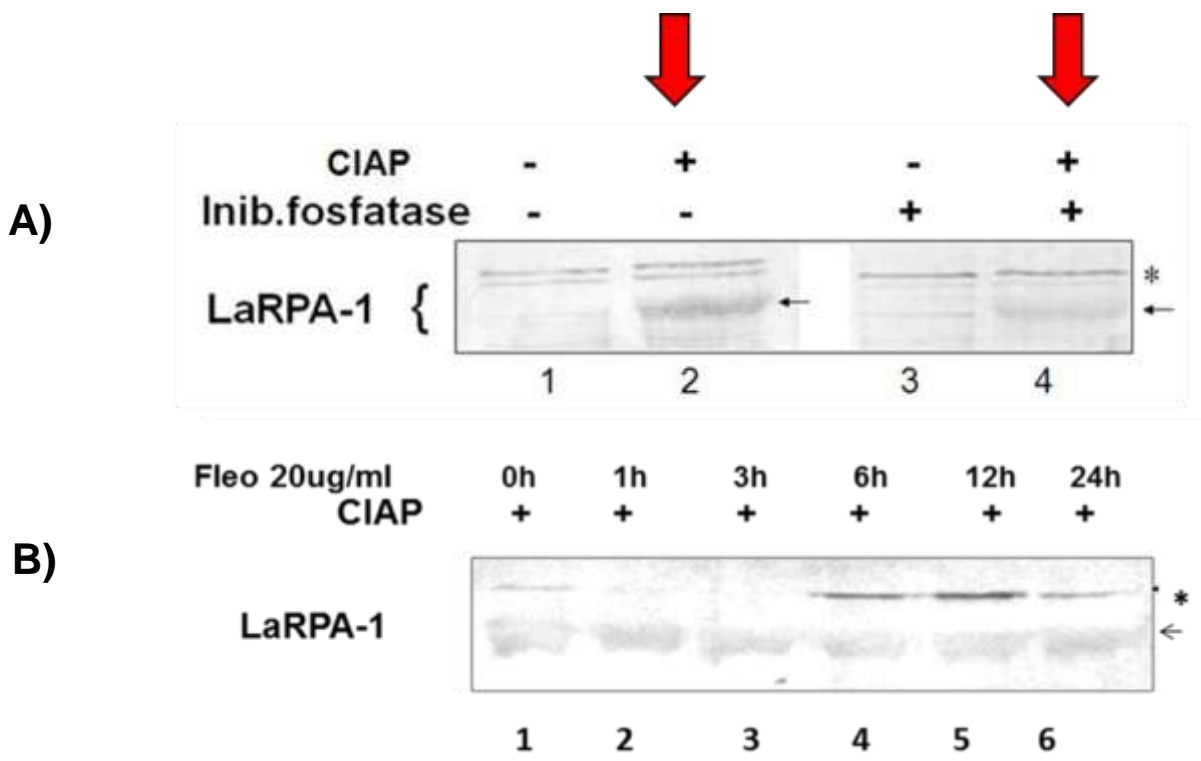


Fig. 7. A fosforilação da LaRPA-1 ocorre em diferentes níveis durante o crescimento exponencial de promastigotas de *Leishmania*. Em A) Western blotting contendo extratos nucleares (10^7 parasitas/linha do gel), preparados na ausência (linhas 1 e 2) e na presença de inibidor de fosfatase (In.fosf.) (linhas 3 e 4), estes foram revelados com soro policlonal de coelho anti-LaRPA-1. Para testar as bandas de migração mais lenta que a LaRPA-1 nativa, os extratos foram incubados com 20U de CIAP (linhas 2 e 4). O resultado mostra os diferentes níveis de fosforilação e possível hiperfosforilação da LaRPA-1 indicado pelo asterisco (*). Em B) Western blotting contendo extratos nucleares (10^7 parasitas/linha do gel) tratados com 20 μ g/ml de fleomicina. Esses extratos foram preparados na presença de inibidor de fosfatase e em seguida foram tratados com 20U fosfatase alcalina (CIAP) (linhas 1-5).

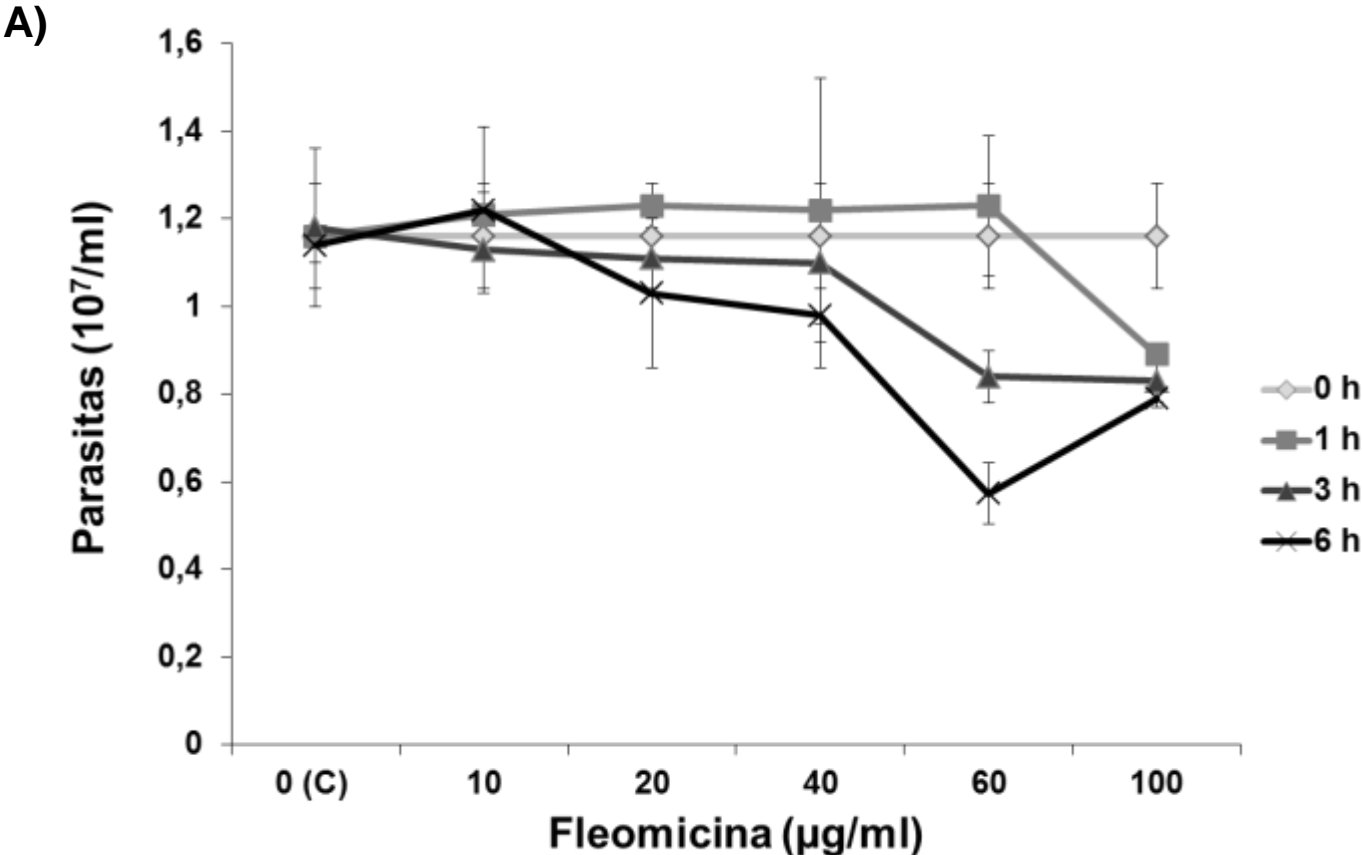
4.2. Fleomicina induz parada de crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* entre as fases G1/S do ciclo celular

Sabendo que na maioria dos organismos a fleomicina é uma droga que quebra DNA na forma de dupla fita (McKean, et al., 2001), procurou-se determinar o IC 50 para as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Utilizou-se primeiramente o método clássico usando o MTT. O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais, transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan), no entanto não obteve resultado satisfatório, pois a fleomicina absorve a luz no mesmo comprimento de onda (570nm) do que o formazan (dados não mostrados). Desta maneira foram realizadas curva decrescimento com diferentes concentrações de fleomicina (10, 20, 40, 60 e 100 μ g/ml). A Fig. 8A mostra que após 6 h de incubação com 60 μ g/ml de fleomicina houve uma redução no número de parasitas em aproximadamente 50%, o que é semelhante ao IC50 da fleomicina para formas promastigotas de *L. major* (McKean et al., 2001). Neste experimento o controle do experimento está representado pelos parasitas não tratados com fleomicina. Nota-se que a maior concentração de fleomicina usada neste ensaio (100 μ g/ml) não foi capaz de provocar a morte em 100% dos parasitas (Fig, 8A). Assim procurou-se examinar a influência da fleomicina sobre a viabilidade dos parasitas, usando o teste de exclusão celular pelo azul de tripan (Paland et al., 2009). A Fig. 8B demonstra que quando se compara os parasitas controles (não tratados com fleomicina) com os parasitas tratados com 20-100 μ g/ml por 3 horas resultou na mortalidade de aproximadamente 25- 40%, sugerindo que

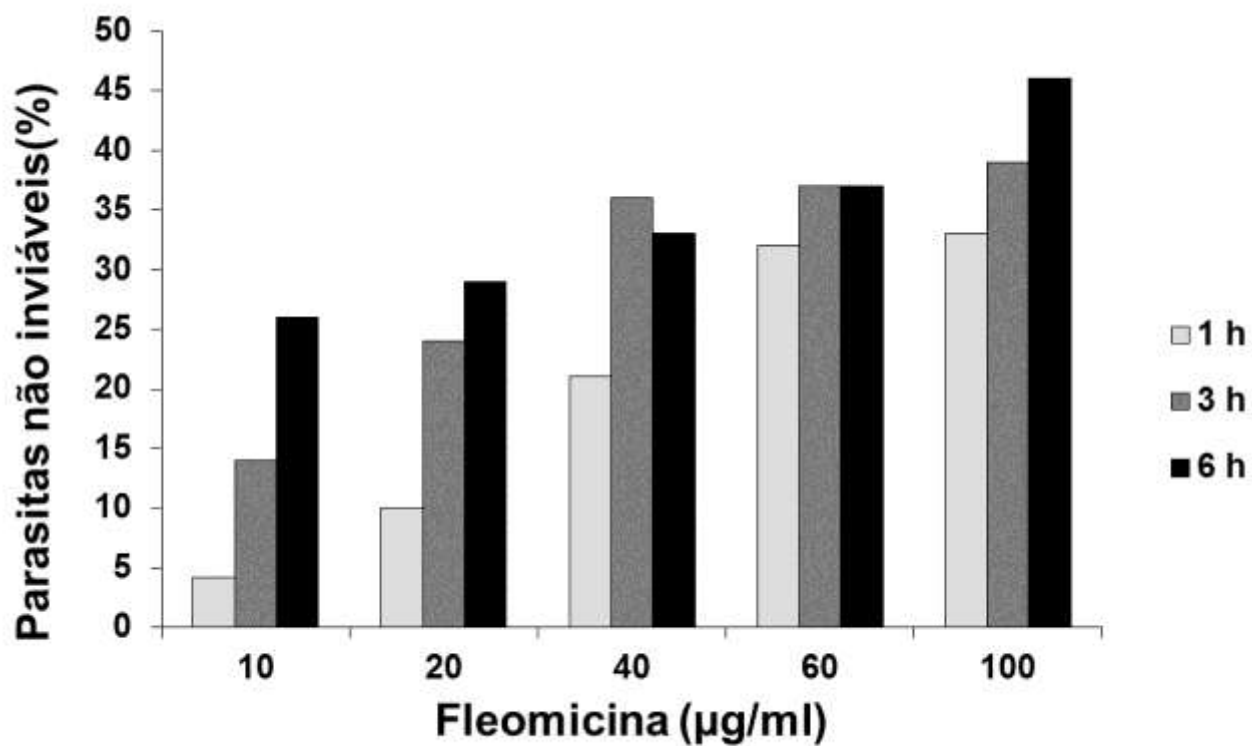
o dano induzido pela fleomicina foi rapidamente reparada, assim decidiu-se realizar a maioria dos experimentos apresentados nesta tese utilizando a concentração de 20-40µg/ml de fleomicina e dentro do período de incubação 0- 3h.

Em seguida verificou-se o ciclo celular desses parasitas quando estes foram tratados com a droga. Assim os promastigotas de *Leishmania amazonensis* não tratados (controle) e tratados com fleomicina (20 µg/ml) por 1h, 3h, 6h, 12h e 24h, foram submetidos à análise por citometria de fluxo conforme descrito na metodologia (item 3.9). A figura 8C representa um histograma comparando a fluorescência do iodeto de propídio em relação à quantidade de DNA dos parasitas controle (C) com os parasitas tratados com a droga (F), Observa-se na Fig.8C que provavelmente em resposta ao dano ocasionado pela fleomicina, os parasitas sofreram um atraso nas fases G1 e S do ciclo celular, logo nas primeiras 3 horas, (indicado pela seta) persistindo até 24horas em comparação aos parasitas não tratados.. Este resultado sugere que a fleomicina atua inibindo o crescimento dos parasitas e provavelmente ativando *checkpoints* do ciclo celular nas fases G1/S,estabelecendo uma provável sincronização da cultura, já que ainda persistem parasitas viáveis na cultura.

Fig.8



B)



C)

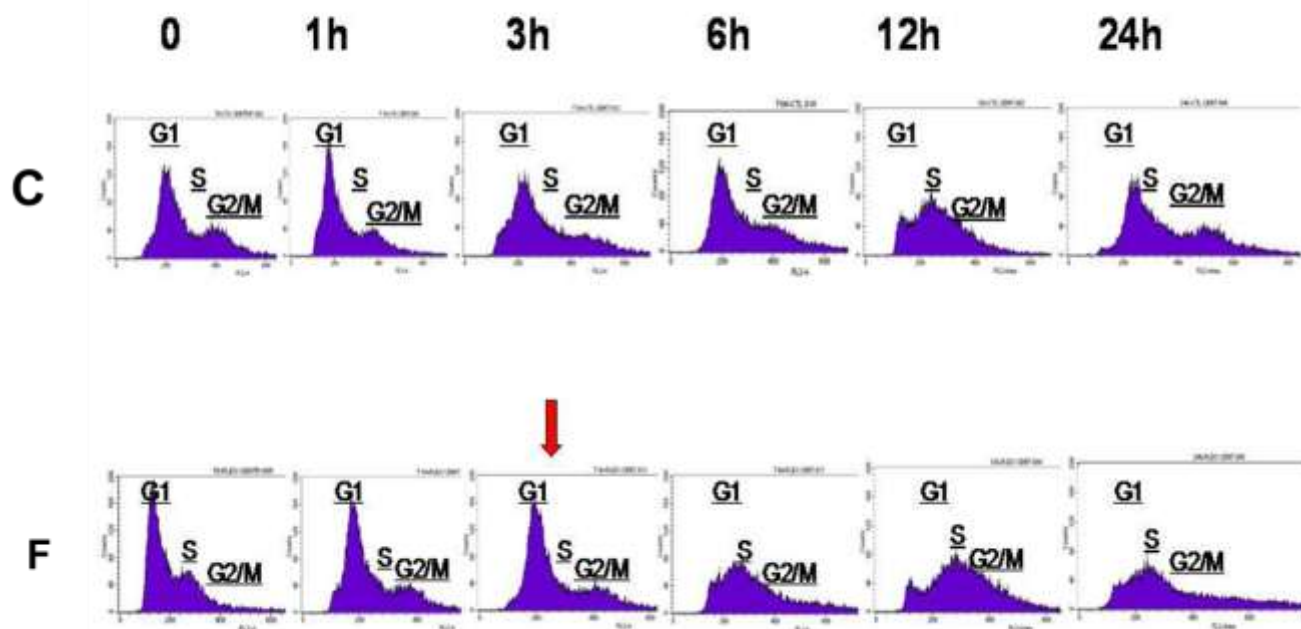


Fig. 8. Fleomicina inibe o crescimento dos parasitas e induz parada em G1/S no ciclo celular de formas promastigotas de *L. amazonensis*. A) Curva de crescimento de parasitas não tratados e

tratados com diferentes concentrações (10-100µg/ml) de fleomicina por 0h-6h. As células foram contadas em câmara de Neubauer. B) Teste de exclusão celular usando o corante azul de Tripán. Em células viáveis, o azul de tripán não é absorvido, entretanto, penetra na membrana das células mortas, como as células vivas são excluídas da coloração esse teste é chamado teste de exclusão, assim o gráfico mostra a quantidade de parasitas inviáveis na cultura após o tratamento com 10,20,40, 60 e 100 µg/ml de fleomicina, por 0h, 1h, 3h e 6h. C) Os histogramas medem a fluorescência do iodeto de propídio em relação à quantidade de DNA das células dos parasitas. Os parasitas controles (C) e os parasitas tratados com 20 µg/ml de fleomicina (F), foram coletados nos tempos: 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h e 24 h. Cada histograma representa dados coletados em 20.000 eventos para cada amostra. A análise do conteúdo do DNA das células destes parasitas foram realizadas em um citômetro analítico FACSCalibur (Becton Dickinson), e o programa utilizado para plotagem desses histogramas foi o CELL Quest.

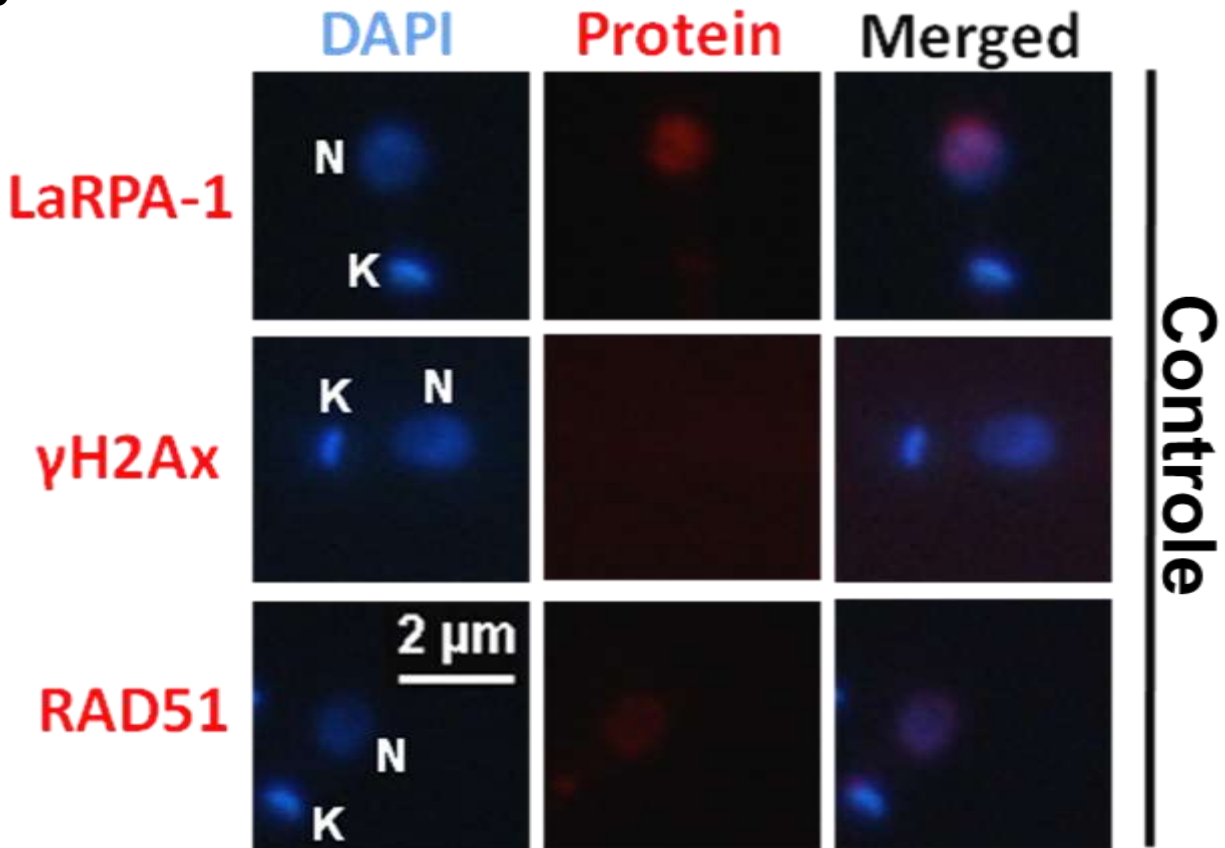
4.3. Fleomicina induz danos ao DNA: Possível envolvimento de LaRPA-1 e RAD51 na resposta ao dano no DNA induzido por fleomicina

Com a finalidade de verificar se a fleomicina está ocasionando danos ao DNA de *Leishmania amazonensis*, além de analisar a expressão de LaRPA-1 e RAD51 na presença da droga, realizou-se ensaios de imunofluorescência indireta (IFI). Parasitas em fase exponencial de crescimento foram tratadas ou não tratadas com 40µg/ml de fleomicina por 0h, 1h e 3h (Fig.9) e submetidas a ensaios de Imunofluorescência Indireta (IFI) (item 3.10). Para confirmar que realmente a fleomicina está causando dano ao DNA desses parasitas, utilizou-se soro específico a um sensor universal a danos ao DNA, a histona γH2Ax (REDON et al., 2002). A Fig.9 representa as imagens capturadas referentes aos parasitas não tratados com a droga (controles) e os parasitas tratados com a droga nos respectivos tempos de incubação. Observa-se que a fleomicina está provocando dano ao DNA desses parasitas, visto que não há marcação do soro anti-γH2Ax nos parasitas controles (não tratados com fleomicina). Em contrapartida, após 1 hora de tratamento com a fleomicina, 90% das células expressam a γH2Ax, sugerindo que ocorreu dano no DNA. Após 3 horas de exposição a droga, ocorre uma visível diminuição da marcação para γH2Ax (mais de 80% das células), sugerindo que o dano foi sinalizado e as proteínas de reparo já foram recrutadas. Foi observado que houve um aumento gradativo na expressão de LaRPA-1 durante o tratamento com a droga, sugerindo que a LaRPA-1 participa na resposta ao dano no DNA, juntamente com RAD51. Contradizendo Mckean, (2001), RAD51 apresentou uma expressão basal em aproximadamente 20% das células que não foram tratadas com fleomicina (C), e teve aumento marcante e gradual de sua expressão, entre 1-

3h de exposição com a droga. Este aumento aparece inicialmente em aproximadamente 60% das células tratadas chegando a 90% das células após 3h de exposição, quando comparado com o controle. Isto sugere que RAD51 deve ser recrutada como parte da maquinaria que repara o dano provocado pela fleomicina. A fig.9B mostra a quantificação da intensidade de fluorescência utilizando o programa Nis-Elements BR.

Fig.9

A)



B)

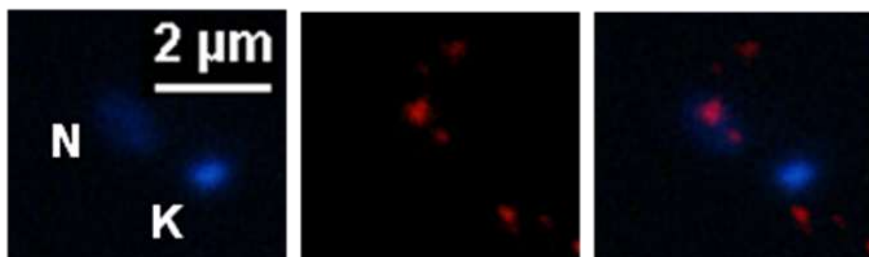
LaRPA-1



γ H2Ax



RAD51



1h Fleomicina

C)

LaRPA-1



γ H2Ax



RAD51



3h Fleomicina

D)

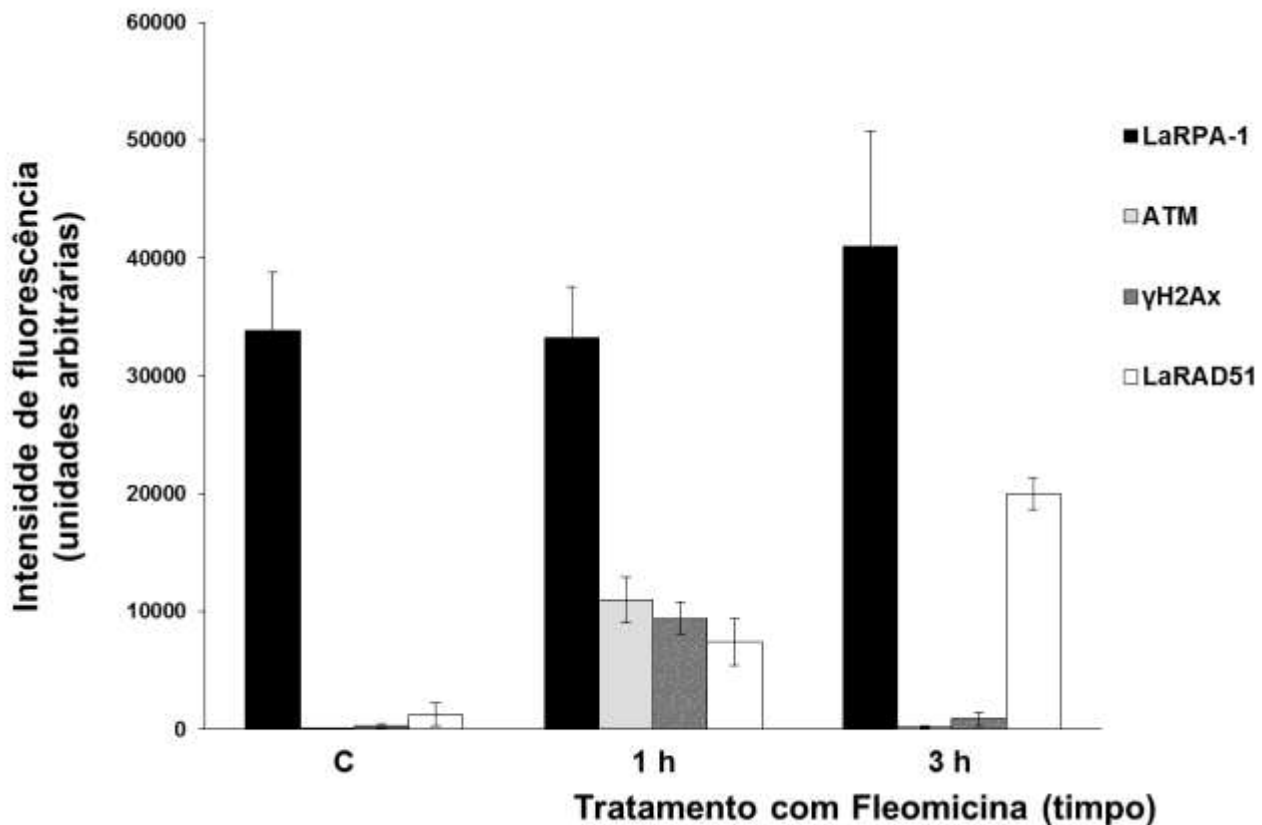


Fig.9. Possível envolvimento de LaRPA-1 e RAD51 na resposta a dano ao DNA induzido fleomicina. A-C) Ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) em parasitas tratados ou não (C) com 40µg/ml de fleomicina por 1h e 3h. As células foram incubadas com soros primários: α-LaRPA-1, α-γH2Ax e α-RAD51 seguido a incubação de soro secundário com Alexa Fluor 555 goat anti-coelho IgG (Invitrogen) (vermelho). Para visualizar o núcleo (N) e o cinetoplasto (K) utilizou-se um corante de DNA, o DAPI. As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Eclipse 80i), usando aumento de 100X e analisadas através do programa Nis-Elements BR. D) Análise quantitativa de intensidade de fluorescência das imagens de IFI (7A), utilizando programa Nis-Elements BR. O gráfico representa a média das intensidades de fluorescência obtidas em 10 células. As barras representam o desvio padrão.

4.4. Fleomicina provoca alterações na expressão das proteínas LaRPA-1 e RAD51

Para verificar se a fleomicina altera a expressão de LaRPA-1 e RAD51 em *L. amazonensis*, foram preparados extratos de núcleo provenientes de parasitas tratados ou não com 40µg/ml de fleomicina por 0h, 1h, 3h e 6h. Esses extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE 10%, e

analisados por Western blotting, revelado com soro policlonal anti-LaRPA-1 e anti-RAD51. Como controle de *loading* a membrana do gel com esses extratos foi corada com Ponceau (0,1%). Nos resultados mostrados na Fig.10., analisou-se a expressão de LaRPA-1 (caixa superior) e RAD51 (caixa inferior). Observando os resultados, nota-se um aumento na expressão da proteína após incubar os parasitas por 1h com a droga, (Fig.10A, linha2, 3 e 4 caixa superior, e fig. 10B) o que de certa forma confirma os achados de IFI (Fig. 10A-C e Fig.10A). Quando se analisou a expressão de RAD51 (Fig.10. caixa inferior), nota-se que a RAD51 apresenta expressão basal em parasitas não tratados com a droga (Fig. 10, linha 1, caixa inferior), confirmando os achados de IFI (Fig 9A-C). No entanto, na presença da droga, a expressão de RAD51 é aumentada imediatamente após 1 hora de tratamento em relação ao controle (Fig. 10, linha 2, caixa inferior), mostrando um pico em 3 horas de exposição com a droga (Fig. 10, linha 3) como observado nos ensaios de IFI mostrados na fig. 9C. Resultado semelhante se observa para a expressão de LaRPA-1 (Fig. 10, linhas1-3, caixa superior e Fig 9B). Após 6 horas de incubação com a droga houve uma diminuição da expressão de RAD51. Esses resultados apresentados sugerem que em *Leishmania* a quebra de DNA na forma de dupla fita induz o mecanismo de reparo por recombinação homóloga, levando a ativação da proteína RAD51 já que o parasita não tem RAD52 em seu genoma. (STAUFFER; CHAZIN, 2004). A Fig. 10B mostra a quantificação da intensidade da banda utilizando o programa scion image.

Fig.10

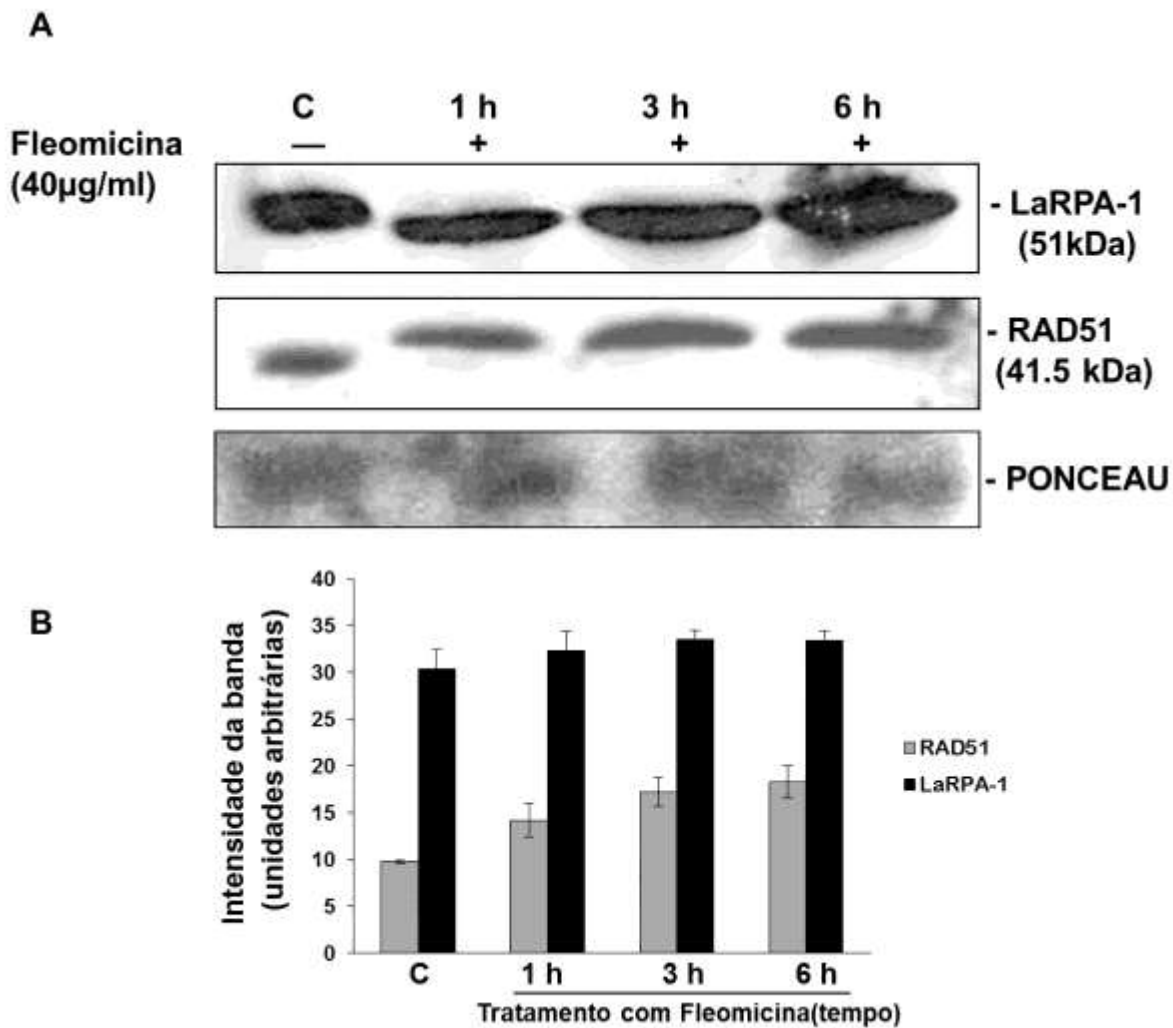


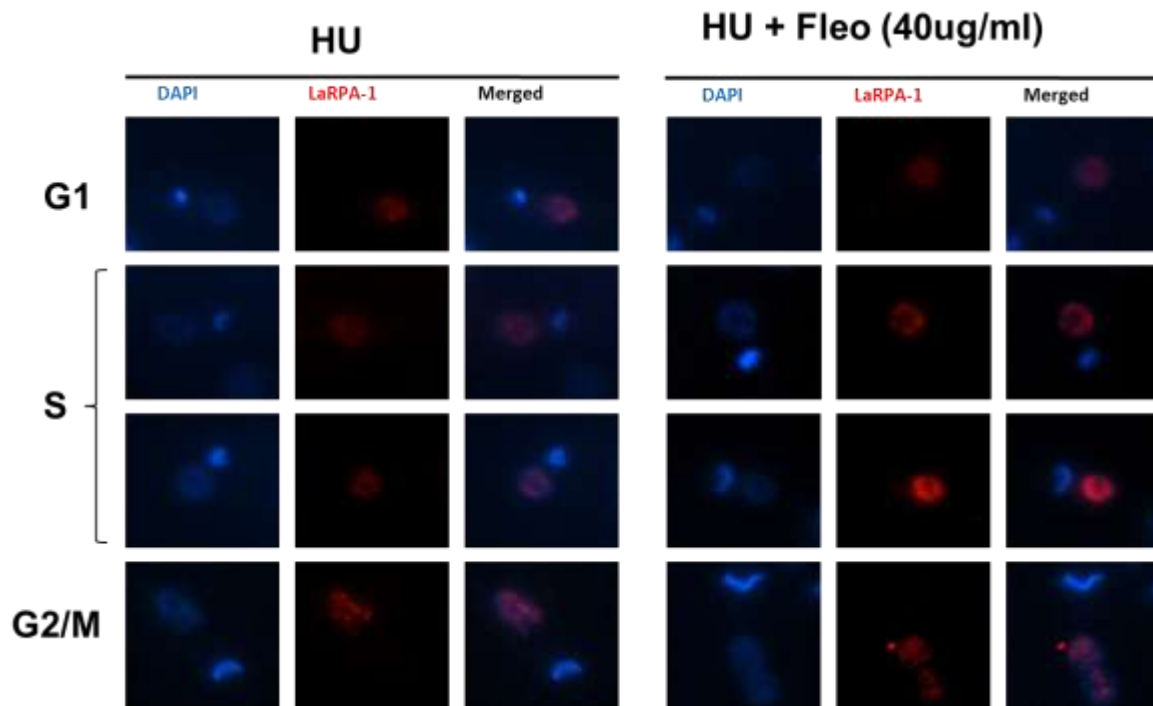
Fig.10. Fleomicina causa alterações na expressão de LaRPA-1 e RAD51 em promastigotas de *L. amazonensis*. **A)** Extrato protéico de núcleo obtidos a partir de parasitas em fase mid log de crescimento incubados em meio livre de fleomicina (controles) (linha 1) e extratos protéicos de núcleos incubados com 40µg/ml de fleomicina por 1h, 3h e 6h, (linha 2-4). As proteínas nucleares foram fracionadas por gel SDS-PAGE 10%, cada linha do gel contém o equivalente de 6×10^7 parasitas, em seguida o gel contendo as proteínas fracionadas foi transferido para uma membrana de nitrocelulose (Bio-rad). Na parte superior foi utilizado para revelação soro anti-LaRPA-1 obtido em coelho. Na parte inferior utilizou-se soro anti-RAD51 obtido em coelho (Abcam). **B)** Análise quantitativa da intensidade do ensaio de western blotting, utilizando o programa Scion image.

4.5. A intensidade de fluorescência de LaRPA-1 e RAD51 aumentam durante a fase S do ciclo celular, em parasitas tratados com fleomicina

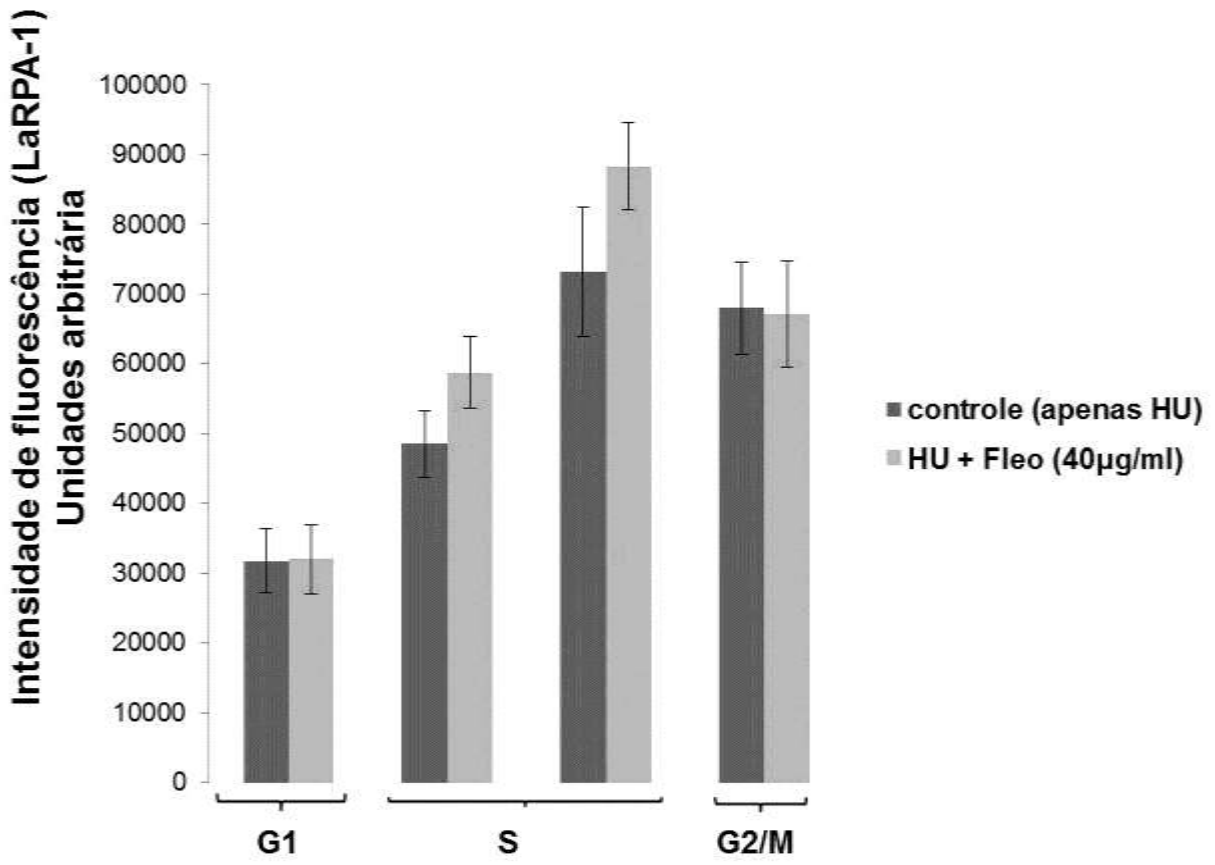
Culturas de parasitas sincronizados com Hidroxiuréia (DA SILVA et al., *in preparation*), foram tratados ou não tratados (C) com 40µg/ml de fleomicina por 1, 3 e 6 h e após esse período de incubação seguiu-se com o ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), o qual foi revelado com soro primário anti-LaRPA-1 e anti-RAD51, e soro secundário Alexa Fluor 555 goat anti-coelho IgG (Invitrogen) (vermelho). Pode-se visualizar nas imagens mostradas na Fig.11A-B que quando se compara os parasitas controles (não tratados com fleomicina) com os parasitas tratados com fleomicina há um aumento na expressão de LaRPA-1 logo na primeira hora de incubação com a droga, atingindo seu ápice em 3h. Após 6 horas de incubação com a droga, a expressão de LaRPA-1 iguala-se aos controles, sugerindo assim que LaRPA-1 pode estar envolvida com a resposta ao dano induzido pela fleomicina. Esse fenômeno é observado em 90% dos campos analisados. Quando se analisa a Fig. 11C-D observa-se que assim como visto nas Fig. 11A-B, houve um aumento na expressão de RAD 51 logo nas primeiras horas de tratamento com a droga e atinge um ápice em 3 horas de tratamento em comparação aos parasitas controles (não tratados com fleomicina). Esse fenômeno é observado em 90% dos campos analisados. Esse resultado sugere que LaRPA-1 e RAD51 participa da resposta ao dano no DNA, assim como mostrado em outros eucariotos.

Fig. 11

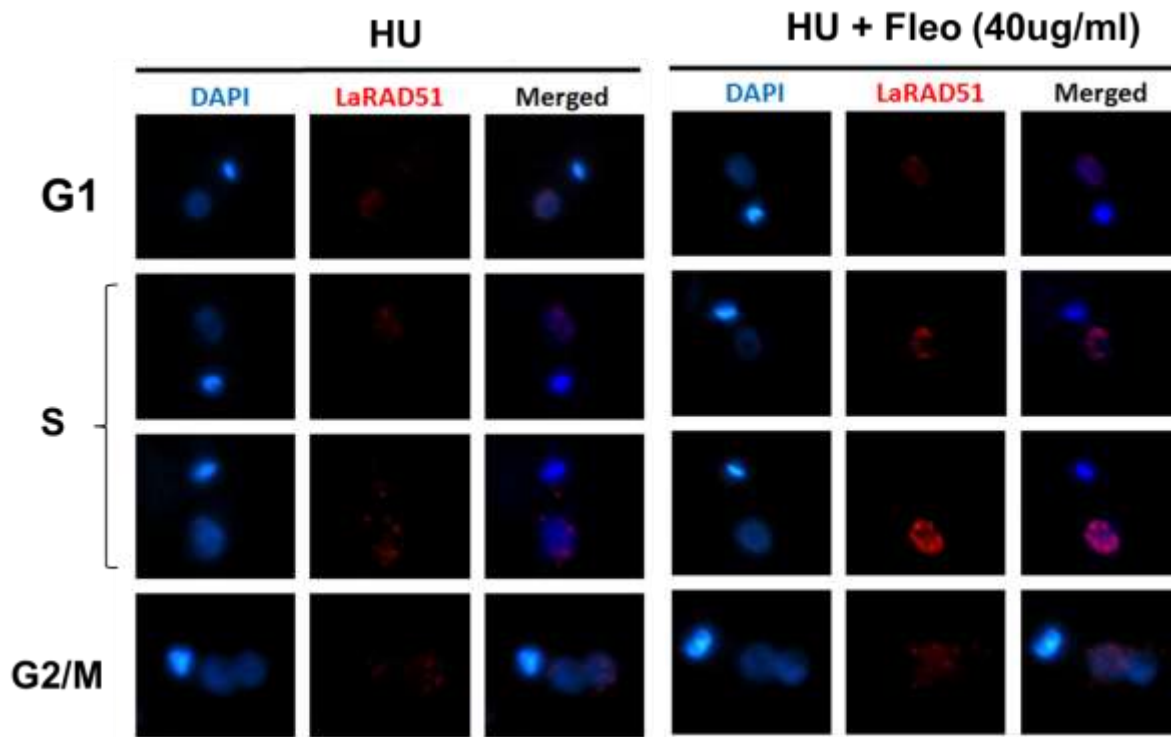
A)



B)



C)



D)

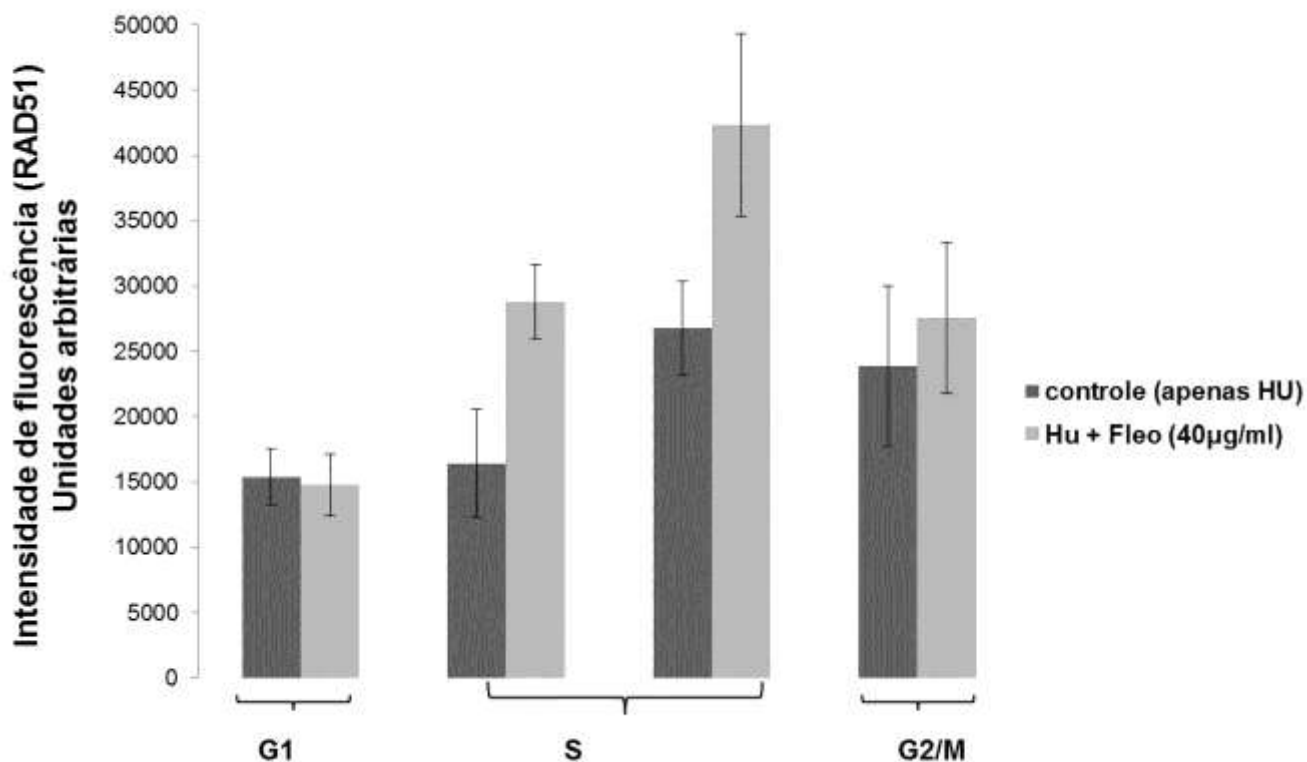


Fig.11. Fleomicina causa aumento da expressão de LaRPA-1 e RAD51 em células sincronizadas com HU. A) Ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) em parasitas com ciclo celular sincronizado com HU, foram tratados ou não (C) 40µg/ml de fleomicina por 1h e 3h. As células foram incubadas com soro primário: α -LaRPA-1, seguido a incubação de soro secundário com Alexa Fluor 555 goat anti-coelho igG (Invitrogen) (vermelho) Para visualizar o núcleo (N) e o cinetoplasto (K) utilizou-se um corante de DNA, o DAPI. As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X e analisadas através do programa Nis-Elements BR. B) Análise quantitativa de intensidade de fluorescência das imagens de IFI (9A), utilizando programa Nis-Elements BR. O gráfico representa a média das intensidades de fluorescência obtidas em 10 células. As barras representam, o desvio padrão. C) Ensaio de imunofluorescência indireta (IFI) em parasitas com ciclo celular sincronizado com HU, foram tratados ou não (C) 40µg/ml de fleomicina por 1h e 3h. As células foram incubadas com soro primário: α -RAD51, seguido a incubação de soro secundário com Alexa Fluor 555 goat anti-coelho igG (Invitrogen) (vermelho) Para visualizar o núcleo (N) e o cinetoplasto (K) utilizou-se um corante de DNA, o DAPI. D) As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X e analisadas através do programa Nis-Elements BR.

4.6. Maior quantidade de LaRPA-1 se associa ao DNA nas primeiras horas de tratamento com fleomicina

Para analisar se na presença de fleomicina ocorria alterações na quantidade de LaRPA-1 e RAD51 associadas a cromatina, preparou-se extratos de cromatina (item 3.5) a partir de parasitas em fase midi log de crescimento tratados ou não com 40ug/ml de fleomicina nos tempo de 0h,1h, 3h e 6h e a cada tempo de incubação foram tratadas ou não com 50U de Dnase. Essas cromatinas foram fracionadas em gel SDS-PAGE 10% e submetidos a Western blotting. Os resultados apresentados na Fig.12 A mostram que houve uma leve alteração na quantidade de LaRPA-1 associada ao DNA (cromatina) em parasitas tratados quando estes foram comparados com o controle, (Fig.12, linhas 1-8), no entanto em 3 horas de incubação com droga e quando este extrato foi incubado com DNase, nota-se uma maior quantidade de LaRPA-1 ligada na cromatina, sugerindo que LaRPA-1 atua na resposta ao dano global no DNA em 3 horas de exposição a droga. Resultado semelhante nota-se quando analisamos RAD51 (Fig. 12B), há uma maior quantidade de RAD 51 em 3 horas quando os extratos foram incubados com Dnase quando comparado aos controles. Resultado semelhante foi obtido no ensaio de IFI em células sincronizadas (Fig.11. Além disso, a LaRPA-1 mostrou diferentes níveis de fosforilação em resposta a danos induzidos pela fleomicina (Fig.12A painel a cima). Isto foi confirmado quando essas bandas fosforiladas foram abolidas quando esses extratos de cromatina foram tratados com fosfatase alcalina (CIP) (Fig. 12A painel do meio). Estes achados sugerem que após 1h de tratamento coma fleomicina maior quantidade de LaRPA-1 e RAD 51 são ligados a cromatina quando tratados com fleomicina e parte da laRPA-1 é fosforilada/ hiperfosforilada e é liberada do DNA provavelmente para dar o lugar a outras proteínas de reparo , como RAD51. Como controle do experimento as membranas foram coradas com ponceau.

Fig.12.

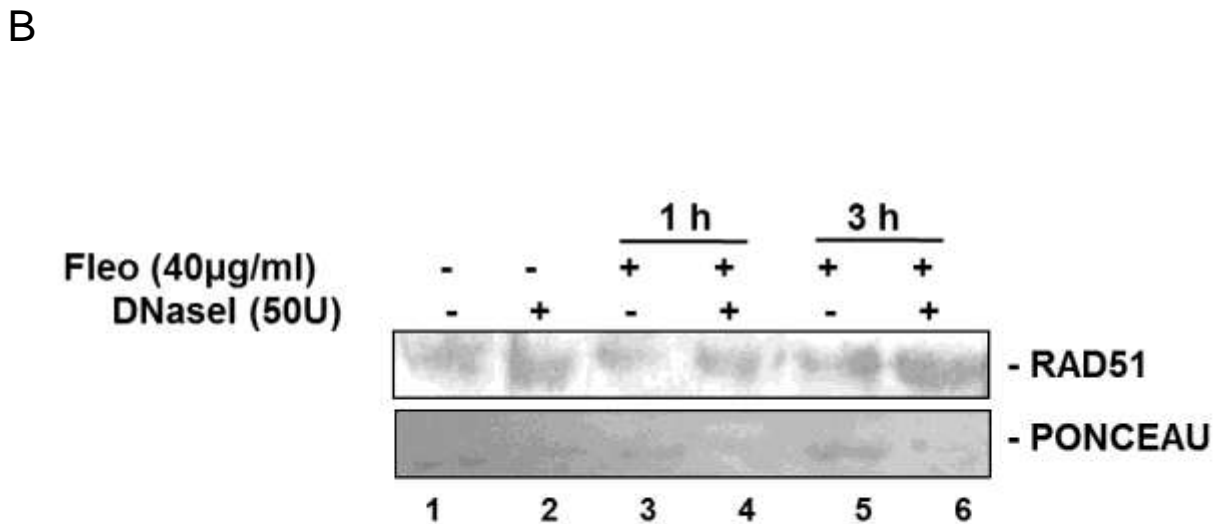
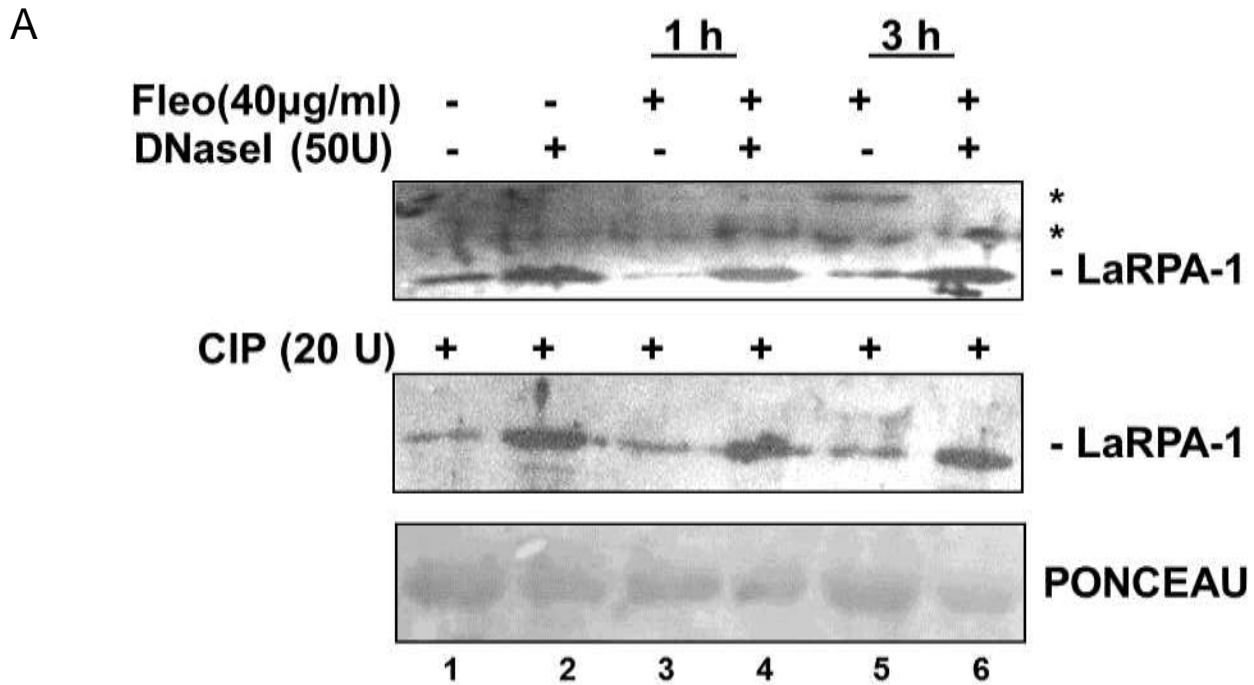


Fig. 12. Fleomicina desencadeia níveis de fosforilação da LaRPA-1 e aumento da quantidade de LaRPA-1 e RAD 51 associadas à cromatina em promastigotas de *L. amazonenses*, em 3 horas de tratamento com fleomicina. **A)** O tratamento com CIP foi utilizado para eliminar as bandas que sugeriam ser bandas fosforiladas da LaRPA-1 (marcadas com asterisco) induzidas após o tratamento dos parasitas com fleomicina (Fig. 12 A , painel do meio, linhas 1-6). **A-B)** A quantidade de LaRPA-1 (A) e RAD51(B) ligadas a cromatina foram analisadas por western blotting utilizando soros anti LaRPA-1 e RAD51 respectivamente. Para isto foram preparados extratos de cromatina de 10^7

parasitas tratados ou não com 40µg/ml de Fleomicina (Fig. 12 A e 12 B, linhas 1-6), foram tratadas (Fig. 12 A e 12 B, linhas, 2,4 e 6) ou não (Fig. 12 A e 12 B linhas, 1,3,5 e 7) com 50U de Dnase e fracionadas em gel SDS-PAGE 10 % e submetidos a Western blotting.

4.7. A LaRPA-1 interage com RAD51 e telomerase, sugerindo possível participação destas proteínas na resposta a danos nos telômeros.

Para verificar se a fleomicina provoca alteração nas interações entre LaRPA-1 e outras proteínas, foram realizados ensaios de imunoprecipitação. Para isso, os complexos imunoprecipitados com soro anti-LaRPA-1 (camundongo) (ítem 3.16), foram fracionados em gel SDS-PAGE 10% e analisados por Western blotting (Fig. 13B). A Fig. 13 A-B mostra resultados de Western dos blotting de extratos de núcleo utilizados para o ensaio de imunoprecipitação (input 10%) (Fig.13A) e 1/1 dos eluatos contendo proteínas imunoprecipitadas, ambos revelados com soro anti-LaRPA-1, anti-RAD51, anti-TERT e anti-Histona H2A não fosforilada. Analisando a Fig. 13B (painel à esquerda) nota-se que a LaRPA-1 pode formar complexos com RAD51 e com telomerase, mesmo na ausência de fleomicina, e esta interação tornou-se mais forte quando os parasitas foram tratados por 3 horas com fleomicina. Para mostrar que essas proteínas estão ligadas ao DNA, revelou-se os eluatos de Imunoprecipitação e o input (Fig. 13A) com histona, analisando a Fig. 13B (painel a esquerda) nota-se que uma maior quantidade de histona é imunoprecipitada com LaRPA-1 em 3 horas de tratamento com fleomicina, sugerindo que LaRPA-1 se liga mais fortemente ao DNA nesse tempo de tratamento com a droga. Como controle do experimento os eluatos de imunoprecipitação foram revelados com soro pré imune (fig.13C)

Fig.13

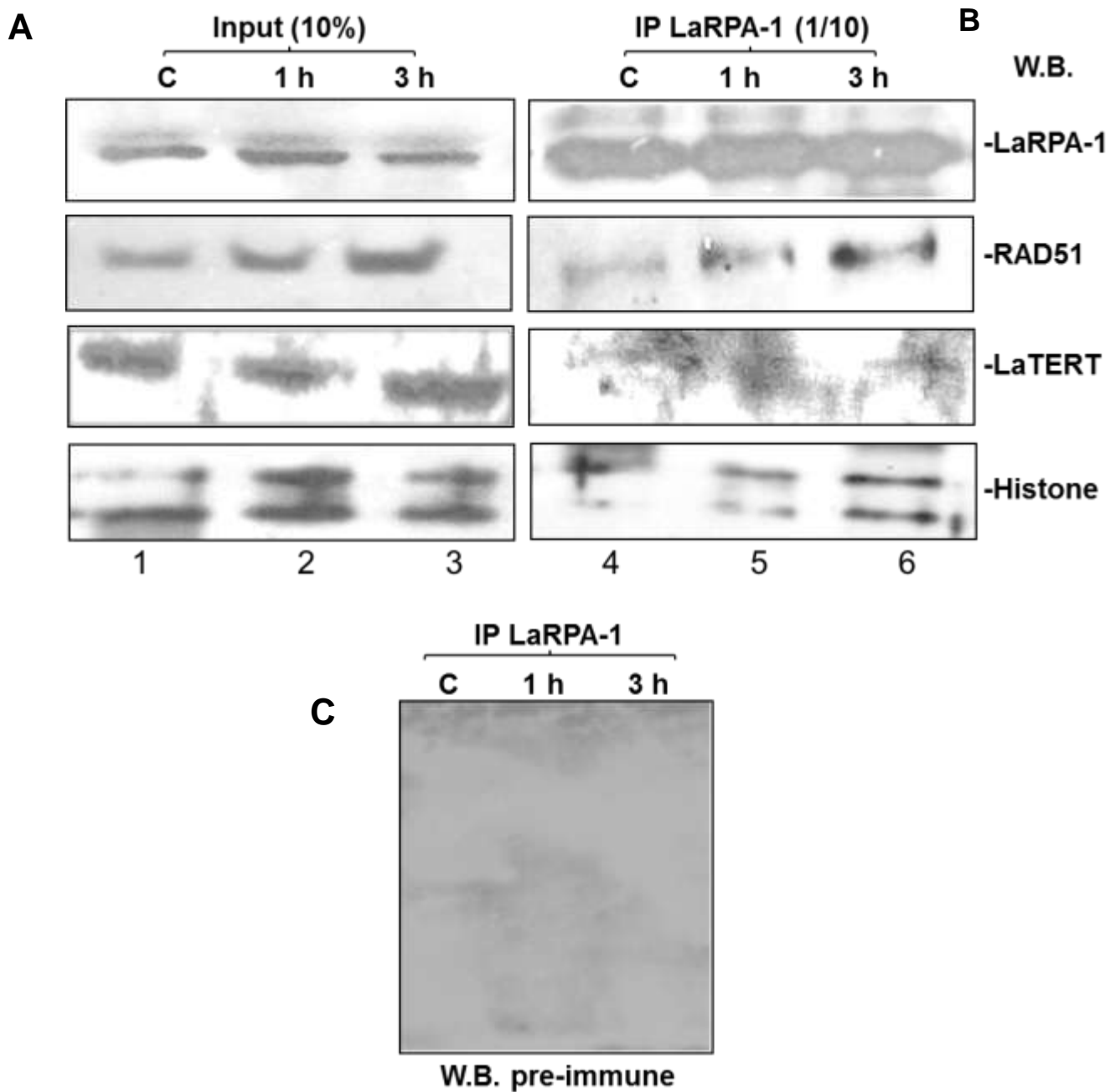


Fig.13. LaRPA-1, RAD51 e Telomerase formam parte de um mesmo complexo em *Leishmania amazonensis*. Em A) Corresponde 10% do input (extrato de núcleo) utilizado no ensaio de imunoprecipitação, esses extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE, e revelados com soro anti-LaRPA-1, anti-RAD51, anti-TERT e anti-Histona H2A. B) extratos obtidos a partir de parasitas tratados e não tratados (C) com 40µg/ml de fleomicina por 1h e 3h, foram imunoprecipitados em coluna

proteína Handee™ spin column, juntamente com proteína A (Crosslink Immunoprecipitation Kit- Pierce) e soro policlonal anti-LaRPA-1 produzido em camundongos. Linha 1, 10% do input utilizado no ensaio, Linha 2-4, 1/10 dos eluatos contendo as proteínas imunoprecipitadas foram fracionados em gel SDS-PAGE, e revelados com soro anti-LaRPA-1, anti-RAD51, anti- TERT e anti-Histone. C) Como controle do experimentos os eluatos contendo as proteínas imunoprecipitada foram revelados com soro pré-imune.

4.8. LaRPA-1 e RAD51 são recrutados para os telômeros em parasitas tratados com fleomicina.

4.8.1. Co-localização da proteína LaRPA-1 e RAD51 nos telômeros quando os parasitas foram tratados com fleomicina.

Realizou-se ensaio de imunofluorescencia indireta combinada com hibridização fluorescente *in situ* (FISH),(item 3.17) utilizando como sonda o kit Telomere PNA FISH Kit/FITC (DakoCytomation) (Fig.14) e protocolo previamente estabelecido (SIQUEIRA NETO et al. 2007, DA SILVA, et al. 2010). Os parasitas utilizados neste ensaio foram tratados ou não (C) com 40µg/ml de fleomicina por 1h, 3h e 6h, em seguida foram submetidos a um ensaio de IFI usando como soro primário anti-LaRPA-1 (Fig. 14A) e soro primário anti-RAD51(Fig.14B), como soro secundário foi utilizado Alexa flúor 555. Analisando a Fig. 14A, observa-se que quando os parasitas foram tratados por 1h com 40ug/ml de fleomicina, há um aumento na marcação de LaRPA-1 no telômero comparando com os parasitas não tratados com a droga (C), e essa marcação aumento ainda mais em em 3 horas de tratamento com a droga, esses resultados coincidem com os resultados obtidos no ensaio de innoprecipitação da cromatina (ChIP) hibridizada com a sonda telomérica da fita C (-Tel 1[(CCCTAA)]₃, (Fig.14B), quando ocorreu um aumento da cromatina imunoprecipitada com anti-LaRPA de parasitas tratados com a droga por 1 hora e 3 horas, sugerindo mais uma vez que a LaRPA-1 é recrutada imediatamente para os telômeros em resposta a danos no DNA. Na fig. 14B pode se observar a colocalização de RAD 51 no telômero em 3 horas de tratamento com a droga, sugerindo que a fleomicina provoca sítios de

DNA danificado conhecidos por focos de DNA telomérico não funcionais ou TIFs (“telomere-dysfunction induced foci”) nos telômeros desses parasitas e que LaRPA-1 e RAD51 estão atuando na resposta local.

Fig. 14

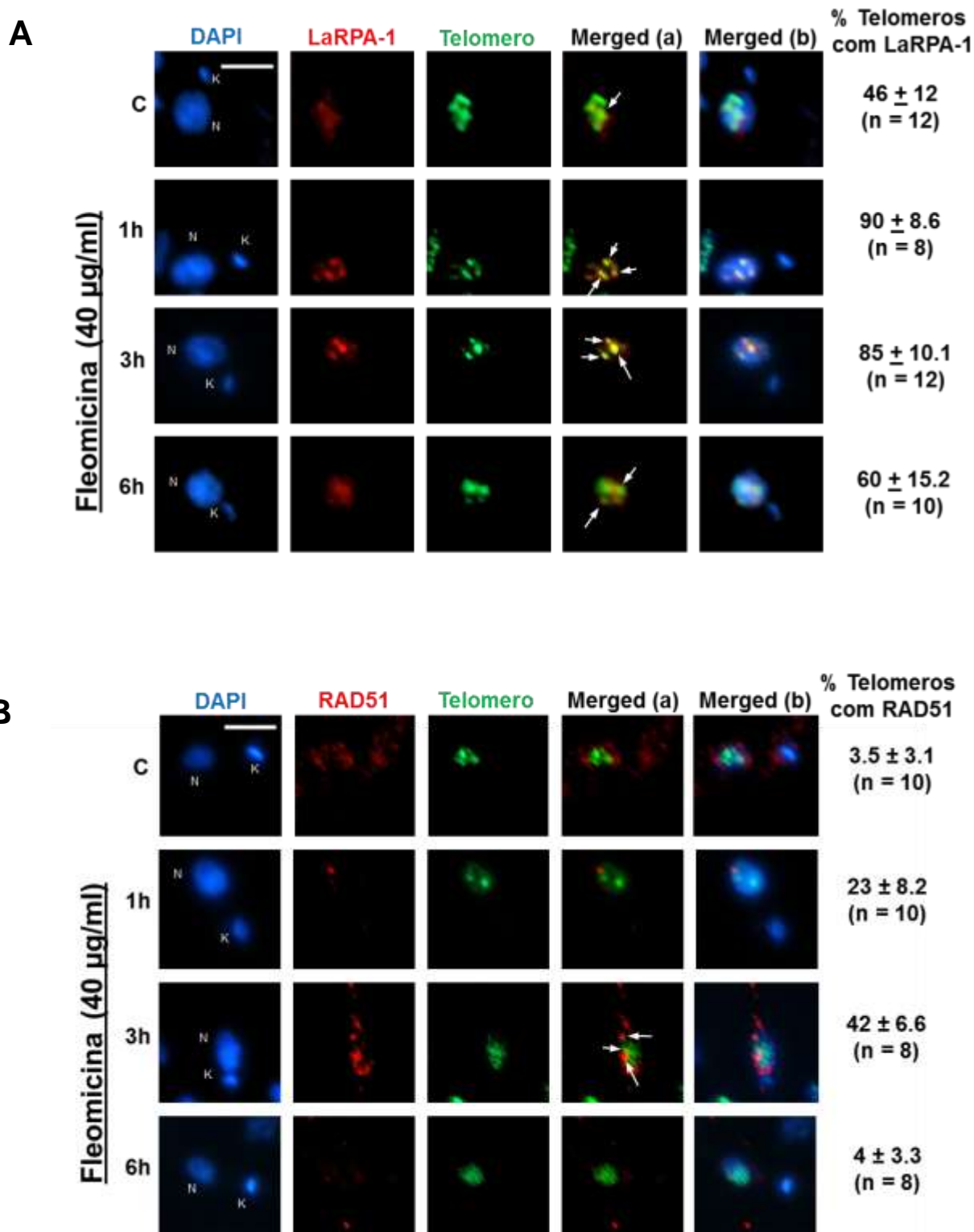


Fig.14. Provável participação da LaRPA-1 e RAD51 na resposta a danos no telômero em *L. amazonensis*. Parasitas tratados ou não (C) com 40µg/ml de fleomicina por 1h, 3h e 6h. **A)** No ensaio de IFI as células foram incubadas com soros primário α-LaRPA-1, seguido a incubação de soro secundário marcado com Alexa Flúor 555 anti-igG de coelho (Invitrogen) (vermelho). Em

seguida as lâminas foram incubadas com sonda telomérica, utilizando o kit Telomere PNA FISH Kit/FITC (DakoCytomation) (verde). As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X e analisadas através do programa Nis-Elements BR. Para visualizar o núcleo (N) e o cinetoplasto (K) utilizou-se um corante de DNA, o DAPI. **B)** No ensaio de IFI as células foram incubadas com soros primário α -RAD51, seguido a incubação de soro secundário marcado com Alexa Flúor 555 anti-igG de coelho (Invitrogen) (vermelho). Em seguida as lâminas foram incubadas com sonda telomérica, utilizando o kit Telomere PNA FISH Kit/FITC (DakoCytomation) (verde) . Colocar Ke N na fig e falar o q o DAPI. As imagens foram analisadas por microscopia de fluorescência (Nikon Exclipse 80i), usando aumento de 100X e analisadas através do programa Nis-Elements BR. Para visualizar o núcleo (N) e o cinetoplasto (K) utilizou-se um corante de DNA, o DAPI. As flechas apontam a co-localização da proteína de interesse no telômero do parasita.

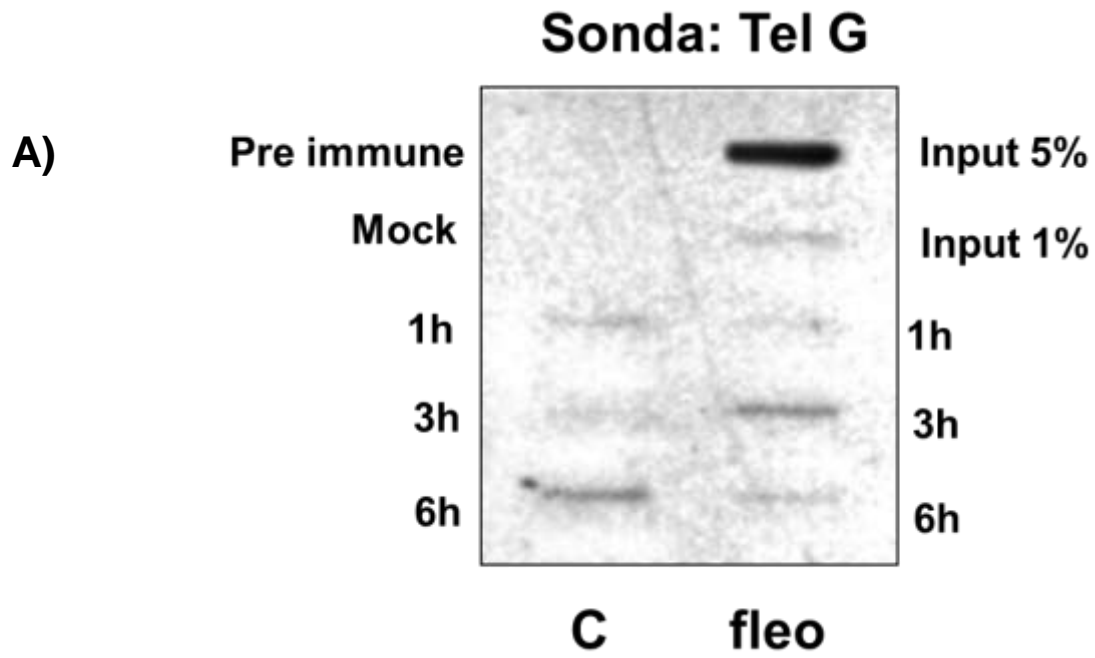
4.8.2. LaRPA -1 é recrutada para os telômeros em parasitas tratados com fleomicina

As inúmeras proteínas que compõem os telômeros permitem diferenciar os terminais cromossômicos normais de DNA quebrado na forma de dupla fita, assim protegendo-os da ação deletéria das proteínas de reparo que estão presentes nesses terminais (BAILEY et al., 1999; BOULTON; JACKSON, 1998). Quando analisa-se os telômeros em relação a resposta ao dano induzido por fleomicina, percebe-se que assim como no DNA não telomérico, os telômeros também respondem mediante a ocorrência de um dano (LINGER; PRICE, 2009). Por estas razões é de grande importância compreender os mecanismos que controlam os telômeros através das proteínas que o compõem e das interações entre elas.

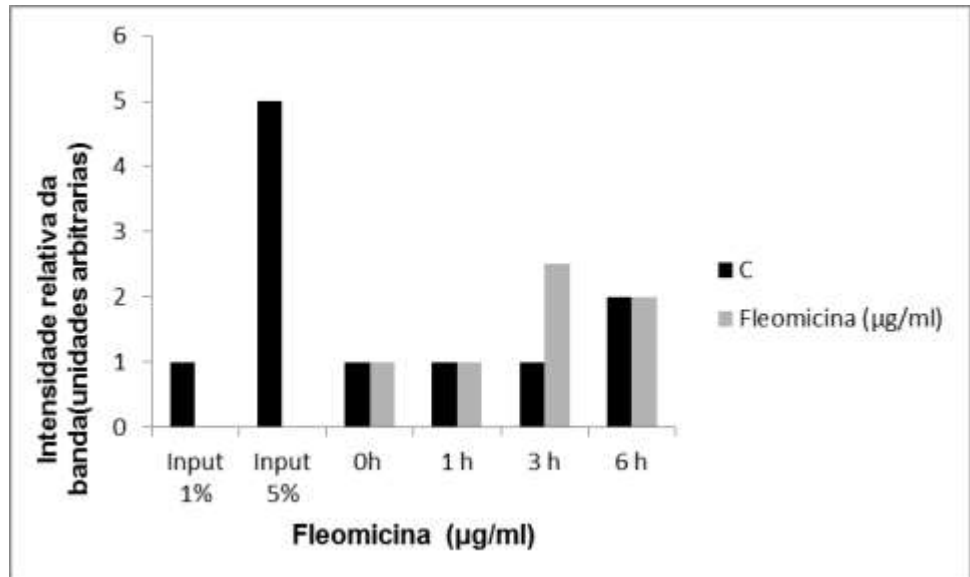
Assim, procurou-se compreender como se inicia a resposta ao dano nos telômeros em *Leishmania*. Para tal, os parasitas foram tratados ou não com 20 μ g/ml de fleomicina em diferentes tempos (0h, 1h, 3h e 6h), esses parasitas foram submetidos a ensaio de imunoprecipitação de cromatina. O DNA imunoprecipitado que era parte da cromatina obtida foi transferido para uma membrana e hibridizado com diferentes sondas (TelG, TelC) a fim de verificar se havia DNA telomérico na cromatina imunoprecipitada. (Fig.15 A e C). Na Figura 15C, a cromatina imunoprecipitada com anti-LaRPA foi hibridizada com a sonda telomérica da fita G [Tel6-(5'TTAGGG-3')₆] que hibridiza com a fita telomérica rica em C. Os resultados mostram que nos parasitas não tratados com a droga, quando comparado aos *inputs* (1% e 5%), a quantidade de LaRPA-1 ligada a fita telomérica rica em C é de aproximadamente 2,5% após 6 horas de crescimento do parasita, o que coincide com o momento de uma duplicação da cultura (dados não

mostrados) e com o possível envolvimento da LaRPA-1 com a replicação do DNA. Nos períodos que antecedem as 6h de crescimento do parasita, a quantidade de DNA telomérico imunoprecipitado permaneceu entre 0,8 e 1%, como mostrado anteriormente (SIQUEIRA NETO et al., 2007). Em contraste, quando os parasitas foram tratados por 3h com fleomicina, a quantidade de LaRPA-1 nos telômeros dobra em relação ao controle (de 1% para aproximadamente 2%) coincidindo com o momento que a fleomicina induz parada no ciclo celular (ver Fig 8C). Foram usados como controle do experimento, DNA telomérico não imunoprecipitado (mock) e imunoprecipitado com soro pré-imune. Em 15A a cromatina imunoprecipitada com anti-LaRPA foi hibridizada com a sonda telomérica da fita C (-Tel 1[(CCCTAA)]₃, que hibridiza a fita telomérica rica em G. Aqui pode-se observar que a quantidade de LaRPA-1 recrutada após 1h de tratamento com a droga dobra em relação ao controle e ela permanece associada aos telômeros até 3h de tratamento com a droga. Isto sugere que a LaRPA-1 responde ao dano induzido pela fleomicina, e que esta resposta é preferencialmente mais rápida para a fita telomérica rica em G, a qual é considerada alvo principal de interação de LaRPA-1 nos telômeros do parasita (BOCHLKAREVA et al., 2001). Esses resultados sugerem que na quantidade de 20 µg/ml a fleomicina pode causar danos ao DNA de *Leishmania*, isto evidenciado pelo recrutamento da LaRPA-1 para o telômero. Além disso, nessa concentração, a droga deve ter estimulado pontos de checagem de ciclo celular que levaram a parada em G1/S após 6 h de tratamento (Fig.8C). As Fig. 15B e 15D representam a quantificação através do programa Scion image da quantidade de DNA imunoprecipitada com LaRPA-1 nas respectivas fitas teloméricas.

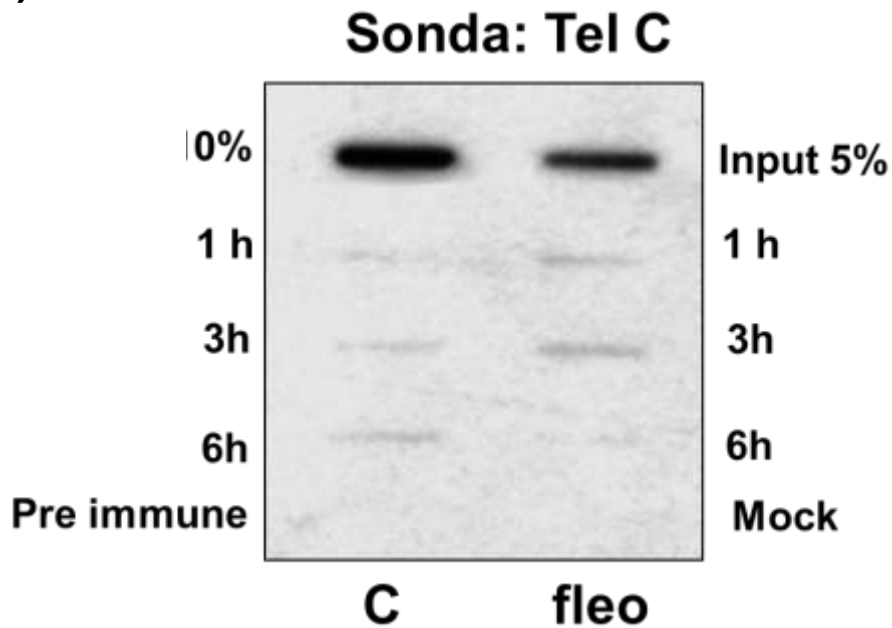
Fig. 15



B)



C)



D)

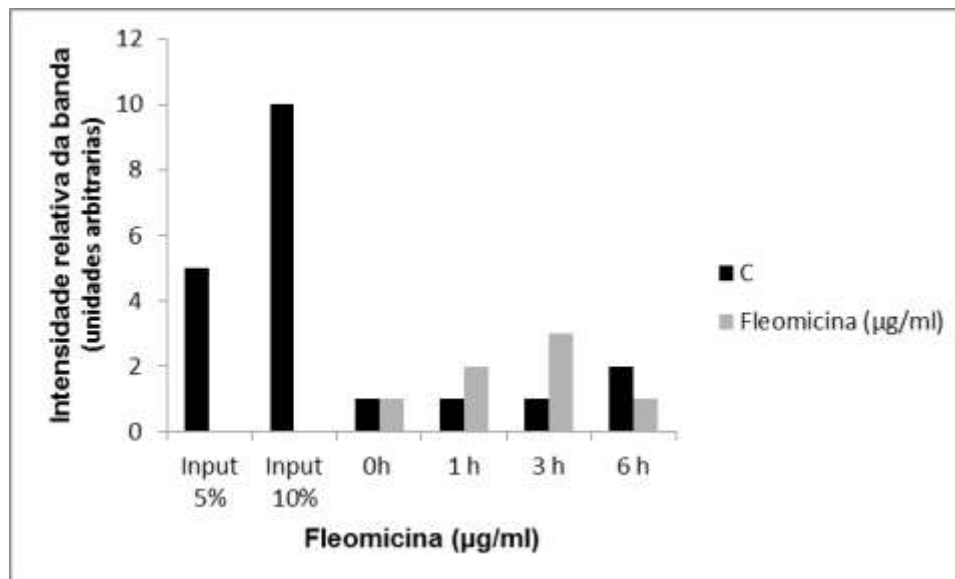


Fig.15. LaRPA-1 é rapidamente recrutada para os telômeros quando os parasitas são tratados com fleomicina. A) DNA de promastigotas de *L. amazonensis* não sincronizadas em relação ao ciclo celular e em fase mid log de crescimento, foram tratados (Fleo) ou não (C) com fleomicina. E estes foram imunoprecipitados com soro anti-LaRPA-1 com ou com soro pré-imune (*pre immune*) Para o controle da reação foram utilizadas células não imunoprecipitadas com soro (*mock*). O *input* corresponde a 1% e 5% do DNA total de $0,8 \times 10^8$ células. As amostras foram transferidas para membrana e o DNA foi hibridizado com a sonda telomérica Tel TelG a qual hibridiza a fita telomérica rica em C.B) Quantificação da intensidade de banda usando o programa Scion image.

C) DNA de promastigotas de *L. amazonensis* não sincronizadas em relação ao ciclo celular e em fase mid log de crescimento, foram tratados (Fleo) ou não (C) com fleomicina, estes foram imunoprecipitados com soro anti-LaRPA-1 com ou com soro pré-imune (*pre immune*) Para o controle da reação foram utilizadas células não imunoprecipitadas com soro (*mock*). O *input* corresponde a 1% e 5% do DNA total de $0,8 \times 10^8$ células. As amostras foram transferidas para membrana e o DNA foi hibridizado com a sonda telomérica Tel C que hibridiza a fita telomérica rica em G. D) Quantificação da intensidade de banda usando o programa Scion image.

5. Discussão

Inúmeras proteínas que coordenam a dinâmica da estrutura telomérica estão associadas aos telômeros formando um grande complexo nucleoprotéico. Este complexo protéico é responsável por manter a estabilidade do telômero e também por regular o acesso a telomerase (DMITRIEV et al., 2003; AUBERT; LANSDORP, 2008). Essas proteínas teloméricas podem estar associadas diretamente ao DNA, a outras proteínas teloméricas ou ainda a outros fatores, tais como proteínas das maquinarias de replicação e de reparo a danos no DNA (SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004, de LANGE 2005), algumas tendo ação dependente, inclusive, da fase do ciclo celular (LONGHESE 2008). Estas proteínas geralmente estão envolvidas na regulação da atividade de telomerase e na resposta a danos no DNA telomérico. Estudos recentes têm facilitado este entendimento e confirmam que os telômeros podem ser temporariamente reconhecidos ou se assemelharem estruturalmente a DNA quebrado na forma de dupla fita (DSB) (LONGHESE, 2008). No entanto, esses terminais mantêm-se normalmente em um estado protegido (“capped”) os quais não são reconhecidos por proteínas dos complexos de resposta e reparo a danos ao DNA.

Em mamíferos, seis proteínas se associam a repetição TTAGGG no terminal dos cromossomos formando um complexo nucleoproteico denominado “shelterina” (DE LANGE, 2005). Este complexo permite distinguir células normais de células com DNA danificado/quebrado nas extremidades dos cromossomos, reprimindo ações drásticas da maquinaria de reparo no local, principalmente a ações das quinases ATM e ATR, e regulando a manutenção dos telômeros via telomerase (LIU et al., 2004). Outro complexo telomérico, o complexo CST, formado por proteínas “RPA-like” e que têm homólogos funcionais e estruturais em leveduras, plantas e humanos, apresentam funções teloméricas e extra-teloméricas que lhe conferem independência de “shelterina”

para atuar nos telômeros e em outras maquinarias (WELLINGER, 2009). Especula-se inclusive que um complexo CST mínimo compõe os telômeros de *Leishmania* spp. (DA SILVA et al., em preparação).

Há uma década não se conhecia nenhuma proteína que se associava aos telômeros de *Leishmania*, hoje já é possível estabelecer um panorama parcial da constituição da cromatina telomérica de *L. amazonensis* (Fig.6). Em nosso laboratório, foram identificados três complexos protéicos que se associam *in vitro* ao DNA telomérico simples fita rico em G (FERNÁNDEZ et al., 2004). Duas proteínas que compõem dois destes complexos foram identificadas em extratos nucleares de *L. amazonensis* utilizando-se métodos bioquímicos. São elas as proteínas LaRbp38 e LaRPA-1 (FERNÁNDEZ et al., 2004). Ambas também interagem e co-localizam com os telômeros do parasita *in vivo* (LIRA et al., 2007a, SIQUEIRA NETO et al., 2007). Também já foram identificadas proteínas que se associam à dupla-fita telomérica desta espécie, como a LaTBP1, a LaRBP38 (LIRA et al., 2007b) e a LaTRF (DA SILVA et al., 2010) além da enzima telomerase responsável pela alongação dos terminais cromossômicos (CANO et al., 1999; GIARDINI et al., 2006, GIARDINI et al., 2010).

O foco deste trabalho é a proteína LaRPA-1, que em *Leishmania* spp., corresponde ao homólogo da subunidade 1 do trímero que compõe o complexo RPA (LaRPA-1). (SIQUEIRA NETO et al., 2007). O complexo (RPA) compreende três proteínas conservadas na escala evolutiva, que complexadas são consideradas o principal ligante de DNA na forma de simples-fita no genoma de eucariotos (WOLD, 1997). Este complexo apresenta funções essenciais no metabolismo do DNA, participando das maquinarias de replicação, reparo, recombinação, “checkpoint” e transcrição (LONGHESE et al., 1994, WOLD, 1997, SMITH et al., 2000). RPA1 e RPA2 também atuam na regulação dos telômeros em leveduras, mamíferos e protozoários (SMITH et al., 2000, SCHRAMKE et al., 2004, KIBE et al., 2007, KOBAYASHI et al., 2010, LIRA et al., 2007b), sendo por isso consideradas importantes para a coordenação do metabolismo de DNA nas células eucarióticas.

A RPA aparece nos telômeros de leveduras transientemente durante a fase S do ciclo celular (VERDUN; KARLSEDER, 2006), e está envolvida na ativação dos pontos de checagem do ciclo

celular. Nos telômeros de leveduras atua ativando a enzima telomerase através da interação com as proteínas CDC13 e Est1, que fazem parte do complexo do telossomo (LONGHESE, 2008). Já, em *Leishmanias* spp. a ação da proteína LaRPA-1 identificada *in vivo* em associação com os telômeros, pode ser funcionalmente idêntica às das proteínas CDC13 de leveduras e POT1 de mamíferos e plantas, uma vez que está demonstrado que não existem proteínas semelhantes ou homólogos a POT1 e a CDC13 no genoma destes parasitas (SIQUEIRA NETO et al., 2007; LIRA et al., 2007b). Lembrando que as proteínas CDC13 e POT1 apresentam papel importante na proteção e regulação do tamanho dos telômeros, e são essenciais para a normal proliferação celular (XIN et al., 2007; WANG et al., 2007, TAGGART et al., 2002).

Já o envolvimento da RPA com a resposta a danos no DNA desencadeia a hiperfosforilação da subunidade 2 em humanos e o recrutamento de proteínas da família RAD, como a RAD51 em leveduras (OAKLEY et al., 2003, BINZ et al., 2004). Foi descrito em *C. elegans* que a subunidade 1 da RPA (RPA-1) sofre fosforilação através das proteínas quinases CHK1, ATM e ATR quando ocorre quebra na dupla fita do DNA (DSBs) ocasionado por radiações ionizantes (LEE, 2010). O processo de reparo de DSBs já é bastante conhecido em diversos organismos eucariotos, e ocorre tanto por mecanismos de recombinação homóloga (HR, “homologous recombination”) quanto de junções de terminais não-homólogos (NHEJ, “non-homologous end-joining”) (PASTINK et al., 2001). A HR é um tipo de rearranjo genético que ocorre através da quebra e junção de moléculas de DNA em regiões idênticas, ou muito similares e é também considerada a principal via de reparo de DSB em eucariotos inferiores (BHATTACHARYYA et al., 2004). A HR contribui com a geração de variabilidade genética, por exemplo, em tripanosomatídeos (MACHADO et al., 2006), embora existam poucos relatos sobre a ação desta maquinaria nestes organismos (MCKEAN et al., 2011, MACHADO et al., 2006; REJIS DA SILVA et al., 2006).

Nada se sabe sobre as atuações da LaRPA-1 na resposta a danos no DNA, global e local, no caso nos telômeros, de *Leishmania amazonensis*. Assim, neste trabalho procurou-se verificar se agentes genotóxicos, como a fleomicina, são capazes de induzir danos no DNA do parasita e também alterações na expressão e nas interações de LaRPA-1.

É sabido que a fleomicina induz quebra na dupla fita do DNA (POVIRK et.al, 1989), e por isso é considerada um agente genotóxico interessante para estudos funcionais de proteínas envolvidas com resposta a danos no DNA ou envolvidas diretamente com a maquinaria de reparo. No presente trabalho mostrou-se que a fleomicina atua provavelmente inibindo o crescimento dos parasitas por ativação de algum “checkpoint” de ciclo celular entre as fases G1/S. Efeito similar causado pela fleomicina foi mostrado em leveduras de fissão (BELENGUER et al., 1995). Estudos realizados por Mckean et al., (2001) com *Leishmania major* mostraram que a fleomicina foi capaz de induzir a expressão de uma proteína envolvida com o reparo de quebra na dupla fita do DNA, a recombinase RAD51. Sabe-se que em leveduras e humanos, uma vez ocorrido um dano, por quebra de DNA na forma de dupla fita, a RPA interage com a proteína RAD51, participando do mecanismo de reparo por recombinação homóloga (SUGIYANA et al., 2002, STAUFFER; CHAZIN, 2004). Esta interação se dá via o N-terminal da proteína RAD51 e o domínio A de interação com o DNA simples fita da subunidade RPA-1. Parece que RAD51 ao se ligar a RPA, compete pelo sítio de interação com o DNA, deslocando a RPA da fita simples de DNA no início da recombinação homóloga (STAUFFER; CHAZIN, 2004).

Para iniciar em nesse estudo, primeiramente procurou-se saber se em *Leishmania* a LaRPA-1 era fosforilada assim como descrito em outros eucariotos (BINZ, S. K., et al., 2004). Um fato interessante foi observado quando preparou-se extratos de núcleo provenientes de *L. amazonensis* tratados ou não com fleomicina. Observou-se que LaRPA-1 sofre fosforilação naturalmente e que esta modificação é independente da ocorrência de danos no DNA, assim como descrito em outros eucariotos (BINZ et al., 2004). Entretanto ainda não se sabe qual(is) proteína quinase(s) e(sao) responsável(is) pela fosforilacao de LaRPA-1.

Para confirmar que realmente a fleomicina estava causando danos no DNA destes parasitas, utilizou-se um sensor universal de dano ao DNA, a histona γ H2Ax . Histona H2Ax é uma isoforma da histona H2A, que desempenha um papel importante como sensor e efetor do dano ao DNA (REDON et al., 2002). H2Ax é necessária para formação de complexos de proteínas de reparo como BRCA1, 53BP1, NBS1 e Mre11 (CELESTE et al., 2002; PENG et al, 2003), e tem sido demonstrado que sua

forma fosforilada γ H2Ax é expressa somente em células sob estresse de replicação ou com DNA danificado na forma de quebra em dupla fita (ROGAKOU et al, 1999). A resposta a danos no DNA telomérico também é caracterizada pelo acúmulo nos telômeros de componentes das maquinarias de reparo, tais como p53BP1 ou γ H2Ax, que formam sítios nucleares de DNA danificado conhecidos por focos de DNA telomérico não funcionais ou TIFs (“telomere-dysfunction induced foci”) (TAKAI et al, 2003). Concluiu-se neste trabalho que a fleomicina provoca danos no DNA de *L. amazonensis*, visto que na sua presença ocorre o rápido recrutamento da histona fosforilada γ H2Ax para o núcleo dos parasitas. Este é acompanhado de aumento sinérgico de LaRPA-1 e RAD51 detectados por IFI. Na presença da droga ocorre um aumento gradual e crescente de RAD51 no núcleo, atingindo seu ápice após 3h de tratamento e este é acompanhado da visível diminuição e posterior desaparecimento da histona γ H2Ax. Nessas condições experimentais também se observaram leves alterações nos níveis de LaRPA-1 no núcleo dos parasitas tratados, quando se comparou aos controles (Fig.9A-C) Assim como, em extratos nucleares de células não sincronizadas (Fig. 10A) foi observado um leve aumento nos níveis de LaRPA-1 e RAD51 sugerindo que ocorreu provável resposta ao dano provocado no DNA. Em células sincronizadas com hidroxiuréia, foi possível observar que a fleomicina induziu um acúmulo de LaRPA-1 e RAD51 no núcleo dos parasitas na fase S do ciclo celular (Fig.11A-B), concordando com seus respectivos papéis de sinalizar e reparar o dano. Isto foi acompanhado por um aumento gradual na quantidade de LaRPA-1 ligada a cromatina. Foi demonstrado em tripanosomatídeos que a síntese de histonas em geral aumenta quando os parasitas entram na fase S do ciclo celular, sugerindo assim que a síntese de histona está intimamente ligada com a replicação do DNA. No entanto, a adição de hidroxiuréia na cultura não interfere na transcrição das histonas (SOTO et al., 2004). Sabendo-se que a HU desencadeia a parada do ciclo celular nas fases G1/S (SOTO et al., 2004) e lembrando que RPA-1 exerce várias funções no metabolismo do DNA (LONGHESE et al., 1994, WOLD, 1997, SMITH et al., 2000, SCHRAMKE et al., 2004, KIBE et al., 2007, KOBAYASHI et al., 2010), pode ser que esse aumento da quantidade detectada de LaRPA-1 em células sincronizadas esteja implicada com o evento de replicação do DNA (Fig.11). Além disso, contradizendo os resultados de mckean et al., (2001) com

Leishmania major, foi mostrado que a fleomicina era capaz de induzir danos ao DNA do parasita e provocar a superexpressão natural da proteína recombinase RAD51 (Fig.9), sugerindo fortemente que a semelhança de outros eucariotos, RAD51 participa ativamente da resposta ao dano no DNA induzido pela fleomicina (MCKEAN et al., 2001). A atividade de recombinase RAD51 também foi mostrada em um estudo utilizando células de mamíferos transfectadas como produto do gene RAD51 de *T. cruzi* (TcRad51). As células superexpressando RAD51 apresentaram resistência à radiação ionizante e ao tratamento de culturas de *T. cruzi* com Zeocina, a qual é uma droga membro da família da bleomicina/Fleomicina. (REGIS-DA SILVA, 2006).

Os resultados aqui apresentados sugerem que em *Leishmania amazonensis* a quebra de DNA na forma de dupla fita induz reparo por recombinação homóloga, levando a ativação da proteína RAD51 já que o parasita não tem RAD52 em seu genoma (STAUFFER; CHAZIN, 2004). Em outros eucariotos, este tipo de reparo inicia-se com a formação de fitas de DNA contendo longas porções simples fita em direção a extremidade 3' do DNA ("3'-single-stranded DNA overhangs"). Estas são rapidamente cobertas por RPA, que passa a funcionar como um sensor de danos e a recrutar as recombinases RAD51 e RAD52. Estas recombinases formam um complexo com RPA deslocando-a da simples fita de DNA e efetivando o início do reparo (STAUFFER; CHAZIN, 2004). Em outros tripanosomatídeos como, por exemplo, em *Trypanosoma brucei*, a RAD51 exerce papel importante na recombinação homóloga durante a variação antigênica (MCCULLOCH; BARRY, 1999) e em *Leishmania major*, o homólogo da RAD51 é altamente conservado na escala evolutiva e cumpre atividades compatíveis as RAD51 de outros eucariotos (MCKEAN et al., 2001).

Quando analisa-se os telômeros do parasita em relação a resposta ao dano induzido por agente genotóxico, como fleomicina, percebe-se que assim como o DNA não telomérico, os telômeros também respondem mediante a ocorrência de um dano (LINGER; PRICE, 2009). Mesmo existindo diferenças notáveis na composição e na arquitetura dos telômeros de humanos, leveduras, plantas e protozoários, os princípios gerais da função das proteínas nos telômeros são os mesmos (LINGER; PRICE, 2009). Em todos os casos os complexos teloméricos nucleoprotéicos permitem que as células diferenciem terminais cromossômicos naturais, de quebras de DNA em dupla fita. Sem a

proteção dos telômeros, os terminais cromossômicos ativam as vias de reparo de DNA as quais sinalizam a célula para interromper a divisão levando-a a senescência ou apoptose (BAILEY et al., 1999; BOULTON; JACKSON, 1998). Por estas razões é de grande importância compreender os mecanismos que controlam os telômeros através das proteínas que o compõem e das interações entre elas.

Em humanos, uma disfunção em algum componente da “shelterina” implica no recrutamento transitório ou parcial de fatores que não estão presentes durante todo o ciclo celular DIOTTI; LOAYZA, 2011. Esses fatores quando associados aos telômeros levam a estabilidade cromossômica permitindo o processamento dos telômeros e a passagem da fase S para as fases G2 e M do ciclo celular DIOTTI; LOAYZA, 2011. Por outro lado, a depleção ou perda de função de algum componente da “shelterina” pode levar a ativação de proteínas quinases ATM ou ATR, além da parada do ciclo celular e instabilidade genômica (DIOTTI; LOAYZA, 2011). Estudos mostraram que em células de camundongo, TRF2 e POT1 atuam diretamente na resposta a danos no DNA telomérico. POT1 inibe ATM e TRF2 inibe ATR, (CELLI; DE LANGE, 2005; LAZZERINI, D., 2007, evitando assim respostas catastróficas tais como a ocorrência de rearranjos cromossômicos inadequados e fusões terminais LAZZERINI, 2007.

Em leveduras, foram propostos dois modelos (LISBY et al., 2010). No primeiro modelo, a ressecção de um único telômero na fase S do ciclo celular levaria a um encurtamento gradual nos telômeros nas células daquela população. Neste caso os terminais simples-fita “TG1-3'-overhangs” estariam predominantes recobertos por Cdc13 não por RPA, o que previniria a formação de uma estrutura filamentar característica para a interação de RPA e o subsequente recrutamento da recombinase RAD52. Se a ressecção se estender para a região subtelomérica, as proteínas RPA e Rad52 são recrutadas para iniciar a recombinação homóloga. O segundo modelo propõe que uma resposta precoce a danos nos telômeros poderia ser resultado de um colapso acidental em uma forquilha de replicação formada próximo a um telômero. Isto iria expor os terminais simples-fita “TG1-3'-overhangs” que seriam reconhecidos tanto pela Cdc13 quanto pela RPA. Na ausência de telomerase, ocorreria o recrutamento de Rad52, levando a uma via alternativa de reparo dos

telômeros. Em estudo independente, Ozza et al, (2009), mostraram que DSBs induzidas pela endonuclease HO induzem o recrutamento de Cdc13 para a fita simples no local da DSB e que isto requer as atividades da exonuclease Mre11 e da recombinase RAD51, sugerindo que na ausência de RAD51, RPA poderia prevenir a ocupação da fita simples pela Cdc13.

Em *L. amazonensis*, a presença da fleomicina induziu um rápido aumento na quantidade de LaRPA-1 associada a fita telomérica rica em G, quando comparada com a fita C (Fig.15B). Isto pode ser explicado pelo fato de que a própria LaRPA-1 nutre a ausência de outros homólogos funcionais das proteínas CDC13 e POT1 nos telômeros do parasita. E por ser um componente natural da cromatina fita telomérica de *Leishmania* (SIQUEIRA NETO, 2007; LIRA et al., 2007b; DA SILVA et al., em preparação), em um evento de estresse, no caso provocado pela fleomicina, a LaRPA-1 pode estar cumprindo um papel duplo, como protetor dos terminais simples-fita, evitando a ação do reparo e como sensor de um possível dano neste local. Ensaios de FISH-IFI usando sonda telomérica (Fig.14.A), confirmam estes achados e mostram que a presença de fleomicina induz rápido aumento da quantidade de LaRPA-1 associada aos telômeros, seguido da presença em alguns poucos focos teloméricos da proteína de reparo RAD51, sugerindo assim que LaRPA-1 deve prevenir perdas da simples fita telomérica e também eliciar uma resposta local.

Com os resultados apresentados até aqui, pode-se sugerir que LaRPA-1 está implicada tanto na resposta global a danos que provocam quebra de DNA em dupla fita quanto a resposta local nos telômeros de *L. amazonensis*. Esta ação pode ser direta por interação com o DNA simples fita (como mostrado por FISH/ IF e CHIP) ou indireta interagindo com proteínas teloméricas e com proteínas da maquinaria de reparo, no caso RAD51. Sabendo-se que o papel da RPA no metabolismo do DNA vai além de qualquer função isolada, procurou-se confirmar as interações que esta proteína poderia fazer com proteínas teloméricas na presença de agente genotóxico e com a RAD51.

Vale lembrar que em outros eucariotos, durante o reparo de quebra do DNA na forma de dupla fita (DSBs), por recombinação homóloga, a RPA interage com dois membros do grupo epistático RAD52 (RAD51 e RAD52) (SUGIYANA et al., 2002, STAUFFER; CHAZIN, 2004), e durante o reparo de quebra de dupla fita por recombinação não homóloga e reparo por junção de pontas não pareadas

(NHEJ), a RPA interage com proteínas kinases (DNA-PK) e co-localiza com proteínas do complexo MRN (Mre11, HUS1, Nbs1), sinalizando onde ocorreu o dano (ROBISON et al., 2004).

O complexo MRN (Mre11-Rad50-NBS1), o qual também está implicado com o processo de reparo por recombinação (DENG, 2009), pode promover resposta a danos nos telômeros e o alongamento deste. Foi proposto que em células de camundongo, na ocorrência de dano ao DNA, ATM fosforila a proteína telomérica TRF1, evento este dependente de Nbs1, reduzindo a quantidade de TRF ligada no DNA o que por sua vez, induz a ativação da telomerase (WU, 2010). Da mesma maneira, em células telomerase positivas, a depleção de Mre11 ou Nbs1, induz a redução do tamanho dos telômeros (CHA, 2006).

Sabendo disso, aqui procurou-se identificar os possíveis complexos de interação com a LaRPA-1.

Para verificar se a fleomicina provoca alteração nas interações da LaRPA-1 com outras proteínas, foram realizados ensaios de imunoprecipitação. Assim, verificou-se que a LaRPA-1 pode formar complexos com RAD51, Tert e com a histona H2A não fosforilada mesmo na ausência de fleomicina e quando na presença desta droga a interação entre estas proteínas não é desfeita, mas sim intensificada, sugerindo que elas atuam juntas nesta resposta local. KALOCSAY et al. (2009) e outros (LISBY et al., 2010) demonstraram que a persistência de uma DSB leva a associação do DNA danificado na periferia do núcleo, em um processo que requer RAD51 e a histone variante H2A.Z.

Visto que as proteínas teloméricas são essenciais para manter a estabilidade genômica, compreender os mecanismos que elas utilizam para controlar os telômeros através de suas interações e associações poderia levar ao conhecimento de alvos para o desenvolvimento de novas terapias anti-parasitárias. Uma vez conhecidas estas informações talvez sejamos capazes de interferir nestas células desestabilizando seus telômeros, e conseqüentemente induzir instabilidade genômica. Dependendo do organismo, induzir senescência e até a morte celular. Sabendo que a leishmaniose é uma doença de grande importância epidemiológica e seu tratamento é muito limitado, ferramentas moleculares serão de grande utilidade para a melhor compreensão da biologia do

parasita. Desta forma, é de total interesse continuar os estudos de interações da proteína LaRPA-1, para futuramente propor um novo panorama do complexo de proteínas teloméricas de *L. amazonensis* e assim entender a dinâmica e a importância dessas associações.

6. Conclusões

Neste trabalho, procurou-se caracterizar a proteína LaRPA-1 de *Leishmania amazonensis*, e identificar suas parceiras. Baseado nos resultados apresentados pode-se concluir que:

- A proteína LaRPA-1 sofre diferentes níveis de fosforilação durante o crescimento exponencial de promastigotas de *Leishmania* e que este é independente da ocorrência de dano no DNA .
- A fleomicina foi capaz de provocar parada nas fases G1/S do ciclo celular desses parasitas e recrutar rapidamente o sensor de danos no DNA, a histona fosforilada γ H2Ax para o núcleo dos parasitas,
- Os resultados apresentados sugerem que em *Leishmania amazonensis*, quando provocado dano no DNA a proteína RAD51 é rapidamente recrutada, sugerindo que assim como em leveduras e humanos, RAD51 deve atuar no reparo ao dano induzido pela droga.

- Em células sincronizadas nota-se um aumento na quantidade de LaRPA-1 e RAD51 no núcleo de parasitas tratados com fleomicina, comparando-se com os parasitas não tratados.
- O aumento da quantidade de LaRPA-1 e RAD 51 associada nos telômeros após tratamento com a fleomicina é caracterizado por sua possível participação na resposta local nesses terminais.
- LaRPA-1 pode formar complexos com, RAD51, Telomerase e histona H2A não fosforilada mesmo na ausência de fleomicina e quando na presença desta droga a interação entre estas proteínas não é desfeita, mas sim intensificada, sugerindo que elas atuam juntas nesta resposta local.

7. Referências

ALMEIDA, A.B.P.F. *Inquérito soroepidemiológico e caracterização da leishmaniose canina por PCR-RFLP em Cuiabá, Mato Grosso, Brasil*. 2009. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá, 2009.

ALVAR, J. et al. Leishmania and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin. Microbiol. Rev.*, v.10, p. 298-319, 1997.

ANDERSON, E.M.; HALSEY, W.A.; WUTTKE, D.S. Delineation of the high-affinity single-stranded telomeric DNA-binding domain of *Saccharomyces cerevisiae* Cdc13. *Nucleic Acids Res.*, v.30, p.4305-4313, 2002.

AUBERT, G.; LANSDORP, P.M. Telomeres and Aging. *Physiol. Rev.*, v.88, p.557-579, 2001.

BAE, S.H. et al. RPA governs endonuclease switching during processing of Okazaki fragments in eukaryotes. *Nature*, v.412, p.456-461, 2008.

BAILEY, S.M. et al. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, v. 96, p.14899-14904, 1999.

BARR, S.C. Leishmaniose: dermatose por protozoário, In: RHODES, K.H. *Dermatologia de pequenos animais* – consulta em 5 Minutos. Rio de Janeiro: Revinter, p.346-349, 2005.

BARRAL, A. et al. Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.44, p. 536-546, 1991.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose Tegumentar Americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. *Rev. Bras. Epidemiol.*, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

BASU, M.K.; RAY, M. Macrophage and Leishmania: an unacceptable coexistence. *Crit. Rev. Microbiol.*, v. 31, p.145-154, 2005.

BELENGUER, P. et al. Effects of phleomycin-induced DNA damage on the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* cell cycle. *Yeast*, v.11, p.225-231, 1995.

.BEVERLEY, S.M. Gene amplification in *Leishmania*. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.4, p.417-444, 1991.

BHATTACHARYYA, M.K.; NORRIS, D.E.; KUMAR, N. Molecular players of homologous recombination in protozoan parasites: implications for generating antigenic variation. *Infect. Genet. Evol.* v.4, n.2, p.91-98., 2004.

BIANCHI, A.; NEGRINI, S.; SHORE, D. Delivery of yeast telomerase to a DNA break depends on the recruitment functions of Cdc13 and Est1. *Mol. Cell*, v.16, p.139-146, 2004.

BIANCHI, A.; SHORE D. Early replication of short telomeres in budding yeast. *Cell*, v.128, p.1051-1062, 2007

BINZ, S.K.; SHEECHAN, A.M.; WOLD, M.S. Replication protein A phosphorylation and the cellular response to DNA damage. *DNA Repair*, v.3, n.8-9, p. 1015-1024, 2004.

BLACKBURN, E.H. Switching and signaling at the telomere. *Cell*, v.106, p.661-673, 2001.

BOCHKAREVA, E. et al. Structure of the major single-stranded DNA-binding domain of replication protein A suggests a dynamic mechanism for DNA binding. *EMBO J.*, v.20, p.612-618, 2001.

BOCHKAREVA, E. et al. Structure of the RPA trimerization core and its role in the multistep DNA-binding mechanism of RPA. *EMBO J.*, v.21, n.7, p.1855-1863, 2002.

BOCHKAREVA, E. From RPA to BRCA2: lessons from single-stranded DNA binding by the OB-fold. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, v.14, p.36-42, 2004.

BOULTON, S.J.; JACKSON, S.P. Components of the Ku-dependent non-homologous end-joining pathway are involved in telomeric length maintenance and telomeric silencing. *EMBO J.*, v.17, p.1819-1828, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. *Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana*. Brasília: Centro Nacional de Epidemiologia, Fundação Nacional de Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. *Leishmaniose visceral grave: normas e condutas*. Brasília: MS, 2006. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de DST e Aids. *Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção Leishmania-HIV*. Brasília: MS, 2004. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).

- BROWN, G.W.; MELENDY, T.E.; RAY, D.S. Conservation of structure and function of DNA replication protein A in the trypanosomatid *Crithidia fasciculata*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.89, p.10227-1023, 1992.
- CANO, M.I.N. A vida nos terminais dos cromossomos. *Ciênc. Hoje*, v.39, p.16-23, 2006.
- CANO, M.I.N. et al. Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 96, p.3616-3621, 1999.
- CANO, M.I.N. Telomere biology of trypanosomatids: more questions than answers. *Trends Parasitol.*, v.17, p. 425-429, 2001.
- CANO, M.I.N. The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol. Res.*, v.98, p.447-454, 2006.
- CELESTE, A. et al. Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, v.296 922-927, 2002.
- CELLI, G.B; DE LANGE T. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat. Cell Biol.*, v.7, n.7, p.12-8, 2005
- CHANDRA, A. et al. Cdc13 both positively and negatively regulates telomere replication. *Genes Dev.*, v.15, p.404-414, 2001.
- CONTE, F.F.; CANO, M.I.N. Genomic organization of telomeric and subtelomeric sequences (TAS – telomere associated sequences) of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Int. J. Parasitol*, v.35, p.1435-1443, 2005.
- CROY, J.E.; WUTTKE, D.S. Themes in ssDNA recognition by telomere-end protection proteins. *Trends Biochem. Sci.*, v.31, p.516-525, 2006.
- CRUZ, I. et al. *Leishmania*/HIV co-infections in the second decade. *Indian J. Med. Res.*, v.123, p.357-388, 2006.
- DA SILVA, M.S. et al. The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. *BMC Microbiol.*, v.10, p.136, 2010.
- DAHLEN, M.; SUNNERHAGEN, P.; WANG, T.S. Replication proteins influence the maintenance of telomere length and telomerase protein stability. *Mol. Cell Biol.*, v.23, p.3031-3042, 2003.
- DE LANGE, T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene*, v.21, p.532-540, 2002
- DE LANGE, T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telômeros. *Genes Dev.*, v.19, p.2100-2110, 2005.
- DIOTTI, R.; LOAYZA, D. Shelterin complex and associated factors at human telomeres *Nucleus*, v.2, n.2, p.119-135, 2011.
- DMITRIEV, P.V.; PETROV, A.V.; DONTSOVA, O.A. Yeast telosome complex: components and their functions. *Biochemistry*, v.68, p.718-734, 2003.
- EVANS, S.; LUNDBLAD, V. Est1 and cdc 13 as comediators of telomerase access. *Science*, v.286, p.117-120, 1999.

- EVANS, S.; LUNDBLAD, V. Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J. Cell Sci.*, v.19, p.3357-3364, 2000.
- FANG, G.; CECH, T.R. The beta subunit of *Oxytricha* telomere binding protein promotes G-quartet formation by telomeric DNA. *Cell*, v.74, p.875-885, 1993.
- FERNÁNDEZ, M.F. et al. Identification of three proteins that associate in vitro with the *Leishmania (Leishmania) amazonensis* G-rich telomeric strand. *Eur. J. Biochem.*, v.271, p.3050-3063, 2004.
- FRAGAKI, K. et al. A novel *Leishmania infantum* nuclear phosphoprotein Lepp12 which stimulates IL1-beta synthesis in THP-1 transfectants. *BMC Microbiol.*, v.3, p.7, 2003.
- FU, G.; BARKER, D.C. Rapid cloning of telomere-associated sequence using primer-tagged amplification. *Biotechniques*, v.24, p.386-390, 1998.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Leishmaniose*. Rio de Janeiro: Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia - IOC, 2011.
- GAO, H.R.B. et al. RPA-like proteins mediate yeast telomerefunction. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, v.14, p. 208-214, 2007.
- GIARDINI, M.A. et al. *Leishmania amazonensis*: partial purification and study of the biochemical properties of the telomerase reverse transcriptase activity from promastigote-stage. *Exp. Parasitol.*, v.127, n.1, p.243-248, 2010.
- GIARDINI, M.A. et al. The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: gene cloning and characterization. *Parasitol Res.*, v.9, p.447-454, 2006.
- GILSON, E.; GELI, V. RPA regulates telomerase action by providing est1p access to chromosome ends. *Nat. Genet.*, v.36, p.46-54, 2004.
- GILSON, E.; GELLI, V. How telomeres are replicated. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, v.8, p.825-838, 2007.
- GOTTSCHILING, D.E.; ZAKIAN, V.A. Telomere proteins: specific recognition and protection of the natural termini of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Cell*, v.47, p.195-205, 1986.
- GRAY, J.T. et al. Cloning and expression of genes for the *Oxytricha* telomere-binding protein: specific subunit interactions in the telomeric complex. *Cell*, v.67, p.807-814, 1991
- GRIFFITH, J.D. et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*, v.97, p.503-514, 1999.
- GRIMALDI, J.G.; TESH, R.B.; Mc MAHON-PRATT, D. A review of geographical distribution and epidemiology of leishmaniasis in the New World. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 41, n.6, p. 687-725, 1989.
- GRYNBERG, P. *Análise da expressão gênica em trypanosoma cruzi em resposta à radiação ionizante pela técnica de microarranjo de DNA*. 2011.Tese (Doutorado) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Uberlândia, 2011.
- HENDERSON, E.R.; BLACKBURN, E. An overhang 3' terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol. Cell Biol.*, v. 9, p. 345-348, 1993.

HOLLAND, C. et al. *Ciclo de vida da Leishmania chagasi*. Disponível em: <<http://www.vet.uga.edu/vpp/nsep/Brazil2002/leishmania/images/2.jpg>> Acesso em: 28 fev. 2008.

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

IVENS, A.C. et al. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. *Science*, v.309, n.5733, p.436-442, 2005.

JACOBS, D.M. et al. 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.*, v.14, p.321-331, 1999.

JOHNSTON, D. et al. Genomics and the biology of parasites. *BioEssays*, v.21, p.131-147, 1999.

KALOCSAY

KASTAN, M.B.; BARTEK, J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature*, v.432, n.7015, p. 316-323., 2004.

KAYE, M.P.; BLACKWELL, J.M. Postgenomic research on leishmaniasis: a critical self-appraisal. *Trends Parasitol.*, v.24, n. 9, p.401-405, 2008.

KIBE, T. et al. Fission yeast taz1 and RPA are synergistically required to prevent rapid telomere loss. *Mol. Biol. Cell.*, v.18, p. 2378-2387, 2007.

KLOBUTCHER, L.A. All gene-sized DNA molecules in four species of hypotrichs have the same terminal sequence and an unusual 3' terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.78, n.5, p. 3015-3019, 1981.

KOBAYASHI, Y. et al. Expression of mutant RPA in human cancer cells causes telomere shortening. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, v.74, n.2, p.382-385, 2010.

KOWALCZYKOWSKI, S.C. Some assembly required. *Nat. Struct. Biol.*, v.7, p.1087 – 1089, 2000.

LAINSON, R. et al. Amazonian visceral leishmaniasis distribution of the vector *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) in relations to the fox *Cercocyon thous* (Linn.) and the efficiency of this reservoir host as a source of infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.85, p.135-137, 1990.

LANG, T.; LECOEUR, H.; PRINA, E. Imaging *Leishmania* development in their host cells. *Trends Parasitol.*, v.25, p.464-473, 2009.

LAZZERINI, D. E.; DE LANGE, T. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, v.448, p.1068-1071, 2007

LEE, S.E. et al. Evidence for DNA-PK-dependent and -independent DNA double-strand break repair pathways in mammalian cells as a function of the cell cycle. *Mol. Cell. Biol.*, v. 17, p.1425-1433, 1997.

LEE, S.E. et al. The *Caenorhabditis elegans* Werner Syndrome Protein Functions Upstream of ATR and ATM in Response to DNA Replication Inhibition and Double-Strand DNA Breaks. *PLoS Genet.*, v. 6, n.1, p. e1000801, 2010.

LISBY, M. et al. The fate of irreparable DNA double-strand breaks and eroded telomeres at the nuclear periphery. *Nucleus* v.1, p.1-4, 2010.

- LIN, J.J.; ZAKIAN, V.A. The Saccharomyces CDC13 protein is a single-strand TG1-3 telomeric DNA-binding protein in vitro that affects telomere behavior in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, v.93, p.13760-13765, 1996.
- LINGER, B.R.; PRICE, C.M. Conservation of telomere protein complexes: shuffling through evolution. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, v.44, n.6, p.434-446, 2009.
- LIRA, C.B.B. et al. LaRbp38: a *Leishmania amazonensis* protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.358, n.3, p.854-860, 2007a.
- LIRA, C.B.B. et al. LaTBP1: a *Leishmania amazonensis* DNA-binding protein that associates *in vivo* with telomeres and GT-rich DNA using a myb-like domain. *Arch. Biochem. Biophys.*, v.465, p.399-409, 2007c.
- LIRA, C.B.B. et al. Telomere Biology of Trypanosomatids: beginning to answer some questions. *Trends Parasitol.*, v. 23, p.357-362, 2007b.
- LIRA, C.B.B. et al. DNA and heparin chaperone the refolding of purified recombinant Replication Protein A subunit 1 from *Leishmania amazonensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, v. 1790, n. 2, p.119-125, 2009d.
- LIU, D. et al. Telosome, a Mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric Proteins. *J. Biol. Chem.*, v.279, p.51338-51342, 2004.
- LONGHESE, M.P. DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres *Genes Dev.*, v.22, p.125-140, 2008.
- LONGHESE, M.P.; PLEVANI, P.; LUCCHINI, G. Replication factor A is required in vivo for DNA replication, repair, and recombination. *Mol. Cell Biol.*, v.14, p.7884-7890, 1994.
- MACHADO, C.R., et al. DNA metabolism and genetic diversity in Trypanosomes. *Mutat. Res.*, v. 612, n.1, p.40-57, 2006.
- MCCULLOCH, R. Two pathways of homologous recombination in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.*, v. 45, n.6, p. 1687-1700, 2002.
- MCCULLOCH, R.; BARRY J.D. A role for RAD51 and homologous recombination in *Trypanosoma brucei* antigenic variation. *Genes Dev.*, v.13, p. 2875-2888, 1999.
- MCKEAN, P.G. et al. Identification and characterisation of a *RAD51* gene from *Leishmania major*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v.115, p.209-216, 2001.
- MELO, J.; TOCZYSKI, D. The DNA damage checkpoint response. *Curr. Opin. Cell Biol.*, v.14, p.237-245, 2002.
- MENDONÇA, S. Leishmaniose. In: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Glossários de doenças*. Rio de Janeiro: Instituto Fiocruz, 2011 Disponível em: > www.fiocruz.br>. Acesso em: 10 jan. 2011.
- MINAS FAZ CIÊNCIAS. Belo Horizonte: FAPEMIG, 2008. Disponível em:<<http://revistafapemig.br/2/leishmaniose>>. Acesso em: 13 out. 2008.
- MIYAKE, Y. RPA-like Mammalian Ctc1-Stn1-Ten1 Complex Binds to Single-Stranded DNA and Protects Telomeres Independently of the Pot1 Pathway. *Mol. Cell*, v.36, p.193-206, 2009.

- MORSE, R.H. RAP, open up. New wrinkles for RAP1 in yeast. *Trends Genet.*, v.1, p.51-53, 2000.
- MUNOZ-JORDAN, J.L. et al. T-loops at trypanosome telomeres. *EMBO J.*, v.20, p.579-588, 2001.
- NEVES, D.P. et al. *Parasitologia humana*. 10.ed. Rio de janeiro: Atheneu, 2000. p.31-72.
- NEVES, D.P. et al. *Parasitologia Humana*. 11.ed. Rio de janeiro: Atheneu, 2005. p. 31-72.
- NUGENT, C. et al. Cdc13p: a single-strand telomeric DNA-binding protein with a dual role in yeast telomere maintenance. *Science*, v.274, p.249-252, 1996.
- OAKLEY, G.G. RPA phosphorylation in mitosis alters DNA binding and protein-protein interactions. *Biochemistry*, v.42, p.3255-3264, 2003.
- OAKLEY, G.G. UV-induced Hyperphosphorylation of Replication Protein A Depends on DNA Replication and Expression of ATM Protein. *Mol. Biol. Cell*, v.12, p.1199-1213, 2001.
- OLIVIER, M.; GREGORY, D.J.; FORGET, G. Subversion mechanisms by which Leishmania parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin. Microbiol.*, v. 18, p. 293-305, 2005.
- OPRESKO, P.L. et al. Telomere-binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom Syndrome helicases. *J. Biol. Chem.*, v.275, p. 41110-41119, 2002.
- OZA P; et al. Mechanisms that regulate localization of a DNA double-strand break to the nuclear periphery. *Genes Dev.*, v. 23, p.912-27, 2009.
- PAESCHKE, K. et al. telomere end-binding proteins control the formation of G-quadruplex DNA structures *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, v.12, p.847-854, 2005.
- PASTINK, A.; ECKEN, J.C.; LOHMAN, P.H. Genomic integrity and the repair of double strand DNA breaks. *Mutat. Res.*, v.480, n.481 p. 37-50, 2001.
- PEACOCK, C. et al. Comparative genomic analysis of three Leishmania species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.*, v. 39, p.839-847, 2007.
- PENG, A.; CHEN, P.L. NFB1, like 53BP1, is an early and redundant transducer mediating Chk2 phosphorylation in response to DNA damage. *J. Biol. Chem.*, v.278 p. 8873-8876, 2003
- PISCOPO, T.V.; MALLIA, A.C. Leishmaniasis. *Postgrad. Med. J.*, v.82, p.649-657, 2006.
- POVIRK, L.F.; HAN, Y.-H.; STEIGHNER, R.J. Structure of bleomycin-induced DNA double-strand breaks: predominance of blunt ends and single-base 5' extensions. *Biochemistry*, v.28, p. 8508-8585, 1989
- PRICE, C.M.; CECH, T.R. Properties of the telomeric DNA-binding protein from *Oxytricha nova*. *Biochemistry*, v. 28, p.769-774, 1989.
- PRICE, C.M.; CECH, T.R. Telomeric DNA-protein interactions of *Oxytricha* macronuclear DNA. *Genes Dev.*, v.1, p.783-793, 1987.

RAGHURAMAN, M.K. et al. Oxytricha telomeric nucleoprotein complexes reconstituted with synthetic DNA. *Nucleic Acids Res.*, v.17, p. 4235-4253, 1989.

REDON, C. et al. Histone H2A variants and H2AZ. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, v.12, p. 162-169, 2002.

REGIS-DA-SILVA, C.G; et al. Characterization of the Trypanosoma cruzi Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* v.149, n.2, p.191-200, 2006.

REY, L. *Bases da parasitologia médica*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p.199-214.

REY, L. *Parasitologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. p.214-266.

ROBISON, J.G. et al. Replication protein A and the Mre11/Rad50/Nbs1 complex co-localize and interact at sites of stalled replication forks. *J. Biol. Chem.*, v.279, p. 34802-

ROGAKOU, E. P., et al. Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J. Biol. Chem.*, 275, 9390–9395, 2000.

ROGAKOU, E.P. et al. Megabase chromatin domains involved in dna double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.*, v.146, p. 905-916, 1999.

SALAS, T.R. et al. Human replication protein A unfolds telomeric G-quadruplexes. *Nucleic Acids Res.*, v.34, p.4857-4865, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSEL, D.W. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 3.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SANCAR, A. et al. Molecular mechanism of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoint. *Annu. Rev. Biochem.*, v.73, p.39-85, 2004.

SAÚDE SAÚDE: *Leishmaniose*. Disponível em:<<http://www.saudesauade.com.br/saudesauade/arquivo.php?Numero=9>>. Acesso em: 20 Jan. 2011.

SCHRAMKE, V. et al. RPA regulates telomerase action by providing est1p access to chromosome ends. *Nat. Genet.*, v.36, p. 46-54, 2004.

SIMPSON, A.G. et al. Early evolution within kinetoplastids (euglenozoa), and the late emergence of trypanosomatids. *Protist*, v.155, p.407-422, 2004.

SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu. Rev. Microbiol.*, v.41, p.363-382, 1987.

SIQUEIRA NETO, J.L. Caracterização de proteínas que se associam *in vivo* com a simples-fita telomérica de *Leishmania amazonensis*, 2007. Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

SIQUEIRA NETO, J.L. et al. *Leishmania* Replication Protein A-1 binds *in vivo* single-stranded telomeric DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, v.358, n.2, p. 417-423, 2007.

SMITH, J.; ZOU, H.; ROTHSTEIN, R. Characterization of genetic interactions with RFA1: the role of RPA in DNA replication and telomere maintenance. *Biochimie*, v.82, p.71-78, 2000.

SMITH, S.; DE LANGE, T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Curr. Biol.* v.10, n.20, p.1299-1302, 2000.

SMOGORZEWSKA, A. et al. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol. Cell Biol.*, v.20, n.5, p.1659-1668, 2000.

SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. Regulation of Telomerase by Telomeric proteins. *Annu. Rev. Biochem.*, v.73, p. 177-208, 2004.

SOTO, M. et al. Cell-cycle-dependent translation of histone mRNAs is the key control point for regulation of histone biosynthesis in *Leishmania infantum*. *Rev. Biochem.*, v. 379, p. 617-625, 2004.

STAUFFER, M.E.; CHAZIN, W.J. Physical interaction between replication protein a and rad51 promotes exchange on single-stranded dna. *J. Biol. Chem.*, v.279, n.24, p. 25638-25645, 2004.

STEWARTT, S.A.; WEINBERG, R.A. Senescence: does it all happen at the ends? *Oncogene*, v. 21, p. 627-630, 2002.

STILES, J.K. et al. Genomic Organization, transcription, splicing and gene regulation in *Leishmania*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, v.93, p.781-807, 1999.

SUGIYANA, T.; KOWALCZKOWSKIS, C. RAD52 protein associates with replication protein A (RPA)-single-stranded DNA to accelerate RAD51-mediated displacement of RPA and presynaptic complex formation. *J. Biol. Chem.*, v.277, p.31663-31672, 2002.

SUN, J.; YU, E. I. Stn1-Ten1 is an Rpa2-Rpa3-like complex at telomeres. *Genes Dev.* v.24, p.2900-2914, 2009

SUNG, P. Yeast Rad 55 and Rad 57 proteins form a heterodimer that function with replication protein A to promote DNA strand exchange by RAD51 recombinase. *Genes Dev.*, v.11, n.9, p. 1111-1121, 1997.

SUROVTSEVA, Y.V. Arabidopsis POT1 associates with the telomerase RNP and is required for telomere maintenance. *EMBO J.*, v.26, p.3653-3661, 2007.

TAGGART, A.K.; TENG, S.C.; ZAKIAN, V.A. Est1p as a cell cycle-regulated activator of telomere-bound telomerase. *Science*, v.297, n.5583, p.1023-1026, 2002.

TAKAI, H.; SMOGORZEWSKA, A.; de Lange, T. DNA damage foci at dysfunctional telomeres. *Curr. Biol.*; v.13, p.1549-56, 2003.

THOMAS, S. et al. Histone acetylations Mark origins of polycistronic transcription in *Leishmania major*. *BMC Genomics*, v.10, p.152, 2009.

VAN STEENSEL, B.; SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell*, v.92, p.401-413, 1998.

VERDUN, R.E.; KARLSEDER, J. The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell*, v.127, p.709-720, 2006.

VOSS, T.S.; KAESTLI, M.; VOGEL, D. Identification of nuclear proteins that interact differentially with *Plasmodium falciparum* var gene promoters. *Mol. Microbiol.*, v. 6, p. 1593–1607, 2002.

WANG, F. et al. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature*, v.445, p.506-510, 2007.

WARD, I.M.; CHEN J. Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress, *J. Biol. Chem.*, v.276, p. 47759-47762, 2001.

WELLINGER, R.J. The CST Complex and Telomere Maintenance: The Exception Becomes the Rule. *Mol. Cell*, v.36, p.168-169, 2009.

WHO EXPERT COMMITTEE. *Control of the leishmaniases*. Geneva: World Health Organization, 1990. (*Technical Report Series*, 793).

WINCKER, P. The *Leishmania* genome comprises 36 chromosomes conserved across widely divergent human pathogenic species. *Nucleic Acids Res.*, v.24, p.1688-1694, 1996.

WOLD, M.S. Replication Protein A: A Heterotrimeric, Single-Stranded DNA-binding Protein Required for Eukaryotic DNA Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.*, v.66, p.61-91, 1997.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *WHO report on global surveillance of epidemic-prone infectious diseases*. Geneva: World Health Organization, 2000.

WOTTON, D.; SHORE, D. A novel RAP1p-interacting factor, Rif2p, cooperates with Rif1p to regulate telomere length in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev.*, v.11, p.748-760, 1997.

WU, X. et al. Preferential localization of hyperphosphorylated replication protein A to double-strand break repair and checkpoint complexes upon DNA damage. *Biochem. J.*, v.391, p. 473-480, 2005b.

WU, X.; SHELL, S.M.; ZOU, Y. Interaction co-localization of Rad9/Rad1/Hus1 checkpoint complex with replication protein A in human cells. *Oncogene*, v. 24, p.4728-4735, 2005a.

XIN, H. et al. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature*, v.445, p.559-562, 2007.

YE, J.Z. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres *J. Biol. Chem.*, v.279, p.47264-47271, 2004.

ZAUG, A.J.; PODELL, E.R.; CECH, T.R. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.102, p.10864-10869, 2005.

ZHANG, J. et al. Certain Imidazotetrazines Escape O6-Methylguanine-DNA Methyltransferase and Mismatch Repair. *Oncology*, v.80, p.195-207, 2011.

ZHU, G.; MARCHEWKA, M.J.; KEITHLY, J.S. *Cryptosporidium parvum* appears to lack a plastid genome. *J. Soc. Gen. Microbiol.*, v.146, p.315-321, 2000.

ZORZETTO, R. Uma doença anunciada: infecção letal causada por parasita de uma só célula, a Leishmaniose visceral avança sobre as cidades brasileiras. *Rev. Pesqui. FAPESP*, n. 151, p. 47-51. 2008.

ZOU, L.; LIU, D.; ELLEDGE, S.J. Replication protein A-mediated recruitment and activation of Rad17 complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.100, p.13827-13832, 2003.

ZOU, Y. et al. Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. *J. Cell Physiol.*, v. 208, p.267-273, 2006.

