



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



Estudos sobre a manutenção dos telômeros durante o ciclo de desenvolvimento de *Leishmania amazonensis*

Aluna: Marina Roveri Vieira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Co-orientadora: Dra. Cristiane de Santis Alves



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



Estudos sobre a manutenção dos telômeros durante o ciclo de desenvolvimento de *Leishmania amazonensis*

Aluna: Marina Roveri Vieira

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Nogueira Cano

Co-orientadora: Dra. Cristiane de Santis Alves

Dissertação de Mestrado encaminhado a coordenação da Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências de

Botucatu

Março-2019

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

Vieira, Marina Roveri.

Estudos sobre a manutenção dos telômeros durante o ciclo de desenvolvimento de *Leishmania amazonensis* / Marina Roveri Vieira. - Botucatu, 2019

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Maria Isabel Nogueira Cano
Coorientador: Cristiane de Santis ALves
Capes: 20200005

1. Telômero. 2. Telomerase. 3. *Leishmania*. 4. Chaperonas moleculares. 5. Proteínas de choque termico.

Palavras-chave: HSP83; *Leishmania amazonensis*; Telomerase; Telômero; inibidor de chaperona.

Dedicatória:

Dedico esse trabalho aos meus pais, Luiz Carlos e Marcia, meu irmão Vinícius e em especial a memória da minha vó Mafalda. Todos eles foram muito importantes para eu ter chegado até onde eu estou agora.

Agradecimentos:

Primeiramente agradeço aos meus pais e meu irmão que sempre me apoiaram e me deram força, carinho e amor nos momentos mais difíceis.

Em memória a minha vó Mafalda que sempre se preocupou comigo durante todos esses anos e sempre torceram por mim que infelizmente não vai poder falar que a sua neta caçula se tornou Mestre em Genética

Aos colegas de trabalho do Laboratório de Telômeros pelo convívio e por me ensinarem tudo que foi necessário na realização desse trabalho. Em especial aqueles que mais me ajudaram nesses últimos meses do mestrado e me deram apoio.

Aos amigos que fiz dentro do departamento, em especial a Amanda e Beatriz que me deram apoio em momentos difíceis e que me proporcionaram momentos de alegria e conversas.

A Prof^a Maria Isabel Nogueira Cano por ter me recebido no laboratório, pela dedicação e ensinamentos. E a minha co-orientadora Dr^a Cristiane de Santis Alves por toda a ajuda durando o mestrado.

A UNESP pelo espaço físico e equipamentos, e pela receptividade e colaboração de todos seus funcionários e alunos que tive contato.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

“Caso se aguarde o momento adequado, tudo se tranquilizará e o almejado será alcançado”

Autor desconhecido

“Lute com determinação, abrace a vida com paixão, perca com classe e vença com ousadia, porque o mundo pertence a quem se atreve e a vida é muito para ser insignificante”

Augusto Branco

Sumário

Lista de Figuras	I
Lista de siglas e abreviaturas	II
1.Introdução	1
1.1 leishmaniose	1
1.2 Telômero e telomerase	5
1.3 Telômeros em <i>leishmania ssp</i>	7
1.4 Funções da chaperona HSP90 e sua ortóloga em <i>Leishmania ssp.</i>	9
1.5 O análogo da geldanamicina 17- allilamino-17-demethoxigeldanamicina(17-AAG) inibidor de HSP90	11
2. Objetivos	14
3.Material e métodos	14
3.1 Cultivo de formas de vida promastigota de <i>L. amazonensis</i>	14
3.2 Obtenção de formas de vida metacíclica de <i>L. amazonensis</i>	15
3.3 Obtenção de formas de vida amastigota de <i>L. amazonensis</i>	15
3.4 Obtenção de extratos proteicos das diferentes formas de desenvolvimento de <i>L. amazonensis</i>	16
3.5 Cromatografia de troca iônica em DEAE para purificação de proteínas e da atividade de Telomerase	17
3.6 Ensaio de atividade de telomerase pelo método TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol)	17
3.7 Ensaio de imunoprecipitação (IP)	19
3.8 Ensaio de <i>Western Blot</i>	20
3.9. Análises <i>in silico</i> do TERT e HSP83 em bibliotecas de SL-Seq	21
3.10 Obtenção de IC ₅₀ do fármaco 17-AAG para formas amastigotas	21
3.11 Extração de DNA genômico das diferentes formas de desenvolvimento de <i>L. amazonensis</i>	21
3.12 Southern blot telomérico para analisar o perfil de restrição telomérico (TRF, Telomere Restriction Fragment) das diferentes formas de desenvolvimento de <i>L. amazonensis</i>	22
3.12.1 Digestão do DNA	22
3.12.2 Eletroforese e transferência	22
3.12.3 Hibridização	23
3.12.4 Revelação e detecção dos resultados	23
4. Resultados e discussão	24
4.1 Telômero de <i>L. amazonensis</i> encurtando durante o ciclo de desenvolvimento e após várias passagens	24
4.2. Os telômeros de <i>L. amazonensis</i> são mantidos por uma telomerase que é ativada a 28°C e a 37°C	25
4.3 HSP 83 é parte do complexo ribonucleoproteico de telomerase de <i>L. amazonensis</i>	27
4.4 HSP83 parece sofrer alterações pós-traducionais durante o ciclo de desenvolvimento de <i>Leishmania amazonensis</i>	29
4.5 Tratamento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com 17-AAG induz encurtamento dos telômeros e inibição da atividade de telomerase	30
4.6 Obtenção do IC ₅₀ do fármaco 17-AAG para formas promastigotas	31
4.7 Tratamento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> com 17-AAG induz encurtamento dos	32

telômeros e inibição da atividade de telomerase

5. Conclusão	34
6. Apêndice	35
7. Bibliografia	35

Lista de ilustrações

Figura 1. Representação da distribuição de leishmaniose cutânea. Temos a distribuição mundial da leishmaniose cutânea no ano de 2016, segundo o número de casos reportados (<http://datasus.saude.gov.br/>).

Figura 2. Representação da distribuição da leishmaniose tegumentar no Brasil. Em A, temos o registro de casos de leishmaniose tegumentar por municípios no país. Em B, apenas com casos verificados no estado de São Paulo. Ambos mostram dados referentes ao ano 2017 e foram retirados no site oficial DATASUS (<http://datasus.saude.gov.br/>).

Figura 3. Representação do ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*. Figura retirada do site Canal ciência (http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_viscerar_canina.html).

Figura 4. Representação dos telômeros. Em A: demonstração da localização dos telômeros nas extremidades dos cromossomos. Em B, DNA telomérico é formado por fita dupla, uma fita rica em G e a sua complementar rica em C, sendo que, a fita rica em G forma uma protrusão na extremidade 3', denominada 3'*G-overhang*, que se estende mais que sua fita complemento.

Figura 5. Representação da estrutura mínima do complexo ribonucleoproteico da telomerase. Os componentes mínimos do complexo são a TERT (Telomerase reverse Transcriptase), o qual corresponde à porção protéica e o RNA (TER, Telomerase RNA) que contém o molde da repetição telomérica utilizado pela TERT para estender os telômeros (GIARDINI et al., 2014). (B) Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica da telomerase de *T. castaneum*, demonstrando a configuração em anel, formada pelos três domínios estruturais da proteína complexada ao componente RNA (magenta) que aparece interagindo com o DNA telomérico (amarelo) (GILLIS et al., 2008; MITCHELL et al., 2010).

Figura 6. Mecanismo de adição de nucleotídeos na região telomérica dos cromossomos pela telomerase. Em 1, a TERT interage com a repetição telomérica e permite que o componente TER se acople ao terminal 3'*G overhang*. Em 2, a TERT estende a região telomérica copiando o molde contido no TER, por adição de nucleotídeos ao terminal 3' OH dos cromossomos. Ao término da adição de uma repetição (3), a TERT se desloca e se reposiciona em relação à repetição telomérica para dar início a um novo ciclo de amplificação.

Modificado a partir de Giardini, et. al, (2014).

Figura 7. Representação da estrutura telomérica de *Leishmania* spp. com suas principais proteínas envolvidas. Principais proteínas já caracterizadas do parasito *Leishmania* que interagem com o complexo telomérico. Imagem atualizada a partir de da Silva et al, (2012).

Figura 8. Modelo das alterações conformacionais que acompanham a interação e hidrólise de ATP pela HSP90 baseado em evidências estruturais e bioquímicas. O N-terminal (azul), a porção mediana (amarelo) e o C-terminal (vermelho) estão mostrados. A proteína cliente (verde) se liga a HSP90 e sofre alterações durante a passagem da chaperona para o estado conformacional de interação com o ATP. Inibição da interação da HSP90 por inibidores como a geldanamicina, bloqueia a ativação da proteína cliente. Figura

retirada de (PEARL AND RODROMOU (2006).

Figura 9: Estrutura do ADP e geldanamina (GA) na conformação que ambas se ligam a HSP90 e mecanismo de ligação com a chaperona. Em A, embora ambas as moléculas apresentem propriedades químicas diferentes, a GA imita a estereoquímica do ADP para competir pelo sítio de ligação na chaperona (SCHEIBEL; BUCHNER, 1998). Em B, interação da GA com a HSP90 (LI et al., 2012).

Figura 10. Perfil do tamanho dos telômeros nas diferentes formas desenvolvimento de *Leishmania amazonensis*. A) Southern blot telomérico utilizando o kit Telo TAGGG Telomere Length Assay (Roche).

2µg de DNA genômico foram digeridos com 10 U da enzima de restrição *AfaI* e fracionados em gel de agarose 1%. Na imagem superior os fragmentos de digestão foram hibridizados com a sonda da repetição telomérica e na imagem inferior os fragmentos foram hibridizados com sonda que reconhece o gene alfa- tubulina utilizada como controle de quantidade de DNA. Ama: amastigotas, Pro: promastigotas, Meta: metacíclicas.

B) Ensaio Flow-FISH mostrando as diferenças entre o tamanho dos telômeros das diferentes fases de desenvolvimento de *L. amazonensis*. Histogramas (No. de parasitas (counts) x fluorescência(FITC)) mostrando a quantidade de DNA total (curva em linha contínua) e DNA hibridizado com a sonda telomérica que denota diferenças entre o tamanho dos telômeros (curva em linha pontilhada) nas formas amastigota, metacíclica e promastigota de *L. amazonensis* usando Flow-FISH. Os dados foram analisados usando FlowJo software v.7.6.5. A tabela ao lado compila os dados dos histogramas e mostra a diferença proporcional entre o tamanho dos telômeros nas diferentes formas do parasito (em números arbitrários).

Figura 11. Representação de como deve ser feito a montagem da transferência no Min Trans-blot (Bio-Rad). Modificado do kit comercial DIG Gel Shift kit, 2nd generation da Roche (2010).

Figura 12. Esquema mostrando como montar a transferência para realização do ensaio western blot.

Adaptada de (MAHMOOD; YANG, 2012). **Figura 13.**

Representação de como montar a transferência para realização do Southern blot. Adaptado do site <http://nptel.ac.in/courses/102103016/module3/lec28/2.html>.

Figura 14. Os telômeros de *L. amazonensis* encurtam durante um ciclo de desenvolvimento e durante duplicações celulares crescentes. A) e B) Southern blot telomérico mostrando o perfil de restrição telomérico (TRF) do parasito nas diferentes fases de desenvolvimento (ama, amastigota, pro, promastigota, meta, metacíclico). Em ambos ensaios DNA genômico (2 µg) foi digerido com a enzima de restrição *AfaI* (2U) e submetido a Southern blot telomérico conforme descrito no item 3.11 de Material e Métodos. A) Perfil do TRF de formas amastigotas (linha 1) e formas promastigotas diferenciadas em cultura (linha 2) a partir das amastigotas analisadas na linha 1. B) Perfil do TRF de formas promastigotas com duplicações celulares crescentes (P1 a P6) (linhas 1 a 6) e de formas metacíclicas obtidas in vitro a partir de promastigotas P4 a P6 (linhas 7 a 9).

Figura 15. A atividade da telomerase foi detectada nas diferentes formas de desenvolvimento de

***L. amazonensis* usando uma modificação do ensaio TRAP.** Produtos de elongação do oligonucleotídeo TS pela telomerase presente nos extratos dos parasitos foram fracionados em géis não denaturantes 10% de acrilamida. As bandas detectadas (setas em vermelho) representam incrementos de 6pb correspondentes as repetições teloméricas (TTAGGG) adicionadas ao terminal 3' do oligo TS. TSR8 é o controle da processividade da telomerase, NE reações realizadas na ausência de extrato, RNase, reações realizadas com extratos pré-tratados com RNase A.

Figura 16. Ensaio de imunoprecipitação seguido de western Blot mostrando que a HSP83 faz parte do complexo telomerase RNP de *L. amazonensis*. Na parte superior da figura temos a imunoprecipitação realizada com o soro anti-TERT e revelada por western blot com soro imune anti-TERT. Na parte central a imunoprecipitação foi realizada com o soro imune anti-TERT e revelado por western blot usando soro imune anti-HSP83. Já na parte inferior da figura a imunoprecipitação foi realizada com o soro imune anti-HSP83 e revelado por western blot com soro imune anti-TERT. Detalhes sobre os ensaios de IP e western blot estão descritos no item 3.7 e 3.8 de Material e Métodos. **Figura 17. Perfil de expressão da proteína HSP83 durante o ciclo de desenvolvimento de *L. amazonensis* e em parasitos com várias duplicações celulares.** Em A, extratos proteicos obtidos das formas amastigota e metacíclicas (600µg) e das formas promastigotas 275 µg foram fracionados em gel SDS-PAGE 12% seguido de western blot revelado com soro específico anti-*Leishmania* HSP83. Em B, gel SDS-PAGE 12% corado com comassie Blue usado como controle de loading para o gel mostrado na figura

A. A refere-se a amastigota, P promastigota e M metacíclica. **Figura 18. Nível de expressão da TERT e da HSP83 durante o ciclo de desenvolvimento de *L. major*.** O gráfico mostra que os transcritos (normalizados calculando-se o RPKM, *reads per kilobase million*) correspondentes ao componente TERT e a HSP83 são expressos em todas as formas do parasito e que a HSP83 apresenta nível de expressão maior comparado a TERT. Obs- A medida das *reads* por RPKM reflete a concentração molar de um transcrito na amostra inicial, normalizando o comprimento do RNA pelo número total de *reads* na amostra, isto facilita a comparação transparente dos níveis de transcritos tanto dentro como entre as amostras (MORTAZAVI et al., 2008). **Figura 19.**

Obtenção do IC50 do 17-AAG para formas promastigotas de *L. amazonensis*. Gráfico mostra no eixo Y a porcentagem de parasitas vivos na cultura e no eixo X as diferentes concentrações do fármaco. O gráfico foi gerado usando-se GraphPad Prism e o IC50 do 17-AAG para formas promastigotas foi estimado em 202,1nM. **Figura 20. Tratamento com 17-AAG induz encurtamento de telômeros e inibição da atividade de telomerase em promastigotas de *L. amazonensis*.** Em A, ensaio de Southern blot telomérico mostrando que formas promastigotas tratadas com 100nM de 17-AAG por 48 horas apresentam encurtamento dos telômeros quando comparados com parasitos não tratados (C, controle). B) A esquerda, ensaio de atividade de

telomerase (TRAP) com extrato de formas promastigotas (seta vermelha), 17-AAGos quais foram pré- tratado com RNase A como controle para atividade de telomerase.. NE, ensaio realizado na ausência de extrato. Esta membrana foi exposta por 30 min. A direita, ensaio realizado com o mesmo extrato de forma promastigota mostrado no ensaio a esquerda, o qual foi pré-tratado com 50 e 100nM de 17-AAG. Para comprovar que a atividade de telomerase presente no extrato foi totalmente inibida, a membrana foi exposta por 2 horas (superexposição). 17-AAG.

Lista de siglas e abreviaturas

17-AAG	17- allilamino-17-demethoxigeldanamicina
°C	Grau Celsius
Akt	Proteína quinase serina/treonina
ATP	Adenosina trifosfato
CPD	Cloridrato de 2-cloro-5- (4-metoxispiro [1,2-dioxetano-3,2 '- (5-clorotriciclo [3.3.1.13.7 decan]) - 4-il] -1-fenilo fosfatase
Cdk4	Ciclina dependente de quinase 4
cRaf	Proto-oncogene piteína quinase serine/threonine
DIG	Dioxigenina
dATP	Deoxiadenosina trifosfato
dCTP	Deoxicitosina trifosfato
DEADE-sepharose	Dietilaminoetil sepharose
DEPC	Deoxiguanina trifosfato
dGTP	Deoxiguanina trifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Fosfatados
DTT	Ditiotreitol
dTTP	Deoxitimina trifosfato
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EGTA	Etilenoglicol-bis (β -aminoetiléter) -N, N, N ', ácido N-tetracético
Est1	Proteína de alongamento dos telômeros 1
Est3	Proteína de alongamento dos telômeros 3
GA	Geldanamicina
GAR1	GAR1 ribonucleoprotein
Her2	Fator de crescimento epidérmico humano Receptor tipo 2
HSP83	Proteína de choque térmico 83
HSP90	Proteína de choque térmico 90
IC	Concentração inibitória
kDa	KiloDaltons

LaCala	Proteína Cala de <i>Leishmania amazonensis</i>
LaRBP38	Proteína RBP 38 de <i>Leishmania amazonensis</i>
LaRPA 1	Proteína RPA 1 de <i>Leishmania amazonensis</i>
LaTBP 1	Proteína TBP 1 de <i>Leishmania amazonensis</i>
LaTRF 1	Proteína TRF de <i>Leishmania amazonensis</i>
Leish TER	TER de <i>Leishmania</i>
M	Molar
M	Mili
NHP ₂	Proteína ribonucleoproteica
NOP 10	Proteína ribonucleoproteica
N	Nano
OMS	Organização Mundial da Saúde
Pb	Pares de bases
PBS	Tampão salino Fosfato
PCR	Replicação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênios
p23	Proteína 23
p53	Proteína 53
RNA	Ácido ribonucleico
RNP	Ribonucleoproteína
RUVB 1	RuvB like AAA ATPase 1
RUVB 2	RuvB like AAA ATPase 2
SDS	Dodecilsulfato de sódio
SL	Spliced leader
TLC 1	lipocalin 1
TRAP	Telomere Repeat Amplification Protocol
TERT	Telomerase reverse transcriptase
TER	Telomerase RNA
μ	Migro
V	Volts

Resumo

A leishmaniose é uma doença crônica, causada por parasitos flagelados do gênero *Leishmania*, podendo se apresentar nas formas clínicas, tegumentar (cutânea), mucocutânea e visceral (calazar). A doença é considerada negligenciada pela OMS, pois não existem até o momento métodos eficientes de tratamento e controle para a mesma. Os telômeros desse parasito são um dos potenciais alvos no desenvolvimento de novos fármacos para o combate dessa doença e, para tanto, é necessário o entendimento da biologia desta estrutura. Uma enzima de grande interesse para o estudo dos telômeros é a telomerase que é a responsável pela manutenção e alongação dessas estruturas nos terminais dos cromossomos. A manutenção dos telômeros não é unicamente regulada pelo complexo ribonucleoproteico (RNP) da telomerase, mas também por proteínas que se associam ao complexo e ao DNA telomérico, tornando a ação do complexo mais efetiva e estável. Até o momento, o complexo telomérico de *Leishmania amazonensis* é o melhor caracterizado dentre os tripanosomatídeos, porém pouco se sabe sobre a biogênese e a composição do complexo RNP telomerase deste parasito. HSP83, ortólogo da HSP90 humana em *Leishmania* é uma chaperona altamente conservada, dependente de ATP e expressa quando as células são submetidas a diferentes tipos de estresse estando envolvida em transdução de sinal, crescimento, diferenciação celular e sobrevivência. Também é de grande importância para patógenos humanos, em particular aqueles cujo ciclo de vida é transmitido por insetos e que sofrem com alterações ambientais tais como temperatura, pH, estresse oxidativo e privação de nutriente. Essa proteína tem sido relacionada com a estabilidade de alguns componentes teloméricos e conseqüentemente à estabilidade dos telômeros em diferentes eucariotos. Além disso, ela está envolvida no processo de diferenciação do parasito em formas amastigotas, na virulência do parasito e na sua sobrevivência no interior de macrófagos do hospedeiro. Um análogo da geldanamicina, inibidor de HSP90, o 17-allilamino-17-demethoxigeldanamicina (17-AAG), reduz a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* e induz a produção de baixos níveis de moléculas pró-inflamatórias por macrófagos infectados. O presente trabalho teve como objetivos estudar a manutenção dos telômeros durante o ciclo de desenvolvimento do parasito e verificar se a HSP83 cumpre algum papel na regulação de componentes da maquinaria telomérica. Resultados aqui apresentados mostram que os telômeros e a atividade de telomerase do parasito sofrem regulação durante o ciclo de desenvolvimento e que possivelmente a HSP83 exerce alguma função na regulação da maquinaria telomérica, uma vez que ela faz parte do complexo ribonucleoproteico telomerase do parasito. Sobre a atividade da telomerase as três formas de desenvolvimento possuem atividade sendo que amastigota e metacíclica na temperatura de 37 °C e promastigota a 28 °C. A HSP83 além de possuir expressão diferencial entre as formas de vida do parasito, maior transcritos em promastigotas, possivelmente sofre mudanças pós-traducionais durante as passagens. Ensaio usando o fármaco 17-AAG mostram que a inibição de HSP83 induz encurtamento telomérico e inibição da atividade de telomerase nas formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Palavras chaves: telômero, telomerase, *Leishmania amazonensis*, HSP83, inibidor de chaperona

Abstract

Leishmaniasis is a chronic disease, caused by flagellated parasites of the genus *Leishmania*, which could be present in different clinical forms such as, tegumentar (cutaneous), mucocutaneous and visceral (kalazar). WHO classifies leishmaniasis as a neglected disease since there are no efficient methods for disease treatment and control. Parasites telomeres are one of the potential targets for the development of new anti-parasitic drugs to combat this disease and, thus, it is necessary to understand the biology of this structure. Telomerase is the enzyme responsible for maintaining and replicating these structures at the chromosomes termini. However, telomeres maintenance is not only regulated by the telomerase ribonucleoprotein complex (RNP), but also by proteins that associate with the complex and with telomeric DNA, making the action of the complex more effective and stable. To date, the telomeric complex of *Leishmania amazonensis* is the best characterized among trypanosomatids, although little is known about the biogenesis and composition of the RNP telomerase complex of this parasite. HSP90 is a highly conserved, ATP dependent chaperone and expressed when cells are subjected to different types of stress. It is also involved in signal transduction, growth, cell differentiation and survival of the chaperonin is of great importance for human pathogens, particularly those transmitted by insects to a mammalian host, and which suffer from environmental changes such as temperature, pH, oxidative stress and nutrient deprivation during its developmental cycle. HSP90 and its orthologues have been related to the stability of telomerase RNP, of some telomeric components and consequently the stability of telomeres in different eukaryotes. In addition, the *Leishmania* spp. HSP90 orthologue, HSP83, is involved in parasite differentiation, in parasite virulence and survival in host macrophages. An analog of geldanamycin, an HSP90 inhibitor, named 17-allylamino-17-demethoxigeldanamycin (17-AAG), reduces the intracellular viability of *L. amazonensis* and induces the production of low levels of pro-inflammatory molecules by infected macrophages. In the present study, we studied telomeres maintenance during the parasite developmental cycle and verified if HSP83 plays a role in the regulation of components of the telomeric machinery. Results shown here demonstrate that both telomere length and telomerase activity are regulated during the parasite developmental cycle and that possibly HSP83 plays a role in telomere maintenance, since HSP83 forms part of the parasite telomerase RNP complex. About the activity of telomerase the three forms of development of the parasite have activity of the enzyme being that the amastigote and metacyclic at the temperature of 37 ° C and promastigora at 28 ° C. HSP83, in addition to having differential expression between life forms, which are larger in promastigotes, may undergo post-translational changes during the passages. Inhibition of HSP83 by 17-AAG induced telomere shortening and inhibition of telomerase activity in *L. amazonensis* promastigotes.

Keywords: telomere, telomerase, *Leishmania amazonensis*, HSP83, chaperone inhibitor

1.Introdução

1.1 Leishmaniose

A leishmaniose é uma doença tropical de importância médica e veterinária, classificada como negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), e tem como agente etiológico mais de 20 espécies de parasitos flagelados do gênero *Leishmania* (BATISTA et al., 2015; HOMBACH; CLOS, 2014). A doença pode se apresentar em diferentes formas clínicas dependendo da espécie do parasito e do estado imunológico do hospedeiro. As formas clínicas mais comuns são a tegumentar (cutânea), caracterizada por feridas na pele por vezes auto-curativas, que podem se apresentar como uma forma mais severa denominada de cutâneo-difusa em indivíduos imunodeprimidos. A forma muco-cutânea, que pode destruir parcial ou totalmente as membranas mucosas do nariz, boca e garganta e forma visceral (calazar), denominada sistêmica, pois compromete vários órgãos internos, em especial o fígado, baço e medula óssea e pode ser letal em indivíduos de idade jovem (PETERSEN et al., 2012).

Nas Américas já foram catalogadas 12 espécies de *Leishmania* que comprometem o homem e oito espécies descritas apenas em animais. Especificamente no Brasil já foram identificadas sete espécies, dentre elas seis do subgênero *Viannia* e uma subgênero *Leishmania*. As principais espécies são: *L.braziliensis*, *L.guyanensis* e *L. amazonensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Apesar da forma tegumentar da doença possuir uma distribuição abrangente no cenário mundial, o parasito alvo deste projeto, é um dos principais agentes causadores da leishmaniose tegumentar na América Central e do Sul, onde ocorrem 95% dos casos. No continente Americano há registro de casos desde o extremo sul dos Estados Unidos até a Argentina, com exceção do Chile e Uruguai. Ela é dita como um problema de saúde pública em aproximadamente 85 países distribuído nos continentes Americanos, na Europa, África e Ásia com índice anual de 0,7 a 1,3 milhões de novos casos no mundo anualmente, segundo dados de 2014 disponibilizados no site da OMS (Figura 1) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Além disso, esta forma da doença acomete indivíduos na bacia do Mediterrâneo e no Oriente Médio, sendo que dois terços destes casos ocorrem no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica) e na República Árabe Síria.

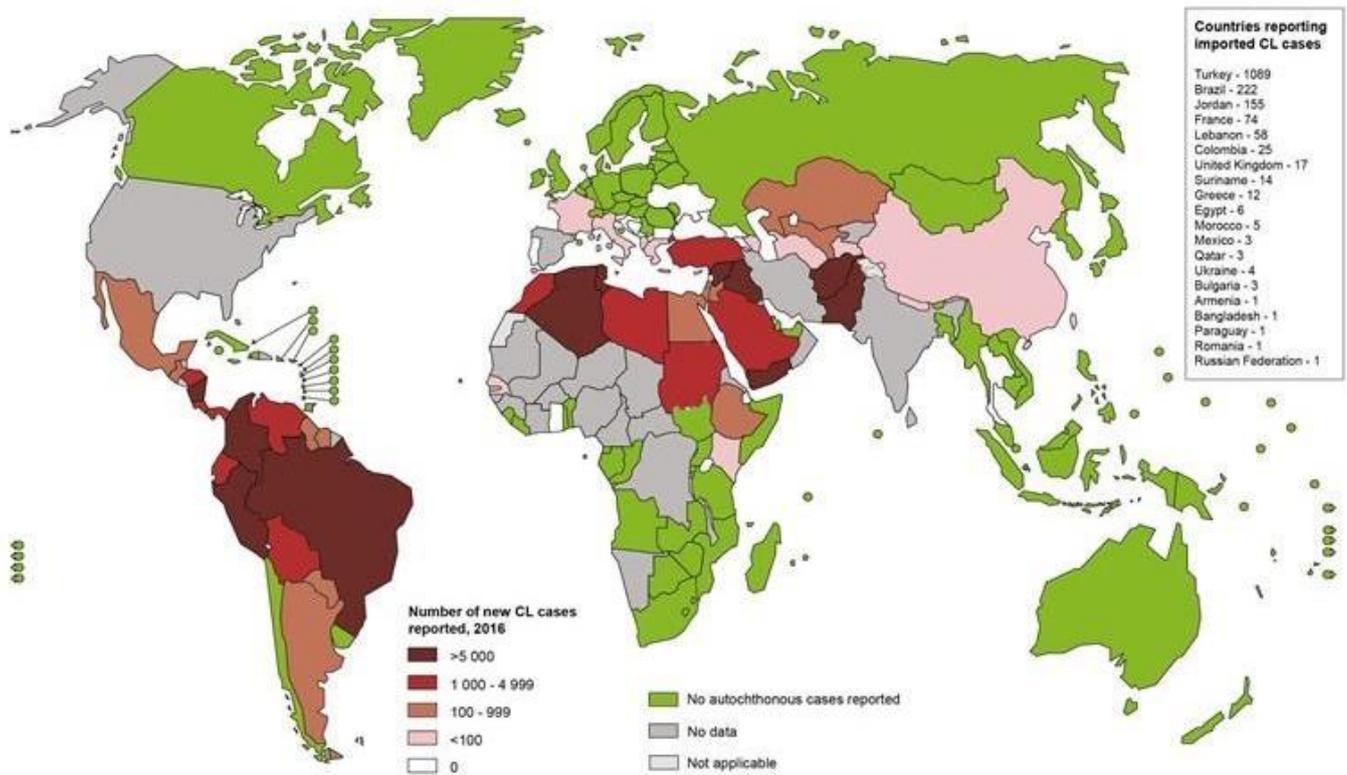


Figura 1. Representação da distribuição de leishmaniose cutânea. Temos a distribuição mundial da leishmaniose cutânea no ano de 2016, segundo o número de casos reportados (<http://datasus.saude.gov.br/>).

No Brasil entre os anos 1995 a 2014 foi observada uma média de 25.763 novos casos de leishmaniose tegumentar registrados com coeficiente de detecção médio de 14,7 casos por 100 mil habitantes (Figura 2 A). Apenas no Estado de São Paulo teve foram registrados 292 novos casos no ano de 2017 (Figura 2 B) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

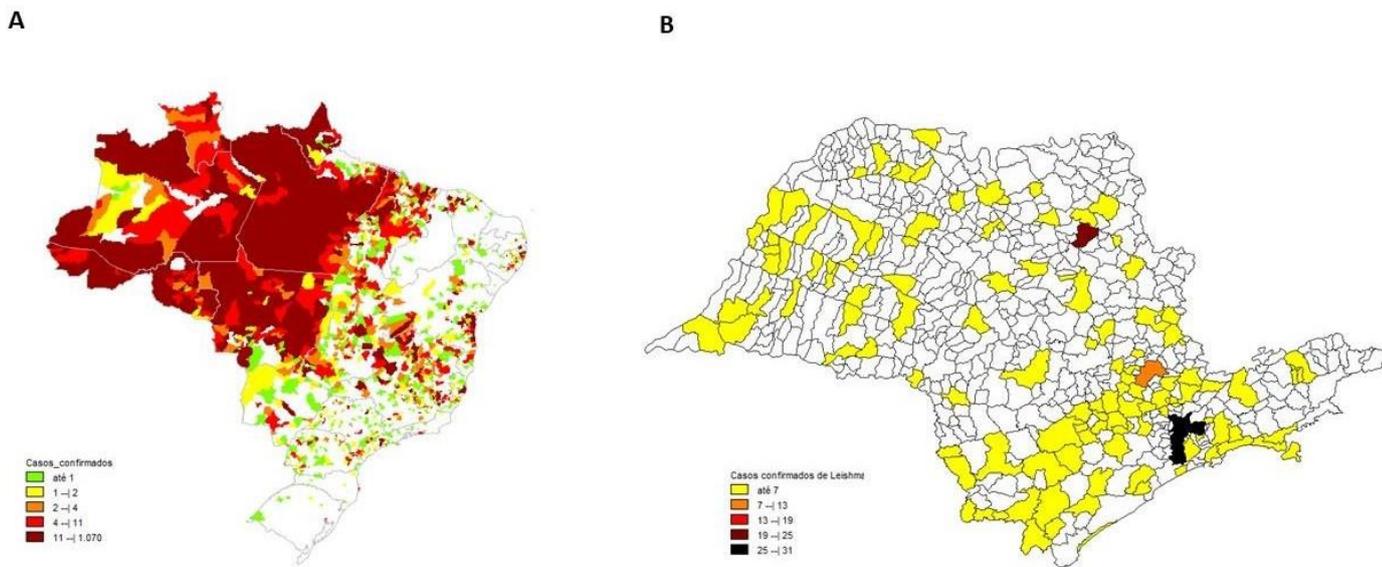


Figura 2. Representação da distribuição da leishmaniose tegumentar no Brasil. Em A, temos o registro de casos de leishmaniose tegumentar por municípios no país. Em B, apenas com casos verificados no estado de São Paulo. Ambos mostram dados referentes ao ano 2017 e foram retirados no site oficial DATASUS (<http://datasus.saude.gov.br/>).

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (HOMBACH; CLOS, 2014), constituída por protozoários unicelulares heteroxenos, os quais podem ser encontrados nas formas promastigota, e amastigota. A forma promastigota é subdividida em promastigota procíclica e promastigota metacíclica (HOMBACH; CLOS, 2014). As duas primeiras formas de vida são caracterizadas pela presença de flagelo alongado e estas formas aparecem livres ou aderidas ao trato digestivo do hospedeiro invertebrado, podendo ser mantidas *in vitro* em cultura axênica. O parasito na forma de vida amastigota encontrada no hospedeiro vertebrado, possui flagelo inaparente, podendo apresentar-se nas formas oval, esférico ou fusiforme, é livre e se multiplica intracelularmente em células fagocíticas (NEVES et al., 2011).

Os hospedeiros invertebrados são, exclusivamente, as fêmeas de insetos hematófagos conhecidos como flebotomíneos, os quais pertencem a Ordem Dípera, Família Psychodidae, subfamília Phebotominae e gênero *Lutzomya* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017). Os hospedeiros vertebrados compreendem principalmente os mamíferos, principalmente roedores e canídeos, podendo afetar casualmente o homem e outras 70 espécies de animais (MONDIALE, 2002). Os hospedeiros vertebrados são infectados no momento em que a forma promastigota metacíclica é inoculada pelo inseto vetor, durante o repasto sanguíneo, sendo fagocitada por neutrófilos e depois por macrófagos periféricos. Depois de fagocitadas, se transformam em amastigotas, se multiplicam lisando o macrófago, e assim, passam a infectar novas células fagocitárias. É neste momento que ocorrem as manifestações clínicas. Durante o repasto sanguíneo, o vetor (hospedeiro invertebrado), ingere a forma amastigota e no trajeto para o trato digestivo ocorre a transformação destas em promastigotas, dando início ao processo de desenvolvimento, multiplicação e diferenciação em formas

promastigotas metacíclicas, seguido da migração das formas metacíclicas para a probóscide do flebotomíneo (Figura 3) (NEVES et al., 2011).

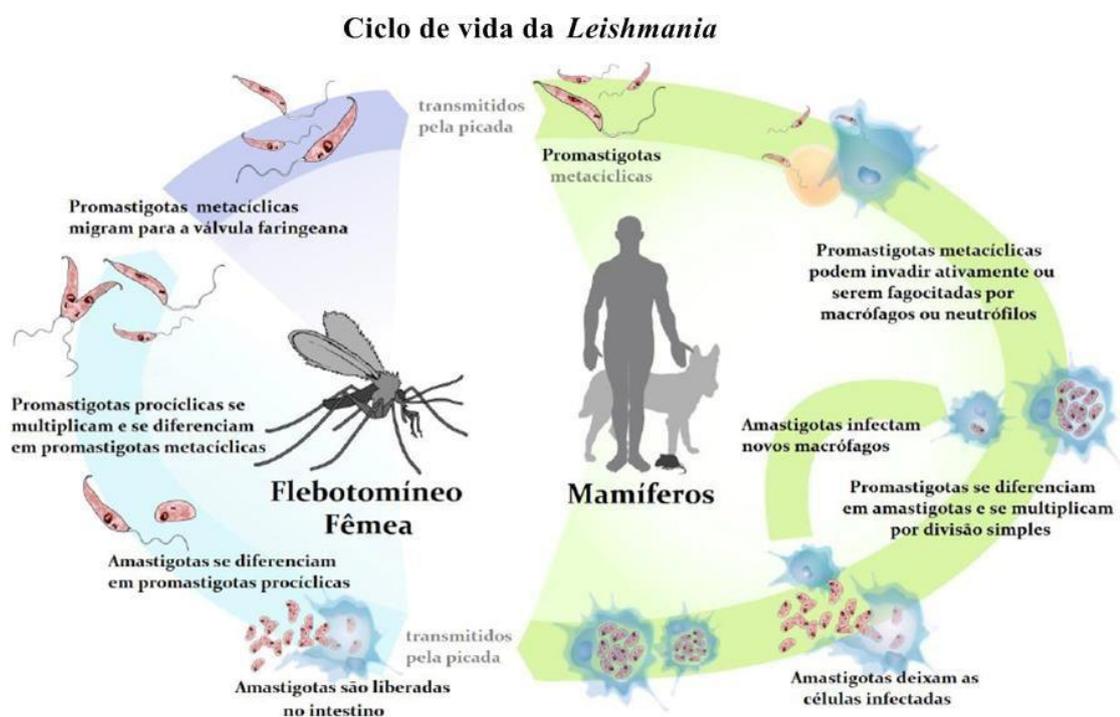


Figura 3. Representação do ciclo de vida de parasitos do gênero *Leishmania*. Figura retirada do site Canal ciência (http://www.canalciencia.ibict.br/pesquisa/0295_A_caminho_da_cura_da_leishmaniose_viscerar_canina.html)

A prevenção da leishmaniose se dá a partir do controle do vetor, dos reservatórios vertebrados, melhoria da habitação e higiene da população, principalmente nas regiões de maior incidência da doença. Em relação ao tratamento, por mais de 70 anos, a primeira linha de tratamento foi o uso de dois antimoniais pentavalentes, o antimoniato de meglumina e o estibogluconato de sódio, os quais são altamente tóxicos. Anfotericina B vem substituindo os antimônios pentavalentes, porém, seu custo é muito elevado para alguns países (CHAPPUIS et al., 2007). A anfotericina B lipossomal é semelhante à anfotericina B em relação a sua eficácia, entretanto é uma forma menos tóxica (PETERSEN et al., 2012). Na atualidade, existem duas vacinas com grande potencial de combater a leishmaniose visceral (LV) (RAMOS et al., 2017). Por ser uma doença caracterizada de crônica ou letal, é fundamental o estudo de novos compostos para combater a leishmaniose, principalmente aqueles que sejam mais eficazes e específicos contra o parasito e causem menor toxicidade ao hospedeiro (PETERSEN, 2015). Há pesquisas que tem como objetivo o uso da enzima telomerase para servir de alvo para o desenho de novos fármacos, com o intuito de combater doenças como o câncer, uma vez que essa enzima é a responsável pela manutenção dos telômeros, uma estrutura fundamental para a estabilidade cromossômica (MELANA; HOLLAND; POGO, 1998; OLAUSSEN et al., 2006).

1.2 Telômeros e telomerase

Os telômeros são estruturas nucleoprotéicas formadas pela interação de proteínas e sequências de DNA repetitivo não codante, localizados nas extremidades dos cromossomos (BLACKBURN; GALL, 1978; PRYDE; GORHAM; LOUIS, 1997). O DNA telomérico é formado por fita dupla, com uma fita rica em guanina (G), e a complementar rica em citosina (C), sendo que, a fita rica em G forma uma protrusão na extremidade 3', denominada 3'-G-overhang, que se estende mais que sua fita complemento (Figura 4) (BLACKBURN, 2005; BLACKBURN; CHAN, 2004). Em mamíferos e outros eucariotos, os telômeros são caracterizados por repetições curtas de 6 nucleotídeos: TTAGGG (HUG; LINGNER, 2006; SMOGORZEWSKA; DE LANGE, 2004), replicados por ação da telomerase e se associam a um complexo nucleoprotéico denominado *Shelterin* que impede que os telômeros sejam reconhecidos e processados como quebras de DNA em dupla fita (DE LANGE, 2005).

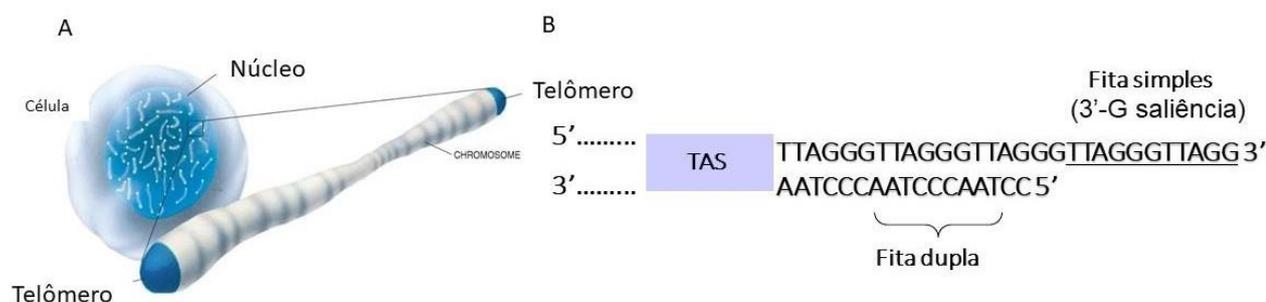


Figura 4. Representação dos telômeros. Em A: demonstração da localização dos telômeros nas extremidades dos cromossomos. Em B, DNA telomérico é formado por fita dupla, uma fita rica em G e a sua complementar rica em C, sendo que, a fita rica em G forma uma protrusão na extremidade 3', denominada 3'-G-overhang, que se estende mais que sua fita complemento.

Durante a replicação do material genético, a DNA polimerase é incapaz de replicar por completo a extremidade 3' da molécula linear do DNA, e assim, essas regiões ficam sem ser duplicadas e expostas, transformando-se ou em substratos para a ação de nucleases das vias de reparo a danos no DNA, ou ainda, podem se fundir umas às outras (FORSYTHE et al., 2001). Para resolver esse problema do fim da replicação de moléculas lineares, a telomerase adiciona repetições teloméricas aos terminos dos cromossomos, usando o terminal 3'-G overhang como substrato. Isso juntamente com o *T-loop* garante que a cada divisão celular nenhuma região do genoma seja perdida ou danificada por ação de nucleases ou maquinaria de reparo a danos no DNA (BLACKBURN, 2005; HOLT et al., 1999; KEPPLER; GRADY; JARSTFER, 2006).

A telomerase é uma ribonucleoproteína (RNP) composta minimamente por um componente proteico (TERT, Telomerase Reverse Transcriptase) e um componente RNA longo não codificador (TER, Telomerase RNA) (NAKAMURA et al., 1997), que tem como função adicionar repetições teloméricas nos cromossomos, estabilizar e manter o comprimento do telômero, assim como sua orientação espacial,

integridade estrutural e estabilidade cromossômica (LINGNER et al., 1997a; SALDANHA; ANDREWS; TOLLEFSBOL, 2003). A telomerase transcriptase reversa (TERT) possui domínios catalíticos conservados e o componente TER contém a sequência molde para a síntese da extremidade 3' (Figura 5). A telomerase faz parte de uma classe de enzimas denominadas de transcriptase reversas, cuja especialidade é sintetizar o DNA a partir do RNA. Esse processo ocorre a partir do componente TER que contém o molde para a polimerização da unidade de repetição telomérica adicionada a extremidade 3' dos telômeros. No caso da *Tetrahymena*, por exemplo, o molde para a repetição telomérica (5'-TTGGGG - 3') contido no RNA, é 3' - AACCCC - 5'. Em *Leishmania* spp. a sequência do molde no TER é 3'- ACCCTTACCCTA-5', utilizada para copiar repetições do tipo - TTAGGG - pela telomerase do parasito (VASCONCELOS et al., 2014)

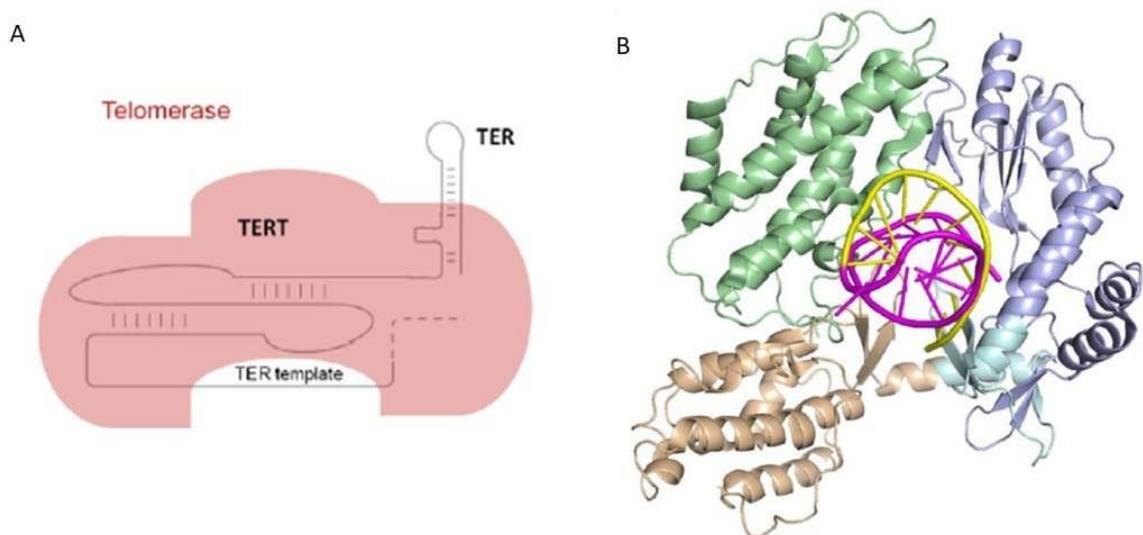


Figura 5. Representação da estrutura mínima do complexo ribonucleoproteico da telomerase. Os componentes mínimos do complexo são a TERT (Telomerase reverse Transcriptase), o qual corresponde à porção protéica e o RNA (TER, Telomerase RNA) que contém o molde da repetição telomérica utilizado pela TERT para estender os telômeros (GIARDINI et al., 2014). (B) Representação em *cartoon* da estrutura cristalográfica da telomerase de *T. castaneum*, demonstrando a configuração em anel, formada pelos três domínios estruturais da proteína complexada ao componente RNA (magenta) que aparece interagindo com o DNA telomérico (amarelo) (GILLIS et al., 2008; MITCHELL et al., 2010)

Após alongar o terminal 3' *G-overhang*, em um novo ciclo de replicação do DNA, a primase sintetiza uma molécula iniciadora (*primer*) que pareia com o terminal 3' *G-overhang* alongado no ciclo anterior pela telomerase, permitindo assim que a DNA polimerase faça a síntese de preenchimento da fita C telomérica, de forma a não permitir que ocorra encurtamento progressivo dos terminais dos cromossomos (Figura 6) (GIARDINI et al., 2014).

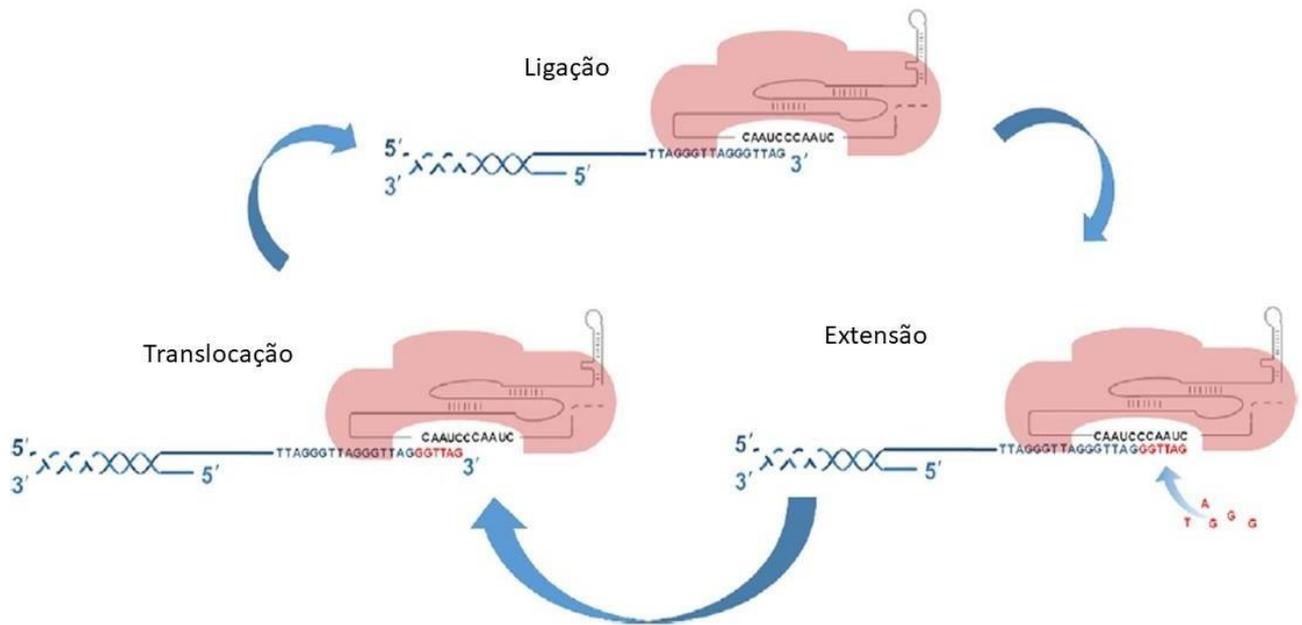


Figura 6. Mecanismo de adição de nucleotídeos na região telomérica dos cromossomos pela telomerase. Em 1, a TERT interage com a repetição telomérica e permite que o componente TER se acople ao terminal 3'G *overhang*. Em 2, a TERT estende a região telomérica copiando o molde contido no TER, por adição de nucleotídeos ao terminal 3' OH dos cromossomos. Ao término da adição de uma repetição (3), a TERT se desloca e se repositioa em relação à repetição telomérica para dar início a um novo ciclo de amplificacao. Modificado a partir de Giardini, et. al, (2014)

Porém, é sabido que a atividade da telomerase é praticamente ausente na maioria das células somáticas humanas levando ao evento da senescência replicativa e envelhecimento celular. Por outro lado, a enzima é ativa em células germinativas, células tronco embrionárias, tronco adultas, células somáticas com alta capacidade de proliferação e em 85-90% das células tumorais. Graças a esta funcionalidade, a telomerase pode ser utilizada como alvo para terapias antitumorais (GREIDER, 1996).

1.3 Telômeros em *Leishmania* spp.

Assim como em mamíferos, os telômeros das *Leishmania* spp. são complexos nucleoprotéicos constituídos por proteínas que se associam as repetições de 6pb da sequência conservada 5'-TTAGGG-3', a qual é mantida pela ação da telomerase. A atividade enzimática já foi detectada em extratos celulares de formas promastigotas de três espécies de *Leishmania* e em outros organismos, como os *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*. Em todos esses organismos a telomerase apresenta comportamento bioquímico semelhante aos demais eucariotos uma vez que é capaz de adicionar repetições TTAGGG na extremidade 3' da fita telomérica rica em G e satisfazer outros parâmetros essenciais para a atividade da telomerase, tal como sensibilidade a RNase A. A processividade da enzima difere entre os tripanosomatídeos, com *Trypanosoma brucei* apresentando a enzima mais processiva em comparação com as telomerases de *T. cruzi* e *Leishmania* spp. (CANO et al., 1999; GIARDINI et al., 2006a, 2011; MUÑOZ; COLLINS, 2004).

domínio do tipo C/D box snoRNA. Em formas promastigotas, a forma madura de LeishTER que contém o 5' SL cap, co-immunoprecipita e co-localiza com o componente protéico da telomerase (TERT) de forma dependente da fase do ciclo celular. A predição da estrutura secundária de LeishTER sugere fortemente a existência de uma sequência molde simples fita localizada próxima ao terminal 5' e um motivo conservado C[U/C]GUCA contido na hélice II, que representa o elemento TBE responsável por interagir com o domínio de interação com o RNA no componente TERT (TRBD, *Telomerase RNA Binding Domain*) (VASCONCELOS et al., 2014).

Porém, ainda não estão caracterizadas outras subunidades ou proteínas acessórias do complexo telomerase RNP, as quais em outros eucariotos cumprem papéis diversos na regulação da atividade enzimática, na elongação dos telômeros, na interação da enzima com o DNA telomérico, no seu recrutamento para os telômeros e por fim na biogênese do complexo RNP. Dentre estas proteínas estão algumas que são organismo-específicas como as que compõem o complexo telomerase humano. Entre elas estão as chaperonas HSP90 e sua co-chaperona p23, RUVB1 e RUVB2 (pontin e repetin, respectivamente), o subcomplexo disquerina, que inclui as proteínas Nop10, NHP2 e GAR1 e mais a proteína TCAB1 que interage com o componente hTER (SCHMIDT; CECH, 2015; VIVIESCAS ET AL., 2019). Em leveduras de brotamento as proteínas Est1 e Est3 compõem o complexo telomerase RNP juntamente com TERT (Est2), TER (TLC1), as proteínas Sm envolvidas com a biogênese de TER e a chaperona HSP82 (SCHMIDT; CECH, 2015; TUCEY; LUNDBLAD, 2014).

1.4 Funções das chaperona HSP90 e sua ortóloga HSP83 em *Leishmania* spp.

A proteína de choque térmico 90 (HSP90) é a chaperona dependente de ATP (Figura 8) mais abundante encontrada no citosol em células eucariotes (WEIKL; ABELMANN; BUCHNER, 1999), sendo altamente conservada, e produzida em resposta a diferentes tipos de estresse. Esta chaperona está envolvida na transdução de sinal, crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (GHADBAN et al., 2016; VARELA-M et al., 2014; WAGATSUMA et al., 2017). Suas funções mais conhecidas são: enovelamento proteico, estabilização e montagem de proteínas, incluindo quinases, fatores de transcrição, proteínas relacionadas ao controle do ciclo celular e transcriptase reversa (PALLAVI et al., 2010; PETERSEN et al., 2012; WEIKL; ABELMANN; BUCHNER, 1999). Além disso, essa proteína é importante para patógenos que comprometem os humanos, em particular aqueles que são transmitidos por insetos e que vivem em ambientes hostis onde comumente estão expostos a mudanças de temperatura, pH, ao estresse oxidativo e a privação de nutrientes (REQUENA; MONTALVO; FRAGA, 2015).

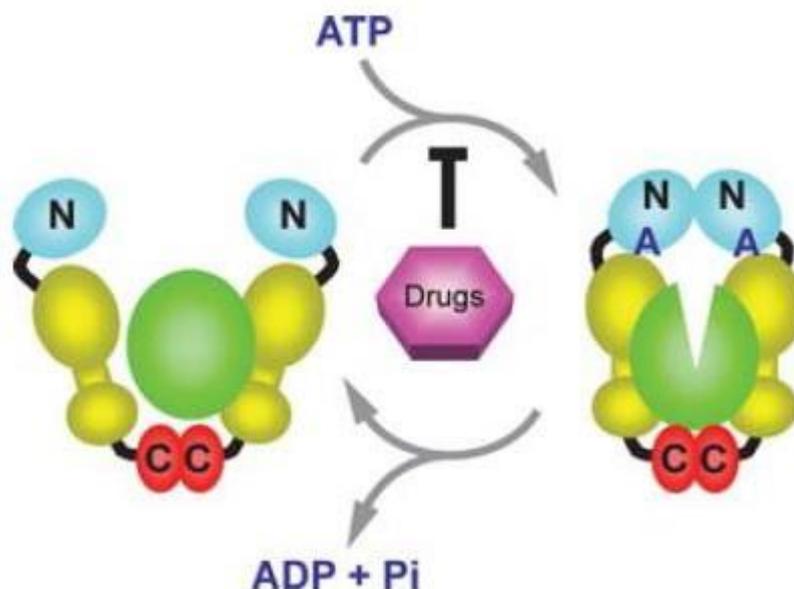


Figura 8. Modelo das alterações conformacionais que acompanham a interação e hidrólise de ATP pela HSP90 baseado em evidências estruturais e bioquímicas. O N-terminal (azul), o porção mediana (amarelo) e o C-terminal (vermelho) estão mostrados. A proteína cliente (verde) se liga a HSP90 e sofre alterações durante a passagem da chaperona para o estado conformacional de interação com o ATP. Inibição da interação da HSP90 por inibidores como a geldanamicina, bloqueia a ativação da proteína cliente. Figura retirada de (PEARL AND RODROMOU (2006).

A estrutura da HSP90 consiste em três domínios: N-terminal que é responsável pela ligação do ATP (dimerização transitória), pelos domínios do meio e o domínio C-terminal, que é encarregado pela dimerização inerente da proteína (Figura 8). A ligação com ATP estabiliza o dímero de HSP90 em um estado conformacional e funcional, enquanto a hidrólise de ATP para ADP provoca o relaxamento do dímero (PEARL AND PRODRMOU, 2006, PRODRMOU, 2016).

A chaperona tem papel em várias funções celulares normais e estão envolvidas com várias doenças humanas, desde amiloidoses, causadas por mal enovelamento proteico até o câncer. Por isso, essa molécula está sendo usada como alvo terapêutico em doenças que comprometem a função de manter a conformação, estabilidade e atividade de muitas proteínas celulares que cumprem papel chave em diferentes moléculas tais como os receptores hormonais intracelulares, cRaf, Her2, Akt, a ciclina Cdk4, a p53 e a telomerase (TOOGUN; DEZWAAN; FREEMAN, 2008). Várias tirosinas e serina/treonina quinase foram detectadas em complexos com HSP90 *in vitro* e *in vivo*, isso vem mostrando que a chaperona também é fundamental para o dobramento correto das quinases (SCHEIBEL; BUCHNER, 1998).

Para manter a integridade dos telômeros e a homeostase celular, são necessários meios eficientes para a correta montagem e desmontagem do complexo telomerase. As chaperonas têm sido relacionadas com a estabilidade de alguns componentes teloméricos e, conseqüentemente, à estabilidade dos telômeros. Em humanos e leveduras, a HSP90 e sua co-chaperona p23 permanecem associadas com a telomerase contribuindo diretamente para a atividade da telomerase. Em humanos a HSP90/p23 se liga a TERT no citoplasma e a direciona para o nucleoplasma e essa interação permanece até a extensão dos telômeros. Nas

leveduras essa interação acontece no recrutamento da telomerase e na extensão dos telômeros (VIVIESCAS; SEGATTO; CANO, 2017). A inibição da ação do complexo HSP90/p23 altera a atividade da telomerase e a manutenção dos telômeros (FORSYTHE et al., 2001; HOLT et al., 1999; KEPPLER; GRADY; JARSTFER, 2006; TOOGUN; DEZWAAN; FREEMAN, 2008).

Durante o seu ciclo de desenvolvimento, protozoários do gênero *Leishmania* estão expostos a várias alterações ambientais e principalmente a mudanças de temperatura quando o parasito troca de hospedeiro e conseqüentemente sofre diferenciação celular (GRAEFE et al., 2002; PETERSEN et al., 2012; WIESGIGL; CLOS, 2001). Com isso, pesquisas apontam que as proteínas de choque térmico de *Leishmania* fazem parte das vias de transdução de sinal que regulam a conversão de fase de desenvolvimento e a expressão gênica específica (KROBISCH et al. 1998; WIESGIGL and CLOS, 2001; MORALES et al. 2010; HOMBACH et al. 2012). Por exemplo, já está comprovado que a HSP83, ortólogo da HSP90 em *Leishmania*, está diretamente envolvida no processo de diferenciação das formas metacíclicas originadas no hospedeiro invertebrado para as formas amastigotas intracelulares encontradas no hospedeiro vertebrado (mamífero). Além disso, ela também cumpre papel na virulência do parasita e em sua sobrevivência no interior dos macrófagos no hospedeiro vertebrado (HÜBEL et al., 1997; REQUENA; MONTALVO; FRAGA, 2015; SHONHAI et al., 2011), uma vez que parasitos submetidos a condições de estresse apresentam aumento da virulência e aumento da expressão de chaperonas (SALOTRA et al., 1994).

Em *Leishmania* spp. a HSP83, (VARELA-M et al., 2014), representa 2,8% do total das proteínas celulares presentes no parasito (BRANDAU; DRESEL; CLOS, 1995; PETERSEN et al., 2012; VARELA-M et al., 2014). A sequência de aminoácidos da HSP83 de diferentes espécies do parasito compartilham alta identidade entre si (~93%) e por sua vez compartilham ~63% de identidade com a HSP90 humana, sugerindo que a HSP83 pode exercer funções semelhantes a HSP90 humana (SILVA; SERAPHIM; BORGES, 2013; VARELA-M et al., 2014).

1.5 O análogo da geldanamicina, 17-allilamino-17-demethoxigeldanamicina (17-AAG) inibidor de HSP90

O fármaco 17-allilamino-17-demethoxigeldanamicina (17-AAG) é um análogo menos tóxico da geldanamicina (GA), inibidor bem caracterizado da chaperona HSP90. Ele também é mais estável do que a GA e apresenta uma modificação na posição 17 da GA (retirada da molécula de Metil) (LI et al., 2014). Resultados *in vitro* com domínios isolados da chaperona demonstraram que GA, assim como o ATP alteram a afinidade do sítio do domínio N-terminal da HSP90 (SCHEIBEL; BUCHNER, 1998). A GA, atua especificamente no sítio ativo da ligação de ATP na chaperona (PRODROMOU, 2006, ZHAO et al., 2017), inibindo a hidrólise do ATP (PETERSEN et al., 2012) e bloqueando a ligação com a sua co-chaperona p23, comprometendo assim, a função dessa molécula (WAGATSUMA et al., 2017) e de outras proteínas que

dependem da atividade da HSP90 (FUMO et al., 2018). A HSP90 inativada induz uma resposta de estresse celular (GRAEFE et al., 2002) e por isso seus inibidores vêm sendo utilizados como agentes quimioterápicos capazes de induzir a apoptose e apresentar efeitos antitumorais (MOHAMMADIAN; ZEYNALI; AZARBAIJANI, 2017).

O inibidor mimetiza a ligação de ADP/ATP utilizando as interações oferecidas pelo sítio no domínio N-terminal da chaperona (Figura 9). Quase todas as ligações hidrofóbicas que o ATP utiliza são reproduzidas pelo inibidor, ressaltando que o GA só não possui a ligação com uma outra chaperona, HSP 70, a qual interage tanto com ATP quanto com a HSP90 (SCHEIBEL; BUCHNER, 1998).

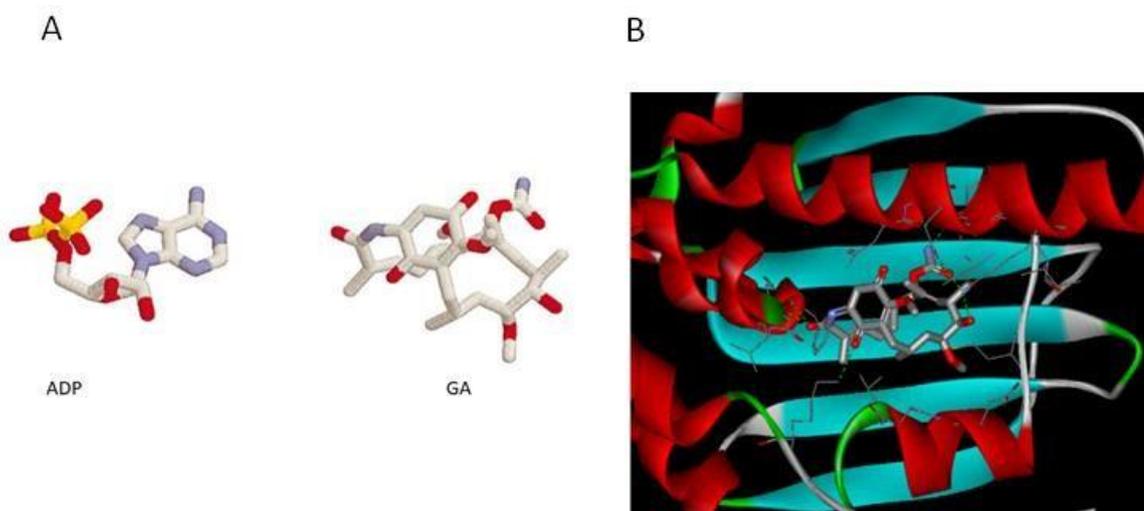


Figura 9: Estrutura do ADP e geldanamina (GA) na conformação que ambas se ligam a HSP90 e mecanismo de ligação com a chaperona. Em A, embora ambas as moléculas apresentem propriedades químicas diferentes, a GA imita a estereoquímica do ADP para competir pelo sítio de ligação na chaperona (SCHEIBEL; BUCHNER, 1998). Em B, interação da GA com a HSP90 (LI et al., 2012).

Segundo estudos de Pallavi e colaboradores (2010), o fármaco 17-AAG inibe o crescimento *in vitro* de *Trypanosoma* e os camundongos infectados pelo parasita quando tratados com o fármaco tiveram 60% de sobrevivência. Em relação ao protozoário *Toxoplasma gondii*, quando tratados com GA, resultou na redução da invasão e crescimento intracelular nas células hospedeiras (AHN; KIM; NAM, 2003)

Em *Leishmania* spp., a HSP83 desempenha papel na diferenciação da forma promastigota metacíclica para amastigota no momento em que há mudança de hospedeiro (WIESGIGL; CLOS, 2001). Petersen et al (2012) comprovaram que o tratamento com o fármaco 17-AAG reduz a viabilidade intracelular de formas amastigotas de *L. amazonensis* e induz a produção de baixos níveis de moléculas pró- inflamatórias nos macrófagos infectados. Estudos anteriores demonstraram que a diminuição de crescimento durante o uso do fármaco 17-AAG acontece também em outros protozoários (PETERSEN et al., 2012)

Além disso, resultados preliminares do nosso grupo confirmam esses achados e mostram que o fármaco 17-AAG na concentração de 100 nM (IC50) inibe parcialmente o crescimento de *L. amazonensis* tanto na forma promastigota em crescimento axênico quanto de formas amastigotas se multiplicando em macrófagos *in vitro*, não exercendo nenhum efeito inibitório no crescimento dos macrófagos (Segatto et al., não publicado).

Aliado a isso, dados anteriores do grupo de pesquisa mostrou que durante o mesmo ciclo de desenvolvimento *L. amazonensis* apresenta variação no tamanho dos telômeros que parece ser dependente não somente da fase do ciclo, mas também da temperatura de crescimento do parasito (Figuras 5). Como mostrado nas Fig. 10 (resultado de ensaios de Southern blot telomérico e Flow-Fish, respectivamente), os telômeros dos parasitas encurtam à medida que ele se diferencia de promastigota para metacíclico e de metacíclico para amastigota. Isto sugere fortemente que a manutenção dos telômeros nesses parasitos é finamente regulada. De acordo com dados de Inbar et al. (2017), durante o ciclo de desenvolvimento, o parasito sofre uma reprogramação genética apresentando níveis diferenciais de expressão gênica associados principalmente à alteração de fase do ciclo de desenvolvimento e a temperatura de crescimento. Assim, especulamos que as alterações de tamanho nos telômeros dos parasitas ocorridas durante um ciclo de desenvolvimento, são um indicativo de reprogramação desta maquinaria.

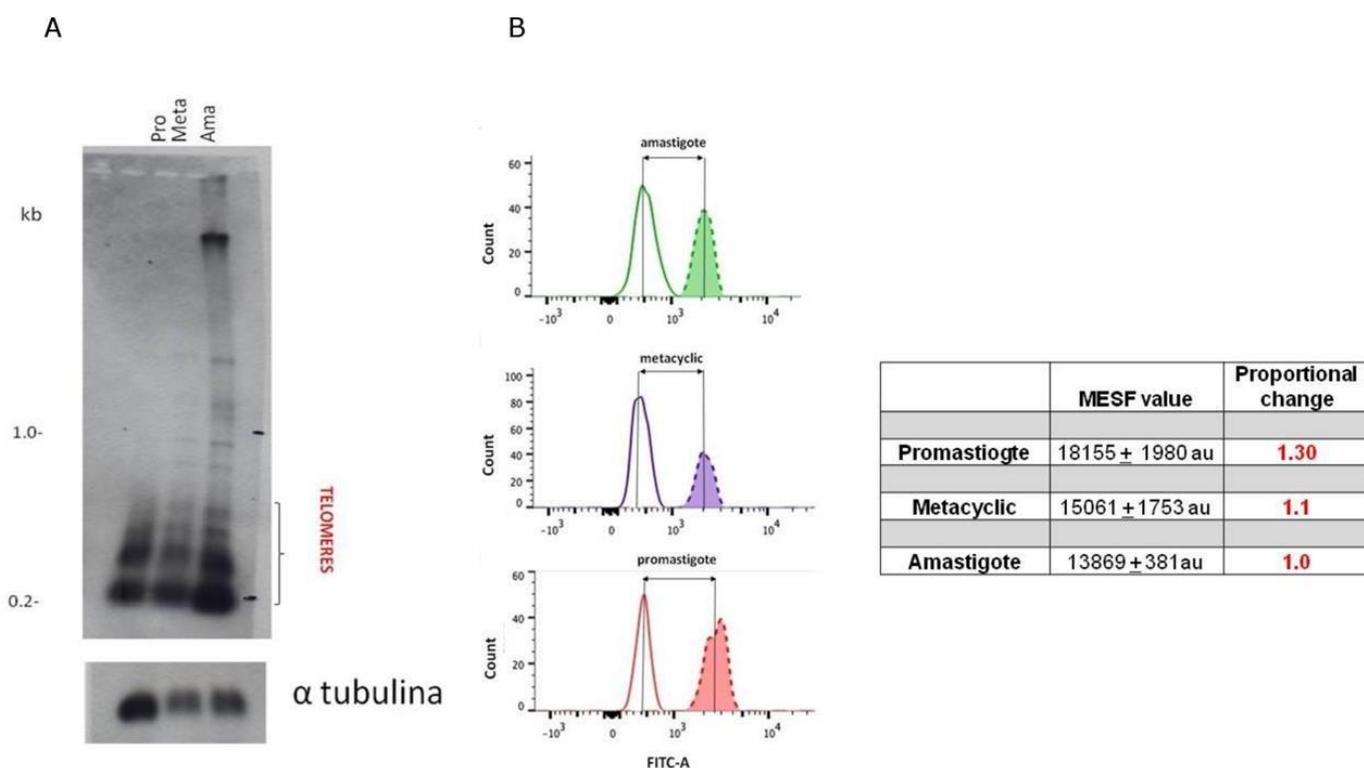


Figura10. Perfil do tamanho dos telômeros nas diferentes formas evolutivas de *Leishmania amazonensis*. A) Southern blot telomérico utilizando o kit Telo TAGGG Telomere Length Assay (Roche). 2µg de DNA genômico foram digeridos com 10U da enzima de restrição *AfaI* e fracionados em gel de agarose 1%. Na imagem superior os fragmentos de digestão foram hibridizados com a sonda da repetição telomérica e na imagem inferior os fragmentos foram hibridizados com sonda que reconhece o gene alfa-tubulina utilizada como controle de quantidade de DNA. Ama: amastigotas, Pro: promastigotas, Meta: metacíclicas. B) Ensaio Flow-FISH mostrando as diferenças entre o tamanho dos telômeros das diferentes fases de desenvolvimento de *L.*

amazonensis. Histogramas (No. de parasitas (counts) x fluorescência (FITC)) mostrando a quantidade de DNA total (curva em linha contínua) e DNA hibridizado com a sonda telomérica que denota diferenças entre o tamanho dos telômeros (curva em linha pontilhada) nas formas amastigota, metacíclica e promastigota de *L. amazonensis* usando Flow-FISH. Os dados foram analisados usando FlowJo software v.7.6.5. A tabela ao lado compila os dados dos histogramas e mostra a diferença proporcional entre o tamanho dos telômeros nas diferentes formas do parasito (em números arbitrários).

Existem várias proteínas envolvidas na regulação da expressão gênica e entre elas estão as proteínas de choque térmico, pois estão envolvidas no processo de diferenciação celular e possuem uma grande importância para os patógenos que comprometem os humanos. Por isso a HSP83, pode ser uma das chaperonas alvo no processo de regulação dos telômeros, uma vez que existem evidências que em *Leishmania* spp. elas desempenham importante papel durante o ciclo de desenvolvimento do parasito (HOMBACH; CLOS, 2014; SHONHAI et al., 2011).

Desta maneira, o intuito do presente trabalho é iniciar estudos sobre a regulação da maquinaria de manutenção dos telômeros de *Leishmania* spp. e averiguar o papel da proteína HSP83 na manutenção dos telômeros nesses parasitos. Para tanto, formas promastigotas de *L. amazonensis* serão tratados com o análogo de geldanamicina denominado 17 –AAG e o efeito da inibição da HSP83 sobre a maquinaria telomérica será analisada comparando-se o perfil de atividade da telomerase e o tamanho dos telômeros de parasitos tratados e não tratados.

2. Objetivos

Este projeto de pesquisa teve como objetivo o estudo da manutenção dos telômeros durante o ciclo de desenvolvimento de *L. amazonensis*.

Entre os objetivos específicos estão:

- 1- Analisar o perfil do TRF (Telomere Restriction Fragment) nas diferentes formas de desenvolvimento originados do mesmo ciclo de desenvolvimento do parasito;
- 2- Avaliar a atividade da telomerase nas diferentes formas de desenvolvimento originados do mesmo ciclo de desenvolvimento do parasito,
- 3- Verificar se a HSP83 interage com o complexo RNP telomerase e se ocorre alguma alteração nos telômeros e na atividade de telomerase quando os parasitos são tratados com 17- AAG.

3. Material e métodos

3.1 Cultivo de formas de vida promastigotas de *L. amazonensis*

Formas promastigotas (P0-passagem zero) foram diferenciadas a partir de formas amastigotas, após 24h em cultura axênica a 27 °C, em meio 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (Cultilab) pH6.5, suplementado, solução 1X de Antibiótico/antimicótico (penicilina e estreptomicina) (Life Technologies, Gibco-BRL), 40 mM Hepes, 10 mM Adenina, 0,0001 % de Biotina e 0,0005% de Hemina.

Formas amastigotas foram coletadas de coxim plantar de camundongos Balb/c infectados previamente com formas metacíclicas. Promastigotas P0 foram mantidos em cultura exponencial e a partir do momento que alcançavam a fase exponencial (4 dias com aproximadamente 2×10^8 células/ml) foram repicadas sucessivamente a cada 4 dias (P1-P6) inoculando-se aproximadamente 1×10^7 parasitas em novo meio de cultura. As culturas foram mantidas em fase exponencial e a cada 4 dias foram contadas, e amostras foram coletadas para ensaios posteriores de extração de DNA para Southern blot telomérico e extração de proteínas para Western blot. As passagens 1 a 6, representam culturas contendo parasitos com duplicações populacionais crescentes, sendo a P6 a que contém parasitos com mais duplicações celulares. Em todas as passagens obtiveram-se formas metacíclicas a partir de culturas de parasitos que atingiram fase estacionária de crescimento (após 8 dias em cultura). A quantidade de parasitos em cada passagem foi calculada pelo número de parasitos totais contados em câmara de Neubauer, multiplicado pelo fator de correção (10^4) e a diluição utilizada.

3.2 Obtenção de formas promastigota metacíclicas de *L. amazonensis*

As formas metacíclicas foram obtidas após as culturas de formas promastigotas de cada passagem atingirem a fase estacionária, ou seja depois de 8 dias de crescimento. Para separar as formas metacíclicas das formas promastigotas utilizou-se aglutinação na presença de lecitina de amendoim (*Arachis hypogaea*). Primeiramente os parasitos foram separados do meio usando centrifugação por 10 min a 4°C a 3214 g, sendo que a primeira foi para retirar o meio de cultura e em seguida os parasitos foram submetidos a duas lavagens em PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) e após as lavagens os parasitos foram ressuspensos em solução PBS 1X contendo 100 μg de Lectina *Arachis hypogaea* (Sigma Aldrich) e 5 mM EDTA, e incubados por uma hora em temperatura ambiente. Para separar as formas promastigotas (precipitado) das metacíclicas (sobrenadante), os parasitos foram centrifugados por 10 min a 4°C a 11 g. Após coleta do sobrenadante contendo as formas metacíclicas, os parasitos passaram por uma centrifugação de 3214g a 4°C e a partir desse passo procedeu-se com extração de DNA e de proteínas

3.3 Obtenção de formas de vida amastigotas de *L. amazonensis*

Essa parte do trabalho foi realizado em colaboração com o Professor Dr Helio Langoni no Departamento de Higiene Veterinária e Saúde Pública na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP do campus de Botucatu.

As formas amastigotas de *L. amazonensis* (cepa MHOM/BR/73/M2269) foram obtidos por meio de infecção do coxim plantar de camundongos (Balb/C) com formas promastigotas e metacíclicas. As culturas de forma promastigota e metacíclicas foram contadas em câmeras de Neubauer e 1×10^7 parasita de cada forma foram centrifugadas a 3214 g, a 4°C por 5 minutos. Em seguida foram lavados com PBS 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCL, 10 mM Na_2HPO_4 , 2 mM KH_2PO_4 , pH 7,4) e novamente centrifugados nas mesmas condições

e por final resuspensos em 40 μ l de PBS 1X.

Utilizando agulha de insulina de 1ml, os 40 μ l foram injetados no coxim plantar das patas traseiras dos camundongos e semanalmente, esses animais foram monitorados para acompanhar o avanço do processo infeccioso. No momento que se observou a formação de lesões, procedeu-se com a extração das formas amastigotas. Estas foram extraídas por meio de maceração da pata com o auxílio de bisturi, tesoura e pinça e solução de PBS 1X (NaCl 137 mM, fosfato 10 mM, KCl 2.7 mM, e um pH de 7.4.) na presença de 66 μ g de Gentamicina.

O processo de separação entre as células do camundongo e as formas amastigotas foi realizada por centrifugação diferencial, seguindo protocolo de Barbieri et al. (1990). Primeiramente foram realizadas duas centrifugações de 32 g cada, a 4°C por 10 minutos para coleta das amastigotas presentes no sobrenadante. Em seguida foram realizadas duas centrifugações a 110 g, 4°C por 10 minutos onde se descartou o sobrenadante e resuspendeu o precipitado em PBS 1X e, após a última lavagem os parasitos foram usados para cultivo em meio 199 (Cultilab) pH6.5, suplementado com 20 % de soro fetal bovino, solução de Antibiótico/antimicótico 1X (penicilina e estreptomicina) (Life Technologies, Gibco-BRL), 40 mM Hepes, 10 mM Adenina, 0,0001 % de Biotina e 0,0005% de Hemina e cultivados a 27°C na estufa incubadora B.O.D e , também separou se os volumes necessário para posteriormente extração de proteína e de DNA.

3.4. Obtenção de extratos proteicos das diferentes formas de desenvolvimento de *L. amazonensis*

A extração de proteína das três formas de desenvolvimento do parasita (amastigotas, promastigotas e metacíclicos provenientes de um mesmo ciclo de desenvolvimento) foi realizada utilizando-se 10 ml de uma suspensão de amastigotas obtidas segundo protocolo descrito no item 3.3, de culturas de promastigotas em fase exponencial de crescimento (aproximadamente 2×10^8 células/ml) e de aproximadamente 2×10^6 /ml formas metacíclicas obtidas segundo descrito no item 3.2. Para obtenção dos extratos, e quando necessário, os parasitos foram separados do meio de cultura por centrifugação a 3214g por 5 minutos a 4°C. Finalizada a centrifugação descartou-se o sobrenadante e os parasitos foram lavados por duas vezes com 5 ml de 1X PBS-glicose (2%), seguido de centrifugação. Depois da última centrifugação, o sobrenadante foi descartado e os parasitos foram ressuspensos em 1 ml de Tampão A (20 mM Tris HCL pH7,5; 1 mM EGTA pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0; 1 mM espermidina; 0,3 mM espermina e 5 mM β -mercaptoethanol) (CANO et al., 1999), contendo inibidor de protease na concentração final de 1X, em seguida foram incubados com 10 μ l de NP-40 no gelo por 30 minutos.

Depois do tempo esperado, retirou-se uma pequena alíquota da mistura para avaliar a lise celular utilizando microscópio ótico (Nikon Eclipse TS100). Em seguida a suspensão foi transferida para tubo do

tipo *ependorf*, seguido de centrifugação a 10.000 g a 4°C por 20 minutos. O sobrenadante desta mistura (extrato proteico total) foi armazenado a -80°C para se proceder com a purificação em coluna de troca iônica DEAE-sepharose.

35 Cromatografia de troca iônica em DEAE para purificação de proteínas e da atividade de telomerase

A coluna de DEAE-sepharose (dietilaminoetanol, Amershan Biosciences) foi montada segundo a capacidade de retenção da resina que é de 40 mg de proteína/ml.

Durante a montagem, o suporte da coluna foi lavado com solução RNase AWAY (Invitrogen™), seguido de água DEPC (dicarbonato de dietila, Invitrogen) de modo a se trabalhar em ambiente livre de RNase. Em seguida foi aplicada a quantidade de resina DEAE correspondente à concentração do extrato proteico (ver item 3.4). A mesma foi equilibrada com 10 volumes de tampão 1X TMG (10 mM Tris-HCl pH8,0; 1.2 mM MgCl₂, 10% Glicerol vol/vol) suplementado com 100 mM acetato de sódio pH 8,0; 1 mM DTT e 0,1 mM EDTA. Depois foi aplicado 1 volume do tampão e para equilibrar a resina *overnight*. Posteriormente, o extrato foi dialisado *overnight* na presença de 1X inibidor de protease em 1X TMG contendo 100 mM de acetato de sódio pH 8,0, 1 mM DTT e 0,1 mM EDTA.

No dia seguinte, o excesso de tampão foi retirado da coluna por gravidade e, em seguida, o extrato foi aplicado vagarosamente. O *Flowthrow* contendo proteínas que não interagem com a resina DEAE, foi coletado em um microtubo e em seguida a coluna foi lavada com 6 volumes de 1X TMG contendo 1 mM DTT, 0,1 mM EDTA e 100 mM acetato de sódio pH 8,0. Em seguida procedeu-se com a coleta das misturas proteicas contendo atividade de telomerase. Os eluatos da coluna que geralmente apresentam atividade da telomerase são aqueles obtidos após eluição das misturas proteicas em 1X TMG suplementados com 400 mM, 32 mM e 600 mM de acetato de sódio pH 8,0 conforme descrito anteriormente (CANO et al., 1999; GIARDINI et al., 2011). Cada mistura proteica obtida após eluição com cada um desses tampões, foi adicionado 1X inibidor de protease e dialisados *overnigh* a 4 °C contra tampão contendo 1X TMG com 250 mM acetato de sódio pH 8,0; 1 mM DTT e 0,1 mM EDTA. No dia seguinte, foram realizadas alíquotas em volumes de 10 µl por tubo e armazenado no freezer à -80°C.

36 Ensaio de atividade de telomerase pelo método TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol)

Para os ensaios de atividade enzimática, foram utilizados 5µl de cada amostra proteica (eluatos de 400 mM, 500 mM e 600 mM (aproximadamente 1 µg de proteínas totais por amostra). Na primeira etapa da reação, foram utilizados 1 µg de cada fração proteica a qual foi misturada com um mix de volume final de 20 µl contendo 40pmol de oligonucleotídeo TS (Tabela 1), 1X tampão de telomerase (50 mM Tris-HCl, pH

8,3; 1 mM DTT; 1 mM espermidina; 1mM MgCl₂), 2 mM dATP e 10 mM dGTP, 2 mM dTTP. Essas misturas foram incubadas por 1 hora a 28°C (promastigota e metacíclica) ou 1h a 37°C (promastigota, metacíclica e amastigota) para que ocorresse a extensão do oligonucleotídeo TS (marcado com digoxigenina no terminal 5') pela telomerase. Logo em seguida, a telomerase presente em cada extrato foi inativada por 5 minutos a 95°C. Como controle da atividade de telomerase, todos os extratos testados foram previamente tratados com 10 µg de RNase A (Amersham Biosciences) por 30 minutos a 37°C. Como controle negativo as reações foram realizadas sem os extratos proteicos (NE, não extrato).

Na segunda etapa que consiste na reação de amplificação por PCR dos produtos alongados na primeira etapa pela telomerase, foram utilizados metade do volume de cada reação da primeira etapa (10 µl). A eles foram adicionados 25 pmol do oligonucleotídeo reverso Cx-ext (Tabela 1), 1X tampão de TRAP (20 mM Tris-HCl, pH 8,3; 1,5 mM MgCl₂; 63 mM KCl; 0,005% Tween (v/v); 1 mM EGTA, pH 8,0), 2,5%

DMSO e 1U de Taq Platinum DNA Polymerase (Invitrogen) em volume final de reação de 20 µl. Como controle de processividade da enzima utilizou-se o oligonucleotídeo TSR8 (Tabela 1) marcado com digoxigenina no terminal 5' na concentração de 0,1 amol/µl. Os produtos de amplificação do mesmo são contados a partir da primeira repetição adicionada no seu terminal 3'-OH, representado por uma banda de 50bp (44 nt do oligo TSR8 +6 nt da repetição telomérica). Ele serve como padrão para estimar a quantidade de repetições teloméricas (incrementos de 6 bp) adicionados ao oligonucleotídeos TS .

O protocolo da reação de PCR foi baseado no descrito em Cano et al (1999), com poucas modificações: 95° C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, repetir esses passos por 38 ciclos e por fim 72°C por 10 minutos. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de poliacrilamida 10% (19:1, acrilamida: bis acrilamida) após uma pré corrida (com a finalidade de alinhar os elétrons presentes no gel) de 1 hora a 150V em tampão TBE 1X (Tampão Tris-borate-EDTA) e depois de aplicar as amostras, mais 2 horas e quinze minutos a 150 V.

O DNA fracionado no gel foi transferido para uma membrana de Hybond nylon N+ (GE Healthcare) e a revelação foi por quimiluminescência utilizando o protocolo do kit comercial DIG Gel Shift kit, 2nd generation da Roche (2010). No entanto, algumas alterações foram realizadas: o uso de 1X de TBE Buffer para equilibrar a membrana ao invés de 0,5X e deixar a transferência agindo por 1 hora ao invés de 30 minutos.

Depois de equilibrar a membrana e os papeis filtro em 1X TBE (89 mM Tris pH 7.6, 89 mM ácido bórico, 2 mM EDTA), foi montada a transferência úmida usando Mini Trans-Blot (Bio-RAD) por 1 hora a 400mA e posteriormente para fixar as amostras na membrana realizou-se o cross-link utilizando o equipamento Ultra.Lum por 2 minutos.

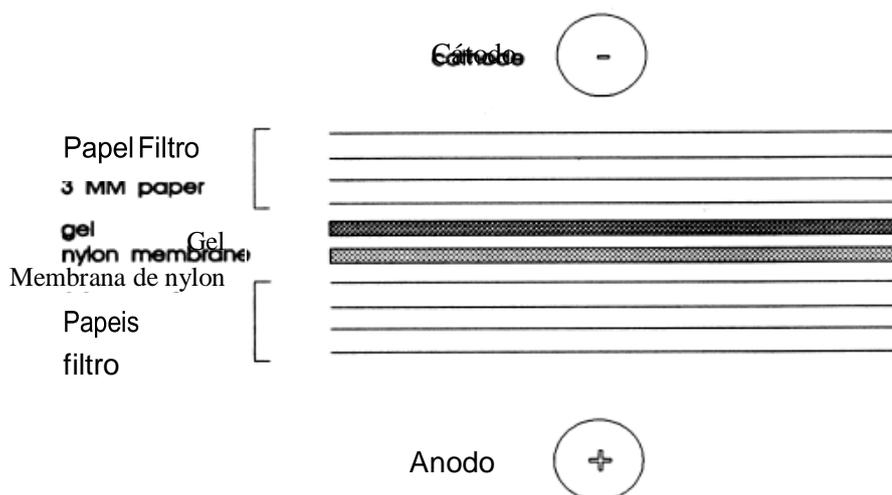


Figura 11. Representação de como deve ser feito a montagem da transferência no Min Trans-blot (Bio-Rad). Modificado do kit comercial DIG Gel Shift kit, 2nd generation da Roche (2010).

Para a revelação da membrana, foram utilizadas as seguintes soluções: tampão de lavagem (0,1M ácido Maleico, 0,15M NaCl; pH7,5 e 0.3% (v/v) Tween 20), Ácido Maleico Buffer (0,1M Ácido Maleico, 0,15M NaCl; pH 7,5, tampão de detecção (0,1 Tris- HCl, 0,1M NaCl, pH 9,5, Solução Bloqueadora (1% de reagente bloqueador dissolvido em tampão de ácido maleico) e solução de Anticorpo (1:10000 de anticorpo para a solução de bloqueio) e CPD-Star.

Primeiramente foi deixado por 5 minutos com tampão de lavagem até cobrir a membrana, incubou-se por 30 minutos com 100 ml de solução bloqueadora, 50 ml de solução de anticorpo e deixando agindo por 30 minutos, lavar duas vezes com tampão de lavagem por 15 minutos, 5 minutos com 20 ml de tampão de detecção e por fim 1 ml de CPD –Star a 37°C por 10 minutos e em seguida a revelação as imagens foram capturadas em serie por 30 min utilizando-se GBOX Chemi- XR5.

37 Ensaio de imunoprecipitação (IP)

Para realização do ensaio de IP foram utilizados 20 µg de cada um dos eluatos obtidos da coluna DEAE (400, 500 e 600 mM) (item 3.5) e soros imunes policlonais mono-específicos (5 µg de cada) anti-HSP83 e anti-TERT, segundo protocolo pré-estabelecido (*DynaBeads protein G* – Thermo Scientific).

Na primeira etapa da reação, cada um dos soros foi incubado com 1,5 mg de *DynaBeads protein G* por 10 minutos sob agitação constante a temperatura ambiente. Em seguida os tubos foram colocados em suporte magnético para retirar o sobrenadante, seguido de uma lavagem com 200 µl PBS 1X- Tween 0,01%. Na segunda etapa, os anticorpos presos na resina foram incubados com os extratos proteicos para ocorrer a interação antígeno-anticorpo durante 10 min sob agitação constante a temperatura ambiente, seguido de três lavagens com 200 µl PBS 1X- Tween 0,01%. Durante a eluição, os imunoprecipitados foram coletados e

dependendo da finalidade do experimento, essa última etapa foi realizado de duas formas, eluição desnaturante e não desnaturante. Para o primeiro foi adicionado 20 µl de tampão de eluição (80 mM glicina) e 10 µl de tampão de carga (250 mM TRIS pH 6,8. 10% SDS, 0,5 % bromofenol blue, 50% glicerol) e em seguida colocados em suporte magnético para retirar o sobrenadante. A não desnaturante foi adicionado 20 µl de tampão de eluição (80 mM glicina) e 20 µl de uma solução 1M de Tris pH7,5. Os eluatos da IP foram armazenados a -80 °C, fracionados em 10% SDS-PAGE seguido de western blot ou usados para extração de RNA.

38 Ensaio de western blot

Para analisar o conteúdo dos eluatos da imunoprecipitação as amostras foram fracionadas em 10% SDS-PAGE em tampão de corrida (25 mM Tris-Cl/250 mM glicina/0.1% SDS) por 30 minutos a 120 V por 2 horas. Em seguida procedeu-se com a transferência das proteínas para membrana PVDF (Immun Blot), impermeabilizada com metanol 100% por 1 minuto, 1 minuto com água milliQ e entre 5- 10 minutos em tampão de transferência (25 mM Tris-HCl, pH 8.3, 192 mM glicina) A transferência (Figura 8) foi realizada a 90 mA utilizando-se o aparelho Mini Trans-blot (Bio-Rad) por 16 horas a 4 °C.

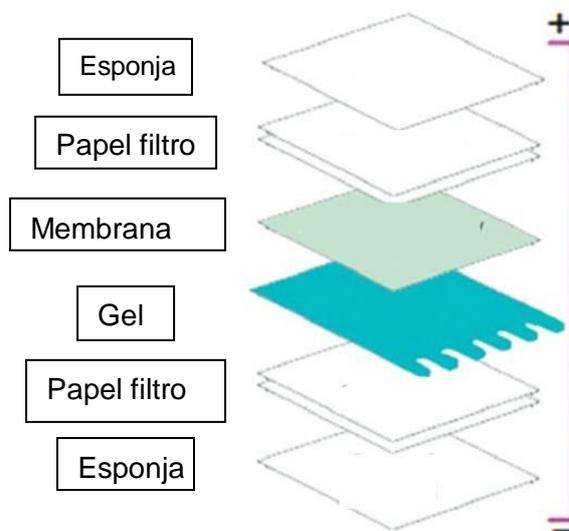


Figura 12. Esquema mostrando como montar a transferência para realização do ensaio western blot. Adaptada de (MAHMOOD; YANG, 2012)

Após a transferência, iniciou se o processo de revelação da membrana que consiste em incubar por 1 hora a membrana em solução de bloqueio (PBS 1 X-Tween com 1% reagente de bloqueio) sobre agitação constante, após esse tempo, lavagem de PBS 1X Tween 0,1% 3 vezes por 5 minutos cada e sobre agitação, 1 hora com o anticorpo primário seguido de 3 lavagens com PBS 1X Tween 0,1% por 5 minutos cada e sobre agitação, 1 hora com anticorpo secundário, novamente as lavagens e por 5 minutos com o revelador ECL™ Prime Western BlottingDetection Reagent Amersham™ . Em cada mudança de solução foi necessário lavar

3 vezes a membrana com PBS 1X-Tween 0,1% e os anticorpos diluídos em PBS-Tween com 1% reagente de bloqueio. As imagens foram capturadas utilizando-se o fotodocumentador G-BOX Chemi- XR5 com auxílio do programa GeneSys. Os títulos dos soros foram estabelecidos por ensaio de western blot: anti- TERT 1/8000 e anti-HSP83 1/5000.

3.9. Análises *in silico* do TERT e HSP83 em bibliotecas de SL-Seq

As análises dos transcritos do TERT e HSP83 foram realizadas utilizando bibliotecas de SL-Seq (CUYPERS et al., 2017) das três formas de desenvolvimento de *L. major*. Para localizar o TERT e HSP83 no genoma de *L. major*, o *software* genome browser ARTEMIS foi utilizado, e as buscas foram utilizadas utilizando o genoma de *Leishmania major* (RUTHERFORD et al., 2000). Foram identificados os números dos transcritos normalizados por RPKM (Reads Per Kilobase Million) tanto do TERT quanto da HSP

3.10 Obtenção do IC50 do fármaco 17-AAG para formas promastigotas

Para obtenção do IC50 de 17-AAG, utilizou-se o reagente PrestoBlue™ (Incitrogen) e o ensaio foi seguido segundo o protocolo que veio como reagente. Foram utilizadas culturas de formas promastigotas em fase exponencial de crescimento e a partir dessas culturas separou-se alíquotas de 1 ml cada contendo 3×10^6 células e foram depositados em placas de 24 poços e tratados por 48 horas a 28°C, com concentrações crescentes do fármaco 17-AAG (150nM, 200nM, 300 nM, 400nM e 500 nM) (Cayman Chemical). Os ensaios foram realizados em triplicada juntamente com o controle, não tratado.

Depois de 48 horas de incubação foram adicionados em placa de 96 poços 90 µl de cada replica e 10 µl de PrestoBlue™, incubar por 10 minutos a 28°C e posteriormente medir a absorbância de 570 nm utilizando o espectrofotometro Epoch (BioTek). Os dados do experimento foram analisados no programa GraphPad Prim 8.

3.11 Extração de DNA genômico das diferentes formas de desenvolvimento de *L. amazonensis*

Depois de obter as formas amastigotas (item 3.2), e as formas promastigotas e metacíclica (itens 3.1 e 3.3), os parasitos foram lavados três vezes em 1X PBS em resuspensos em 150 µl de solução de lise TELT (50 mM TRIS pH 8,0, 62,5 mM EDTA pH 9, 2,5 M LiCl e 4% Triton x-100) contendo 50 µg/ml de proteinase K e deixados sob agitação leve por 5 min. Posteriormente foi adicionado a mistura 150 µl de fenol/cloróformio (50% fenol, 48% cloroforme, 2% álcool isoamílico) e deixados sob agitação leve por mais 5 min. Para a extração de ácidos nucleicos, as misturas foram centrifugadas a 13.000 g, por 10 minutos a 4 °C e em seguida coletou-se a fase aquosa com a ponteira cortada. Esta fase aquosa contendo ácidos nucleicos foi precipitada na presença de 2,5 vol de etanol 100% gelado, seguido de posteriormente centrifugação a 13.000 g por 20 minutos a 4 °C. Procedeu-se com a lavagem, 2 volumes de etanol 70%

seguido de centrifugação a 13.000 g por 20 min a 4 °C, a ressuspensão dos ácidos nucleicos em 50 µl água. Para retirar RNA das amostras, utilizou-se tratamento com 50µl/ml de RNase A por 30 min a 37 °C. e medida sua concentração em espectrofotômetro utilizando leitura da DO_{260nm}.

3.12 Southern blot telomérico para analisar o perfil de restrição telomérico (TRF, Telomere Restriction Fragment) das diferentes formas de desenvolvimento de *L. amazonensis*

Esse ensaio foi realizado seguindo os protocolos descritos no kit *TeloTAGGG* Telomere Length Assay da Roche (edição 9.0, 2011) e em Conte e Cano (2005) com DNA genômico obtido das duas formas do parasito (metacíclica e promastigota) e de diferentes duplicações celulares (passagens).

3.12.1 Digestão do DNA

Para essa etapa foram utilizados 2 µg de DNA genômico obtidos das três formas de vida (item 3.10) que foram digeridos com a enzima de restrição *RsaI* (5U/µg DNA), BSA (2 µg/ reação), 1X tampão da enzima e completar com água para fechar a reação com no máximo 30 µl de volume total. O período de incubação da reação foi de 16 horas na temperatura ótima da enzima (37°C).

3.12.2 Eletroforese e transferência

Os fragmentos de digestão foram separados em gel grande de agarose 0,8% com voltagem de 80V por 3 - 4 horas em tampão 1 X TAE (40 mM Tris, 20 mM ácido acético e 1 mM EDTA pH 8,0). Para transferir as amostras para a membrana, o gel contendo o DNA digerido foi lavado duas vezes com água Milli-Q, duas vezes por 15 min. cada com solução desnaturante (0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl) sob agitação leve, novamente com água Milli-Q e por último, solução de neutralização (0.5 M Tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7.5) por duas vezes de 15 minutos cada. Com isso a transferência foi montada segundo a Figura 7 utilizando a membrana de nylon Hybond N+ e solução 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M Sodium citrate, pH 7.0) e foi deixado por 16 horas. Após a transferência, para fixar bem as amostras, a membrana foi exposta por 2 min a 120mJ de luz UV, utilizando equipamento de UV-cross-linking.

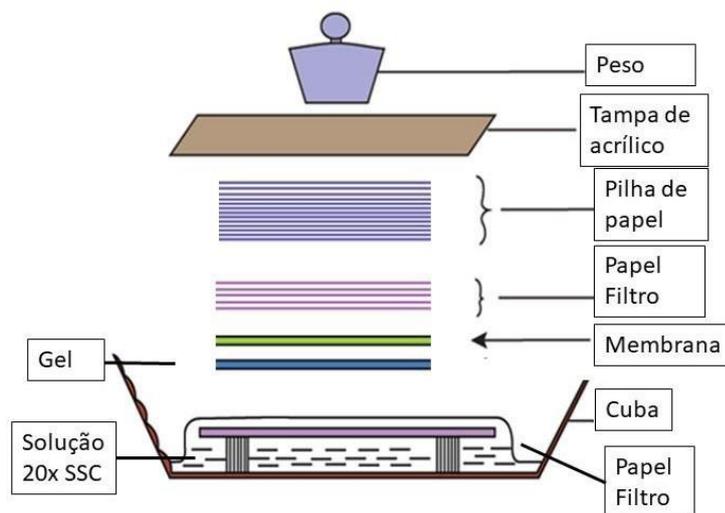


Figura 13. Representação de como montar a transferência para realização do Southern blot. Adaptado do site <http://nptel.ac.in/courses/102103016/module3/lec28/2.html>

3.12.3 Hibridização

A membrana foi lavada rapidamente duas vezes com solução 2X SSC e posteriormente foi incubado a membrana á 42°C com a solução de pré- hibridização (5X SSC, 0,1% sarcosil, 0,02% SDS) entre 30-60 minutos. A pré-hibridização foi descartada e junto com a solução de hibridização (5X SSC, 0,1% sarcosil, 0,02% SDS) foi adicionada a 1 µl da sonda telomérica com marcação de DIG-Fita C (Tabela 1) e foi deixado na mesma temperatura que a anterior por 16 horas.

3.12.4 Revelação e detecção dos resultados

A membrana foi preparada para o processo de revelação, para isso a solução de hibridização foi descartada e lavada sobre agitação com as seguintes soluções: duas vezes por 5 minutos cada uma com o tampão de lavagem estrigente I (2X SSC, 0.1% SDS) na temperatura de 25°C, duas vezes por 15- 20 minutos na temperatura de 50°C com o tampão de lavagem estrigente II (0.2X SSC, 0.1% SDS) e tampão de lavagem (0,1 M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7,5 e 0,3 % Tween 20) por 5 minutos.

Incubação por 30 min sobre agitação com solução de bloqueio (1% do *Blotting-Grade Blocker* em tampão de ácido maleico- 0,1 M ácido maleico, 0,15M NaCl, pH 7,5). A solução anterior foi descartada e incubou-se por mais 30 minutos com a solução de bloqueio adicionando ao anticorpo anti- DIG na proporção 1:10000. Posteriormente foi lavado duas vezes com tampão de lavagem por 15 minutos cada á 25°C, 5 minutos com tampão de detecção (0,1 M Tris-HCl, 0,1M NaCl) e por último a membrana foi exposta a solução de CSPD e revelado no G-BOX Chemi- XR5 por 1 hora.

4. Resultados e Discussão

4.1. Telômeros de *L. amazonensis* encurtam durante o ciclo de desenvolvimento e após várias duplicações celulares

Para confirmar resultados anteriores que mostravam que os telômeros dos parasitas sofrem encurtamento durante um ciclo de desenvolvimento (Fig. 5), analisamos o perfil de restrição telomérico por *Southern blot* de parasitas originados de um único ciclo de desenvolvimento e de parasitas nas formas promastigotas e metacíclicas com número crescente de duplicações celulares.

Como mostrado na Fig.14 A (linhas 1 e 2) telômeros de formas amastigotas são mais curtos que os de formas promastigotas originadas do mesmo ciclo de desenvolvimento, assim como telômeros de formas metacíclicas (Fig. 14B, linhas 7,8 e 9) originadas de culturas de formas promastigotas (obtidas de um único ciclo de desenvolvimento) com duplicações celulares crescentes (Fig. 14B, linhas 1 a 6) apresentam encurtamento crescente, confirmando achados anteriores (Fig. 10).

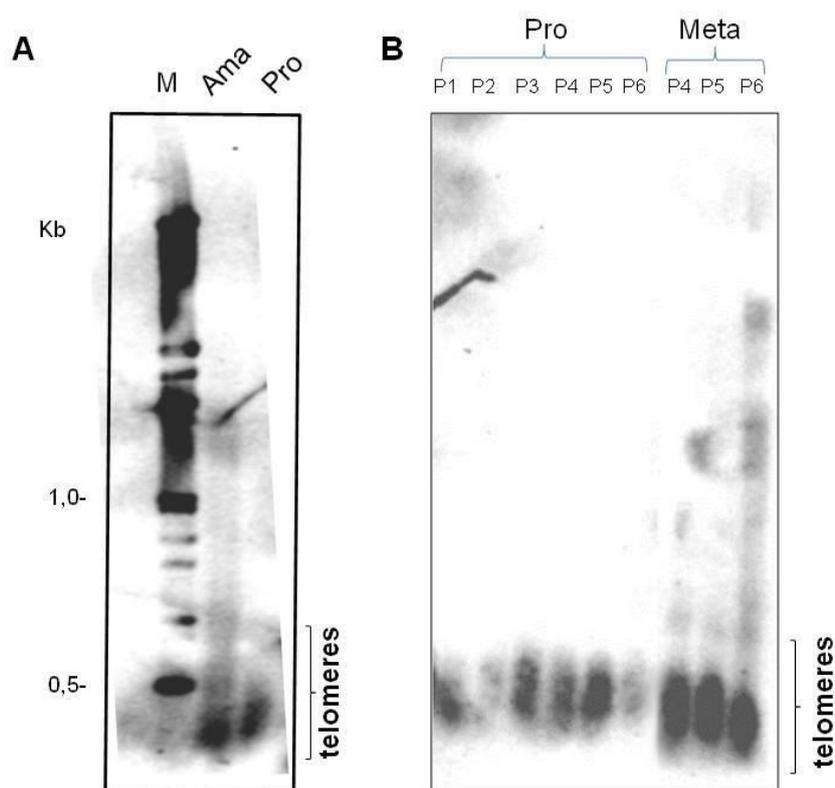


Figura 14. Os telômeros de *L. amazonensis* encurtam durante um ciclo de desenvolvimento e durante duplicações celulares crescentes. A) e B) Southern blot telomérico mostrando o perfil de restrição telomérica (TRF) do parasito nas diferentes fases de desenvolvimento (ama, amastigota, pro, promastigota, meta, metacíclica). Em ambos ensaios DNA genômico (2µg) foi digerido com a enzima de restrição *AfaI* (2U) e submetido a Southern blot telomérico conforme descrito no item 3.11 de Material e Métodos. A) Perfil do TRF de formas amastigotas (linha 1) e formas promastigotas diferenciadas em cultura (linha 2) a partir das amastigotas analisadas na linha 1. B) Perfil do TRF de formas promastigotas com duplicações celulares crescentes (P1 a P6) (linhas 1 a 6) e de formas metacíclicas obtidas in vitro a partir de promastigotas P4 a P6 (linhas 7 a 9).

Para uma melhor compreensão dos resultados mostrados na Fig. 14 (A e B) é importante lembrar que 1) as formas promastigotas denominadas P1 (passagem 1) foram obtidas da cultura P0 as quais são as formas recém transformadas obtidas de diferenciação *in vitro* (cultura axênica) a partir de formas amastigotas obtidas de infecção de coxim plantar de camundongos Balb/c; 2) de P1 em diante, as formas promastigotas foram mantidas em cultura axênica por 4 dias quando elas atingiram a fase exponencial de crescimento; 3) cada uma das passagens (P1 a P6) representa repiques sucessivos a cada 4 dias, a partir de P1, ou seja incrementos de duplicações celulares (ou populacionais, do inglês *population doubling*) do parasito em cultura axênica. De acordo com da Silva et al. (2013), a cada 7 horas de crescimento em meio axênico, formas promastigotas de *L. amazonensis* completam um ciclo de duplicação celular, ou seja, a cada 24 horas ocorrem 3,4 duplicações celulares e conseqüentemente, a cada 4 dias 13,7 duplicações. Isto significa que ao fim da P6 ocorreram aproximadamente 82 duplicações celulares das formas promastigotas. iv) formas metacíclicas são obtidas de fase estacionária de crescimento de formas promastigotas (item 3.2 de Matériel e Métodos), e por isso aquelas que foram obtidas das P4-P6 foram denominadas metacíclicas P4-P6, pois ficaram 8 dias em cultura, ou seja, o dobro de tempo das formas promastigotas, em cada uma das passagens. Isto significa que metacíclicos P6 sofreram aproximadamente 95,8 duplicações celulares.

Em células humanas a cada duplicação celular acontece perda gradual de dos telômeros devido ao chamado problema do fim da replicação do DNA e pela ausência de atividade de telomerase nessas células e com isso alterações celulares que acabam levando a senescência celular (ALLSOPP et al., 1992). Esse acontecimento também compromete as leveduras, no entanto até o momento, este fenômeno não foi descrito em protozoários, embora as formas infectivas denominadas de metacíclicas, não apresentem capacidade de se multiplicar.

Desta forma, decidiu-se verificar se este fenômeno era devido a alterações na atividade de telomerase entre as diferentes formas de desenvolvimento, uma vez que as formas metacíclicas e amastigotas, ao contrário de promastigotas apresentam telômeros mais curtos.

4.2. Os telômeros de *L. amazonensis* são mantidos por uma telomerase que é ativa a 28 °C e a 37°C

Para detectar atividade de telomerase em extratos semi-purificados em coluna DEAE obtidos das três formas de desenvolvimento (promastigotas, metacíclica e amastigota) de *L. amazonensis*, utilizamos uma modificação do ensaio denominado TRAP (GIARDINI et al., 2011, VIEIRA et al., em preparação). Esse ensaio tem a finalidade de detectar a atividade da telomerase pela elongação de um oligonucleotídeo sintético (TS) seguido da amplificação por PCR dos produtos de elongação pela telomerase (REED et al., 2008).

Em todos os ensaios realizados nesse trabalho, incluímos um controle negativo onde o extrato é pré-tratado com RNase A, que degrada o componente TER da telomerase inibindo a atividade da enzima. Lembrando que o componente RNA contém o molde da repetição telomérica utilizado pelo componente TERT para replicar os telômeros. E, sem ele, a enzima não tem como desempenhar a sua função e, portanto não tem atividade (SALDANHA; ANDREWS; TOLLEFSBOL, 2003). Como controle positivo, utilizamos os produtos de amplificação do oligonucleotídeo TSR8 (ver Material e métodos para detalhes).

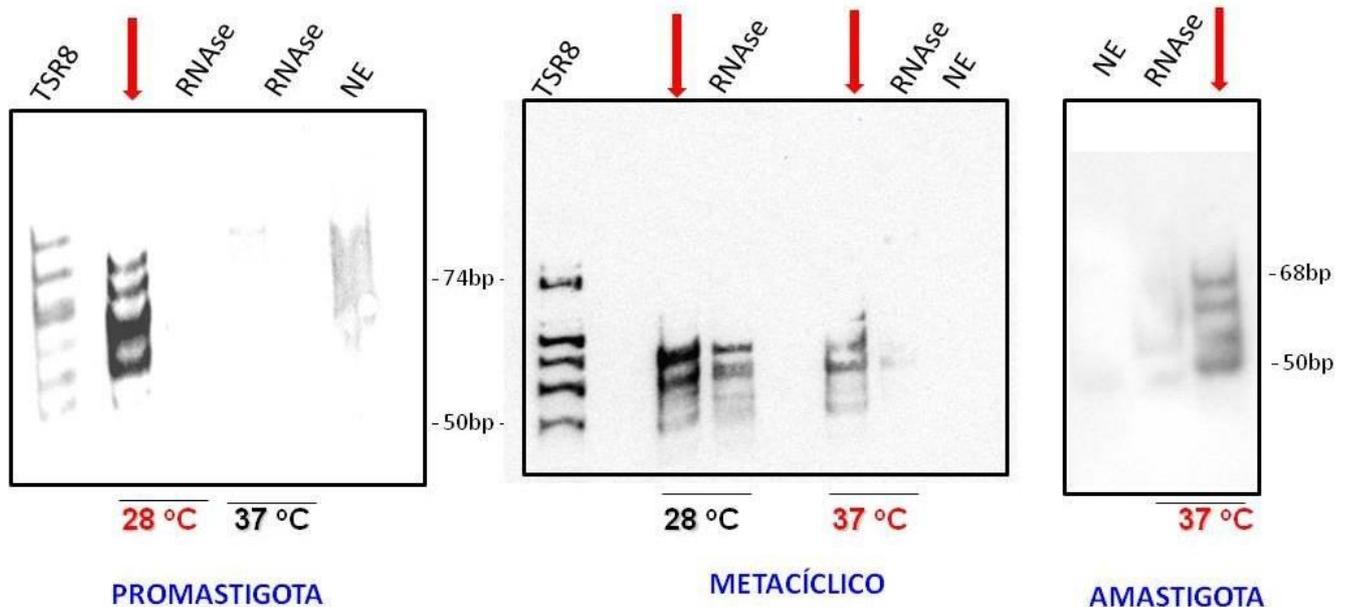


Figura 15. A atividade da telomerase foi detectada nas diferentes formas de desenvolvimento de *L. amazonensis* usando uma modificação do ensaio TRAP. Produtos de elongação do oligonucleotídeo TS pela telomerase presente nos extratos dos parasitos foram fracionados em géis não denaturantes 10% de acrilamida. As bandas detectadas (setas em vermelho) representam incrementos de 6pb correspondentes as repetições teloméricas (TTAGGG) adicionadas ao terminal 3' do oligo TS. TSR8 é o controle da processividade da telomerase, NE reações realizadas na ausencia de extrato, RNase, reações realizadas com extratos pré-tratados com RNase A.

Segundo mostrado na Fig. 15 as três formas de desenvolvimento do parasito apresentam atividade de telomerase capaz de adicionar incrementos de 6 nucleotídeos na extremidade 3' do oligonucleotídeo TS e estas atividades são sensíveis ao tratamento com RNase A. Embora extratos de forma metacíclica quando testados para atividade de telomerase a 28 °C, não se mostraram sensíveis ao pré-tratamento com a RNase. Muito provavelmente, porque a atividade detectada nestes extratos e a esta temperatura não deve ser devida a atividade de telomerase.

Já os extratos de promastigotas e amastigotas mostram a presença de atividade da enzima sensível a RNase A e dependente da temperatura de crescimento de cada forma de vida. O mesmo não se verifica para as formas metacíclicas cuja atividade de telomerase é ativa somente a 37 °C. Esse dado sugere que a telomerase da forma metacíclica está mais relacionada a telomerase das formas amastigotas do que a telomerase de promastigotas. Deve-se ressaltar que as metacíclicas são as formas infectivas para o

hospedeiro mamífero e provavelmente devem estar preparadas para se transformar em formas amastigotas logo após a infecção. Dados recentes de análise do transcrito do ciclo de desenvolvimento do parasito mostram que o parasito realmente sofre uma reprogramação genética durante o desenvolvimento e que as formas metacíclicas são mais semelhantes as amastigotas do que as formas promastigotas (INBAR et al., 2017). Portanto, estes resultados juntos aos resultados de análise de tamanho dos telômeros, sugerem fortemente que, tanto o comprimento do telômero quanto a biogênese e a composição do complexo RNP telomerase são regulados durante o ciclo de desenvolvimento do parasito.

4.3 HSP83 é parte do complexo ribonucleoproteico da telomerase de *L. amazonensis*

Em mamíferos e leveduras várias proteínas estão implicadas com a regulação e biogênese da telomerase, entre elas estão a chaperona HSP90 e sua co-chaperona p23 (VIVIESCAS; SEGATTO; CANO, 2018).

Para testar se a HSP83 (ortólogo da HSP90) faz parte do complexo RNP da telomerase de *L. amazonensis*, e pode estar envolvida com a regulação do tamanho dos telômeros nas diferentes formas de desenvolvimento do parasito, realizamos ensaios de co-imunoprecipitação.

Estes ensaios, ainda preliminares, visaram verificar se a HSP83 e o componente TERT da telomerase interagem dentro do complexo RNP. Por isso, foram realizados ensaios onde extratos de formas promastigotas foram imunoprecipitados com soro imune específico a HSP83 de *Leishmania* spp. e separadamente com soro imune específico a TERT de *Leishmania* spp. Para ver a possível interação, os extratos imunoprecipitados separadamente com os dois soros foram submetidos a *western blot*, de forma que os eluatos da IP com o soro TERT foram revelados com o soro da HSP83 e vice-versa (Fig. 15).

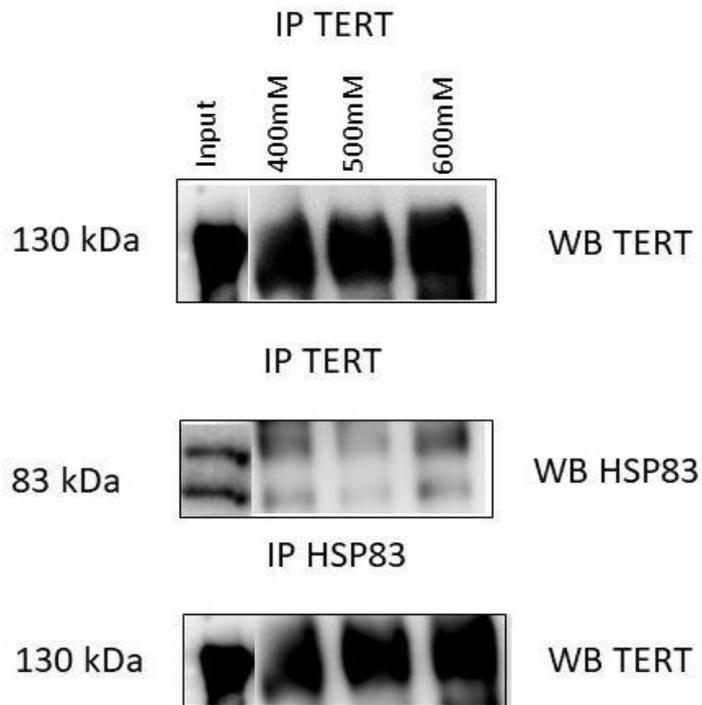


Figura 16. Ensaio de imunoprecipitação seguido de western Blot mostrando que a HSP83 faz parte do complexo telomerase RNP de *L. amazonensis*. Na parte superior da figura temos a imunoprecipitação realizada com o soro anti-TERT e revelada por western blot com soro imune anti-TERT. Na parte central a imunoprecipitação foi realizada com o soro imune anti-TERT e revelado por western blot usando soro imune anti-HSP83. Já na parte inferior da figura a imunoprecipitação foi realizada com o soro imune anti-HSP83 e revelado por western blot com soro imune anti-TERT. Detalhes sobre os ensaios de IP e western blot estão descritos no item 3.7 e 3.8 de Material e Métodos.

No ensaio mostrado na Fig. 16, comprovamos que no mesmo extrato proteico HSP83 e TERT co-immunoprecipitam em extratos com atividade de telomerase. Este resultado sugere que HSP83 e TERT fazem parte de um mesmo complexo, e que em *L. amazonensis* a HSP83 pode cumprir papel semelhante as HSP90 de humanos e seu ortólogo HSP82 em leveduras, na regulação e biogênese da telomerase. Essa interação entre as proteínas podem ser resultante de interações diretamente ou indiretamente entre elas, isto é, a chaperona se liga na TERT ou ela se liga a uma proteína a qual se liga na TERT. Um fato interessante observado é que nos extratos utilizados neste ensaio (P6) o soro anti-HSP83 reconhece nos extratos do parasito duas bandas de peso molecular aproximado entre 90 e 100 kDa, sugerindo que a HSP83 associada a TERT apresenta alguma modificação pós-traducional. Modificações pós-traducionais em HSP90 foram largamente documentadas em humanos e leveduras e parecem alterar o ciclo da chaperona e suas interações com as proteínas clientes e com as chaperonas (PRODRUMOU, 2016). Em levedura, por exemplo, o ortólogo HSP82 sofre fosforilação dependente da fase do ciclo celular (MOLLAPOUR et al., 2010). Por este motivo, além de testarmos a presença da HSP83 nos complexos telomerase RNP das outras formas do parasito, pretendemos verificar futuramente qual modificação pós-traducional a proteína apresenta quando associada ao complexo e se a modificação pós-traducional em HSP83 regula sua ação no complexo telomerase RNP.

4.4 HSP83 parece sofrer alterações pós-traducionais durante o ciclo de desenvolvimento de *Leishmania amazonensis*

De forma a verificar se a HSP83 sofre possíveis modificações pós-traducionais durante o ciclo de desenvolvimento, como hipotetizado no experimento anterior (Fig.16), foram realizados ensaios de *western blot* utilizando extratos de proteínas obtidos das formas amastigotas (600 µg), promastigotas (275 µg) e metacíclicas originadas (600 µg) de um único ciclo de desenvolvimento. Também foram analisados extratos obtidos de promastigotas e metacíclicos após varias duplicações celulares (P1 a P6 e M1 a M6). O padrão de expressão da HSP83 nos diferentes parasitos está mostrado na Fig. 17.

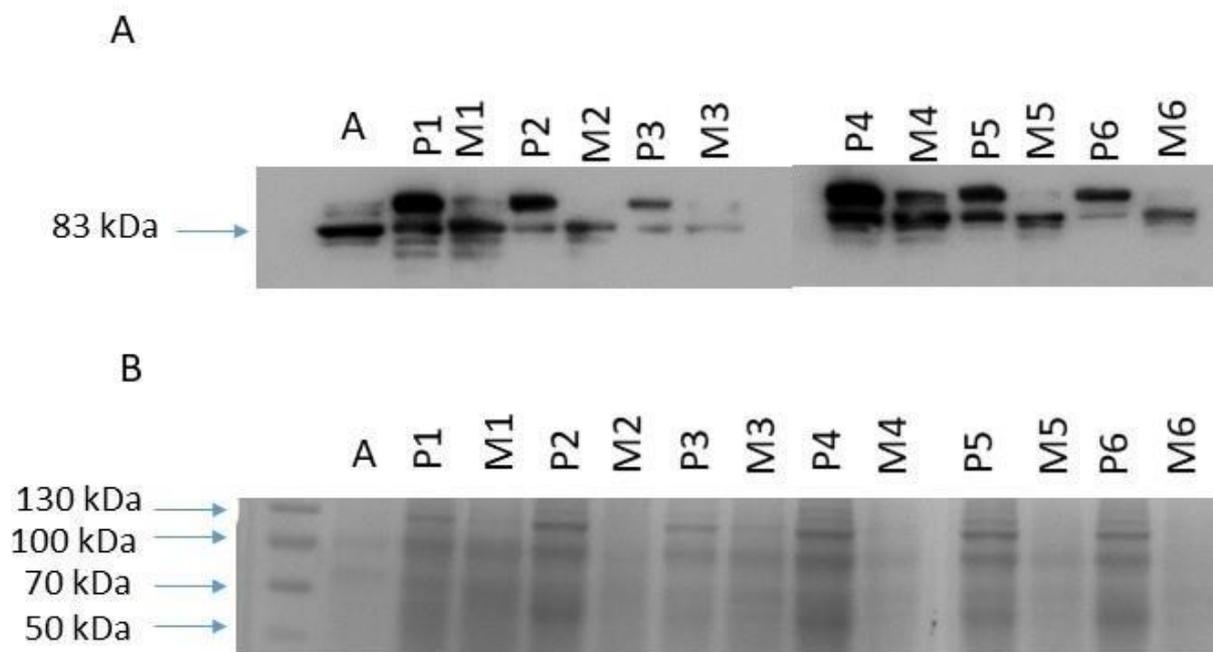


Figura 17. Perfil de expressão da proteína HSP83 durante o ciclo de desenvolvimento de *L. amazonensis* e em parasitos com várias duplicações celulares. Em A, extratos proteicos obtidos das formas amastigota e metacíclicas (600µg) e das formas promastigotas 275 µg foram fracionados em gel SDS-PAGE 12% seguido de *western blot* revelado com soro específico anti-*Leishmania* HSP83. Em B, gel SDS-PAGE 12% corado com comassie Blue usado como controle de *loading* para o gel mostrado na figura A. A refere-se a amastigota, P promastigota e M metacíclica,

Resultados mostrados na Fig. 17A mostram que a Hsp83 sofre modificação pós-traducional nas três formas de desenvolvimento e que essas modificações são mantidas após os diferentes tempos de duplicação nas formas promastigotas e nas formas metacíclicas geradas das mesmas. Essas modificações são demonstradas pela presença de bandas maiores que 83 kDa as quais co-migram juntamente com a banda proteica de 83 kDa em praticamente todos os extratos e que aparecem com sinal de

detecção mais intenso principalmente na forma promastigota, embora seja possível verificar que nas formas amastigotas e nas formas metacíclicas elas também estão presentes. Acreditamos que a diferença de quantidade de sinal das bandas nos extratos, seja devida somente a diferente quantidade de proteína nos mesmos, visível claramente no gel corado com Coomassie usado como controle de loading (Fig. 17B). Uma grande variedade de modificações pós-traducionais tais como fosforilação, acetilação, nitrosilação e sumoilação já foram documentadas em HSP90 de leveduras e humanos (PRODROMOU, 2016), evidenciando as diferentes funções exercidas por estas proteínas dentro das células e corroborando os resultados mostrados na Fig. 17A. Além disso também é sabido que aproximadamente 96-99% das proteínas eucarióticas que são fosforiladas em resíduos de serina e treonina podem sofrer defosforilação por famílias de fosfatases específicas. (fosfatases Ser/Thr) denominadas fosfatases de fosfoproteínas (PPPs). A PP5 de *Leishmania*, a qual faz parte de uma dessas famílias, está diretamente relacionada com a regulação da fosforilação da HSP83 sendo essencial para o parasita. Além disso, o seu nível de expressão é maior em formas metacíclicas comprovando a ação de HSP83 na metaciclogênese (NORRIS-MULLINS et al., 2018).

4.5 Análise transcriptômica mostra que a Hsp83 tem expressão diferencial durante ciclo de desenvolvimento de *Leishmania* spp.

Para analisar o nível de expressão gênica dos genes que codificam a TERT e a HSP83, foi realizado uma busca em bibliotecas de SL-seq das três formas de desenvolvimento de *L. major* que é a espécie do parasito cujo genoma está melhor anotado. Essas análises foram realizadas em colaboração com a Dr^a Edna Gicela O. Morea e os resultados das análises foram colocados em um gráfico (Figura 18).

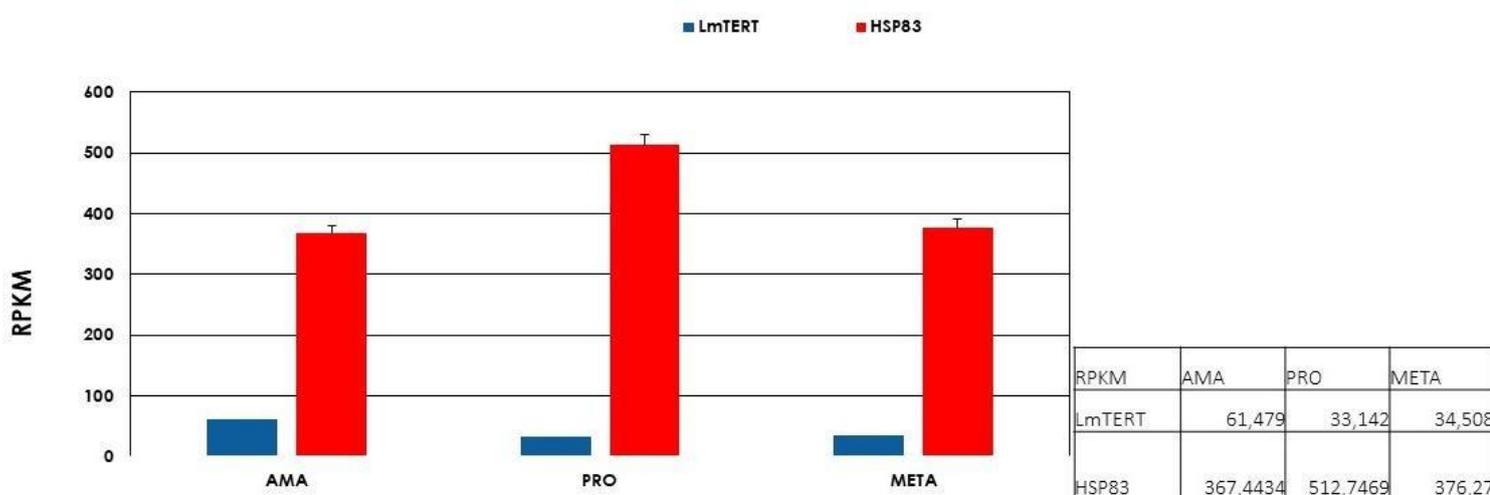


Figura 18. Nível de expressão da TERT e da HSP83 durante o ciclo de desenvolvimento de *L. major*. O gráfico mostra que os transcritos (normalizados calculando-se o RPKM, *reads per kilobase million*) correspondentes ao componente TERT e a HSP83 são expressos em todas as formas do parasito e que a HSP83 apresenta nível de expressão maior comparado a TERT. Obs- A medida das *reads* por RPKM reflete a concentração molar de um transcrito na amostra inicial, normalizando o comprimento do

RNA pelo número total de *reads* na amostra, isto facilita a comparação transparente dos níveis de transcritos tanto dentro como entre as amostras (MORTAZAVI et al., 2008).

As pesquisas realizadas nas bibliotecas SL-seq, mostraram que o gene que codifica o componente TERT da telomerase apresenta apenas uma cópia no cromossomo 36 enquanto que o gene que codifica a HSP83 apresenta 17 cópias organizadas em tandem no cromossomo 33. Segundo mostrado no gráfico, a expressão da TERT não apresenta diferença significativa quando se compara as três formas de vida do parasito. A análise de expressão da HSP83, ao contrário, mostra um maior número de transcritos comparado a TERT, e que esta diferença também aparece quando se compara o número de transcritos expressos entre as fases de desenvolvimento do parasito. Aqui fica evidente que a forma promastigota apresenta maior número de transcritos seguido das formas amastigotas e metacíclicas cuja expressão da HSP83 se apresenta em níveis semelhantes.

Dados recentes de análise transcricional obtidos durante o ciclo de desenvolvimento do parasito mostram que realmente ocorre uma reprogramação genética durante o desenvolvimento e que as formas metacíclicas são mais semelhantes as amastigotas do que as promastigotas (INBAR et al., 2017). Portanto, estes resultados juntos aos resultados de análise de tamanho dos telômeros, e da atividade de telomerase, sugerem que, tanto o comprimento do telômero quanto a biogênese e a composição do complexo RNP telomerase devem ser regulados durante o ciclo de desenvolvimento do parasito.

4.6 Obtenção do IC₅₀ do fármaco 17-AAG para formas promastigotas

Na tentativa de determinar o IC₅₀ do 17-AAG (Cayman Chemical), análogo de geldanamicina, inibidor de HSP90, para formas promastigotas, foram realizados ensaios de viabilidade celular utilizando PrestoBlue. Dados anteriores do nosso grupo utilizando 17-AAG, da marca Invovogen e contagem em câmara de Neubauer, estimaram o IC₅₀ para formas promastigotas em 100nM. Neste ensaio, realizado em triplicata, diferentes concentrações de 17-AAG (150 nM, 200 nM, 300 nM, 400 nM e 500 nM) foram usadas para tratar parasitas mantidos em cultura 48 horas a 28 °C.

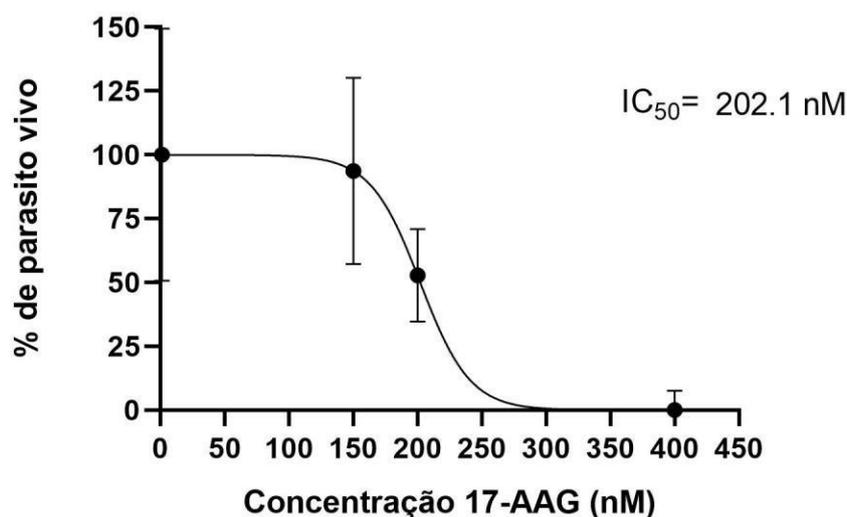


Figura 19. Obtenção do IC₅₀ do 17-AAG para formas promastigotas de *L. amazonensis*. Gráfico mostra no eixo Y a porcentagem de parasitos vivos na cultura e no eixo X as diferentes concentrações do fármaco. O gráfico foi gerado usando-se GraphPad Prism e o IC₅₀ do 17-AAG para formas promastigotas foi estimado em 202,1 nM.

Como observado na Figura 19, conseguimos obter o IC₅₀ para o fármaco o qual foi estimado na concentração de 202,1 nM.

4.7 Tratamento de formas promastigotas de *L. amazonensis* com 17-AAG induz encurtamento dos telômeros e inibição da atividade de telomerase

Como as chaperonas estão diretamente relacionados com a biogênese e regulação da atividade da telomerase (PALLAVI et al., 2010; PETERSEN et al., 2012; TOOGUN; DEZWAAN; FREEMAN, 2008; WEIKL; ABELMANN; BUCHNER, 1999), elas têm sido relacionadas com a estabilidade dos telômeros. Em humanos e leveduras, a HSP90 e sua co-chaperona p23 permanecem associadas ao complexo telomerase funcional por sua interação com TERT. A inibição da ação do complexo HSP90/p23 altera a atividade da telomerase e a manutenção dos telômeros como mostrado por diversos autores (FORSYTHE et al., 2001; HOLT et al., 1999; KEPPLER; GRADY; JARSTFER, 2006; TOOGUN; DEZWAAN; FREEMAN, 2008).

Portanto, resolvemos averiguar preliminarmente se o inibidor de HSP90, o fármaco 17-AAG exerce algum efeito sobre os telômeros e na atividade de telomerase de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Sendo assim, realizamos *Southern blot* telomérico usando parasitos não tratados como controle e parasitos (formas promastigotas e metacíclicas) tratados por 48 horas com 100 nM 17-AAG (Fig. 20A), concentrações abaixo do IC₅₀ previamente determinado.

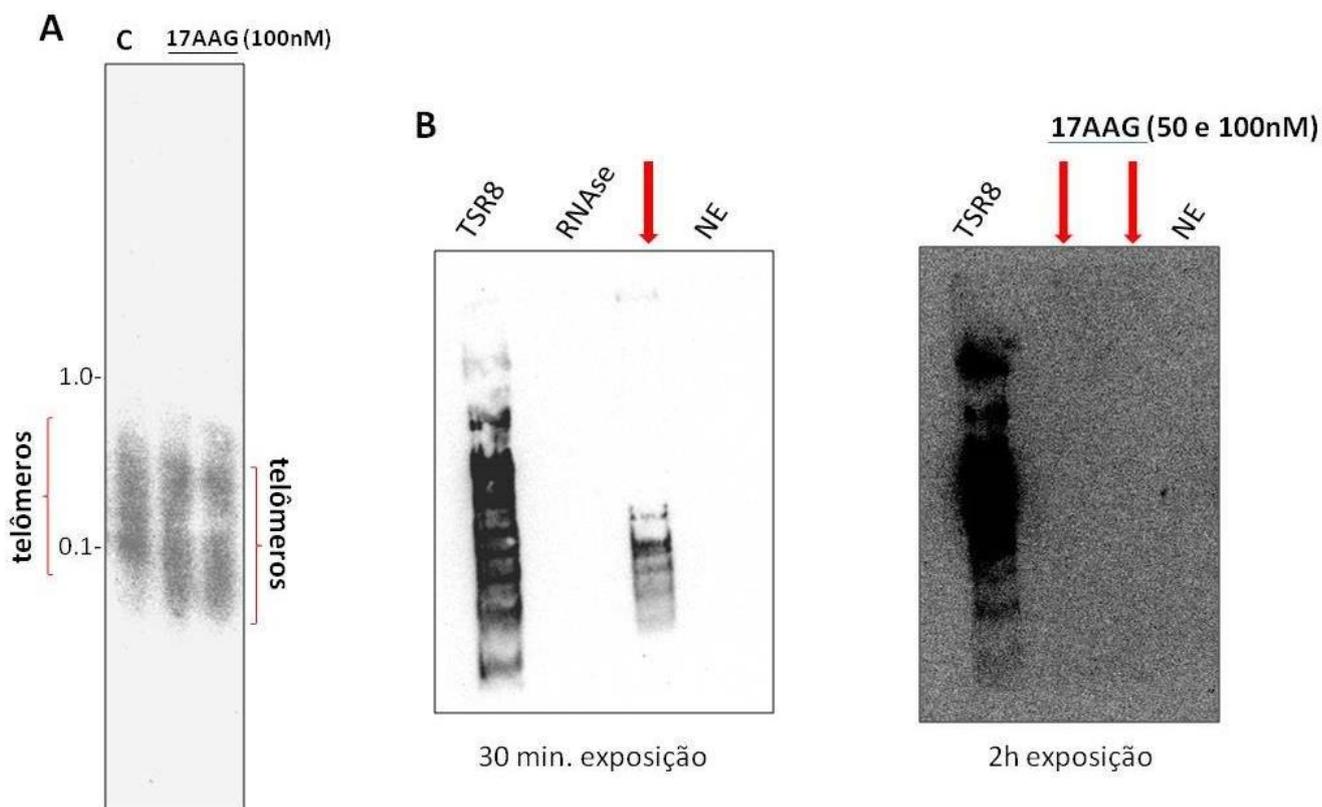


Figura 20. Tratamento com 17-AAG induz encurtamento de telômeros e inibição da atividade de telomerase em promastigotas de *L. amazonensis*. Em A, ensaio de Southern blot telomérico mostrando que formas promastigotas tratadas com 100nM de 17-AAG por 48horas apresentam encurtamento dos telômeros quando comparados com parasitos não tratados (C, controle).B) A esquerda, ensaio de atividade de telomerase (TRAP) com extrato de formas promastigotas (seta vermelha), 17-AAGos quais foram pré-tratado com RNase A como controle para atividade de telomerase.. NE, ensaio realizado na ausência de extrato. Esta membrana foi exposta por 30 minutos. A direita, ensaio realizado com o mesmo extrato de forma promastigota mostrado no ensaio a esquerda, o qual foi pré-tratado com 50 e 100 nM de 17-AAG. Para comprovar que a atividade de telomerase presente no extrato foi totalmente inibida, a membrana foi exposta por 2 horas (superexposição). 17-AAG

Segundo mostrado na Fig. 20 A, o tratamento com 100 nM de 17-AAG induz o encurtamento dos telômeros de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Além disso, extratos positivos para telomerase obtidos de formas promastigotas do parasito tiveram a atividade inibida in vitro quando pré-tratados com 50nM e 100nM de 17-AAG (Fig. 20B). Esses resultados comprovam os dados mostrados na Fig 16 que sugerem que a HSP83 faz parte do complexo RNP da telomerase do parasito e que por sua vez a a telomerase do parasito é uma proteína cliente da HSP83. Eles também sugerem fortemente que a HSP83, a semelhança de seus ortólogos em humanos e leveduras (FORSYTHE et al., 2001; HOLT et al., 1999; KEPPLER; GRADY; JARSTFER, 2006; TOOGUN; DEZWAAN; FREEMAN, 2008), cumpre um papel crucial na regulação e possivelmente na biogênese do complexo RNP da telomerase do parasito e portanto, na manutenção dos telômeros. Resultados semelhantes utilizando geldanamicina como inibidor de HSP90 comprovaram que a chaperona está envolvida com a manutenção dos telômeros em humanos (KEPPLER; GRADY; JARSTFER, 2006) e leveduras (HAENDELER et al., 2003; HOLT et al., 1999)

6. Conclusão

Com dados anteriores do laboratório e os obtidos neste trabalho conseguimos obter resultados que nos dão pistas sobre como é regulada a manutenção dos telômeros e a atividade da telomerase em *L. amazonensis* e que esta regulação ocorre durante o ciclo de desenvolvimento do parasito.

Em resumo, nossos resultados confirmaram resultados prévios do nosso grupo que mostram que os telômeros do parasito encurtam durante um ciclo de vida (amastigotas < metacíclicos < promastigotas) e em parasitos com muitas duplicações celulares. Também mostramos que a atividade de telomerase no parasito é ativa tanto a 28 °C quanto a 37 °C, dependendo da forma e da temperatura de crescimento, sendo que as formas metacíclicas apresentam uma telomerase que é ativa somente a 37 °C. Achados recentes de Inbar (2017), demonstram que do ponto de vista de expressão gênica, as formas metacíclicas são mais semelhantes as amastigotas, o que vem de encontro com os resultados aqui obtidos sobre a atividade catalítica da telomerase. Para entender se a atividade de telomerase nos parasitos pode ser regulada por ação de alguma chaperona, mostramos por ensaios de imunoprecipitação que a HSP83, ortóloga da HSP90 co- imunoprecipita com a TERT, sugerindo que ela faz parte do complexo ribonucleoproteico da telomerase.

A análise transcricômica mostrou que em *Leishmania*, a HSP83 e a TERT são expressas nas três formas de desenvolvimento do parasita. E que ao contrário da TERT que não mostra diferença significativa de expressão entre as formas de desenvolvimento do parasito, a HSP83 apresenta número maior de transcritos e diferença na expressão ao longo do ciclo desenvolvimento. As formas promastigotas apresentam nível maior de expressão enquanto amastigotas e metacíclicos apresentam um padrão bem semelhante entre si e níveis de expressão abaixo da detectada em promastigotas.

De forma a confirmar que a HSP83 faz parte do complexo telomerase em *Leishmania*, obtivemos o IC50 do inibidor de HSP83, o 17-AAG, para formas promastigotas, o qual foi estimado em 202,1nM, valor maior que o anteriormente estimado por nós (100 nM) utilizando-se contagem de parasitas e superior também ao descrito na literatura para formas amastigotas.

Nossos resultados sugerem que a chaperona HSP83 pode estar envolvida tanto com a regulação da manutenção dos telômeros como com a regulação da atividade e biogênese do complexo RNP da telomerase de formas promastigotas e metacíclicas. Em relação a manutenção dos telômeros, a inibição farmacológica da HSP83 por exposição dos parasitos ao inibidor 177-AAG, induz encurtamento dos telômeros. E quanto a sua ação na regulação da atividade e biogênese do complexo RNP da telomerase, mostramos que a HSP83 co- imunoprecipita com o componente TERT da telomerase e que a 17-AAG, inibe *in vitro* a atividade da telomerase do parasito. Como mencionado anteriormente, resultados semelhantes foram obtidos em leveduras e humanos, mostrando que existe um grau de conservação na regulação da maquinaria telomérica.

Uma vez entendida com mais clareza a regulação da manutenção dos telômeros de *L. amazonensis*, as interações proteicas e mecanismos de manutenção ficará mais fácil propor se nessa maquinaria existem alvos terapêuticos para combater a leishmaniose.

7. Apêndice

Tabela suplementar 1. Iniciadores e sondas utilizados neste trabalho.

Iniciadores e Sondas	Sequência
DIG-Fita-C	5'-CCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAACCCCTAA 3'
Oligonucleotídeo-TS	5'- AAT CCG TCG AGC AGA GTT-3'
Cx-extend	5-GTG(CCCTTA) ₃ CCCTAA-3'
TSR8	AG(GGTTAG) ₇

8. Bibliografia

- BARBIÉRI, C., L., DOINE, A., I., FREYMULLER, E. Lysosomal depletion in macrophages from spleen and foot lesions of *Leishmania*-infected hamster. **Exp Parasitol**, v. 71, p. 218–228, 1990.
- AHN, H. J.; KIM, S.; NAM, H. W. Molecular cloning of the 82-kDa heat shock protein (HSP90) of *Toxoplasma gondii* associated with the entry into and growth in host cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 311, n. 3, p. 654–659, 2003.
- ALLSOPP, R. C. et al. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. v. 89, n. November, p. 10114–10118, 1992.
- BATISTA, F. A. H. et al. Identification of two p23 co-chaperone isoforms in *Leishmania braziliensis* exhibiting similar structures and Hsp90 interaction properties despite divergent stabilities. **FEBS Journal**, v. 282, n. 2, p. 388–406, 2015.
- BLACKBURN, E. H. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. **FEBS Letters**, v. 579, n. 4 SPEC. ISS., p. 859–862, 2005.
- BLACKBURN, E. H.; CHAN, S. R. W. L. Telomeres and telomerase. **The Royal Society**, n. December 2003, p. 109–121, 2004.
- BLACKBURN, E. H.; GALL, J. G. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. **Journal of Molecular Biology**, v. 120, n. 1, p. 33–53, 1978.
- BRANDAU, S.; DRESEL, A; CLOS, J. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus *Leishmania*. **The Biochemical journal**, v. 310 (Pt 1, p. 225–232, 1995.

- CANO, M. I. et al. Telomerase in kinetoplastid parasitic protozoa. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 96, n. 7, p. 3616–21, 1999.
- CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. S7–S16, 2007.
- DA SILVA, M. S. et al. The *Leishmania amazonensis* TRF (TTAGGG repeat-binding factor) homologue binds and co-localizes with telomeres. **BMC microbiology**, v. 10, p. 136, 2010.
- DE LANGE, T. Shelterin: The protein complex that shapes and safeguards human telomeres. **Genes and Development**, v. 19, n. 18, p. 2100–2110, 2005.
- EHUD INBAR, V. KEITH HUGHITT, LAURA A. L. DILLON, KASHINATH GHOSH, NAJIB M. EL-SAYED, D. L. S. The Transcriptome of *Leishmania major* Developmental Stages in their natural Sand Fly Vector. **American society for Microbiology**, v. 8, n. 2, p. 1–18, 2017.
- FORSYTHE, H. L. et al. Stable Association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with Active Human Telomerase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15571–15574, 2001.
- FUMO, G. et al. 17-Allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) is effective in down-regulating mutated , constitutively activated KIT protein in human mast cells. v. 103, n. 3, p. 1078–1085, 2018.
- GHADBAN, T. et al. HSP90 is a promising target in gemcitabine and 5-fluorouracil resistant pancreatic cancer. **Apoptosis**, v. 22, n. 3, p. 1–12, 2016.
- GIARDINI, M. A. et al. The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: Gene cloning and characterization. **Parasitology Research**, v. 98, n. 5, p. 447–454, 2006a.
- GIARDINI, M. A. et al. The putative telomerase reverse transcriptase component of *Leishmania amazonensis*: Gene cloning and characterization. **Parasitology Research**, v. 98, n. 5, p. 447–454, 2006b.
- GIARDINI, M. A. et al. *Leishmania amazonensis*: Partial purification and study of the biochemical properties of the telomerase reverse transcriptase activity from promastigote-stage. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 243–248, 2011.
- GIARDINI, M. A. et al. **Telomere and telomerase biology**. [s.l: s.n.]. v. 125
- GRAEFE, S. E. B. et al. Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 936–943, 2002.
- GREIDER, C. W. Telomere length regulation. **Annual review of biochemistry**, v. 65, p. 337–365, 1996.

- HAENDELER, J. et al. Regulation of telomerase activity and anti-apoptotic function by protein-protein interaction and phosphorylation. **FEBS Letters**, v. 536, n. 1–3, p. 180–186, 2003.
- HOLT, S. E. et al. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. **Genes and Development**, v. 13, n. 7, p. 817–826, 1999.
- HOMBACH, A.; CLOS, J. No stress - Hsp90 and signal transduction in Leishmania. **Parasitology**, v. 141, n. 9, p. 1156–1166, 2014.
- HÜBEL, A. et al. Leishmania major Hsp100 is required chiefly in the mammalian stage of the parasite. **Molecular and cellular biology**, v. 17, n. 10, p. 5987–95, 1997.
- HUG, N.; LINGNER, J. Telomere length homeostasis. **Chromosoma**, v. 115, n. 6, p. 413–425, 2006.
- KEPPLER, B. R.; GRADY, A. T.; JARSTFER, M. B. The biochemical role of the heat shock protein 90 chaperone complex in establishing human telomerase activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 29, p. 19840–19848, 2006.
- LI, Y. et al. Discovery and development of natural heat shock protein 90 inhibitors in cancer treatment. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 2, n. 3, p. 238–245, 2012.
- LI, Z. et al. Discovery of diamine-linked 17-arylamido-17-demethoxygeldanamycins as potent Hsp90 inhibitors. **European journal of medicinal chemistry**, v. 87, p. 346–363, 2014.
- LINGNER, J. et al. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. **Science (New York, N.Y.)**, v. 276, n. 5312, p. 561–7, 1997a.
- LINGNER, J. et al. Three Ever Shorter Telomere (EST) genes are dispensable for in vitro yeast telomerase activity. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 21, p. 11190–5, 1997b.
- LIRA, C. B. B. et al. LaRbp38: A Leishmania amazonensis protein that binds nuclear and kinetoplast DNAs. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 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. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 465, n. 2, p. 399–409, 2007b.
- MAHMOOD, T.; YANG, P. C. Western blot: Technique, theory, and trouble shooting. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 4, n. 9, p. 429–434, 2012.

MELANA, S. M.; HOLLAND, J. F.; POGO, B. G.-T. Inhibition of Cell Growth and Telomerase activity of breast cancer Cells in Vitro by 3'-Azido-3'-deoxythymidine. **Clinical Cancer Research**, v. 4, p. 693–696, 1998.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].

MOHAMMADIAN, M.; ZEYNALI, S.; AZARBAIJANI, A. F. Cytotoxic effects of the newly-developed chemotherapeutic agents 17-AAG in combination with oxaliplatin and capecitabine in colorectal cancer cell lines. v. 12, n. December, p. 517–525, 2017.

MOLLAPOUR, M. et al. Swe1Wee1-Dependent Tyrosine Phosphorylation of Hsp90 Regulates Distinct Facets of Chaperone Function. **Molecular Cell**, v. 37, n. 3, p. 333–343, 2010.

MONDIALE, O. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. **Who**, n. 44, p. 365–372, 2002.

MUÑOZ, D. P.; COLLINS, K. Biochemical properties of Trypanosoma cruzi telomerase. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 17, p. 5214–5222, 2004.

NAKAMURA, T. M. et al. Telomerase Catalytic Subunit Homologs from Fission Yeast and Human Telomerase Catalytic Subunit Homologs from Fission Yeast and Human. v. 955, n. 1997, 1997.

NEVES, D. P. et al. Parasitologia Humana. **Atheneu**, p. 498, 2011.

NORRIS-MULLINS, B. et al. Leishmania phosphatase PP5 is a regulator of HSP83 phosphorylation and essential for parasite pathogenicity. **Parasitology Research**, 2018.

OLAUSSEN, K. A. et al. Telomeres and telomerase as targets for anticancer drug development. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 57, n. 3, p. 191–214, 2006.

PALLAVI, R. et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of HSP90 from plasmodium falciparum and Trypanosoma evansi and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 49, p. 37964–37975, 2010.

Pearl, L.H. and Prodromou, C. (2006) Structure and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone machinery. Annual review of biochemistry. **75**, 271–294

PETERSEN, A. L. DE O. A. et al. 17-AAG Kills Intracellular Leishmania amazonensis while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, p. 1–12, 2012.

PETERSEN, A. L. O. . Universidade Federal da Bahia Faculdade de Medicina. 2015.

PRODROMOU, C. et al. Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 65–75, 1997.

PRODROMOU, C. Mechanisms of Hsp90 regulation. **Biochemical Journal**, v. 473, n. 16, p. 2439–52, 2016.

PRYDE, F. E.; GORHAM, H. C.; LOUIS, E. J. Chromosome ends: All the same under their caps. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 7, n. 6, p. 822–828, 1997.

RAMOS, F. F. et al. Selection strategy of phage-displayed immunogens based on an in vitro evaluation of the Th1 response of PBMCs and their potential use as a vaccine against *Leishmania infantum* infection. **Parasites and Vectors**, v. 10, n. 1, p. 1–14, 2017.

REED, J. et al. TRAP-LIG, a modified telomere repeat amplification protocol assay to quantitate telomerase inhibition by small molecules. **Analytical Biochemistry**, v. 380, n. 1, p. 99–105, 2008.

REQUENA, J. M.; MONTALVO, A. M.; FRAGA, J. Molecular Chaperones of *Leishmania*: Central Players in Many Stress-Related and -Unrelated Physiological Processes. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

SALDANHA, S. N.; ANDREWS, L. G.; TOLLEFSBOL, T. O. Analysis of telomerase activity and detection of its catalytic subunit, hTERT. **Analytical Biochemistry**, v. 315, n. 1, p. 1–21, 2003.

SCHEIBEL, T.; BUCHNER, J. The Hsp90 complex—a super-chaperone machine as a novel drug target. **Biochemical Pharmacology**, v. 56, n. 6, p. 675–682, 1998.

SCHMIDT, J. C.; CECH, T. R. Human telomerase: biogenesis , trafficking , recruitment , and activation. p. 1095–1105, 2015.

SHONHAI, A. et al. Intracellular protozoan parasites of humans: the role of molecular chaperones in development and pathogenesis. **Protein and peptide letters**, v. 18, n. 2, p. 143–157, 2011.

SILVA, K. P.; SERAPHIM, T. V.; BORGES, J. C. Structural and functional studies of *Leishmania braziliensis* Hsp90. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**, v. 1834, n. 1, p. 351–361, 2013.

SMOGORZEWSKA, A.; DE LANGE, T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. **Annual review of biochemistry**, v. 73, p. 177–208, 2004.

SÝKOROVÁ, E.; FAJKUS, J. Structure-function relationships in telomerase genes. **Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization**, v. 101, n. 7, p. 375–92, 1 p following

392, 2009.

TOOGUN, O. A.; DEZWAAN, D. C.; FREEMAN, B. C. The Hsp90 Molecular Chaperone Modulates Multiple Telomerase Activities. **Molecular and Cellular Biology**, v. 28, n. 1, p. 457–467, 2008.

TUCEY, T. M.; LUNDBLAD, V. Regulated assembly and disassembly of the yeast telomerase quaternary complex. **Genes and Development**, v. 28, n. 19, p. 2077–2089, 2014.

VARELA-M, R. E. et al. The HSP90 inhibitor 17-AAG potentiates the antileishmanial activity of the ether lipid edelfosine. **Acta Tropica**, v. 131, n. 1, p. 32–36, 2014.

VASCONCELOS, E. J. R. et al. The putative Leishmania telomerase RNA (LeishTER) undergoes trans-splicing and contains a conserved template sequence. **PloS one**, v. 9, n. 11, p. e112061, 2014.

VIVIESCAS, M. A.; SEGATTO, M.; CANO, M. I. N. Chaperones and Their Role in Telomerase Ribonucleoprotein Biogenesis and Telomere Maintenance. **Current Proteomics**, v. In press, 2017.

WAGATSUMA, A. et al. Pharmacological targeting of HSP90 with 17-AAG induces apoptosis of myogenic cells through activation of the intrinsic pathway. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 0, n. 0, p. 0, 2017.

WEIKL, T.; ABELMANN, K.; BUCHNER, J. An unstructured C-terminal region of the Hsp90 co-chaperone p23 is important for its chaperone function. **Journal of molecular biology**, v. 293, n. 3, p. 685–691, 1999.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. November, p. 3307–3316, 2001.

ZHAO, X. et al. Effects of 17 - allylamino - 17 - demethoxygeldanamycin on the induction of apoptosis and cell cycle arrest in HCT - 116 cells. p. 2177–2185, 2017.