

**Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Genética**

**ADALÚCIA DA SILVA**

**Utilização de um repórter fluorescente para a avaliação funcional de fatores envolvidos na iniciação da tradução de tripanossomatídeos**

**Recife**

**2016**

**ADALÚCIA DA SILVA**

**Utilização de um repórter fluorescente para a avaliação funcional de fatores envolvidos na iniciação da tradução de tripanossomatídeos**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética.

**Orientador:** Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

**Coorientadora:** Dra. Danielle Maria Nascimento Moura

**Recife**

**2016**

Catálogo na fonte  
Elaine Barroso  
CRB 1728

**Silva, Adalúcia da**

**Utilização de um repórter fluorescente para a avaliação funcional de fatores envolvidos na iniciação da tradução de tripanossomatídeos/ Adalúcia da Silva– Recife: O Autor, 2016.**

**67 folhas : il., fig., tab.**

**Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto**

**Coorientadora: Daniele Maria Nascimento Moura**

**Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.**

**Centro de Biociências. Genética, 2016.**

**Inclui referências**

1. Regulação da expressão gênica 2. Tripanossomatídeos 3. Micro-organismos- genética I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio (orientador) II. Moura, Daniele Maria Nascimento (coorientadora) III. Título

**572.865**

**CDD (22.ed.)**

**UFPE/CCB-2016-195**

**ADALÚCIA DA SILVA**

**Utilização de um repórter fluorescente para a avaliação funcional  
de fatores envolvidos na iniciação da tradução de  
tripanossomatídeos**

**Aprovado em 07 / 03 / 2016**

**Banca Examinadora:**

---

**Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto**

**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz**

---

**Dr. Danilo Elias Xavier**

**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz**

---

**Dra. Valéria Pereira Hernandes**

**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz**

---

**Dr. Lindomar José Pena**

**Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz**

**Recife**

**2016**

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus por me dar saúde e força para concluir o curso.

Ao meu orientador o Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, pela oportunidade concedida, pelo incentivo e pelas orientações que tornaram possível a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora a Dr<sup>a</sup> Danielle Moura, pelos ensinamentos e pela presteza no auxílio a realização deste trabalho, muito obrigada por compartilhar seus conhecimentos comigo.

A Gustavo pelo companheirismo e momentos de alegria.

A todos os colegas do grupo BioMolTryp por toda colaboração e amizade ao longo desses dois anos de trabalho, em especial ao Dr. Christian Reis pelo empenho e dedicação a todos do grupo.

A toda minha família pela compreensão e apoio

Aos órgãos fomentadores de pesquisa CAPES, FACEPE e CNPq pelo financiamento e suporte na execução das pesquisas científicas, e ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM pela infra-estrutura.

*“O sentido disso tudo é que não há sentido em tentar enlouquecer para impedir-se de ficar louco.”*

*Douglas Adams*

## Resumo

Os tripanossomatídeos são parasitas flagelados causadores de diversas doenças humanas e que apresentam algumas características moleculares bem distintas. Nestes organismos, o controle da sua expressão gênica é quase exclusivamente pós-transcricional e dados obtidos até o momento sugerem que a etapa de iniciação da tradução tem um papel importante neste controle. Durante a iniciação da tradução de eucariotos, o complexo trimérico eIF4F (formado pelas subunidades eIF4A, eIF4G e eIF4E) tem uma participação importante no reconhecimento do mRNA, facilitando o recrutamento ribossomal para iniciar a síntese proteica. Múltiplos homólogos das subunidades do complexo eIF4F foram identificados em tripanossomatídeos, mas não foi possível elucidar a função específica de cada um deles. Desta forma, este trabalho teve como objetivo o desenvolvimento de um ensaio *in vivo* para a avaliação do efeito da superexpressão desses homólogos de *Trypanosoma brucei* na tradução de um mRNA repórter, o qual codifica a proteína GFP (*green fluorescent protein*). Três linhagens repórter foram obtidas (4212, 4213 e 4235) e sete homólogos das subunidades do complexo eIF4F e um de PABP foram testados nestas linhagens. A análise da superexpressão foi feita através de ensaios de *Western blot*, seus perfis de crescimento foram avaliados por curvas de crescimento e a expressão de GFP foi avaliada através de citometria de fluxo. Os resultados apresentados mostram que as linhagens repórter 4213 e 4235 são viáveis para serem utilizadas na caracterização das proteínas envolvidas no controle da expressão gênica de tripanossomatídeos. Foi observado que as proteínas EIF4E1 e EIF4E2 provocam diminuição do crescimento, enquanto a superexpressão de EIF4E3, EIF4E4, EIF4E4<sub>W279A</sub>, EIF4G3, EIF4G4 e PABP1 não alteram o crescimento celular dos parasitas. Apesar da detecção de variações na expressão de GFP durante a superexpressão de alguns dos homólogos testados, não foi possível, contudo, confirmar que estas proteínas aumentam ou diminuem a tradução. Ensaio complementares ainda precisam ser feitos para confirmar a real função destes.

**Palavras-chave:** GFP; eIF4F; tripanossomatídeos; mRNA repórter.

## Abstract

The trypanosomatids are flagellated parasites responsible for several human diseases and which display unique molecular characteristics. Control of gene expression in these organisms is almost exclusively post-transcriptional and the data generated so far suggest that the initiation stage of translation plays an important role in this control. During translation initiation in eukaryotes, the trimeric complex eIF4F (formed by the eIF4A eIF4G and eIF4E subunits) has a relevant role in mRNA recognition and facilitates ribosomal recruitment to start the protein synthesis. Multiples homologues for the eIF4F subunits have been identified in trypanosomes, but it has not been possible to elucidate their specific functions. Thus, this study aimed to develop an *in vivo* assay to evaluate the effect of the overexpression of these *Trypanosoma brucei* homologues during the translation of a reporter mRNA encoding for the green fluorescent protein (GFP). Three reporter strains were generated (4212, 4213 and 4235) in which seven homologues of eIF4F subunits and one of their PABP partner were overexpressed. Confirmation of overexpression was carried out by *Western blot* assays, growth profiles were evaluated by cell counting and GFP expression was assessed by flow cytometry. The results generated show that the reporter lines 4213 and 4235 are feasible for use in the characterization of proteins involved in the control of trypanosomatids gene expression. Overexpression of EIF4E1 and EIF4E2 was seen to induce a reduction in cell growth, while EIF4E3, EIF4E4, EIF4E4<sub>W279A</sub>, EIF4G3, EIF4G4 and PABP1 did not interfere with growth. Despite the detection of variations in GFP expression during overexpression of some of the homologues tested it was not possible to confirm if these proteins increase or decrease translation. Complementary assays still need to be done to confirm the true function of these factors.

**Key words:** GFP; eIF4F; trypanosomatids; mRNA report.

## Lista de ilustrações

<b>Figura 1. Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos.</b>	<b>4</b>
<b>Figura 2. Mosca tsé-tsé (<i>Glossina</i>) vetor transmissor da Tripanossomíase Africana.</b>	<b>5</b>
<b>Figura 3. Ciclo de vida do <i>Trypanosoma brucei</i>.</b>	<b>8</b>
<b>Figura 4. Número total de casos de Tripanossomíase Africana Humana.</b>	<b>9</b>
<b>Figura 5. Distribuição geográfica dos casos relatados de HAT entre os anos de 2000-2009.</b>	<b>10</b>
<b>Figura 6. Representação simplificada do processamento dos mRNAs em tripanossomatídeos.</b>	<b>14</b>
<b>Figura 7. Processo de formação do complexo de iniciação da tradução em eucariotos.</b>	<b>17</b>
<b>Figura 8. Representação da ligação das subunidades do complexo eIF4F (eIF4A, eIF4E e eIF4G) a um mRNA maduro</b>	<b>18</b>
<b>Figura 9. Dois diferentes complexos formados por diferentes subunidades do complexo eIF4F.</b>	<b>24</b>
<b>Figura 10. Esquema representativo dos mRNAs repórteres.</b>	<b>28</b>
<b>Figura 11. Obtenção das linhagens repórter com expressão de GFP.</b>	<b>34</b>
<b>Figura 12. <i>Western blot</i> para confirmação da expressão da proteína GFP nas células das linhagens 4212, 4213 e 4235.</b>	<b>35</b>
<b>Figura 13. Confirmação da expressão de GFP nas linhagens obtidas.</b>	<b>36</b>
<b>Figura 14. Análise por citometria de fluxo, confirmando a expressão de GFP nas linhagens repórteres.</b>	<b>37</b>
<b>Figura 15. Curvas de crescimento e <i>Western blot</i> mostrando o efeito da expressão do EIF4E1 no crescimento das linhagens.</b>	<b>39</b>

<b>Figura 16. Curvas de crescimento e <i>Western blot</i> mostrando o efeito da expressão do EIF4E2 no crescimento das linhagens.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 17. Curvas de crescimento e <i>Western blot</i> mostrando o efeito da expressão do EIF4E3 no crescimento das linhagens.</b>	<b>40</b>
<b>Figura 18. Curvas de crescimento e <i>Western blot</i> mostrando o efeito da expressão do EIF4E4 no crescimento das linhagens.</b>	<b>41</b>
<b>Figura 19. Curvas de crescimento e <i>Western blot</i> mostrando o efeito da expressão do EIF4E4<sub>W279A</sub> no crescimento das linhagens.</b>	<b>42</b>
<b>Figura 20. Curvas de crescimento e <i>Western blot</i> mostrando o efeito da expressão do EIF4G3 no crescimento das linhagens.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 21. Curvas de crescimento e <i>Western blot</i> mostrando o efeito da expressão do EIF4G4 no crescimento das linhagens.</b>	<b>43</b>
<b>Figura 22. Curvas de crescimento e <i>Western blot</i> mostrando o efeito da expressão do PABP1 no crescimento das linhagens.</b>	<b>44</b>
<b>Figura 23. Avaliação por citometria de fluxo da linhagem 4212 em 24 e 48 horas após indução das proteínas de interesse.</b>	<b>46</b>
<b>Figura 24. Avaliação por citometria de fluxo da linhagem 4213 em 24 e 48 horas após indução das proteínas de interesse.</b>	<b>48</b>
<b>Figura 25. Avaliação por citometria de fluxo da linhagem 4235 em 24 e 48 horas após indução das proteínas de interesse.</b>	<b>49</b>

## **Lista de Tabelas**

**Tabela 1: Cinco quimioterapias atuais contra a tripanossomíase Africana humana (HAT), com suas vantagens e desvantagens.** 11

**Tabela 2. Relação dos vetores utilizados para superexpressão dos homólogos dos fatores selecionados.** 29

## Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

**4E-BP**- Proteína de Ligação ao 4E (*4E Binding Protein*);

**ATP**- Adenosina trifosfato;

**BSF**- Forma sanguínea do *Trypanosoma brucei* (*bloodstream form*);

**CaCl<sub>2</sub>** – Cloreto de Cálcio;

**Cap** – Estrutura presente na extremidade 5' do mRNA;

**CDC**- Centro de controle e prevenção de doenças (*Centers for Disease Control and Prevention*);

**DEAD**- Ácido Aspártico (**D**) Ácido Glutâmico (**E**), Alanina (**A**), Ácido aspártico(**D**);

**DNA** – Ácido desoxiribonucléico (*Desoxiribonucleic acid*);

**EDTA** – Ácido etilenodiaminotetracético (*Ethylenediaminetetraacetic acid*);

**eIF** – Fator de iniciação da tradução eucariótico (*eukaryotic Initiation Factor*);

**FL1**- Canal de fluorescência (*Fluorescence 1*);

**FSC**- Tamanho relativo da célula (*Forward SCatter*);

**G418** – Análogo da neomicina;

**GFP**- Proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*);

**GTP**- Guanosina trifosfato;

**HAT** - Tripanossomíase Africana Humana (*Human African trypanosomiasis*);

**HEAT**- Huntingtina (envolvida na doença de Huntington), **EF3** (Fator de Elongação 3), **PR/65A** (subunidade A da proteína Fosfatase 2), e **mTor/FRAP** (molécula sensível à rapamicina);

**IgG**- Imunoglobulina G;

**mRNA** – RNA Mensageiro (*messenger RNA*);

**NaOH** – Hidróxido de Sódio;

**Not I** - Enzima de restrição;

**ODC** - Ornitina descarboxilase;

**OMS** – Organização Mundial da Saúde;

**Mnk**- Proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinases*);

**NECT**- Nifurtimox–eflornitina tratamento combinado;

**p4212** –Plamídeos para expressão de GFP em *Trypanosoma brucei*;

**PABP** – Proteína de ligação a cauda poli-A (*Poly(a)-Binding Protein*);

**PBS** – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*);

**PCF** – Forma procíclica de *Trypanosoma brucei* (*Procyclic Form*);

**PGCs** - Grupamentos gênicos policistrônicos (*polycistronic gene clusters*);

**PIC** - Complexo de pré-iniciação (*preinitiation complex*);

**PVDF** – Fluoreto de Polivinilideno (*polyvinylidene difluoride*);

**RNAi** - RNA de interferência (*RNA interferente*);

**RNA pol** - RNA polimerase;

**RBP**- Proteínas de ligação ao mRNAs (*RNA binding protein*);

**SDM-79** – Meio de cultura de tripanossomas

**SDS-PAGE** – Eletroforese em gel de poliacrilamida - dodecil-sulfato de sódio (*Sodium Disulfate – PolyAcrylamide Gel Eletrophoresis*);

**SIF** - Fator de indução Stumpy (*stumpy induction factor*);

**SL**- *Spliced leader*;

**SSC**- Granulosidade/complexidade celular (*Side SCatter*);

**Tb**- *Trypanosoma brucei*;

**Tbb** - *Trypanosoma brucei brucei*;

**Tbg** - *Trypanosoma brucei gambiense*;

**TBS** – Solução salina tamponada com Tris (*Tris Buffered Saline*);

**Tbr** - *Trypanosoma brucei rhodesiense*;

**tRNA** – RNA Transportador (*transfer RNA*);

**tRNAi** - RNA Transportador iniciador (*Transfer RNA initiator*);

**TET**- Tetraciclina;

**TY** – Peptídeo EVHTNQDPLD do elemento Ty1 de *Sacharomyces cerevisiae*;

**UTR**- Região não traduzida (*Untranslated region*);

**VSGs** – Glicoproteínas variantes de superfície (*Variant Surface Glycoproteins*);

**WHO**- Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*);

**ZPFM** – Tampão para transfecção (*Zimmerman Post-Fusion Medium*);

## Sumário

<b>Resumo</b>	<b>V</b>
<b>Abstract</b>	<b>VI</b>
<b>Lista de ilustrações</b>	<b>VII</b>
<b>Lista de tabelas</b>	<b>IX</b>
<b>Lista de abreviaturas, siglas e símbolos</b>	<b>X</b>
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
<b>2. Revisão da literatura</b>	<b>3</b>
<b>2.1 Tripanossomatídeos</b>	<b>3</b>
<b>2.2 <i>Trypanosoma brucei</i> e a Tripanossomíase Africana</b>	<b>4</b>
2.2.1 Aspectos clínicos	6
2.2.2 Ciclo de vida	7
2.2.3 Epidemiologia e tratamento	8
<b>2.3 <i>Trypanosoma brucei</i> como modelo experimental da família</b>	<b>12</b>
<b><i>Trypanosomatidae</i></b>	
<b>2.4 Características moleculares dos tripanossomatídeos.</b>	<b>13</b>
2.4.1 Organização genômica e processamento dos mRNAs	13
<b>2.5 Iniciação da tradução em eucariotos</b>	<b>15</b>
<b>2.6 O complexo eIF4F de iniciação da tradução e PABP</b>	<b>17</b>
2.6.1 eIF4A	18
2.6.2 eIF4E	19
2.6.3 eIF4G	20

2.6.4 A proteína de ligação ao poli A (PABP)	20
<b>2.7 Fatores de iniciação da tradução em tripanossomatídeos</b>	<b>21</b>
2.7.1 EIF4A	21
2.7.2 EIF4E	22
2.7.3 EIF4G	23
2.7.4 A proteína de ligação ao poli A (PABP) de tripanossomatídeos	24
<b>2.8 Utilização de mRNAs repórter para avaliação funcional de fatores de tradução</b>	<b>25</b>
<b>3. Objetivos</b>	<b>27</b>
3.1 Objetivo geral	27
3.2 Objetivos específicos	27
<b>4. Material e Métodos</b>	<b>28</b>
<b>4.1 Construções plasmidiais</b>	<b>28</b>
4.1.1 Vetor para expressão do mRNA repórter	28
4.1.2 Plasmídeo para expressão dos homólogos do complexo eIF4F de tripanossomatídeos	29
<b>4.2 Cultivo de células de <i>Trypanosoma brucei</i></b>	<b>30</b>
<b>4.3 Transfecção de <i>T. brucei</i></b>	<b>30</b>
<b>4.4 Indução da expressão dos transgenes</b>	<b>31</b>
<b>4.5 Citometria de fluxo</b>	<b>31</b>
<b>4.6 Microscopia confocal</b>	<b>32</b>
<b>4.7 Curvas de crescimento</b>	<b>32</b>
<b>4.8 Western blot</b>	<b>33</b>

<b>5. Resultados</b>	<b>34</b>
<b>5.1 Análise das linhagens de <i>T. brucei</i> expressando GFP</b>	<b>34</b>
<b>5.2 Avaliação dos efeitos da superexpressão de homólogos das subunidades do complexo EIF4F e PABP sobre o crescimento de <i>T. brucei</i></b>	<b>38</b>
5.2.1 Efeito da expressão de homólogos de eIF4E no crescimento de <i>T. brucei</i>	<b>38</b>
5.2.2 Efeito da expressão de EIF4G3 e EIF4G4 no crescimento de <i>T. brucei</i>	<b>42</b>
5.2.3 Efeito da expressão de PABP1 no crescimento de <i>T. brucei</i>	<b>44</b>
<b>5.3 Avaliação dos efeitos da superexpressão de homólogos das subunidades do complexo EIF4F e PABP sobre a expressão de um mRNA repórter codificante para a GFP</b>	<b>45</b>
5.3.1 Efeito da expressão de homólogos do complexo EIF4F na expressão de GFP na linhagem 4212	<b>45</b>
5.3.2 Efeito da expressão de homólogos do complexo EIF4F na expressão de GFP na linhagem 4213	<b>47</b>
5.3.2 Efeito da expressão de homólogos do complexo EIF4F na expressão de GFP na linhagem 4213	<b>48</b>
<b>6. Discussão</b>	<b>50</b>
<b>7. Conclusões</b>	<b>56</b>
<b>8. Referências bibliográficas</b>	<b>57</b>
<b>9. Currículo Lattes atualizado</b>	<b>63</b>

## 1. Introdução

Doenças negligenciadas são um grupo de doenças infecciosas associadas a condições de pobreza, verificadas, em sua grande maioria, nos países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento. Várias destas doenças são causadas por protozoários membros da família *Trypanosomatidae*, representados principalmente pelos gêneros *Leishmania*, causador das diversas formas de leishmaniose, e *Trypanosoma*, causador de doenças como a doença de Chagas e doença do sono, tendo como agentes etiológicos o *T. cruzi* e *T. brucei*, respectivamente. O tratamento medicamentoso dessas doenças tem diversas desvantagens como, por exemplo, alto custo, grau de toxicidade elevado, grande incidência de resistência (requerendo a administração de altas doses), além de problemas logísticos. Por esta razão, a pesquisa de novos alvos farmacológicos e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas mais eficazes e específicas se faz necessário.

Além da sua importância médica e veterinária, os tripanossomatídeos são organismos que se destacam por apresentarem várias peculiaridades em relação à sua biologia celular e molecular. O processamento dos mRNAs nos tripanossomatídeos difere do encontrado na maioria dos eucariotos porque os genes se encontram organizados em *tandem*, formando grandes blocos que são transcritos em uma longa fita de RNA policistrônico. Os RNAs são posteriormente processados por um mecanismo denominado *tras-splicing*, onde o pré-RNA policistrônico é clivado em vários mRNAs monocistrônicos. Este mecanismo também adiciona uma sequência denominada *spliced leader* ao início do mRNA e a poliadenilação da extremidade 3' é um processo que ocorre simultaneamente a

esta etapa. Esses fatos indicam que a regulação da expressão gênica nestes organismos ocorre no nível pós-transcricional.

O início da tradução em eucariotos é um processo complexo e bastante regulado, com um papel importante em eventos de regulação pós-transcricional da expressão gênica e que envolve vários fatores de iniciação (eIFs). É através deste processo que o ribossomo 80S é posicionado corretamente no códon iniciador AUG do mRNA. Dentre os vários eIFs, o complexo eIF4F se destaca por seu papel crucial no reconhecimento e circularização do mRNA. Este complexo é formado por três subunidades denominadas eIF4A (RNA helicase), eIF4E (ligante ao cap) e o eIF4G (proteína estruturadora do complexo).

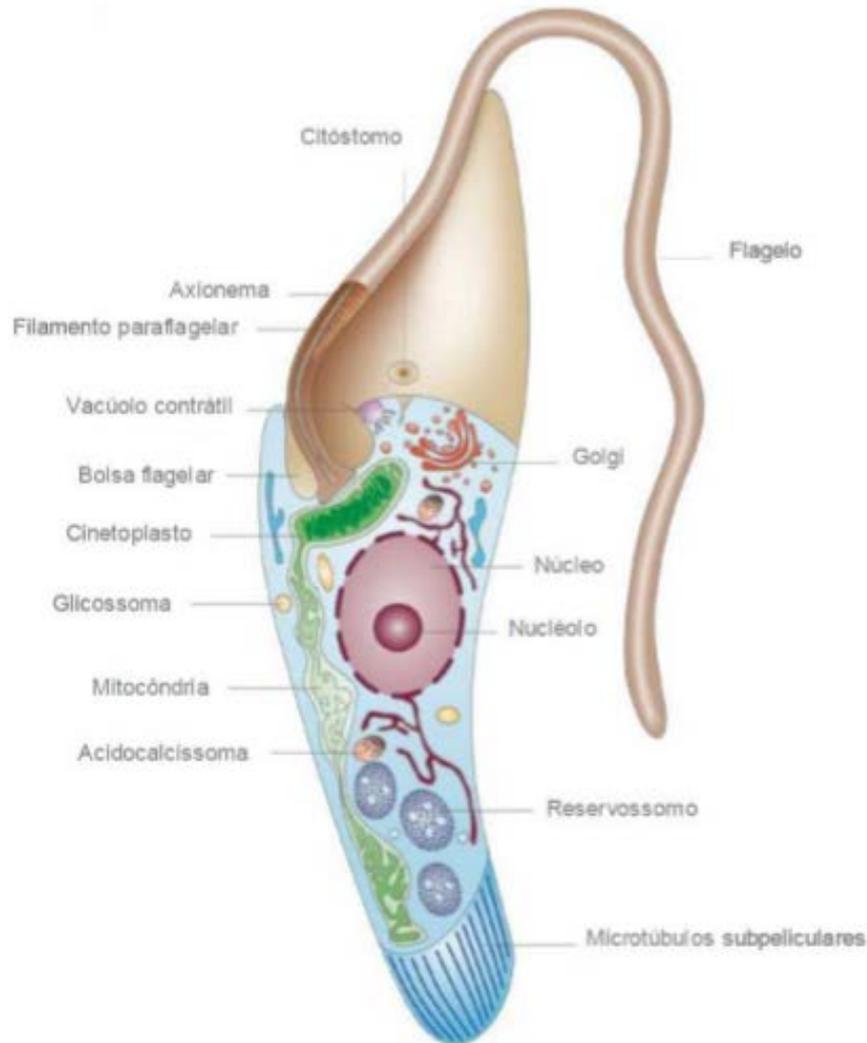
Múltiplos homólogos das diferentes subunidades do complexo eIF4F foram identificados em tripanossomatídeos. Trabalhos anteriores ajudaram na caracterização inicial de vários destes homólogos, mas ainda não foi possível elucidar de forma clara a função específica e/ou o modo de ação de cada um deles. Um destes trabalhos, tentou classificá-los como estimuladores ou inibidores da tradução, utilizando para tal propósito uma linhagem de *T. brucei* expressando o mRNA da enzima luciferase como repórter traducional. Porém, devido às características dos vetores plasmidiais utilizados, a expressão do repórter nesta linhagem tornou-se bastante instável, com níveis de expressão irregulares de luciferase, não sendo possível avaliar a função dos homólogos neste sistema. A disponibilidade de uma nova geração de vetores para transfecção e de linhagens de *T. brucei* de mais fácil cultivo e manipulação, entretanto, nos fez propor o desenvolvimento de um novo sistema repórter baseado na expressão da proteína GFP, mais eficiente e estável, que auxiliasse no estudo de proteínas envolvidas na iniciação da tradução desses parasitas.

## 2. Revisão da Literatura

### 2.1 Tripanossomatídeos

A família *Trypanosomatidae* (ordem Kinetoplastida) compreende vários parasitas protozoários flagelados, digenéticos e unicelulares, responsáveis por diversas doenças infecciosas humanas em populações de baixa renda dos países menos desenvolvidos. As parasitoses humanas mais comuns causadas por espécies desta família incluem: a Tripanossomíase Africana Humana (HAT) ou Doença do sono, causada por duas subespécies do gênero *Trypanosoma* (*Trypanosoma brucei rhodesiense* e *Trypanosoma brucei gambiense*); a Doença de Chagas, causada pela infecção com o parasita *Trypanosoma cruzi*; e também as leishmanioses, causadas pelas diferentes espécies do gênero *Leishmania*. Estas enfermidades são consideradas algumas das doenças negligenciadas mais prejudiciais atualmente, segundo a OMS (OMS, 2014; Stuart *et al.*, 2008).

Treze gêneros de protozoários estão agrupados na família *Trypanosomatidae* (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Strigomonas*, *Angomonas*, *Sergeia*, *Wallaceina*, *Blephomonas* e *Phytomonas*). A sua principal característica é a presença de uma mitocôndria única e ramificada que percorre todo corpo celular, denominada cinetoplasto (Figura 1). Além disto, estes parasitas podem possuir ciclo de vida heteroxênico, ou seja, necessitam de dois ou mais hospedeiros para completar seu ciclo evolutivo; ou monoxênicos, quando desenvolvem todo o seu ciclo de vida em apenas um hospedeiro. Entre seus hospedeiros encontram-se plantas, insetos, peixes, répteis e mamíferos (Lukes *et al.*, 2014).



**Figura 1: Representação esquemática da morfologia dos tripanossomatídeos.** A figura mostra a localização das principais estruturas celulares dos tripanossomatídeos. **Fonte:** DoCampo *et al.*, 2005

## 2.2 *Trypanosoma brucei* e a Tripanossomíase Africana

A Tripanossomíase Africana é uma infecção parasitária causada pelo *T. brucei*. Esta doença é transmitida aos humanos e animais por mais de 20 espécies e subespécies da mosca tsé-tsé (gênero *Glossina*) (Figura 2) em países da África Subsaariana. Os parasitas podem ser transmitidos aos humanos e animais durante o repasto sanguíneo do vetor infectado (Cecchi *et al.*, 2015; Lejon *et al.*, 2013).



**Figura 2. Mosca tsé-tsé (*Glossina*), vetor transmissor da Tripanossomíase Africana.** A figura mostra a mosca durante o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado. **Fonte:** CDC, 2012. (<http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/epi.html>)

Taxonomicamente, a espécie *T. brucei* pode ser subdividida em três subespécies: *T.b. brucei* (*Tbb*), *T.b. gambiense* (*Tbg*), e *T.b. rhodesiense* (*Tbr*). Estas três subespécies são morfologicamente indistinguíveis e são classificadas de acordo com o hospedeiro, o tipo de doença que causam e sua distribuição geográfica. *Tbr* e *Tbg* causam as formas aguda e crônica da tripanossomíase Africana humana, respectivamente. A subespécie *Tbb* não infecta humanos, sendo causadora da tripanossomíase africana em uma ampla variedade de animais domésticos, doença também conhecida como Nagana (Echodu *et al.*,2015).

*Tbr* e *Tbg* causam distúrbios patológicos distintos e apesar de ambas estarem incluídas no termo geral de HAT, têm de ser consideradas como duas doenças distintas, com diferentes padrões clínicos e epidemiológicos. A infecção pelo *T. b. gambiense* é encontrada na África ocidental e central, e geralmente causa a HAT crônica. É uma doença antropomórfica, com poucos reservatórios animais, sendo responsável por 98% dos casos reportados de HAT na última década (WHO, 2014). *T. b. rhodesiense* é encontrado na África oriental e austral.

Ele é menos adaptado aos seres humanos e causa uma doença aguda e que progride rapidamente, conhecida como HAT aguda (Brun *et al.*,2010). É uma doença zoonótica, afetando principalmente animais (gado e animais selvagens), com os seres humanos sendo acidentalmente infectados. A HAT causada por *T.b. rhodesiense* tem grande potencial epidêmico em humanos, tendo sido responsável por grandes surtos no passado (Hide, 1999; Fèvre *et al.*,2004).

### **2.2.1 Aspectos clínicos**

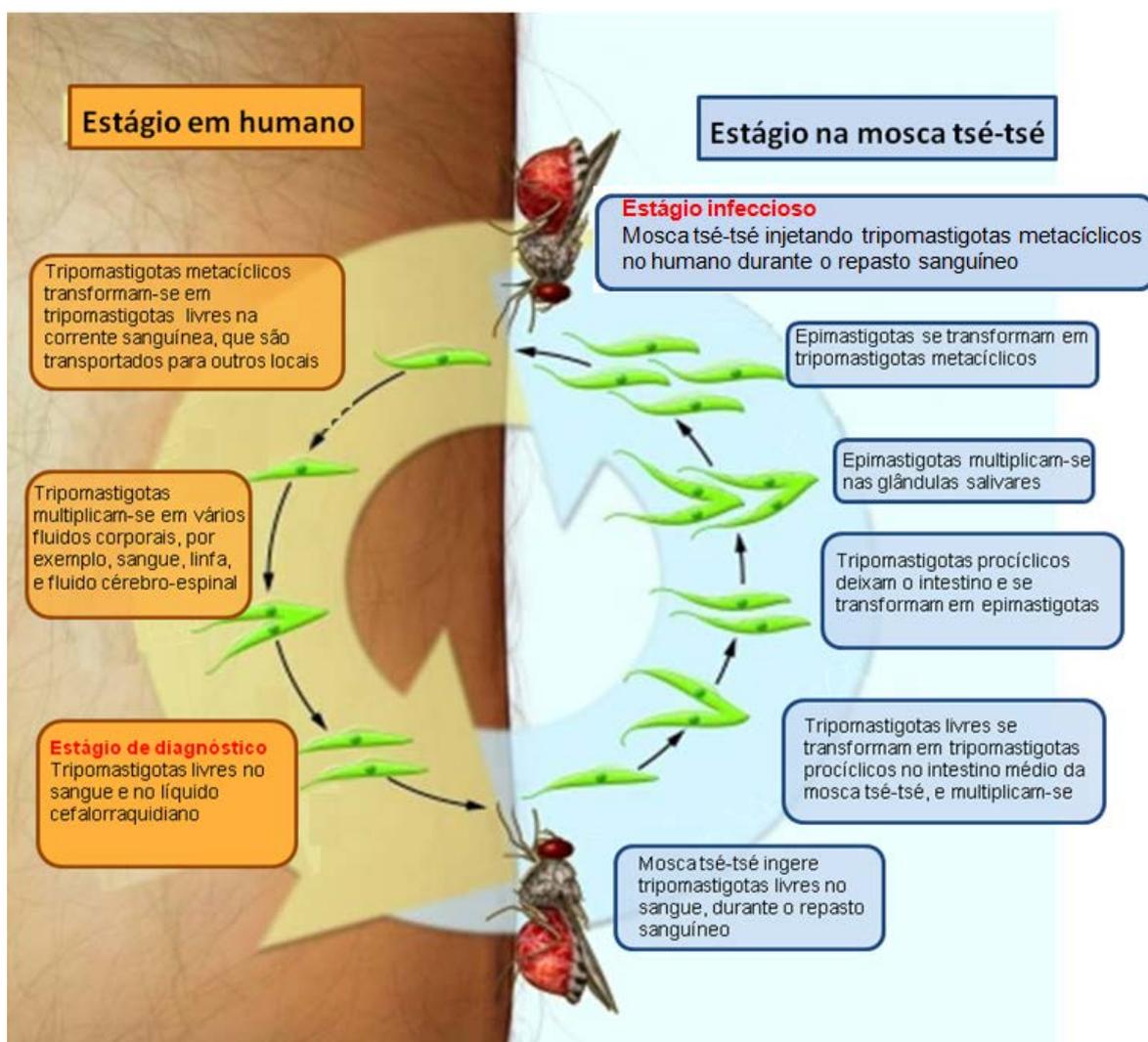
A HAT evolui clinicamente em duas etapas. Inicialmente, há o estágio hemolinfático, onde parasitas multiplicam-se no sistema linfático e na corrente sanguínea. Após um período variável, que é muito menor na HAT aguda do que na HAT crônica, inicia-se a segunda fase quando os tripanossomas atravessam a barreira hemato-encefálica e invadem o sistema nervoso central (fase meningoencefálica). Esta fase é acompanhada por danos neurológicos progressivos e é geralmente fatal se deixada sem tratamento, uma vez que os doentes progridem gradualmente para o coma, falência de órgãos e eventualmente morte (Jamonneau *et al.*,2012).

A apresentação clínica da HAT pode variar nas duas formas da doença, porém os sinais e sintomas são geralmente os mesmos para ambas, diferindo em termos de frequência, gravidade, e aparência cinética. Na HAT aguda, a doença geralmente progride até a morte dentro de 6 meses. Já na HAT crônica, a enfermidade tem um curso progressivo com duração média de três anos (Odiit *et al.*, 1997; Checchi *et al.*, 2008).

Os sinais e os sintomas clínicos são inespecíficos em ambas as formas da HAT, e podem variar entre indivíduos. Febre intermitente, dor de cabeça, prurido e outros problemas dermatológicos, linfadenopatias, fraqueza, astenia, anemia, distúrbios cardíacos, distúrbios endócrinos, dores músculo-esqueléticas e hepatoesplenomegalia são os principais sinais e sintomas da primeira fase. Os sinais e sintomas neuropsiquiátricos, incluindo distúrbios do sono, são característicos da segunda fase da doença. No entanto, a maioria dos sintomas de ambas as fases se sobrepõem, tornando o diagnóstico e a distinção entre as fases, feita com base em características clínicas e epidemiológicas da doença (Sahlas *et al.*, 2002; Simarro *et al.*, 2012).

### **2.2.2 Ciclo de vida**

A infecção pelo *T. brucei* no hospedeiro mamífero é iniciada quando formas tripomastigotas metacíclicas são inoculadas pela mosca tsé-tsé infectada no hospedeiro vertebrado. Uma vez na corrente sanguínea estes parasitas se desenvolvem em tripomastigotas sanguíneas do tipo alongadas (*slender forms*), que irão se multiplicar na corrente sanguínea e estabelecer a infecção. À medida que o número de parasitas aumenta, o fator de indução Stumpy (SIF), promove a parada da divisão celular e a geração de formas mais curtas e espessas (*stumpy forms*). Essas células são ingeridas pelas moscas tsé-tsé, e migram para o intestino do inseto, onde se transformam em formas tripomastigotas procíclicas (Figura 3) (Fenn e Matthews, 2007; Hammarton *et al.*, 2003).

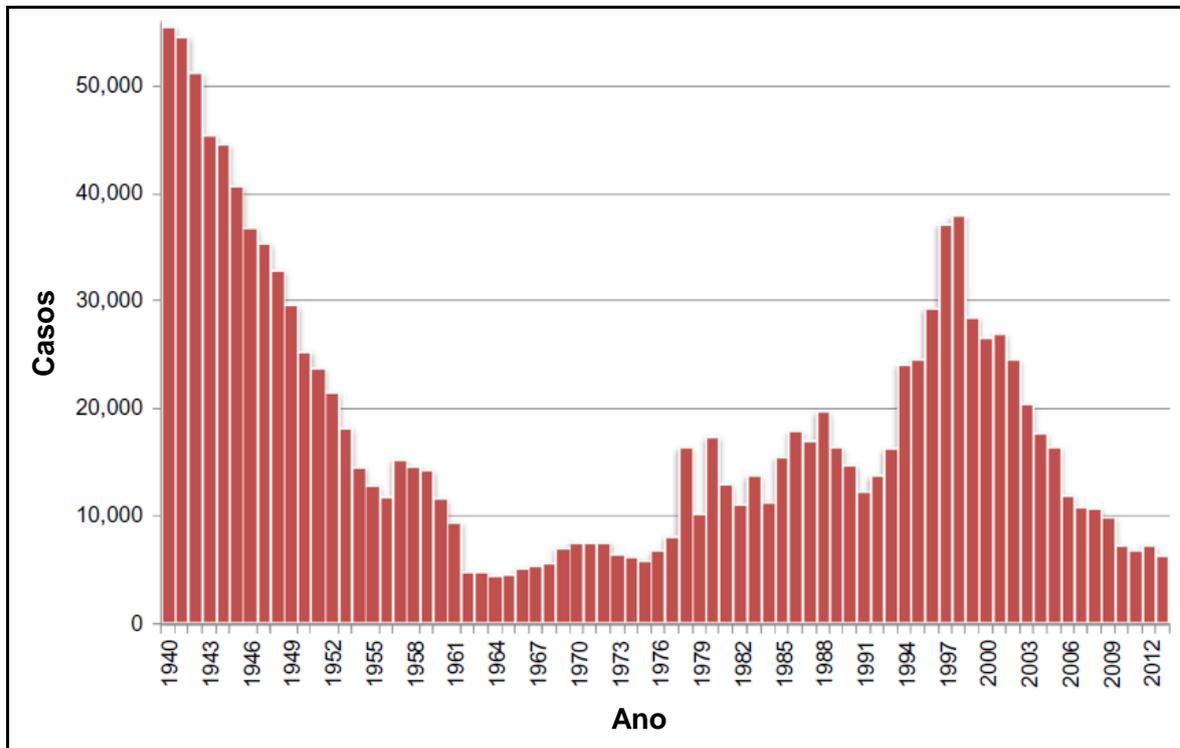


**Figura 3. Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*.** A ilustração mostra a presença de diferentes formas celulares durante a transição entre hospedeiro vertebrado e invertebrado. **Adaptado de:** Stuart *et al.*, 2008.

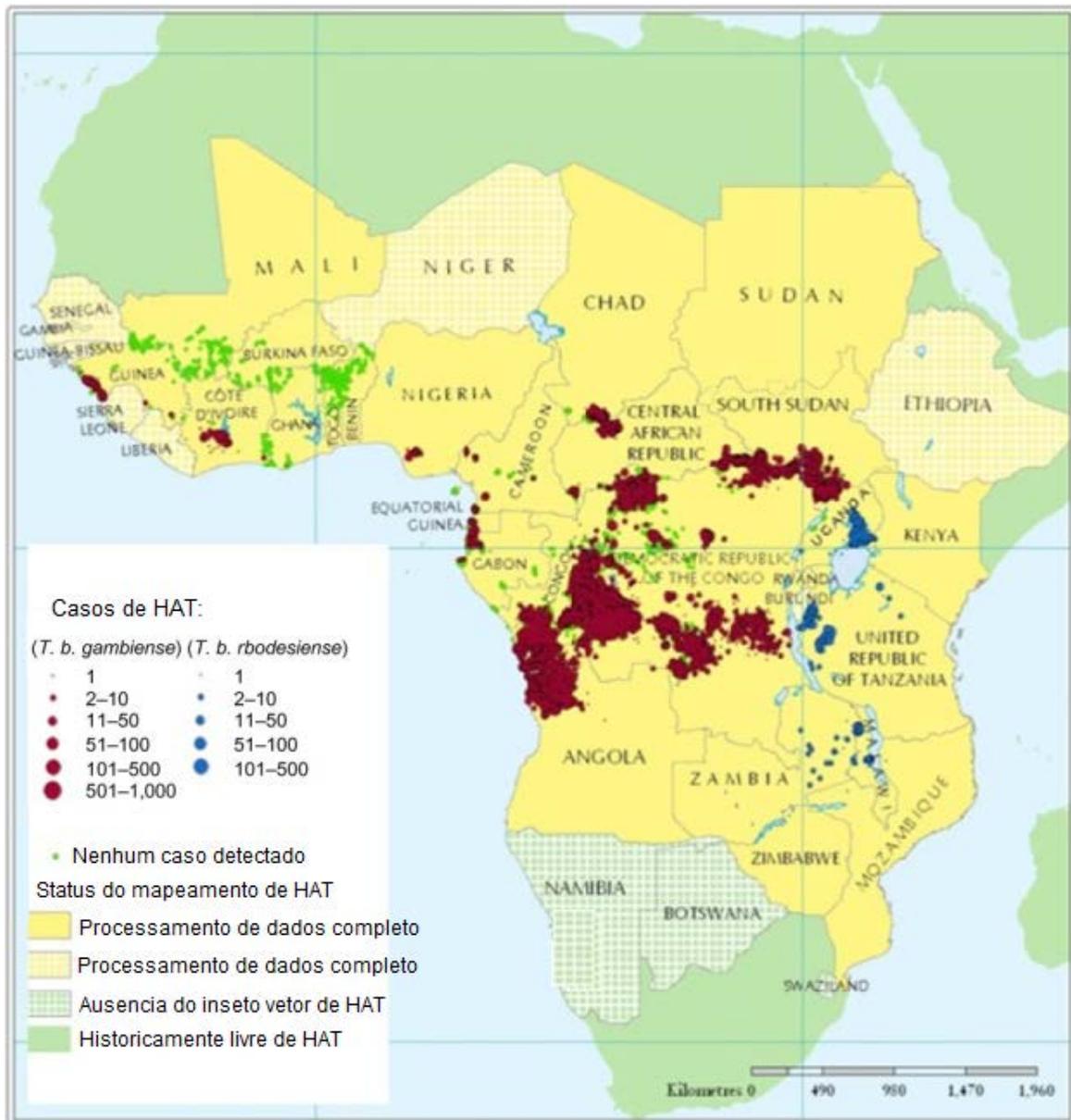
### 2.2.3 Epidemiologia e tratamento

Atualmente a HAT é endêmica em algumas regiões da África Subsaariana, abrangendo em torno de 36 países, com cerca de 70 milhões de pessoas em situação de risco de contrair a doença, e com número total de casos estimados em 300 mil (Figura 4) (WHO, 2013). Ela continua sendo um dos obstáculos mais sérios ao desenvolvimento econômico na África Subsaariana, afetando a saúde

das pessoas, bem como a atividade pecuária. No ano de 2013 foram notificados cerca de 6314 casos de HAT no continente africano, onde destes 98% eram a forma gambiense (Figura 5) (WHO,2013).



**Figura 4. Número total de casos de Tripanossomíase Africana Humana, reportados à Organização Mundial de Saúde no período de 1940–2013. Fonte: WHO, 2013.**



**Figura 5. Distribuição geográfica dos casos relatados HAT entre os anos de 2000-2009.**  
**Fonte:** Simarro et al.,2010.

O maior obstáculo no tratamento de HAT é que ainda não há vacina eficaz contra ambas as subespécies patogênicas aos humanos. A criação de qualquer tipo de vacina contra tripanossoma é difícil devido à variação antigênica e as constantes mudanças das glicoproteínas variantes de superfície (VSGs- do inglês *variant surface glycoproteins*), o que permite que o parasita evite as principais defesas imunológicas. Assim, as únicas medidas anti-tripanosomíase viáveis disponíveis são quimioterápicas. As drogas disponíveis têm potencial limitado,

são complicadas de se administrar, principalmente durante o segundo estágio da doença, e podem causar reações adversas severas. Até recentemente, apenas quatro drogas como tratamentos para a HAT têm sido utilizadas: pentamidina, suramina, melarsoprol e eflornitina (Tabela 1).

**Tabela 1: Cinco quimioterapias atuais contra a Tripanossomíase Africana humana (HAT), com suas vantagens e desvantagens. Adaptado de: Babokhov et al., 2013**

<b>Droga</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Pentamidina (pentamidine Isethionate)</b>	Acumula nos tripanossomas; perturba processos mitocondriais	Eficaz contra o estágio I causado pelo <i>Trypanosoma brucei gambiense</i>	Ineficaz contra o estágio II de <i>T. b. gambiense</i> e ambas as fases do <i>T. b. rhodesiense</i>
<b>Suramin (Bayer 205, Germanin)</b>	Liga-se a enzimas no glicossomo; perturba a glicólise	Eficaz contra estágio I <i>T. b. rhodesiense</i>	Ineficaz contra o estágio II causado pelos <i>T. b. rhodesiense</i> e <i>gambiense</i>
<b>Melarsoprol (Mel B)</b>	Perturba o metabolismo redox do tripanossoma e glicólise	Eficaz contra as duas subespécies em ambas as fases	Tóxico; cerca de 5% dos pacientes morrem em resultado da encefalopatia reativa pós-tratamento; resistência dos tripanossoma de 30%
<b>Eflornitina (difluoromethyl-ornithine)</b>	Inibe irreversivelmente a via da ornitina descarboxilase (ODC); interrupção da proliferação e vulnerabilidade ao ataque oxidativo	Eficaz contra o estágio II de <i>T. b. gambiense</i>	Ineficaz contra ambas as fases do <i>T. b. rhodesiense</i> ; tratamento é demorado
<b>NECT (nifurtimox–eflornitina tratamento combinado)</b>	Eflornitina inibe a via da ornitina descarboxilase (ODC) e nifurtimox induz ataque oxidativo nos tripanossomas enfraquecidos	Alta taxa de cura para ambos os estágios de <i>T. b. gambiense</i> ; baixo índice de efeitos adversos; não há taxa de mortalidade	Potencial de resistência ao tratamento no campo

A utilização destes medicamentos depende do estágio e do patógeno causador da doença. A terapia de combinação envolve a droga oral nifurtimox

(utilizada no tratamento da Doença de Chagas) e eflornitina, e tem sido o mais recente avanço na pesquisa de fármacos anti-tripanosomíase. Esta terapia, conhecida como tratamento de combinação nifurtimox-eflornitina (NECT), foi adicionado à lista da Organização Mundial da Saúde de medicamentos essenciais em 2009. Desde 2010, NECT tem sido usado para tratar 59% do total de casos por *T. b. gambiense*, sendo menos dispendioso e demorado do que a monoterapia. Porém cada um destes medicamentos tem um número de desvantagens no que diz respeito a questões como toxicidade, resistência e problemas logísticos. Por esta razão, o estudo dos mecanismos moleculares destes parasitas pode ser a chave para a identificação de novos alvos para intervenção terapêuticos mais baratos e eficazes (Barrett *et al.*, 2007; Leprohon *et al.*, 2011; Worthen *et al.*, 2010).

### **2.3 *Trypanosoma brucei* como modelo experimental da família *Trypanosomatidae***

Além do impacto socioeconômico causado pela HAT, o *T. brucei* é considerado um organismo modelo da família *Trypanosomatidae* e oferece diversas vantagens como: sistemas fáceis de genética reversa, incluindo um sistema eficiente de RNA de interferência (RNAi) e de expressão induzível de proteínas recombinantes; sistemas para a genética direta, onde epítomos e *tags* são facilmente integrado em locus endógeno usando um único passo de PCR (Lindemann e Kanous, 1997; Morris *et al.*, 2002; Oberholzer *et al.*, 2006).

## 2.4 Características moleculares dos tripanossomatídeos

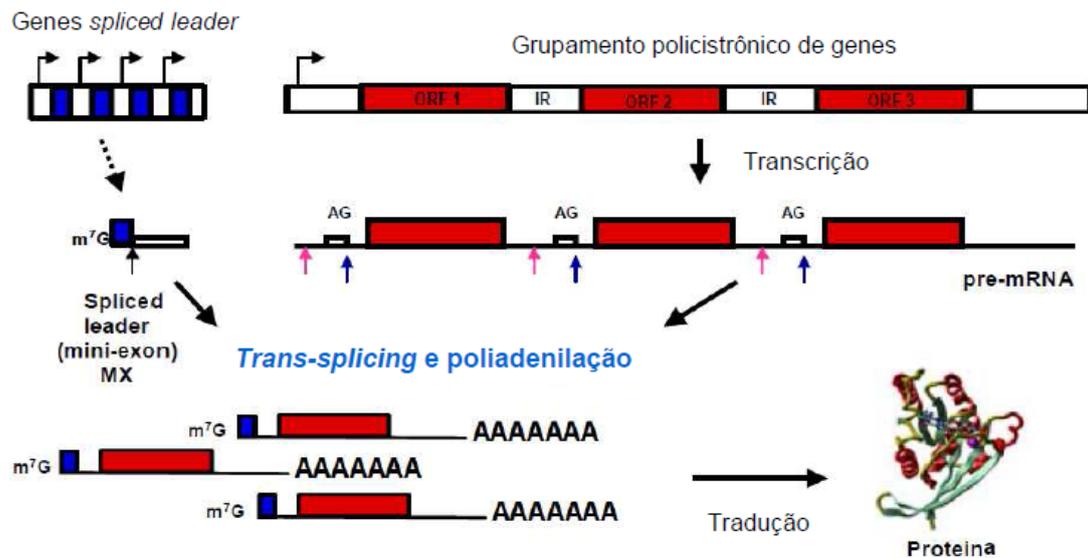
### 2.4.1 Organização genômica e processamento dos mRNAs

Os genomas de tripanossomatídeos estão organizados em grupamentos gênicos policistrônicos (PGCs). Esta organização gênica incomum foi observada pela primeira vez no cromossomo 1 de *L. major* (Myler *et al.*,1999), e com a publicação dos genomas completos de *L. major* (Ivens *et al.*,2005), *T. brucei* (El-Sayed *et al.*,2005) e *T. cruzi* (Berriman *et al.*,2005) foi possível observar que a maioria dos genes em todos os cromossomos dos tripanossomatídeos estão organizados em PGCs.

Ao contrário da maior parte dos eucariotos, a transcrição dos RNAs no tripanossomatídeos é policistrônica. A maioria dos cromossomos dos tripanossomatídeos contém, pelo menos, dois PGCs que podem ser transcritos na direção dos telômeros ou transcritos para longe dos telômeros, entretanto estes blocos gênicos não necessariamente codificam proteínas funcionalmente relacionadas. Os mRNAs maduros são gerados a partir dos transcritos primários por *trans-splicing* e poliadenilação. *Trans-splicing* é um processo que adiciona uma sequência de 39 nucleotídeos, conhecida como *spliced leader* (SL) ao cap na porção terminal 5' dos mRNAs (Figura 6) (Daniels *et al.*, 2010; Kooter e Borst ,1984; Liang *et al.*, 2003).

Todos os genes que fazem parte de um PGC são transcritos no mesmo nível, como consequência da transcrição policistrônica. No entanto, os mRNAs de genes adjacentes podem se mostrar em diferentes concentrações na célula. Isto ocorre devido a expressão dos genes nos tripanossomatídeos ser regulada principalmente no nível do processamento e da estabilidade do mRNA (Clayton,

2002; Haile e Papadopoulou, 2007; Wurst *et al.*, 2012). A síntese constitutiva do transcriptoma e seleção das mensagens certas apenas no passo da maturação provavelmente permite que o parasita mude a expressão dos genes rapidamente para sobreviver e se adaptar a um novo ambiente (Gomes *et al.*, 2010).



**Figura 6. Representação simplificada do processamento dos mRNAs em tripanossomatídeos.** Os RNAs são transcritos de forma policistrônica e sofrem o *trans-splicing* que adiciona uma pequena sequência chamada de spliced leader (SL), à extremidade 5'UTR do RNA policistrônico. A inserção da SL é determinada pelos nucleotídeos AG (**Seta Azul**), o sítio acceptor do SL. A poliadenilação adiciona uma sequência de adeninas à extremidade 3' UTR, em uma região rica em pirimidinas, cerca de 18 a 24 pares de base anteriores ao sítio acceptor do SL do gene seguinte (**Seta rosa**). **Fonte:** Jena Bioscience, 2015.

Outra peculiaridade na regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos é a escassez de promotores clássicos para RNA polimerase II (RNA pol II), o faz com que a regulação da sua expressão gênica não ocorra no nível da iniciação da transcrição, e sim quase que exclusivamente por mecanismos pós-transcricionais, no processamento ou tradução dos mRNAs (Bayele, 2009). Os únicos genes codificantes de proteínas reconhecidamente regulados no nível transcricional são aqueles que codificam as proteínas de

superfície de *T. brucei*, prociclinas e VSGs. Seus respectivos genes são transcritos pela RNA pol I, que em outros organismos é usada exclusivamente para a transcrição de DNA ribossomal (De Gaudenzi *et al.*, 2011; Clayton, 2014).

## **2.5 Iniciação da tradução em eucariotos**

A iniciação da tradução é a etapa mais complexa de todo o processo de síntese de proteínas e aquela mais sujeita a mecanismos de regulação, com impacto direto na expressão gênica nos organismos eucarióticos. Os eventos durante a iniciação da tradução podem ser divididos em:

### **Etapa 1: Formação do complexo de pré-iniciação 43S**

A iniciação da tradução em eucariotos começa com a formação do complexo de pré-iniciação 43S (PIC) contendo a subunidade ribossomal 40S, fatores de iniciação da tradução individuais (eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5) e o complexo ternário (eIF2-GTP-Met-tRNA<sub>i</sub>), formando um complexo maior que facilita o carregamento do iniciador metionil-tRNA (tRNA<sub>i</sub>) para a subunidade 40S.

### **Etapa 2: Ligação do complexo 43S ao mRNA e formação complexo de iniciação 48S.**

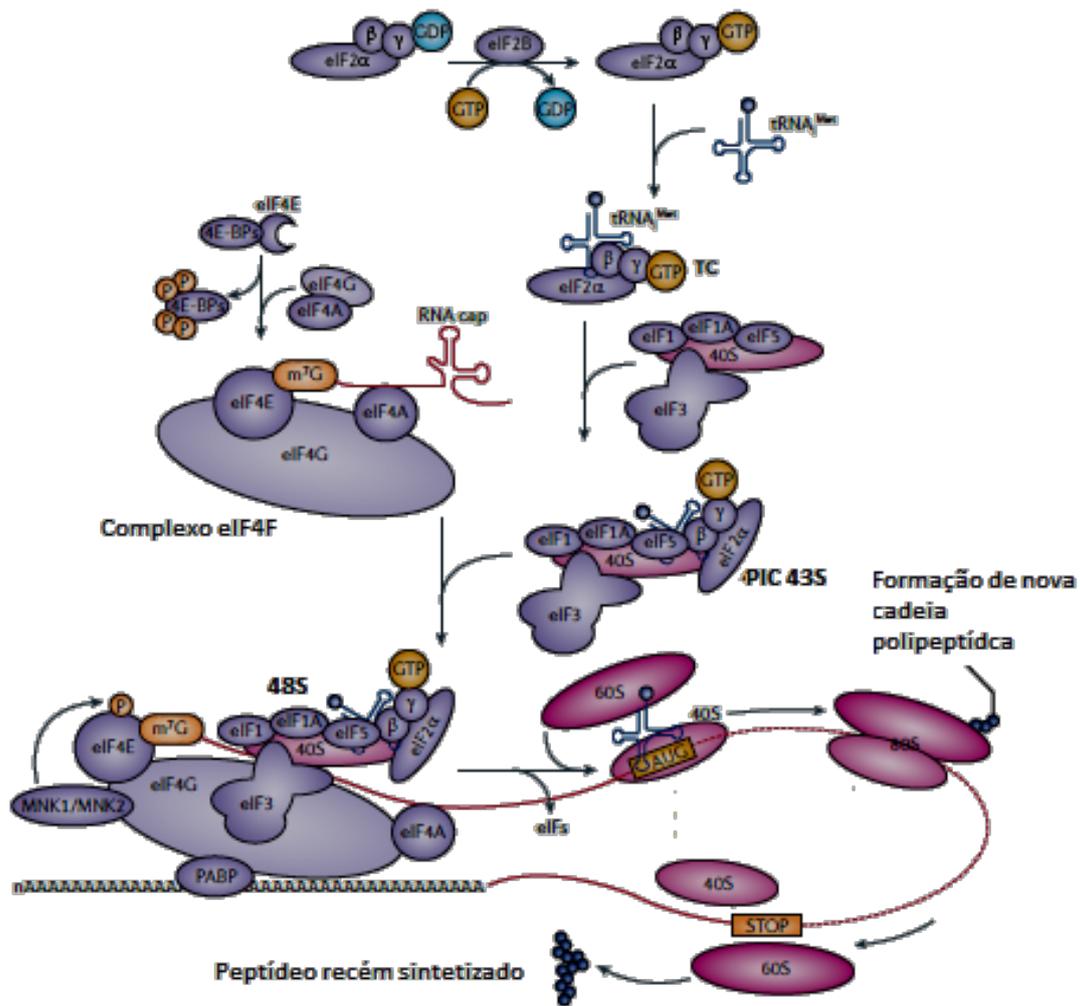
O complexo de pré-iniciação 43S liga-se ao cap na extremidade 5' do mRNA, com a colaboração do complexo eIF4F. Este é um complexo heterotrimérico formado pelas seguintes subunidades: eIF4E, também conhecida como proteína de ligação ao cap; eIF4A, com funções de RNA helicase e ATPase; e eIF4G, responsável pela interação com o eIF4E e o eIF4A, formando o complexo de iniciação 48S.

### **Etapa 3: Movimentação do complexo 48S**

Nesta etapa, ocorre então a movimentação do complexo 48S ao longo da região 5' não traduzida do mRNA até o códon AUG. Este sinaliza o início da sequência codificante, onde ocorre o pareamento de suas bases com as bases do anticódon do tRNA<sub>i</sub>. Nesta etapa, o papel do eIF4A é fundamental devido a sua atividade de helicase, que desfaz as estruturas secundárias do mRNA.

### **Etapa 4: Dissociação do complexo 48S e formação do complexo 80S.**

Por meio da ação do fator eIF5, que desencadeia a hidrólise do GTP-eIF2, ocorre a dissociação de grande parte dos fatores associados ao complexo 48S, permitindo que a subunidade ribossomal maior 60S seja recrutada para formação do ribossomo 80S, deixando o tRNA<sub>i</sub> no sitio P ribossomal. Esta última etapa é mediada pelo eIF5B e requer a hidrólise de mais uma molécula de GTP (Figura 7) (Aitken e Lorsch, 2012; Hinnebusch e Lorsch, 2012; Hinnebusch, 2014; Jackson *et al.*, 2010; Voigts-Hoffmann *et al.*, 2012).

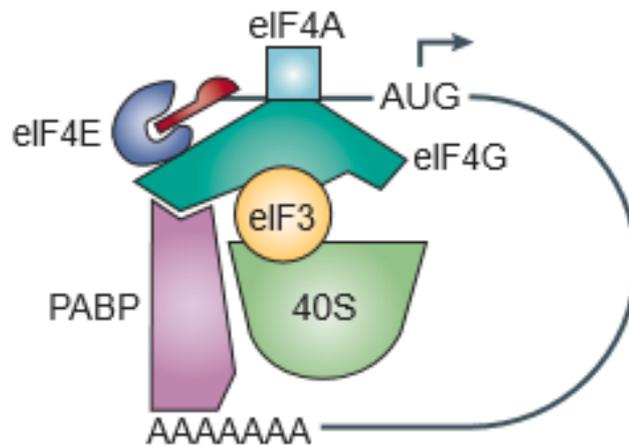


**Figura 7. Processo de formação do complexo de iniciação da tradução em eucariotos.** Ligação do complexo ternário a subunidade 40S ligada aos fatores eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5 e formação do complexo pré-iniciação 43S. Formação do complexo 48S e varredura do mRNA até o reconhecimento do códon AUG. Hidrólise do GTP por eIF5 e eIF5B, e formação do complexo 80S. **Adaptado de:** Bhat *et al.*, 2015.

## 2.6 O complexo eIF4F de iniciação da tradução e PABP

O complexo eIF4F, um dos vários fatores de tradução que auxiliam os ribossomos durante o processo de iniciação da tradução, é o principal responsável pelo recrutamento da subunidade 40S ribossomal à extremidade 5' dos mRNAs. Este complexo trimérico é formado pelas subunidades: eIF4E, eIF4A e eIF4G. A proteína de ligação a cauda poli-A (PABP), apesar de não ser considerada um fator de iniciação da tradução clássico, tem um papel de

destaque na iniciação da tradução, através da sua ligação ao mRNA e sua interação com a subunidade eIF4G (Figura 8) (Jackson *et al.*, 2010).



**Figura 8. Representação da ligação das subunidades do complexo eIF4F (eIF4A, eIF4E e eIF4G) e PABP a um mRNA maduro. Fonte: Holcik e Sonenberg, 2005.**

### 2.6.1 eIF4A

O eIF4A é uma RNA helicase ATP-dependente, pertencente à família DEAD-box. DEAD-box são RNA helicases que contêm o domínio DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) ou DExD/H (Asp-Glu-X-Asp-His). Estas proteínas partilham nove motivos altamente conservados na sequência de aminoácidos e estão envolvidas em quase todos os aspectos do metabolismo de RNA, incluindo a transcrição, biogênese ribossomal, o *splicing* de pré-mRNAs, exportação, tradução e a degradação do RNAs (Rogers *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2010).

Existem três parálogos do eIF4A em mamíferos, denominados de eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII, todos possuindo um elevado grau de similaridade na sua sequência de aminoácidos (Nielsen e Trachsel, 1988). As proteínas eIF4AI e

eIF4AII são citoplasmáticas, contudo, enquanto que o eIF4AIII é uma proteína nuclear. De fato, já foi demonstrado que o eIF4AIII interage mais fracamente com eIF4G quando comparado com seus parálogos (Nielsen e Trachsel, 1988; Li *et al.*, 1999; Chan *et al.*, 2004).

### 2.6.2 eIF4E

O fator eIF4E tem 25 kDa e apresenta a forma de mão em concha, sendo a parte côncava responsável pelo reconhecimento e ligação ao *cap* e a parte convexa, a que interage com o seu parceiro, eIF4G. Vários membros da família eIF4E foram identificados em diversos organismos, tais como: plantas, moscas, mamíferos, pássaros, anfíbios, nemátodos, peixes e vários protistas (Jagus *et al.*, 2012). Evolutivamente, um único gene eIF4E parece ter sido submetido a uma série de duplicações gênicas, gerando várias homólogos de eIF4E, sendo pelo menos um destes homólogos envolvido com a síntese proteica e os demais relacionados a outras funções (Rhoads, 2009).

Em mamíferos, o eIF4E é regulado pela fosforilação da serina 209 pelas quinases Mnk1 e Mnk2. Estas interagem com o eIF4G, através de seu domínio C-terminal, que funciona como sítio de ancoragem para as quinases, permitindo que as mesmas se posicionem próximas ao eIF4E. A atividade do eIF4E é regulada também pela ação das proteínas de ligação ao eIF4E ou 4E-BPs, as quais competem com o eIF4G pela ligação ao eIF4E, agindo como inibidores competitivos de interação eIF4E-eIF4G (Joshi *et al.*, 2005; Zinoviev *et al.*, 2011).

### **2.6.3 eIF4G**

O eIF4G recruta a subunidade ribossomal menor ao mRNA através de interações com o eIF4E e o complexo eIF3. Também promove a circularização do mRNA através da interação com a proteína de ligação ao poli A, a PABP (Marintchev *et al.*, 2009).

Em mamíferos, a família eIF4G é composta por três grandes proteínas (eIF4GI, eIF4GII e p97) que têm papéis críticos na iniciação da tradução *cap*-dependente e *cap*-independente. O eIF4G humano possui 1600 aminoácidos, divididos em três domínios definidos por padrões de clivagem por proteases virais. O segmento N-terminal inclui sítios de ligação ao eIF4E e PABP; o domínio central do eIF4G (MIF4G) é crítico para a montagem do mecanismo de tradução, pois abriga o sítio de ligação para eIF3 e o domínio HEAT, responsável pela ligação ao eIF4A. Outras isoformas do eIF4G incluem o domínio MIF4G, porém não possuem o domínio N-terminal, como por exemplo a proteína humana DAP5 de 97 kDa ou a variante do eIF4G em *Caenorhabditis elegans*. Estas proteínas estão envolvidas na produção de genes apoptóticos em condições de *stress* celular e DAP5 também é necessária para manter a sobrevivência das células durante a mitose (Bellsollell *et al.*, 2006; Marash *et al.*, 2008; Marintchev e Wagner, 2004).

### **2.6.4 A proteína de ligação ao poli A (PABP)**

Uma das mais importantes modificações pós-transcricionais é a poliadenilação, presente em todos os mRNAs de eucariotos (exceto nos mRNAs de histonas). A adição da cauda poliA na extremidade 3' do transcrito influencia no término da transcrição e é determinante para a estabilidade do mRNA. A PABP

atua como regulador central de destino do mRNA no citoplasma, coordenando a sua utilização e destruição (Brook *et al.*, 2009; Burgess *et al.*, 2010).

A PABP se liga simultaneamente cauda poliA do mRNA e interage com o complexo de tradução eIF4F, sendo essencial para circularização do mRNA, o que aumenta o recrutamento ribossômico e também protege o mRNA de degradação (Fabian *et al.*, 2010).

## **2.7 Fatores de iniciação da tradução em tripanossomatídeos**

Uma vez que a regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos é predominantemente pós-transcricional e que a tradução pode ter um papel crítico neste processo, alguns trabalhos vêm se detendo na caracterização funcional de homólogos das subunidades do eIF4F e da PABP no controle da expressão gênica de tripanossomatídeos.

### **2.7.1 EIF4A**

Até o momento foram descritos dois homólogos de eIF4A denominados EIF4AI e EIF4AIII, porém através de ensaios em *T. brucei* e em *L. major*, apenas o EIF4AI parece ter envolvimento na iniciação da tradução. Em *L. major*, o EIF4AI foi capaz de interagir com o domínio HEAT de homólogos do fator eIF4G (Dhalia *et al.*, 2005). Em *T. brucei*, essa proteína apresentou localização citoplasmática, e a redução no seu nível intracelular ou a redução de sua atividade de helicase reduziu drasticamente a síntese proteica. Diferentemente, o homólogo EIF4AIII tem localização nuclear e quando depletado por RNAi ou eliminada a sua função de helicase, não leva à diminuição imediata no crescimento celular, sugerindo que

sua função seja outra que não de fator da iniciação da tradução (Dhalia *et al.*, 2006).

### 2.7.2 EIF4E

As proteínas de ligação ao *cap* de tripanossomatídeos sofreram algumas adaptações estruturais durante a sua evolução para ajustar a ligação do *cap-4*, que é constituído por 2-O metilações na ribose nos quatro primeiros nucleotídeos da sequência *leader* (SL), e duas metilações na primeira adenosina e quarta uridina. Estas metilações são únicas do *cap* de tripanossomatídeos, não sendo conhecidas em outro grupo de eucariotos (Bangs *et al.*, 1992; Badjatia *et al.*, 2013; Perry *et al.*, 1987).

Os genomas de tripanossomatídeos codificam um total de seis isoformas de eIF4E denominadas de EIF4E1 a EIF4E6 (Dhalia *et al.*, 2005; Freire *et al.*, 2014a; Freire *et al.*, 2014b). Ensaio biofísicos de afinidade de ligação ao *cap-4* em *L. major*, mostraram que quatro deles, nomeados de *LeishIF4E-1* a *LeishIF4E-4*, variam em suas especificidades de ligação ao *cap* (m7GTP), onde os *LeishIF4E-1* e *LeishIF4E-4* se ligam ao *cap* e *cap-4* com afinidades comparáveis, *LeishIF4E-3* liga-se principalmente ao *cap* e dificilmente ao *cap-4*, enquanto *LeishIF4E-2* mostrou uma grande preferência para *cap-4* em comparação com m7GTP (Yoffe *et al.*, 2006;). Em *T. brucei*, o EIF4E3 se mostrou ser o único homólogo essencial à viabilidade celular, através de ensaios de RNAi (Freire *et al.*, 2011). Os EIF4E5 e EIF4E6 foram recentemente descritos e ainda estão sendo caracterizados, porém estudos em *T. brucei* observaram que ambos possuem a capacidade de se ligar ao *cap*, mas não são essenciais para a sobrevivência da célula (Freire *et al.*, 2014a; Freire *et al.*, 2014b).

### 2.7.3 EIF4G

Em tripanossomatídeos são descritos cinco homólogos de eIF4G, denominados de EIF4G1 a EIF4G5. Utilizando ensaios de interação proteína-proteína foi avaliada a capacidade de dois homólogos do EIF4G de se ligarem aos homólogos de EIF4E e EIF4A, observando-se a formação de dois complexos: um entre o EIF4G4 e o EIF4E3 e outro entre o EIF4G3 e o EIF4E4, ambos apresentando interação com o EIF4A1 (Dhalia *et al.*, 2005; Freire *et al.*, 2011).

Em ensaios de RNAi em *T. brucei*, foi observado que o silenciamento do EIF4G3 diminui tanto o crescimento das células quanto a síntese protéica, já o silenciamento do EIF4G4, apesar de também diminuir o crescimento celular, não demonstrou impacto significativo na tradução. As semelhanças nas sequências e estruturas de EIF4G3 e EIF4G4, contudo, são indicativas de duplicação gênica gerando dois complexos distintos do tipo eIF4F com funções distintas. É sugerido então que o complexo EIF4G3/EIF4E4, teria função principal na tradução e que o complexo formado por EIF4G4/EIF4E3 tenha um papel mais seletivo, como por exemplo, a tradução de mRNAs específicos (Moura *et al.*, 2015). Não se tem muita informação em relação aos demais homólogos EIF4G, entretanto foi observado que EIF4E5 interage com EIF4G1 e EIF4G2, enquanto que o EIF4E6 interage com EIF4G5 (Freire *et al.*, 2014a; Freire *et al.*, 2014b).

#### 2.7.4 A proteína de ligação ao poli A (PABP) de tripanossomatídeos

Três homólogos de PABP foram encontrados nas sequências do genoma de *L. major* (PABP1, PABP2 e PABP3), porém ortólogos de apenas as duas primeiras foram observadas em *T. cruzi* e *T. brucei*. Estudos destas proteínas em *Leishmania* indicam que apenas a PABP1 participa do complexo formado pelos EIF4G3/EIF4E4/EIF4AI, desempenhando funções na tradução. As PABPs 2 e 3 se ligam aos mesmos mRNAs, porém a mRNAs distintos daqueles onde a PABP1 se liga, o que sugere que estas proteínas possuem funções diferenciadas (da Costa Lima *et al.*, 2010).

Como já citado, em tripanossomatídeos já foram confirmados a formação de dois complexos distintos do tipo eIF4F: um complexo principal formado pelas subunidades EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI, o qual se liga à PABP1 e um outro complexo formado pelas subunidades EIF4E3/ EIF4G4/EIF4AI que não parece interagir com esse homólogo de PABP (Figura 9)(Freire *et al.*, 2011).

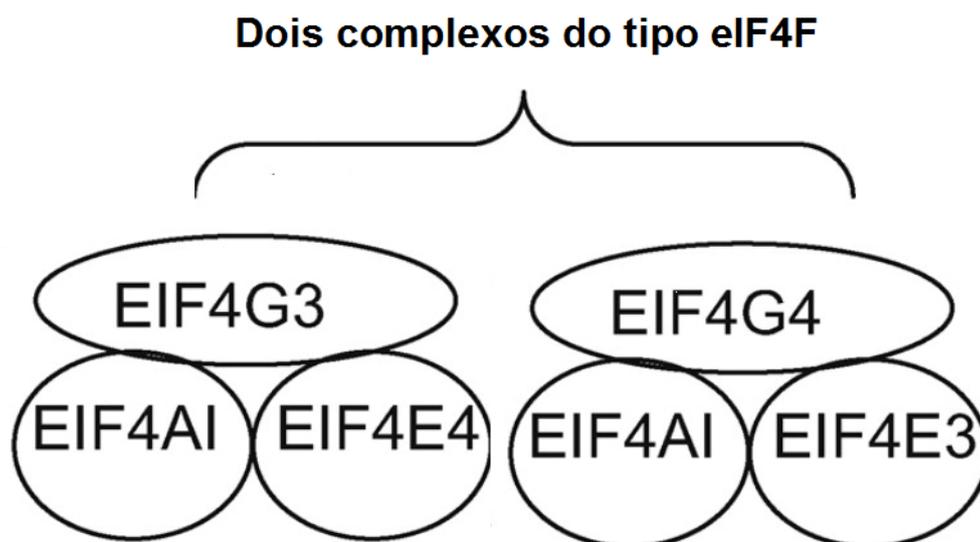


Figura 9. Dois diferentes complexos formados por diferentes subunidades do complexo eIF4F. Fonte: Pereira *et al.*, 2013.

## 2.8 Utilização de mRNAs repórter para avaliação funcional de fatores de tradução

Apesar de terem sido identificados diferentes homólogos de subunidades do complexo eIF4F, vários resultados sugerem uma distinção funcional entre eles e com vários destes apresentando propriedades não observadas em outros organismos (Freire *et al.*, 2014a; Freire *et al.*, 2014b). A falta de ensaios específicos que demonstrem a real função destes homólogos, contudo, constitui o principal entrave para se completar a sua caracterização funcional.

Para suprir tal necessidade, o desenvolvimento de um ensaio *in vivo* para a avaliação direta do efeito da superexpressão ou depleção destes homólogos pode ser a chave para identificação de sua real função na biossíntese protéica dos tripanossomatídeos, o que pode ser feito através da avaliação da tradução de um mRNA repórter. O uso de mRNAs repórter tem sido amplamente utilizado para estudo de proteínas envolvidas no metabolismo de RNAs, em diversas espécies, incluindo o estudo de fatores de iniciação da tradução em humanos (Lee e McCormick, 2006; Paek *et al.*, 2015) e também na investigação da expressão proteica em diferentes estágios celulares em *Caenorhabditis elegans* (Mendenhall *et al.*, 2015).

Trabalhos anteriores tentaram identificar a função de alguns homólogos de subunidades do complexo eIF4F como estimuladores ou inibidores da tradução a partir da utilização de uma linhagem de *T. brucei* expressando a enzima luciferase como repórter. Devido às características dos vetores plasmidiais utilizados, contudo, esta linhagem tornou-se bastante instável, com níveis de expressão irregulares com o passar do tempo (Moura, resultados não publicados). Entretanto,

com a disponibilidade de uma nova geração de vetores para transfecção e novas linhagens de *T. brucei* (Sunter *et al.*, 2012b), o desenvolvimento de um novo sistema repórter, mais eficiente e estável, poderá ser útil no estudo de proteínas envolvidas na iniciação da tradução. Abordagem semelhante foi descrita por Erben *et al.*, 2014, que identificou a participação de várias proteínas distintas no aumento da expressão de um mRNA repórter. Nesse sentido o presente trabalho buscou contribuir para caracterização funcional de fatores selecionados na iniciação da tradução em tripanosomatídeos, investigando o efeito da sua superexpressão na expressão da proteína repórter GFP.

### **3. Objetivos**

#### **3.1 Objetivo geral**

Contribuir para a caracterização funcional de homólogos selecionados de eIF4E, eIF4G e PABP de *Trypanosoma brucei*, identificando a ação destes fatores como estimuladores ou inibidores da biossíntese proteica, a partir da avaliação do efeito deles sobre a expressão de um mRNA repórter.

#### **3.2 Objetivos específicos**

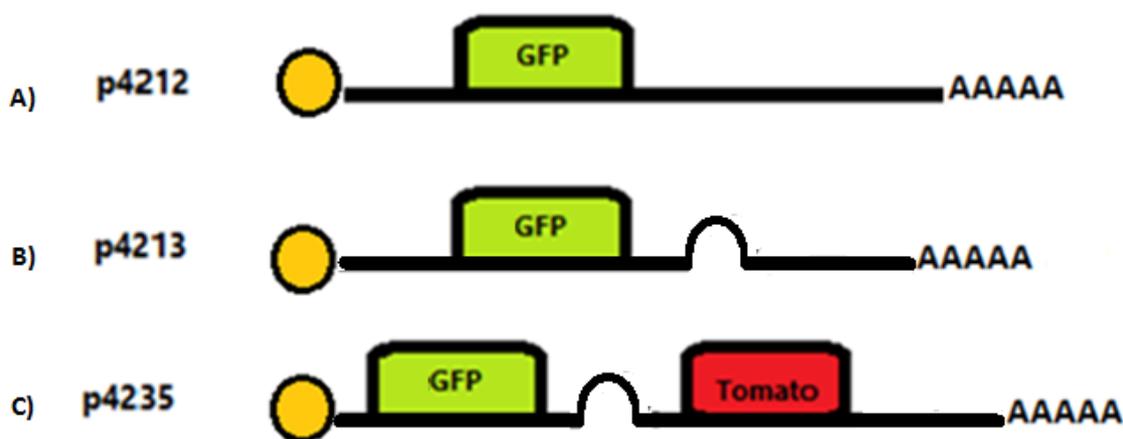
- Obter linhagens de *T. brucei* com expressão estável de um mRNA repórter que codifica a GFP (*Green Fluorescent Protein*);
- Obter culturas de *T. brucei* expressando diferentes homólogos de fatores de iniciação da tradução (complexo eIF4F e PABP), transfectadas em linhagens expressando o mRNA repórter;
- Avaliar a influência da expressão das proteínas sobre o crescimento e níveis de expressão de GFP, durante a superexpressão das proteínas selecionadas para o estudo.

## 4. Material e Métodos

### 4.1 Construções plasmidiais

#### 4.1.1 Vetor para expressão dos mRNAs repórter

Os vetores plasmidiais utilizados neste trabalho são derivados dos vetores p3605 e p3227 (Sunter *et al.*, 2012a), os quais possuem o gene de resistência ao antibiótico G418. Modificações no vetor p3605 deram origem aos vetores p4212 e p4213, os quais permitem a expressão constitutiva da proteína fluorescente GFP em *T. brucei*. O p4213 possui ainda uma estrutura em grampo (BoxB) na porção 3'-UTR do mRNA. O vetor p4235 é derivado do p3227 e permite a expressão induzível de um mRNA bicistrônico, contendo a região codificadora de GFP, seguida de uma região intergênica contendo a mesma estrutura em grampo BoxB, seguida da região codificadora da proteína fluorescente vermelha sTomato (Figura 10).



**Figura 10. Esquema representativo dos mRNAs repórter.** A) Esquema do mRNA monocistrônico codificante para proteína GFP e sem o grampo na região 3' B) Esquema do mRNA monocistrônico codificante para proteína GFP contendo o grampo na região 3' e em C) Representação do mRNA bicistrônico codificante para as proteínas GFP e sTomato contendo o grampo na região 3' entre as sequências.

#### 4.1.2 Plasmídeos para expressão dos homólogos do complexo eIF4F de tripanossomatídeos

Os plasmídeos da série pD foram desenvolvidos em trabalho anterior (Moura, 2011; Moura, dados não publicados) e se encontravam disponíveis no laboratório (Tabela 2). Esses plasmídeos permitem a fusão das proteínas em estudo à sequência do peptídeo  $\lambda$ N-(1-22), uma sequência de 22 aminoácidos provenientes do antiterminador transcricional do bacteriófago  $\lambda$  que serve como sistema de recrutamento artificial de mRNAs (Eckhardt *et al.*, 2011). Esta sequência está fusionada ao epítopo TY, o qual facilita o reconhecimento posterior das proteínas produzidas por anticorpos monoclonais. Estes plasmídeos possuem marca de resistência ao antibiótico blastidina, uma região codificante para o operador de tetraciclina e região de integração no *locus* da tubulina.

**Tabela 2. Relação dos plasmídeos utilizados para superexpressão dos homólogos dos fatores selecionados.**

Plasmídeos	Descrição
pD2	Proteína de fusão $\lambda$ N-(1-22)+TY+EIF4G3
pD5	Proteína de fusão $\lambda$ N-(1-22)+TY+EIF4G4
pD8	Proteína de fusão $\lambda$ N-(1-22)+TY+EIF4E1
pD9	Proteína de fusão $\lambda$ N-(1-22)+TY+EIF4E2
pD10	Proteína de fusão $\lambda$ N-(1-22)+TY+EIF4E3
pD11	Proteína de fusão $\lambda$ N-(1-22)+TY+EIF4E4
pD22	Proteína de fusão $\lambda$ N-(1-22)+TY+EIF4E4 Mutante W279A
pD23	Proteína de fusão $\lambda$ N-(1-22)+TY+PABP1

## 4.2 Cultivo de células de *Trypanosoma brucei*

Formas procíclicas de *T. brucei* da linhagem 4106 (Sunter *et al.*, 2012a) foram cultivadas em meio SDM-79 (Gibco), suplementado com 10% de soro fetal bovino e solução de ampicilina/estreptomicina (Sigma), na temperatura de 27°C. Para a manutenção do transgene do repressor de tetraciclina (o qual controla a indução das proteínas de interesse) na linhagem 4106, foi adicionado ao meio SDM-79 o antibiótico puromicina (10 µg/mL). Os parasitas foram monitorados por microscopia óptica e contados em câmara de Neubauer.

## 4.3 Transfecção de *T. brucei*

Para as transfecções, alíquotas de  $2 \times 10^7$  células procíclicas de *T. brucei*, da linhagem 4106, em fase exponencial, foram centrifugadas a 3000 g por 10 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 5 mL de tampão ZPFM [NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Mg(CH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub> 0,5 mM e Ca(CH<sub>2</sub>COO)<sub>2</sub> 0,09 mM], centrifugadas nas condições citadas anteriormente e o sobrenadante desprezado. As células foram então ressuspedidas em 450µL de tampão ZPFM, juntamente com 20 µg de DNA plasmidial previamente linearizado com a enzima *Not I*. O conjunto foi submetido à eletroporação, utilizando-se o aparelho *BioRad Gene Pulser II*, com cuveta de 4 mm, pulso de 1,5 kV e 25µF de capacitância. Em seguida, os parasitas foram transferidos para 4,5 mL do meio SDM-79, suplementado com 10% de soro fetal bovino, e mantidos a 27°C por 24 horas para recuperação.

Após a recuperação, foi acrescentado o antibiótico de seleção: G418 (15 µg/mL) para os plasmídeos das linhagens reporter (p4212, p4213 e p4235); e blastomicina (10 µg/mL) para os plasmídeos da série pD. As células foram

submetidas também à seleção clonal através de diluição limitante em placas de cultura de 24 poços. A seleção ocorreu num período de 07 a 10 dias.

Três clones foram selecionados para avaliação do sucesso da transfecção e para as análises por citometria de fluxo, enquanto que um clone representativo de cada foi utilizado nos experimentos de curva de crescimento e análises por *Western blot*.

#### **4.4 Indução da expressão dos transgenes**

As linhagens obtidas após as transfecções foram diluídas e mantidas em fase exponencial de crescimento ( $2$  a  $8 \times 10^6$  cels/mL), e a seguir foram induzidas com tetraciclina (TET) ( $1$  ug/ mL) para expressão dos transgenes. O efeito sobre a expressão do repórter foi observado após 24 e 48 horas de indução, inicialmente avaliado em microscópio de fluorescência e, em seguida, em citômetro de fluxo. A análise de crescimento e de expressão das proteínas de fusão se deu durante 96 horas, através de contagem em câmara de Neubauer e por *Western blot*.

#### **4.5 Citometria de fluxo**

Após indução da expressão das proteínas em estudo pela adição de tetraciclina, amostras independentes de cada linhagem foram analisadas quanto à expressão da GFP em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD Biosciences), utilizando o laser 488 nm (canal FL1), sendo avaliadas  $2 \times 10^5$  células por experimento. Três clones de cada linhagem foram testados. Os resultados foram analisados através do software FlowJo versão 10.0.6, e a significância destes resultados foram determinadas aplicando-se o teste ANOVA one way com

intervalo de confiança de 95% ( $p < 0.05$ ), utilizando-se o software Graph Pad Prism 5<sup>®</sup>.

#### **4.6 Microscopia confocal**

A partir de uma cultura em fase exponencial de crescimento, os protozoários foram centrifugados a 3000 *g* por 10 minutos, lavados e ressuspensos em PBS estéril. Para a observação da fluorescência, 1  $\mu$ L das amostras foi colocado em lâminas com lamínulas e visualizadas no microscópio confocal Leica SPII-AOBS, utilizando o laser HeNe 488nm. As imagens foram adquiridas e processadas através do software Leica Application Suite Lite 2.6 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany).

#### **4.7 Curvas de crescimento**

O perfil de crescimento dos parasitas foi avaliado através de contagem em câmara de Neubauer. Para isto, as culturas de parasitas foram diluídas para a concentração inicial de  $5 \times 10^5$  céls/ml, estas culturas foram acompanhadas a cada 24 horas até 96 horas. Estas alíquotas foram utilizadas para a produção de extratos proteicos totais, sendo as células coletadas através de centrifugação durante 10 minutos (3000 *g* a 4°C), lavadas com PBS e o sedimento ressuspendido em tampão de proteína SDS-desnaturante. Os extratos foram fracionados em SDS-PAGE e utilizados nos experimentos de *Western blot* com os soros contra as diferentes proteínas alvo.

#### **4.8 Western blot**

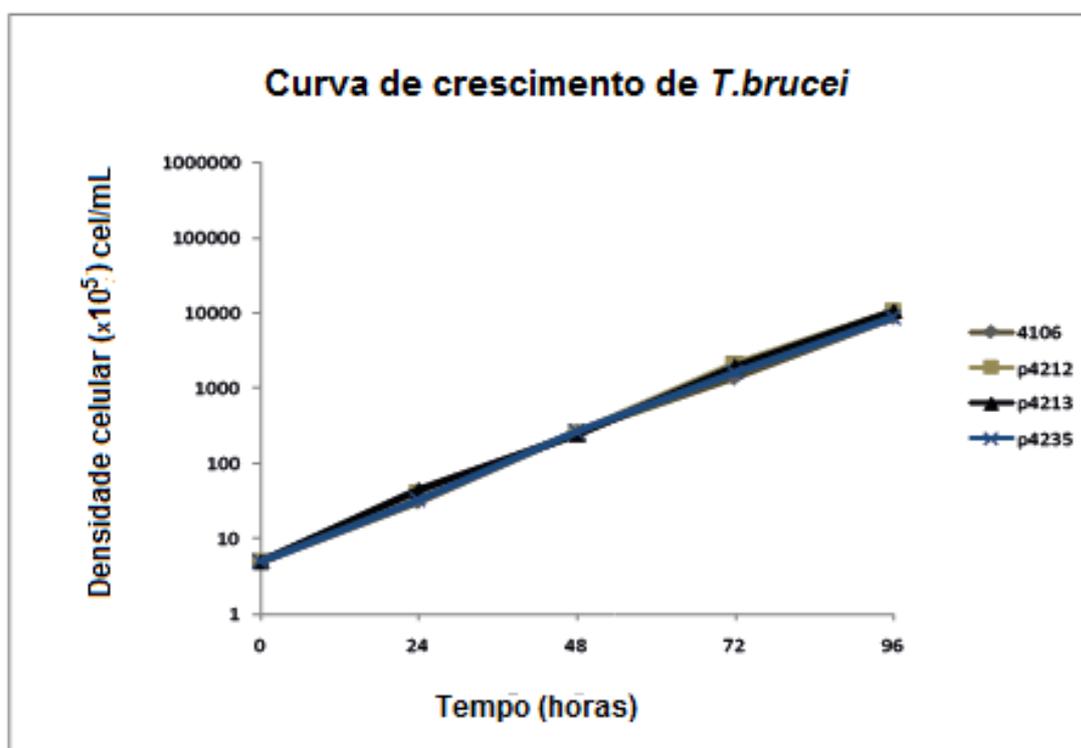
Os extratos proteicos foram fracionados em SDS-PAGE 15% ( $2,5 \times 10^6$ ) e transferidos para membrana de PVDF (Immobilon-P – Millipore®). A membrana foi bloqueada em solução de leite 5% em TBS-Tween 20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,5) a temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, a membrana foi incubada com os anticorpos contra as proteínas de interesse: anticorpo comercial anti-GFP® (Invitrogen) na diluição de 1: 5000, anticorpos monoclonais anti-TY BB2 na diluição 1: 200 ou anti-Bip na diluição de 1:80.000 por 1 hora em solução de leite 5% em TBS-Tween 20. Após três lavagens de 10 minutos com solução de leite 5% TBS-Tween 20, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase na diluição de 1:3000 (para o anti-TY BB2) ou anti IgG de coelho conjugado com peroxidase na diluição de 1:10.000 (para os anticorpos anti-Bip e anti-GFP®), na mesma solução que a incubação anterior por 1 hora, seguida de novas lavagens com TBS-Tween.

A membrana foi então incubada em solução quimioluminescente composta por luminol (1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1M, pH 8,5), iodofenol para uma concentração final de 0,4 mM e de peróxido de hidrogênio para 0,03%, durante 2 minutos. Após secagem em papel filtro, a membrana foi exposta a filme autorradiográfico e revelada em solução Dektol 1:2 (Kodak®) até saturação, por cerca de 3 minutos. A reação foi interrompida com ácido acético, por 1 minuto e fixada em solução fixadora por 2 minutos.

## 5. Resultados

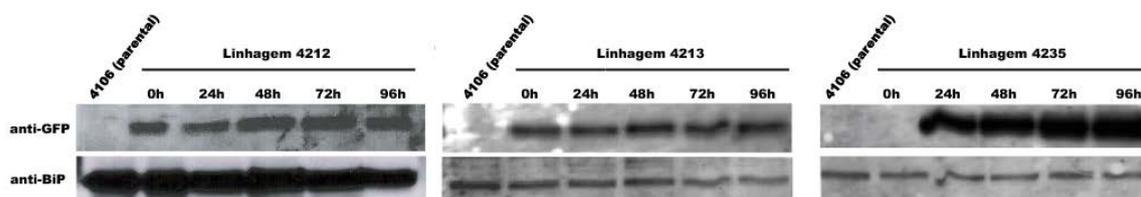
### 5.1 Análise das linhagens de *T. brucei* expressando GFP

Após linearização dos plasmídeos p4212, p4213 e p4235 com a enzima *Not* I, células procíclicas de *T. brucei* da linhagem 4106 foram transfectadas e selecionadas, e as linhagens obtidas foram denominadas, respectivamente, de 4212, 4213 e 4235. A partir destas linhagens, foram realizadas curvas de crescimento (até 96 horas a partir do repique), onde foram coletados extratos celulares (Figura 11), os quais foram usados em ensaios de *Western blot*. Os perfis das curvas de todas as novas linhagens foram bem similares à linhagem controle 4106, indicando que a presença dos vetores de expressão não afetou o crescimento celular.



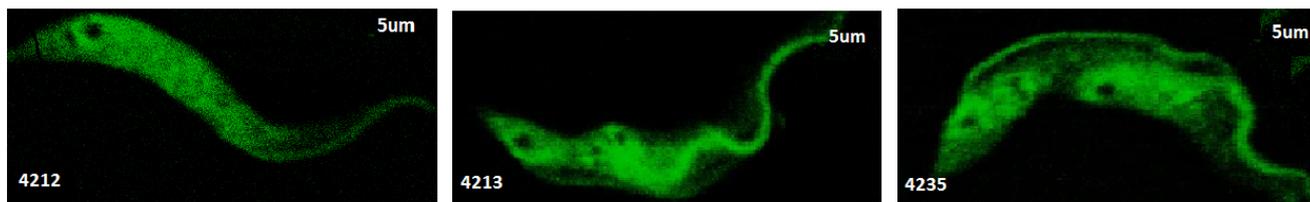
**Figura 11. Obtenção das linhagens repórter com expressão de GFP.** Curvas de crescimento das linhagens repórter 4212, 4213 e 4235.

Ensaio de *Western blot* foram em seguida realizados para confirmação da expressão de GFP ao longo de todo ciclo das células em meio de cultura. Foi possível confirmar a expressão do repórter em todas as culturas (Figura 12), e é possível observar também que as linhagens 4212 e 4213, de expressão constitutiva, apresentam padrão de expressão de GFP semelhante, visto que ambos os vetores possuem a mesma 3' UTR de actina, enquanto que a linhagem induzível 4235 apresenta uma expressão de GFP mais elevada. Esse vetor apresenta uma parte da sequência *spliced-leader* de *T. brucei*, além de possuir a 3' UTR da proteína paraflagelar do parasita, o que gera um nível maior de expressão. Ao longo de todo o trabalho, a proteína BiP (*Binding protein*), que é uma proteína chaperona de expressão constitutiva (Nuttall *et al.*, 2003), foi utilizada como controle da quantidade de células aplicadas em cada poço.



**Figura 12. *Western blot* para confirmação da expressão da proteína GFP nas células das linhagens 4212, 4213 e 4235.** O extrato proteico total foi utilizado para a eletroforese em gel SDS-PAGE 15% e para o *Western blot*, avaliado com anticorpos contra as proteínas GFP e BiP. A linhagem 4106 foi utilizada como controle negativo, e a proteína Bip foi utilizada como controle da quantidade de células aplicada nos poços.

Análises por microscopia confocal utilizando as células das linhagens repórter mostram a presença da GFP em todas as linhagens obtidas e também a sua localização que é distribuída ao longo de toda a célula (Figura 13).



**Figura 13. Confirmação da expressão de GFP nas linhagens 4212, 4213 e 4235.** Imagens obtidas por microscopia confocal de fluorescência mostrando a presença de GFP nas células prociclícas de *T. brucei*.

A citometria de fluxo foi então utilizada com intuito de se avaliar a emissão de fluorescência nas populações de células de *T. brucei* analisadas e também para quantificação da expressão da GFP em cada linhagem. As células viáveis foram identificadas com base nas propriedades físicas de dispersão da luz, utilizando os parâmetros FSC (*forward scatter* - relativo ao tamanho da célula) e SSC (*side scatter* – referente à granulosidade da célula) e a intensidade de fluorescência através do canal FL1. A linhagem 4106 foi utilizada como controle negativo, permitindo a determinação da porcentagem de parasitos fluorescentes em comparação com o perfil gerado pela linhagem selvagem. É possível observar aumento da porcentagem de células fluorescentes nas linhagens contendo o repórter (quadrante Q3), quando comparados ao controle sem nenhuma marcação (4106), onde a maior parte das células se encontra no quadrante Q4 (Figura 14).

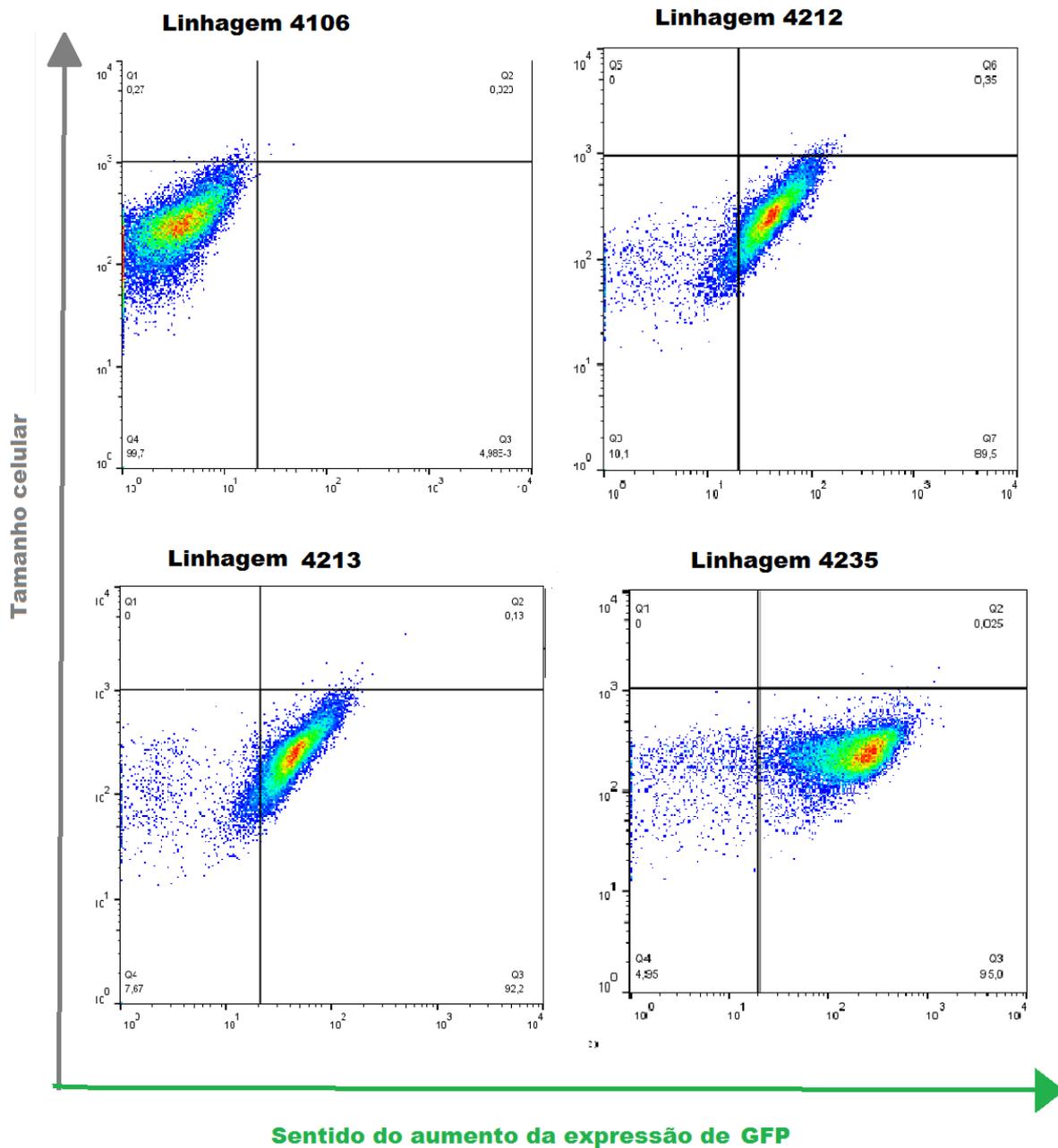


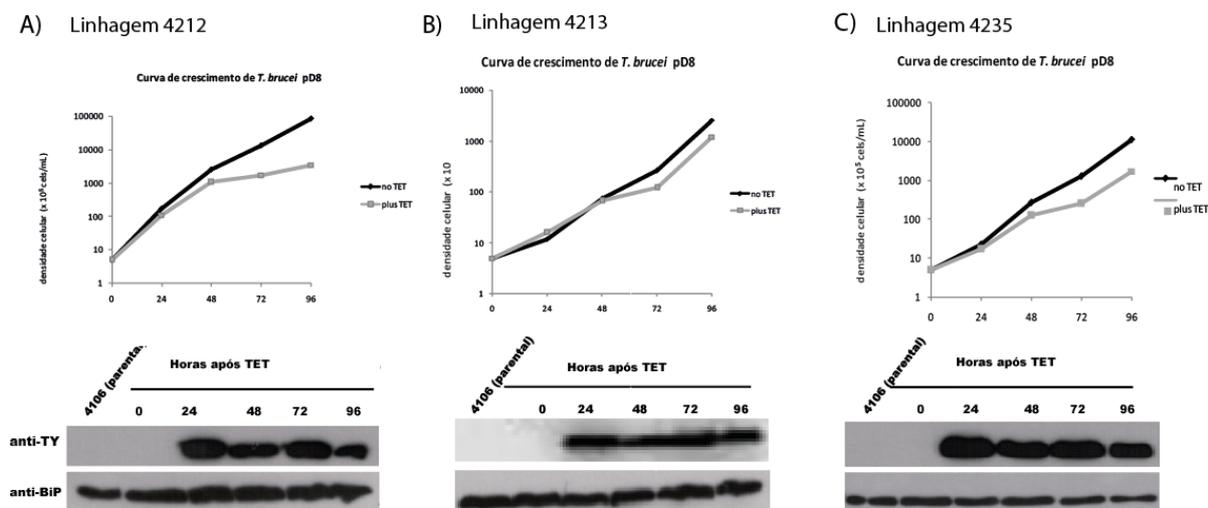
Figura 14. Análise por citometria de fluxo, confirmando a expressão de GFP nas linhagens repórteres. Em A) Linhagem 4212, em B) Linhagem 4213 e, em C) Linhagem 4235.

## **5.2 Avaliação dos efeitos da superexpressão de homólogos das subunidades do complexo EIF4F e PABP sobre o crescimento de *T. brucei***

Após obtenção das linhagens repórter expressando a proteína GFP de forma constante, estas foram transfectadas com os plamídeos para a superexpressão das proteínas EIF4E1, EIF4E2, EIF4E3, EIF4E4, EIF4E4<sub>W279A</sub>, EIF4G3, EIF4G4 e PABP1, todas fusionadas ao peptídeo  $\lambda$ N-(1-22) e ao epítipo TY. Após transfecção e seleção, as culturas foram induzidas com tetraciclina por 96 horas para avaliação do crescimento e obtenção de extratos celulares para Western *blot*, porém o perfil de expressão de GFP foi avaliado logo nas primeiras 48 horas após a indução, por citometria de fluxo.

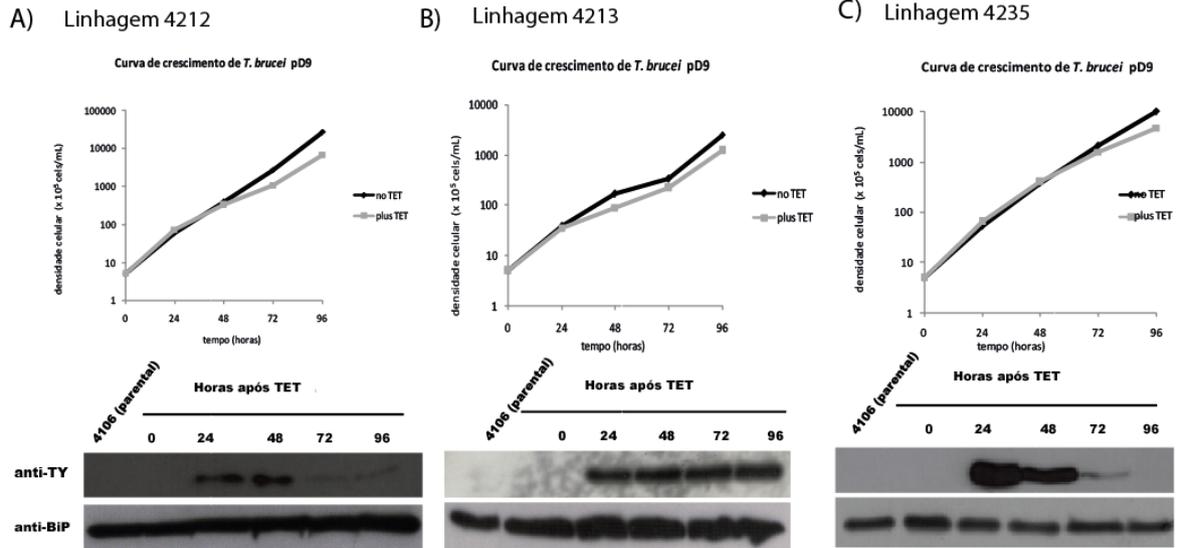
### **5.2.1 Efeito da expressão de homólogos de eIF4E no crescimento de *T. brucei***

Um estudo anterior havia demonstrado que a depleção de EIF4E1 por RNAi, resultava numa diminuição de crescimento celular, sem levar à morte do parasita, demonstrando que, apesar de não ser essencial para viabilidade celular, este fator pode desempenhar outras funções relacionadas à viabilidade celular (Freire *et al.*, 2011). Das células superexpressando o EIF4E1, a indução nas linhagens 4212 e 4235 demonstraram um crescimento reduzido após 24 horas quando comparado ao controle não induzido (Figura 15 A e C). Já no caso da linhagem 4213 (Figura 15 B) se observou redução de crescimento a partir de 48 horas, nas mesmas condições. A avaliação dos extratos celulares utilizando anticorpo anti-TY confirmou a superexpressão de EIF4E1 em todas as linhagens durante todo o período da curva.



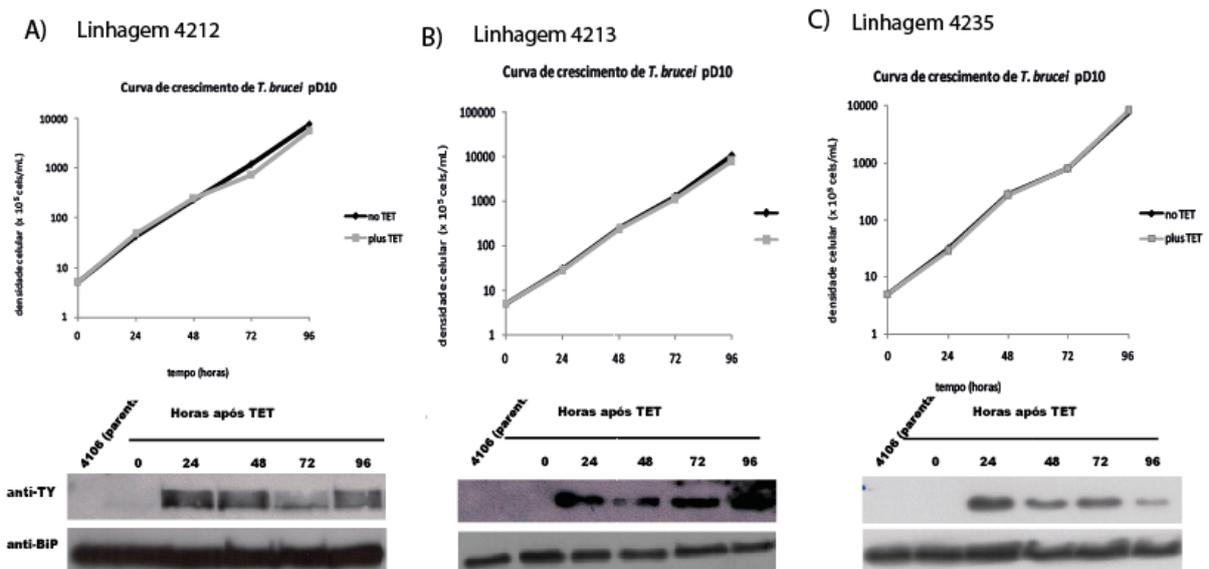
**Figura 15. Curvas de crescimento e *Western blot* mostrando o efeito da expressão do EIF4E1 no crescimento das linhagens de A) 4212, B) 4213 e C) 4235 de *Trypanosoma brucei*.**

Em relação ao EIF4E2, dados de Freire *et al.*, 2011, não mostraram nenhum efeito no crescimento celular após sua depleção via RNAi, mostrando que este fator não é essencial para a viabilidade celular. Quanto à superexpressão de EIF4E2, as células das três linhagens apresentaram uma discreta diminuição do crescimento após indução, quando comparado ao controle não induzido. Na avaliação dos extratos por *Western blot* é possível notar a presença da proteína, porém nas linhagens 4212 e 4235 (Figura 16 A e C) a proteína diminui a sua expressão a partir de 72 horas, enquanto que a linhagem 4213 (Figura 16 B) expressa durante todo o período da curva.



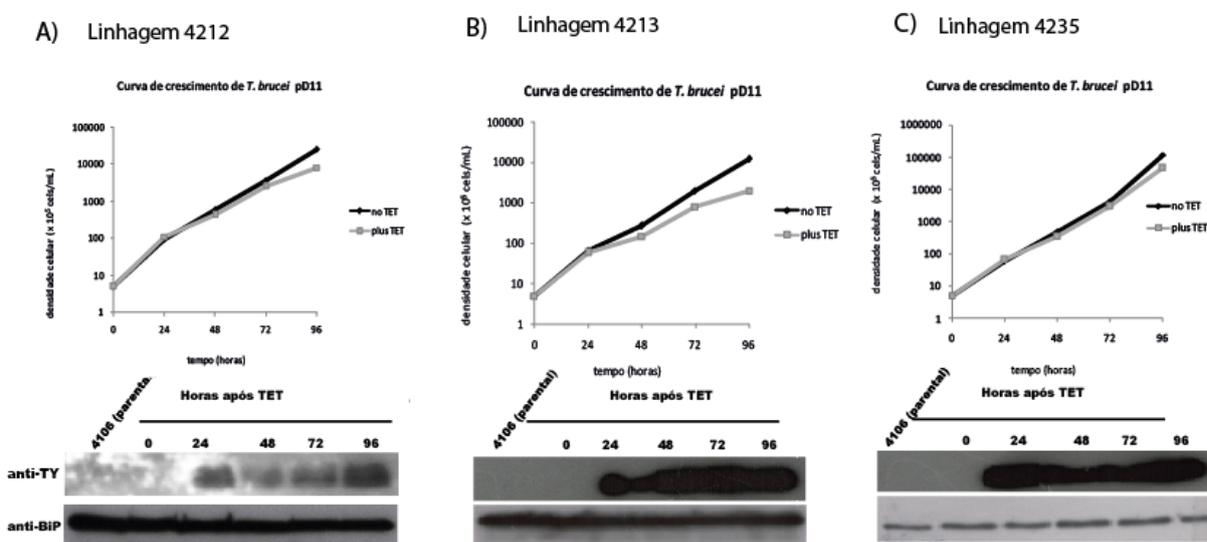
**Figura 16. Curvas de crescimento e *Western blot* mostrando o efeito da expressão do EIF4E2 no crescimento das linhagens de A) 4212, B) 4213 e C) 4235 de *Trypanosoma brucei*.**

Dados anteriores mostraram que o EIF4E3 é um homólogo essencial para a viabilidade celular de *T. brucei* e que possui papel relevante na síntese de proteínas *de novo* (Freire *et al.*, 2011). As linhagens superexpressando EIF4E3 demonstraram perfil de crescimento semelhante ao controle. Todas as linhagens tiveram resultados similares quanto à expressão do EIF4E3 (Figura 17).



**Figura 17. Curvas de crescimento e *Western blot* mostrando o efeito da expressão do EIF4E3 no crescimento das linhagens de A) 4212, B) 4213 e C) 4235 de *Trypanosoma brucei*.**

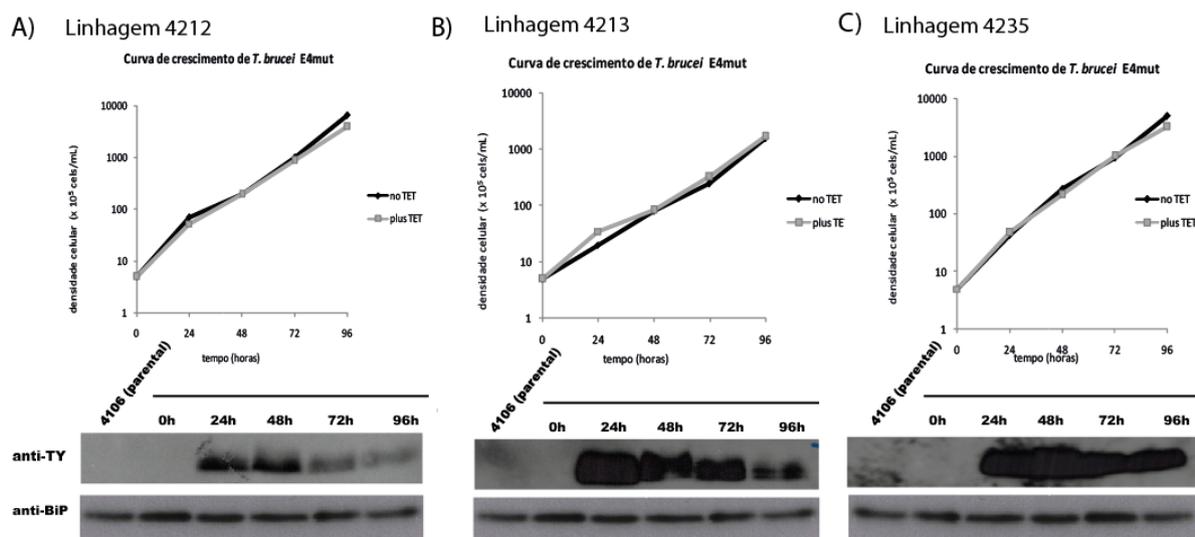
De acordo com a literatura, vários autores sugerem que o complexo formado pelo EIF4E4 com o EIF4G3 e o EIF4A1 é um dos prováveis complexos eIF4F ativos na tradução em tripanossomatídeos. As linhagens superexpressando EIF4E4 demonstraram perfil de crescimento com uma leve diminuição do crescimento comparado ao controle e foi observada a expressão de EIF4E4 durante o período analisado, em todas as linhagens (Figura 18).



**Figura 18. Curvas de crescimento e *Western blot* mostrando o efeito da expressão do EIF4E4 no crescimento das linhagens de A) 4212, B) 4213 e C) 4235 de *Trypanosoma brucei*.**

Quanto às linhagens expressando EIF4E4<sub>W279A</sub> (Figura 19), não houve alteração do crescimento celular em relação ao controle, porém houve decréscimo na expressão da proteína mutante EIF4E4<sub>W279A</sub> ao longo da curva, em todas as linhagens, sendo mais bem observado nas amostras de 72 e 96 horas, podendo ser resultante de uma maior instabilidade da proteína mutante. O mutante EIF4E4<sub>W279A</sub> de *T. brucei* é equivalente ao utilizado na abordagem feita por de Melo Neto *et al.*, 2015, que identificaram na sequência de aminoácidos do EIF4E4 de *L. infantum* motivos envolvidos com a ligação ao EIF4G3. Em *L.*

*infantum*, uma mutação no W279 do EIF4E4 aboliu totalmente a interação entre esta proteína e o EIF4G3 em ensaios de *pull down*, porém em estudos de complementação foi demonstrado que esta interação não é essencial para a viabilidade do parasita.

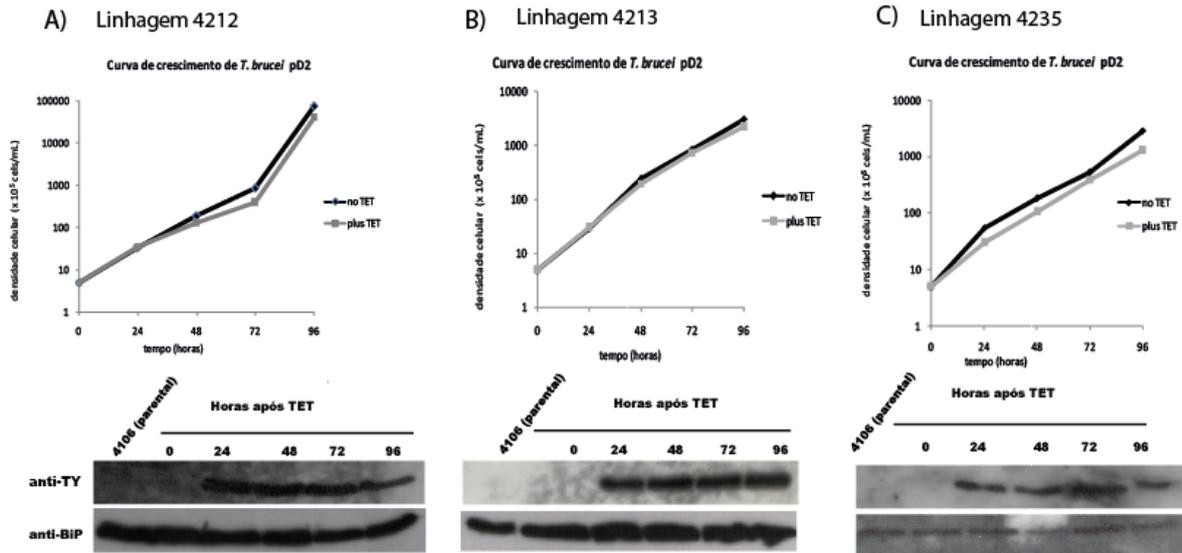


**Figura 19. Curvas de crescimento e *Western blot* mostrando o efeito da expressão do EIF4E4<sub>W279A</sub> no crescimento das linhagens de A) 4212, B) 4213 e C) 4235 de *Trypanosoma brucei*.**

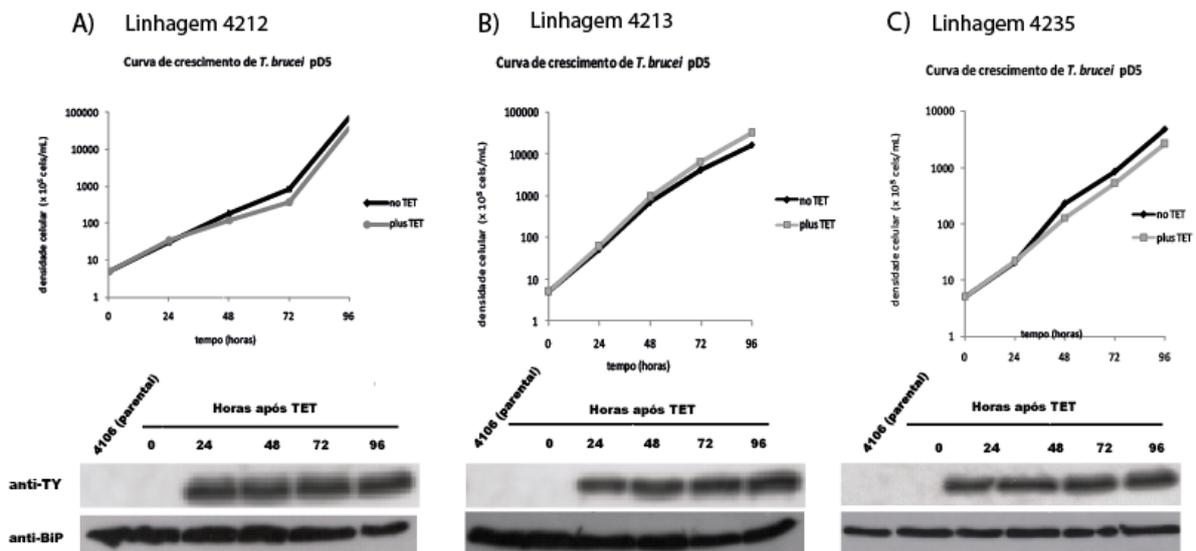
### 5.2.2 Efeito da expressão de EIF4G3 e EIF4G4 no crescimento de *T. brucei*

Os EIF4G3 e EIF4G4 participam de dois complexos do tipo eIF4F em tripanossomatídeos. Através de dados de RNAi verificou-se que ambos os homólogos são essenciais para a viabilidade celular dos parasitas, e o silenciamento do EIF4G4 levou a mudanças na morfologia, mas nenhuma inibição substancial da tradução. Estes resultados sugerem que o complexo formado por EIF4G4/EIF4E3 possui um papel seletivo na tradução, como por exemplo, a tradução de mRNAs específicos, e que o complexo EIF4G3/EIF4E4, teria função principal na tradução (Moura *et al.*, 2015).

Nas linhagens superexpressando EIF4G3 ou EIF4G4 aqui analisadas, não foram observadas grandes alterações no crescimento celular, com exceção de um pequeno decréscimo observado na linhagem 4235 para ambas as proteínas. O perfil de expressão destas proteínas se manteve constante durante toda a curva (Figuras 20 e 21).



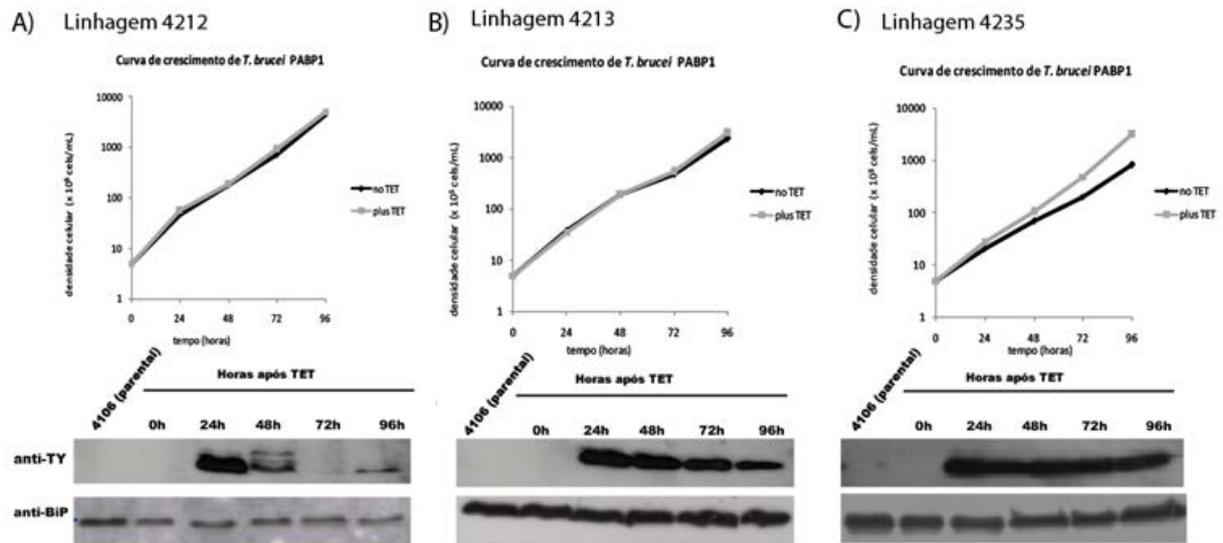
**Figura 20. Curvas de crescimento e *Western blot* mostrando o efeito da expressão do EIF4G3 no crescimento das linhagens de A) 4212, B) 4213 e C) 4235 de *Trypanosoma brucei*.**



**Figura 21. Curvas de crescimento e *Western blot* mostrando o efeito da expressão do EIF4G4 no crescimento das linhagens de A) 4212, B) 4213 e C) 4235 de *Trypanosoma brucei*.**

### 5.2.3 Efeito da expressão de PABP1 no crescimento de *T. brucei*

Ensaio anteriores indicam que a PABP1, participa do complexo principal formado pelo EIF4G3/EIF4E4/EI4AI desempenhando as funções já definidas para PABP na tradução (da Costa Lima *et al.*, 2010). Neste trabalho, as linhagens 4212 e 4213 superexpressando PABP1 demonstraram perfil de crescimento semelhante em relação ao controle (Figura 22 A e B) e ambas demonstraram um perfil de expressão da PABP1 semelhante, com a sua expressão decaindo ao longo da curva, principalmente na linhagem 4212 nas amostras de 72 e 96 horas (Figura 22 A). A linhagem 4235 apresentou um crescimento maior em relação ao controle, e seu perfil de expressão da PABP1 se manteve constante ao longo da curva (Figura 22).



**Figura 22. Curvas de crescimento e *Western blot* mostrando o efeito da expressão de PABP1 no crescimento das linhagens de A) 4212, B) 4213 e C) 4235 de *Trypanosoma brucei*.**

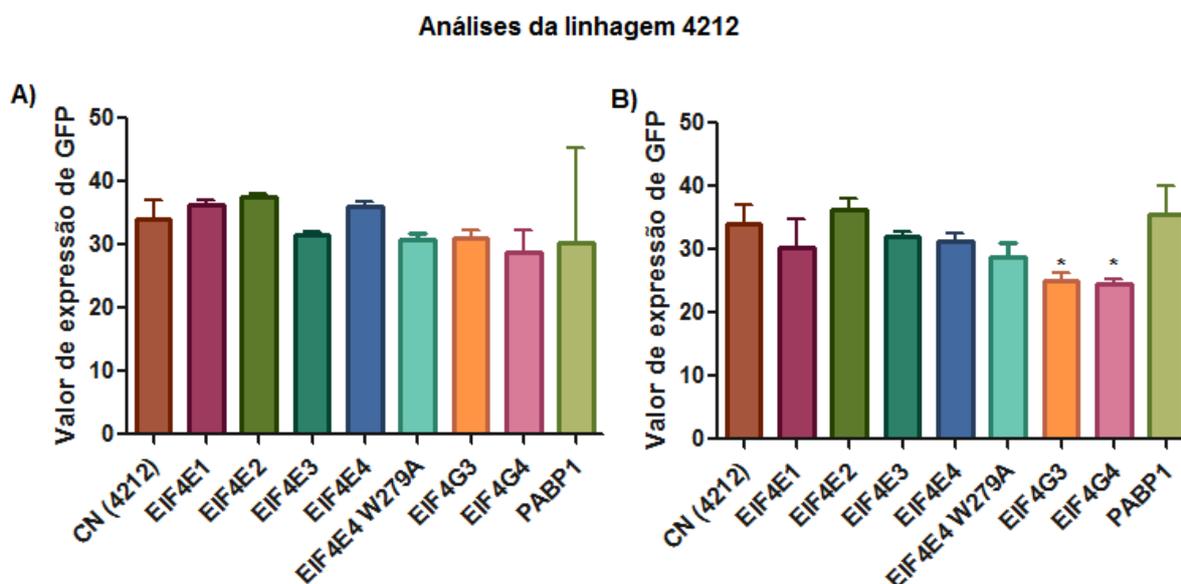
### **5.3 Avaliação dos efeitos da superexpressão de homólogos das subunidades do complexo EIF4F e PABP sobre a expressão de um mRNA repórter codificante para a GFP**

Com o intuito de avaliar se a superexpressão das proteínas do complexo eIF4F causariam alguma alteração na expressão do repórter GFP, foi utilizada a técnica de citometria de fluxo e os dados testados pela análise de Variância (one way ANOVA). Os resultados das amostras foram comparados com o perfil de expressão das linhagens repórter que não expressavam os homólogos de interesse (não induzidas). Neste ensaio foi quantificada a expressão de GFP no total de células contadas, tendo por objetivo saber se as células haviam reduzido/aumentado a expressão de GFP quando superexpressos os homólogos selecionados.

#### **5.3.1 Efeito da expressão de homólogos do complexo EIF4F na expressão de GFP na linhagem 4212.**

O vetor p4212 permite a expressão constitutiva da proteína GFP em *T. brucei*, a partir de um mRNA maduro com estruturas canônicas típicas, não possuindo nenhuma estrutura diferenciada em sua porção 3'-UTR. Na análise da fluorescência do total de células em 24 horas nenhuma das proteínas testadas alterou significativamente a expressão de GFP ( $p < 0.05$ ) quando comparado a linhagem controle 4212 (Figura 23 A). Na análise de 48 horas, as células expressando EIF4G3 e EIF4G4 produziram uma pequena diminuição da

expressão de GFP quando comparadas ao controle (Figura 23 B). Estes resultados se mostram condizentes ao observado anteriormente nesta linhagem cujo repórter, por possuir alta estabilidade, não se mostrou sensível para captar variações na tradução.



**Figura 23. Avaliação por citometria de fluxo da linhagem 4212 em 24 e 48 horas após indução das proteínas de interesse.** Em análise por ANOVA, pode ser observada diferença significativa na média da intensidade de fluorescência em decorrência da superexpressão dos diversos homólogos dos fatores do complexo EIF4F, onde \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ). Em **A)** Análise da expressão de GFP após 24 horas de indução, e em **B)** Análise da expressão de GFP após 48 horas de indução.

Na fase inicial deste projeto, apenas a linhagem 4212 foi utilizada como repórter, e já nas primeiras análises foi observado que os níveis desta proteína não se mostraram sensíveis para captar possíveis variações na tradução, possivelmente devido a uma alta estabilidade da proteína GFP e/ou uma competição entre as proteínas de fusão induzidas com as proteínas endógenas na atuação sobre o mRNA reporter. Para corroborar a suposição da alta estabilidade de GFP, as células foram tratadas com a cicloheximida, um inibidor de síntese proteica em eucariotos. O tratamento com cicloheximida mostrou que os níveis de GFP se mantiveram constantes por 24 horas, indicando uma alta

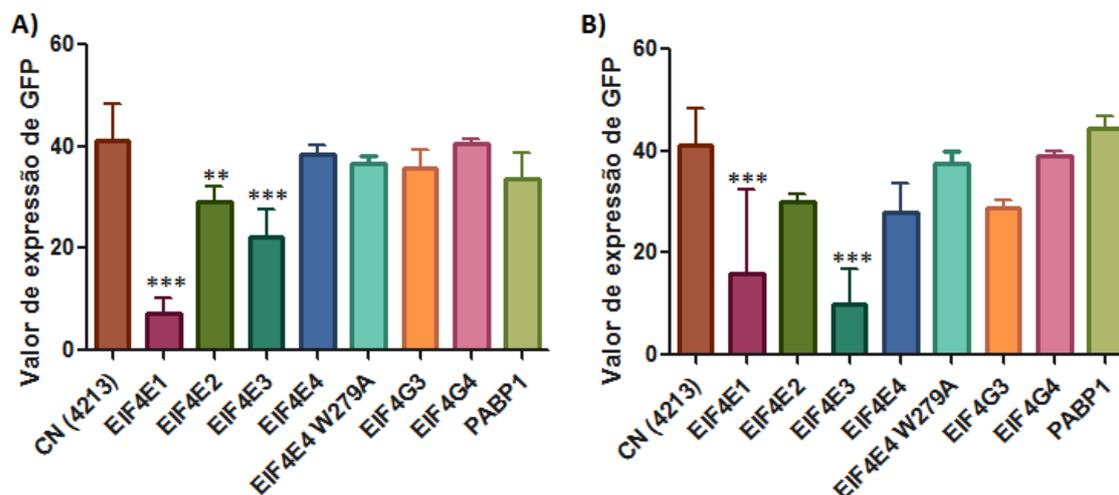
estabilidade/ baixo *turn over* dessa proteína e inviabilizando sua utilização na abordagem proposta (resultados não mostrados).

Por isto, como uma nova abordagem para investigar o papel dos fatores sobre a síntese proteica, através do monitoramento da tradução de mRNAs repórter, foram utilizados os vetores p4213 e p4235, os quais permitem a expressão do mRNA de GFP seguido de uma estrutura em grampo na porção 3'-UTR do mRNA (BoxB). O vetor p4235 permite ainda a expressão induzível e em maiores níveis de um mRNA bicistrônico, contendo a região codificadora de GFP, seguida de uma região intergênica contendo a mesma estrutura em grampo seguida da região codificadora da proteína sTomato.

### **5.3.2 Efeito da expressão de homólogos do complexo EIF4F na expressão de GFP na linhagem 4213**

Na linhagem 4213, a análise de 24 horas mostrou que as células superexpressando EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E3 apresentaram uma diminuição significativa da expressão de GFP ( $p < 0.05$ ) quando comparado à linhagem controle 4213 (Figura 24 A). Nos resultados de 48 horas, apenas EIF4E1 e EIF4E3 demonstraram redução na intensidade de fluorescência e as células expressando EIF4E2 mantiveram a expressão de GFP próxima ao controle 4213 (Figura 24 B).

### Análises da linhagem 4213

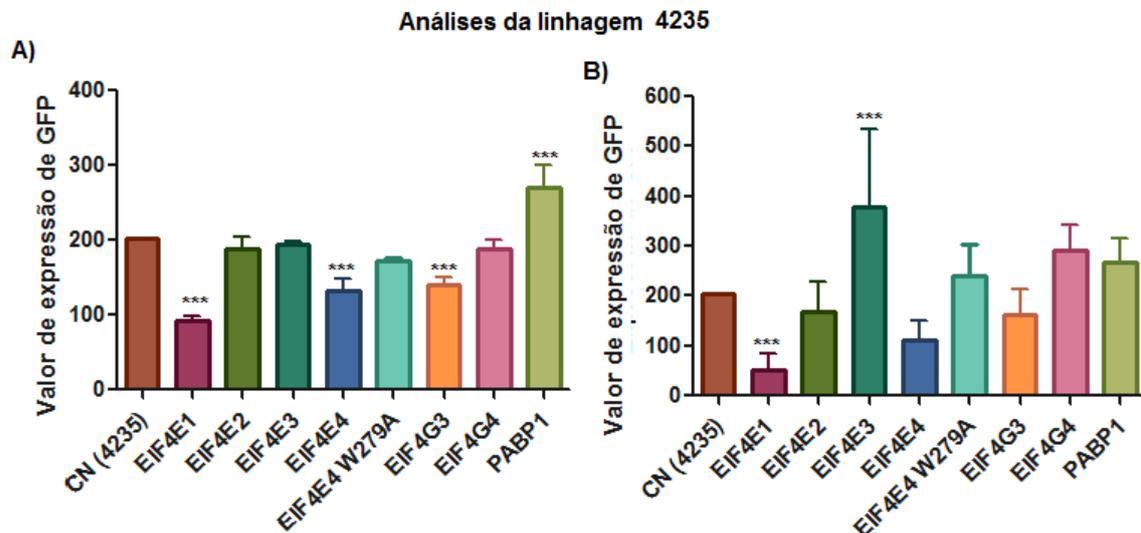


**Figura 24. Avaliação por citometria de fluxo da linhagem 4213 em 24 e 48 horas após indução das proteínas de interesse.** Em análise por ANOVA, pode ser observada diferença significativa na média da intensidade de fluorescência em decorrência da superexpressão dos diversos homólogos dos fatores do complexo EIF4F, onde \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ). Em **A)** Análise da expressão de GFP após 24 horas de indução, e em **B)** Análise da expressão de GFP após 48 horas de indução

### 5.3.3 Efeito da expressão de homólogos do complexo EIF4F na expressão de GFP na linhagem 4235

Na linhagem 4235, as análises de 24 horas mostraram que as células expressando EIF4E1, EIF4E4 e EIF4G3 apresentaram uma redução significativa dos níveis de expressão de GFP, enquanto que as células expressando PABP1 tiveram um aumento da intensidade de fluorescência, quando comparadas a linhagem controle 4235 (Figura 25 A).

Nas análises de 48 horas a expressão de EIF4E1 diminuiu a expressão de GFP, enquanto que a expressão de EIF4E4, EIF4G3 e PABP1 não demonstraram nenhum impacto significativo nos níveis de expressão de GFP. Já a superexpressão de EIF4E3 mostrou um aumento significativo nos níveis de GFP (Figura 25 B).



**Figura 25. Avaliação por citometria de fluxo da linhagem 4235 em 24 e 48 horas após indução das proteínas de interesse.** Em análise por ANOVA, pode ser observada diferença significativa na média da intensidade de fluorescência em decorrência da superexpressão dos diversos homólogos dos fatores do complexo EIF4F, onde \* ( $P < 0,05$ ), \*\* ( $P < 0,01$ ), \*\*\* ( $P < 0,001$ ). Em **A)** Análise da expressão de GFP após 24 horas de indução, e em **B)** Análise da expressão de GFP após 48 horas de indução

A partir destas análises, é possível observar mesmo com a variação demonstrada pelas linhagens superexpressando os diferentes homólogos do complexo EIF4F e PABP de *T. brucei*, apenas o EIF4E1 apresentou um resultado consistente de inibidor da expressão de GFP em ambas as linhagens contendo o sistema BoxB/Npeptideo. As demais observações precisarão ser repetidas e reanalisadas.

## 6. Discussão

Os tripanossomatídeos apresentam várias peculiaridades no que diz respeito a sua biologia molecular. Diferentemente do que acontece nos demais eucariotos, nestes organismos a maior parte do controle da expressão gênica é desempenhado em etapas posteriores à transcrição, através do controle da estabilidade e degradação dos mRNAs, de eventos durante a tradução e ainda em eventos pós-traducionais. Durante os eventos que levam à tradução dos mRNAs, a etapa da iniciação é um processo-chave, devido a atuação dos fatores de iniciação da tradução (eIFs, do inglês *eukaryotic initiation factors*) (Haile e Papadopoulou, 2007). Entre os eIFs, o complexo trimérico eIF4F (formado pelas subunidades eIF4E, eIF4A e eIF4G) atua no reconhecimento do mRNA e facilita o recrutamento do ribossomo para iniciar a síntese proteica. Nos tripanossomatídeos foram identificados múltiplos homólogos das diferentes subunidades do complexo eIF4F (Zinoviev *et al.*, 2012).

Na primeira etapa deste trabalho, o foco foi a geração de um sistema repórter para caracterização de alguns homólogos selecionados do complexo eIF4F e PABP de *Trypanosoma brucei*. As linhagens celulares de *T. brucei* obtidas neste trabalho expressam a proteína GFP de forma constitutiva (4212 e 4213) ou induzível (4235), em níveis detectáveis por *Western blot*, microscopia confocal e citometria de fluxo, e possuem padrões constantes da sua expressão durante toda a curva de crescimento do parasita, bem como ao longo de diversas passagens por meio de cultura. Desta forma, as culturas obtidas foram utilizadas nos ensaios de superexpressão dos fatores do complexo eIF4F e da PABP. As três linhagens apresentaram um perfil de crescimento muito semelhante ao

controle parental, a linhagem 4106, demonstrando que a o repórter não afeta o crescimento do parasita.

Em estudos anteriores a este, a superexpressão do EIF4E3 em uma linhagem expressando um mRNA repórter bicistrônico de GFP contendo sequências do tipo *stem-loop*, fusionadas ao peptídeo  $\lambda$ N na sua região 3' não traduzida, foi possível observar um incremento na expressão do mRNA repórter (Danielle Moura, comunicação pessoal). Abordagem semelhante foi descrita em trabalho publicado recentemente que validou a participação de várias proteínas distintas no controle da expressão gênica em *T. brucei* (Erben *et al.*, 2014).

Outro objetivo desse projeto foi classificar alguns homólogos do complexo eIF4F e PABP como possíveis estimuladores ou inibidores da tradução, avaliando a influência da superexpressão das proteínas selecionadas nos níveis de expressão de GFP. Dentre as proteínas avaliadas nesse estudo, estão homólogos da proteína de ligação ao *cap*, eIF4E, que em *T. brucei* receberam a denominação EIF4E1, EIF4E2, EIF4E3, EIF4E4 e EIF4E4<sub>W279A</sub>, este último sendo uma variação do EIF4E contendo uma mutação que impede sua ligação ao EIF4G.

Em relação ao perfil de crescimento, apenas as células expressando EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E4 tiveram alguma alteração do crescimento celular, apresentando um crescimento menor quando comparado ao controle não induzido. Na fase procíclica de *T. brucei*, as proteínas EIF4E1 e EIF4E2 se encontram em baixos níveis nas células e se localizam tanto no núcleo quanto no citoplasma, podendo estar envolvidas em outros processos e não ligadas diretamente a eventos relacionados à tradução (Freire *et al.*, 2011). A alta concentração destes fatores na célula pode estar interferindo na ligação de outros

fatores, já que o EIF4E1 e EIF4E2 também se ligam ao *cap* podendo competir com a ligação do EIF4E3, ou ainda alterando outras funções celulares.

Os resultados obtidos foram corroborados pelas análises por citometria de fluxo, onde foi possível visualizar que a superexpressão do EIF4E1 nas linhagens 4213 e 4235 levou a uma diminuição nos níveis de GFP celulares, nas duas condições analisadas. Este perfil pode ser devido ao fato do EIF4E1 não apresentar ligação com nenhum dos homólogos do EIF4G, apesar de se ligar ao *cap* (Zinoviev *et al.*, 2011). Este resultado também foi visto por Erben *et al.*, 2014, onde EIF4E1 diminuiu notavelmente a expressão do repórter, quando superexpresso em células procíclicas de *T. brucei*. Também há evidências de que EIF4E1 em *Leishmania* está envolvido na iniciação da tradução na fase amastigota do parasita e durante o stress térmico (Zinoviev *et al.*, 2011), não sendo, portanto necessário em grandes quantidades para a tradução na fase procíclica em situações normais, ou ainda agindo como um inibidor traducional durante essa fase do ciclo do parasita.

A superexpressão do EIF4E3 nas linhagens 4212, 4213 e 4235 não demonstrou nenhuma alteração do crescimento celular do parasita, porém os resultados das análises da citometria de fluxo demonstraram um aumento dos níveis de GFP na linhagem 4235 nas análises de 48 horas. Este resultado é corroborado pelos resultados preliminares encontrados pelo nosso grupo (Danielle Moura, comunicação pessoal) e também com os resultados mostrados por Erben *et al.*, 2014, onde a superexpressão desta proteína levou a um incremento na expressão do repórter GFP. Porém estes resultados não foram similares na linhagem 4213, onde houve diminuição da expressão do repórter

após indução de EIF4E3, este teste nesta linhagem ainda precisa ser repetido para confirmar estes resultados.

Nas células superexpressando EIF4E4 houve uma pequena redução do crescimento celular, enquanto que nas células superexpressando o mutante EIF4E<sub>4W279A</sub> não foi observado nenhuma alteração de crescimento dos parasitas quando comparadas com a linhagem controle. Com relação aos resultados da citometria, apenas na linhagem 4235 na análise de 24 horas as células superexpressando EIF4E4 apresentaram uma diminuição dos níveis de GFP, enquanto que as células superexpressando EIF4E<sub>4W279A</sub> não demonstraram numa alteração significativa nos níveis de GFP. O perfil diferenciado quando compara-se a superexpressão dessas proteínas sugere que a mutação no resíduo de triptofano 279 em *T. brucei* altera a funcionalidade da proteína. Outra observação é que a proteína mutante parece ter uma menor estabilidade que a proteína selvagem, visto que sua expressão mostrou diminuição gradual ao longo das curvas de crescimentos nas três linhagens avaliadas.

As curvas de crescimento para as células superexpressando as proteínas EIF4G3, EIF4G4 e PABP1, não mostraram alterações consideráveis do crescimento do parasita, quando comparadas ao crescimento do controle, com exceção de um discreto aumento na linhagem 4235 expressando PABP1. Nos resultados das análises por citometria de fluxo, apenas a linhagem 4212 superexpressando EIF4G3 e EIF4G4 na análise de 48 horas e 4235 superexpressando EIF4G3 na análise de 24 horas apresentaram diminuição da intensidade de fluorescência, enquanto que na linhagem 4235 expressando PABP1 nas análises de 24 horas houve incremento da expressão de GFP quando comparado ao controle, porém nas outras linhagens não foi possível visualizar

nenhuma alteração dos níveis de expressão do repórter GFP. Estes resultados contrastam em parte, com os resultados demonstrados por Erben *et al.*, 2014, onde a superexpressão de EF4G3 e EIF4G4 aumentou a expressão do repórter, assim como a expressão de PABP1, onde este resultado condiz com a função da PABP de aumentar a estabilidade dos mRNAs. Do mesmo modo, os resultados descritos por Amrani *et al.*, 2008 demonstraram que a interação PABP/eIF4G parece aumentar a iniciação da tradução e estabilidade do mRNA em *Saccharomyces cerevisiae*.

Apesar do EIF4E1 ter tido um efeito inibitório evidente sobre a expressão do mRNA da GFP, e do EIF4E3 ter um aparente papel de estimulador da tradução do repórter, as análises precisam ser repetidas e reanalisadas a fim de se estabelecer melhor os critérios de classificação das proteínas testadas como inibidoras ou estimuladoras da tradução.

Os resultados descritos neste trabalho mostram que o sistema de mRNA repórter utilizando GFP é funcional, porém alguns ajustes ainda são necessários. Outro passo na caracterização das proteínas do complexo eIF4F é a utilização destas linhagens repórteres em ensaios investigando o efeito da depleção desses homólogos sobre a expressão de GFP. Foi obtida uma linhagem similar à 4212 para este propósito, entretanto, não houve tempo hábil para a continuação dessas análises (Silva, resultados não mostrados).

Nossos resultados finais também confirmam que a utilização da linhagem 4212 não foi efetiva para avaliar o efeito da superexpressão das proteínas de interesse sobre o repórter de GFP, corroborando com os resultados obtidos no início deste trabalho e confirmando que a importância da interação direta das proteínas do complexo eIF4F com o mRNA, a qual foi permitida através do uso do

sistema peptídeo  $\lambda$ N-(1-22)/boxB, presente nas linhagens 4213 e 4235. Estes resultados estão, assim, de acordo com os resultados obtidos por Moura, 2011 e também por Erben *et al.*, 2014, que se utilizaram de estratégia semelhante para caracterização de alguns fatores envolvidos na tradução e regulação da expressão gênica de tripanossomatídeos.

Por fim, ainda não se pode confirmar que as proteínas testadas, apesar de alterar a expressão do repórter, atuam especificamente sobre a sua tradução, pois pode estar havendo mudanças na estabilidade dos mRNAs, uma vez que o controle da expressão gênica nestes organismos é regulado de forma pós-transcricional, através de diversos mecanismos, sendo a estabilização mediadas por proteínas de ligação ao mRNAs (RBPs), uma das principais vias de regulação (Estévez, 2008). Assim, análises de meia-vida do mRNA da GFP nas mesmas condições testadas neste trabalho consistem num ponto fundamental que deverá ser abordado futuramente.

## 7. Conclusões

- ✓ As linhagens celulares 4213 e 4235, obtidas neste trabalho, são viáveis para serem utilizadas na caracterização das proteínas envolvidas no controle da expressão gênica de tripanossomatídeos;
- ✓ O sistema peptídeo  $\lambda$ N-(1-22)/boxB (presente nas linhagens 4213 e 4235), é essencial para a detecção dos efeitos das superexpressão dos homólogos do complexo eIF4F e PABP sobre a expressão de GFP;
- ✓ A superexpressão de alguns dos homólogos analisados (EIF4E1, EIF4E2 e EIF4E4 e PABP1) altera em maior ou menor grau o crescimento de *T. brucei*;
- ✓ EIF4E1 aparenta ter um efeito inibitório sobre a expressão do repórter GFP;
- ✓ Não se pode confirmar que as proteínas testadas aumentam ou diminuem a tradução e ensaios complementares ainda precisam ser feitos para confirmar a real função destes fatores.

## 8. Referências Bibliográficas

- Aitken CE and Lorsch JR (2012). A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology*, 19(6), 568-576.
- Amrani N, Ghosh S, Mangus DA, Jacobson A (2008). Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. *Nature*, 453(7199), 1276-1280.
- Babokhov P, Sanyaolu AO, Oyibo WA, Fagbenro-Beyioku AF, Iriemenam NC (2013). A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathogens and global health*, 107(5), 242-252.
- Badjatia N, Ambrósio DL, Lee JH, Günzl A (2013). Trypanosome cdc2-related kinase 9 controls spliced leader RNA cap4 methylation and phosphorylation of RNA polymerase II subunit RPB1. *Molecular and cellular biology*, 33(10), 1965-1975.
- Bangs JD, Crain PF, Hashizume T, McCloskey JA, Boothroyd JC (1992). Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. *Journal of Biological Chemistry*, 267(14), 9805-9815.
- Barrett MP, Boykin DW, Brun R, Tidwell RR (2007). Human African trypanosomiasis: pharmacological re-engagement with a neglected disease. *Br J Pharmacol*. 152:1155–71.
- Bayele HK (2009). *Trypanosoma brucei*: a putative RNA polymerase II promoter. *Experimental parasitology*, 123(4), 313-318.
- Bellolell L, Cho-Park PF, Poulin F, Sonenberg N, Burley SK (2006). Two structurally atypical HEAT domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and Mnk1. *Structure*, 14:913-923.
- Berriman M, Ghedin E, Hertz-Fowler C and Blandin (2005) The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 309:416–422.
- Bhat M, Robichaud N, Hulea L, Sonenberg N, Pelletier J, Topisirovic I (2015). Targeting the translation machinery in cancer. *Nature Reviews Drug Discovery*, 14(4), 261-278.
- Brook M, Smith JWS, Gray NK (2009). The DAZL and PABP families: RNA-binding proteins with interrelated roles in translational control in oocytes. *Reproduction*, 137:595–617.
- Brun R, Blum J, Chappuis F, Burri C (2010). Human African trypanosomiasis. *Lancet*, 375(9709):148–159.

- Burgess HM, Gray NK (2010). mRNA-specific regulation of translation by poly(A)-binding proteins. *Biochem. Soc. Trans.* 38:1517–1522.
- Centers for Disease Control and Prevention (2012). Disponível em: <http://www.cdc.gov/parasites/sleepingsickness/epi.html> Acesso em 30/11/15
- Cecchi G, Paone M, Herrero RA, Vreysen MJ, Mattioli RC (2015). Developing a continental atlas of the distribution and trypanosomal infection of tsetse flies (*Glossina* species). *Parasites & vectors*, 8(1), 284.
- Chan CC, Dostie J, Diem MD, Feng W, Mann M, Rappsilber J e Dreyfuss G (2004) eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA* 10:200–209. doi: 10.1261/rna.5230104
- Checchi F, Filipe JA, Haydon DT, Chandramohan D, Chappuis F (2008). Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness. *BMC Infect Dis.*,8.
- Clayton CE (2002). Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO Journal*, 21(8):1881–1888.
- Clayton CE (2014) Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 195:96–106.
- Da Costa Lima TD, Moura DMN, Reis CRS, Vasconcelos JRC, Ellis L, Carrington M, Figueiredo RCBQ and de Melo Neto OP (2010) Functional characterization of three *Leishmania* poly(A) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. *Eukaryot Cell* 9:1484–1494.
- Daniels J, Gull K, Wickstead B (2010). Cell biology of the trypanosome genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74(4): 552-569.
- De Gaudenzi, Noé G, Campo VA, Frasch AC e Cassola A (2011) Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays Biochem* 31–46. doi: 10.1042/BSE0510031
- De Melo Neto OP, da Costa Lima TD, Xavier CC, Nascimento LM, Romão T P, Assis LA, Papadopoulou B (2015). The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. *RNA biology*, 12(11), 1209-1221.
- Dhalia R, Reis CRS, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JRC, Standart N and De Melo Neto OP (2005) Translation initiation in *Leishmania major*: Characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol* 140:23–41.

- Dhalia R, Marinsek N, Reis C, Katz R, Muniz J, Standart N, Carrington M, e de Melo Neto O (2006). The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic Acids Res.* 34: 2495-2507.
- Docampo R, Souza W, Miranda K, Rohloff P, Moreno SNJ (2005). Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man. *Nat. Rev. Microbiol.*, 3, 251-261, 2005.
- Echodu R, Sistro M, Bateta R, Murilla G, Okedi L, Aksoy S, Caccone A (2015). Genetic Diversity and Population Structure of *Trypanosoma brucei* in Uganda: Implications for the Epidemiology of Sleeping Sickness and Nagana. *PLoS neglected tropical diseases*, 9(2), 353-356.
- Eckhardt S, Szostak E, Yang Z, Pillai R (2011). Artificial tethering of Argonaute proteins for studying their role in translational repression of target mRNAs. In *Argonaute Proteins*, 191-206.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, Caler E, Renauld H, Worthey E a, Hertz-Fowler C (2005) Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309:404–409.
- Erben ED, Fadda A, Lueong S, Hoheisel JD, Clayton C. (2014). A genome-wide tethering screen reveals novel potential post-transcriptional regulators in *Trypanosoma brucei*. *PLoS pathogens*, 10(6), e1004178.
- Estévez A M (2008). The RNA-binding protein TbDRBD3 regulates the stability of a specific subset of mRNAs in trypanosomes. *Nucleic acids research*, 36(14), 4573-4586.
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W(2010). Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem*, 79:351–379.
- Fenn K e Matthews (2007) The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Curr Opin Microbiol* 10:539–46. doi: 10.1016/j.mib.2007.09.014
- Fèvre EM, Coleman PG, Welburn SC, Maudlin I (2004). Reanalyzing the 1900–1920 sleeping sickness epidemic in Uganda. *Emerg Infect Dis.*,10(4):567–573.
- Freire ER, Dhalia R, Moura DM, da Costa Lima TD, Lima RP, Reis CR, Hughes K, Figueiredo RC, Standart N, Carrington M, de Melo Neto OP (2011). The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Mol .BiochemParasitol.* 176(1):25-36.
- Freire ER, Malvezzi AM, Vashisht A a, Zuberek J, Saada E a, Langousis G, Nascimento JDF, Moura D, Darzynkiewicz E, Hill K et al. (2014a) *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. *Eukaryot Cell* 13:896–908. doi: 10.1128/EC.00071-14

- Freire ER, Vashisht A a, Malvezzi AM, Zuberek J, Langousis G, Saada E a, Nascimento JDF, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Hill K et al. (2014b) eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. RNA 20:1272–86. doi: 10.1261/rna.045534.114.
- Gomez C, Esther Ramirez M, Calixto-Galvez M, Medel O, Rodríguez MA (2010). Regulation of gene expression in protozoa parasites. BioMed Research International, 2010.
- Haile S and Papadopoulou B (2007). Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. Curr. Opin. Microbiol. 10: 569-577.
- Hammarton TC, Clark J, Douglas F, Boshart M, Mottram JC(2003). Stage-specific differences in cell cycle control in *Trypanosoma brucei* revealed by RNA interference of a mitotic cyclin. Journal of Biological Chemistry, 278(25), 22877-22886.
- Hide G (1999). History of sleeping sickness in East Africa. Clin Microbiol Rev, 12(1):112–125.
- Hinnebusch A and Lorsch JR(2012). The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. Cold Spring Harbor perspectives in biology, 4(10), a011544.
- Hinnebusch AG (2014). The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. Annual review of biochemistry, 83, 779-812.
- Holcik M and Sonenberg N (2005). Translational control in stress and apoptosis. Nature reviews Molecular cell biology, 6(4), 318-327.
- Ivens AC, Peacock CS, Worthey E a, Murphy L, Aggarwal G, Berriman M, Sisk E, Rajandream M-A, Adlem E, Aert R *et al.*, (2005) The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. Science 309:436–442.
- Jackson R, Hellen C, Pestova T(2010). The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 11: 113-127.
- Jagus R, Bachvaroff TR, Joshi B e Place AR (2012) Diversity of Eukaryotic Translational Initiation Factor eIF4E in Protists. Comp Funct Genomics 2012:134839. doi: 10.1155/2012/134839
- Jamonneau V, Ilboudo H, Kaboré J(2012) Untreated human infections by *Trypanosoma brucei gambiense* are not 100% fatal. PLoS Negl Trop Dis. 6(6):e1691.
- Jena Bioscience (2015). LEXSY User guide (Atualizado em novembro de 2015). Disponível em: <http://www.jenabioscience.com/>.

- Joshi B, Lee K, Maeder DL, Jagus R (2005). Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. *BMC evolutionary biology*, 5(1), 48.
- Kooter JM and Borst P (1984). Alpha-amanitin-insensitive transcription of variant surface glycoprotein genes provides further evidence for discontinuous transcription in trypanosomes. *Nucleic Acids Research*.12(24):9457–9472.
- Lee S and McCormick F (2006) p97/DAP5 is a ribosome-associated factor that facilitates protein synthesis and cell proliferation by modulating the synthesis of cell cycle proteins. *EMBO J*. 25: 4008-19.
- Leprohon P, Légaré D and Ouellette M (2011). ABC transporters involved in drug resistance in human parasites: *Essays Biochem*, v. 50, p. 121-44.
- Lejon V, Jacobs J, Simarro PP (2013). Elimination of sleeping sickness hindered by difficult diagnosis. *Bulletin of the World Health Organization* , 91 (10), 718-718
- Li Q, Imataka H, Morino S, Rogers GW, Richter-Cook NJ, Merrick WC e Sonenberg N (1999) Eukaryotic translation initiation factor 4AIII (eIF4AIII) is functionally distinct from eIF4AI and eIF4AII. *Mol Cell Biol* 19:7336–7346.
- Liang X-H, Haritan A, Uliel S, Michaeli S (2003). trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryotic Cell*, 2(5):830–840
- Lindemann CB, Kanous KS (1997). A model for flagellar motility. *Int Rev Cytol*,173:1–72.
- Lukeš J, Skalický T, Týč J, Votýpka J, Yurchenko V (2014). Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Molecular and biochemical parasitology*, 195(2), 115-122.
- Marash L, Liberman N, Henis-Korenblit S, Sivan G, Reem E, Elroy-Stein O, Kimchi A (2008). DAP5 promotes cap-independent translation of Bcl-2 and CDK1 to facilitate cell survival during mitosis. *Mol. Cell*,30:447-459.
- Marintchev A and Wagner G (2004). Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. *Q Rev Biophys* 37:197–284.
- Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N and Wagner G (2009) Complex in Translation Initiation. *Cell* 136:447–460.
- Mendenhall AR, Tedesco PM, Sands B, Johnson TE, Brent R (2015). Single Cell Quantification of Reporter Gene Expression in Live Adult *Caenorhabditis elegans* Reveals Reproducible Cell-Specific Expression Patterns and Underlying Biological Variation.

- Myler PJ, Audleman L, Devos T (1999). *Leishmania major* Friedlin chromosome 1 has an unusual distribution of protein-coding genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 96(6):2902–2906.
- Morris JC, Wang Z, Drew ME, Englund PT (2002). Glycolysis modulates trypanosome glycoprotein expression as revealed by an RNAi library. *EMBO J*. ,21:4429–38.
- Moura DM (2011). Análise da participação de dois homólogos do fator eIF4G na iniciação da síntese protéica de *Trypanosoma brucei* (Tese de Doutorado).
- Moura DM, Reis CR, Xavier CC, Lima TD da C, Lima RP, Carrington M e Neto OP de M (2015) Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol*.
- Nielsen PJ and Trachsel H (1988) The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. *EMBO J* 7:2097–2105.
- Nuttall J, Vitale A, Frigerio L (2003). C-terminal extension of phaseolin with a short methionine-rich sequence can inhibit trimerisation and result in high instability. *Plant Molecular Biology* 51, p. 885–894.
- Oberholzer M, Morand S, Kunz S, Seebeck T(2006). A vector series for rapid PCR-mediated C-terminal in situ tagging of *Trypanosoma brucei* genes. *Mol Biochem Parasitol*.145:117–20.
- Odiit M, Kansiime F, Enyaru JC (1997). Duration of symptoms and case fatality of sleeping sickness caused by *Trypanosoma brucei rhodesiense* in Tororo, Uganda. *East Afr Med J*. 74(12):792–795.
- Paek KY, Hong KY, Ryu I, Park SM, Keum SJ, Kwon OS, Jang SK (2015). Translation initiation mediated by RNA looping. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(4), 1041-1046.
- Pereira MM, Malvezzi AM, Nascimento LM, da Costa Lima TD, Alves VS, Palma ML, de Melo Neto OP (2013). The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. *Molecular and biochemical parasitology*, 190(2), 82-86.
- Perry KL, Watkins KP, Agabian N (1987). Trypanosome mRNAs have unusual "cap 4" structures acquired by addition of a spliced leader. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(23), 8190-8194.
- Rhoads RE (2009) eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. *J Biol Chem* 284:16711–5.

- Rogers GW, Richter NJ, Lima WF, Merrick WC (2001). Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), 30914-30922.
- Sahlas DJ, MacLean JD, Janevski J, Detsky AS (2002). Clinical problem-solving. Out of Africa. *N Engl J Med*. 347(10):749–753
- Simarro PP, Franco JR, Cecchi G (2012). Human African trypanosomiasis in non-endemic countries (2000–2010) *J Travel Med*. 19(1):44–53.
- Simarro PP, Cecchi G, Paone M (2010). The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *Int J Health Geogr*.9:57.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, et al. (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest* 118: 1301–1310.
- Sunter J, Wickstead B, Gull K, Carrington M (2012a). A new generation of T7 RNA polymerase-independent inducible expression plasmids for *Trypanosoma brucei*. *PloS one*, 7(4).
- Sunter J, Wickstead B, Gull K, Carrington M (2012b). Comparison of the Lister 427 pSPR2.1 and Lister 427 29-13 cell lines. *PLOS ONE*. 10.1371/journal.pone.0035167.g001.
- Voigts-Hoffmann F, Klinge S, Ban N (2012). Structural insights into eukaryotic ribosomes and the initiation of translation. *Current opinion in structural biology*, 22(6), 768-777.
- World Health Organization (2014). Disponível em: [www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/](http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs259/en/)
- Acesso em 01/12/2015.
- World Health Organization (2013). Trypanosomiasis, African – prevention and control. Trypanosomiasis, African – epidemiology. Disponível em: [http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95732/1/9789241209847\\_eng.pdf](http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/95732/1/9789241209847_eng.pdf)
- Acesso em 15/05/2015.
- Worthen C, Jensen BC, Parsons M (2010). Diverse effects on mitochondrial and nuclear functions elicited by drugs and genetic knockdowns in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. *PLoS Negl Trop Dis*. 4:e678.
- Wurst M, Seliger B, Jha BA, Klein C, Queiroz R, Clayton C (2012). Expression of the RNA recognition motif protein RBP10 promotes a bloodstream form transcript pattern in *Trypanosoma brucei*. *Molecular microbiology*, 83(5), 1048-1063.

- Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A (2006). Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. *Eukaryotic Cell*.5(12):1969–1979.
- Yoffe Y, Leger, M, Zinoviev A, Zuberek J, Darzynkiewicz E, Wagner G, Shapira M (2009). Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Res.* 37: 3243-3253.
- Zinoviev A, Léger M, Wagner G, Shapira M (2011). A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic acids research*, gkr555.
- Zinoviev A, Manor A, Shapira M (2012) Nutritional stress affects an atypical cap-binding protein in *Leishmania*. *RNA Biol.* 1;9(12):1450-60.

**Adalúcia da silva**

Curriculum Vitae

2016

## **Identificação**

ADALÚCIA DA SILVA

SILVA, A.

## **Formação acadêmica, Histórico escolar do Mestrado**

Histórico escolar do mestrado: Conceito A

Especialização em Inovação Tecnológica e Formação Qualificada. Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

**Título:** Produção do antígeno p24 do HIV 1 em *Leishmania tarentolae*.

Orientadores: Antonio Carlos de Freitas e Christian Robson de Souza Reis.

## **Formação Complementar**

Curso de Biotecnologia aplicada ao desenvolvimento de vacinas. (Carga horária: 40h). Centro de pesquisas Aggeu Magalhães -Fundação Oswaldo Cruz (PE).

Curso de Proteção radiológica para área de pesquisa. (Carga horária: 40h). Laboratório de metrologia das radiações ionizantes(LMRI). Departamento de energia nuclear – DEN/UFPE.

## **Resumo publicados em Anais de Congresso**

**SILVA, A., MOURA, D. M. N., LIMA, G. B., DE MELO NETO, O. P.**  
Desenvolvimento de um repórter fluorescente para identificação de proteínas envolvidas na iniciação da síntese proteica de tripanossomatídeos. 2014. **XX**

## **Encontro de Genética do Nordeste**

LIMA, G. B., **SILVA, A.**, SILVA, A. J. D., SEVERO GOMES, B . Avaliação do conhecimento básico de genética de alunos concluintes ou em conclusão do ensino médio da rede pública do estado de Pernambuco. 2014. **XX Encontro de Genética do Nordeste**

LIMA, G. B., NASCIMENTO, L. M., MALVEZZI, A. M., MOURA, D. M. N., **SILVA, A.**, DE MELO NETO, O. P. Análise de expressão do fator eif4e5 durante o ciclo de vida de *Leishmania infantum*. 2014. **XX Encontro de Genética do Nordeste**

## **Atividades didáticas**

Monitoria na disciplina Engenharia Genética Experimental: do DNA a Proteína no 2º semestre/2015, oferecida pelo do Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, sob a coordenação do Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto. Carga horária: 16 horas

## **Eventos**

- XX Encontro de Genética do Nordeste. Desenvolvimento de um repórter fluorescente para identificação de proteínas envolvidas na iniciação da síntese proteica de tripanossomatídeos. 2014. (Encontro).