

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

IRASSANDRA ROOZE PEREIRA UCHÔA CAVALCANTI DE AQUINO

Caracterização preliminar de homólogos de fatores de iniciação da tradução eIF4B e eIF5 e de possíveis parceiros da proteína de ligação ao poli-A (PABP) em *Leishmania infantum*

Recife

2018

IRASSANDRA ROOZE PEREIRA UCHÔA CAVALCANTI DE AQUINO

Caracterização preliminar de homólogos de fatores de iniciação da tradução eIF4B e eIF5 e de possíveis parceiros da proteína de ligação ao poli-A (PABP) em *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadora : Dra. Tamara De Carli da Costa Lima

Recife

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

Aquino, Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de

Caracterização preliminar de homólogo de fatores de iniciação da tradução eIF4B e eIF5 e de possíveis parceiros da proteína de ligação ao poli-A (PAPB) em *Leishmania infantum* / Irassandra Rooze Pereira Uchôa Cavalcanti de Aquino. – 2018.

108 f. : il.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

Coorientadora: Tamara De Carli da Costa Lima.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Genética, Recife, 2018.

Inclui referências.

1. Tripanossomo 2. Genética I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orientador) II. Lima, Tamara de Carli da Costa (coorientadora) III. Título.

593

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 141

IRASSANDRA ROOZE PEREIRA UCHÔA CAVALCANTI DE AQUINO

Caracterização preliminar de homólogos de fatores de iniciação da tradução eIF4B e eIF5 e de possíveis parceiros da proteína de ligação ao poli-A (PABP) em *Leishmania infantum*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Área de concentração Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Genética.

Aprovada em: 26/02/2018

COMISSÃO EXAMINADORA:

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

Dr. Antonio Roberto Lucena de Araújo
Universidade Federal de Pernambuco

Dr. Tercilio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco

Dra. Duschinka Ribeiro Duarte Guedes
Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães – Fiocruz/PE

À minha família

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, pela confiança depositada em mim para o desenvolvimento desse trabalho. Mesmo sabendo que seria um grande desafio, a chance foi me dada. Porém gostaria de agradecer ainda mais pelo crescimento profissional e por ter compartilhado o seu conhecimento durante todos esses anos.

Agradeço à minha co-orientadora, Tamara De Carli, por todo ensinamento, carinho e atenção. Também não poderia deixar de agradecer, grandemente, à Lud (minha também eterna co-orientadora), que me acompanhou desde do primeiro dia que entrei no laboratório da microbiologia e com toda paciência me ensinou todas as técnicas necessárias para desenvolver às pesquisas. Sempre muito acessível.

Agradeço à todos que trabalham na microbiologia (e até os que não fazem mais parte), sem exceção, desde dos colegas de bancadas até os técnicos de laboratórios: Amaranta, Maria, Camila, Izabel, Rafaela, Veruska, Talyta, Éden, Renata, Adriana Neuman, Adriana Roberto, Kleison, Moezio, May, Dani, Wagner, Arthur, Isis, Dona Lara, Cláudio, Fabiana, Bruna e Silvana.

Agradeço aos “Imorais”, Ada, Gustavo e Thaíse, pela amizade, força e companhia de sempre. Em especial a Gustavo, que sempre é muito prestativo e muitas vezes até se anula para ajudar ao outro, sem medir esforços.

Agradeço à duas pessoas muito especiais que acompanharam de perto meus medos e angústias diárias, Rafael Dhalia e Christian, muito obrigada pelo carinho, conselhos e apoio nesses dois anos.

Agradeço à toda equipe do LaViTE, sem exceção, por toda força, amizade e acolhimento nesses meses que exigiram de mim muitas vezes terceiros turnos, finais de semanas e feriados para que eu conseguisse finalizar esse mestrado. Mas em especial queria agradecer a Vera, Tati, Manu, Rafa, May, Diégina, Andreza, Priscila, Cinthia e Eli.

Agradeço à minha família, sem ela, eu não teria chegado até aqui: Rilva (mãe), Iraquitã (Pai), Roninho (irmão), Lays (cunhada), Jujú (sobrinha e afilhada), Yohan (meu filho, minha vida) e meu esposo (Pedro). Pela compreensão de inúmeras vezes conviverem com a minha ausência.

Agradeço ao Instituto de Pesquisa Aggeu Magalhães, por toda a estrutura e equipamentos necessários para a execução da pesquisa e ao Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Federal de Pernambuco que permitiu a concretização de um sonho em cursar uma pós-graduação em genética.

“Minha energia é o desafio, minha motivação é o impossível, e é por isso que eu preciso ser, à força e a esmo, inabalável”.

Augusto Branco, 2011

RESUMO

Nos eucariotos, o reconhecimento dos mRNAs pelo ribossomo durante a iniciação da tradução depende da ação do complexo heterotrimérico eIF4F (*eukaryotic Initiation Factor* – Fator de Iniciação Eucariótico - eIF), bem como da proteína de ligação ao poli A (PABP). Juntos eles promovem a circularização do mRNA e estimulam sua tradução, mas sua ação depende de outros fatores, como os eIF5 e eIF4B. Múltiplos homólogos de subunidades do eIF4F e da PABP, cuja caracterização está em andamento, foram identificados nos tripanossomatídeos, protozoários patogênicos. Esta caracterização depende de um melhor conhecimento sobre parceiros funcionais, como homólogos de eIF5 e eIF4B, e sobre proteínas hipotéticas identificadas como parceiras da PABP, como as LinJ.33.0390 e ZC3H41. Este trabalho teve como objetivo caracterizar estas quatro proteínas a partir da sua expressão em *L. infantum* fusionadas ao epítopo HA. Esta expressão foi confirmada e avaliada e teve como destaque a confirmação de múltiplas isoformas para o homólogo de eIF4B, sugerindo fosforilação. Ensaio de imunoprecipitação foram realizados utilizando soro anti-HA seguido da investigação de proteínas associadas. Para o homólogo de eIF4B não foram identificados fatores de tradução entre seus parceiros, o que sugere que ele possa desempenhar outra função. Foi confirmada a associação do eIF5 com parceiros conhecidos, como o complexo eIF2, concluindo a sua identificação. Homólogos de subunidades do eIF4F, contudo, foram identificados entre os parceiros da LinJ.33.0390. Já a associação da ZC3H41 com os três homólogos de PABP foi confirmada. Estes resultados agregam informações relevantes sobre o processo de tradução em tripanossomatídeos, etapa esta ainda não bem elucidada.

Palavras-chaves: EIF5. EIF4B. Tripanossomatídeos.

ABSTRACT

In eukaryotes, the recognition of mRNAs by the ribosome during translation initiation depends on the action of the heterotrimeric complex eIF4F (eIF - *eukaryotic Initiation Factor* - *eIF*) as well as the poly A-binding protein (PABP). Together they promote the circularization of mRNA and stimulate its translation, but their action depends on other factors, such as eIF5 and eIF4B. Multiple homologues of eIF4F and PABP subunits have been identified in trypanosomatids, which is a pathogenic protozoa, that characterization is ongoing. This characterization depends on a better knowledge about functional partners, such as eIF5 and eIF4B homologues, and on hypothetical proteins identified as PABP partners, such as LinJ.33.0390 and ZC3H41. This work aimed to characterize these four proteins through their expression in *L. infantum* fused to the HA epitope. This expression was confirmed and evaluated and highlighted the confirmation of multiple isoforms for the eIF4B homolog, suggesting phosphorylation. Immunoprecipitation assays were performed using anti-HA serum followed by the investigation of associated proteins. For the eIF4B homologue, no translation factors were identified among its partners, suggesting another function. The association of eIF5 with known partners, such as the eIF2 complex, was confirmed, confirming its identification. Homologues of eIF4F subunits, however, were identified among the LinJ.33.0390 partners. The association of ZC3H41 with the three homologues of PABP was also confirmed. These results take together relevant information about the translation process in trypanosomatids, stage is still not well elucidated.

Keywords: eIF5. eIF4B. Trypanosomatids.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - MORFOLOGIA DOS PARASITAS DE <i>LEISHMANIA</i>	23
FIGURA 2 – CICLO BIOLÓGICO DA <i>LEISHMANIA</i> , O AGENTE CAUSADOR DA LEISHMANIOSE.....	25
GRAFICO 1 – CASOS DE LEISHMANIOSE POR REGIÕES BRASILEIRAS EM 2015.....	28
FIGURA 3 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA MATURAÇÃO DE mRNA POR <i>TRANS-SPLICING</i> E POLIADELIAÇÃO.....	31
FIGURA 4 – DIFERENÇAS NO MECANISMO DE <i>CIS</i> E <i>TRANS-SPLICING</i> NOS EUCARIOTOS.....	32
FIGURA 5 – ESTRUTURA DO CAP4 DE TRIPANISSOMATÍDEOS.....	33
FIGURA 6 – MECANISMOS DA INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EUCARIÓTICA.....	38
FIGURA 7 – COMPLEXO eIF4F E CIRCULARIZAÇÃO DO mRNA POR MEIO DA PABP.....	39
FIGURA 8 – VISÃO GERAL DAS ETAPAS DA SÍNTESE PROTEICA NOS EUCARIOTOS.....	42
FIGURA 9 – OS DOIS DIFERENTES COMPLEXOS eIF4F FORMADOS PELOS RESPECTIVOS HOMÓLOGOS DE eIF4E, eIF4G, eIF4A E PABP CARACTERIZADOS EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	46
FIGURA 10 – ESTRUTURA DO eIF4B EM MAMÍFEROS.....	48
FIGURA 11 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DA ESTRUTURA DOS DOMÍNIOS DE eIF5.....	49
FIGURA 12 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DAS SEQUÊNCIAS DOS GENES LinJ.33.0390 E ZC3H41.....	50
FIGURA 13 – ESQUEMA ILUSTRATIVO DO FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	52
FIGURA 14 – MAPA DO VETOR PLASMIDIAL DE EXPRESSÃO pET21a.....	53

FIGURA 15 – MAPA DO VETOR PLASMIDIAL DE EXPRESSÃO pSP-BT1-Y-NEO-ALFA-HA.....	54
FIGURA 16 – ENSAIO PRÉVIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DOS EXTRATOS CELULARES EXPRESSANDO A PROTEÍNA EIF4B FUSIONADA AO EPÍTOPO HA.....	64
FIGURA 17 – AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA EIF4B DURANTE O CICLO DE VIDA DE <i>L. INFANTUM</i>	65
FIGURA 18 – PURIFICAÇÃO DE FOSFOPROTEÍNAS POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE E DETECÇÃO DO EIF4B, PABP1 E EIF4AI EM <i>L. INFANTUM</i>	66
FIGURA 19 – ENSAIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DE EXTRATOS E LISADOS CELULARES DE <i>L. INFANTUM</i> EXPRESSANDO O EIF4B FUSIONADO AO EPÍTOPO HA.....	67
FIGURA 20 – ENSAIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DA PROTEÍNA EIF4B FUSIONADA AO EPÍTOPO HA.....	67
FIGURA 21 – ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DO EIF4B COM ALGUNS POSSÍVEIS PARCEIROS LIGANTES.....	68
FIGURA 22 - AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DO EIF5 DURANTE CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>L. INFANTUM</i>	71
FIGURA 23 – ENSAIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DE EXTRATOS E LISADOS CELULARES DE <i>L. INFANTUM</i> EXPRESSANDO O EIF5 FUSIONADO AO EPÍTOPO HA.....	72
FIGURA 24 – ENSAIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DA PROTEÍNA EIF5 FUSIONADA AO EPÍTOPO HA.....	72
FIGURA 25 – CONFIRMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS LinJ.33.0390/pSP-BT1.....	75
FIGURA 26 – ENSAIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DOS EXTRATOS E LISADOS CELULARES EXPRESSANDO A PROTEÍNA LINJ.33.0390 FUSIONADA AO EPÍTOPO HA.....	76
FIGURA 27 – ENSAIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DA PROTEÍNA LINJ.33.0390 FUSIONADA AO EPÍTOPO HA.....	77

FIGURA 28 - ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DO LINJ.33.0390 COM ALGUNS POSSÍVEIS PARCEIROS LIGANTES.....	77
FIGURA 29 - CONFIRMAÇÃO DAS CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS ZC3H41/pET21a.....	80
FIGURA 30 – EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE ZC3H41/POLI-HISTIDINA.....	81
FIGURA 31 – ENSAIOS COM O ANTICORPO POLICLONAL ZC3H41.....	82
FIGURA 32 – AVALIAÇÃO DO PERFIL DE EXPRESSÃO DA PROTEÍNA ZC3H41 DURANTE O CICLO DE VIDA DE <i>L. INFANTUM</i>	83
FIGURA 33 - ENSAIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DE EXTRATOS E LISADOS CELULARES DE <i>L. INFANTUM</i> EXPRESSANDO O ZC3H41 FUSIONADO AO EPÍTOPO HA.....	84
FIGURA 34 - ENSAIO DE <i>WESTERN-BLOT</i> DA IMUNOPRECIPITAÇÃO DA PROTEÍNA ZC3H41 FUSIONADA AO EPÍTOPO HA.....	84
FIGURA 35 - ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO DO ZC3H41 COM ALGUNS POSSÍVEIS PARCEIROS LIGANTES.....	85
GRÁFICO 2 – POPULAÇÕES DE mRNAs LIGADAS AO ZC3H41, PABP1, PABP2 E AO RBP23.....	89
FIGURA 36 – POSSÍVEIS COMPLEXOS ENVOLVENDO O EIF4B.....	92
FIGURA 37 – PROTEÍNAS QUE CO-PRECIPITAM COM O EIF5.....	94
FIGURA 38 - PROTEÍNAS QUE CO-PRECIPITAM COM O LINJ.33.0390.....	96
FIGURA 39 - PROTEÍNAS QUE CO-PRECIPITAM COM O ZC3H41.....	98

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ANÁLISE DAS PROTEÍNAS, POR ESPECTROMETRIA DE MASSA, QUE CO-PRECIPITAM COM O FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4B DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	69
TABELA 2 - ANÁLISE DAS PROTEÍNAS, POR ESPECTROMETRIA DE MASSA, QUE CO-PRECIPITAM COM O FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF5 DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	73
TABELA 3 - ANÁLISE DAS PROTEÍNAS, POR ESPECTROMETRIA DE MASSA, QUE CO-PRECIPITAM COM A LINJ.33.0390 DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	78
TABELA 4 - ANÁLISE DAS PROTEÍNAS, POR ESPECTROMETRIA DE MASSA, QUE CO-PRECIPITAM COM A ZC3H41 DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	86

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ATP	- Adenosina trifosfato
BSA	- <i>Bovine Serum Albumin</i> – Albumina Bovina Sérica
CMF	- Complexo Multifatorial
dATP	- <i>Deoxyadenosine triphosphates</i> – Trifosfato de adenosina
DEAD	- Ácido Aspártico (D) Ácido Glutâmico (E), Alanina (A), Ácido Aspártico (D)
DMSO	- Dimetilsufóxido
DNA	- <i>Desoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucléico
dNTPs	- <i>Deoxynucleotide Triphosphates</i> – Trifosfatos Deoxinucleotideo.
DTNs	- Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	- Ditionotreitól
eIF	- <i>eukaryotic Initiation Factor</i> – Fator de Iniciação Eucariótico
GAP	- Acelera a Proteína GTPase (<i>GTPase Accelerating Protein</i>)
GDI	- Inibidor de dissociação GDP (<i>GDP Dissociation Inhibitor</i>)
GTP	- <i>Guanosine Triphosphate</i> – Guanosina Trifosfato
HA	- Hemaglutinina
HEPES	- <i>4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid</i>
IgG	- Imunoglobulina G
IP	- Imunoprecipitação
IPTG	- Isopropil-tio- β -D-galactopiranosídeo
kDa	- kilo Dalton
LB	- Luria Bertani
LC	- Leishmaniose cutânea
LCD	- Leishmaniose cutânea difusa
Ldi	- <i>Leishmania donovani infantum</i>
LDPK	- Leishmaniose dérmica pós-calazar
LMC	- Leishmaniose Mucocutânea
LV	- Leishmaniose Visceral
Met	- Metionina
mL	- Mililitro
mRNA	- <i>Messenger RNA</i> – RNA Mensageiro
NPT	- Núcleo e Plataforma Tecnológica

PABP	- <i>Poli (A) Binding Protein</i> – Proteína de ligação ao Poli A
Paip	- <i>PABP-interacting protein</i> – Proteína de interação com a PABP
pb	- Pares de Base
PBS	- <i>Phosphate Buffered Saline</i> – Tampão Fosfato Salino
PVDF	- <i>Polyvinylidene fluoride</i> – Polivinil Fluorido
RBP	- Proteínas de ligação ao RNA (<i>RNA – Binding Protein</i>)
RNA	- <i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucléico
RNAi	- Técnica de RNA de interferência
RNA poli	- RNA polimerase
RPM	- Rotações por minuto
RRM	- <i>RNA Recognition Motif</i> - Motivo de reconhecimento do RNA
SDS-PAGE	- <i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> – Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil Sulfato de Sódio
SL	- <i>Splicing Leader</i> – Sequencia Líder
SOC	- <i>Super Optimal broth with Catabolite repression</i>
TBS	- <i>Tris-Buffered Saline</i> – Tampão Tris salino
tRNAi	- <i>Transfer RNA initiator</i> – RNA Transportador iniciador
UTR	- <i>Untranslated region</i> – Região não traduzida
WB	- <i>Western-Blot</i>
WHO	- <i>World Health Organization</i> – Organização Mundial da Saúde
WT	- Células selvagens do parasita (<i>Wild Type</i>)
X-GAL	- <i>5-bromo-4-chloro-indolyl-β-D-galactopyranoside</i> (BCIG)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	19
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE.....	21
2.2 GÊNERO LEISHMANIA E AS LEISHMANIOSES.....	21
2.2.1 Ciclo biológico.....	23
2.2.2 Manifestações clínicas.....	25
2.2.3 Epidemiologia.....	27
2.3 ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	29
2.3.1 Transcrição policistrônica.....	29
2.3.2 Processamento de RNA: trans-splicing, cap4 e poliadenilação.....	30
2.3.3 Controle da expressão gênica nos tripanossomatídeos.....	34
2.4 PROCESSO DE SÍNTESE PROTEICA EM EUCARIOTOS.....	35
2.4.1 Iniciação da tradução.....	36
2.4.2 O complexo eIF4F e a proteína de ligação a cauda poli A.....	39
2.4.2.1 Fator eIF4E: a proteína de ligação ao cap.....	39
2.4.2.2 Fator eIF4A: a RNA helicase.....	40
2.4.2.3 Fator eIF4G: a proteína que estrutura o complexo EIF4F.....	40
2.4.2.4 PABP: a proteína de ligação à cauda poli-A.....	41
2.5 SÍNTESE PROTEICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	42
2.5.1 Fatores polipeptídeos únicos.....	43
2.5.2 Fatores constituintes de complexos de múltiplas subunidades.....	43
2.5.3 Complexo eIF4F e a PABP.....	44
2.5.3.1 eIF4As.....	44
2.5.3.2 eIF4Gs.....	44
2.5.3.3 eIF4Es.....	45
2.5.3.4 PABPs.....	46
2.6 FATORES PROTEICOS DO ESTUDO.....	47
2.6.1 eIF4B.....	47
2.6.2 eIF5.....	48

2.6.3 Proteínas parceiras de homólogos da PABP.....	49
2.6.3.1 LinJ.33.0390 e ZC3H41.....	50
3 OBJETIVOS.....	51
3.1 OBJETIVO GERAL.....	51
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	51
4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	52
4.1 FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS.....	52
4.2 CONSTRUÇÃO PLASMIDIAL DOS GENES LinJ.33.0390 E ZC3H41 EM VETORES DE EXPRESSÃO.....	53
4.3 EXPRESSÃO PROTEICA EM <i>ESCHERICHIA COLI</i>	54
4.3.1 Expressão de proteínas recombinantes.....	54
4.3.2 Purificação de proteínas recombinantes.....	55
4.3.3 Produção de soros policlonais e ensaios de <i>Western-Blot</i>.....	56
4.4 EXPRESSÃO PROTEICA EM <i>LEISHMANIA IINFANTUM</i>	57
4.4.1 Cultivo e transfecção de células.....	57
4.4.2 Preparação de extratos totais.....	58
4.4.3 Curvas de crescimento e preparação de extratos totais.....	58
4.4.4 Ensaios de purificação e análise de fosfoproteínas.....	59
4.4.5 Preparação de lisados celulares e ensaios de imunoprecipitação.....	59
4.4.6 Ensaios de <i>Western-Blot</i>.....	60
4.4.7 Análise da espectrometria de massas.....	61
4.4.8 Extração de RNA e construção da biblioteca de cDNA.....	61
5 ANÁLISE DOS RESULTADOS.....	63
5.1 CARACTERIZAÇÃO DE UM POSSÍVEL HOMÓLOGO DO FATOR eIF4B DE <i>LEISHMANIA INFANTUM</i> ATRAVÉS DA IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS E EVENTOS DE FOSFORILAÇÃO.....	63
5.1.1 Avaliação da expressão do EIF4B.....	63
5.1.2 Investigação de mudanças pós-traducionais do EIF4B.....	65
5.1.3 Produção de lisados celulares e avaliação da imunoprecipitação do EIF4B fusionado ao epítopo HA.....	66
5.1.4 Análise da interação de possíveis parceiros ligantes por ensaios de <i>Western-blot</i> e espectrometria de massas.....	68

5.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS DO FATOR eIF5 EM <i>LEISHMANIA INFANTUM</i>	70
5.2.1 Avaliação da expressão do EIF5.....	70
5.2.2 Produção de lisados celulares e avaliação da imunoprecipitação do EIF5 fusionado ao epítipo HA.....	71
5.2.3 4 Análise da interação de possíveis parceiros ligantes por espectrometria de massas.....	73
5.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA LINJ.33.0390 EM <i>L. INFANTUM</i> E IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS.....	74
5.3.1 Subclonagem do gene LinJ.33.0390 no pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA.....	74
5.3.2 Avaliação da expressão do LINJ.33.0390.....	75
5.3.3 Produção de lisados celulares e avaliação da imunoprecipitação do LINJ.33.0390 fusionado ao epítipo HA.....	76
5.3.4 Análise da interação de possíveis parceiros ligantes por ensaios de <i>Western-blot</i> e espectrometria de massas.....	77
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA ZC3H41 EM <i>L. INFANTUM</i> E IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS.....	79
5.4.1 Subclonagem do gene ZC3H41 no vetor de expressão bacteriana.....	80
5.4.2 Expressão e purificação da proteína ZC3H41 recombinante.....	80
5.4.3 Ensaios de eficiência, sensibilidade e especificidade do anticorpo policlonal ZC3H41.....	81
5.4.4 Avaliação da expressão do ZC3H41.....	82
5.4.5 Produção de lisados celulares e avaliação da imunoprecipitação do ZC3H41 fusionado ao epítipo HA.....	83
5.4.6 Análise da interação de possíveis parceiros ligantes por ensaios de <i>Western-blot</i> e espectrometria de massas.....	85
5.4.7 As populações de mRNAs associadas com ZC3H41.....	87
6 DISCUSSÃO.....	90
7 CONCLUSÕES.....	99
REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

Doenças provocadas por protozoários têm sido negligenciadas por diferentes órgãos públicos e organizações privadas que financiam recursos que podem ser destinados para a melhora da saúde e da pesquisa. Como consequência, milhões de pessoas no mundo ainda continuam a serem acometidas por essas parasitoses. Logo, ainda percebe-se uma necessidade de compreender a biologia desses microrganismos bem como a interação desses nos respectivos hospedeiros, a fim de se encontrar métodos, seja de prevenção ou tratamento, mais eficazes para diminuir os casos de morbidade e mortalidade mundial.

Os tripanossomatídeos são responsáveis por uma considerável parte dos efeitos danosos das doenças provocadas por protozoários. Entre estes se destacam então várias espécies causadoras de doenças de impacto mundial e de interesse médico, como as espécies de *Leishmania* (leishmanioses), o *Trypanosoma brucei* (doença do sono) e o *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas). Estes organismos divergiram muito cedo na linhagem evolutiva dos eucariotos e do ponto de vista molecular apresentam características peculiares, como a regulação da sua expressão gênica, a nível pós-transcricional, mediada pelo controle da estabilidade dos mRNAs e da sua tradução, na síntese proteica.

Nos eucariotos, a etapa do processo de síntese proteica mais sujeita a mecanismos de regulação é a iniciação da tradução, que compreende todas as etapas que precedem a formação da primeira ligação peptídica da nova proteína. Esta começa quando a subunidade menor ribossomal, juntamente com o tRNA iniciador, formam o complexo de pré-iniciação que se associa então ao mRNA na sua extremidade 5'. Uma vez ligada ao mRNA, a subunidade ribossomal identifica o códon de iniciação da tradução, o que leva à subsequente junção da subunidade maior ribossomal e ao início da síntese proteica. Nesta etapa, já bem caracterizada em organismos modelos, participam diversas proteínas auxiliares denominadas de *eIFs* (*eukaryotic Initiation Factor* – Fator de Iniciação Eucariótico). Um exemplo de *eIFs* é o complexo eIF4F, formado por três subunidades: eIF4E, eIF4G e eIF4A. Este complexo reconhece a extremidade 5' dos mRNAs e permite a associação da subunidade ribossomal 40S e outros fatores (como o eIF1, eIF1A, eIF2, eIF3 e eIF5)

ao mRNA. Outra proteína importante para o processo é a proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) que se liga a extremidade 3' do mRNA e, durante a tradução, leva a circularização da molécula por meio da sua interação com o eIF4G.

Nos tripanossomatídeos foram identificados múltiplos homólogos para as subunidades do complexo eIF4F e para a PABP, um indicativo de complexidade na iniciação da sua tradução. No intuito de contribuir para uma melhor compreensão de como ocorre a etapa de iniciação da tradução nesses parasitas e descobrir possíveis alvos proteicos (e/ou complexos) passíveis de intervenção para impedir o seu ciclo de vida, este trabalho teve como propósito iniciar a caracterização de quatro fatores, são eles, EIF4B, EIF5, LinJ.33.0390 e ZC3H41, candidatos a participarem desta etapa de síntese proteica interagindo com o complexo eIF4F e/ou fatores relacionados.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

Da ordem Kinetoplastida (Filo Euglenozoa, supergrupo Excavata), os tripanossomatídeos são protozoários unicelulares caracterizados como parasitas intra e extracelulares e que apresentam variações na sua morfologia celular dependendo do ambiente em que se encontram. São causadores de enfermidades que fazem parte das chamadas “Doenças Tropicais Negligenciadas” (DTNs), todas envolvendo um complexo ciclo entre hospedeiro, parasita e ambiente (NOVO et al., 2016). Os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os principais representantes da família Trypanosomatidae, responsáveis pela Doença do Sono (*Trypanosoma brucei*), Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e pelas leishmanioses (*Leishmania*) (SZÖÖR et al., 2010).

A característica que dá nome a ordem Kinetoplastida é a presença de uma única mitocôndria contendo uma extensa região denominada de cinetoplasto, localizado na região basal do flagelo e que congrega o DNA mitocondrial, o kDNA. Este é formado por inúmeras moléculas de DNA circular, extra-nuclear, arranjados em maxi e mini círculos amplamente utilizados em análises moleculares, pois estão intrinsecamente relacionados a maquinaria proteica da mitocôndria (FIDALGO; GILLE, 2011). Outros aspectos moleculares desses microorganismos diferem dos demais eucariotos e parecem ser essenciais para a sobrevivência/virulência do parasita como, por exemplo, a regulação gênica, podendo ser explicada pelo fato desses organismos terem divergido precocemente da linha evolutiva dos eucariotos (STUART et al., 2008).

2.2 GÊNERO *LEISHMANIA* E AS LEISHMANIOSES

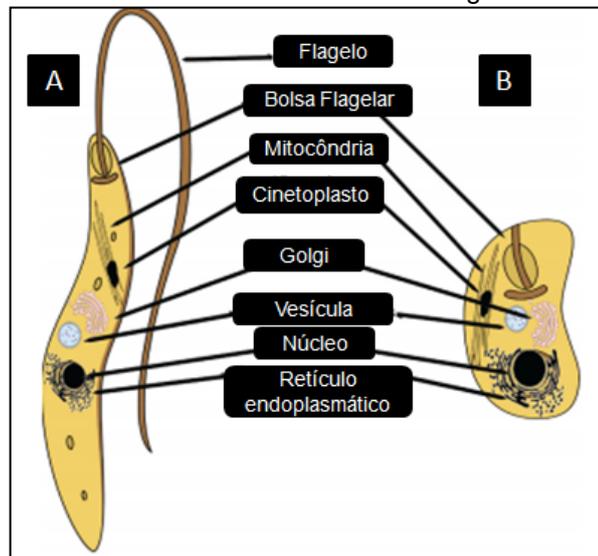
Baseados em estudos genéticos e de caracterização bioquímica existem 29 espécies do gênero *Leishmania*, subdividida em três subgêneros: *Leishmania*, *Vianna* e *Sauroleishmania*. Apenas os dois primeiros são responsáveis por causar as várias formas de leishmaniose no homem e em outros mamíferos, enquanto que

o último acomete os répteis. Os subgêneros *Leishmania* e *Vianna* são diferenciados de acordo com o local de desenvolvimento no trato digestivo do vetor: o primeiro ocorre preferencialmente no intestino médio e anterior; e o segundo, nas porções posteriores do intestino. Dentre as espécies existentes, duas: *Leishmania donovani* e *Leishmania infantum* (conhecida também como *Leishmania chagasi*) causam a forma mais grave da doença, a leishmaniose visceral, potencialmente fatal (BATES, 2007; CHAPPUIS et al. 2007; LEWIS, 1971).

A transmissão do parasita ocorre por meio da picada da fêmea de insetos dípteros conhecidos como flebotomíneos (sub-família Phlebotominae). Das 500 espécies conhecidas do referido inseto, 30 estão intrinsecamente ligadas com a transmissão da doença nas Américas (gênero *Lutzomyia*) e na Europa, Ásia, Austrália e África (gênero *Phlebotomus*). Apenas as fêmeas se nutrem a partir do sangue, geralmente de mamíferos (cão, raposa e tatu). Esses insetos se alimentam a noite e de dia se abrigam em lugares escuros e úmidos, como troncos de árvores, tocas de certos roedores e em lixos. São nesses lugares que os ovos são depositados pelas fêmeas, onde as larvas vão encontrar as condições necessárias para se desenvolver, como matéria orgânica, calor e umidade (GRIENSVEN;DIRO, 2012; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

Os parasitas do gênero *Leishmania* apresentam duas formas evolutivas principais, morfologicamente distintas: amastigota e promastigota (Figura 1). A forma amastigota é intracelular obrigatória, encontrada em células do sistema fagocitário do hospedeiro mamífero, com formato oval ou arredondada e com ausência de flagelo aparente. Mede em média de 1,5 a 3 μm de comprimento por 3 a 6 μm de diâmetro. Já a forma promastigota é extracelular e encontrada no trato digestivo do inseto vetor, alongada e com flagelo livre. Possui dimensões superiores à forma anterior, variando entre 10 a 40 μm de comprimento e 1,5 a 3 μm de diâmetro (NEVES, 2011). A forma promastigota é a mais estudada, por ser cultivada facilmente em meio de cultura, podendo ainda ser subclassificada em promastigota procíclica (móvel, replicativa e não infectante em mamíferos) e promastigota metacíclica (flagelo extenso, não replicativa e infectante) (KAMHAWI, 2006; BESTEIRO et al., 2007).

Figura 1. Morfologia dos parasitas do gênero *Leishmania*. (A) Forma promastigota, e (B) forma amastigota. Promastigotas são alongados com um núcleo, cinetoplasto e um flagelo que é usado para propulsão do parasita e aderência às microvilosidades no intestino do mosquito. Por contraste os amastigotas são arredondados e imóveis devido à falta de flagelos



Fonte: figura adaptado de ZULFIQAR et al.(2017).

2.2.1 Ciclo biológico

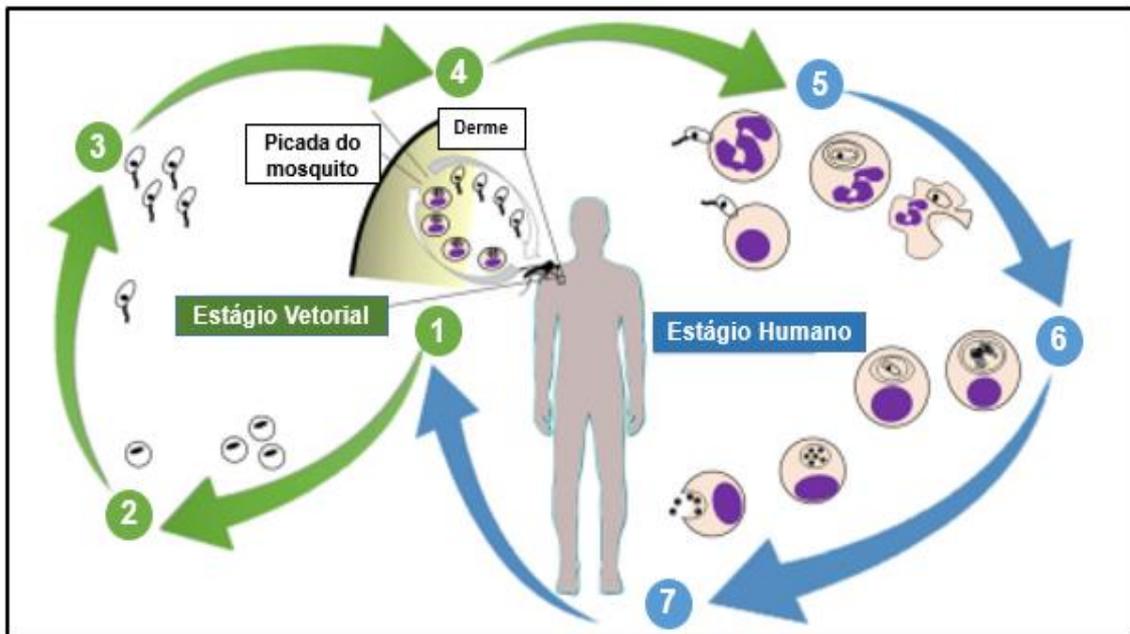
Os protozoários do gênero *Leishmania* são considerados digenéticos, pois necessitam de dois hospedeiros (um invertebrado e o outro vertebrado) para que o seu ciclo de vida se realize. Assim, esses microrganismos estão sujeitos a sofrer sucessivas mudanças ambientais (pH, temperatura ou nutricionais) que os obrigam a realizarem também mudanças fisiológicas e morfológicas e assim se tornarem resistentes e capazes de sobreviver a determinado hospedeiro, manifestando dessa maneira, as diversas formas da doença (KAMHAWI, 2006).

O ciclo biológico das espécies de *Leishmania* se inicia quando o mosquito fêmea realiza um repasto sanguíneo no homem ou em outro mamífero infectado pelo parasita e, juntamente com o sangue, ingere macrófagos que contém as formas amastigotas. No trajeto pelo trato digestivo os macrófagos se rompem, liberando as formas amastigotas que realizam então divisão binária e sofrem a mudança morfológica para a forma evolutiva que mais se adapta ao ambiente fisiológico do inseto, as formas promastigotas, primariamente procíclicas (BESTEIRO *et al.*, 2007). Após sucessivas divisões binárias estas são então armazenadas na probóscide do inseto, que compreende a região do esôfago, faringe e válvula estomodeal (STUART

et al., 2008; BORGHI, 2017). Nesse momento ocorre uma nova diferenciação, dando origem à forma altamente infectiva, a promastigota metacíclica. Em decorrência do armazenamento dos parasitas nessa região, e quando de um novo repasto sanguíneo, os músculos responsáveis pela sucção relaxam provocando o refluxo das formas metacíclicas. Ocorre assim a infecção de um novo hospedeiro (KAMHAWI, 2006; BESTEIRO et al., 2007).

O hospedeiro vertebrado é infectado pelas formas promastigotas metacíclicas, transmitidas no momento do repasto sanguíneo do inseto que alberga o parasita. Estas são liberadas e depositadas na pele por meio da formação de feridas, principal forma de transmissão da doença, originada pela introdução do aparelho bucal do inseto. Ao alcançarem a corrente sanguínea, estes microrganismos por serem estranhos ao organismo do hospedeiro ativam as células do sistema imunológico da linhagem fagocitária, sendo então capturados por macrófagos formando o fagossomo (BATES, 2007; STUART et al., 2008). No interior da referida célula, o fagossomo se junta com vesículas contendo enzimas digestivas (lisossomos), formando o fagolisossomo (ou vacúolo parasitóforo), uma defesa da célula que busca destruir o agente invasor. No entanto, mesmo com a acidificação do pH desta organela e com o aumento da temperatura que ocorre devido a mudança de hospedeiro, o parasita evidencia a sua resistência (ainda não bem elucidada) diferenciando-se em amastigota, forma altamente adaptada para sobreviver em pH ácido (KRAMER et al., 2012). Ocorre em seguida uma intensa proliferação do protozoário dentro do macrófago, levando ao rompimento da membrana celular e a liberação das formas amastigotas para o meio externo. Estas podem ser então capturadas por outras células fagocitárias, ocorrendo um aumento da sua taxa de proliferação. Com o repasto sanguíneo por um novo inseto, todo o ciclo é reiniciado, conforme demonstrado na figura 2 (STUART et al., 2008; ZULFIQAR et al., 2017).

Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania*, o agente causador das leishmanioses. (1) O mosquito fêmea do inseto ingere macrófagos infectados durante o repasto sanguíneo em um mamífero infectado. (2) As formas amastigotas são liberadas pelos macrófagos infectados dentro dos vetores e são convertidas em promastigotas no intestino posterior/intestino médio. (3) Os parasitas proliferam, se diferenciam em promastigotas infecciosas e migram para as glândulas salivares do inseto. (4) Durante um novo repasto sanguíneo em áreas expostas da pele de humanos, a fêmea do inseto injeta as formas de promastigotas infectantes. (5) Os parasitas são capturados por fagócitos no tecido dérmico, inicialmente por neutrófilos de curta duração (o primeiro leucócito recrutado para o local da picada que posteriormente entra em apoptose) e, posteriormente por macrófagos. (6) Além dos parasitas fagocitados, os macrófagos também fagocitam os neutrófilos apoptóticos infectados. (7) Dentro de macrófagos, promastigotas estabelecem uma residência intracelular e se transformam em amastigotas aflagelados, onde se multiplicam e são liberados após a lise celular, quando muitos amastigotas estão presentes no fagolisossomo, resultando em reinfeção de outras células.



Fonte: figura adaptada de BORGHI et al. (2017).

2.2.2 Manifestações clínicas

Existem três principais formas das leishmanioses: cutânea, a mais comum, compromete a pele; mucocutânea ou espúngica; e a visceral, também conhecida como Calazar, a forma mais grave e que se não tratada adequadamente, é fatal.

A leishmaniose cutânea (LC) ou tegumentar acomete a pele causando lesões única ou múltiplas, principalmente ulcerações em áreas expostas do corpo como membros superiores e inferiores, pois facilitam a ação do inseto vetor da doença. Inicialmente é uma lesão indolor com a presença de pápulas e com o progresso de semanas a meses origina-se um nódulo central que posteriormente formará a úlcera. Se não tratadas, essas lesões são autorresolutivas deixando apenas cicatrizes

deprimidas de superfície lisa com coloração diferente da pele. No Brasil, é causada por espécies como a *Leishmania braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis*, assim como a *L. mexicana* e *L. panamensis* na América como um todo (BRASIL, 2009; DAVID; CRAFT, 2009; PACE, 2014).

A depender do estado imunológico do indivíduo infectado e da espécie do parasita, ele pode desenvolver uma leishmaniose cutânea difusa (LCD). Essa forma ocorre devido a uma anergia imunológica, ou seja, quando o organismo não possui nenhum tipo de reação imune celular para combater o agente invasor, sendo caracterizado então como imunocomprometido. Então ocorre a disseminação do parasita por tecidos, linfa e corrente sanguínea, originando várias lesões nodulares pela pele, com o envolvimento de mucosas contendo um infiltrado parasitário. No Brasil é causada pela espécie *L. amazonensis* (BRASIL, 2009; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) também chamada de espúngica é mais grave que a LC, pois se caracteriza pela invasão e destruição de áreas de mucosa, principalmente da boca, nariz e garganta. A disseminação do parasita ocorre lentamente, às vezes não causa destruição inicial, o que mascara a injúria sofrida pela mucosa que passa despercebida. Inicialmente esse infiltrado na mucosa apresenta ulcerações superficiais que posteriormente se tornam bem desenvolvidas provocando a necrose do local com a perda de tecido e dando origem não apenas a aparências desfigurantes, principalmente na face, mas também prejudicando a função de determinado órgão ou sistema. A *L. braziliensis* é responsável pela maioria dos casos da LMC (CHAPPUIS et al., 2007; TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A leishmaniose visceral (LV) ou Calazar é a forma mais grave da doença, pois acomete os órgãos internos e é fatal se não tratada em tempo hábil. O período de incubação é de três a oito meses e a população de risco inclui principalmente crianças, indivíduos imunocomprometidos e desnutridos. Os acometidos pela LV apresentam ataque de febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia (em decorrência do infiltrado dos parasitas nos tecidos) e anemia. Algumas crianças apresentam ainda características de diarreia crônica e retardo no crescimento. A progressão desses sintomas ocorre rapidamente em semanas ou meses, sendo necessário que a identificação da doença ocorra o mais rápido possível para que se

inicie o tratamento. Logo o diagnóstico diferencial com outras enfermidades é essencial para que a cura não seja retardada ou nem alcançada. A principal espécie causadora desta forma nas Américas é a *L. infantum*.

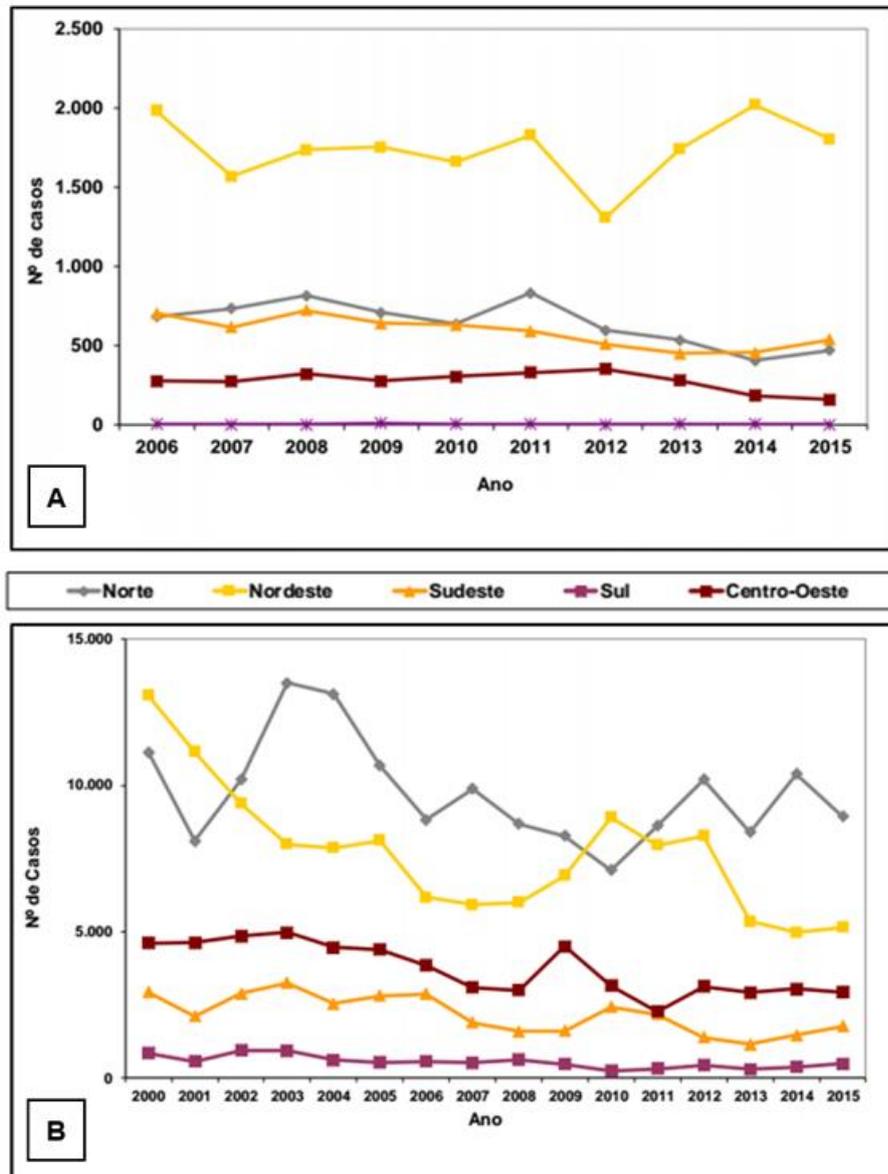
Alguns indivíduos portadores de leishmaniose visceral evoluem, mesmo após o tratamento, para uma disseminação cutânea do parasita, chamada de leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPK). Esta se caracteriza pelo aparecimento de máculas hipopigmentadas ou nódulos infiltrados, geralmente na face e regiões perifaciais podendo se espalhar para outras partes do corpo, inclusive mucosas (BRASIL, 2009; SINGH et al., 2011; PACE, 2014).

2.2.3 Epidemiologia

As leishmanioses afetam entre 12 a 15 milhões de pessoas no mundo, sendo que 350 milhões vivem em locais que apresentam riscos de adquirir a doença. A incidência de casos por ano é de 1,5 a 2 milhões e destes 70.000 chegam à óbito. Com relação à distribuição mundial é encontrada em 97 países de todos os continentes, exceto, Oceania e Antártida. Em conjunto constituem a sétima mais importante doença tropical e a terceira doença parasitaria, perdendo apenas para a malária e a esquistossomose em relação a mortalidade e morbidade, representando sérios problemas de saúde mundial e socioeconômicos (WHO, 2017; ZULFIQAR et al., 2017).

Em 2015, 90% dos casos globais de LV foram reportados em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Os 10 países com maior número de casos de CL relatados em 2015 são: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos representam 87% da incidência global de CL relatada. No Brasil a região mais afetada pela LV ainda é a Nordeste, seguida da Sudeste e Norte. Já em relação a LC a região Norte é a mais atingida e, posteriormente, a Nordeste e Centro-Oeste (Gráfico 1) (BRASIL, 2017; WHO, 2017).

Gráfico 1: Casos de leishmaniose por regiões brasileiras em 2015. (A) leishmaniose visceral e (B) leishmaniose cutânea.



Fonte: adaptado de Brasil (2017).

Os fatores que contribuem para a dispersão das leishmanioses são: mudanças climáticas e de temperatura, desmatamento, imunossupressão pelo HIV, transplante de órgão ou imunoterapia, viagens para regiões endêmicas, guerras, desastres naturais, comunidades menos favorecidas socioeconomicamente e resistência às drogas utilizadas no combate desta doença (principalmente os antimoniais pentavalentes). O tratamento da doença ainda não é totalmente eficiente e carece de estudos voltados para a melhoria da saúde de pessoas que vivem em áreas de riscos. Estas ficam aprisionadas aos medicamentos disponíveis atualmente

e aos seus diversos efeitos colaterais dentre eles, a sua alta toxicidade. Por muitas vezes, esta reação adversa obriga a suspensão da medicação por um tempo determinado, podendo ocorrer a resistência a droga e a progressão da doença (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

2.3 ASPECTOS DA BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

É sabido que espécies de *Leishmania*, assim como outros tripanossomatídeos, apresentam peculiaridades na sua biologia molecular que os fazem diferenciar dos demais eucariotos. Isso se deve ao fato destes organismos terem divergido muito precocemente na linhagem evolutiva eucariótica, adquirindo características moleculares que lhe são únicas. Também está associado a sua condição de vida, parasitando dois hospedeiros muito distintos (invertebrado e vertebrado), o que requer do parasita uma certa resistência às mudanças fisiológicas e uma rápida capacidade de adaptação para sua sobrevivência (MARTINEZ-CARVILLO et al., 2010). A descoberta e estudo dessas peculiaridades teve um avanço considerável com o advento de estudos genômicos derivados do sequenciamento de vários genomas de diferentes tripanossomatídeos, dentre os quais se enquadraram os denominados “TriTryps”, *T. brucei* (BERRIMAN et al., 2005), *T. cruzi* (EL-SAYED et al., 2005) e *L. major* (IVENS et al., 2005), como são conhecidas as três espécies que inicialmente tiveram seus genomas estudados.

2.3.1 Transcrição policistrônica

Os genomas dos tripanossomatídeos são organizados em grandes conjuntos de genes policistrônicos codificantes de proteínas que, em sua grande maioria, não apresentam introns. Como consequência dessa organização genômica, estes genes estão densamente agrupados e separados por regiões intergênicas ricas em pirimidinas que auxiliam no processamento do RNA mensageiro e na regulação gênica (EL-SAYED et al., 2005). A típica e peculiar organização dos genes de tripanossomatídeos foi observado pela primeira vez no cromossomo 1 de *L. major*, que agrupa seus 85 genes em dois blocos distintos, um com 32 e o outro com 53

genes (MARTINEZ-CARVILHO et al., 2010). Arranjos em série dos genes de RNA ribossômico (rRNA) são encontrados entre os agrupamentos maiores de genes policistrônicos, transcritos pela RNA Polimerase I, enquanto que os genes de RNA transportador (tRNA) são transcritos pela RNA Polimerase III e estão organizados em grupos principalmente localizados nos limites dos aglomerados policistrônicos (LIANG et al., 2003). Até o momento, estudos apontam uma escassez de promotores para a RNA Polimerase II que reflete na ausência de alguns fatores de transcrição típicos, com exceção de um único promotor típico que atua na sequência *spliced-leader* no processo de maturação do RNA mensageiro (mRNA) (MARTINEZ-CALVILLO et al., 2010; KRAMER; CARRINGTON, 2011).

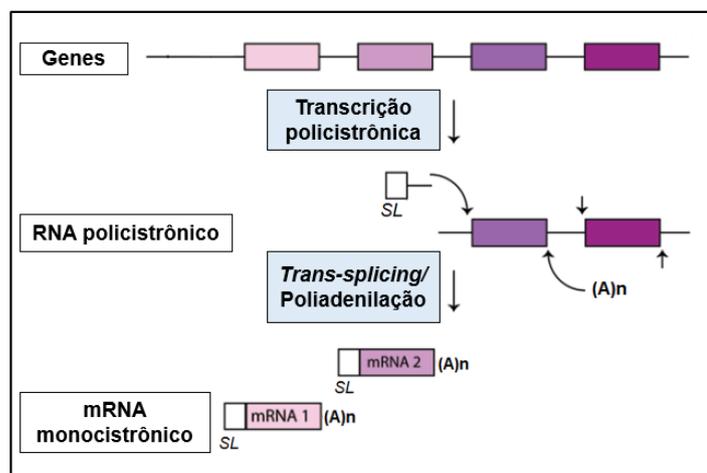
Na maioria dos eucariotos o processo de transcrição é denominado de monocistrônica, onde um promotor é utilizado para a expressão de um único gene, resultando na regulação individual da expressão de cada gene ao nível da sua transcrição. Diferentemente, os tripanossomatídeos se assemelham mais aos *operons* bacterianos, pois em decorrência dos policístrons um único promotor permite a transcrição de vários genes. Ao contrário do que se observa nos *operons* bacterianos, contudo, não há nenhuma relação funcional entre os genes que se encontram na mesma unidade policistrônica. Isso denota que os tripanossomatídeos tem uma dependência exclusiva nos processos pós-transcricionais para regular a sua expressão gênica, como o processamento de mRNAs e sua tradução em proteínas (JÄGER et al., 2008; HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

2.3.2 Processamento de RNA: *trans-splicing*, cap4 e poliadenilação

Nos tripanossomatídeos, durante o processo de maturação do mRNA, unidades dos pré-mRNAs policistrônicos são processados em monocístrons por duas reações de clivagens. A primeira se dá na extremidade 5' da molécula, pelo processo de *trans-splicing*, e resulta na adição de uma sequência de 39 nucleotídeos (*Spliced Leader - SL*), proveniente de outro transcrito independente, à esta região de praticamente todos os mRNAs maduros. A segunda, na extremidade 3' do mRNA maduro, coincide com a poliadenilação da molécula. Um trato rico em pirimidina comum localizado entre duas regiões codificantes de proteínas adjacentes

no precursor policistrônico, é o sinal que direciona ambos os processos e rege o seu processamento: para a poliadenilação na extremidade 3' do gene anterior e para a adição da sequência SL na extremidade 5' do gene seguinte (Figura 3) (LIANG et al., 2003; GUNZL et al., 2010).

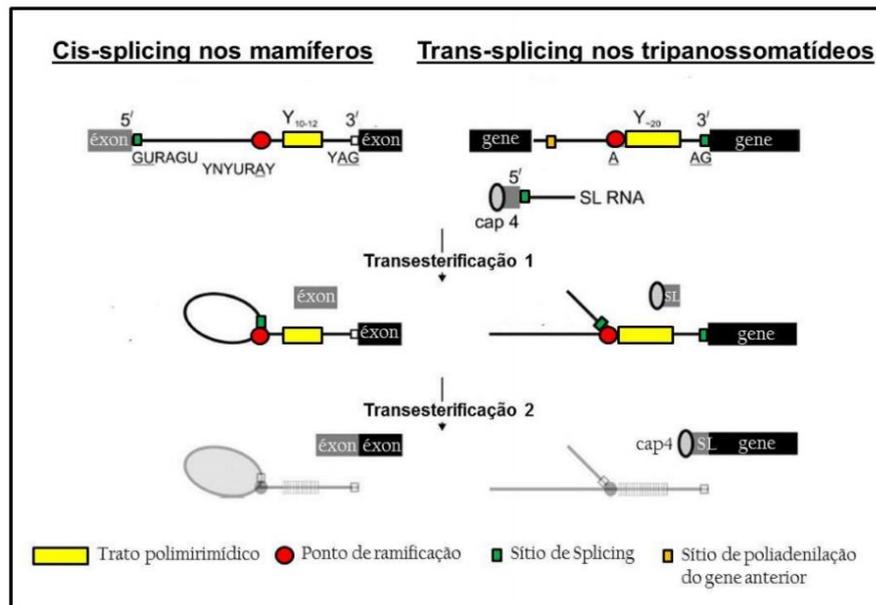
Figura 3: Representação esquemática da maturação de mRNA por *trans-splicing* e poliadenilação. Agrupamentos de genes que codificam proteínas de funções não relacionadas são transcritos via transcrição policistrônica e depois processados por acoplamento de *trans-splicing* e mecanismos de poliadenilação, dando origem a mRNA monocistrônicos maduros. (A) n, cauda poli (A).



Fonte: figura adaptada de DE GAUDENZI et al. (2011).

O *trans-splicing* ocorre a partir de uma reação com duas etapas de *trans*-esterificação, formando uma estrutura em “Y”, produto da junção do pré-mRNA e da sequência SL. Esta estrutura se compara ao laço intermediário formado pela retirada dos íntrons no processamento convencional observado em eucariotos (*cis-splicing*) (figura 4) (SULAMIT, 2012). Juntamente com a SL, uma estrutura *cap* (7-metilguanossina) modificada em tripanossomatídeos, denominada de *cap4*, também é adicionada e aparentemente encontrada na extremidade 5' de todos os mRNAs maduros destes organismos (KRAMER; CARRINGTON, 2011).

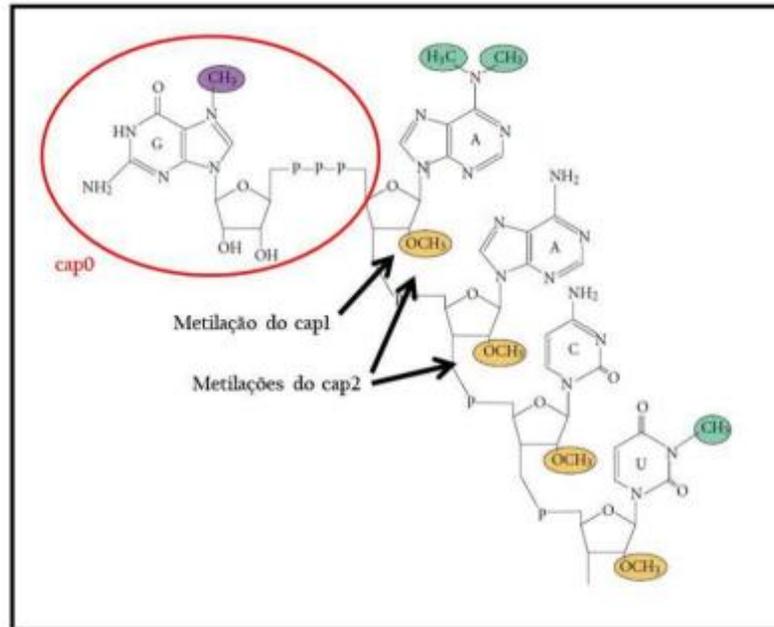
Figura 4: Diferenças no mecanismo de *cis* e *trans*-splicing nos eucariotos. Enquanto que em sistemas de mamíferos, os sítios 3'e 5' de *splicing* e o ponto de ramificação exibem sequências parcialmente conservados (R, purina, Y, pirimidina, N, qualquer base), não há nenhuma conservação de sequências óbvia no ponto de ramificação e no sítio de processamento 3' dos tripanossomatídeos. As sequências parcialmente conservadas em mamíferos necessitam de um trato de polipirimidinas pequeno (10 a 12 resíduos). Já nos tripanossomatídeos este trato de polipirimidinas é maior (cerca de 20 resíduos), e é um determinante essencial para um processamento eficiente, estando tipicamente posicionado imediatamente após o ponto de ramificação. Em seguida à reação de *trans*-esterificação, no *cis*-*splicing* o íntron é retirado formando um laço, enquanto que uma estrutura intermédia em forma de Y é gerada no processo de *trans*-*splicing*. Após a segunda *trans*-esterificação, ambas as estruturas são desramificadas e rapidamente degradadas, e os éxons são reunidos.



Fonte: figura adaptada de GUNZL (2010).

O *cap* é uma estrutura encontrada em todos os eucariotos como um sinal que define a extremidade 5' de boa parte, senão de todos, os mRNAs maduros, requerido para manter a estabilidade desses e uma tradução eficiente (HALL; HO, 2006). O número de metilações, em eucariotos, pode variar desde a metilação inicial da 7-metil-guanosina adicionado ao primeiro nucleotídeo por meio de uma ponte trifosfato (*Cap0*) a metilações adicionais nas riboses do primeiro (*Cap1*) ou do primeiro e segundo (*Cap2*) nucleotídeos do mRNA (SHUMAN, 2002). Em tripanossomatídeos o *cap* encontrado é hipermetilado, uma vez que, juntamente com as duas metilações citadas anteriormente, possui mais duas metilações nas riboses dos dois nucleotídeos subsequentes da sequência *SL*, além de duas metilações inéditas nas bases nitrogenadas do primeiro e quarto nucleotídeos, como ilustrado na figura 5 (ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012).

Figura 5: Estrutura do *cap4* de tripanosomatídeos. As metilações em amarelo, são as quatro metilações do carbono 2' das riboses que ocorrem nos primeiros 4 nucleotídeos (AACU) do *SL* dos tripanosomatídeos. O *cap1* só possui a primeira metilação e o *cap2* possui a primeira e segunda. Além destas metilações, os tripanosomatídeos possuem mais dois nucleotídeos que possuem metilações diretamente nas bases nitrogenadas (o primeiro e o quarto). Circulado em vermelho, o *cap* propriamente dito, o m^7GTP , adicionado ao primeiro nucleotídeo por meio de uma ponte trifosfato. Sua própria metilação está indicada em roxo, e é realizada por meio da enzima guanina N-7 metiltransferase.



Fonte: figura adaptada de ZINOVIEV e SHAPIRA (2012).

Ao contrário do que ocorre na maioria dos eucariotos, alguns estudos sugerem que o *trans-splicing* e a poliadenilação em tripanosomatídeos são eventos dependentes que ocorrem concomitantemente e logo após a transcrição, visto que ambos os mecanismos utilizam o mesmo sinal para realizar o processamento do pré-mRNA, a região rica em pirimidinas. De uma forma geral em eucariotos superiores, uma sequência consenso AAUAAA localizada na extremidade 3' não traduzível é utilizada como sinal para a adição consecutiva de adeninas pela enzima Poli-A Polimerase (PAP), auxiliada pela proteína de ligação a cauda poli-A (PABP). A PABP se liga quando essa cauda tem cerca de 10 resíduos de adenosinas aumentando a afinidade da enzima PAP pelo mRNA alvo (KERWITZ, 2003) e conferindo uma estabilidade à molécula, evitando assim que este sofra degradação por exonucleases no transporte ao citoplasma para realização da síntese proteica.

Nos tripanosomatídeos não foram encontradas sequências específicas como a região AAUAAA para o sinal de poliadenilação (HAILE; PAPADOPOLOU, 2007).

Ao invés disso, a poliadenilação ocorre a uma distância fixa antes do sinal de processamento. No início desta descoberta, estudos mostraram que 100 a 400 nucleotídeos separavam estas duas regiões (LEBOWITZ et al., 1993; MATTHEWS et al., 1994). No caso do *trans-splicing*, recentemente foi identificada que a distância entre o sítio AG onde este ocorre e a região polipirimídica é de cerca de 140 nucleotídeos, com a metade dos genes possuindo uma distância entre 128 e 178 nucleotídeos (KOLEV et al., 2010). Já o mecanismo que determina o sítio de adição da cauda poli-A ainda permanece desconhecido.

2.3.3 Controle da expressão gênica nos tripanossomatídeos

Devido a sua transcrição policistrônica e constitutiva, a escassez para promotores clássicos da RNA polimerase II e por seu genoma codificar poucos fatores de transcrição, acredita-se que os tripanossomatídeos tenham perdido a capacidade da regulação gênica a nível transcricional (CAMPBELL et al., 2003; IVENS et al., 2005). Estudos recentes, porém, indicam que a iniciação da transcrição pela RNA polimerase II tem sido regulada por modificação de histonas nesses parasitas, mais precisamente em relação à acetilação e metilação (FERNÁNDEZ-MOYA; ESTEVEZ, 2010). No caso da acetilação, direcionada a resíduos de lisinas na região N-terminal de histonas, seu efeito é provocar a descondensação da cromatina, facilitando o acesso da RNA polimerase e fatores de transcrição à região que será transcrita. A metilação caracteriza a condensação da cromatina e, como consequência a interrupção da expressão gênica (COSTA; PACHECO, 2013).

Em tripanossomatídeos as evidências sugerem então que a regulação da expressão gênica ocorra predominantemente no nível pós-transcricional, mais precisamente ao nível do controle da estabilidade do mRNA e na utilização deste na síntese proteica (FERNÁNDEZ-MOYA; ESTEVEZ, 2010). Sabe-se que diferentes grupos de genes presentes nas mesmas unidades policistrônicas apresentam padrões de expressão diferentes dentro da célula. Isso em parte se deve ao fato de alguns mRNAs sofrerem processos diferenciados de degradação, pela ausência e/ou remoção de fatores estabilizadores, correlacionando diretamente às diferenças no tempo de meia vida com níveis de expressão (FRANKS; LYKKE-ANDERSON,

2008; HAILE; PAPADOPOLOU, 2007). Por outro lado, a tradução dos mRNAs em proteínas também é um ponto importante de regulação ainda em investigação, como descrito a seguir. Modificações pós-traducionais que as proteínas podem apresentar também podem ter impacto na regulação da expressão gênica, pois essas modificações determinam a atividade, localização e interação com outras proteínas que podem ser vitais para a atividade metabólica celular do parasita (LEY; CARVALHO, 2017; PANICKER et al, 2017).

2.4 PROCESSO DE SÍNTESE PROTEICA EM EUCARIOTOS

A síntese proteica é um processo complexo onde participam um grande número de proteínas e fatores, e sua regulação permite que a célula gere uma resposta rápida para sinais externos e internos (ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012). Esse processo possibilita que a informação genética contida no mRNA mensageiro na etapa da transcrição seja traduzida em proteínas, moléculas imprescindíveis para o crescimento, proliferação e desenvolvimento celular. A tradução é dividida em quatro fases distintas denominadas: iniciação, alongação, terminação e reciclagem dos ribossomos.

A iniciação da tradução é predominantemente vista como a fase limitante do processo de síntese de proteínas, servindo assim como alvo para uma multiplicidade de mecanismos reguladores (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009; VALÁSEK, 2012). Nesta etapa ocorre a montagem das subunidades ribossomais menor (40S) e maior (60S) junto ao mRNA, mediada pelo recrutamento e ação dos chamados fatores de iniciação da tradução, eIFs (*eukaryotic Initiation Factors*). A função desses fatores, além de recrutar as subunidades ribossomais é promover o posicionamento correto destas no códon de iniciação AUG (JACKSON et al., 2010). As fases subsequentes à iniciação apresentam um grupo limitado de fatores passíveis de regulação (LIVINGSTONE et al., 2010).

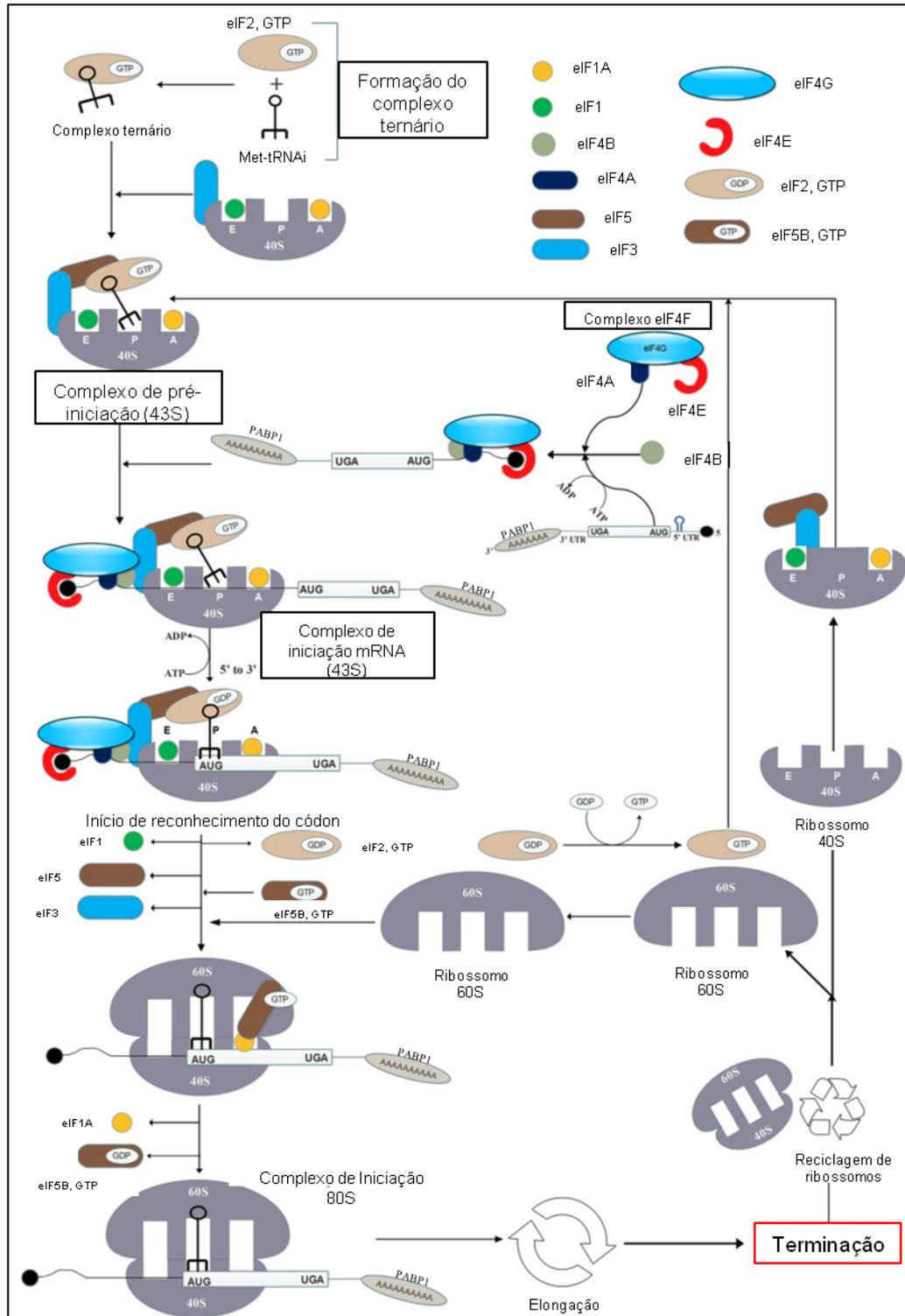
2.4.1 Iniciação da tradução

A iniciação da tradução em eucariotos depende da ação de pelo menos 12 fatores de iniciação, congregando cerca de 25 polipeptídeos diferentes que irão auxiliar na montagem e posicionamento correto dos ribossomos para dar início a síntese proteica (JACKSON et al., 2010; AITKEN; LORCH, 2012). Como ilustrado na figura 6, o processo se inicia da seguinte forma:

- 1) Seleção do RNA transportador inicial (Met-tRNA_i) pelo eIF2, na sua forma ligada ao GTP, formando o complexo ternário;
- 2) Recrutamento da subunidade menor ribossomal (40S) pelo complexo eIF3, juntamente com os fatores eIF1, eIF1A e eIF5, denominados de Complexo Multifatorial (CMF). Este irá se juntar com o complexo ternário formando o complexo de pré-iniciação (43S).
- 3) Concomitantemente, ocorre a associação do complexo eIF4F no *cap* na extremidade 5' do mRNA. O complexo eIF4F é formado por três subunidades: o fator eIF4E, responsável pela ligação do complexo ao *cap*; o eIF4G, uma proteína estruturadora que apresenta sítios de ligação para várias proteínas; e o eIF4A, uma RNA helicase com função de desfazer possíveis estruturas secundárias que dificultem a identificação do códon de iniciação da tradução. Um outro fator participante do processo que auxilia a função do eIF4F, mas que não está inserido no complexo, é o eIF4B, que reforça a atividade helicase do eIF4A.
- 4) O complexo de pré-iniciação se associa ao mRNA por meio da interação entre o complexo eIF3 e a subunidade eIF4G do eIF4F, formando o complexo 48S;
- 5) Ocorre então o deslocamento do complexo formado pela subunidade menor ribossomal e fatores de iniciação ao longo da região 5' não traduzida do mRNA, a procura do primeiro códon AUG em contexto favorável para iniciar a tradução. Essa movimentação é facilitada pelos fatores eIF4A e eIF4B citados anteriormente.

- 6) A identificação do primeiro codon a ser traduzido se dá pelo pareamento do AUG com o seu anti-códon no tRNA_i (Met-tRNA_i). Esta etapa exige ainda a ação do fator eIF5, uma proteína com função GTPásica que promove a hidrólise do eIF2-GTP em eIF2-GDP e Pi, durante ou depois da ligação do complexo de pré-iniciação ao mRNA. Estas moléculas, no entanto, ainda permanecem associado ao eIF2 até o reconhecimento correto do códon de iniciação da tradução, quando são liberadas.
- 7) Para finalizar o processo é requerida a ação de uma segunda GTPase, o eIF5B, que promove a junção da subunidade 60S com a 40S e estabiliza a ligação do tRNA_i no sítio P da subunidade 40S, permitindo a montagem do ribossomo 80S completo junto ao mRNA.
- 8) Todos os fatores de iniciação do complexo dissociam-se também pela ação do eIF5B, juntamente com o eIF6 e o ribossomo então se torna competente para a elongação da cadeia peptídica junto ao mRNA;
- 9) O eIF2-GTP é recomposto em reação catalisada pelo eIF2B, se associando ao tRNA_i e formando um novo complexo ternário: eIF2, GTP e tRNA_i (JACKSON et al., 2010; LORSCH; DEVER, 2010; AITKEN; LOUCH, 2010; YÁNGUEZ; NIETO, 2011; HERNANDEZ et al., 2012; VALASÉK, 2012; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012; PISAREVA; PISAREV, 2014).

Figura 6: Mecanismos da iniciação da tradução eucariótica. Formação do complexo de pré-iniciação (43S) constituído pela subunidade ribossomal 40S, eIF2-GTP, Met-tRNAi, eIF1, eIF1A, eIF3 e possivelmente eIF5; Associação do complexo 43S ao mRNA; Varredura da região 5' não traduzida pelo complexos 43S; Reconhecimento do códon AUG de iniciação da tradução e formação do complexo de iniciação 48S; Junção da subunidade ribossomal 60S ao complexo 48S e dissociação sequencial de eIF2-GDP e outros fatores de tradução mediados pelo eIF5B; Hidrólise de GTP por eIF5B e liberação do EIF1A e eIF5B ligado ao ribossomo 80S, compatível com início da síntese proteica propriamente.

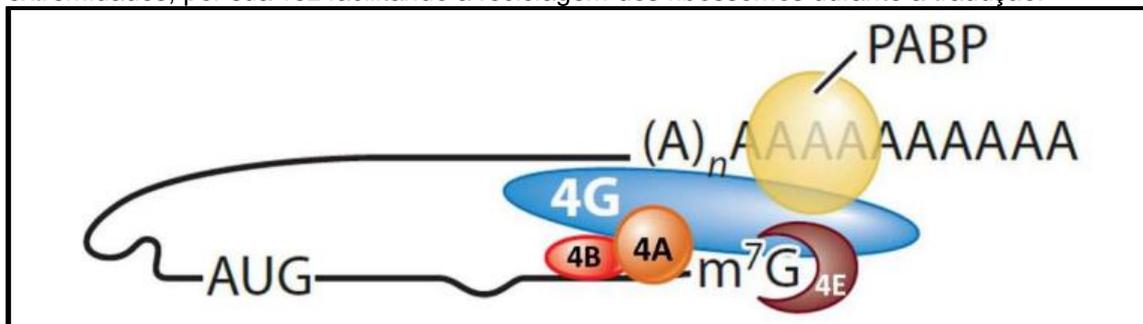


Fonte: figura adaptada de ALI et al. (2017).

2.4.2 O complexo eIF4F e a proteína de ligação a cauda poli-A

Dentre outros fatores presentes na etapa da iniciação da tradução, o complexo eIF4F é o primeiro fator relatado com múltiplas subunidades (eIF4E, eIF4A e eIF4G) trabalhando em conjunto, reconhecido por recrutar as subunidades ribossomais para o mRNA (SONENBERG; DEVER, 2003; CARVAJAL-GAMEZ et al., 2012). A proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) também participa nesta etapa, atuando de forma a permitir o reconhecimento pelo referido complexo de estruturas presentes em ambas as extremidades do mRNA e provocando a sua circularização durante o processo de tradução (Figura 7) (LLOYD, 2006).

Figura 7: Complexo eIF4F e circularização do mRNA por meio da PABP. O eIF4E é responsável pela ligação direta ao cap enquanto que o eIF4A, uma RNA helicase, desfaz as estruturas secundárias que possam existir na 5'UTR, facilitando a ligação da subunidade menor ribossomal e a identificação do codon AUG. Já o eIF4G promove a estruturação do complexo eIF4F interagindo com várias proteínas e com a PABP, o que leva a circularização do mRNA e a aproximação das suas extremidades, por sua vez facilitando a reciclagem dos ribossomos durante a tradução.



Fonte: figura adaptada de HINNEBUSCH (2014).

2.4.2.1 Fator eIF4E: a proteína de ligação ao *cap*

O fator eIF4E (25,1kDa), a proteína de ligação ao *cap*, reconhece esta estrutura na extremidade 5' dos mRNAs por meio de dois resíduos de triptofano conservados. Devido à sua natureza de taxa limitante, uma leve superexpressão de eIF4E (~ 2,5 vezes) transforma células normais em células imortalizadas em camundongos transgênicos (RUGGERO et al., 2004). A fosforilação do eIF4E em resposta à estimulação extracelular leva a uma incontrolável tradução, proliferação e inibição da apoptose celular (BHAT et al., 2015).

A interação eIF4E-eIF4G é um alvo importante para o controle da síntese protéica, pois as proteínas de ligação ao eIF4E (*4E-binding protein*) e algumas outras proteínas contêm um motivo peptídico que se assemelham ao sítio de ligação do eIF4G pelo eIF4E. Este motivo tem, no máximo, 15 aminoácidos e, é a partir desta região, que estas proteínas competem com o eIF4G controlando a taxa de associação da subunidade ribossomal menor com o mRNA e, conseqüentemente, a iniciação da tradução (RITCHER; SONNEMBERG, 2005).

2.4.2.2 Fator eIF4A: a RNA helicase

O eIF4A (46,2 kDa), pertence à família de proteínas DEAD-*box* e é uma proteína ATPase RNA-dependente com função de RNA helicase e que atua rompendo estruturas secundárias presentes no mRNA. Sua ação facilita assim a ligação e deslocamento do complexo 43S ao longo do RNA mensageiro (ANDREOU; KLOSTERMEIER, 2013). Em contrapartida, se comparando com outras helicases da mesma família, o eIF4A apresenta uma baixa atividade ATPásica e uma baixa afinidade pelo RNA quando está livre. Estas atribuições são aumentadas e reforçadas quando há a atuação do fator dentro do complexo eIF4F (mediada mais precisamente pelo fator eIF4G) e, simultaneamente pela sua interação com o eIF4B (LINDER; JANKOWSKY, 2011).

As proteínas DEAD-*box* usam a energia do ATP para desfazer regiões curtas de fita dupla de RNAs, mas parece que nenhuma destas helicases possuem uma alta capacidade de desmanchar estruturas secundárias do mRNA sozinhas, fato que dificulta a procura do codon de iniciação da tradução pela unidade ribossomal menor. Em contrapartida, estudos *in vitro* mostram que apenas a adição do eIF4A já é suficiente para auxiliar a subunidade ribossomal, no entanto, não está claro que o mesmo aconteça *in vivo* (MERRICK, 2010).

2.4.2.3 Fator eIF4G: a proteína que estrutura o complexo eIF4F

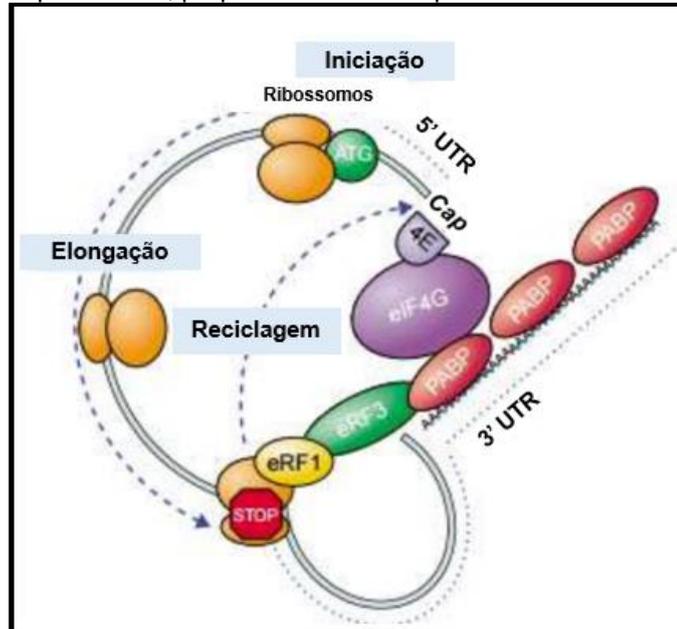
O eIF4G (175,5 kDa) é uma proteína estruturadora em torno da qual o mRNA, subunidades ribossômicas e o complexo de ligação ao *cap* é montado para realizar a tradução. Este fator melhora a associação de eIF4E com a estrutura de *cap* por mecanismos alostéricos. Na sua região N-terminal possui sítios de ligação para o eIF4E e para a PABP, enquanto que nas regiões central e C-terminal se ligam o eIF4A e o eIF3 (Figura 10) (GROSS et al., 2003; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009; HARMS et al., 2014). Em leveduras uma observação importante é que não foi identificada a interação do eIF4G com o eIF3 e sim com o eIF5 e eIF1 (ASANO et al., 2001). Um estudo *in vitro* mostrou que um determinado inibidor da iniciação da tradução, o 4EGI-1, poderia reduzir a interação eIF4G-eIF4E em melanoma humano e em células cancerosas de mama levando à inibição do crescimento desses cânceres em modelos de camundongos (CHEN et al., 2012). Este estudo demonstrou o potencial terapêutico de se inibir a formação do complexo eIF4F.

2.4.2.4 PABP: a proteína de ligação à cauda poli-A

Apesar de não ser um fator de iniciação da tradução clássico ou pertencente ao complexo eIF4F, a PABP apresenta uma importância no processo de síntese protéica, pois a sua interação com o complexo eIF4F, mais precisamente com o eIF4G, leva a circularização do mRNA e potencializa a tradução. Esta ação, segundo alguns estudos, auxilia na volta dos ribossomos para a região 5' do mesmo mRNA para que um novo ciclo de tradução seja iniciado. Esta etapa é denominada de reciclagem dos ribossomos e fortaleceria a iniciação da tradução e estabilidade do mRNA, pois dessa forma evitaria a sua degradação, e o aumento da taxa de síntese protéica como um todo (Figura 8) (AMRANI et al., 2008). No entanto, alguns estudos propõem que a ligação eIF4G-PABP não é crítica para que esta etapa seja eficiente, apenas represente uma das diversas interações que estabilizam o eIF4G na ligação ao mRNA. De fato em leveduras foi mostrado que essa interação era dispensável para o crescimento celular (PARK et al., 2010; VALÁSEK, 2012). Além

disso a PABP interage ainda com outros fatores como o eIF4B e duas proteínas regulatórias, Paip 1 e Paip 2 (SONEMBERG; DEVER, 2003).

Figura 8: Visão geral das etapas da síntese proteica nos eucariotos. Ilustração das interações entre os fatores de iniciação da síntese proteica, fatores de terminação (eRF1 e eRF3) e a circularização do mRNA pela PABP, preparando o mRNA para reiniciar todo o processo.



Fonte: figura adaptada de SONEMBERG e DEVER (2003).

2.5 SÍNTESE PROTEICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Apesar do advento do sequenciamento genômico e da descoberta da grande conservação gênica dos tripanossomatídeos em relação aos demais eucariotos, alguns aspectos ainda precisam ser estudados a respeito das particularidades no modo de ação dos eIFs na iniciação da tradução desses parasitas. Avanços, contudo, já foram obtidos na caracterização de alguns destes polipeptídicos e complexos, enquanto que outros ainda permanecem sem um esclarecimento ao certo da sua real função. Para facilitar sua descrição, esses fatores foram separados naqueles constituídos por polipeptídicos únicos (eIF1, eIF1A, eIF4B, eIF5, eIF5B e eIF6) e complexos com várias subunidades (eIF2, eIF2B, eIF3 e eIF4F) (DE MELO NETO et al., 2016). Vale salientar que apesar da PABP não ser considerada um típico fator de tradução, a sua função é de grande valia para a iniciação da síntese proteica e por esta razão aqui foi tratada de forma diferenciada.

2.5.1 Fatores polipeptídicos únicos

Este grupo de fatores (eIF1, eIF1A, eIF4B, eIF5, eIF5B e eIF6), de uma forma geral, está mais envolvido no recrutamento das subunidades ribossomais e tRNAⁱ e no auxílio a montagem correta das subunidades ribossomais no códon AUG, assim como descrito em eucariotos. Estes fatores têm ortólogos únicos prontamente identificáveis em tripanossomatídeos, observados dentro de genomas variados disponíveis no banco de dados *TriTrypDB*. A única exceção é o eIF4B que é mais divergente em sequência, como exemplificado por uma comparação de humanos, levedura e planta (HERNANDEZ; VAZQUEZ-PIANZOLA, 2005). Este não tem ortólogos claramente identificáveis em sequências genômicas de tripanossomatídeos (DE MELO NETO et al., 2016).

2.5.2 Fatores constituintes de complexos de múltiplas subunidades

Os complexos eIF2 (três subunidades: eIF2 α , eIF2 β e eIF2 γ) e eIF3 (12 subunidades, nomeadas de eIF3a a eIF3l em mamíferos) apresentam atribuições semelhantes às já conhecidas em eucariotos, diferenciando apenas de quais subunidade é responsável em exercer determinada função. Ortólogos de subunidades do eIF2 foram encontrados em sequências de genomas de tripanossomatídeos, mas até agora apenas o ortólogo da subunidade eIF2 α foi investigada (DE MELO NETO et al., 2016). As outras duas subunidades do eIF2 ainda não foram devidamente caracterizadas, mas seus ortólogos foram identificados e as três subunidades co-precipitam com o complexo eIF3 e subunidades do complexo eIF4F (MELEPPATTUS et al, 2015; ZINOVIEV et al., 2011). No caso do eIF3, ortólogos de 11 subunidades foram identificados em tripanossomatídeos (eIF3a a eIF3l – REZENDE et al., 2014) com o ortólogo da subunidade eIF3a em *Leishmania* indicando a sua presença em um Complexo Multifatorial (CMF), já conhecido de outros eucariotos, com os ortólogos de eIF1, eIF1A e eIF5 (MELEPPATTU et al, 2015). O complexo eIF2B (cinco subunidades: eIF2B α , eIF2B β , eIF2B γ , eIF2B δ e eIF2B ϵ) , por sua vez, ainda não foi estudado formalmente nos tripanossomatídeos.

2.5.3 Complexo eIF4F e a PABP

No caso do complexo eIF4F e da sua proteína parceira PABP foram identificados em tripanossomatídeos dois homólogos de eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII - nomeados de acordo com a similaridade funcional com os fatores equivalentes em humanos), seis de eIF4E (do EIF4E1 ao EIF4E6), cinco de eIF4G (do EIF4G1 ao EIF4G5); e três homólogos da PABP (da PABP1 a PABP3) (DA COSTA LIMA et al., 2010; DHALIA et al., 2005; FREIRE et al., 2014A; FREIRE et al., 2014B). Estes serão descritos com mais detalhes a seguir.

2.5.3.1 eIF4As

O primeiro homólogo do eIF4A foi identificado em *Leishmania*, denominado de *LeIF*, como uma proteína imunologicamente relevante que é constitutivamente expresso nas fases amastigotas e promastigotas do parasita (SKEIKY et al., 1998). Ortólogo dos eIF4AI e eIF4AIII foram posteriormente caracterizados em *L. major* e *T. brucei*, ambos com mais de 50% de similaridade de sequência com a proteína eIF4AI de humano. Estudos relatam que apenas o EIF4AI de *Leishmania* está envolvido na iniciação da síntese proteica, visto que, em *L. major* esta proteína está em grande quantidade no citoplasma e é capaz de interagir com homólogos de eIF4G, diferentemente do EIF4AIII. Este, localizado no núcleo, se apresenta em uma quantidade inferior da célula e não interage com nenhuma outra proteína conhecida envolvida na tradução (DHALIA et al., 2005; DHALIA et al., 2006).

2.5.3.2 eIF4Gs

Os cinco homólogos do eIF4G foram descritos tanto em *T. brucei* como em *L. major* (DHALIA et al., 2005). Todos os cinco polipeptídeos identificados compartilham o domínio central conservado de ligação ao eIF4A, eIF3 e RNA e evidenciam uma semelhança com sequências de mamíferos, plantas e leveduras do respectivo fator (DHALIA et al., 2005). Ensaio de interação *in vivo* e *in vitro* entre estes homólogos

com outras proteínas evidenciou que apenas o EIF4G3 e o EIF4G4 parecem exercer funções mais diretas na tradução e que os outros não apresentam uma participação equivalente nesta.

O EIF4G3 interage com os EIF4E4 e EIF4AI e, o EIF4G4 com o EIF4E3 e também com o EIF4AI, sugerindo a formação de dois complexos do tipo eIF4F diferentes (YOFFE et al., 2009). No entanto, recentemente em *T. brucei*, estudos mostraram que a supressão do EIF4G3 a partir da sua depleção por RNAi afetou o crescimento celular e a síntese proteica, já a do EIF4G4 não causou mudanças na tradução (MOURA et al., 2015). Logo, os resultados apontam que o homólogo EIF4G3 apresenta um grande potencial de atuar diretamente no principal complexo da iniciação da tradução.

2.5.3.3 eIF4Es

Os homólogos de eIF4E foram identificados baseados em buscas de semelhanças com as sequências do referido fator de mamíferos ou leveduras contra sequências genômicas de *Leishmania*. Em *L. major* um primeiro candidato homólogo foi inicialmente identificado e caracterizado como uma proteína citoplasmática e com afinidades equivalentes de interação ao *cap* monometilado e tetrametilado, denominado *LeishIF4E-1* (YOFFE et al., 2004). Posteriormente, os seis homólogos de eIF4E foram descritos em *Leishmania* (apenas os EIF4E1 a 4 - DHALIA et al., 2005) e depois em *T. brucei* (EIF4E1 a 6 - FREIRE et al., 2011; FREIRE et al., 2014A), todos apresentando tamanhos variados. O EIF4E1 e o EIF4E4 têm afinidade tanto pelo *cap* tetrametilado de tripanossomatídeos (*cap4*) quanto ao *cap* monometilado clássico (DHALIA et al., 2005).

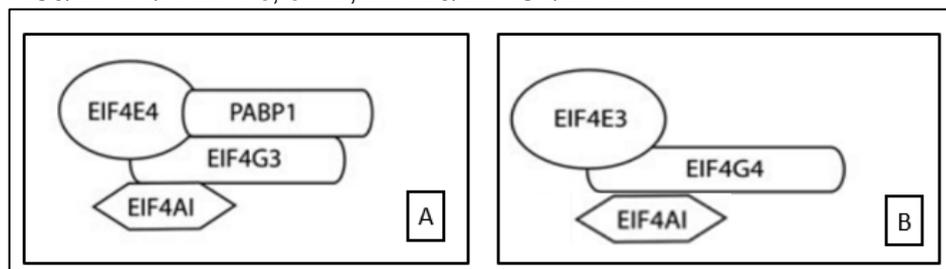
Segundo Freire e colaboradores (2017) os homólogos EIF4E1 e 2 não estariam envolvidos diretamente na tradução, mas com funções essenciais para a viabilidade celular. Apenas os EIF4E3 e EIF4E4 estão associados à formação de complexos eIF4F típicos nessa espécie interagindo com os EIF4G4 e EIF4G3, respectivamente (MOURA et al., 2015). Os dois complexos do tipo eIF4F citados anteriormente são EIF4G3/EIF4E4/EIF4AI e EIF4G4/EIF4E3/EIF4AI. No entanto, estudos revelaram que o EIF4E3 tem baixa afinidade pelo *cap4* de

tripanossomatídeos, logo também pode não ser um forte candidato a tradução em tripanossomatídeos (ZINOVIEV et al., 2012). Já o EIF4E4 interage ainda com outros fatores de tradução como a PABP 1 e 2 e com ortólogo de eIF5 e de eIF5B, sendo este então um forte candidato a participar diretamente do processo de tradução (ZINOVIEV et al., 2011; de MELO NETO et al., 2016; FREIRE et al., 2017).

2.5.3.4 PABPs

Três homólogos da PABP (PABP1, PABP2 e PABP3) foram identificados e caracterizados em sequências de *L. major* sendo que apenas os dois primeiros são conservados em *T. cruzi* e *T. brucei* (DA COSTA LIMA et al., 2010). Estudos evidenciaram que os três homólogos apresentam localização citoplasmática, entretanto foi observado que as três proteínas diferem na maneira de se ligar ao RNA alvo e que em caso de inibição da transcrição, apenas a PABP1 permanece no citoplasma e as outras duas migram para o núcleo. Acrescentando a esse fato, dados *in vivo* e *in vitro* mostraram que as PABP2 e PABP3 interagem entre si, e nenhuma das duas interagem com a PABP1 e, apenas esta última evidenciou interação em *Leishmania* com um dos complexos eIF4F ilustrados na figura 9. Logo, a PABP1 apresenta uma grande probabilidade de participação direta na síntese proteica dos tripanossomatídeos (DA COSTA LIMA et al., 2010).

Figura 9: Os dois diferentes complexos eIF4F formados pelos respectivos homólogos de eIF4E, eIF4G, eIF4A e PABP caracterizados em tripanossomatídeos. Em A, EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI/PABP1 e, em B, EIF4E3/EIF4G4/EIF4AI.



Fonte: figura adaptada de DE MELO NETO et al. (2016).

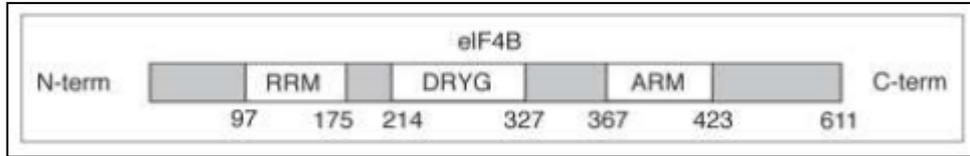
2.6 FATORES PROTEICOS DO ESTUDO

2.6.1 eIF4B

O fator eIF4B é o único das proteínas do grupo eIF4, como as demais subunidades do complexo eIF4F, que ainda não foi investigado nos tripanossomatídeos, uma vez um outro fator, eIF4H, só é encontrado em metazoários. Mesmo em eucariotos mais bem estudados, contudo, o papel de eIF4B (69.2kDa) na iniciação da tradução não é bem compreendido e encontram-se controvérsias em relação a sua real importância para a síntese proteica. Em alguns estudos realizados foi relatado que o eIF4B é independente do complexo eIF4F e não essencial para iniciação da tradução (DMITRIEV et al., 2003). Em contrapartida, estudos recentes mostraram que a produção deste fator na iniciação da tradução estimula a atividade eIF4A, por regra, por meio de um ciclo conformacional. Foi relatado ainda a sua interação com o complexo eIF3 por intermédio da subunidade eIF3A, podendo interagir indiretamente com o complexo eIF4F (HARM et al., 2014). Essa ligação do eIF4B e o eIF3A é fortalecida após a fosforilação do eIF4B que é induzida pela ativação de uma proteína S6K quinase, uma fosfoproteína implicada na expressão de genes relacionados ao controle da tradução (SHAHBAZIAN et al., 2010).

Em algumas espécies, os homólogos do eIF4B se estruturam da seguinte forma: na sua região N-terminal um domínio RRM, motivo de reconhecimento de RNA; na região central o domínio DRYG, uma região hidrofílica rica em ácido aspartático, arginina, resíduos de tirosina e glicina; e na região C-terminal o domínio ARM (motivo rico em arginina) (Figura 10). Os domínios RRM e ARM auxiliam na ligação ao mRNA, enquanto o motivo DRYG interage com o eIF3 (eIF3A em mamíferos e, eIF3G em leveduras) e promove a dimerização da proteína (SHAHBAZIAN et al., 2010). Em plantas e animais já foi observada a interação do eIF4B com a PABP, eIF4A e eIFiso4G (isoforma do eIF4G em plantas) (CHENG; GALLIE, 2010; GALLIE; LIU, 2014).

Figura 10: Estrutura do eIF4B em mamíferos. A figura apresenta os motivos RRM e ARM, responsáveis pela ligação ao RNA e o DRYG, importante na dimerização da proteína e interação com alguns fatores.



Fonte: figura adaptada de SHAHBAZIAN et al. (2010).

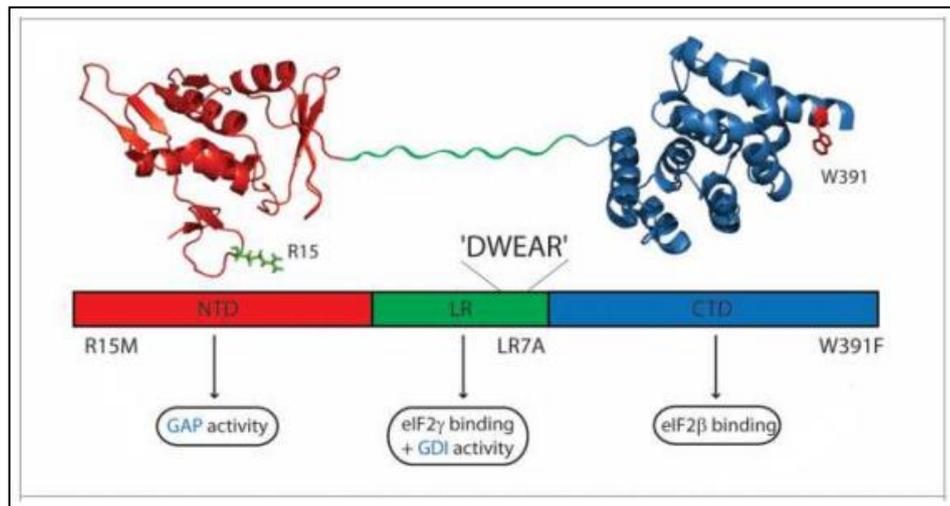
2.6.2 eIF5

A proteína do eIF5, de aproximadamente 45 kDa, é um dos mais importantes polipeptídeos da iniciação da tradução em eucariotos do qual muito pouco se conhece nos tripanossomatídeos. Encontrada apenas em eucariotos, têm como uma de suas funções recrutar a subunidade menor ribossomal juntamente com outros fatores, eIF1, eIF1A e eIF3, formando o complexo multifatorial já descrito em leveduras, plantas e mamíferos. Em leveduras o eIF5, junto com o eIF1, atua como ponte permitindo o recrutamento da subunidade ribossomal e demais fatores para o mRNA, através de uma ligação direta com o fator eIF4G. Ela também atua como ativadora GTPásica (GAP), estimulando a hidrólise do GTP pelo eIF2, durante ou depois da ligação do complexo de pré-iniciação ao mRNA, em eIF2-GDP + Pi (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009; PISAVERA; PISAREV, 2014). O eIF5 ainda apresenta uma função de inativação da reciclagem do eIF2 estabilizando a ligação do EIF2 ao GDP (atividade de GDI). Esta atividade será desativada pelo fator eIF2B, que dissocia o eIF5 e a molécula de GDP do eIF2, liberando este último para a reciclagem. Da mesma forma o eIF5 promove a dissociação de outros fatores do complexo 48S, como o eIF1 e eIF3, pois apenas a hidrólise do GTP não é suficiente. Sua ação possibilita que o complexo multifatorial seja reconstituído e os referidos fatores sejam então liberados (JENNINGS; PAVITT, 2010).

De acordo com a figura 11, o eIF5 apresenta dois domínios independentes: o domínio N-terminal (NTD) que contém um resíduo crítico de arginina (R15) e é fundamental para a função GAP; e um domínio C-terminal (CTD) conhecido por mediar a interação com eIF1, eIF2 β (subunidade β do eIF2) e o eIF3, sendo também responsável pela atividade GDI. Uma região central denominada de LR, com

estrutura ainda não bem conhecida apresenta um motivo de resíduos conservados chamado de DWEAR. Já foi descrito que mutações nesse motivo ou em triptofanos conservados na região CTD suprimem a função GDI, evidenciando que ambos os domínios são requeridos para esta função (JENNINGS; PAVITT, 2010). Logo, as funções GAP e GDI são necessárias para funcionamento correto do eIF5 na tradução.

Figura 11: Esquema ilustrativo da estrutura dos domínios de eIF5. A figura mostra o domínio N-terminal (NTD) do eIF5, região de ligação (LR) que contém o motivo DWEAR e o domínio C-terminal (CTD). Mutações relevantes e com impactos funcionais em cada domínio são indicadas por R15M, LR7A e W391F.



Fonte: figura adaptada de JENNINGS e PAVITT (2010).

2.6.3 Proteínas possíveis parceiras de homólogos da PABP

O interesse pelas proteínas descritas a seguir foi despertado a partir de resultados obtidos pelas técnicas de imunoprecipitação e espectrometria de massas com homólogos da PABP1 e PABP2 (em espécies de *L. infantum* e *T. brucei*) pelo grupo de pesquisa ao qual está inserido este trabalho e colaboradores. A partir da análise dos resultados foi observado que a presença dessas proteínas era marcante com outras proteínas já conhecidas sugerindo então, a formação de possíveis novos complexos que sejam de grande relevância em uma investigação da função da PABP e de complexos associados, como os complexos do tipo eIF4F já descritos.

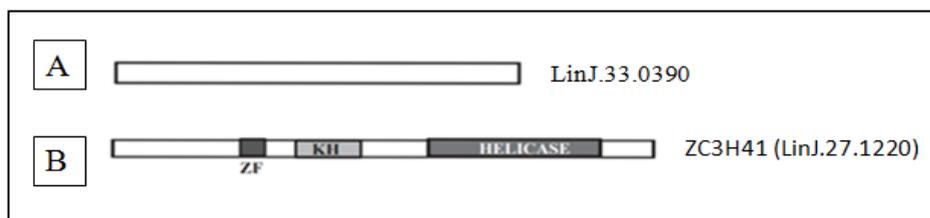
Então, para ter um entendimento mais geral destas, os dados do *TriTrypDB* foram consultados para que os experimentos laboratoriais fossem iniciados.

2.6.3.1 LinJ.33.0390 e ZC3H41

O gene LinJ.33.0390, localizado no cromossomo 33 de *L. infantum*, de aproximadamente 37 kDa é codificada para uma proteína hipotética e conservada. Não há nenhum relato em literaturas nem mesmo no *TriTrypDB* da sua possível função. No entanto, apresenta vários ortólogos em espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, todas se apresentando como proteína hipotética, sem exceção.

A proteína ZC3H41 (LinJ.27.1220) localizada no cromossomo 27 de *L. infantum* tem tamanho predito de aproximadamente 60 kDa e também apresenta vários ortólogos em *Leishmania* e *Trypanosoma*. No entanto, diferentemente da proteína citada anteriormente, esta apresenta um domínio de reconhecimento de RNA do tipo KH, um domínio C-terminal da superfamília de helicases, além do *Zinc Finger* (ZF) (Figura 12). Estudos realizados recentemente *in vitro* e *in vivo* mostraram que uma determinada proteína ZF em *T. brucei* estabiliza mRNAs em resposta à estresse celular, enquanto que a fosforilação desta *in vivo* causa instabilidade. Também foi observado que a região 3' *UTR* do seu mRNA suprime sua tradução podendo então estar envolvida na regulação desta etapa (MINIA; CLAYTON, 2016).

Figura 12: Esquema ilustrativo das sequências dos genes LinJ.33.0390 e ZC3H41. Em A, o gene LinJ.33.0390 sem nenhuma evidencia ainda na literatura e, em B, o ZC3H41 e suas possíveis propriedades proteicas.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel funcional na iniciação da síntese proteica de quatro parceiros putativos de subunidades do complexo eIF4F de *Leishmania infantum* e da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) mediante a caracterização de sua expressão e identificação de parceiros funcionais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

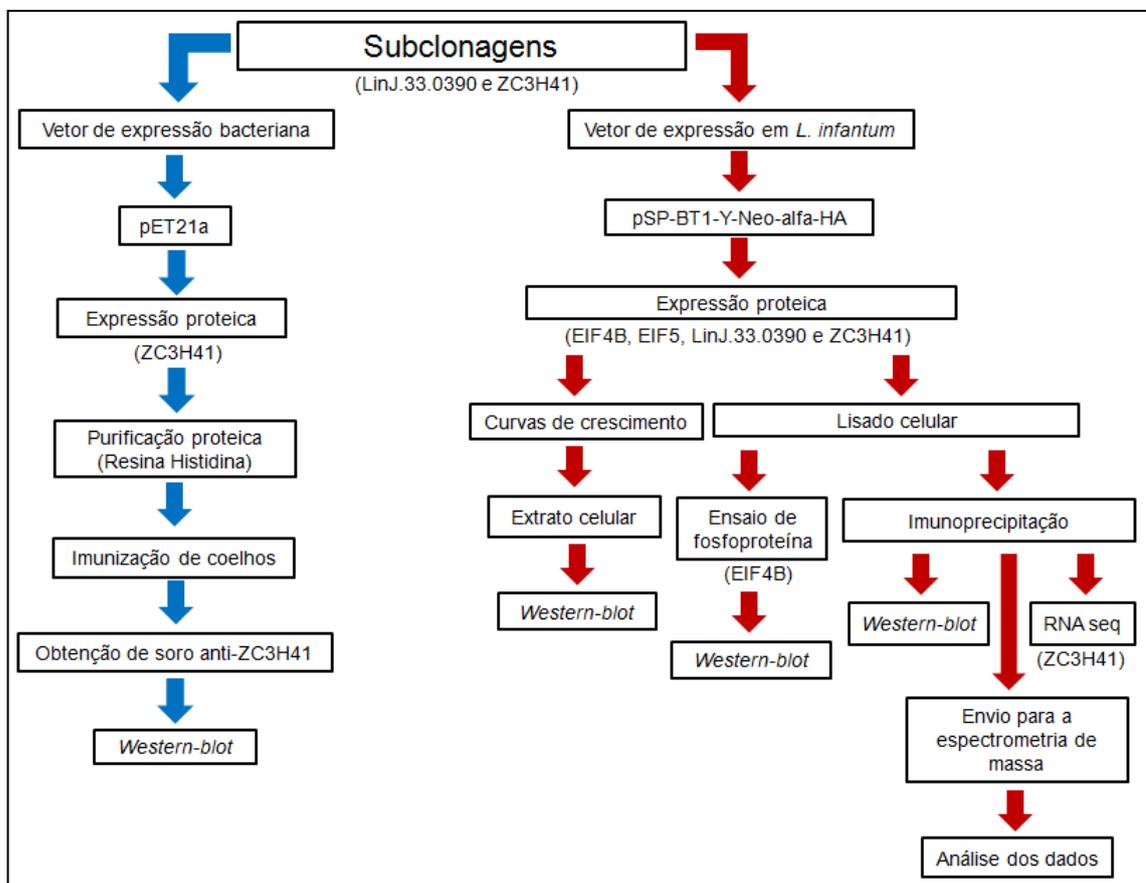
- a) Avaliar a expressão, investigar a natureza de modificações pós-traducionais e identificar parceiros funcionais de um possível ortólogo do fator eIF4B de *L. infantum*;
- b) Avaliar a expressão e identificar funções conservadas e divergentes do fator eIF5 de *L. infantum* através de identificação de interações conservadas ou não com parceiros funcionais;
- c) Identificar parceiros funcionais com vistas a definir a contribuição da proteína hipotética LinJ.33.0390 para a função de homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) de *L. infantum*.
- d) Investigar a função exata da proteína hipotética com dedos de zinco (*Zinc-Finger*) ZC3H41, originalmente identificada como parceira da PABP1, através da avaliação da sua expressão, identificação de parceiros proteicos e caracterização de mRNAs alvos.

4 PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

4.1 FLUXOGRAMA DE PROCEDIMENTOS METODOLÓGICOS

Para um melhor entendimento das metodologias utilizadas neste trabalho, mais sucintamente, foi realizado um esquema em fluxograma (Figura 13).

Figura 13: Esquema ilustrativo do fluxograma de procedimentos metodológicos. Metodologias utilizadas para o desenvolvimento deste trabalho e os genes e as proteínas que foram necessários para cada etapa.

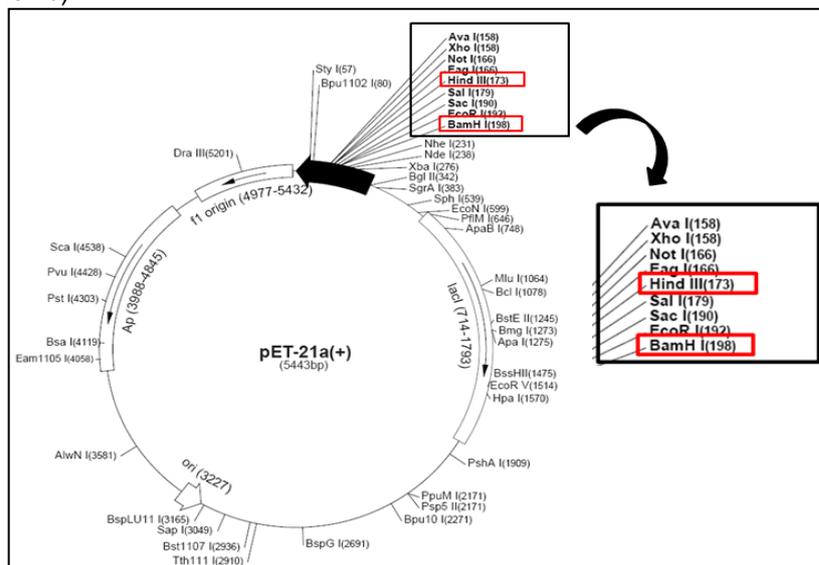


Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

4.2 CONSTRUÇÃO PLASMIDIAL DOS GENES LINJ.33.0390 E ZC3H41 EM VETORES DE EXPRESSÃO

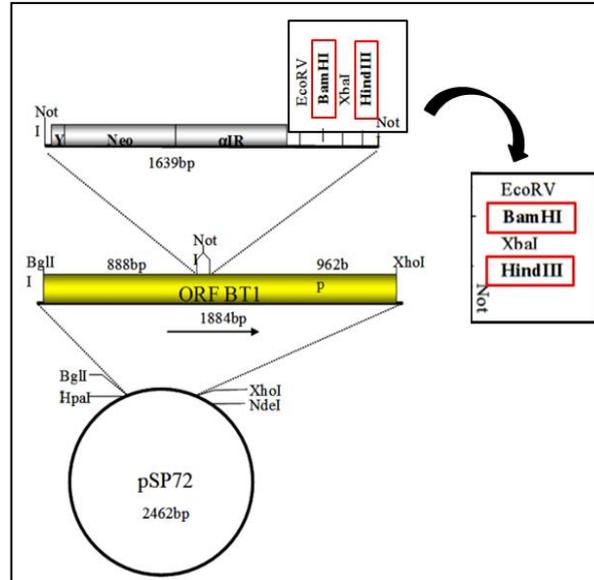
As construções plasmidiais dos genes LinJ.33.0390/pGEM-T easy e ZC3H41/pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA (já disponíveis no laboratório) foram submetidas a digestão dupla com as enzimas BamHI e HindIII. Os fragmentos liberados foram purificados por meio do “GE Healthcare Life Sciences PCR DNA and Band Purification Kit” conforme recomendação do fabricante. Em seguida, os fragmentos do ZC3H41 foram ligados ao plasmídeo pET21a (Novagen®) (Figura 14) e o LinJ.33.0390 ao pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA (Promega®) (Figura 15), todos já disponível no laboratório. Proporções variadas de inserto e plasmídeo foram utilizadas (a depender da quantificação do DNA em ng/μl pelo programa Nanodrop) juntamente com a enzima T4 DNA ligase (New England BioLabs®) e seu respectivo tampão para volume final de 10 μl.

Figura 14: Mapa do vetor plasmidial de expressão pET21a, fusionado a sequências de poli-histidina na extremidade C-terminal. Os sítios das enzimas de restrição utilizados foram: BamHI e HindIII (em vermelho).



Fonte adaptada: NOVAGEN (2017)

Figura 15: Mapa do vetor plasmidial de expressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA, fusionado ao epítipo HA (Hemaglutinina). Os sítios das enzimas de restrição utilizados foram: BamHI e HindIII (em vermelho).



Fonte adaptada: NOVAGEN (2017)

Cepas de *Escherichia coli* TOP10 quimiocompetentes foram transformadas por choque térmico, onde se acrescentou 5 μ l da ligação a 50 μ l de células competentes, submetendo o conjunto a 30 minutos no gelo e 5 minutos a 37°C. A solução foi semeada em meio LB (Luria-Bertani) sólido contendo ampicilina (100 μ l/ml) sendo incubadas a 37°C por 16 horas. As colônias formadas na placa foram utilizadas para extração de DNA plasmidial por intermédio do “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit” (Sigma®), conforme a orientação do fabricante. A confirmação das clonagens foi obtida mediante a digestão a 37°C com as enzimas de restrição, por três horas e os DNAs foram quantificados no Nanodrop 2000c (ThermoFisher).

4.3 EXPRESSÃO PROTEICA EM *ESCHERICHIA COLI*

4.3.1 Expressão de proteínas recombinantes

Para a expressão das proteínas recombinantes, o plasmídeo derivado do vetor pET21a contendo o fragmento gênico do ZC3H41 foi transformado em cepas de células BL21 star (Invitrogen®) de *E. coli* mediante e transformação por choque térmico. Para a transformação, as bactérias foram incubadas por 30 minutos a 4°C,

seguido de choque térmico a 37°C por 5 minutos, com subsequente semeio das células transformadas em placa de Petri contendo meio Agar LB (Luria-Bertani) sólido na presença de ampicilina (100 µg/µL) e incubadas a 37°C por 18 horas.

As colônias obtidas foram inoculadas em 20 mL de meio LB líquido contendo antibiótico, como descrito anteriormente, e foram crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm por 18 horas. Para indução da expressão das proteínas recombinantes, alíquotas de 10 mL das culturas crescidas foram inoculadas em 500 mL de meio LB com antibiótico e crescidas a 37°C sob agitação de 180 rpm e o crescimento bacteriano foi acompanhado pela aferição em espectrofotômetro (comprimento de onda de 600nm) até atingir uma densidade ótica (D.O.) entre 0,5 ou 0,8, dependendo da proteína a ser expressa. Em seguida foi adicionado o indutor de síntese de proteínas, IPTG (isopropil-β-D-tio-galactosídeo - Sigma-Aldrich®), na concentração final de 0,1 mM e a cultura permaneceu sob agitação por 4 horas a 30°C (D.O. de 0,5) ou 1 hora (D.O. de 0,8). A visualização da proteína recombinante se deu por meio de eletroforese em SDS-PAGE a 15%, e posteriormente este corado com azul de Coomassie R 250 (Sigma Aldrich).

4.3.2 Purificação de proteínas recombinantes

A purificação da proteína ZC3H41 fusionada a sequência de poli-histidinas foi realizada de acordo com protocolos para proteínas solúveis conforme descrição abaixo. A cultura bacteriana após indução foi centrifugada a 10000 rpm durante 10 minutos e o sedimento bacteriano obtido foi ressuspenso em 20 ml de tampão de lise e equilíbrio (100 mM NaH₂PO₄, 10mM Tris, 8 M uréia , pH 8). A suspensão foi em seguida submetida à ultrassonicação e com posterior centrifugação nas mesmas condições já descritas anteriormente. O sobrenadante foi incubado por 1 hora a 4°C com 300 µl da resina Ni-NTA Agarose (Quiagen), sendo previamente equilibrada por três vezes com 10 ml do tampão de lise suplementado com 20 mM de imidazol. A incubação foi seguida de lavagens, sendo duas delas com o mesmo tampão de lise com 20 mM de imidazol e duas com 30 mM imidazol, para retirada de proteínas ligadas inespecificamente. Para desligar as proteínas recombinantes da resina foram feitas duas eluições com tampão de lise (1 M imidazol e pH 4,5), com duração de

meia hora cada. As amostras obtidas foram congeladas a -80°C . Para análise da eficiência da purificação, alíquotas das amostras foram então fracionadas em gel de SDS-PAGE 15%.

4.3.3 Produção de soros policlonais e ensaios de *Western-Blot*

Os soros policlonais foram obtidos contra a proteína ZC3H41 mediante a imunização de coelhos adultos da raça New Zealand, com a respectiva proteína purificada fusionada a cauda de poli-histidinas. Todos os procedimentos de manipulação dos animais seguiram as normas de bem-estar animal e foram devidamente aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), número 52/2013, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz. Antes da primeira imunização foi coletada uma alíquota de sangue venoso da orelha dos animais para testes posteriores (soro pré-imune).

Em cada processo de imunização (num total de três pulsos, com intervalo de 15 dias entre eles), foram utilizado aproximadamente $150\ \mu\text{g}$ da proteína purificada, isolados diretamente de um gel preparativo SDS-PAGE 10% corado com azul de Coomassie. A região do gel contendo a proteína de interesse foi cortada e macerada num sistema de válvulas acoplado a seringas de 5 ml. Em seguida, foram acrescentados $200\ \mu\text{l}$ de adjuvante de Freund (Gibco BRL Life Technologies) sendo coadjuvante completo na primeira vez e incompleto nas demais e $600\ \mu\text{l}$ de PBS. Os componentes homogeneizados foram aplicados por via subcutânea nos coelhos, em três regiões diferentes do corpo do animal. Após o terceiro pulso foi coletada uma alíquota de sangue venoso da orelha dos animais, para a confirmação da produção dos anticorpos. Depois dessa confirmação, os animais foram sacrificados, sob anestesia, para a retirada de sangue por meio de punção cardíaca e obtenção do soro. Para testar a sensibilidade e especificidade dos soros produzidos contra a proteína foram realizados ensaios de *Western-Blot*. Alíquotas dos soros foram armazenadas a -80°C .

4.4 EXPRESSÃO PROTEICA EM *LEISHMANIA INFANTUM*

4.4.1 Cultivo e transfecção de células

As células de *Leishmania infantum*, nas suas formas promastigotas, foram cultivadas a 26°C em meio Schneider, pH 7,2, suplementados com 10% de soro fetal bovino e 0,2% de hemina. Para a seleção e manutenção das linhagens transgênicas foi necessária a adição de 80 µg/ml do antibiótico Neomicina (G418 da Sigma®). O crescimento dos parasitas foi monitorado por contagem em câmara de Neubauer sendo os parasitas mantidos em fase exponencial de crescimento por meio de repasses sucessivos.

Para transfecção, aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos. O sedimento foi ressuspendido em 1 ml de tampão HEPES-NaCl (21 mM HEPES pH 7,05/ 137 mM NaCl/ 5 mM KCl/ 0,7 mM Na₂HPO₄ / 6 mM glicose) e a etapa de centrifugação foi repetida nas condições citadas. O sedimento foi então ressuspendido em 400 µl do tampão HEPES-NaCl e transferido para cuvetas de 0,2 mm, as quais continham DNA plasmidial (gene de interesse + vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA) numa quantidade de 1 a 2 µg. Para controle negativo foi adicionado apenas os parasitas a cuveta, sem a presença de DNA. As cuvetas permaneceram no gelo por um período de 15 minutos.

O conjunto foi submetido à eletroporação, sendo utilizado o aparelho BioRad Gene Pulser II, com pulso elétrico de 450 V com capacitância de 500 µF (microfaradays). Após o choque, o material foi transferido para garrafa de cultura contendo meio de cultura Schneider pH 7,2 e incubado a 26°C, por 24 horas. Em seguida, foi feita a pré-seleção adicionando a metade da quantidade do antibiótico Neomicina necessária para manutenção da linhagem (40 µg/ml). A cultura foi incubada novamente a 26°C por 24 horas. Na etapa de seleção, 1 ml da cultura foi transferido para nova garrafa contendo 9 ml de meio Schneider pH 7,2, juntamente com 80 µg/ml de Neomicina. As culturas foram incubadas em estufa a 26°C por aproximadamente 10 a 15 dias, até se tornarem viáveis para um repasse celular.

4.4.2 Preparação de extratos totais

A fim de avaliar a expressão das proteínas heterólogas fusionadas ao epítipo HA, foram feitos extratos totais das linhagens transgênicas de *L. infantum*. Para isso, aproximadamente 2×10^6 células/ml de cada linhagem teve seu crescimento acompanhado por cerca de 48 horas até atingir 10^7 células/ml. Destas, 10 ml (10^8 células) foram centrifugadas nas condições citadas no tópico 4.3.1. O sedimento foi lavado com tampão fosfato salino (PBS) para lavagem do excesso de meio e centrifugado novamente nas mesmas condições. Posteriormente, as células foram ressuspensas em tampão de amostra para gel SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 μ l/mL de 2-mercaptoetanol) para concentração final de 5×10^5 célula/ μ l. As amostras foram fervidas por 5 minutos e guardadas a -80°C .

4.4.3 Curvas de crescimento e preparação de extratos totais

Para a realização de curvas de crescimento, foram utilizadas culturas das linhagens transfectadas em meio Schneider com pH 7,2. Ao atingir a fase estacionária, estas foram repassadas para o meio da cultura-teste numa diluição inicial de 10^6 células/mL e adicionadas de neomicina 80 μ g/mL. A partir daí as culturas foram monitoradas e alíquotas de 10^7 células foram retiradas para a avaliação da expressão das proteínas nos pontos 0h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h, pontos estes representativos das principais etapas da curva de crescimento.

A contagem das células foi realizada em Câmara de Neubauer. As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS) para lavagem do excesso de meio e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Posteriormente, foram ressuspensas em tampão de amostra para gel SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 μ l/mL de 2-mercaptoetanol) para uma concentração final de 2×10^5 cél/ μ L. As amostras foram fervidas por 5 minutos e guardadas a -80°C .

4.4.4 Ensaio de purificação e análise de fosfoproteínas

A purificação do conjunto de fosfoproteínas de *L. infantum* foi realizada com o sistema comercial PhosphoProtein Purification Kit (Qiagen), onde foi possível realizar a separação da fração de proteínas fosforiladas do total protéico das células. Cerca de 2×10^8 células de cultura em fase estacionária (96h) foram centrifugadas a 5000 rpm por 10 minutos, lavadas com HEPES 10 mM pH7,0 e centrifugadas novamente nas mesmas condições. O sedimento foi ressuspensionado em 3 ml de tampão de lise proveniente do próprio kit, com nova centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante obtido após a lise foi quantificado por intermédio do método de Bradford, e 25 mg de proteína total foi diluída em 25 ml do mesmo tampão de lise.

Este lisado foi passado em uma coluna de íons metálicos positivamente carregados, e as proteínas fosforiladas (carregadas negativamente) foram atraídas e retidas pela coluna. Nesta etapa, foi coletada a fração não ligante (sobrenadante). Após sucessivas lavagens, foram feitas seis eluições de 500 µl cada. O lisado total (30 µg), a fração não ligante (30 µg) e as eluições (100 µl) foram fracionadas em SDS-PAGE e transferidas para uma membrana de PVDF para detecção das proteínas de interesse por meio de ensaios de *Western-blot*.

4.4.5 Preparação de lisados celulares e ensaios de imunoprecipitação

Para a obtenção da fração citoplasmática de células de *L. infantum*, cerca de 2×10^8 células promastigotas foram coletadas por centrifugação e lavadas com PBS suplementado com 10% de inibidor de protease (Roche®). Em seguida, estas células foram ressuspensas em 500 µl tampão de lise (20 mM de HEPES-KOH pH 7,4/ 75 mM acetato de potássio/ 4mM de acetato de magnésio/ 2 mM de DTT, suplementado com inibidores de protease). Para a lise, as células foram submetidas à diferença de pressão, sendo a ruptura celular monitorada por microscopia óptica. As amostras foram centrifugadas a 12000 rpm durante 10 minutos para remover restos celulares e o sobrenadante armazenado a -80°C.

Para a imunoprecipitação, como todas as proteínas de interesse possuíam o epítipo HA, utilizou-se 0,2 mg de Beads Magnéticas Anti-HA (Pierce™) de acordo com o protocolo do fabricante. Esta foi lavada três vezes com PBS. Em seguida, a resina foi incubada com os lisados celulares por uma hora a 4°C. Após a incubação, o sobrenadante (depletado) foi guardado e a resina, lavada mais três vezes com PBS. Alíquotas do lisado celular original, do lisado depletado após a imunoprecipitação e a resina foram ressuspensos em tampão de amostra para SDS-PAGE, fervidos por 5 minutos e guardados a -80°C.

4.4.6 Ensaio de *Western-blot*

Tanto as amostras provenientes dos extratos totais e lisados celulares quanto às de imunoprecipitação foram analisadas mediante ensaios de *Western-blot* (WB). Após o fracionamento em gel SDS-PAGE, as amostras foram transferidas para membrana de PVDF (Immobilon-P – Millipore®), que foi bloqueada com solução de TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7.5), leite desnatado 5% e Tween-20 a 0,05% em temperatura ambiente por uma hora. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo anti-HA (Sigma®) numa diluição de 1:3000 por 16 horas a 4°C em solução igual a de bloqueio e lavadas três vezes por 5 minutos com TBS-Tween 20. Efetuou-se então a incubação com um segundo anticorpo, anti-IgG de camundongo ligado à peroxidase, numa diluição de 1:3000 por uma hora a temperatura ambiente, em solução de igual composição à utilizada no bloqueio e incubação com primeiro anticorpo. Após mais três lavagens de 10 minutos com TBS-Tween-20, as membranas foram banhadas em 25 ml de solução quimioluminescente de revelação (25 ml de luminol 1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5; adicionado de iodofenol diluído em DMSO para uma concentração final de 0,4 mM; peróxido de hidrogênio a 0,03%). A visualização final foi realizada por meio de uma reação de quimioluminescência em filme Kodak Biomax Light.

Para a visualização da presença de outras proteínas nas imunoprecipitações e extratos, foram realizados ensaios de *WB* utilizando soros policlonais produzidos em coelho como primeiro anticorpo, em diluições próprias para cada soro, por uma ou 16 horas de incubação. O segundo anticorpo utilizado nesses casos foi o anti-IgG

de coelho ligado à peroxidase, numa diluição de 1:10000, também por uma hora. As demais condições do WB foram às mesmas.

4.4.7 Análise da espectrometria de massas

Para espectrometria de massas (EM), os conjuntos de proteínas eluídas na resina foram aplicados em géis SDS-PAGE de 15%, realizado a migração até o início da fase de resolução do gel e a eletroforese interrompida antes do fracionamento das proteínas. As bandas do gel contendo todo o produto das imunoprecipitações (IPs) foram então excisadas e armazenadas em água MiliQ até o envio para a análise do produto por espectrometria de massas. A identificação das proteínas foi baseada na sequência das proteínas de *L. infantum* disponíveis no banco de dados (C: Bases de dados Linfantum_uniprot_8045entries_29032016.fasta), depositado em *TriTrypDB*. Para confirmar a especificidade dos ensaios de IP, para cada polipeptídeo, a relação entre a intensidade gerada a partir dos IPs utilizando os extratos que expressam as proteínas marcadas com HA e a intensidade da IP do controle (usando um extrato de célula não transfectadas) foi primeiro determinado. Os logaritmos da base 2 (Log2) dos valores produzidos foram então calculados para dois experimentos independentes realizados com diferentes extratos citoplasmáticos e apenas os valores >1,9 foram considerados. Os polipeptídeos identificados foram classificados e listados em tabelas com os valores mais altos obtidos da média dos Log2 para analisar os dados gerados a partir das IPs.

4.4.8 Extração de RNA e construção da biblioteca de cDNA

Os mRNAs ligantes foram extraídos do imunoprecipitado das proteínas com o epítipo HA de acordo com o RNeasy Mini Kit (QIAGEN), e as amostras de RNA foram quantificadas pelo Qubit™ RNA HS Assay Kit (Thermo Fisher) usado para ler a concentração no Qubit® 2.0 Fluorômetro. Pelo menos 0,1-4 µg do RNA total foi utilizado para construir a biblioteca de cDNA com o TrueSeq Stranded mRNA Library Prep Kit (Illumina). Primeiro, os mRNAs foram purificados por poli (A) e

fragmentados para sintetizar a primeira fita de cDNA. Depois disso, a segunda fita de cDNA foi sintetizada e as extremidades 3' foram adeniladas para a ligação de adaptadores. Os fragmentos de DNA que possuem moléculas adaptadoras nas duas extremidades foram enriquecidos pela PCR e, em seguida a biblioteca foi validada quantitativamente para qPCR usando os *KAPA Library Quantification Kits* bem como qualitativamente por gel de agarose. Finalmente, as bibliotecas foram normalizadas e o conjunto preparado para sequenciar usando o MiSeq® Reagent Kit v3, 150 ciclos (Illumina). Os dados obtidos foram analisados por ferramentas de bioinformática: (1) *FastQC*, para avaliar a qualidade das sequências; (2) *Trimmomatic*, para remover os adaptadores e as sequências de baixa qualidade; (3) *Bowtie*, para anotar as sequências do genoma de *L. infantum*; e (4) *HTSeq*, para contar o número de leituras para cada sequência. Os resultados foram fixados em gráficos que contém os grupos dos primeiros mRNAs que se associam a cada proteína.

5 ANÁLISE DOS RESULTADOS

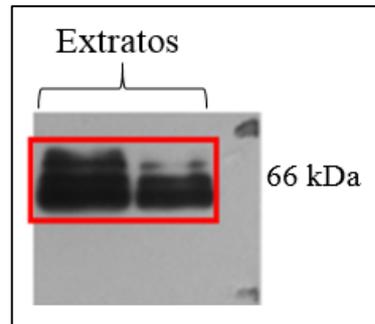
5.1 CARACTERIZAÇÃO DE UM POSSÍVEL HOMÓLOGO DO FATOR EIF4B DE *L.INFANTUM* ATRAVÉS DA IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS E EVENTOS DE FOSFORILAÇÃO

Apesar de sua pouca conservação de sequência, o fator eIF4B tem um papel importante na iniciação da tradução ao reforçar a atividade de helicase do complexo eIF4F em diferentes eucariotos, como leveduras, plantas e mamíferos. Em *Leishmania* e outros tripanosomatídeos uma proteína hipotética foi identificada como possível ortóloga do fator eIF4B, entretanto com homologia de sequência muito baixa em relação a outros eucariotos. Esta proteína foi aqui denominada de EIF4B, por conta de elementos de homologia identificados com este fator de tradução e daqui para frente será tratada dessa forma, embora essa nomenclatura possa ser revista no futuro. Nesse trabalho partiu-se para confirmar a identificação dessa proteína a partir de sua caracterização e identificação de parceiros funcionais.

5.1.1 Avaliação da expressão do EIF4B

Ao se iniciar este trabalho, o gene codificando o EIF4B de *Leishmania* já se encontrava disponível e subclonado no vetor plasmidial para a expressão em *L. infantum*, *pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA* (DE AQUINO, 2015). Esse vetor permite a expressão da proteína alvo fusionada ao epítipo sintético HA na sua extremidade C-terminal. Sua expressão pode então ser confirmada por intermédio de um anticorpo comercial específico para este epítipo. Esta expressão foi confirmada com a visualização de bandas mostrando um tamanho predito de ~66 kDa (Figura 16). Neste caso múltiplas bandas foram detectadas em experimentos preliminares, sugerindo mudanças pós-traducionais, como fosforilação.

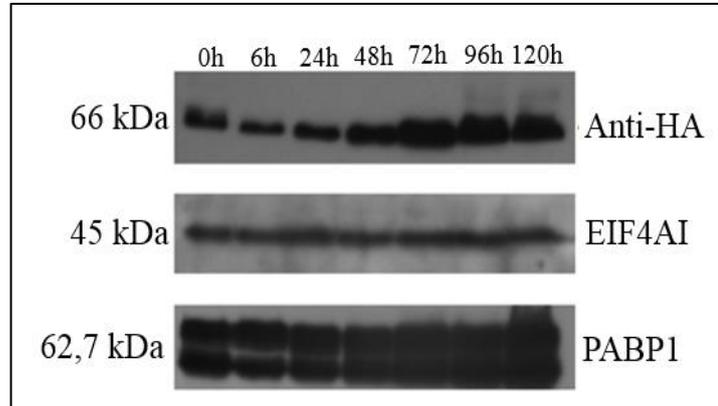
Figura 16: Ensaio prévio de *Western-blot* dos extratos celulares expressando a proteína EIF4B fusionada ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA reconheceu a proteína no seu tamanho predito de aproximadamente 66 kDa (em vermelho).



Fonte: DE AQUINO (2015).

Células de *L. infantum* foram cultivadas e transfectadas com a mesma construção, que permite a expressão constitutiva da proteína recombinante em níveis significativos. Culturas celulares expressando a proteína EIF4B recombinante de *Leishmania* foram então utilizadas para a produção de extratos celulares em sete pontos de uma curva de crescimento do parasita (0h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h). Esta avaliação foi realizada com o intuito de verificar mudanças no seu perfil de expressão e detectar possíveis modificações pós-traducionais nas fases de adaptação, crescimento exponencial, estacionária até o início de morte celular. Em seguida, estes extratos foram fracionados em gel SDS-PAGE para observação do seu perfil de expressão mediante imunodeteccção por *Western-blot* com anticorpo comercial contra o epítipo HA (anti-HA) da marca Sigma®. Como controle de carga, os mesmos extratos foram testados com soro policlonal contra uma proteína que apresenta expressão constitutiva durante o crescimento da *L. infantum*, o ortólogo de *Leishmania* do fator de iniciação da tradução eIF4A, no caso EIF4AI (Figura 17). Como já havia indícios de que a proteína EIF4B poderia estar sujeita a mudanças pós-traducionais, as mesmas amostras foram testadas ainda com soro contra a proteína PABP1 que apresentam expressão constitutiva, porém sujeita a fosforilação na fase exponencial de crescimento. Como mostrado na figura, o EIF4B apresentou um perfil de múltiplas isoformas na fase estacionária de crescimento, diferente do que foi observado para a PABP1, mas ainda assim indicando modificações pós-traducionais.

Figura 17: Avaliação do perfil de expressão da proteína EIF4B durante o ciclo de vida de *L. infantum*. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-HA para detecção da proteína EIF4B e soros policlonais de coelho contra EIF4AI e PABP1 para controle de carga e fosforilação, respectivamente, diluídos 1:3000 para os dois primeiros anticorpos e 1:2000 para o último. O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgG de camundongo diluído 1:3000 para o monoclonal e o anti-IgG de coelho diluído 1:10000 para os policlonais.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

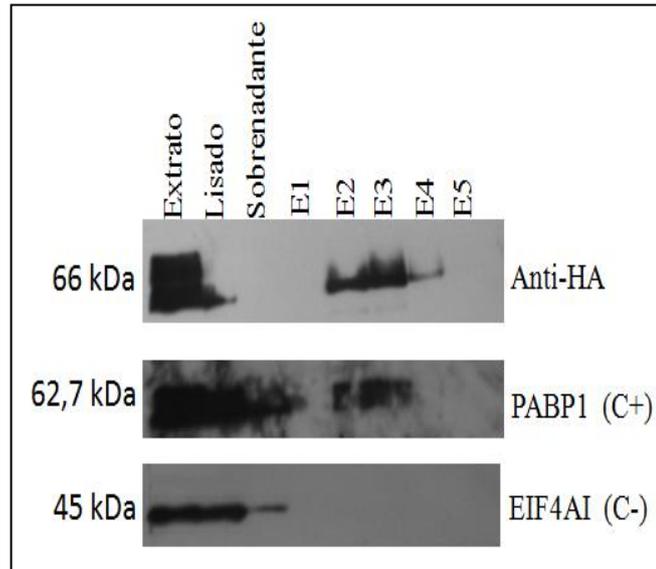
5.1.2 Investigação de mudanças pós-traducionais do EIF4B

Como observado durante a curva do crescimento com as células transfectadas de *L. infantum* expressando a proteína EIF4B, pôde-se verificar o seu perfil possivelmente fosforilado na fase estacionária. No entanto, para se confirmar, de fato, essa modificação pós-traducional foi realizado um ensaio de purificação de fosfoproteínas desse parasita para detectar não apenas a referida proteína do trabalho, mas também outros alvos que apresentam a mesma modificação ou não. Para controle negativo deste experimento foi utilizado o anticorpo do EIF4AI (que não apresenta o perfil fosforilado) e como controle positivo o da PABP1, visto que o seu ortólogo em *L. major* já foi descrito fosforilado.

Para o *Western-blot* foram utilizados cerca de 30 µg de extrato e lisado celular, assim como o do sobrenadante e 100 µl das cinco eluições (E1-5) obtidos na fase estacionária (96h) do crescimento celular. As amostras foram precipitadas com TCA e acetona, fracionadas em gel SDS-PAGE 15% e transferidas para membranas de PVDF. O EIF4B apareceu nas frações de eluição 2, 3 e 4, enquanto que a PABP1 apareceu apenas nas frações 2 e 3, confirmando a ocorrência de fosforilação nestas proteínas. Já o EIF4AI apareceu apenas no extrato, lisado e sobrenadante (Figura 18), compatível com ausência de fosforilação. Nota-se ainda a

aparente ausência do EIF4B do sobrenadante indicando que boa parte da proteína, ou quase sua totalidade, encontra-se fosforilada nas amostras testadas.

Figura 18: Purificação de fosfoproteínas por cromatografia de afinidade e detecção do EIF4B, PABP1 e EIF4AI em *L. infantum*. Ensaio realizado com células de *L. infantum*, na fase estacionária (ponto de 96h) da curva de crescimento. Todas as proteínas são reconhecidas no extrato e lisado celular. A EIF4AI é detectada ainda no sobrenadante. A EIF4B e PABP1 são detectadas também nas eluições, E2-4 e, E2-3, respectivamente. O marcador LMW foi marcado no filme radiográfico pela comparação com a membrana de PVDF.

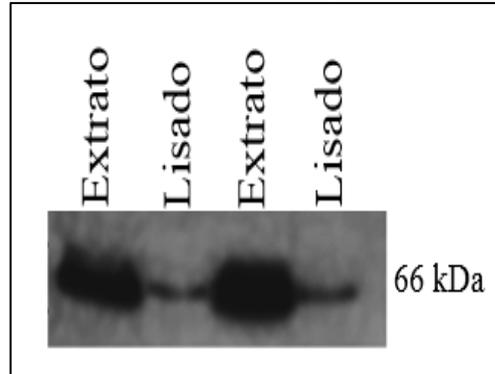


Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.1.3 Produção de lisados celulares e avaliação da imunoprecipitação do EIF4B fusionado ao epítipo HA

Inicialmente, optou-se por avaliar a susceptibilidade do EIF4B recombinante a eventos de degradação durante o processo de lise celular e centrifugações necessárias para a obtenção de frações solúveis citoplasmáticas de *L. infantum* (lisados celulares). Aliquotas destes lisados supostamente expressando a proteína EIF4B, no tamanho de 66 kDa, foram fracionadas e comparadas em SDS-PAGE com extratos celulares produzidos pela lise direta do parasita em tampão contendo SDS (Figura 19). O resultado observado mostra que o EIF4B estava presente em quantidade suficiente nos lisados para ensaios subsequentes, mas que houve uma degradação significativa durante a preparação destes.

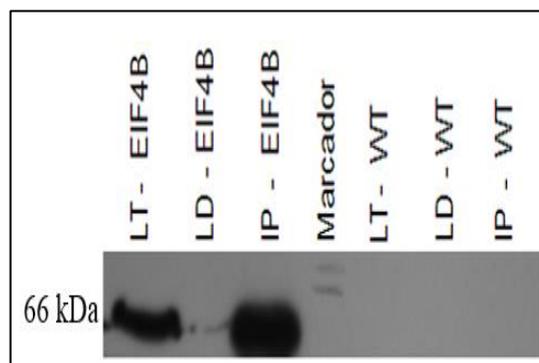
Figura 19: Ensaio de *Western-blot* de extratos e lisados celulares de *L. infantum* expressando o EIF4B fusionado ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA da marca sigma® diluído 1:3000 reconheceu a proteína no seu tamanho esperado de 66 kDa



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

As frações solúveis citoplasmáticas obtidas a partir de *L. infantum* expressando o EIF4B foram então utilizados para a obtenção de imunoprecipitados. Alíquotas da resina (imunoprecipitado – IP) juntamente com o lisado total (LT) e o lisado após o ensaio (lisado depletado - LD) foram utilizadas para a realização de *Western-blot* que foi testado inicialmente com o anticorpo anti-HA para detectar a presença da proteína marcada com o epítipo do HA no imunoprecipitado. Para servir de controle negativo, também foi realizado o ensaio com lisado selvagem de *L. infantum* (WT), pois este só irá apresentar proteínas nativas do parasita expressas e não as que têm epítipo HA (Figura 20). O resultado mostra uma precipitação efetiva de boa parte do EIF4B junto a resina, com praticamente nenhum EIF4B permanecendo junto ao lisado depletado.

Figura 20: Ensaio de *Western-blot* da imunoprecipitações da proteína EIF4B fusionada ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA, diluído 1:3000, reconheceu a proteína no seu tamanho esperado de aproximadamente 66 kDa, no lisado total (LT), no produto do imunoprecipitado (IP) e ainda no lisado depletado (LD). Não houve reconhecimento no controle negativo (*Leishmania infantum* selvagem – WT), como esperado. O segundo anticorpo foi o anti-IgG de camundongo diluído 1:3000.

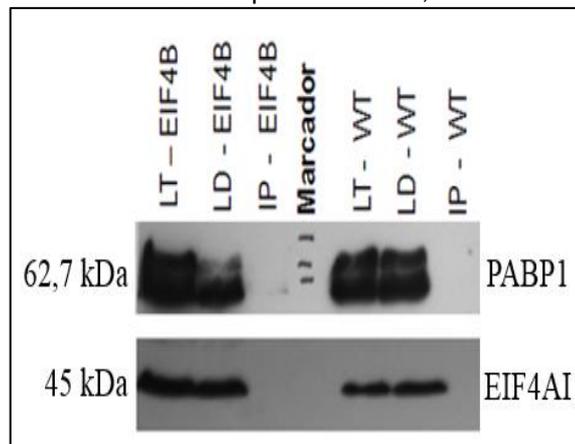


Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.1.4 Análise da interação de possíveis parceiros ligantes por ensaios de *Western-blot* e espectrometria de massas

Os produtos das imunoprecipitações observados anteriormente foram testados quanto à presença da PABP1 e EIF4AI como possíveis parceiros na co-precipitação (Figura 21). As proteínas selvagens foram detectadas no lisado e no depletado tanto do controle quanto das proteínas de estudo, nos seus respectivos tamanhos, 62,7 kDa e 45 kDa. É importante ressaltar que os anticorpos utilizados para os testes já estavam disponíveis no laboratório, resultado de trabalhos prévios da equipe. No entanto, o EIF4B parece co-precipitar apenas com a PABP1, mas não com o EIF4AI.

Figura 21: Ensaio de imunoprecipitação do EIF4B com alguns possíveis parceiros ligantes. Foi utilizado anticorpos policlonais específicos para PABP1 e EIF4A, diluídos 1:2000 e 1:3000, respectivamente. O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgG de coelho diluído 1:10000. Observa-se uma discreta detecção do alvo na IP do EIF4B para a PABP1, mas nenhuma para o EIF4AI.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

O intuito dos ensaios de imunoprecipitação é verificar diretamente a interação da proteína de estudo com possíveis parceiros ligantes. Para a identificação destes, os imunoprecipitados foram enviados (em duplicata) para a Plataforma Tecnológica do Instituto Carlos Chagas de espectrometria de massas em Curitiba, com a finalidade identificar novos parceiros e complexos proteicos com os quais o EIF4B interage. Os resultados obtidos desta análise estão discriminados na tabela 1.

Tabela 1: Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que co-precipitam com o fator de iniciação da tradução EIF4B de *Leishmania infantum*. Os resultados foram divididos em número de acesso dos genes, identidade, função molecular e a média do Log2.

EIF4B (LINJ.25.1120)			
Nº de acesso do gene	Identidade	Função	Média (Log2) >1,9
Não caracterizada			
LINJ.25.1300	-	-	2,92
Enzimas			
LINJ.26.0770	Proteína tipo glutaciona peroxidase	Atividade oxidoreductase da glutaciona peroxidase	2,01
LINJ.21.1450	Timidina quinase	Atividade da timidina quinase	2,03
LINJ.30.0650	Histidil-tRNA sintetase	Atividade da histidina - tRNA-ligase	2,18
LINJ.15.0720	Alanil-tRNA sintetase	Atividade da alanil-tRNA-ligase	2,39
LINJ.13.0260	Subunidade de N-acetiltransferase ARD1	Atividade de N-acetiltransferase	2,14
Transporte celular			
LINJ.04.0230	Domínio GRAM	Receptor acoplado a membrana	4,43
LINJ.04.0470	Fatores de Ribosilação do ADP	Transporte de proteínas intracelular	2,52
LINJ.17.0080	Proteína 1 do fator de Ribosilação - ADP	Transporte de proteínas intracelular	2,34
LINJ.30.2380	Fatores de Ribosilação do ADP	Transporte de proteínas intracelular	2,05
Replicação de DNA			
LINJ.15.0310	Factor de replicação A	Ligação ao DNA (Reparo)	2,10
Relacionadas ao RNA			
LINJ.25.1120 (EIF4B)	<i>RBD</i>	Ligação de ácido nucleico	16,12
LINJ.18.0220	<i>RBD29</i>	Ligação de ácido nucleico	2,37

Fonte: elaborada pela autora (2018).

Pela análise da tabela é possível observar que o EIF4B do estudo não interage com homólogos do complexo EIF4F, em especial, com o homólogo EIF4AI, como descrito na maioria dos eucariotos, reforçando a atividade helicase deste complexo durante o *scanning* para reconhecimento do códon de iniciação da tradução. No entanto, foram observadas interações com proteínas importantes envolvidas em processos biológicos de transporte celular (principalmente, a LINJ.04.0230), transdução de sinais (LINJ.21.1450) e de ligação a ácidos nucleicos (LINJ.18.0220). Estes dados sugerem que, embora não esteja diretamente relacionada a etapa de iniciação da tradução pode desempenhar funções

significativas de comunicação intra e/ou intercelular em *L. infantum* para o resultado final, a síntese proteica.

5.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS DO FATOR EIF5 EM *L. INFANTUM*

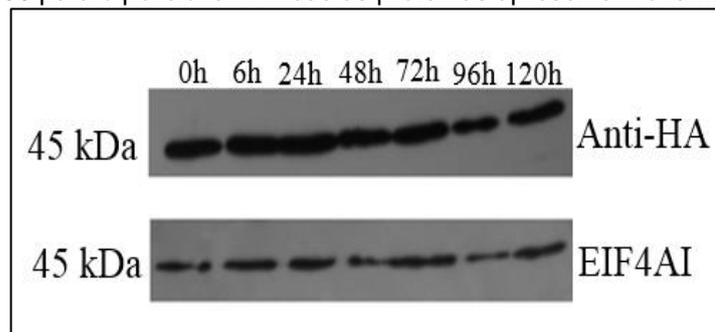
O fator eIF5 é reconhecido como tendo um papel crítico no reconhecimento do códon AUG de iniciação da tradução, em eucariotos de uma forma geral, por meio da sua associação com os complexos eIF2 e eIF3. Ao menos em leveduras, o eIF5 participa diretamente no recrutamento dos mRNAs para a tradução através de uma interação direta com a subunidade eIF4G do complexo eIF4F (SINGH et al., 2012; HE et al., 2003). Em *Leishmania*, diferenças observadas nos complexos eIF4F, com múltiplos homólogos de suas subunidades formando múltiplos complexos (DE MELO NETO et al., 2016; YOFFE et al., 2009), e eIF2, com dois complexos distintos sugerem que diferenças também possam haver no modo de ação do eIF5 (NASCIMENTO, 2016). Nesta dissertação, com o intuito de se investigar se há conservação no seu modo de atuação, partiu-se então para a caracterização de sua expressão e identificação de parceiros funcionais.

5.2.1 Avaliação da expressão do EIF5

No início desse trabalho, o gene codificando o ortólogo de *L. infantum* do fator eIF5 (EIF5) também já se encontrava subclonado no mesmo vetor plasmidial utilizado para a expressão em *L. infantum* do EIF4B (DE AQUINO, 2015). No caso do EIF5, sua expressão também foi avaliada por intermédio do anticorpo comercial específico para o epítipo HA presente no vetor de expressão. Essa expressão foi confirmada em experimentos prévios com a identificação de uma banda do tamanho predito de 45 kDa em extratos de células transfectadas com o plasmídeo contendo o gene *EIF5* (resultado não mostrado). Neste trabalho, culturas celulares expressando a proteína eIF5 recombinante de *L. infantum*, chamada de EIF5, também foram utilizadas para a produção de extratos celulares em sete pontos da uma curva de

crescimento do parasita (0h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h). Buscou-se também avaliar sua expressão nas fases de: adaptação, crescimento exponencial, estacionária até o início de morte celular. Estes extratos foram testados com o anticorpo contra o epítipo HA e também com soro policlonal contra a proteína EIF4AI, como controle de carga (Figura 22). Como observado na figura, o EIF5 foi identificado em todas as amostras analisadas sem variação de intensidade entre os pontos analisados e sem a presença de bandas adicionais indicativas de modificações pós-traducionais.

Figura 22: Avaliação do perfil de expressão do EIF5 durante curva de crescimento de *L. infantum*. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-HA para detecção da proteína EIF5 e o soro policlonal contra o EIF4AI de *Leishmania* para controle de carga, diluídos 1:3000. O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgG de camundongo diluído 1:3000 para o monoclonal e o anti-IgG de coelho diluído 1:10000 para o policlonal. Ambas as proteínas apresentam o tamanho de 45 kDa.

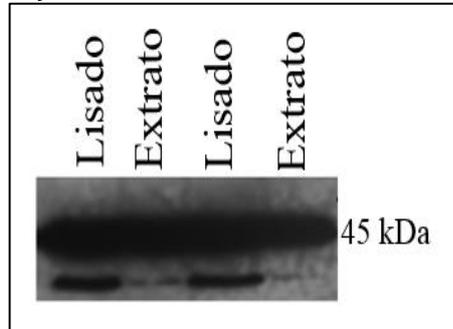


Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.2.2 Produção de lisados celulares e avaliação da imunoprecipitação do EIF5 fusionado ao epítipo HA

O EIF5 recombinante também foi avaliado quanto a possíveis eventos de degradação durante o processo de lise celular para obtenção de frações solúveis citoplasmáticas de *L. infantum* (lisados celulares). Alíquotas dos lisados supostamente expressando a proteína EIF5, no tamanho de aproximadamente 45 kDa, foram fracionadas e comparadas em SDS-PAGE com extratos celulares produzidos pela lise direta do parasita em tampão contendo SDS (Figura 23). O resultado observado mostra que o EIF5 estava presente em quantidade substancial nos lisados e que não houve degradação significativa durante a preparação destes.

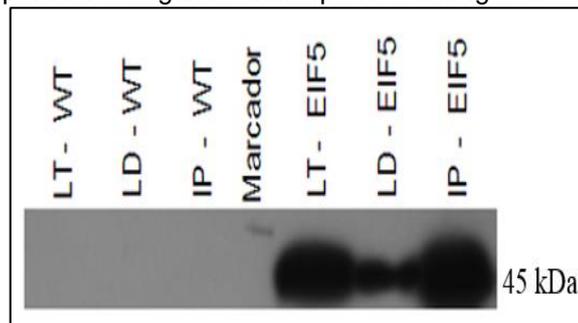
Figura 23: Ensaio de *Western-blot* de extratos e lisados celulares de *L. infantum* expressando o EIF5 fusionado ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA da marca sigma® diluído 1:3000 reconheceu a proteína no seu tamanho esperado de 45 kDa. Alguns fragmentos inespecíficos evidenciam degradação.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

Os lisados totais obtidos a partir de *L. infantum* expressando o EIF5 foram então utilizados para a obtenção de imunoprecipitados. Alíquotas da resina (imunoprecipitado – IP) juntamente com o lisado total (LT) e o lisado após o ensaio (lisado depletado - LD) foram utilizadas para a realização de *Western-blot* que foi testado inicialmente com o anticorpo anti-HA para detectar a presença da proteína marcada com o epítipo do HA no imunoprecipitado. Para servir de controle negativo, também foi realizado o ensaio com lisado selvagem de *L. infantum* (WT), pois este só irá apresentar proteínas nativas do parasita expressas e não as que têm epítipo HA (figura 24). O resultado mostra uma precipitação efetiva de boa parte do EIF5 junto a resina, com apenas uma fração deste permanecendo no lisado depletado.

Figura 24: Ensaio de *Western-blot* da imunoprecipitações da proteína EIF5 fusionada ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA, diluído 1:3000, reconheceu a proteína no seu tamanho esperado de 45 kDa, no lisado total (LT), no produto do imunoprecipitado (IP) e ainda no lisado depletado (LD). Não houve reconhecimento no controle negativo (*Leishmania infantum* selvagem – WT), como esperado. O segundo anticorpo foi o anti-IgG de camundongo diluído 1:3000.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.2.3 Análise da interação de possíveis parceiros ligantes por espectrometria de massas

Com o objetivo de verificar a interação do EIF5 com possíveis parceiros ligantes, os imunoprecipitados foram enviados (em duplicata) para a Plataforma Tecnológica do Instituto Carlos Chagas em Curitiba para a espectrometria de massas e os dados analisados. Os resultados obtidos desta análise estão discriminados na tabela 2.

Tabela 2: Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que co-precipitam com o fator de iniciação da tradução EIF5 de *Leishmania infantum*. Os resultados foram divididos em número de acesso dos genes, identidade, função molecular e a média do Log2.

EIF5 (LINJ.34.0370)			
Nº de acesso do gene	Identidade	Função	Média (Log2) >1,9
Fatores de Iniciação da tradução			
LINJ.34.0370	Fator de iniciação da tradução eucariótica 5 (EIF5)	Fator de iniciação da tradução	5,90
LINJ.08.0570	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2 subunidade beta (EIF2 β)	Fator de iniciação da tradução	4,79
LINJ.09.1130	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2 subunidade gamma (EIF2 γ)	Fator de iniciação da tradução	4,53
LINJ.03.0960	Fator de iniciação da tradução eucariótica 2 subunidade alfa (EIF2 α)	Fator de iniciação da tradução	3,77
LINJ.28.2480	Fator de iniciação da tradução eucariótica 3 subunidade E (EIF3E)	Fator de iniciação da tradução	2,25
Subunidades Ribossomais			
LINJ.11.1110	Proteína ribossomal 60S L28	Constituinte estrutural do ribossomo	2,34
LINJ.03.0410	Proteína ribossomal ácida 60S P2 (LIP2)	Constituinte estrutural do ribossomo	2,28
LINJ.35.3810	Proteína ribossomal 60S L27A / L29	Constituinte estrutural do ribossomo	2,27
LINJ.36.4730	Proteína ribossomal 60S L18 (RPL18)	Constituinte estrutural do ribossomo	2,14
LINJ.15.1060	Proteína ribossomal 60S L6	Constituinte estrutural do ribossomo	2,04
Enzimas			
LINJ.34.3280	RUVB tipo 1 helicase de DNA	Atividade de DNA helicase	2,05
Transporte Celular			
LINJ.04.0230	Domínio GRAM	Receptor acoplado a membrana	2,54
Relacionadas ao RNA			
LINJ.18.0220	RBD 29	Ligação de ácido nucleico	2,10

Fonte: elaborada pela autora (2018).

Pelos resultados da tabela 2 é possível confirmar que o EIF5 forma complexo com três subunidades do complexo EIF2 de *Leishmania* e que constituem um dos dois complexos eIF2 encontrados neste organismo (Nascimento, 2016). Não se observa a segunda subunidade EIF2 gamma de *Leishmania* e que caracterizaria o segundo complexo EIF2. Também foi identificada apenas uma das onze subunidades do complexo eIF3, EIF3E, além de proteínas ribossomais (60S), bem típicas de etapas iniciais da tradução. Não foram identificados homólogos de subunidades do complexo eIF4F. Estes resultados sugerem uma conservação da função do EIF5 de *Leishmania* em relação ao que é conhecido em outros eucariotos e mamíferos, porém com especificidades para este organismo e outros tripanossomatídeos.

5.3 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA LINJ.33.0390 EM *L.INFANTUM* E IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS

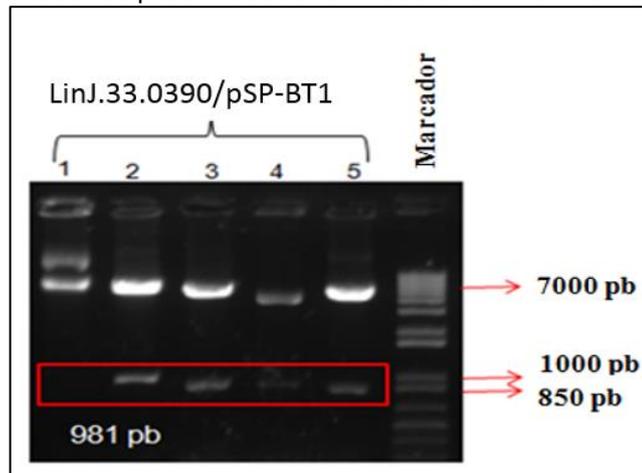
Em resultados prévios foi observada a proteína LINJ.33.0390 diretamente envolvida com homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) atuantes no processo de síntese proteica e de processamento do RNA (de Melo Neto et al., RNA Biology, manuscrito aceito para publicação). A suposição era que esta proteína pudesse estar envolvida em complexos importantes na etapa de iniciação da tradução, juntamente com os homólogos já conhecidos da PABP e do complexo EIF4F. No entanto, não há evidências na literatura de sua propriedade proteica e função. Logo, este trabalho teve o intuito de caracterizar a sua expressão e identificar os seus possíveis parceiros ligantes, em *L. infantum*.

5.3.1 Subclonagens do gene LinJ.33.0390 no pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA

No início desse trabalho, o gene codificando o LinJ.33.0390 já se encontrava clonado no vetor de passagem pGEM-T easy (resultado não mostrado), sendo necessária a sua subclonagem no vetor de expressão em *Leishmania* pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA. A confirmação da construção plasmidial foi obtida com a utilização das

enzimas de restrição BamHI/HindIII evidenciando o tamanho predito do inserto de 981 pb e o do vetor de aproximadamente 7000 pb (Figura 25).

Figura 25: Confirmação das construções plasmidiais LinJ.33.0390/pSP-BT1. Gel de agarose 1% mostrando as digestões das construções utilizando as enzimas de restrição BamHI e HindIII evidenciando o inserto de 981 pb. O vetor apresenta um tamanho de aproximadamente 7000 pb como já esperado. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 Kb Plus Ladder (©Invitrogen).



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

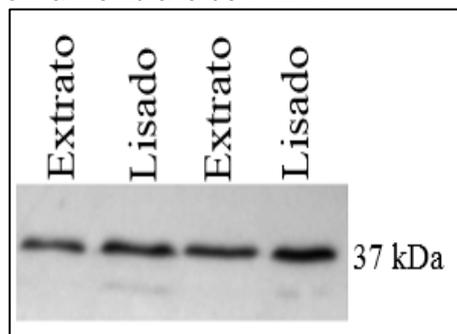
5.3.2 Avaliação da expressão do LINJ.33.0390

A análise da expressão da LinJ.33.0390 também poderia ser confirmada por intermédio do anticorpo comercial anti-HA, com a identificação de uma banda do tamanho predito de 37 kDa. No presente trabalho, células de *L. infantum* foram cultivadas e transfectadas com a mesma construção, que permite a expressão constitutiva da proteína recombinante em níveis significativos. No entanto, não foi possível detectar os extratos obtidos na concentração 2×10^5 (como descrito na metodologia). Esse resultado aponta para uma possível expressão diminuta da proteína nesse parasita, se comparando com às outras do estudo. O extrato só é detectável numa concentração de 5×10^5 , mais que o dobro do testado, e ainda assim percebe-se a sua diminuição em abundância. Logo, não foi possível verificar mudanças no seu perfil de expressão nas fases de: adaptação, crescimento exponencial, estacionária até o início de morte celular. Para se obter uma curva de crescimento detectável desta proteína, uma nova padronização metodológica terá que ser realizada.

5.3.3 Produção de lisados celulares e avaliação da imunoprecipitação do LINJ.33.0390 fusionado ao epítipo HA

Inicialmente, alíquotas de extratos e lisados celulares supostamente expressando a proteína LINJ.33.0390, em *L. infantum*, no tamanho predito de 37 kDa foram fracionadas em SDS-PAGE para avaliar a susceptibilidade destas proteínas a eventos de degradação durante o processo de extração e lise utilizando o anticorpo anti-HA (Figura 26). O resultado observado sugere que a LINJ.33.0390 aparentemente estava presente em uma menor quantidade, se comparada com as outras proteínas deste estudo. No entanto, para que essa informação seja afirmada seria necessário fazer ensaios de análise quantitativa. Em relação à identificação de degradação durante a preparação dos lisados, esta não foi significativa e os produtos foram suficientes para serem utilizados no ensaio de imunoprecipitação.

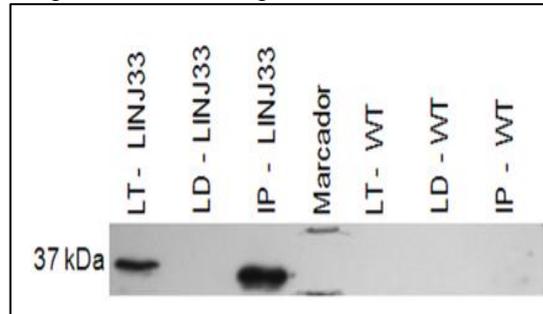
Figura 26: Ensaio de *Western-blot* dos extratos e lisados celulares expressando a proteína LinJ.33.0390 fusionada ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA da marca sigma® diluído 1:3000 reconheceu cada proteína no seu tamanho esperados de 37 kDa. Alguns fragmentos inespecíficos evidenciam degradação. O marcador BenchMarck foi marcado no filme radiográfico pela comparação com a membrana de PVDF.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

As alíquotas da resina (imunoprecipitado – IP) juntamente com o lisado total (LT) e o lisado após o ensaio (lisado depletado - LD) obtido da imunoprecipitação foram utilizadas para a realização de *Western-blot* que foi testado inicialmente com o anticorpo anti-HA. Para servir de controle negativo, também foi realizado o ensaio com lisado selvagem de *L. infantum* (WT) (Figura 27). O resultado mostra uma precipitação efetiva do LINJ.33.0390 junto a resina no seu tamanho esperado de 37 kDa.

Figura 27: Ensaio de *Western-blot* da imunoprecipitações da proteína LINJ.33.0390 fusionada ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA, diluído 1:3000, reconheceu a proteína no seu tamanho esperado de 37 kDa, no lisado total (LT) e no produto do imunoprecipitado (IP). Não houve reconhecimento no controle negativo (*Leishmania infantum* selvagem – WT), como esperado. O segundo anticorpo foi o anti-IgG de camundongo diluído 1:3000.

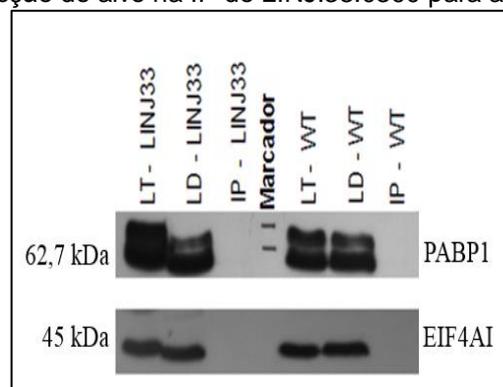


Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.3.4 Análise da interação de possíveis parceiros ligantes por ensaios de *Western-blot* e espectrometria de massas

Os produtos das imunoprecipitações obtidos na etapa anterior foram testados quanto à presença da PABP1 e EIF4AI como possíveis parceiros na co-precipitação por meio de ensaios de *Western-Blot* com os anticorpos policlonais destes já disponíveis no laboratório (Figura 28). As proteínas selvagens foram detectadas no lisado e no depletado tanto do controle quanto das proteínas de estudo, nos seus respectivos tamanhos, 62,7 kDa e 45 kDa. No entanto, o LINJ.33.0390 parece não co-precipitar com nenhum dos homólogos.

Figura 28: Ensaio de imunoprecipitação do LINJ.33.0390 com alguns possíveis parceiros ligantes. Foi utilizado anticorpos policlonais específicos para PABP1 e EIF4A, diluídos 1:2000 e 1:3000, respectivamente. O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgG de coelho diluído 1:10000. Não foi observada nenhuma detecção do alvo na IP do LINJ.33.0390 para a PABP1 e o EIF4AI.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

Posteriormente, os imunoprecipitados foram enviados (em duplicata) para a Plataforma Tecnológica do Instituto Carlos Chagas de espectrometria de massas em Curitiba, com a finalidade de verificar diretamente a interação da proteína de estudo com possíveis parceiros ligantes e identificar possíveis complexos proteicos. A análise dos resultados obtidos está discriminada na tabela 3.

Tabela 3: Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que co-precipitam com a LINJ.33.0390 de *Leishmania infantum*. Os resultados foram divididos em número de acesso dos genes, identidade, função molecular e a média do Log2.

LINJ.33.0390			
Nº de acesso do gene	Identidade	Função	Média (Log2) >1,9
Não caracterizada			
LINJ.33.0390	-	-	20,71
LINJ.09.0370	-	-	2,03
Fatores de Iniciação da tradução			
LINJ.27.1520	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4E-1 (EIF4E1)	Ligação ao RNA (Cap 4)	6,44
LINJ.16.1700	Fator de iniciação da tradução eucariótica 4 gama 3 (EIF4G3)	Ligação ao RNA e a proteínas	3,47
Enzimas			
LINJ.03.0690	Proteína contendo o domínio Aminoacil-tRNA	Atividade de aminoacil-tRNA ligase	3,39
Transporte celular			
LINJ.27.0920	Proteína de transporte vesicular (homólogo CDC48)	Transporte de proteínas intracelular	2,72
LINJ.02.0280	Proteína de fixação da NSF solúvel (<i>Soluble NSF attachment protein – SNAP</i>)	Fusão de vesículas na reação de transporte	2,01
Relacionadas ao RNA			
LINJ.36.0050	Proteínas com sequências repetitivas de domínios Pumilio (PUF1)	Ligação ao RNA	2,66
LINJ.35.0970	Fosfoproteína de ligação à sequência do ciclo celular (RBP33)	Ligação a Fosfoproteínas	2,55
LINJ.18.0220	<i>RBD 29</i>	Ligação de ácido nucleico	2,16
LINJ.07.1020	Fator de <i>splicing</i> tipo 1	Regulação do <i>splicing</i> no RNA	2,23

Fonte: elaborada pela autora (2018).

Com este resultado é possível afirmar que o LINJ.33.0390 interage com homólogos do complexo EIF4F (EIF4E1 e o EIF4G3), mas não com homólogos da PABP. Isto sugere uma relação funcional mais direta da proteína de estudo com a

iniciação da tradução, visto que é sabido que o EIF4E1 e EIF4G3 são atuantes na etapa de síntese proteica. No entanto, ainda não foi observada a formação de um complexo EIF4F com o EIF4E1 e EIF4G3 juntos, até porque são antagônicos. Enquanto o primeiro está envolvido com a repressão, o segundo tem a função de estimular a tradução. Então, esses dados sugerem duas possibilidades: a interação do LINJ.33.0390/EIF4E1/EIF4G3 no mesmo momento ou a interação da proteína de estudo com os homólogos em momentos distintos.

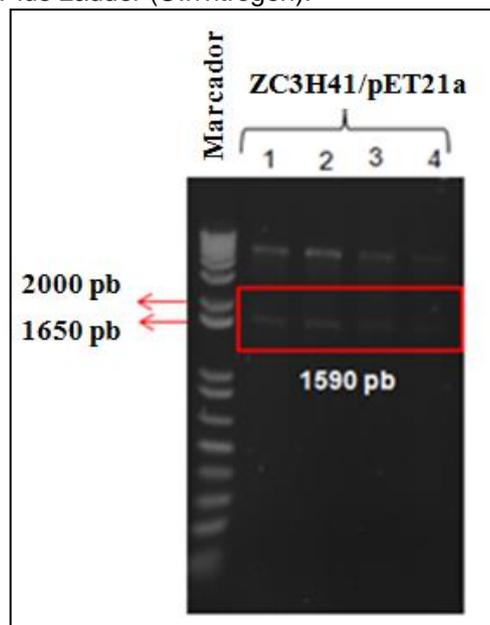
5.4 CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA ZC3H41 DE *L.INFANTUM* E IDENTIFICAÇÃO DE PARCEIROS FUNCIONAIS

Assim como a LINJ.33.0390, a ZC3H41 também foi identificada em resultados prévios, possivelmente envolvida com homólogos da proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) atuantes no processo de síntese proteica e de processamento do RNA (de Melo Neto et al., RNA Biology, manuscrito aceito para publicação). No entanto, foi possível obter algumas propriedades atribuídas a este gene no banco de dados do *TriTryp* e pode-se verificar trata-se de uma proteína com domínio do tipo dedos de zinco ou *Zinc Finger (ZF)*. Normalmente estas proteínas estão mais envolvidas em processo que antecede a etapa de síntese proteica, contudo há relatos na literatura de proteínas com esta natureza envolvidas no processo de tradução, em especial, na iniciação da tradução. Este é o caso da subunidade β do fator de iniciação da tradução EIF2 (EIF2 β) que apresenta na sua extremidade C-terminal domínios do tipo *ZF* que participam da ligação ao mRNA e também no reconhecimento do códon de iniciação da tradução (SCHMITT et al., 2010). Além de ortólogos identificáveis em *T. brucei* com funções significativas de ligação ao mRNA (LUEONG et al., 2016), então esses fatos sugerem que a ZC3H41 poderia estar envolvida em complexos importantes juntamente com os homólogos já conhecidos da PABP e do complexo eIF4F para a conclusão da síntese proteica. Portanto, este trabalho teve o intuito de caracterizar a sua expressão, identificar em *L. infantum* os seus possíveis parceiros ligantes e ainda investigar seus mRNAs alvos.

5.4.1 Subclonagem do gene ZC3H41 em vetor de expressão bacteriana

No início desse trabalho, o gene codificando o ZC3H41 já se encontrava clonado no vetor de passagem pGEM-T easy (resultado não mostrado), sendo necessária a sua subclonagem no vetor de expressão bacteriana pET21a, que permite a expressão da proteína alvo fusionada a sequências de poli-histidina na sua extremidade C-terminal. A confirmação da construção plasmidial foi obtida com a utilização das enzimas de restrição BamHI/HindIII evidenciando o tamanho predito do inserto de 1590 pb e o do vetor de aproximadamente 5500 pb (Figura 29).

Figura 29: Confirmação das construções plasmidiais ZC3H41/pET21a. Gel de agarose 1% mostrando as digestões utilizando as enzimas de restrição BamHI/HindIII evidenciando o tamanho do inserto já esperado de 1590 pb. O vetor apresenta um tamanho de 5500 pb. O marcador de peso molecular utilizado foi o 1 Kb Plus Ladder (©Invitrogen).



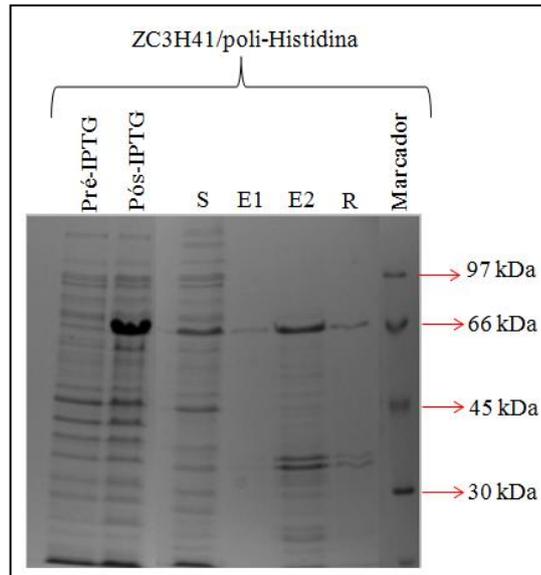
Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.4.2 Expressão e purificação da proteína ZC3H41 recombinante

A proteína recombinante expressa em *E. coli* com a cauda de poli-histidina foi então purificada utilizando a resina Ni-NTA Agarose para ser utilizada em experimentos posteriores. Alíquotas da pré e pós-indução, sobrenadante (S) e eluatos (E1 e E2) das purificações foram submetidas à migração em gel SDS-PAGE

evidenciando o tamanho predito de 66 kDa (60 kDa da proteína acrescido de 6 kDa da cauda de poli-Histidina) (Figura 30).

Figura 30: Expressão e purificação da proteína recombinante ZC3H41/poli-histidina. Gel SDS-PAGE 15% mostrando alíquotas do pré e pós-IPTG, Sobrenadante (S), Eluições 1 e 2 (E1 e E2) e Resina (R) do processo de expressão e purificação da proteína ZC3H41 com a cauda de poli-histidina evidenciando o tamanho de 66 kDa (60 kDa da proteína acrescido de 6 kDa da cauda de poli-Histidina). Marcador LMW.



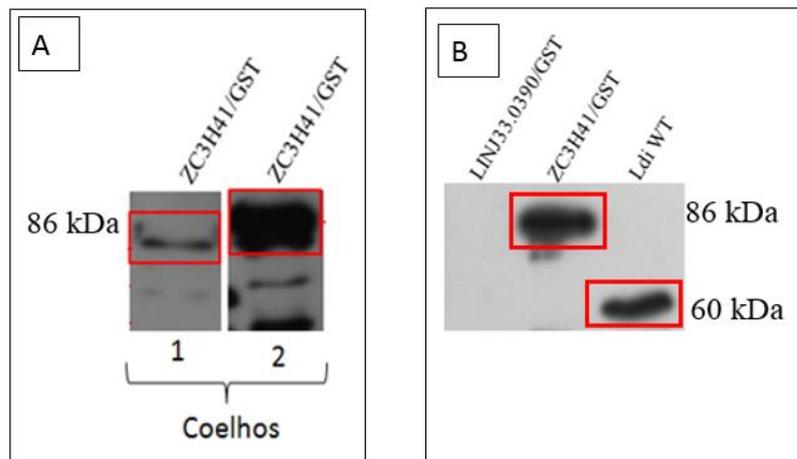
Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.4.3 Ensaio de eficiência, sensibilidade e especificidade do anticorpo policlonal ZC3H41

Com a proteína ZC3H41/poli-histidina purificada, foi realizada a imunização de coelhos para a obtenção de soro policlonais. Antes de se realizar o sacrifício do animal foi obtida uma alíquota do soro por meio de sangria no lóbulo da orelha para avaliar a eficiência do anticorpo produzido em ensaios de *Western-Blot* com os soros não purificados (de ambos os coelhos utilizados na imunização). Estes foram testados contra a proteína ZC3H41 na diluição 1:1500 para testar o reconhecimento em extrato de *Escherichia coli* expressando a proteína recombinante em fusão com a Glutathione S-Transferase (GST) (Figura 31A). No caso, ambos os soros policlonais reconheceram a proteína no seu tamanho predito de 86 kDa (60 kDa da proteína acrescido de 26 kDa da cauda de GST) nas concentrações testadas. Posteriormente a confirmação, os testes de sensibilidade e especificidade foram realizados

utilizando o soro do coelho 2 purificado, previamente, na diluição 1:1500 para testar o reconhecimento em alíquotas das proteínas recombinantes purificadas em fusão com GST (LINJ.33.0390 e ZC3H41) e extrato total de *L. infantum*, para a detecção da proteína selvagem (Figura 31B). Apenas na proteína LINJ.33.0390 não se observou o reconhecimento, o que indica a especificidade do anticorpo produzido. Já a detecção é observada no extrato selvagem (60 kDa) e no extrato purificado da ZC3H41/GST (86 kDa). Vale salientar que as proteínas recombinantes ZC3H41 e LINJ.33.0390 com a cauda de Glutathione S-Transferase foram obtidas previamente (resultados não mostrados).

Figura 31: Ensaio com o anticorpo policlonal ZC3H41. Em A, observa-se o teste de eficiência do anticorpo contra a proteína ZC3H41 com os soros não purificados contra a proteína ZC3H41 na diluição 1:1500. Ambos os soros policlonais reconheceram a proteína no seu tamanho predito de 86 kDa. Em B, observa-se o ensaio de sensibilidade e especificidade do anticorpo ZC3H41 utilizando o soro purificado na diluição 1:1500. A proteína foi detectada no extrato selvagem (60 kDa) e na proteína purificada ZC3H41/GST (86 kDa), mas não na proteína LINJ.33.0390/GST, o que indica a especificidade do anticorpo produzido. O marcador LMW foi marcado no filme radiográfico pela comparação com a membrana de PVDF.



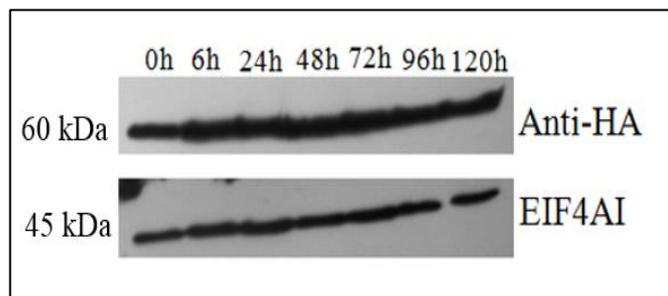
Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.4.4 Avaliação da expressão do ZC3H41

Células de *L. infantum* foram cultivadas e transfectadas com o ZC3H41 previamente subclonado no vetor de expressão, que permite a expressão constitutiva da proteína recombinante em níveis significativos. Culturas celulares expressando a proteína ZC3H41 recombinante de *Leishmania* também foram utilizadas para a produção de extratos celulares em sete pontos de uma curva de

crescimento do parasita (0h, 6h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h) com o intuito de verificar mudanças no seu perfil de expressão nas fases de: adaptação, crescimento exponencial, estacionária até o início de morte celular. Em seguida, estes extratos foram avaliados por *Western-blot* com anticorpo anti-HA, utilizando novamente como controle de carga o fator EIF4AI (figura 32). É possível observar a detecção proteica no seu tamanho predito de 60 kDa e sua expressão durante todos os pontos da curva mencionados sem nenhuma alteração, em abundância ou modificações pós-traducionais.

Figura 32: Avaliação do perfil de expressão da proteína ZC3H41 durante o ciclo de vida de *L. infantum*. Foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-HA para detecção da proteína ZC3H41 e o anticorpo policlonal do EIF4AI para controle de carga, ambos diluídos 1:3000. O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgG de camundongo diluído 1:3000 para o monoclonal e o anti-IgG de coelho diluído 1:10000 para os policlonal.

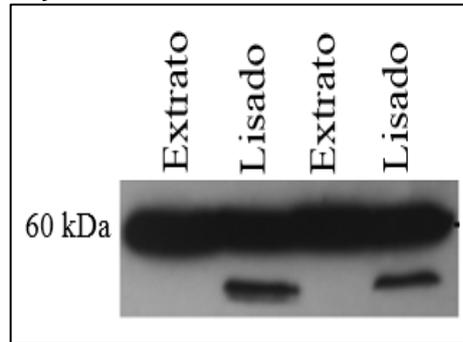


Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.4.5 Produção de lisados celulares e avaliação da imunoprecipitação do ZC3H41 fusionado ao epítipo HA

Novamente, para avaliar a susceptibilidade do ZC3H41 recombinante a eventos de degradação durante o processo de lise celular foi necessário a obtenção de frações solúveis citoplasmáticas de *L. infantum* por meio da centrifugação (lisados celulares). Alíquotas destes lisados supostamente expressando a proteína ZC3H41, no tamanho de 60 kDa, foram fracionadas e comparadas em SDS-PAGE com extratos celulares produzidos pela lise direta do parasita em tampão contendo SDS (Figura 33). É possível observar que o ZC3H41 estava presente em quantidade substancial nos lisados e que não houve degradação significativa durante a preparação destes.

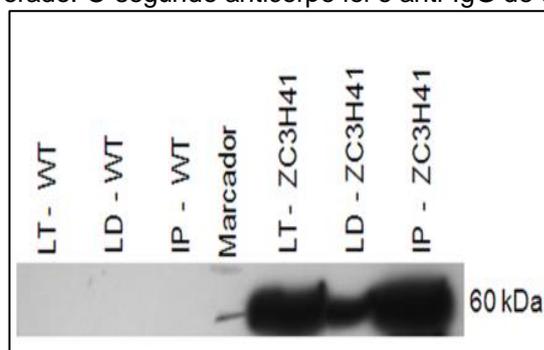
Figura 33: Ensaio de *Western-blot* de extratos e lisados celulares de *L. infantum* expressando o ZC3H41 fusionado ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA da marca sigma® diluído 1:3000 reconheceu a proteína no seu tamanho esperado de 45 kDa. Alguns fragmentos inespecíficos evidenciam degradação.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

Os lisados totais obtidos a partir de *L. infantum* expressando o ZC3H41 também foram utilizados para a obtenção de imunoprecipitados. Aliquotas da resina (IP) juntamente com o lisado total (LT) e o lisado após o ensaio (LD) foram utilizadas para a realização de *Western-blot* testado inicialmente com o anticorpo anti-HA. Assim como para as outras proteínas deste estudo o ensaio também foi realizado com um controle negativo, o lisado selvagem de *L. infantum* (WT), pois este só irá apresentar proteínas nativas do parasita expressas e não as que têm epítipo HA (Figura 34). O resultado mostra uma precipitação efetiva de boa parte do ZC3H41 junto a resina, com apenas uma fração deste permanecendo no lisado depletado.

Figura 34: Ensaio de *Western-blot* da imunoprecipitações da proteína ZC3H41 fusionada ao epítipo HA. O anticorpo monoclonal comercial anti-HA, diluído 1:3000, reconheceu a proteína no seu tamanho esperado de 60 kDa, no lisado total (LT), no produto do imunoprecipitado (IP) e ainda no lisado depletado (LD). Não houve reconhecimento no controle negativo (*Leishmania infantum* selvagem – WT), como esperado. O segundo anticorpo foi o anti-IgG de camundongo diluído 1:3000.

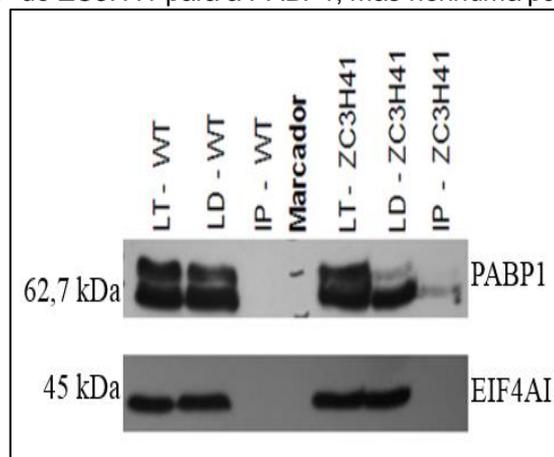


Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

5.4.6 Análise da interação de possíveis parceiros ligantes por ensaios de *Western-blot* e espectrometria de massas

O produto das imunoprecipitações também foi testado quanto à presença da PABP1 e EIF4AI como possíveis parceiros na co-precipitação (Figura 35). As proteínas selvagens foram detectadas no lisado e no depletado tanto do controle quanto das proteínas de estudo, nos seus respectivos tamanhos, 62,7 kDa e 45 kDa. O resultado sugere que o ZC3H41 parece co-precipitar, apenas com a PABP1, mas não com o EIF4AI.

Figura 35: Ensaios de imunoprecipitação do ZC3H41 com alguns possíveis parceiros ligantes. Foi utilizado anticorpos policlonais específicos para PABP1 e EIF4A, diluídos 1:2000 e 1:3000, respectivamente. O segundo anticorpo utilizado foi o anti-IgG de coelho diluído 1:10000. Observa-se uma detecção do alvo na IP do ZC3H41 para a PABP1, mas nenhuma para o EIF4AI.



Fonte: figura elaborada pela autora (2018).

Com o intuito de identificar a interação da proteína de estudo com possíveis parceiros ligantes, os imunoprecipitados foram enviados (em duplicata) para a Plataforma Tecnológica do Instituto Carlos Chagas em Curitiba para a espectrometria de massas e os dados analisados. Os resultados obtidos desta análise estão discriminados na tabela 4.

Tabela 4: Análise das proteínas, por espectrometria de massa, que co-precipitam com a ZC3H41 de *Leishmania infantum*. Os resultados foram divididos em número de acesso dos genes, identidade, função molecular e a média do Log2.

LINJ.27.1220 (ZC3H41)			
Nº de acesso do gene	Identidade	Função	Média (Log2) >1,9
Não caracterizada			
LINJ.05.0450	-	-	4,86
Enzimas			
LINJ.18.1360	Componente E1 do piruvato desidrogenase subunidade alfa	Atividade de oxidoreductase	3,48
LINJ.36.2790	Precursor de dihidrolipoamida acetiltransferase	Atividade transferase	2,60
Transporte celular			
LINJ.18.0300	Perfil de domínio do fator 2 do transporte nuclear	Transporte de proteínas intracelular	2,43
Relacionadas ao RNA			
LINJ.27.0980	<i>RBP21</i> kDa	Regulação da transcrição	2,33
LINJ.27.1220 (ZC3H41)	Proteína contendo domínio <i>KH</i>	Ligação ao RNA	5,35
LINJ.17.0610	<i>RBP23</i>	Ligação ao RNA	2,63
LINJ.27.2020	<i>RBP</i>	Ligação de ácido nucleico	2,24
LINJ.07.1020	Fator de <i>splicing</i> tipo 1	Regulação do <i>splicing</i> no RNA	2,28
LINJ.35.4200	Proteína de ligação a cauda de poliadenilação 2 (PABP2)	Ligação ao RNA (poli-A) e ao fator de iniciação eucariótico 4G	2,39
LINJ.25.0080	Proteína de ligação a cauda de poliadenilação 3 (PABP3)	Ligação ao RNA (poli-A) e ao fator de iniciação eucariótico 4G	2,32
LINJ.35.5360	Proteína de ligação a cauda de poliadenilação 1 (PABP1)	Ligação ao RNA (poli-A) e ao fator de iniciação eucariótico 4G	1,94

Fonte: elaborada pela autora (2018).

Após a análise dos dados percebe-se, de fato, a interação do ZC3H41 com os três homólogos da PABP (1-3), mas nenhuma com homólogos do complexo EIF4F. No entanto, surge uma proteína ainda não caracterizada em *Leishmania* que co-precipita fortemente com a proteína de estudo, a LINJ.05.0450, que apresenta um ortólogo em *T. brucei* com a função de ligação ao mRNA. Além desta, aparece também à proteína RBP23 que está envolvida em processos de tradução juntamente

com homólogos do complexo EIF4F e a PABP1. Em dados equivalentes de espectrometria de massas a RBP23 já foi identificada co-precipitando com a ZC3H41 (de Melo Neto et al., comunicação pessoal). Esses resultados sugerem então que a ZF em questão pode interagir, ao menos, indiretamente com o complexo de iniciação da tradução EIF4F por meio de sua associação com a RBP23.

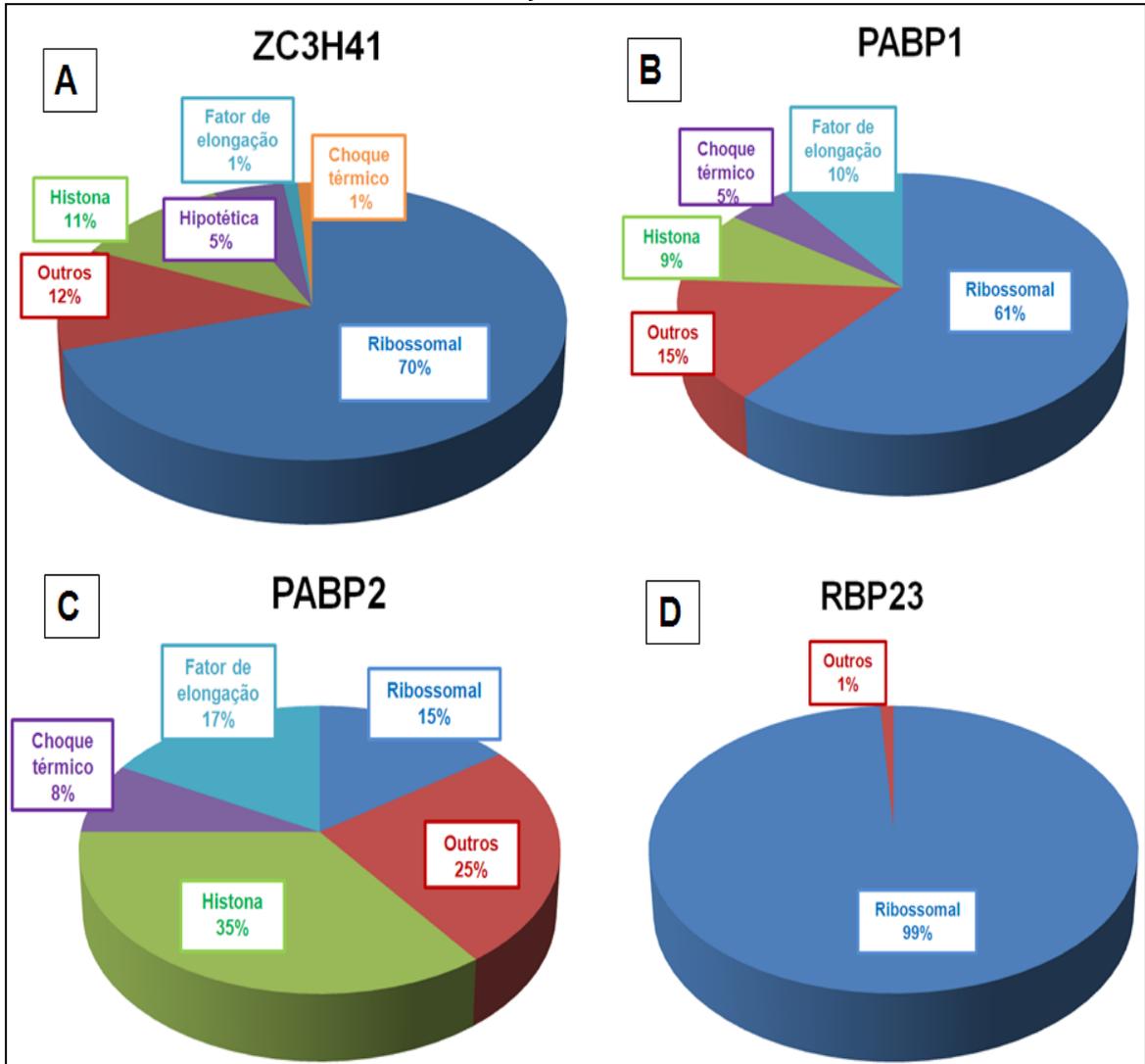
5.4.7 As populações de mRNAs associadas com ZC3H41

Os produtos das IPs também foram utilizados para a extração de RNA com o intuito de compreender a função dos complexos do ZC3H41 com os homólogos da PABP em *Leishmania* e a RBP23 por meio da identificação do conjunto de mRNAs ligados a essas proteínas. É importante ressaltar que em trabalhos prévios foram realizados os ensaios de imunoprecipitação dos homólogos da PABP (1 e 2) e RBP23 em triplicata usando os respectivos anticorpos policlonais para os primeiros e o anticorpo monoclonal comercial Anti-HA para o último, pois este apresentava o epítipo HA. Os mRNAs co-purificados da PABP1, PABP2 e RBP23 foram extraídos e utilizados para sequenciamento. Os primeiros 50 mRNAs com o maior número de leituras foram agrupados de acordo com a descrição funcional de seus produtos proteicos, que eram codificantes de proteínas ribossomais, histonas, fator de alongamento, choque térmico e outros. De forma semelhante foram realizados ensaios para a ZC3H41 com a intenção de comparar as análises. Para este segundo ensaio os mRNAs ligados ao ZC3H41 com o epítipo HA foram extraídos e usados para construir a biblioteca de cDNA e sequenciamento por meio de equipamento de última geração. O controle negativo utilizado foi de um extrato citoplasmático sem expressar proteínas marcadas com o epítipo HA. Os dados do sequenciamento mostraram os mRNAs ligados ao ZC3H41 que foram submetidos ao ensaio de RNA Seq para comparar com os dados da PABP1, PABP2 e RBP23.

A maioria dos mRNA mensageiros ligados ao ZC3H41 identificados são codificantes de proteínas ribossomais (70%), histonas (11%) e outros (12%) (Gráfico 2A). Nesta última categoria foram agrupados todos os produtos de mRNAs solitários. Ao comparar com os dados da PABP1, PABP2 e RBP23 percebe-se que todas

apresentam uma quantidade de mRNAs de proteínas ribossomais significativa, no entanto a RBP23 é a mais enriquecida. Com a PABP1, além da maior leitura de mRNAs de proteínas ribossomais foram identificados ainda histonas, fatores de alongação, choque térmico e outros (Gráfico 2B). Nos dados da PABP2 foi possível observar uma maior população de mRNAs de histonas, seguida de mRNAs solitários (outros), mRNAs de proteínas ribossomais, fatores de alongação e de choque térmico (Gráfico 2C). E por fim, a do RBP23 que tem apenas mRNAs de duas naturezas: codificantes de proteínas ribossomais e outros, sendo o primeiro de 99% (Gráfico 2D). Logo, percebe-se que a ZC3H41 se assemelha com as populações de mRNAs identificadas com as três proteínas comparadas, no entanto, mais ainda com a PABP1 por apresentar as mesmas categorias (com exceção da hipotética) e em proporções aproximadas. Fica claro, no entanto, que não há especificidade da ligação da ZC3H41 em relação aos mRNAs alvos ou aos homólogos de PABP, ao contrário da sua parceira RBP23 que se liga com grande especificidade a mRNAs codificantes de proteínas ribossomais e apenas a PABP1.

Gráfico 2: As populações de mRNAs ligadas ao ZC3H41, PABP1, PABP2 e ao RBP23. Os primeiros 50 mRNAs com o maior número de leituras foram agrupados de acordo com a descrição funcional de seus produtos proteicos. Em A, um gráfico mostra as populações de mRNAs identificadas no ZC3H41; Em B, as identificações realizadas na PABP1; em C, as categorias descobertas na PABP2; E, em D, as observações na RBP23.



Fonte: Figura elaborada pela autora (2018).

6 DISCUSSÃO

Em tripanossomatídeos há uma grande variedade de proteínas que são ligadas ao controle da tradução e que podem ou não sofrer modificações pós-traducionais, como já descrito na literatura (FERNANDEZ-MOYA; ESTEVEZ, 2010; ZINOVIEV et al., 2012). Essas observações despertam o interesse dos cientistas que estudam e buscam desvendar as peculiaridades moleculares desses parasitas. O fato é que para que ocorra qualquer dessas atividades em um organismo é necessário que haja a expressão de informações genéticas (genes) e essas, transformadas em proteínas (síntese proteica ou tradução). Modificações pós-traducionais tem papel fundamental na regulação de atividades biológicas tais como, ciclo, crescimento e proliferação celular, interações entre fatores proteicos, entre outras relações (ULRICH, 2012), além obviamente da tradução. E é justamente nesse trajeto que os tripanossomatídeos se destacam como seres ainda não devidamente conhecidos.

EIF4B

A suposta proteína EIF4B, inserida neste trabalho, apesar de ser pouco conservada, demonstrou algumas características inclusive como o ortólogo de *T. brucei* (URBANIAK et al, 2013) sugerindo que pudesse ser o ortólogo do eIF4B, já conhecida e encontrada na maioria dos eucariotos com a sua principal função de reforçar a atividade helicase do complexo eIF4F. Ao ser expressa em *L. infantum* pôde-se perceber o seu possível perfil fosforilado em extratos celulares, característica esta presente no eIF4B de humanos, por exemplo, e que participa diretamente na repressão de tumores quando inibida (RAUGHT et al., 2004; SHAHBAZIAN et al., 2010). Então, testes para investigar essa modificação pós-traducional foram realizados e foi confirmada a fosforilação pelo ensaio de purificação de fosfoproteína, indicando a sua atuação mais na fase estacionária/morte celular na curva de crescimento celular de formas promastigotas de *L. infantum*. Esse achado supôs que a sua atividade nessa etapa interferisse no tempo de morte celular, prolongando-o. No entanto, ao se analisar o seu

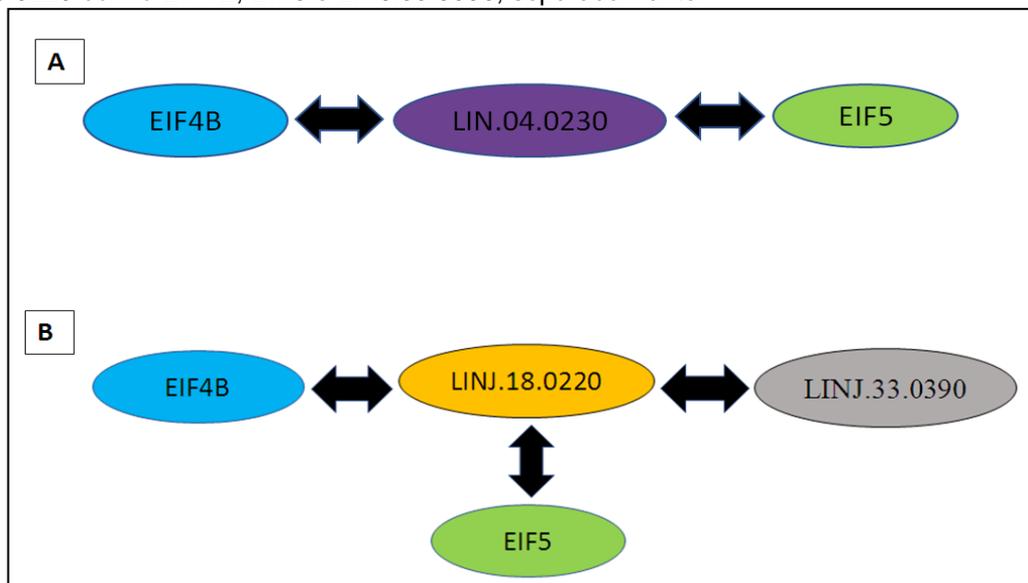
crescimento em um gráfico com uma linhagem selvagem de *L. infantum* isso não acontece. Ambas apresentam o mesmo padrão de tempo para esta etapa (dados não mostrados).

Para se descobrir quais complexos proteicos a suposta EIF4B está envolvida foram iniciados os ensaios de imunoprecipitação utilizando os soros policlonais EIF4A1 e PABP1, ambos já confirmados na literatura como capazes de interagir com esta proteína, tanto em plantas como animais e leveduras (CHENG; GALLIE, 2010; GALLIE; LIU, 2014). Apenas a PABP1 demonstrou co-precipitar, mas fracamente, com a EIF4B, resultado bastante intrigante visto que o EIF4B da maioria dos eucariotos se associa diretamente com o EIF4A (do complexo eIF4F) tornando a sua função até dispensável quando não associado a este (SAKHAROV; AGALAROV, 2016). Para uma melhor veracidade desse fato (e até descobrir novos) o imunoprecipitado foi enviado para a espectrometria de massas e, ao analisar os dados, realmente não foi observada nenhuma interação, ao menos semelhante, ao do EIF4B dos eucariotos. Pode-se afirmar até, que sua atividade pouco pode estar diretamente vinculada com a etapa de iniciação da tradução. No entanto, algumas proteínas co-precipitadas com a proteína do estudo sugerem uma importância desta proteína em outros processos celulares como de transdução de sinais intra e intercelular, função vinculada à proteína LINJ.04.0230 mais fortemente identificada com a EIF4B. A LINJ.04.0230 apresenta um domínio GRAM que está inserida na família das fosfatases. As proteínas que possuem este domínio, de uma forma geral, estão predominantemente envolvidas em processos de membrana acoplados, como reconhecimento de substrato para a transdução de sinais perante uma resposta celular. Mutações genéticas que afetam a estrutura do domínio GRAM conduzem a distúrbios humanos, incluindo miopatia com gênita ligada ao cromossomo X (BEGLEY et al., 2003).

Uma pesquisa realizada no banco de dados TriTryp revela que a LINJ.04.0230 é uma proteína ainda não caracterizada em *Leishmania*, mas que apresenta um perfil fosforilado semelhante a do EIF4B, o que sugere a sua importância em processos biológicos. Um aspecto interessante é que a LINJ.04.0230 também co-precipita com a EIF5, embora não seja observada uma interação entre o EIF4B e o EIF5. Pode se supor, então, que ao menos os processos biológicos que envolvem o complexo EIF4B/LIN.04.0230 e o EIF5/LINJ.04.0230

podem ser muito próximos (Figura 36A). Outra interação do EIF4B com a proteína de ligação ao mRNA (LINJ.18.0220), que também co-precipita com outras duas proteínas deste estudo (LINJ.33.0930 e EIF5), faz supor uma ligação incomum entre elas (Figura 36B). Um ortólogo da LINJ.18.0220 em *T. brucei* (Tb927.10.13720) foi localizado no núcleo e identificado como uma proteína de ligação a mRNAs envolvida no processamento destes, mais especificamente na sua estabilização (LUEONG et al., 2016). Em mamíferos, um ortólogo dessa mesma proteína denominada de Subunidade 64 kDa, se liga à pre-mRNAs e está mais voltada para a etapa de processamento do RNA, mais precisamente *splicing* e poliadenilação, porém não de forma direta e, sim auxiliando outras proteínas atuantes, de fato, nesse processo (VERALDI et al., 2001). Então, o EIF4B pode estar mais incluído em etapas que antecedem a síntese proteica, não sendo menos importante, pois vale salientar que a etapa de estabilização do mRNA, por exemplo, também é uma etapa de provável regulação diferencial em tripanossomatídeos (FADDA et al., 2014).

Figura 36: Possíveis complexos envolvendo o EIF4B. Em A, o complexo das proteínas EIF4B e EIF5 com a proteína LIN.04.0230, separadamente. E, em B as interações realizadas pela proteína LINJ.18.0220 com o EIF4B, EIF5 e LINJ.33.0390, separadamente.



Fonte: Figura elaborada pela autora (2018).

EIF5

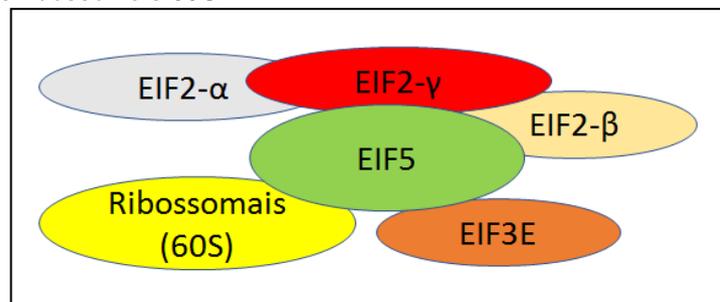
Em contrapartida ao possível EIF4B, o EIF5, um ortólogo já confirmado em tripanossomatídeos, não evidenciou grandes diferenças moleculares para a sua expressão. Esta foi observada até bem uniforme e constante durante toda a curva de crescimento celular em *L. infantum*. O EIF5 está envolvido no complexo multifatorial de pré-iniciação da tradução interagindo com os fatores eIF1, eIF1A1, subunidades do eIF2 (α , γ e β), eIF3 e a subunidade menor ribossomal (40S) para o reconhecimento do códon de iniciação da tradução no mRNA (PISAREVA; PISAREV, 2014). Com o resultado da espectrometria de massas foi possível confirmar esse complexo (EIF5, EIF3 e EIF2), mas não foi identificada a interação com o EIF1 e o EIF1A1. Algumas interpretações podem ser direcionadas com relação a este resultado, sendo que a primeira, e mais importante, é que de fato o EIF5 interage com as subunidades do EIF2 confirmando a sua função no complexo multifatorial de pré-iniciação e sua atividade de estabilizar o EIF2 (GDI), preparando-o para a dissociação da molécula de GDP para que todo o processo se inicie. No entanto, para que este processo de reciclagem do EIF2 ocorra é formado um complexo transiente entre o EIF5/EIF2-GDP/EIF2B (JENNINGS et al., 2013), porém o EIF2B não é observado no resultado, sugerindo que possa existir uma competição entre o EIF5 e o EIF2B no mesmo local de ligação ao EIF2.

A segunda, é que a proteína do estudo co-precipita com as subunidades do EIF2 (α , β e γ) como já descrito em *Leishmania* e na maioria dos eucariotos (LUNA et al., 2012; JENNINGS et al., 2013). No entanto, em trabalhos recentes com a subunidade EIF2 γ em *Leishmania* (com uma conservação semelhante à maioria dos eucariotos) foi identificado um parólogo, o EIF2 γ -2, uma subunidade exclusiva de espécies de *Leishmania* que foi originada por acúmulo de mutações e inserções após uma duplicação gênica. Ambos co-precipitaram com a EIF5, mas com uma maior intensidade com a EIF2 γ (NASCIMENTO, 2016). Logo, este trabalho reinteira o complexo EIF5/ EIF2 γ , mas não com o parólogo EIF2 γ -2. Assim como a sua co-precipitação com as subunidades, EIF2 α e EIF2 β , que também se ligam a EIF2 γ , mas não interagem entre si.

Por fim, a terceira observação é que o EIF5 co-precipita com a subunidade EIF3E e estudos em eucariotos identificaram a interação da subunidade EIF3C com

o complexo de pré-iniciação da tradução por meio da sua ligação ao EIF5 (ASANO et al., 2000; KARASKOVA et al., 2012). Outro achado interessante é que proteínas da subunidade ribossomal 60S foram detectadas, mas a interação com esta subunidade é característica do EIF5B de mamíferos, que é mais atuante na fase final da etapa de iniciação da tradução após o reconhecimento do códon pelo EIF5, recrutando a subunidade maior ribossomal para o mRNA e sua montagem correta com a 40S (JIANG et al., 2016). Então, é provável que o EIF5 deste trabalho atue em dois momentos da etapa de iniciação da tradução (Figura 37).

Figura 37: Proteínas que co-precipitam com o EIF5. A figura mostra as interações proteicas realizadas pelo EIF5 para a formação do complexo de pré-iniciação da tradução com as subunidades do fator EIF2, EIF3 e ribossomais 60S.



Fonte: Figura elaborada pela autora (2018).

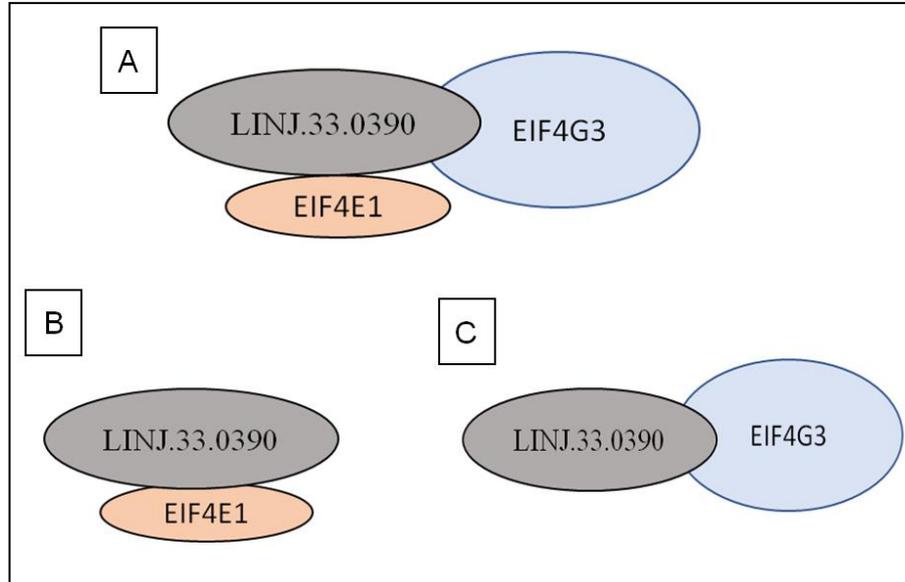
LINJ.33.0390

Outro achado importante desse trabalho foi com a proteína LINJ.33.0390, uma proteína ainda não caracterizada funcionalmente em nenhum organismo, mas que se fez muito presente em resultados prévios de co-precipitação (DE MELO NETO et al., RNA Biology, manuscrito aceito para publicação), por isso o interesse em caracterizá-la pois poderia participar de complexos importante na etapa de iniciação da tradução. Dessa forma os trabalhos foram iniciados e foi observado no primeiro ensaio de *Western-blot* que a sua expressão parecia ser menos abundante em *L. infantum* se comparando com as outras proteínas do estudo. Essa característica foi confirmada ao se realizar a curva de crescimento em uma concentração abaixo da metade do extrato inicial e não foi possível detectar a proteína.

Em relação à caracterização com possíveis parceiros ligantes, esta não foi detectada em ensaios com o anticorpo policlonal do EIF4AI e PABP1, porém o resultado da espectrometria de massas foi o mais inaudito. As principais proteínas que co-precipitam fortemente com a LINJ.33.0390 são: EIF4E1 e EIF4G3, dois homólogos do complexo EIF4F já descritos em tripanossomatídeos (DHALLIA et al., 2005), mas nenhuma com os homólogos da PABP. O primeiro está envolvido na repressão da tradução e o segundo é um dos mais fortes homólogos do complexo EIF4F envolvidos na tradução (FREIRE et al., 2010). O EIF4G3 forma o principal complexo EIF4F com os homólogos EIF4E4, EIF4AI e PABP1 (DE MELO NETO et al., 2016; YOFFE et al., 2009). Estudo com RNAi do EIF4G3 evidenciou o bloqueio da tradução, já o de RNAi do EIF4E4 nada acontece indicando então, que o EIF4G3 tem um papel fundamental na tradução (MOURA et al., 2015).

Estudos com a expressão do EIF4E1 e EIF4E4, em *T. brucei*, demonstrou uma redução na síntese proteica, mas não com morte celular imediata (FREIRE et al., 2011). Já em *L. major*, a interação entre EIF4E1 e EIF4G3 foi observada ativando a tradução, tanto em ensaios de frações de polissomos como em resultados de espectrometria de massas (YOFFE et al., 2009). Então, percebe-se que em tripanossomatídeos há uma divergência quanto a atuação do EIF4E1, onde ora ele atua como repressor da tradução e ora como estimulador. As evidências obtidas neste trabalho do LINJ.33.0390 juntamente com o EIF4E1 e EIF4G3 sugerem que este complexo apresenta uma atuação efetiva na tradução, em *L. infantum*, se supor a formação deste complexo em um mesmo momento (interação direta). No entanto, como ainda não se tem dados da espectrometria de massas do EIF4E1 e do EIF4G3 fica improvável afirmar se a ligação da proteína de estudo interage de forma direta e com a mesma intensidade que ambos os homólogos do EIF4F co-precipitam com esta. Então, os dados sugerem um complexo único (LINJ.33.0390/EIF4E1/EIF4G3) (Figura 38A) ou complexos isolados, LINJ.33.0390/EIF4E1 (Figura 38B) ou LINJ.33.0390/EIF4G3 (Figura 38C).

Figura 38: Proteínas que co-precipitam com o LINJ.33.0390. Em A, o complexo formado pelo LINJ.33.0390/EIF4E1/EIF4G3 com possível atuação na etapa de iniciação da tradução. Em B e C são os possíveis complexos isolados, LINJ.33.0390/EIF4E1 e LINJ.33.0390/EIF4G3, respectivamente.



Fonte: Figura elaborada pela autora (2018).

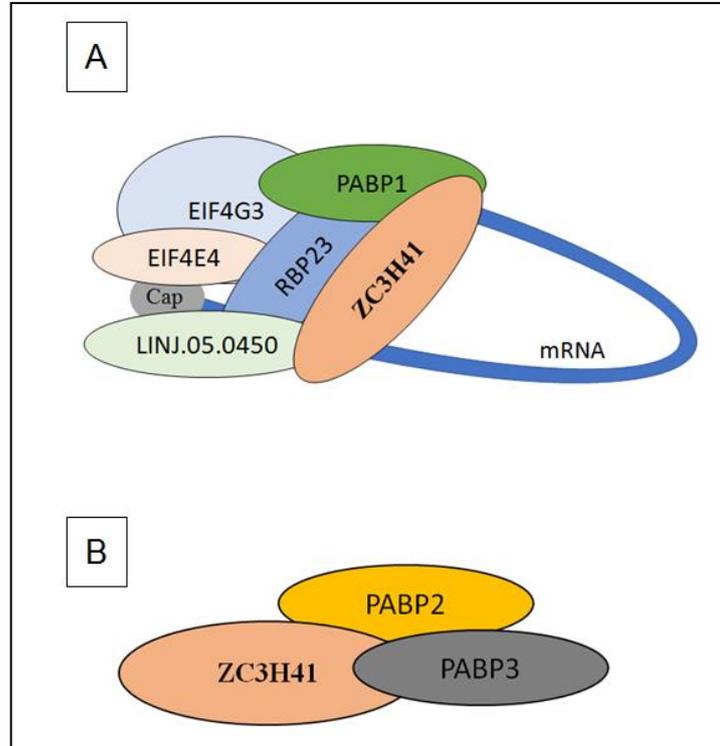
ZC3H41

A caracterização e identificação de complexos com a proteína ZC3H41 eram desconhecidas, visto que a maioria das proteínas que apresentam o domínio de *ZF* está mais associada a etapas que antecedem a tradução atuando mais no reparo do DNA. Mas essa proteína apareceu fortemente em estudos prévios de interação entre proteínas atuantes no processo de tradução (homólogos da PABP) (DE MELO NETO et al., RNA Biology, manuscrito aceito para publicação). E o fato desta proteína estar associada a etapas de síntese proteica não seria tão surpreendente, visto que em *T. brucei* já foi identificada uma *ZF* (ZC3H11) que participa ativamente da tradução, inclusive envolvida na regulação desta (MINIA; CLAYTON, 2016). Logo, foi iniciada a caracterização da ZC3H41 e a sua expressão detectada durante toda a curva de crescimento de formas promastigotas, constitutivamente e sem a presença de modificações pós-traducionais. Em ensaios de imunoprecipitação por meio de *Western-Blot* foi observada a sua interação com o homólogo da PABP1 e nenhuma com o EIF4AI. Os resultados dos anticorpos policlonais foram confirmados com a análise dos dados da espectrometria de

massas, onde foi observado a interação da proteína de estudo com os três homólogos da PABP, além das proteínas, RBP23 e LINJ.05.0450.

A RBP23 forma um complexo com homólogos típicos da iniciação da tradução em tripanossomatídeos, o EIF4E4, EIF4G3, PABP1 (mas não com a PABP2 e PABP3), o ZC3H41 e também com a mesma proteína ainda não caracterizada que co-precipitou com a proteína de estudo em questão, a LINJ.05.0450. Então os resultados sugerem que a ZC3H41 forme um complexo mais robusto junto a RBP23 (Figura 39A) e outro complexo mais isolado com os homólogos da PABP2 e 3 (Figura 39B). Este último muito provavelmente se dá em condições diferentes visto que a PABP1 é a única que integra nos dois complexos EIF4F já descritos em tripanossomatídeos (DE MELO NETO et al., 2016; YOFFE et al., 2009). Uma pesquisa realizada para a LINJ.05.0450 foi possível identificar um ortólogo em *T.brucei* (Tb927.7.7460) de localização citoplasmática e com a função de interagir com o mRNA, até mesmo pelo *cap*, podendo esta proteína está envolvida em processos de estabilização do mRNA ou na etapa da tradução (LUEONG et al., 2016). Um estudo realizado em células nervosas de mamífero descreve a interação de uma determinada ZF (denominada de MKRN1) com a PABP, e juntas, elas tem como funções, localizar e direcionar o mRNA para a síntese proteica controlando as sinapses nervosas por meio de sua ligação e estabilização ao mRNA (MIROCI et al., 2012). Vale salientar que um dos pontos críticos de regulação na expressão gênica de tripanossomatídeos é na estabilidade do mRNA (FADDA et al., 2014) e na etapa de iniciação da tradução (DE GAUDENZI et al, 2011; FERNANDEZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010) podendo então, a proteína de estudo em questão participar mais ativamente de processos mais próximos da síntese proteica e não apenas a nível de DNA. Esta concepção é reforçada quando os dados da população de mRNA do ZC3H41 é comparada com as da PABP1, PABP2 e RBP23, onde a maioria dos mRNA identificados são de codificantes de proteínas ribossomais demonstrando, ao menos, uma certa relevância para a etapa de síntese proteica.

Figura 39: Proteínas que co-precipitam com o ZC3H41. Em A, o possível complexo atuante da etapa de iniciação da tradução junto ao mRNA. Em B o possível complexo isolado do ZC3H41 com a PABP2 e 3.



Fonte: Figura elaborada pela autora (2018).

Considerações finais

Os resultados desse trabalho colaboram para um melhor entendimento do funcionamento da etapa de iniciação da tradução em tripanossomatídeos com os novos complexos que foram descobertos. As proteínas descobertas nesta dissertação precisam ser estudadas mais especificamente para saber, se de fato, participam ativamente da síntese proteica (reprimindo ou estimulando a tradução) ou se são apenas cofatores que se ligam a proteínas atuantes, sem exercer uma função crucial para esta etapa.

7 CONCLUSÕES

1. A modificação pós-traducional do EIF4B foi confirmada por meio de ensaios de purificação de fosfoproteínas, sendo de fato uma proteína fosforilada.
2. O EIF4B não se associa a nenhum homólogo do complexo EIF4F e os resultados apontam para uma atuação indireta na etapa de iniciação da tradução.
3. O EIF5 interage com homólogos do complexo multifatorial de pré-iniciação da etapa de iniciação da tradução com as subunidades do EIF2 (α , β , e γ), EIF3E e proteínas ribossomais (60S);
4. A LINJ.33.0390 forma um complexo com os homólogos, EIF4G3 e EIF4E1, atuantes na tradução indicando a sua forte ligação na síntese proteica;
5. A ZC3H41 co-precipita com os três homólogos da PABP e ainda duas outras proteínas envolvidas com mRNA e que também integarem com o complexo EIF4G3, EIF4E4 e PABP1, participantes da etapa de tradução.
6. A população de mRNA ligada ao ZC3H41 é, em maior parte, relacionada a mRNAs codificantes de proteínas ribossomais e o outro segmento subdividido em histonas, fatores de elongação, proteínas hipotéticas e de choque térmico.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, C.E.; JON, R.; LORSCH, J.R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nature Structural & Molecular Biology**, USA, 19(6), 568-76, jun. 2012.
- ALI, M.U. et al. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. **Tumor Biology**, China, 39(6), 1-19, jun. 2017.
- AMRANI, N. et al. Translation factors promote the formation of two states of the closed-loop mRNP. **Nature**, USA, 453(7199), 1276-80, may. 2008.
- ANDREOU A.Z.; KLOSTERMEIER D. The DEAD-box helicase eIF4A: paradigm or the odd one out? **RNA Biol**, Germany, 10(1), 19–32, sep. 2013
- ASANO K. et al. A multifactor complex of eukaryotic initiation factors, eIF1, eIF2, eIF3, eIF5, and initiator tRNA(Met) is an important translation initiation intermediate in vivo. **Genes Dev**, USA, 14(19), 2534–2546, Oct. 2000.
- ASANO K. et al. Multiples roles for the C-terminal domain of eIF5 in translation initiation complex assembly and GTPase activation. **EMBO J**, USA, 20(9), 2326-37, may. 2001.
- BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **Int. J. for Parasitol**, UK, 37(10), 1097–1106, Apr. 2007.
- BEGLEY, M.J. et al. Crystal structure of a phosphoinositide phosphatase, MTMR2: insights into myotubular myopathy and Charcot-Marie-Tooth syndrome. **Mol Cell.**, USA, 12(6), 1391-402, Dec. 2003.
- BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, UK, 309 (5733), 416-22, jun. 2005.
- BESTEIRO, S. et al. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **Int J Parasitol**, UK, 37(10), 1063-1075, Aug. 2007.
- BHAT, M.; ROBICHAUD, N.; HULEA, L. Targeting the translation machinery in cancer. **Nat Rev Drug Discov**, Canada, 14, 261–278, Mar. 2015.
- BORGHI, S.M, et al. *Leishmania* infection: painful or painless? **Parasitology Research**, Paraná (BR), 116(2), 465-475, Feb. 2017.
- BRASIL, Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Série A – Normas e Manuais Técnicos**, Brasil, 7a Ed., Caderno 11, 2009.

BRASIL, Ministério da Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Série A – Normas e Manuais Técnicos**, Brasil, 7a Ed., Caderno 11, 2017.

CAMPBELL, D.A.; THOMAS, S.; STURM, N.R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect**, USA, 5(13) 1231-1240, Nov. 2003.

CARVAJAL-GAMEZ, B.I.; QUINTAS-GRANADOS, L.I.; ARROYO, R. Translation initiation factor eIF-5A, the hypusine-containing protein, is phosphorylated on serine and tyrosine and O-glycosylated in *Trichomonas vaginalis*. **Microb Pathog**, Mexico, 52(3), 177–183, Mar. 2012.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nat Rev Microbiol**, Geneva, 5 (11), 873-882, Nov. 2007.

CHENG, S.; GALLIE, D.R. Competitive and noncompetitive binding of eIF4B, eIF4A, and the poly(A) binding protein to wheat translation initiation factor eIF4G. **Biochemistry**. USA, 49(38), 8251-65, sep. 2010.

CHEN, Y. et al. VPS35 Asp620Asn and EIF4G1 Arg1205His mutations are rare in Parkinson disease from southwest China. **Neurobiol Aging**. China, 34(6), 1709, e7-8, Jun. 2013.

COSTA, E.B.O.; PACHECO, C. Epigenetics: gene expression regulation at transcriptional level and its implications. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, Londrina, v.34, n.2, p.125-136, 2013.

DA COSTA LIMA, T.D.C. et al. Functional characterization of three *Leishmania* poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. **Eukaryotic cell**, Brazil, 9(10), 1484-94, jul. 2010.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol Ther**, USA, 22(6), 491-502, Nov. 2009.

DE AQUINO, I.R.P.U.C. Identificação de Interações entre os Fatores de Iniciação da Tradução EIF4B e EIF5 de *Leishmania* sp. com Homólogos de Diferentes Componentes da Maquinaria de Síntese Proteica. Trabalho de Conclusão de Curso, **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife (BR), 2015.

DE GAUDENZI, J.G. et al. Gene Expression regulation in trypanosomatids. **Biochemical Society Essays Biochem**, Argentina, 51, 31-46, Oct. 2011.

DE MELO NETO, O.P. et al. Translation Initiation Factors in Trypanosomatids: Identification of Conserved and Divergent Features Based on Sequence Analysis of the Available Genomes. **RNA Biology**, Brazil, manuscrito aceito para publicação.

DE MELO NETO, O.P. et al. Unique and Conserved Features of the Protein Synthesis Apparatus in Parasitic Trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania*) species. **Springer International publishing Switzerland**, Brazil, G. Hernández an R.

Jagus (eds), Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its regulation, Aug. 2016.

DMITRIEV, S.E. et al. Assembly of 48S translation initiation complexes from purified components with mRNAs that have some base pairing within their 5' untranslated regions. **Mol Cell Biol**. Russia, 23(24):8925-33, Dec. 2003.

DHALIA, R. et al. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic Acids Res**, Brazil, 34 (9): 2495-507, May. 2006.

DHALIA, R. et al. Translation initiation in *Leishmania major*. Characterization of multiple eIF4F subunit homologues. **Mol Biochem Parasitol**, Brazil, 140 (1), 23-41, Mar. 2005.

EL-SAYED, N.M. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, USA, 309 (5733), 409-15, jun. 2005.

FADDA, A. et al. Transcriptome-wide analysis of trypanosome mRNA decay reveals complex degradation kinetics and suggests a role for co-transcriptional degradation in determining mRNA levels. **Mol Microbiol**. Rockville, 94(2), 307-26, Oct. 2014.

FERNANDEZ-MOYA, S.M.; ESTÉVEZ, A.M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **Wiley Interdiscip Rev RNA**, Spain, 1(1), 34-46, May. 2010.

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharm Res**, Cuba, 28(11), 2758-70, sep. 2011.

FRANKS, T.M.; LYKKE-ANDERSEN J. The control of mRNA decapping and P-body formation. **Mol Cell**. USA, 32(5), 605-15, Dec. 2008.

FREIRE, E.R. et al. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Mol Biochem Parasitology**, Brazil, 176 (1), 25-36, Nov. 2010.

FREIRE, E.R. et al. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Mol Biochem Parasitol**. Brazil, 176(1):25-36, Mar. 2011.

FREIRE, E.R. et al. *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. **Eukaryot Cell**. Brazil, 13(7), 896-908. May. 2014A.

FREIRE, E.R. et al. eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. **RNA**. 20(8), 1272-86. Aug. 2014.

FREIRE, E.R. et al. The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. **Pathogens**. Brazil, 6(4). pii: E55, Oct. 2017.

GALLIE, D.R.; LIU, R. Phylogenetic analysis reveals dynamic evolution of the poly(A)-binding protein gene family in plants. **BMC Evol Biol**. USA, 14, 238, Nov. 2014.

GRIENSVEN, J.V.; DIRO, E. Visceral leishmaniasis. **Infect Dis Clin North Am**. Belgium, 26(2), 309-22, Apr. 2012.

GROSS, J.D.; MOERKE, N.J.; VON DER HAAR, T. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. **Cell**, USA, 115(6), 739–750, Dec. 2003.

GUNZL, A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? **Eukaryotic cell**, USA, 9(8), 1159-1170, Jun. 2010.

HAILE, S.; PAPADOPOLOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Curr Opin Microbiol**, Canada, 10 (6), 569-77, Dec. 2007.

HALL, M.P.; HO, C.K. Functional characterization of a 48 kDa *Trypanosoma brucei* cap 2 RNA methyltransferase. **Nucleic Acids Res**, USA, 34 (19), 5594-602, Oct. 2006.

HARMS, U. et al. eIF4B, eIF4G and RNA regulate eIF4A activity in translation initiation by modulating the eIF4A conformational cycle. **Nucleic Acids Res**. Germany, 42(12), 7911-22, jul. 2014.

HE, H. et al. The yeast eukaryotic initiation factor 4G (eIF4G) HEAT domain interacts with eIF1 and eIF5 and is involved in stringent AUG selection. **Mol Cell Biol**. USA, 23(15), 5431-45, Aug. 2003.

HERNANDEZ, G.; VAZQUEZ-PIANZOLA, P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. **Mechanisms of development**, Germany, 7-8, 865-76, jul. 2005.

HERNANDEZ, G. et al. On the diversification of the translation apparatus across eukariotes. **Comp Funct Genomics**, Mexico, 2012: 256848, May. 2012.

HINNEBUSCH, A.G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. **Annu Rev Biochem**, Bethesda, 83, 779–812, Jan. 2014.

IVENS, A.C. et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science**, UK, 309 (5733), 436-42, Jul. 2005.

JACKSON, R.J.; HELLEN, C.U.; PESTOVA, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat Rev Mol Cell Biol Rev**, Cambridge, 11 (2), 113- 27, Feb. 2010.

JÄGER, A.V.; MUIÁ, R.P.; CAMPETELLA, O. Stage-specific expression of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase involves highly conserved 3' untranslated regions. **FEMS Microbiol Lett.** Argentina, 283(2), 182-8, Jun. 2008.

JENNINGS, M.D. et al. eIF2B promotes eIF5 dissociation from eIF2*GDP to facilitate guanine nucleotide exchange for translation initiation. **Genes Dev.** UK, 27(24), 2696-707, Dec. 2013.

JENNINGS, M.D.; PAVITT, G.D. eIF5 has GDI activity necessary for translational control by eIF2 phosphorylation. **Nature.** UK, 465(7296), 378-81, May. 2010.

JIANG, X. et al. Proteomic Analysis of eIF5B Silencing-Modulated Proteostasis. **PLoS One.** China, 11(12), e0168387, Dec. 2016.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and leishmania parasites: friends or foes? **Trends Parasitol.** USA, 22(9): 439-45, Jul. 2006.

KARASKOVA, M. et al. Functional characterization of the role of the N-terminal domain of the c/Nip1 subunit of eukaryotic initiation factor 3 (eIF3) in AUG recognition. **J Biol Chem.** Czech Republic, 287, 28420–28434, Jun. 2012.

KERWITZ, Y. et al. Stimulation of Poly(A) Polymerase Through a Direct Interaction With the Nuclear Poly(A) Binding Protein Allosterically Regulated by RNA. **EMBO J,** Germany, 22, 3705-3714, Jul. 2003.

KOLEV, N.G. et al. The transcriptome of the human pathogen *Trypanosoma brucei* at single-nucleotide resolution. **PLoS Pathog,** USA, 6(9), pii: E1001090, Sep. 2010.

KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends Parasitol Rev,** Cambridge, 27 (1), 23-30, Jul. 2011.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. **Molecular & Biochemical Parasitology,** UK, 181: 61– 72, Oct. 2012.

LEBOWITZ, J.H. et al. Coupling of Poly(A) Site Selection and Trans-Splicing in *Leishmania*. **Genes Dev,** Indiana, 7, 996-1007, Jul. 1993.

LEWIS, D.J. Phlebotomid sandflies. Bull. **World Health Organ,** 44(4), 535-551, 1971.

LEY, S.C.; CARVALHO, L.P.S. Protein CoAlation: a redox-linked post-translation modification. **Biomechemical Journal,** UK, 474 (16), 2897-2899, Aug. 2017.

LIANG, X.H. et al. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. **Eukaryot. Cell,** Israel, 2, 830-840, Oct. 2003.

LINDER, P.; JANKOWSKY, E. From unwinding to clamping – The DEAD box RNA helicase family. **Nat Rev Mol Cell Biol**, Genève, 12(8), 505-16, Jun. 2011.

LLOYD, R.E. Translational control by viral proteinases. **Virus Res Rev**, USA, 119 (1), 76- 88, Jul. 2006.

LIVINGSTONE, M. *et al.* Mechanisms governing the control of mRNA translation. **Phys Biol Rev**, Canada, 7 (2), 021001, May. 2010.

LORSCH, J.R.; DEVER, T.E. Molecular view of 43 S complex formation and start site selection in eukaryotic translation initiation. **The Journal of biological chemistry**, USA, 285, 21203–21207, Jul. 2010.

LUEONG, S. *et al.* Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. **Mol Microbiol**. Germany, 100(3), 457-71, May. 2016.

LUNA, R.E. *et al.* The C-terminal domain of eukaryotic initiation factor 5 promotes start codon recognition by its dynamic interplay with eIF1 and eIF2 β . **Cell Rep**. USA, 1(6), 689-702. Jun. 2012.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene expression in trypanosomatid parasites. **J Biomed Biotechnol Rev**, Mexico, 2010, 525241, Aug. 2010.

MATTHEWS, K.R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs transsplicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes Dev**. New Haven, 8(4), 491-501, Feb. 1994.

MELEPPATTU, S. *et al.* The eIF3 complex of Leishmania-subunit composition and mode of recruitment to different cap-binding complexes. **Nucleic Acids Res**. 43 (13), 6222-35, 2015.

MERRICK, W.C. Eukariotic protein synthesis: still a mystery. **J Biol Chem**, 285(28), 21197-201, 2010.

MINIA, I.; CLAYTON, C. Regulating a Post-transcriptional regulator: protein phosphorylation, degradation and translation blockage in control of the trypanosome stress-response RNA-Binding protein ZC3H11. **PLOS Pathogens**, DOI:10.1371/journal.ppat.1005514, 2016.

MIROCI, H. *et al.* Makorin ring zinc finger protein 1 (MKRN1), a novel poly(A)-binding protein-interacting protein, stimulates translation in nerve cells. **J Biol Chem**. 287(2), 1322-34, Jan. 2012.

MOURA, D.M. *et al.* Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA Biol**. 12(3), 305-19, 2015.

NASCIMENTO, L.M. Complexo eIF2 em *Leishmania sp.*: Expressão proteica, função biológica, interações moleculares e descrição de novo fator de iniciação da tradução. Tese de doutorado. **Universidade Federal de Pernambuco**, Recife, 2016.

NEVES, D. **Parasitologia Humana**. 11ª edição. Ed. Atheneu, São Paulo, 2011, 521p.

NOVO, S.P.C. et al. The processo of Leishmania infection-disease and new perspectives of paleoparasitology. **Rev Inst Med Trop**, Sao Paulo, 58,45, 2016.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**. 69, 510-518, 2014.

PANICKER, N.; DAWSON, V.L.; DAWSON, T.M. Activation mechanisms of the E3 ubiquitin ligase parkin. **Biochemical Journal**, 474 (18),3075-3086, 2017.

Park EH, Walker SE, Lee JM, Rothenburg S, Lorsch JR, Hinnebusch AG. Multiple elements in the eIF4G1 N-terminus promote assembly of eIF4G1-PABP mRNPs in vivo. **EMBO J**. 2010; 30, 302-316.

PISAREVA, V.P.; PISAREV, A.V. eIF5 and eIF5B together stimulate 48S initiationcomplex formation during ribosomal scanning. **Nucleic Acids Research**, 42 (19), 12052–12069, 2014.

RAUGHT, B. et al. Phosphorylation of eucaryotic translation initiation factor 4B Ser422 is modulated by S6 kinases. **EMBO J**. 23(8), 1761-9, Apr. 2004.

REZENDE, A.M. et al. The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates--identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. **BMC Genomics**. Brazil, 15, 1175, Dec. 2014.

RICHTER, J.D.; SONENBERG, N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins. **Nature**. 433(7025),477-80, Feb. 2005.

RUGGERO, D.; MONTANARO, L.; MA, L. The translation factor eIF-4E promotes tumor formation and cooperates with c-Myc in lymphomagenesis. **Nature Med**,10, 484–486, 2004.

SAKHAROV, P.A.; AGALAROV, S.C. Free Initiation Factors eIF4A and eIF4B Are Dispensable for Translation Initiation on Uncapped mRNAs. **Biochemistry (Mosc)**. 81(10), 1198-1204, Oct. 2016.

SCHMITT, E.; NAVEAU, M.; MECHULAM Y. Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: a heterotrimeric tRNA carrier. **FEBS Lett**. 584(2),405-12, Jan. 2010.

SINGH, S.; SHARMA, U.; MISHIRA, J. Post-kala-azar dermal leishmaniasis: recent developments. **International Journal of Dermatology**. 50, 1099–1108, 2011.

SINGH, C.R. et al. Sequential eukaryotic translation initiation factor 5 (eIF5) binding to the charged disordered segments of eIF4G and eIF2 β stabilizes the 48S preinitiation complex and promotes its shift to the initiation mode. **Mol Cell Biol.** 32(19), 3978-89, Oct. 2012.

SHAHBAZIAN, D. et al. eIF4B controls survival and proliferation and is regulated by proto-oncogenic signaling pathways. **Cell Cycle.** 9(20), 4106-9. Oct. 2010.

SHUMAN, S. What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 3, 619–625, 2002.

SKEIKY, Y.A. et al. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. **J Immunol.** 161(11),6171-9, Dec. 1998.

SONENBERG, N.; DEVER, T.E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. **Curr Opin Struct Biol.** 13(1), 56-63, Feb. 2003.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, 136 (4), 731-45, 2009.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **J. Clin. Invest.** 118, 1301-1310, 2008.

SULAMIT, M. Spliced leader RNA silencing (SLS) – a programmed cell death pathway in *Trypanosoma brucei* that induced upon ER stress. **Parasit Vectors**, 5, 107, 2012.

SZÖÖR, B. Trypanosomatid protein phosphatases. **Mol Biochem Parasitol Rev**, 173 (2), 53-63, 2010.

TORRES-GUERRERO, E. et al. Leishmaniasis: a review [version 1; referees: 2 approved]. **F100Research**, 750, 2017.

ULRICH, H.D. Ubiquitin, SUMO and phosphate: How a trio of posttranslational modifiers governs protein fate. **Mol Cell.** 47(3), 335-7, Aug. 2012.

URBANIÁK, M.D.; MARTIN, D.M.A; FERGUSON, M.A.J. Global Quantitative SILAC Phosphoproteomics Reveals Differential Phosphorylation Is Widespread between the Procyclic and Bloodstream Form Lifecycle Stages of *Trypanosoma brucei*. **J. Proteome Res**, 12, 2233 –2244, 2013.

VALÁSEK, L.S. 'Ribozoomin' – Translational initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). **Curr Protein Pept Sci**, 13(4), 305-30, 2012.

VERALDI, K.L. et al. hnRNP F influences binding of a 64-kilodalton subunit of cleavage stimulation factor to mRNA precursors in mouse B cells. **Mol Cell Biol.** 21(4), 1228-38, Feb. 2001.

YÁNGÜEZ, E.; NIETO, A. So similar, yet so diferente: seletive translational of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza vírus infected cell. **Virus Res.** 156(1-2),1-12, Mar. 2011.

YOFFE, Y. et al. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. **Nucleic Acids Res**, Israel, 37, 3243-3253, Sep. 2004.

YOFFE, Y. et al. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. **Nucleic Acids Res**, Israel, 37, 3243-3253, Mar. 2009.

ZINOVIEV, A. et al. A novel 4E interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. **Nucleic acids research**, Israel, 39 (19), 8404-15, Jul. 2011.

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. **Comp Funct Genomics**, Israel, 2012, 8137-18, Jul. 2012.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T.B.; AVERY, V.M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, Australia, Volume 00, Number 00. 2039, 1-16, Oct. 2017.

Referências Eletrônicas:

WHO – World Health Organization. Disponível em: <<http://www.who.int>>. Acesso em: 01 out. 2017.

NOVAGEN Vector Database. Disponível em:< https://www.addgene.org/vector-database/query/?q_vdb=source:Novagen>. Acesso em: 10 jan. 2017.