

Universidade Federal de Pernambuco  
Centro de Biociências  
Programa de Pós-Graduação em Genética

**THAÍSE YASMINE VASCONCELOS DE LIMA CAVALCANTI**

**Identificação de parceiros funcionais e propriedades do fator EIF4E5,  
homólogo do fator de iniciação da tradução EIF4E (EIF4E5) de *Leishmania  
infantum***

Recife

2018

**THÁISE YASMINE VASCONCELOS DE LIMA CAVALCANTI**

**Identificação de parceiros funcionais e propriedades do fator EIF4E5,  
homólogo do fator de iniciação da tradução EIF4E (EIF4E5) de *Leishmania  
infantum***

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

**Orientador:** Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto  
**Co-orientadora:** Dra Amaranta Muniz Malvezzi

Recife

2018

Catálogo na fonte:  
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Cavalcanti, Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima

Identificação de parceiros funcionais e propriedades do fator EIF4E5, homólogo do fator de iniciação da tradução EIF4E (EIF4E5) de *Leishmania infantum* /Thaíse Yasmine Vasconcelos de Lima Cavalcanti. – 2018.

94 f. : il.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

Coorientador: Amaranta Muniz Malvezzi.

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

1. *Leishmania*. 2. Expressão gênica. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (Orientador). II. Malvezzi, Amaranta Muniz (Coorientadora). III. Título.

579.4

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 - 211

**THAÍSE YASMINE VASCONCELOS DE LIMA CAVALCANTI**

**Identificação de parceiros funcionais e propriedades do fator EIF4E5,  
homólogo do fator de iniciação da tradução EIF4E (EIF4E5) de *Leishmania  
infantum***

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

Aprovada em: 02/03/2018.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Orientador)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Antônio Roberto Lucena de Araújo (Examinador Interno)  
Universidade Federal de Pernambuco/UFPE

---

Dr. Danilo Elias Xavier (Examinador Externo)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

---

Dr. Manoel Sebastião da Costa Lima Júnior (Examinador Externo)  
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto pela oportunidade, conhecimento transmitido e confiança para a realização deste trabalho com todo o suporte necessário por meio de sua orientação.

Ao grupo BioMolTrip e a todos que colaboraram de alguma forma para meu crescimento pessoal, por meio da amizade construída e crescimento profissional, por meio do conhecimento repassado ao longo do tempo, agradeço a vocês: Ada, Amaranta, Artur, Allana, Danielle, Diego, Éden, Izabel, Isis, Igor, Jade, Kleison, Ludmila, Lílian, Maria, Mariana, Moezio, Tallyta, Veruska e Wagner. Especialmente a Gustavo Lima por todo apoio, paciência e colaboração com as várias etapas para a construção deste trabalho.

A Irassandra, colega de turma de mestrado e grande amiga, obrigada pela amizade e conhecimento repassado. Ira acompanhou e apoiou os vários momentos de alegria e tristeza desde a seleção até o fim do mestrado.

Aos grandes presentes adquiridos durante o mestrado: Adriana Neuman, Adriana Roberto, Aline, Mayara e Camila. Obrigada pelo apoio, pelos conselhos e pelo carinho.

A Christian Reis pelo conhecimento repassado, pelo profissionalismo, por chefiar de maneira admirável o departamento da microbiologia, agradeço também pela amizade.

A Carol, secretária do departamento da microbiologia, pela agilidade, apoio e suporte em todos momentos necessários e pela amizade construída.

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

Ao Instituto Aggeu Magalhães pela infraestrutura e a todos os funcionários envolvidos que mantêm a organização do Instituto.

Ao programa de Pós Graduação em Genética – PPGG- UFPE.

A todos os professores que passaram por minha vida, pois cada um, de alguma forma me transmitiu valores pessoais e científicos que instigou minhas escolhas.

A minha família, especialmente a meu pai Abraão, minha mãe Edlúcia e minha irmã Lígia por todo apoio, compreensão e paciência nos momentos em que tive que me ausentar. Obrigada por acreditar em mim mais do que eu mesma.

A força condutora, Deus, que rege, une e proporciona encontros de sabedoria para que algo maior seja realizado.

*“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. Albert Einstein*

*“Que os nossos esforços desafiem as impossibilidades. Lembrai-vos de que as grandes proezas da história foram conquistas daquilo que parecia impossível.” Charles Chaplin*

## RESUMO

Na tradução em eucariotos, a etapa de iniciação requer a cooperação de fatores proteicos que auxiliam as subunidades ribossomais na sua função. Dentre esses, destaca-se o complexo eIF4F, onde a subunidade eIF4E é a responsável pelo reconhecimento dos mRNAs por meio de sua extremidade 5'. Nos tripanossomatídeos, protozoários parasitas de importância médica, sua expressão gênica é regulada pós-transcricionalmente e durante a tradução. Nesse contexto, múltiplos homólogos de eIF4E foram identificados nestes organismos com possível função na regulação da tradução. Dentre esses, os EIF4E5 e EIF4E6 ainda não foram descritos formalmente em *Leishmania* e o estudo do EIF4E5 foi o objetivo deste trabalho. Para isso, construções plasmidiais foram inicialmente geradas para a expressão da proteína nativa e mutantes em *Leishmania infantum*. Foi visto que a superexpressão do EIF4E5 se dá em diferentes fases de crescimento da *L. infantum*. Sua distribuição subcelular, determinada por imunofluorescência, ocorre por todo o citoplasma e sua superexpressão leva a alterações morfológicas no parasita. Ensaios de imunoprecipitação e espectrometria de massas revelaram que o EIF4E5 interage especificadamente com o EIF4G1, homólogo de outra subunidade do complexo eIF4F, o eIF4G. Outras interações com proteínas de modificação de mRNAs e ligadas a vias de sinalização também foram identificadas, mas várias destas interações foram abolidas quando foi mutado um resíduo de triptofano conservado no EIF4E5. Sendo assim, este trabalho revelou aspectos inéditos relacionados à função desta proteína nos tripanossomatídeos.

**Palavras-chave:** Tripanossomatídeos. Expressão gênica. Fatores de iniciação da tradução. Síntese proteica. eIF4E.

## ABSTRACT

In translation in eukaryotes, the initiation stage requires the cooperation of proteins factors that assist the ribosomes subunits in its function. Amongst these the eIF4F complex stands out, with its subunit eIF4E responsible for the recognition of mRNAs through their 5', end. In trypanosomatids, protozoan parasites of medical importance, their gene expression is regulated post- transcriptionally and also during translation. In this context, multiple eIF4E homologues have been identified in these organisms with possible functions in the regulation of translation. Amongst these, the EIF4E5 and EIF4E6 homologues have not yet been formally described in *Leishmania*. Therefore, the study of EIF4E5 was the objective of this work. Initially plasmid constructions were generated for the expression of the native and mutant protein in *Leishmania infantum*. The overexpression of EIF4E5 was confirmed and seen to occurs at different stages of growth of *L. infantum*. Its subcellular distribution was determined by immunofluorescence and seen to occur throughout the cytoplasm but its overexpression leads to morphological changes in the parasite. Immunoprecipitation and mass spectrometry assays revealed that EIF4E5 interacts specifically with EIF4G1, homologous to another eIF4F subunit, eIF4G. Other interactions with mRNA modifying enzymes and proteins linked to signaling pathways were also identified. Several of these interactions were abolished when a tryptophan residue conserved in EIF4E5 was mutated. Thus, this work revealed unknown aspects related to the function of this protein in trypanosomatids.

**Key-words:** Trypanosomatids. Gene expression. Translation initiation factors. Protein interaction. eIF4E.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Principais estruturas morfológicas dos tripanossomatídeos.....	20
Figura 2 - Flebotomíneo.....	22
Figura 3 - Ciclo de vida da <i>Leishmania</i> .....	24
Figura 4 - Manifestações clínicas das leishmanioses.....	25
Figura 5 - Distribuição geográfica das leishmanioses em 2015.....	27
Figura 6 - Formação dos mRNAs maduros nos tripanossomatídeos.....	31
Figura 7 - Esquematização do complexo eIF4F.....	33
Figura 8 - Estrutura tridimensional da proteína eIF4E de camundongo.....	37
Figura 9 - Esquema do complexo EIF4E5-EIF4G1-G1-IP-GI-IP2.....	40
Figura 10 - Esquema das reações de PCR para obtenção dos genes mutantes.....	47
Figura 11 - Esquema do plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa.....	50
Figura 12 - Imagem das proteínas recombinantes purificadas.....	57
Figura 13 - Imagem do teste dos anticorpos purificados.....	58
Figura 14 - Quantificação da proteína recombinante <i>L</i> EIF4E5.....	59
Figura 15 - Quantificação da proteína endógena <i>L</i> EIF4E5 em <i>L. infantum</i> .....	60
Figura 16 - Imagens de <i>L. infantum</i> em microscopia confocal.....	61
Figura 17 - Localização subcelular da proteína <i>L</i> EIF4E5.....	62
Figura 18 - Análise comparativa de sequências do EIF4E5 de diferentes espécies de Leishmania e Trypanosoma.....	64
Figura 19 - Gel de agarose resultante de corrida eletroforética dos fragmentos da 1ª PCR e 2ª PCR.....	65
Figura 20 - Gel de agarose confirmando a subclonagem em plasmídeo pSP-BT1Y- Neo alfa.....	66
Figura 21 - <i>Western blot</i> confirmando a superexpressão de <i>L</i> EIF4E5 em <i>L. infantum</i> .....	67
Figura 22 - <i>Western blot</i> confirmando a expressão das proteínas em curvas de crescimento.....	68
Figura 23 - Morfologia Celular analisada por Contraste de Interferência Diferencial.....	70
Figura 24 - Imagem dos lisados celulares e imunoprecipitação.....	72

Figura 25 - Imagem representativa do subcomplexo do EIF4E5 e suas versões

.....83

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - <i>Primers</i> para obtenção de linhagens mutantes.....	46
Quadro 2 - Proteínas co-imunoprecipitadas com o EIF4E5 em <i>L. infantum</i> .....	75

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

<b>Item</b>	<b>Definição</b>
A	Adenina
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BOD	<i>Biochemical Oxygen Demand</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
OD	<i>Optic Density</i> (Densidade Óptica)
Dntp	<i>Deoxynucleotide Triphosphates</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
eIFs	<i>eukaryotic Initiation Factors</i>
GST	Glutathiona S- Transferase
G	Gravidade
IPTG	Isopropil-Beta-D-galactosídeo
IP	Imunoprecipitação
KDa	Kilodaltons
LB	Luria Bertani
LC	Leishmaniose cutânea
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LV	Leishmaniose visceral
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LM	Leishmaniose mucosa
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
m <sup>7</sup> GTP Triphosphate)	7-metilguanosina trifosfato (7-methylguanosine Triphosphate)
mL	Mililitro
µL	Microlitro
ng	Nanograma
µg	Micrograma
NaOH	Hidróxido de sódio
NaCl	Cloreto de sódio
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>

Pb	Pares de base
PBS	Phosphate Buffered Saline
PVDF	Polyvinylidene fluoride – Polivinil Fluorido
PABP	Proteína de Ligação a Cauda Poli-A ( <i>Poly-A Binding Protein</i> )
HA	Hemaglutinina
HEAT	Huntingtina (envolvida na doença de Huntington), EF3 (Fator de Elongação 3), PR/65A (subunidade A da proteína Fosfatase 2), e mTor/FRAP (molécula sensível à rapamicina)
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
RNA	Ácido Ribonucleico
mRNA	RNA mensageiro
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes ( <i>Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis</i> )
SL	Sequência <i>Spliced leader</i> ou mini-éxon
SMF	Sistema Mononuclear Fagocitário
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> – Região não traduzida
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- $\beta$ -D-galactopiranosídeo
WB	<i>Western blot</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
WT	<i>Wilde type</i> (Linhagem selvagem)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo Geral.....	17
1.1.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	19
2.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE.....	19
2.1.1 Gênero <i>Leishmania</i> .....	20
2.1.2 Vetores de <i>Leishmania</i> .....	21
2.1.3 Ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i> .....	22
2.1.4 As leishmanioses.....	24
2.1.5 Epidemiologia das leishmanioses.....	26
2.2 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	27
2.2.1 Organização genômica.....	28
2.2.2 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos.....	29
2.2.3 Processamento dos mRNAs.....	30
2.3 INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM EUCARIOTOS.....	31
2.3.1 Complexo eIF4F.....	32
2.3.2 eIF4A.....	34
2.3.3 eIF4G.....	34
2.3.4 eIF4E e seus homólogos.....	36
2.4 A PROTEÍNA EIF4E5 DE TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	38
2.4.1 Parceiros funcionais do EIF4E5 de <i>T. brucei</i> .....	39
2.4.2 EIF4E5 de <i>Leishmania</i> .....	41
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	42
3.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE.....	42
3.2 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO POR IMUNOADSORÇÃO.....	43
3.3 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA LiEIF4E5 ENDÓGENA EM CÉLULAS DE <i>L. infantum</i> .....	44
3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA.....	45
3.5 CONSTRUÇÕES DOS GENES MUTANTES DO EIF4E5.....	46
3.6 CLONAGEM NO VETOR pGEM®-T EASY.....	48

3.7 SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO PSP-BT1-Y-NEO-ALFA-HA.....	49
3.8 CULTIVO DE PARASITAS E TRANSFEÇÃO.....	50
3.9 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS TOTAIS E CURVAS DE CRESCIMENTO.....	52
3.10 DELEÇÃO E COMPLEMENTAÇÃO GÊNICA.....	53
3.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	54
3.12 LISE CELULAR POR CAVITAÇÃO EM CILINDRO DE ALTA PRESSÃO.....	54
3.13 IMUNOPRECIPITAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	55
<b>4 RESULTADOS.....</b>	<b>57</b>
4.1 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE ANTICORPOS PURIFICADOS UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES PURIFICADAS.....	57
4.2 QUANTIFICAÇÃO DE LiEIF4E5 DE <i>L. infantum</i> .....	58
4.3 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA LiEIF4E5.....	60
4.4 OBTENÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES DE SUPEREXPRESSORES DA PROTEÍNA EIF4E5.....	63
<b>4.4.1 Amplificação das sequências de interesse.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.2 Clonagem em vetor pGEM T-easy.....</b>	<b>65</b>
<b>4.4.3 Subclonagem no vetor de superexpressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa.....</b>	<b>66</b>
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG HA E CURVAS DE CRESCIMENTO.....	67
4.6 DELEÇÃO GÊNICA.....	69
4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA CELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL.....	69
4.8 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO PROTEICA DOS LISADOS CELULARES E IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	71
4.9 ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	72
<b>5 DISCUSSÃO.....</b>	<b>80</b>
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>85</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Doenças negligenciadas de impacto mundial são causadas por parasitas pertencentes à ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae*, constituída por nove gêneros obrigatórios. Dentre estes se destacam os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* responsáveis pelas tripanossomíases, doença de Chagas e doença do sono, e pelas diversas formas de leishmanioses, cujos agentes etiológicos são respectivamente: *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* e *Leishmania sp.*

Os tripanossomatídeos divergiram mais precocemente da linhagem evolutiva eucariótica e por isso adquiriram características relevantes em relação aos demais eucariotos. Estas características se refletem na sua biologia molecular, de forma que existem particularidades na expressão gênica que são inerentes a esses organismos, como a transcrição policistrônica, *trans splicing* e a ausência de promotores típicos para a RNA polimerase II. Deste modo a regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos é realizada ao nível pós transcricional, envolvendo eventos de controle da estabilidade de mRNAs, regulação da tradução e modificações pós-traducionais.

A tradução gênica é um mecanismo de extrema importância para a sobrevivência dos seres vivos. Em eucariotos este processo pode ser dividido em iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A etapa da iniciação da tradução é a etapa mais complexa, mais sujeita a regulação e que requer a cooperação de diversos fatores de iniciação eucarióticos (eIFs – *eukariotic Initiation Factors*). Dentre estes se destaca o complexo eIF4F, o principal responsável pela etapa de reconhecimento do mRNA pelo ribossomo para iniciar a síntese proteica. Este complexo é formado por três subunidades polipeptídicas: eIF4A (RNA helicase), eIF4G (proteína âncora do complexo) e eIF4E (proteína de ligação ao *cap* dos mRNAs). Estas proteínas são auxiliadas por outros fatores e pela proteína de ligação a cauda poli-A (PABP).

O eIF4E é uma proteína encontrada só em eucariotos e atua no reconhecimento da extremidade 5' dos mRNAs por meio do *cap* estimulando a tradução *cap*-dependente. O eIF4E ainda possui uma ligação específica com o eIF4G, importante para o início da tradução. Em tripanossomatídeos, seis homólogos do eIF4E foram descritos, sendo que dois destes foram identificados

mais recentemente, EIF4E5 e EIF4E6. Estes são os menores membros da *família* e análises experimentais em *Trypanosoma brucei* revelaram que ambos se ligam a análogos do *cap in vitro*, são citosólicos e se associam com complexos multiproteicos incluindo homólogos do eIF4G. Em *Leishmania*, contudo, ainda não foram descritos.

Em trabalhos prévios, o gene codificando o EIF4E5 de *Leishmania* foi clonado, expresso em bactérias e utilizado para a produção de soro policlonal específico. Com objetivo de dá continuidade ao estudo do EIF4E5 em um segundo organismo, além do *T. brucei*, buscou-se no presente trabalho uma melhor caracterização funcional desse fator em *L. infantum*, pois nada ainda foi descrito formalmente sobre essa proteína em *Leishmania*. Questões acerca desse homólogo e suas atuações no início da tradução proteica em tripanossomatídeos poderão assim ser respondidas.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão do EIF4E5 e de versões mutadas durante o ciclo de vida de *L. infantum*, investigando suas interações com outras subunidades do complexo eIF4F e novas proteínas parceiras, bem como eventuais modificações fenotípicas induzidas por alterações no seu perfil de expressão.

### 1.1.2 Objetivos específicos

1. Analisar a expressão endógena do EIF4E5 e sua localização subcelular em *L. infantum*;
2. Gerar versões mutadas do eIF4E5 modificadas em sítios requeridos para a ligação a parceiros funcionais;

3. Avaliar a expressão do fator EIF4E5 nativo e superexpresso fusionados a epítipo específico durante as diferentes fases do ciclo de vida de *L. infantum*;
4. Avaliar a capacidade do eIF4E5 complementar a ausência das cópias endógenas de seus genes;
5. Analisar por microscopia confocal as possíveis alterações morfológicas em *L. infantum* induzidas por alterações nos perfis de expressão da proteína EIF4E5 selvagem e mutantes;
6. Identificar as interações funcionais do EIF4E5 selvagem e mutantes com homólogos do complexo eIF4F e novos parceiros funcionais *in vivo*.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados classificados na ordem *Kinetoplastida* (filo Euglenozoa, supergrupo Excavata) (STUART et al., 2008). Estes organismos divergiram precocemente na linhagem da evolução eucariótica quando comparados com grande parte de outros grupos mais conhecidos de protistas parasitas (ADL et al., 2012). Por esse motivo, os tripanossomatídeos são considerados peculiares por possuírem características únicas em processos biológicos básicos como na sua expressão gênica (DANIELS et al., 2010).

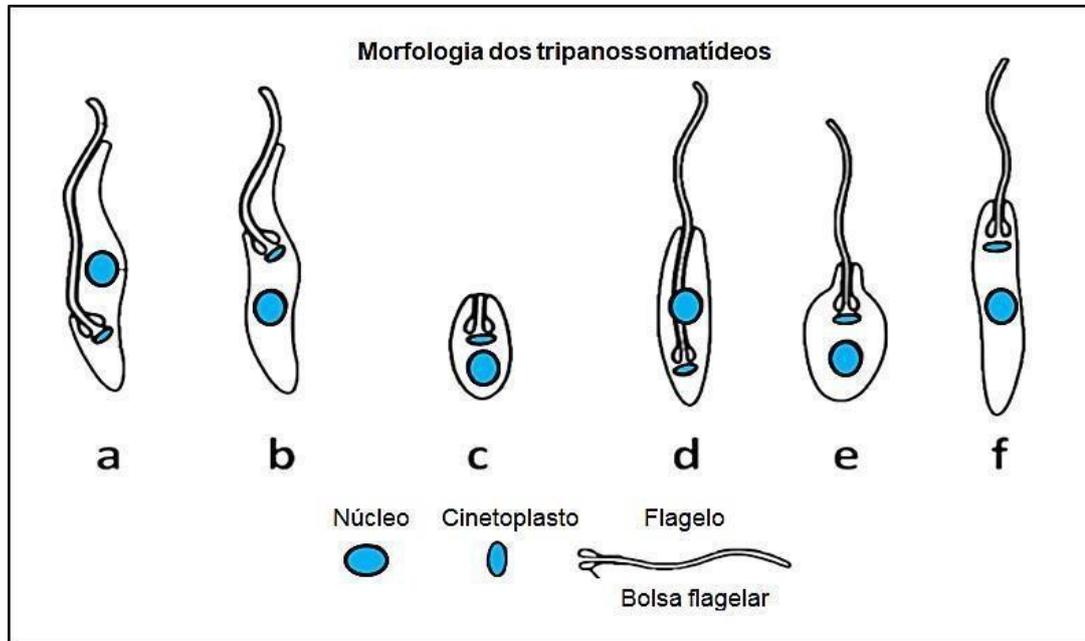
Os tripanossomatídeos podem ser restritos a hospedeiros invertebrados, como também podem ter um ciclo de vida mais complexo, possuindo um vetor invertebrado e hospedeiros vertebrados ou plantas. Dois gêneros e várias espécies desses organismos são agentes etiológicos patogênicos aos humanos (KAUFER et al., 2017). Dentre estes se destacam o *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e espécies de *Leishmania*, que provocam nos seres humanos a doença do sono (tripanossomíase africana), doença de Chagas e as leishmanioses, respectivamente (JACKSON et al., 2016).

A biologia celular nos diversos kinetoplastidas é muito similar entre si. Todos eles são protozoários que possuem flagelo único, que tem origem próxima a sua única e grande mitocôndria e provém de uma invaginação na membrana celular (LUKES et al., 2002). Na porção mitocondrial próxima à base do flagelo existe uma região rica em DNA, conhecida como cinetoplasto (ou kinetoplasto) e que dá nome ao grupo. Por sua vez é a região que possui o DNA mais complexo encontrado na natureza (LUKES et al., 2002).

Os tripanossomatídeos se adaptam aos ambientes dos seus hospedeiros e vetores e, mesmo possuindo características conservadas, ocorrem variações morfológicas nos diferentes estágios do seu ciclo de vida e de acordo com cada espécie (WHEELER et al., 2013). Alterações morfológicas consideráveis também podem ocorrer a depender do ambiente e condições de cultivo que o parasita se encontra. As principais classes morfológicas em tripanossomatídeos são: (a)

tripomastigota, (b) epimastigota, (c) amastigota, (d) opimastigota, (e) coanomastigota e (f) promastigota (Figura 1) (SIMPSON et al., 2006; STEVENS et al., 2001; WHEELER et al., 2013).

**Figura 1 - Principais estruturas morfológicas dos tripanossomatídeos**



**Fonte:** Modificado de SIMPSON et al. (2006); STEVENS et al. (2001); WHEELER et al. (2013).

**Nota:** Os principais morfotipos dos tripanossomatídeos estão representados na imagem: **a** Tripomastigota. **b** Epimastigota. **c** Amastigota. **d** Opimastigota. **e** Coanomastigota. **f** Promastigota. Os morfotipos **a** e **b** representam a superclasse que possuem um flagelo que está ligado lateralmente ao corpo da célula. As formas **d**, **e** e **f** representam a classe onde não possuem um flagelo anexado lateralmente e **c** é a forma amastigota que existe para todos os tripanossomatídeos.

A compreensão genética, molecular e celular dos tripanossomatídeos, especialmente os patogênicos aos seres humanos, pode gerar ferramentas que contribuam para o desenvolvimento de diagnósticos, drogas, vacinas e outros meios de combate as doenças causadas por esses parasitas (STUART et al., 2008).

### 2.1.1 Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* inclui aproximadamente 53 espécies, das quais 20 causam leishmanioses nos humanos (KAUFER et al., 2017). Este gênero é subdividido em duas linhagens filogenéticas principais, referidas como *Euleishmania* e *Paraleishmania* (CUPOLILLO et al., 2000). A linhagem *Euleishmania* compreende

os seguintes subgêneros: *Viannia*, *Leishmania*, *Sauroleishmania* e o complexo *Mundina*. O subgênero *Viannia* compreende as espécies *L. braziliensis* e *L. guyanensis*, entre outras. Este subgênero é restrito aos neotrópicos, enquanto o subgênero *Leishmania stricto sensu* está presente tanto no Novo Mundo (Américas) quanto no Velho Mundo (Europa, Ásia e África). O subgênero *Leishmania* é representado por diferentes espécies patogênicas, entre as quais: *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum*, *L. mexicana* e *L. tropica* (Akhoundi et al., 2016). A *L. donovani*, presente no Velho Mundo, e a *L. infantum*, presente tanto no Velho quanto no Novo Mundo, são as espécies responsáveis de forma majoritária pelos casos de leishmaniose visceral, a forma mais grave da doença (CNUUDE et al., 1994; AKHOUNDI et al., 2016).

Os parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania* são os agentes causadores das leishmanioses, doenças responsáveis por uma alta taxa de morbidade e mortalidade em todo o mundo. Esses parasitas possuem um ciclo de vida digenético (heteroxeno), uma vez que é realizado em dois hospedeiros distintos: um vertebrado e um invertebrado. No hospedeiro invertebrado são encontradas as formas promastigotas procíclicas aderidas ao intestino do inseto vetor, e posteriormente essas formas migram para o aparelho bucal e são diferenciadas em promastigotas metacíclicas. Já no hospedeiro vertebrado é encontrada a outra forma do parasita, aflagelada e denominada de amastigota. Esta pode ser fagocitada por macrófagos quando entram em contato com tecidos dos hospedeiros e se multiplicam intracelularmente (MUSKUS e MARÍN-VILLA, 2002; CLAYTON e SHAPIRA, 2007).

### **2.1.2 Vetores de *Leishmania***

As mais de 20 espécies de *Leishmania* são transmitidas ao hospedeiro por meio da picada de insetos flebotomíneos hematófagos do gênero *Lutzomyia* e *Phlebotomus*, dos quais as fêmeas infectadas são responsáveis por essa transmissão (Figura 2). Cerca de 100 espécies dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* foram confirmadas como vetores comprovados ou suspeitos de transmitir a leishmaniose humana (MAROLI et al., 2013). O gênero *Phlebotomus spp.* é

encontrado no Velho Mundo (Europa, Ásia e África), enquanto que o gênero *Lutzomyia spp.* é restrito ao Novo Mundo (Américas) (BURRI e BRUN, 2003).

No Brasil, esses insetos são conhecidos como mosquito palha. Aproximadamente 70 espécies de animais servem como reservatórios das espécies patogênicas humanas de *Leishmania*, incluindo roedores (ROSE et al., 2004), cães (BEST et al., 2014) e outros mamíferos (DOUGALL et al., 2009).

**Figura 2 - Flebotomíneo**



**Fonte:** <https://www.studyblue.com/notes/n/microbiology-study-guide-2013-14whoever/deck/8693165>

**Nota:** Fêmea de flebotomíneo regurgitada.

### **2.1.3 Ciclo biológico da *Leishmania spp.***

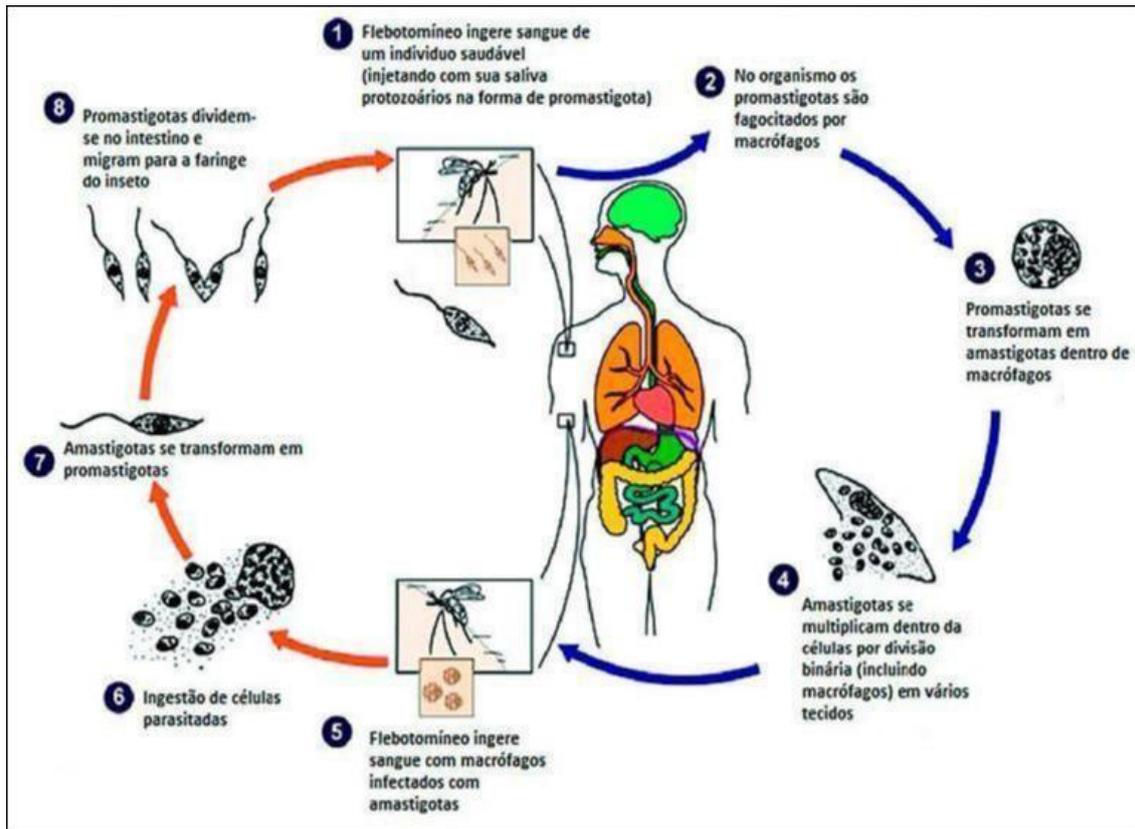
O ciclo biológico das diferentes espécies de *Leishmania* tem início quando o inseto vetor flebotomíneo realiza o repasto sanguíneo em hospedeiro vertebrado inoculando formas promastigotas metacíclicas do parasita (Figura 3). No hospedeiro vertebrado estas são fagocitadas por macrófagos e se diferenciam no seu interior, mais precisamente no vacúolo parasitóforo, em formas amastigotas (Brasil, 2014). Essa diferenciação é induzida pelas mudanças nas condições do ambiente entre o hospedeiro invertebrado e o vertebrado, como o aumento da temperatura, disponibilidade de oxigênio e diminuição do pH (BESTEIRO et al., 2007; McCONVILLE et al., 2007). As formas amastigotas se reproduzem por divisão binária em etapas rápidas e sucessivas até ocorrer o rompimento dos macrófagos. Com isso ocorre a propagação hematogênica dessas formas para outros tecidos ricos em células do Sistema Mononuclear Fagocitário (SMF), como por exemplo:

linfonodos, fígado, baço e medula óssea (Brasil, 2014). A transmissão da *Leishmania* ao inseto vetor se dá quando este, ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, faz a ingestão de macrófagos parasitados pelas formas amastigotas do parasita. Ao entrar no trato digestivo do inseto ocorre então o rompimento dos macrófagos com a liberação das formas amastigotas. Em seguida, ocorre a diferenciação destas em formas flageladas, denominadas de promastigotas procíclicas, que colonizam o esôfago e faringe do vetor e permanecem aderidas ao epitélio pelo flagelo. Essas formas se reproduzem por sucessivos ciclos de divisão binária, e se diferenciam em formas infectantes, conhecidas como promastigotas metacíclicas (Brasil, 2014).

O ciclo de transmissão da *Leishmania* é finalizado quando as fêmeas infectadas do vetor, ao realizarem um novo repasto sanguíneo em um hospedeiro vertebrado, liberam na corrente sanguínea deste as formas promastigotas infectantes. Ao entrar em contato com a epiderme do hospedeiro, ocorre novamente o processo de fagocitose do parasita por células do SMF e o ciclo se repete (Brasil, 2014).

As doenças que são transmitidas por vetores têm sido, desde o passado até o momento atual, um significativo problema de saúde pública. Deste modo, é imprescindível o conhecimento mais aprofundado das características dessas doenças e dos seus agentes etiológicos para evitar sua propagação (PATINO e RAMÍREZ, 2017).

Figura 3 - Ciclo de vida da *Leishmania*



**Fonte:** [https://www.researchgate.net/figure/236881715\\_fig2\\_Figure-2-Life-cycle-of-Leishmania-parasite](https://www.researchgate.net/figure/236881715_fig2_Figure-2-Life-cycle-of-Leishmania-parasite) <http://www.dpdc.govdpx>.

**Nota:** O hospedeiro vertebrado ao ser picado pelo vetor é infectado pela formas promastigotas metacíclicas que penetram nos macrófagos e multiplicam-se transformando-se em amastigotas. Os macrófagos se rompem e liberam estas formas. O vetor ingere os macrófagos infectados com as amastigotas que são liberadas no intestino e se diferenciam em promastigotas procíclicas. Estas se multiplicam e se diferenciam em metacíclicas que migram para a válvula faríngea e o ciclo se repete (Ministério da Saúde, 2014).

### 2.1.4 As leishmanioses

A forma como as leishmanioses se apresentam varia de acordo com o sistema imunológico do paciente, idade, estado nutricional e outros fatores do hospedeiro e da espécie do protozoário (KEVRIC et al., 2015). As formas de leishmanioses variam desde a mais branda, a cutânea, até as mais complexas como a difusa e visceral, sendo assim as principais formas das leishmanioses são classificadas como: Leishmaniose Cutânea (LC), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), Leishmaniose Mucocutânea (LMC), Leishmaniose Mucosa (LM) e Leishmaniose Visceral (LV) (DA-CRUZ e PIRMEZ 2005; SAHA et al., 2006; HARHAY et al. 2011, MS, 2006) (Figura 4).

**Figura 4 - Manifestações clínicas das leishmanioses**



**Fonte:** <http://www.biologynoteshelp.com/leishmanialeishmaniasis/> e Ministério da Saúde, 2014).

**Nota:** **A:** Leishmaniose Cutânea, **B:** leishmaniose Mucocutânea, **C:** Leishmaniose Cutânea Difusa e **D** Leishmaniose Visceral.

A LC, tida como a forma mais comum da doença em geral é benigna, pode apresentar no indivíduo infectado pápulas no local da inoculação do protozoário que podem evoluir para úlceras. A LM tem como características clínicas a presença de úlceras que atingem principalmente as mucosas da nasofaringe, levando a destruição desses tecidos. Complicações das LC e LM podem levar a deformidades anatômicas nos tecidos atingidos (Brasil, 2017). Já a LV é tida como a forma mais grave da doença, caracterizando-se por crises irregulares de febre, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia e anemia, e sem tratamento é fatal em mais de 95% dos casos dentro de dois anos do início da doença. (BAÑULS et al., 2007; OMS, 2016, Organização Panamericana de Saúde, 2017).

Os tratamentos existentes contra as leishmanioses são eficazes, porém os efeitos colaterais provocados e o seu alto custo acabam impedindo o tratamento adequado da doença ou fazendo com que o mesmo não seja completo. Isso faz com que ocorra a evolução para estágios mais graves, podendo levar ao óbito do paciente (BLANCO e NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017). Dos vários fármacos utilizados, a anfotericina B e os antimoniais pentavalentes possuem uma alta taxa de eficiência, porém a toxicidade e outros danos provocados por estes medicamentos são severos (HALDAR et al., 2011).

Os meios para a prevenção e controle disponibilizados contra as leishmanioses são limitados, por isso é imprescindível a implementação de medidas para diminuir o risco de propagação do parasita entre vetores e hospedeiros por meio de intervenções que contribuam com a saúde pública (Organização Panamericana de Saúde, 2017).

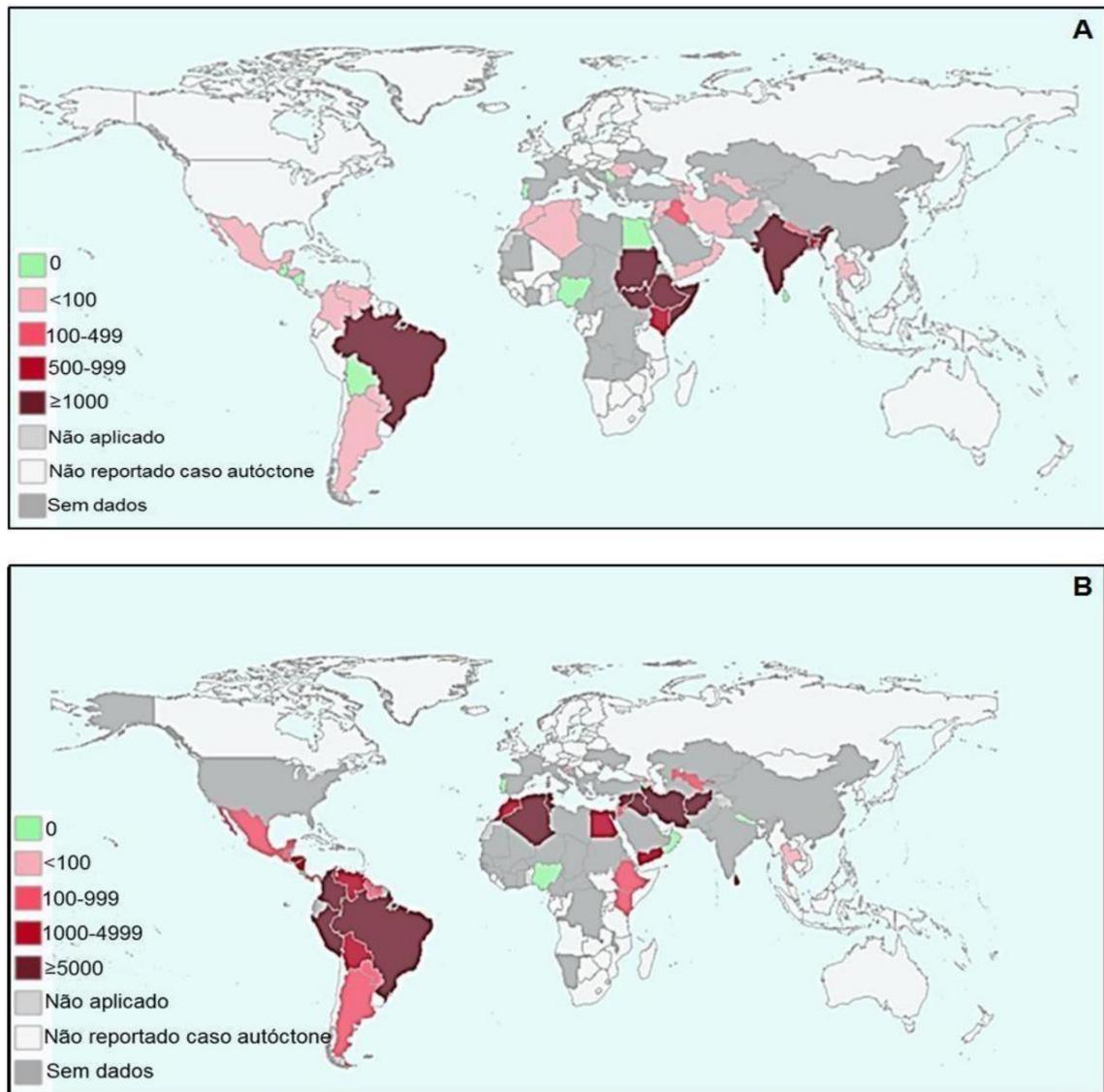
### **2.1.5 Epidemiologia das leishmanioses**

A maioria dos casos registrados de leishmanioses ocorre em países considerados subdesenvolvidos. A migração de pessoas e animais provocada pela globalização, entretanto, fez com que a doença se tornasse endêmica em alguns países da Europa onde eram poucos os casos confirmados (Blanco e NASCIMENTO-JÚNIOR, 2017). A epidemiologia das leishmanioses é ainda intrinsecamente influenciada por fatores sociais, ambientais e climatológicos.

A LV é endêmica em mais de 80 países, apresentando aproximadamente 90% de todos os novos casos reportados nos seguintes países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Do número global de casos, cerca de 70% da forma cutânea ocorrem em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria (WHO, 2016).

Nas Américas os casos de LV estão presentes em 12 países, sendo 96% destes relatados no Brasil. Entre 2001 e 2015 foram notificados 52.176 casos de LV em humanos nas Américas. Ao se analisar a densidade destes casos, observa-se uma maior concentração na região Nordeste do Brasil e no Paraguai (Organização Pan-Americana de Saúde, 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde em 2015 no Brasil foram reportados 19.395 casos de LC e 3.289 de LV (WHO, 2016) (Figura 5).

**Figura 5 - Distribuição geográfica das leishmanioses em 2015**



**Fonte:** Modificado de WHO (2016).

**Nota:** Casos de Leishmaniose Cutânea **A** e casos de Leishmaniose Visceral **B**

## 2.2 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

Nos tripanossomatídeos, o perfil da expressão gênica, tanto durante o desenvolvimento quanto durante a mudança entre os hospedeiros, revela que a expressão de vários genes é regulada de forma diferenciada. Uma característica que merece atenção na biologia molecular dos tripanossomatídeos, contudo, é que eles não apresentam promotores típicos para a RNA polimerase II e assim a regulação da sua expressão gênica deve ocorrer ao nível pós-transcricional (CLAYTON e

SHAPIRA, 2007). Parte dessa expressão é então modulada ao nível dos mRNAs (principalmente devido ao controle da sua estabilidade) e outra parte regulada ao nível proteico, envolvendo eventos durante a tradução e pós- traducionais (HAILE e PAPADOPOULOU, 2007; RUDENKO, 2010).

As características moleculares incomuns dos tripanossomatídeos, como a transcrição policistrônica, processamento por *trans-splicing* e poliadenilação, também indicam que a regulação dos genes codificadores de proteínas ocorre de forma pós-transcricional (ZINOVIEV e SHAPIRA, 2012). A regulação da expressão gênica é então um dos aspectos mais intrigantes da biologia molecular dos tripanossomatídeos (BRITTINGHAM et al., 2001; YAO, DONELSON e WILSON, 2003).

### **2.2.1 Organização genômica**

Ao se analisar e comparar os genomas de *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major* e *T. brucei*, as análises revelaram que, mesmo possuindo uma grande distância na filogenia, todos possuem um proteoma com um elevado grau de conservação, constituído por 6200 proteínas. Também apresentam uma elevada sintenia gênica, ou seja, os blocos gênicos se encontram em uma mesma organização genômica entres os organismos distintos (EL SAYED et al., 2005; KISSINGER, 2006).

Ao correlacionar os blocos sintênicos conservados e grandes aglomerados genômicos, os policístrons dos três gêneros dos tripanossomatídeos refletem o acoplamento das reações de transcrição com o subsequente processamento dos pré-mRNAs pelo *trans-splicing* e poliadenilação. As sequências de *Leishmania* já disponibilizadas mostram que existe uma sintenia entre elas, mas que há aproximadamente 200 diferenças no conteúdo dos seus genes ou pseudogenes, englobando cerca de 80 genes restritos a espécies individuais. Há evidências que a expressão gênica difere consideravelmente entre as espécies e isso também pode ocorrer devido à variação no número de cópias de genes entre as espécies (PEACOCK et al., 2007).

Apesar desses organismos apresentarem sintonia gênica, existem diferenças substanciais entre eles, o que reflete em adaptações específicas a pressões seletivas e diferenças no ciclo de vida, fazendo parte das estratégias para a sobrevivência de cada organismo (EI-SAYED et al., 2005 e PAYS et al., 2004).

### **2.2.2 Regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos**

Dentre as características mais marcantes no genoma dos tripanossomatídeos destaca-se a organização dos genes que codificam proteínas. Estes genes são organizados em unidades policistrônicas e, diferentemente dos policistrons encontrados em operons de bactérias, eles não são funcionalmente relacionados entre si (IVENS et al., 2005).

Os genes das unidades policistrônicas são transcritos simultaneamente no mesmo nível, no entanto, os mRNAs maduros de genes adjacentes podem apresentar concentrações muito diferentes das proteínas expressas. Isso se dá devido a expressão gênica nos tripanossomatídeos ser predominantemente regulada a nível pós-transcricional (CLAYTON, 2002; HAILE e PAPADOPOULOU, 2007). Mesmo que vários mRNAs codificantes sejam sintetizados por meio de um mRNA policistrônico, as taxas de expressão gênica variam entre eles. Os elementos regulatórios que estão presentes na extremidade 3` UTR agem como sítio de ligação de proteínas regulatórias, que por sua vez podem promover a estabilização ou desestabilização do transcrito (DE GUDENZI et al., 2003; TEIXEIRA, 2011).

Os eventos de regulação pós-transcricional incluem: a regulação do processamento e exportação dos mRNAs; a degradação dos mRNAs, controlada em parte por sequências presentes na 3` UTR; a tradução, com atuação de complexos de ligação ao *cap* e regulação por sequências de reconhecimento próximas ao *start* códon (AUG); e ainda processos que envolvem modificações como fosforilação, transporte e degradação de proteínas (eventos pós- traducionais) (CLAYTON e SHAPIRA, 2007; HAILE e PAPADOPOULOU, 2007).

Estudos atuais indicam que a tradução do mRNA é uma das etapas principais da regulação gênica. O processamento por *splicing*, a poliadenilação e a tradução são etapas da biologia do mRNA e que dependem de interações do tipo proteína-

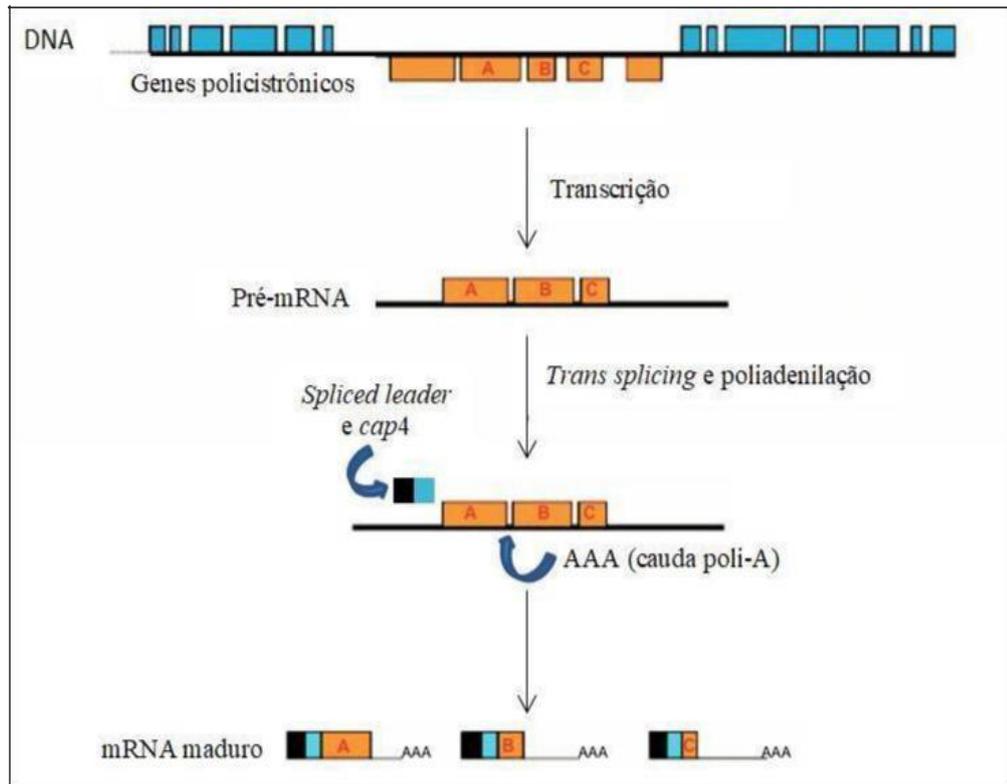
RNA (NANDAN et al., 2017). Os mecanismos envolvidos no processamento e estabilidade do mRNA são fundamentais para uma produção eficiente da respectiva proteína (CAMPBELL et al., 2003; CLAYTON, 2002).

### 2.2.3 Processamento dos mRNAs

A maioria dos mRNAs eucarióticos apresenta na sua extremidade 5' a estrutura 7-metil-GTP, denominada de *cap*, que é responsável pelo eficiente reconhecimento do mRNA pela maquinaria da tradução (AITKEN E LORSCH, 2012). O *cap* é uma modificação que se manteve conservada no mRNA eucariótico. Vários estudos revelam que o *cap* tem um papel fundamental no recrutamento de proteínas celulares para o mRNA e participa de funções extremamente necessárias para a síntese proteica, como o processamento do pré-mRNA e exportação nuclear (RAMANATHAN, ROBB e CHAN, 2016). Desde a descoberta do *cap*, diversos estudos revelaram a sua importância nos aspectos bioquímicos envolvidos na regulação gênica (FURUCHI, 2015).

Existem características únicas relacionadas a regulação gênica dos tripanossomatídeos, como por exemplo a transcrição constitutiva dos seus genes (MARTINEZ-CALVILLO et al., 2010). Após o processo de transcrição gênica, ocorre a maturação dos mRNAs pelo processo de *trans-splicing*. Neste processo os mRNAs primários (policistrônicos) são clivados em mRNAs monocistrônicos e é adicionado a sua extremidade 5' uma sequência de 39 nucleotídeos denominada *Spliced-Leader* – SL ou mini-éxon (HAILE e PAPADOPOULOU et al., 2007). A presença da sequência SL ocorre em todos os mRNAs dos tripanossomatídeos e sua adição tem por finalidade posicionar o *cap* na extremidade 5' dos mRNAs o *cap* modificado, característico dos tripanossomatídeos: o *cap4*, uma estrutura de 7-metil guanossina com metilação nos quatro primeiros nucleotídeos da sequência SL. Esse processamento, juntamente com a poliadenilação na região 3' dos mRNAs, leva à formação de mRNAs maduros monocistrônicos (HAILE e PAPADOPOULOU et al., 2007; KRAMER e CARRINGTON, 2011; YOFFE et al., 2004; VANHAMME e PAYS, 1995; TEIXEIRA et al., 2011) (Figura 6).

Figura 6 - Formação dos mRNAs maduros nos tripanossomatídeos



**Fonte:** Modificado de Da Silva e Cano (2017).

**Nota:** Os genes transcritos pela RNA polimerase II formam o pré-mRNA policistrônico, que é processado por meio do mecanismo de *trans-splicing*. Neste, a sequência *spliced leader* e a estrutura *cap* modificada, *cap4*, é adicionada ao mRNA. A partir do *trans-splicing*, os pré-mRNAs são separados, na região 5' é adicionado *spliced leader* em conjunto com o *cap4* e, em paralelo, ocorre a poliadenilação na região 3'. Com estas etapas, o mRNA se torna maduro e monocistrônico e pronto para ser utilizado na etapa da tradução Modificado de Da Silva e Cano (2017).

A estrutura *cap4* presente em todos os mRNAs de tripanossomatídeos parece ter um papel relevante no controle da tradução, além do que a presença do *cap4* pode proteger os mRNAs da degradação e possibilitar o seu transporte do núcleo para o citoplasma, com um papel fundamental na montagem do complexo de iniciação da tradução (revisado por YOFFE et al., 2004).

### 2.3 INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EM EUKARIOTOS

A tradução é um mecanismo essencial para o funcionamento da célula, sendo sujeito a uma complexidade, sincronidade e controle de vários eventos e componentes celulares. Este processo é dividido em iniciação, alongamento,

terminação e reciclagem dos ribossomos (ACKER e LORSCH, 2008, SONENBERG e HINNEBUSCH, 2009). Enquanto as fases de alongamento e terminação da tradução envolvem a atuação de um número limitado de fatores de tradução, a etapa da iniciação em eucariotos é um evento complexo que requer a cooperação de diversas proteínas, resultando em mais de 25 polipeptídeos, denominadas fatores de iniciação eucarióticos ou eIFs, do inglês, *eukaryotic Initiation Factors* (ANDAYA et al., 2014; SHARMA et al., 2016).

A síntese proteica envolve várias etapas da regulação na tradução gênica, e este processo é imprescindível para o controle tanto da quantidade, quanto da natureza dos produtos sintetizados. Dentre os passos extremamente importantes, o recrutamento da subunidade ribossomal para o mRNA prepara o início da tradução que segue na direção 5'→ 3' a partir do *start* códon (AUG) (VON DER HAAR et al., 2004). Este recrutamento, e sua regulação, depende do complexo de iniciação eIF4F, crucial para a viabilidade celular (LEARY et al., 2013).

### 2.3.1 Complexo eIF4F

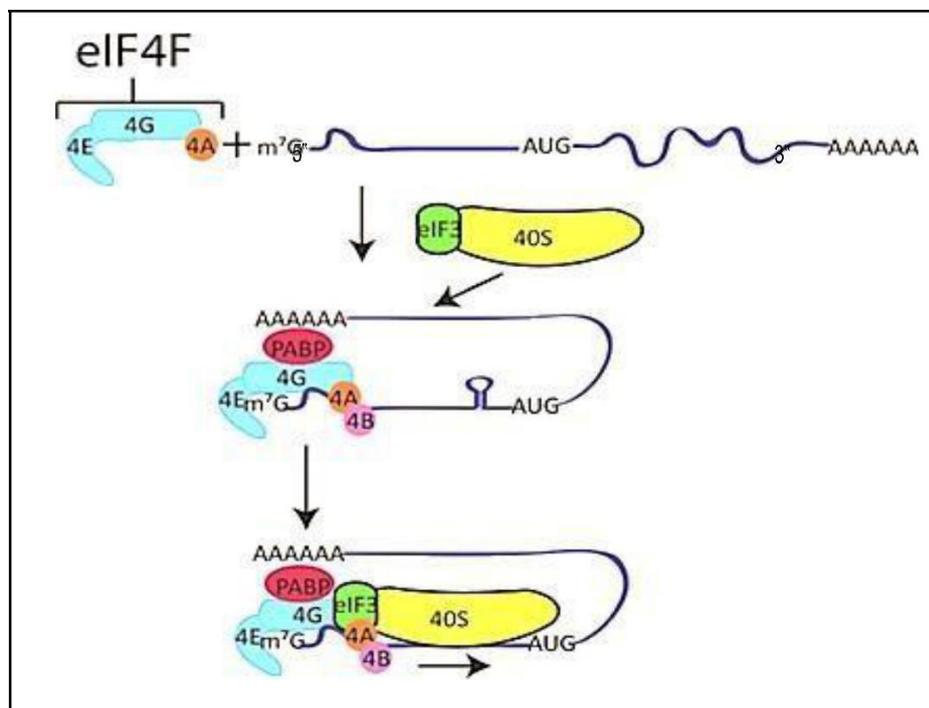
Diante de todos os fatores relacionados com a iniciação da tradução, o complexo eIF4F se destaca por ser um dos principais responsáveis pela etapa de reconhecimento do mRNA e por mediar sua associação com ribossomos para dar início a síntese proteica. A iniciação da tradução eucariótica mediada pelo complexo eIF4F é dita como tradução de mRNA *cap*-dependente. Este complexo se adequou a diversas mudanças evolutivas de acordo com a necessidade de ligação ao *cap* do mRNA, de forma que os integrantes deste complexo são bastante divergentes nos eucariotos. O *cap* em todos os eucariotos serve de alvo para a regulação gênica, e esta função é semelhante nos tripanossomatídeos (HO e LEE, 2016).

O papel fundamental do eIF4F é fazer o reconhecimento da extremidade 5' do mRNA fazendo a associação deste com a subunidade ribossomal 40S para a formação do complexo 48S, (MARINTCHEV e WAGNER, 2004), atuando também no rastreamento do códon de iniciação da tradução para dar início a síntese proteica (JACKSON et al., 2010, HINNEBUSCH, 2014). O complexo é formado por três subunidades polipeptídicas (eIF4A, eIF4E e eIF4G) e auxiliado pelos fatores eIF4B,

eIF4H (em metazoários apenas) e pela proteína de ligação a cauda poli-A (PABP de *Poly-A Binding Protein*) (GEBAUER e HENTZE 2004)

O fator eIF4E é uma proteína de interação com a extremidade 5', especificamente com o *cap*, e por isso também é chamado de proteína de ligação ao *cap*. Já a subunidade eIF4A atua como RNA helicase dependente de ATP, promovendo o desdobramento de estrutura secundária do mRNA de forma a permitir que a subunidade menor ribossomal alcance o *start* códon, o AUG, ao final da região 5' não traduzida do mRNA 5' UTR. Este desdobramento é auxiliado pelo eIF4B que é um fator multifuncional que estimula o eIF4A. O eIF4G é uma grande proteína que age como âncora do complexo, com motivos de ligação ao eIF4E, eIF4A e a um segundo complexo de iniciação da tradução, o eIF3. Este por sua vez está associado com a subunidade menor ribossomal, ou 40S. O complexo eIF4F, via subunidade eIF4G, também interage com a PABP, na extremidade 3' do mRNA, o que permite uma possível circularização do mRNA (GEBAUER e HENTZE 2004; GINGRAS et al., 1999; JACKSON et al., 2010; PESTOVA et al., 2001, SONENBERG e HINNEBUSCH, 2009) (Figura 7).

**Figura 7- Esquemática do complexo eIF4F**



**Fonte:** Modificado de Andreou e Klostermeier (2013).

**Nota:** O complexo heterotrimérico eIF4F é composto pelas subunidades eIF4A (atividade helicase auxiliada pela proteína eIF4B), eIF4G (proteína mantenedora do complexo que interage com eIF4A), eIF4E, e com a proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) permitindo a circularização do mRNA. A

proteína eIF4E se liga ao *cap* (m<sup>7</sup>G) dos mRNAs na sua extremidade 5' Andreou e Klostermeier, 2013 . O eIF4F faz o reconhecimento da extremidade 5' dos mRNAs mediando a associação destes com a subunidade ribossomal 40S e dando início a tradução (Marintchev e Wagner, 2004).

### 2.3.2 eIF4A

O eIF4A, membro da família das helicases conhecida como “DEAD-box”, atua por meio do uso de ATP, desenrolando curtos segmentos de RNA duplex até o *start* códon (AUG) do mRNA. Outras proteínas relacionadas participam de processos envolvidos com a síntese, processamento de RNA, exportação e tradução. A análise genômica da maioria dos eucariotos revela a codificação para mais de uma forma do eIF4A (FERRAIUOLO et al., 2004, ANDREOU e KLOSTERMEIER, 2013).

Em tripanossomatídeos as sequências codificantes de dois homólogos do eIF4A foram identificadas por meio de pesquisas com a ferramenta *Blast* comparando-se o eIF4A de humano com sequências de *L. major*. Estas análises serviram para identificar e nomear os homólogos, EIF4A1 e EIF4A2. Foi visto que o EIF4A1 é mais abundante que o EIF4A2 e se liga a um homólogo do eIF4G (EIF4G3) em *Leishmania* (DHALIA et al., 2005).

Ao se utilizar o *T. brucei* como modelo, foi visto que o EIF4A1 tem localização citoplasmática, enquanto EIF4A2 se localiza estritamente dentro do núcleo. Ensaios definiram conclusivamente que o EIF4A1 (ou EIF4A1) está envolvido na iniciação da tradução (DHALIA et al., 2006).

### 2.3.3 eIF4G

A subunidade eIF4G atua como âncora do complexo eIF4F apresentando ligação com os outros fatores (AITKEN e LORSCH, 2012). O fator eIF4G desempenha um importante papel na iniciação da tradução por meio de sua ligação ao eIF4E. Esta interação tem sido bastante estudada, pois representa um importante alvo de drogas que reprimem a tradução (Grüner et al., 2016), e depende do motivo de ligação YXXXXLΦ onde X é qualquer aminoácido e Φ qualquer aminoácido hidrofóbico). Este motivo, presente no eIF4G, é responsável pela ligação ao eIF4E

na sua superfície dorsal. Caso haja a substituição dos resíduos Y ou LΦ ocorre o impedimento da interação entre eIF4E- eIF4G (CARROLL e BORDEN 2013; MADER et al., 1995).

O fator eIF4G é uma proteína que interage tanto com eIF4E quanto com a PABP, o que faz com que esse fator conseqüentemente se ligue tanto a extremidade 5 quanto a 3 do mRNA. Este fator possui uma função essencial para a formação do complexo eIF4F, influenciando a eficácia da tradução dos mRNAs por meio de sua interação com a PABP, fundamental para a ligação ao complexo de pré-iniciação 43S na extremidade 5' do mRNA (PARK et al., 2004). O eIF4G em conjunto com a PABP e com o eIF4E promovem então a estabilidade do mRNA para permitir o início da tradução (MARINTCHEV et al., 2009; VALÁSEK 2012; SMITH et al., 2017).

Em relação ainda aos sítios de ligação presentes no fator eIF4G, destacam-se os sítios presente na região N-terminal, que permitem a interação com a PABP e com o eIF4E. Na sua região central ainda está presente o domínio MIF4G, que por sua vez consiste de várias repetições HEAT (MARCOTRIGIANO et al., 2001) típicas de todas as proteínas eIF4G em eucariotos superiores (MARINTCHEV e WAGNER, 2005) e relacionado com a ligação ao eIF4A, mRNA e eIF3 (MARINTCHEV e WAGNER, 2004).

Experimentos realizados *in vitro* mostraram que a afinidade do eIF4E ao *cap* tem um aumento de aproximadamente 10 vezes quando o mesmo está ligado ao fator eIF4G (Haghighat et al., 1996). Isto estimula a tradução *cap* dependente, pois a ligação do eIF4G ao eIF4E provoca mudanças conformacionais no eIF4E que influencia na sua afinidade pelo *cap* por meio da interação do segmento compreendido entre os resíduos 393 a 490 do eIF4G com a extremidade N- terminal do eIF4E (GROSS et al., 2003; PESTOVA e HELLEN 2003).

Os tripanossomatídeos codificam cinco homólogos de EIF4G (EIF4G1-5), tanto em *L. major* quanto em *T. brucei* todos identificados pela presença do domínio MIF4G equivalente ao domínio central encontrado na proteína de mamíferos (DHALIA et al., 2005; YOFFE et al., 2006; YOFFE et al., 2009). Cabe ressaltar que os EIF4G3 e EIF4G4 foram os mais implicados no processo de tradução (MOURA et al., 2015; DE MELO NETO et al., 2016), enquanto que os homólogos EIF4G1 e EIF4G2 parecem está relacionados a complexos proteicos ligados a homólogos de

EIF4E, mas que parecem não ter papel central no processo de tradução (FREIRE et al., 2014a; FREIRE et al., 2014b).

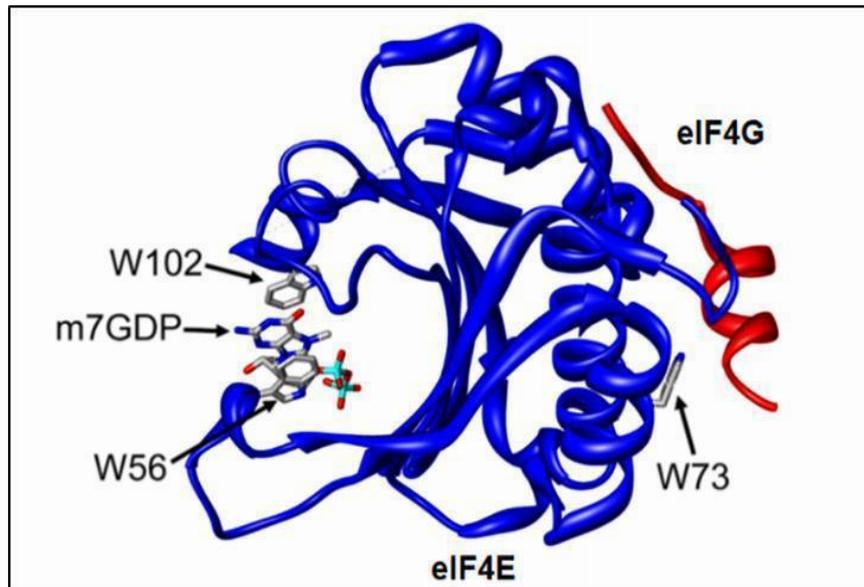
#### 2.3.4 eIF4E e seus homólogos

O eIF4E clássico é uma proteína de aproximadamente 25kDa que se liga de forma específica ao *cap* e atua estimulando a tradução *cap* dependente e participando do recrutamento do mRNA por meio de sua ligação específica com o eIF4G (RHOADS, 2009). A proteína eIF4E é citoplasmática e se dobra em uma estrutura tridimensional encontrada apenas em células eucarióticas. A ligação do eIF4E ao *cap* do mRNA permite o início da tradução (GROSS et al., 2003; NIEDZWIECKA et al., 2002).

A estrutura primária do eIF4E é extremamente conservada entre os eucariotos, ressaltando seu importante papel para a célula. Sua estrutura terciária foi caracterizada em camundongo, em humano, em levedura e no trigo (MONZINGO et al., 2007; TOMOO et al., 2002). Esta estrutura é constituída por oito folhas  $\beta$  antiparalelas e três hélices no seu lado convexo. A ligação específica ao *cap* é feita por meio de dois resíduos de triptofanos localizados no lado côncavo da proteína. Em mamíferos, os dois resíduos altamente conservados de triptofanos são encontrados nas posições 56 e 102, que empacotam a guanosina metilada do *cap*. A ligação aos outros parceiros do complexo, como ao eIF4G é feita por meio de outro resíduo conservado de triptofano no seu lado convexo, o W73 (VON DER HAAR et al., 2004; RHOADS 2009; GOODFELLOW e ROBERTS, 2011), como pode ser visto na Figura 8.

O eIF4E também interage com outros parceiros funcionais como as 4E- BPs, que são reguladoras da atividade do eIF4E. O que permite esta ligação é a presença, na grande maioria dos parceiros do eIF4E em eucariotos, da sequência consenso YXXXXL $\Phi$  (NIEDZWIECKA et al., 2002; VON DER HAAR; VOLPON, 2006, BALL e MCCARTHY, 2000).

**Figura 8 - Estrutura tridimensional da proteína eIF4E de camundongo**



**Fonte:** Modificado de Goodfellow e Roberts (2011).

**Nota:** A imagem representa a estrutura do eIF4E (azul), a estrutura *cap* (m7GDP) e o fator eIF4G (vermelho). Resíduos de grande importância para a ligação do eIF4E ao *cap* são o W56 e W102 na região côncava da proteína. O resíduo W73 é importante para a ligação do eIF4E ao eIF4G na sua parte convexa. Todos os resíduos mencionados estão apontados pelas setas na imagem.

A caracterização dos homólogos do eIF4E em tripanossomatídeos identificou inicialmente quatro homólogos da proteína (DHALIA et al., 2005; YOFFE et al., 2006). Contudo, mais recentemente dois homólogos foram identificados (FREIRE et al., 2014) totalizando seis homólogos do eIF4E em tripanossomatídeos das espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*. Estes homólogos, em função de suas características distintas, podem ser subdivididos em três grupos (DHALIA et al., 2005; FREIRE et al., 2014; FREIRE et al., 2011): o grupo 1 composto pelo EIF4E1 e EIF4E2, o grupo 2 por EIF4E3 e EIF4E4 e o grupo 3 composto pelos membros identificados mais recentemente: EIF4E5 e EIF4E6. Esses homólogos diferem quanto à capacidade de ligação ao *cap* e a parceiros funcionais. Assim foi confirmado que os homólogos EIF4E1 e EIF4E4 interagem fortemente com o *cap4* peculiar dos tripanossomatídeos (DHALIA et al., 2005; YOFFE et al., 2004), enquanto o EIF4E3 interage mais fracamente e o EIF4E2 não interage com o *cap4* (YOFFE et al., 2006).

O terceiro grupo de homólogos de eIF4E de tripanossomatídeos, composto pelos EIF4E5 e EIF4E6, é o mais divergente em relação aos demais de eIF4Es, pois seus componentes estão mais estritamente correlacionados entre si do que com qualquer outro membro da família eIF4E, além de apresentarem menor homologia

de sequência. Tanto o EIF4E5 quanto o EIF4E6 são proteínas muito pequenas, contendo menos que 200 aminoácidos. Ambas, entretanto, possuem diversos resíduos conservados em eIF4Es de várias espécies e fundamentais para a função celular. Estes dois fatores foram formalmente descritos apenas em *T. brucei* (FREIRE et al., 2014a; FREIRE et al., 2014b).

## 2.4 A PROTEÍNA EIF4E5 DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

Em *L. major* o EIF4E5 é uma proteína de peso molecular de 23,9 kDa, tendo os resíduos de triptofano W33 e W156 equivalentes aos W56 e W166 de EIF4E de humano que fazem parte da ligação ao *cap*. Em humano, o W102 no EIF4E é outro resíduo de ligação ao *cap*, que no EIF4E5 de *L. major* corresponde ao Y88, resíduo aromático conservado. Ainda em *L. major* se encontra o W58 que em humano equivale ao W73, resíduo responsável pela ligação do EIF4G. O EIF4E5 de *T. brucei* é uma proteína de 21,9 kDa que possui os mesmos resíduos de W conservados na porção côncava e convexa da proteína. As cargas positivas dos resíduos nas posições requeridas contribuem com a ligação do EIF4E5 ao *cap* (FREIRE et al., 2014a).

A modelagem do EIF4E5 revela que este apresenta estruturas típicas de homólogos de eIF4E para a interação ao *cap*. Esta interação foi de fato vista por ensaios de fluorescência, utilizando-se quatro análogos sintéticos do *cap* e o homólogo de *T. brucei* como modelo do estudo. Neste ensaio foi visto que o EIF4E5 recombinante interage tanto com o m<sup>7</sup>GTP quanto com *cap4*. Estudos de imunofluorescência realizados em *T. brucei* indicam que tanto o EIF4E5 quanto o EIF4E6 estão presentes em todo o citoplasma (FREIRE et al., 2014a; Freire et al., 2014b). Ensaio de RNAi em *T. brucei* indicaram que o EIF4E5 parece não ser um fator necessário para a síntese proteica em células procíclicas. A sua depleção levou a perda da motilidade celular, isso foi avaliado por meio de ensaios de sedimentação (FREIRE et al., 2014a). Outro estudo que também utilizou RNAi em *T. brucei* e mostrou que ocorreu um crescimento anormal das células procíclicas após a depleção do EIF4E5 (ALSFORD et al., 2011). A deleção dupla do gene do fator

EIF4E5 em *T. brucei* não foi viável, podendo indicar a essencialidade do mesmo (FREIRE et al., 2014a; FREIRE et al., 2014b).

#### 2.4.1 Parceiros funcionais do EIF4E5 de *T. brucei*

Ensaio de interação do EIF4E5 de *T. brucei* com os cinco homólogos do eIF4G mostrou uma especificidade de ligação do EIF4E5 com os EIF4G1 e EIF4G2, com a interação do EIF4E5 com o EIF4G2 sendo mais intensa quando comparada com a com o EIF4G1. Análises de proteômica e espectrometria de massas também mostraram a interação do EIF4E5 ao EIF4G1 e ao EIF4G2 *in vivo*, formando assim dois complexos em *T. brucei*: o EIF4E5-EIF4G1, e EIF4E5- EIF4G2 e ainda interações com outras proteínas hipotéticas associadas (FREIRE et al., 2014a). Essas proteínas, denominadas de parceiros funcionais, foram inicialmente classificadas de acordo com o peso molecular de cada uma, e mais recentemente renomeadas em *T. brucei* de TbG1-IP, TbG1-IP2 e TbG2-IP, respectivamente (FREIRE et al., 2014; revisado por FREIRE, STURM, CAMPBELL e DE MELO NETO, 2017). Pouco se sabe a seu respeito, mas experimentos de ancoramento de proteínas na região 3' não traduzida de um mRNA reporter mostraram que a TbG2-IP, além dos EIF4G1 e EIF4G2, age como ativadora da tradução (ERBEN et al., 2014; LUEONG et al., 2016).

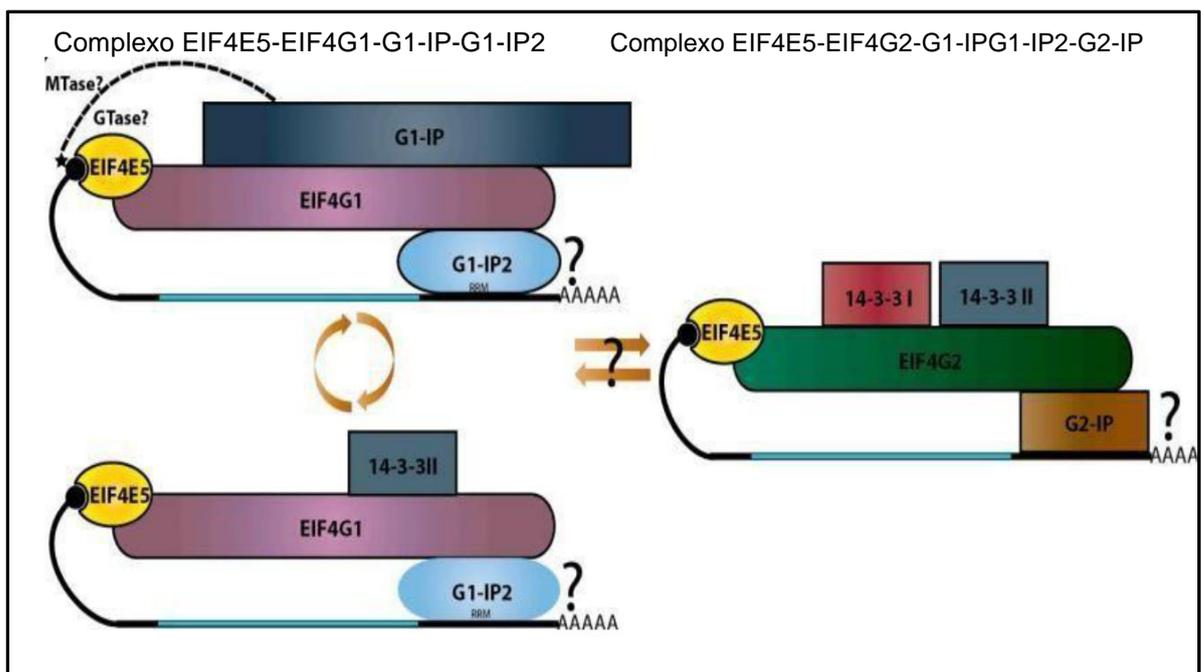
Também foram identificadas nos complexos associados ao EIF4E5 as proteínas 14-3-3 I, 14-3-3 II. A proteína 14-3-3 e seus homólogos atuam regulando funções de proteínas-chave em diversas vias de sinalização. Esse processo é tipicamente mediado por um motivo de fosfotreonina ou fosfoserina presente na proteína alvo que é reconhecido pela proteína 14-3-3. Os motivos de fosfotreonina e fosfoserina se ligam a fatores de sinalização e atuam na regulamentação de interações proteína-proteína (FU, SUBRAMANIAN e MASTERS, 2000; OBSILOVA, 2014). As proteínas 14-3-3 estão envolvidas em vários processos celulares, como o crescimento, diferenciação e sobrevivência celular (MHAWECH, 2005), ligação ao RNA, processamento de proteínas, apoptose, ligação a proteínas nucleares e citoesqueléticas (RUBIO et al., 2004; Benzinger et al., 2005). E ainda os efeitos

intermediados pela ligação da 14-3-3 a proteína alvo levam a proteção contra degradações proteolíticas (OBSILOVA et al., 2014; VAN HEUSDEN, 2005).

A TbG1-IP é uma proteína grande que contém dois domínios, o de guaniltransferase e metiltransferase, esses domínios são encontrados em proteínas que estão implicadas na adição do *cap* e maturação do mRNA (GHOSH e LIMA, 2010). Ensaio de espectrometria de massas do complexo purificado de TbG1-IP mostraram que TbEIF4E5, TbEIF4G1 e TbG1-IP2 interagem na ausência do homólogo 14-3-3 (FREIRE et al., 2014). Estudos com a TbG1-IP não comprovaram a relação desta proteína com fatores de iniciação da tradução enquanto que a TbG1-IP2 está relacionada com a interação ao RNA. Ensaio em levedura demonstraram que a TbG1-IP se liga diretamente ao EIF4G1 e parece estar relacionada com a ligação do EIF4E5 ao EIF4G1 (FREIRE et al., 2014).

Supostamente a ausência de alguma das proteínas hipotéticas no complexo TbEIF4E5-TbEIF4G1-TbG1-IP-TbG1-IP2 pode de alguma forma implicar uma troca dinâmica entre complexos que abrigam a interação TbEIF4E5- TbEIF4G1. O primeiro complexo incluiria o TbG1-IP na ausência do homólogo 14-3-3, e o segundo complexo poderia ter a proteína 14-3-3 substituindo TbG1-IP (FREIRE et al., 2014), como pode ser analisado na representação esquemática da Figura 9.

**Figura 9 - Esquema do complexo EIF4E5-EIF4G1-G1-IP-G1-IP2**



Fonte: Modificado de Freire et al. (2017).

**Nota:** O esquema apresentado mostra o complexo EIF4E5-EIF4G1-G1-IP-G1-IP2, semelhantes ao complexo maior eIF4F. O complexo do EIF4E5 é composto por sua interação com o EIF4G1, que por sua vez se liga a proteína G1-IP que contém o domínio da guaniltransferase/metiltransferase e também está ligado à proteína G1-IP2, que é uma proteína de ligação ao RNA. O outro complexo é composto pela interação do EIF4E5 a um outro homólogo do eIF4G, sendo o EIF4G2, que também se liga a uma proteína hipotética denominada por Freire et al, 2017 de G2-IP (Freire. et al, 2017)

#### **2.4.2 EIF4E5 de *Leishmania***

Em trabalhos prévios, o gene eIF4E5 de *Leishmania major* foi subclonado em vetores de expressão, a fim de produzir a respectiva proteína recombinante por expressão heteróloga em *Escherichia coli*. Esta proteína foi purificada e utilizada para realizar ensaio de imunização em coelho e conseqüentemente produção de soro policlonal específico anti-eIF4E5 (NASCIMENTO, 2012).

O presente trabalho fez uso destas ferramentas bioquímicas para, com a geração de novas construções, melhor compreender o papel funcional do EIF4E5 em *Leishmania infantum*.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 EXPRESSÃO HETERÓLOGA E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNA RECOMBINANTE

A expressão da proteína *L*/EIF4E5, fusionada ao *tag* GST ou ao *tag* de histidinas foi realizada a partir da transformação bacteriana de genes previamente produzidos que codificam GST-*L*/EIF4E5 (fusão com GST) e His-*L*/EIF4E5 (fusão com o *tag* de histidinas). As construções que codificam GST-*L*/EIF4E6 e His-*L*/EIF4E6 serviram como controles negativos aos testes subsequentes. Estas construções foram utilizadas para transformação em bactérias de expressão, a Rosetta™ DE3 *Competent Cells* – Novagen- Merck Millipore, e semeadas em placa contendo LB (Luria Bertani) ágar suplementado com 50 µg/mL e 10 µg/mL de cloranfenicol.

Para a expressão das proteínas, colônias bacterianas individuais obtidas dos eventos de transformação foram utilizadas para realizar pré-inóculos em 20 mL de meio LB líquido suplementado com 50 µg/mL e 10 µg/mL de cloranfenicol. Esse meio contendo as colônias foi incubado por 16 horas sob agitação em incubador de agitação orbital a 37 °C. No dia seguinte foi feito um inóculo com 20 mL de células crescidas em 500 mL de meio LB líquido suplementado com 50 µg/mL de ampicilina. As células continuaram em agitação a 37 °C. O crescimento celular foi monitorado pela medida da Densidade Óptica (OD) pelo espectrofotômetro WPA UV 1101 *Biotech photometer* utilizando comprimento de onda de 600nm. Ao atingir a OD de aproximadamente 0,5, correspondente a fase logarítmica de crescimento bacteriano, a temperatura do agitador orbital foi reduzida para 30 °C e adicionado ao meio, contendo as células, IPTG 1M para uma concentração final de 0,1mM com o intuito de promover a indução de proteínas pelas bactérias. Esse processo de indução permaneceu por 4 horas sob agitação.

Para a purificação da proteína recombinante, a cultura bacteriana induzida com IPTG foi transferida para tubo do tipo GSA para realizar o processo de centrifugação a 10.000 g por 10 minutos em temperatura de 4 °C. Para as proteínas contendo o *tag* de GST, os sedimentos celulares foram então ressuspensos em 20

mL de PBS para a purificação com a resina de Glutathione Sepharose (GE Biosciences). Já para as proteínas contendo o *tag* de histidinas, a resuspensão foi em 20 mL de tampão de lise e equilíbrio ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  100mM; Tris 10mM; Uréia 8M; 20mM Imidazol) para a purificação com resina de níquel Ni-NTA *protein purification system* (Qiagen). Todas as células foram lisadas por ultrassonicação, com amplitude 50, aplicando 6 pulsos de 30 segundos, e com intervalo de 1 min entre cada pulso. Posteriormente o processo de purificação seguiu os protocolos sugeridos pelos fabricantes da resina *Glutathione Sepharose 4B GST-tagged protein purification resin* (GE Healthcare Life Sciences, USA) e Ni-NTA *protein purification system* (Qiagen).

### 3.2 PURIFICAÇÃO DE ANTICORPO POR IMUNOADSORÇÃO

Os anticorpos foram purificados utilizando os soros policlonais disponibilizados pelo laboratório (Nascimento JF, 2012) contra as proteínas recombinantes His-*L*EIF4E5, His-*L*EIF4E6, GST-*L*EIF4E5 e GST-*L*EIF4E6. Para analisar a eficácia dos anticorpos purificados foi necessário quantificar as proteínas recombinantes para utilizar uma concentração de aproximadamente 150 ng/ $\mu\text{L}$  para cada proteína. Essa concentração foi estimada por meio de quantificação por análise comparativa de uma curva padrão de BSA (*Bovine Serum Albumin*), com diluições seriadas de concentrações conhecidas da proteína em tampão de amostra para SDS-PAGE, sendo: 2  $\mu\text{g/mL}$ , 1  $\mu\text{g/mL}$ , 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , 0,250  $\mu\text{g/mL}$  e 0,125  $\mu\text{g/mL}$ . A intensidade das bandas de BSA foi comparada com diluições seriadas das proteínas recombinantes, sendo 1:1, 1:2, 1:3 e 1:4. Essas amostras foram submetidas a eletroforese em gel SDS PAGE 15%.

A partir da quantificação foi possível utilizar aproximadamente a concentração de 150 ng/ $\mu\text{L}$  de His-*L*EIF4E5, His-*L*EIF4E6. Então foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida 15% com a concentração desejada para cada proteína, e esse gel foi transferido para uma membrana PVDF (Polivinil Fluorido Immobilon-P Millipore®). Esta membrana foi corada com ponceau 0,2 %/ 1 % TCA, cortada em pedaços pequenos e lavada três vezes com PBS por 10 min. Em seguida, a membrana foi bloqueada com leite desnatado 5% por 30 min a 4 °C. Após a retirada

da solução de bloqueio, a membrana foi lavada rapidamente com PBS e incubada por dois dias com 1:1 de PBS e soro policlonal. Posteriormente, o material foi centrifugado e os cortes da membrana foram lavados três vezes com PBS e o anticorpo foi eluído utilizando Glicina-HCl 100 mM pH 2,5, e então foi obtido os anticorpos purificados.

Para testar a eficiência da purificação do anticorpo, foram realizados ensaio de *Western blot* utilizando 30 ng das proteínas recombinantes e o anticorpo purificado numa concentração de 1:500. Estes anticorpos serviam para teste de quantificação da proteína *L*EIF4E5 endógena em células de *L. infantum* e para ensaios de imunofluorescência.

### 3.3 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA *L*EIF4E5 ENDÓGENA EM CÉLULAS DE *L. infantum*.

Para estimar a quantificação da proteína endógena *L*EIF4E5 em *L. infantum* foi adotada uma estratégia na qual foi utilizada a quantificação da proteína recombinante His-*L*EIF4E5 fusionada ao *tag* de histidina em diluições seriadas de 1:1, 1:2, 1:3, 1:4 e 1:5. A quantificação da proteína se deu por meio da comparação da intensidade das bandas de diluições seriadas da proteína His- *L*EIF4E5 com diluições seriadas de curva padrão de BSA, como descrito acima. A análise da intensidade das bandas se deu por meio do programa da câmera digital, Kodak 1D *Image Analysis Software*. Concentrações de proteína recombinante de 20 ng/ $\mu$ L, 10 ng/ $\mu$ L, 5 ng/ $\mu$ L e 2,5 ng/ $\mu$ L foram utilizadas em eletroforese de gel SDS PAGE 15% juntamente com extratos totais de *L. infantum* em concentrações de:  $2 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$  e  $1,25 \times 10^6$ . O gel foi transferido para membrana de PVDF para realizar o teste de reconhecimento proteico por meio de *Western blot* com o anticorpo anti-*L*EIF4E5 purificado numa concentração de 1:500 e com anticorpo secundário anti-IgG de coelho numa concentração de 1:3000.

### 3.4 IMUNOFLUORESCÊNCIA

Para os ensaios de imunofluorescência, cerca de  $2,5 \times 10^6$  parasitas transfectados e selvagens foram fixados em paraformaldeído 3% e PBS por 10 minutos em temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes com PBS para retirar o excesso do fixador e posteriormente vários procedimentos foram realizados para o preparo das lamínulas para a visualização no microscópio confocal.

As lamínulas utilizadas foram tratadas com poli-L-lisina por 30 minutos a temperatura ambiente. As células foram centrifugadas e ressuspendidas em PBS 1X e depois o excesso da poli-L-lisina foi retirado com papel filtro. As lamínulas foram recobertas com as células por 15 minutos em temperatura ambiente. O excesso de células foi retirado com papel filtro e as lamínulas foram distribuídas em um suporte e lavadas três vezes por 1 minuto com tampão de lavagem (Glicina;PBS). As células foram então tratadas com tampão de permeabilização (NP40 0,1%; Glicina 20mM) e lavadas novamente com tampão de lavagem. Em seguida foi feito o bloqueio com tampão específico (Glicina; PBS; BSA 1%). Após o bloqueio, as lamínulas foram incubadas com o anticorpo purificado anti-EIF4E5 na concentração final de 1:500 em PBS por 45 minutos em estufa a 37 °C. Em seguida, as lamínulas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e incubadas por 45 minutos em estufa a 37 °C com o anticorpo anti-IgG de coelho, ALEXA *anti-rabbit*, que foi diluído em tampão de incubação (PBS; Glicina; anticorpo), para ficar com uma concentração final de 1:800. A partir desta etapa o procedimento foi realizado sem luz direta.

Para visualização, as lamínulas foram colocadas sobre lâminas com 1 gota do corante DAPI e seladas com esmalte até secarem. A leitura das lâminas foi feita em microscópio confocal utilizando 405 nm para o DAPI e 488 nm para o ALEXA, tanto o 405 nm quanto o 488 nm referem-se ao comprimento de onda máxima de excitação e máxima e emissão.

### 3.5 CONSTRUÇÃO DOS GENES MUTANTES DO eIF4E5

Para a obtenção do gene eIF4E5 com seus variantes mutantes foi realizado um esquema de duas reações em cadeia da polimerase (PCR) consecutivas, que permitem alterar os prováveis motivos de ligação do fator EIF4E5 aos sítios requeridos para a ligação a parceiros funcionais. A primeira reação fez uso de um oligonucleotídeo iniciador (*primer*) que contém a mutação a ser inserida em conjunto com um *primer* de uma das extremidades do gene. O produto resultante desta reação, parte do gene do eIF4E5 com a mutação de interesse, foi purificado e utilizado como um *primer* estendido, denominado *megaprimer*. O *megaprimer* foi utilizado numa segunda PCR juntamente com um outro *primer* que corresponde a segunda extremidade do gene, obtendo assim o gene completo com a mutação de interesse, como detalhado a seguir.

Os *primers* utilizados estão listados no quadro 1, os mesmos foram sintetizados pela Midland Certified Reagent Company Inc. of Midland, Texas.

**Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos utilizados para a obtenção das linhagens mutantes**

<i>Primer</i>	<i>Sentido</i>	<i>Sequência (5' - 3')</i>
<i>LiEIF4E5-BamHI F</i>	<i>Foward</i>	<b>GGATCC</b> <u>ATG</u> TCGGCCACGCACGCACT
<i>LiEIF4E5-HindIII R</i>	<i>Reverse</i>	<b>AAGCTT</b> ATCCTT <u>CAT</u> CATCGGCGGCG
<i>LiEIF4E5<sub>W45A</sub></i>	<i>Reverse</i>	GAGTTCATTGTAGACGCGAGCTCTTCTACCGA
<i>LiEIF4E5<sub>W53A</sub></i>	<i>Reverse</i>	TCTACCGACGTAATCGCGTCGAGCTTCTGAGT

**Fonte:** O autor (2018).

**Legenda:** O prefixo *Li* se refere a espécie de *Leishmania infantum*. As bases em negrito correspondem aos sítios de restrição para as enzimas *BamHI* (GGATCC) e *HindIII* (AAGCTT); as sublinhadas sinalizam os códons de iniciação da tradução (ATG) e de parada (CAT).

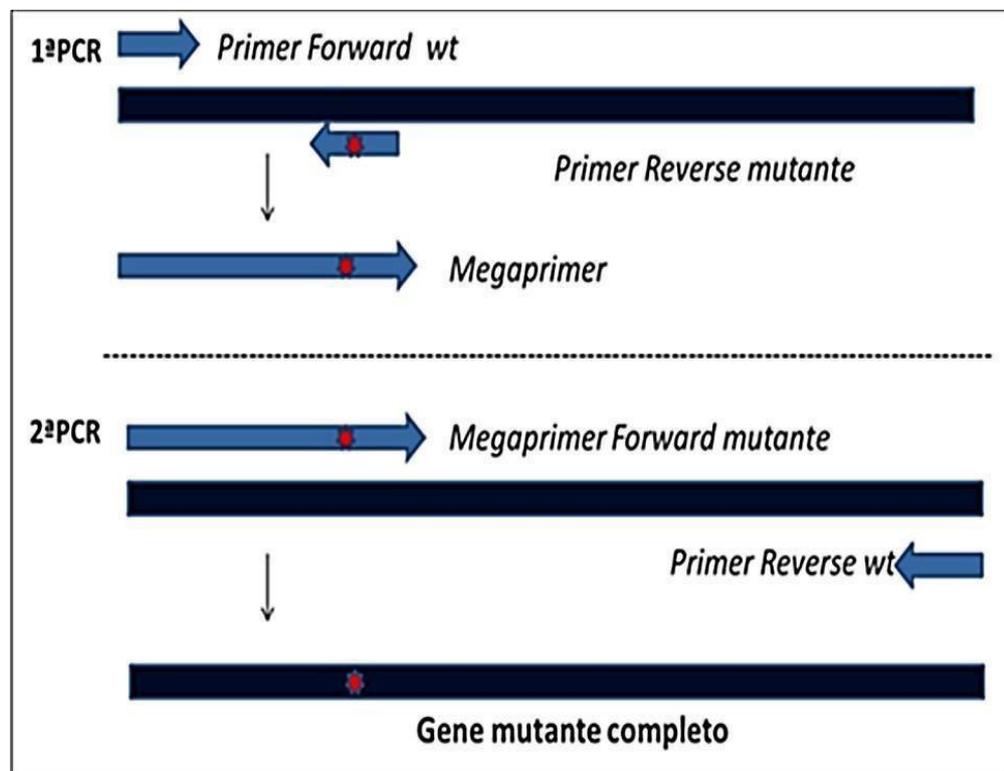
As reações de PCR foram realizadas utilizando os seguintes reagentes: 0,02 U/ml da enzima Phusion® *HighFidelity* DNA *Polymerase*, com seu tampão Phusion®GC, 0,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 3% de DMSO e 0,2 mM de dNTPs, para uma reação final de 20 µL. Esta reação foi realizada em triplicata para obtenção de um

volume total de 60  $\mu$ L. A Figura 10 esquematiza o processo de mutação pontual realizado com duas reações de PCRs consecutivas para o gene eIF4E5.

**1ª PCR:** O *primer reverse* contendo a mutação a ser inserida foi utilizado juntamente com o *primer forward wt* da extremidade 5' do gene com a finalidade de amplificar parte do gene até o ponto que contém a mutação. Esta PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8 %, corado com Syber® Safe (Invitrogen) e visualizadas em transiluminador. A banda do fragmento foi purificada utilizando “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” GE Healthcare, Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) seguindo as recomendações do fabricante com a finalidade de purificar o produto gerado, denominado *megaprimer*.

**2ª PCR:** O *megaprimer* obtido na 1ª reação de PCR foi utilizado como *primer forward* e o *primer reverse wt* foi anelado à extremidade 3' do gene. O produto desta PCR foi a amplificação do gene completo com a mutação pontual na sequência de interesse. Esta PCR foi submetida à eletroforese em gel de agarose 0,8 %, corado com Syber® Safe e visualizada em transiluminador. A banda do fragmento foi purificada e subsequentemente usada para clonagem gênica.

Figura 10 - Esquema das reações de PCR para obtenção dos genes mutantes



Fonte: O autor (2018).

**Nota:** Para a obtenção dos genes mutantes são necessárias duas PCRs: a 1ª PCR utiliza o *primer forward wt* até atingir a região que contém a mutação desejada e o *primer reverse* mutante para obter o gene amplificado até a região desejada, o fragmento é o *megaprimer*. Na 2ª PCR o *megaprimer* é utilizado como *primer forward* e o *primer reverse* é o *wt*, isto permite que na 2ª PCR o gene seja todo amplificado contendo a mutação na região de interesse.

### 3.6 CLONAGEM NO VETOR pGEM®-T EASY.

Depois de obtidos e purificados, os amplicons provenientes da PCR de mutagênese foram tratados com a enzima Platinum® *Taq DNA Polymerase High Fidelity* (Invitrogen) com o intuito de adicionar adeninas às extremidades livres (1,0 µL de Taq polimerase; 1,0 µL de dATP 10 nmol; 1,0 µL de MgSO<sub>4</sub>, 2,0 µL de tampão 10x da Taq polimerase; 5 µL do DNA purificado). A reação foi incubada por 30 minutos à 74 °C em termociclador. Subsequentemente os DNAs foram quantificados pelo equipamento NanoDrop (Thermo Scientific) e posteriormente foi realizado o procedimento de ligação dos insertos ao plasmídeo pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, USA) seguindo as recomendações do fabricante.

Os produtos da ligação foram utilizados para a transformação por choque térmico em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* (One Shot™ TOP 10 Chemically Competent *E. coli*, Invitrogen), utilizando 5µL da reação da ligação juntamente com 50 µL das células de *E. coli* que foram incubadas no gelo por 30 minutos e depois em banho-maria a 37 °C por 5 minutos. Em seguida houve o preparo de placas contendo meio LB ágar suplementado com 100µg/mL de ampicilina, e com o intuito de identificar os clones contendo o DNA recombinante, foi adicionado 10 µL de IPTG 1M e 20 µL de X-gal 50mg/mL, uma vez que as colônias formadas por células que não contêm o DNA recombinante aparecem com coloração azul, enquanto as recombinantes aparecem com coloração branca. As células transformadas foram semeadas nestas placas e posteriormente foram incubadas em estufa a 37 °C por aproximadamente 16 horas.

Para a extração do DNA das colônias brancas, as mesmas foram inoculadas em meio LB líquido contendo 100µg/mL de ampicilina e incubadas em agitador orbital a 37 °C por aproximadamente 16 horas. Em seguida foi realizada a minipreparação plasmidial utilizando o protocolo de lise alcalina (Sambrook e Russell, 2001). Para confirmar a clonagem gênica, os plasmídeos foram digeridos

com a enzima de restrição *EcoRI*-High Fidelity (*New England Biolabs*), e a análise dos fragmentos foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 1% em TBE 0,5x (Tris 0,089M, Ácido Bórico 0,089M e EDTA 0,002M), a visualização foi possível sob luz ultravioleta do transiluminador e permitiu a comparação dos fragmentos obtidos com o marcador de peso molecular (1 Kb Plus DNA Ladder).

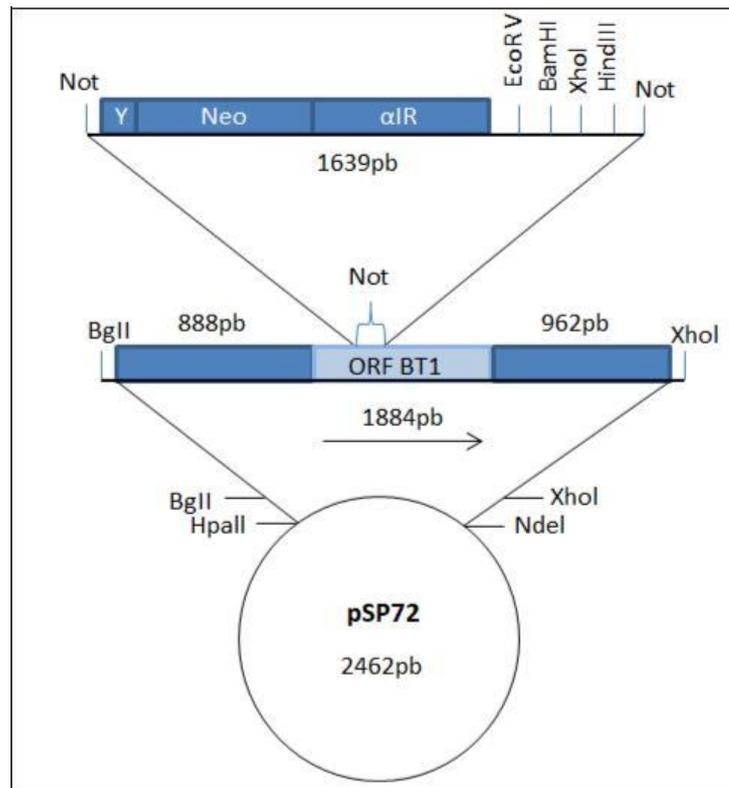
As clonagens também foram confirmadas pelo Sequenciador Automático de DNA *Applied Biosystems-Hitachi* utilizando o kit *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*®) disponível no NPT (Núcleo de Pesquisa Tecnológicas) do Instituto Aggeu Magalhães.

### 3.7 SUBCLONAGEM NO VETOR DE EXPRESSÃO pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA.

Após a confirmação da integridade das sequências, os plasmídeos contendo os genes clonados em pGEM®-T Easy passaram por processo de digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. Os fragmentos liberados foram purificados e ligados ao plasmídeo de expressão episossomal pSP-BT1-Y-Neo-alfa, também digerido com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III. O plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa contém o gene de resistência a neomicina, usado como marca de seleção, e uma sequência que codifica para o peptídeo HA (do inglês, *Human influenza hemagglutinin*) inserido a *downstream* do sítio de restrição *Hind*III (Figura 11).

Tanto o inserto de interesse quanto o plasmídeo de superexpressão foram purificados com o “GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” GE Healthcare, Sigma-Aldrich, Gillingham, UK) e quantificados por NanoDrop para que a ligação dos fragmentos fosse realizada em proporções específicas. A ligação dos fragmentos obtidos foi realizada por meio da enzima T4 DNA Ligase (400,000 U/mL) (*New England Biolabs*) 0,5 µL, com o seu tampão (10x) e água. A reação permaneceu em temperatura ambiente por aproximadamente 16 horas.

Figura 11 - Esquema do plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa



**Fonte:** Modificado de Padmanabhan et al. (2012).

**Nota:** O plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa trata-se de uma modificação do plasmídeo pSP72, no qual foi inserido a ORF BT1 contendo o gene de resistência a Neomicina. Neste estudo, a sequência que codifica para o peptídeo HA foi inserido logo após o sítio de restrição *HindIII*.

Posteriormente as ligações passaram por processo de transformação em célula quimiocompetente de *E. coli* Top10 seguido de extração plasmidial pelo kit GenElute™ *Plasmid Miniprep Kit* (Sigma- Aldrich) conforme orientações do fabricante. Para a confirmação da subclonagem foi realizada digestão enzimática com as enzimas *BamHI* e *HindIII* e posteriormente sequenciamento para analisar a integridade das sequências.

### 3.8 CULTIVO DE PARASITAS E TRANSFEÇÃO

A manutenção das formas promastigotas de *Leishmania infantum* foi realizada em meio Schneider's *insect medium*-Sigma (pH 7,2 adicionado de 1% de penicilina e estreptomicina, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 0,2% de hemina).

As células foram mantidas em BOD (*Biochemical Oxygen Demand*) a 26 °C e o monitoramento do seu crescimento, morfologia e motilidade foi realizado por meio de contagem diária em câmara de Neubauer durante o ciclo de vida do parasita (em média cinco dias). Repasses sucessivos foram realizados com parasitas em fase exponencial com o intuito de manter as células em crescimento adequado para a realização dos experimentos.

As células selvagens de *L. infantum*, bem como as células *single knock-out* (sem uma cópia do gene eIF4E5), já estavam em cultivo pelo grupo de pesquisa proponente. As células em sua forma promastigota foram utilizadas para a transfecção. Aproximadamente  $2,5 \times 10^8$  de células promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial foram centrifugadas a 1000 g por 5 minutos. O sedimento foi ressuscitado em 1 mL de tampão HEPES-NaCl (21mM HEPES pH 7,05; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 6mM glicose) e depois submetido novamente a centrifugação em 1000 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuscitado em 400 µL do tampão HEPES-NaCl e em seguida transferido para cuvetas de eletroporação de 0,2 mm, contendo o DNA plasmidial das construções obtidas anteriormente (gene de interesse com o plasmídeo de expressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA), cada DNA estava com uma concentração de 1 a 2 µg. O controle negativo consistiu da cuveta sem o DNA, ou seja, só as células selvagens, *w.t.* (do inglês *wild type*). As cuvetas contendo as células foram introduzidas no gelo por 15 minutos e depois submetidas a eletroporação pelo aparelho (*BioRad Gene Pulser II*), com 1 pulso elétrico de 450 V e capacitância de 500 µF (microFarads). Este procedimento permite a entrada da construção em algumas células em suspensão.

Após o pulso elétrico, o material foi transferido para garrafa de cultura celular contendo meio de cultura Schneider pH 7,2 e depois as células foram incubadas a 26 °C em BOD. Após 24 horas, foi feita a pré-seleção, com a adição do antibiótico neomicina (G418) (Sigma-Aldrich), numa concentração de 40 µg/mL, com o intuito de selecionar as células portadoras da construção. As culturas foram então incubadas em BOD a 26 °C e após 24 horas foi realizada a seleção. Nesta etapa, 1 mL da cultura foi transferida para nova garrafa contendo 9 mL de meio *Schneider* e adicionado o antibiótico neomicina com a concentração de 80 µg/mL. Esta cultura foi acompanhada por cerca de 10 a 15 dias até as células selecionadas atingirem uma concentração adequada para um repasse celular.

### 3.9 PREPARAÇÃO DE EXTRATOS TOTAIS E CURVAS DE CRESCIMENTO

Com as células de *L. infantum* transfectadas mantidas em meio Schneider de pH 7,2, foi esperado que as mesmas atingissem a fase estacionária. Então essas células com uma diluição inicial de  $10^6$  células/mL foram repassadas para o meio de cultura Schneider de pH 7,2, contendo 80 µg/mL de neomicina. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer diariamente até atingir a morte celular para avaliar o crescimento e morfologia celular. As culturas foram monitoradas e alíquotas de  $2 \times 10^7$  de células foram retiradas e centrifugadas por 5 min à 1000 g, em seguida foram ressuspensas em tampão de amostra para gel SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% de glicerol, azul de bromofenol, 50 µL/mL de 2 mercaptoetanol) para uma concentração final de  $2 \times 10^5$  cél/µL e lisadas por 5 minutos em banho seco/termobloco à 100 °C e posteriormente armazenadas em *Deep Freeze* a -80 °C. Os extratos celulares serviram para avaliar a expressão das proteínas mutadas utilizando o anticorpo anti-HA, e também o anticorpo anti-EIF4A1, servindo como um controle de carga, uma vez que a proteína EIF4A1 é constitutivamente expressa em *L. infantum*.

Os extratos celulares provenientes das curvas de crescimento de *L. infantum* *wt*, *L*SKOE5+pSPE5HA, *L*SKOE5+pSPE5<sub>W53A</sub>, *L*SKOE5+pSPE5<sub>W45A</sub> e contendo uma concentração de  $2 \times 10^6$  para cada célula foram submetidos à eletroforese gel SDS-PAGE 15%. O gel foi transferido para membrana de PVDF e posteriormente a membrana foi incubada com leite desnatado a 5% por 1 hora. Após esse processo foi utilizado para o primeiro *Western blot* o anticorpo comercial anti-HA (Sigma-Aldrich) com uma diluição de 1: 3000 em leite 5% com TBS-Tween 20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,5). Ao se passar uma hora foram realizadas lavagens sucessivas com TBS-Tween 20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,5) e a membrana contendo o anticorpo anti-HA foi incubada com o segundo anticorpo (anti IgG de camundongo conjugado com peroxidase), numa diluição de 1:3000 e incubada por uma hora, seguida de novas lavagens com TBS-Tween 20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,5). A membrana foi então incubada em uma solução quimioluminescente contendo luminol a 1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5, adicionado de iodofenol para uma concentração final de 0,4 mM e de peróxido de hidrogênio a 0,03%. Após secagem

em papel filtro, a membrana foi exposta a filme autorradiográfico e revelada em solução Dektol 1:2 (Kodak®) até saturação, por cerca de 3 a 5 minutos. A reação foi interrompida com ácido acético, por 1 minuto e fixada em solução fixadora por 2 minutos. Depois do resultado obtido a mesma membrana foi novamente utilizada, dessa vez utilizando o anti-EIF4A1 como anticorpo primário, e como anticorpo secundário foi utilizado o anti IgG de coelho conjugado com peroxidase, as etapas de preparo do *Western blot* foram as mesmas descritas acima.

### 3.10 DELEÇÃO E COMPLEMENTAÇÃO GÊNICA

Para a geração de linhagens desprovidas de duas cópias (*double knock-out*) do gene eIF4E5, foram utilizados cassetes de deleção gênica construídos em um trabalho anterior. Esses cassetes foram construídos seguindo o protocolo rápido e simplificado de *knock-out* descrito por Derbise e colaboradores (2003), que utiliza pares de *primers* específicos para amplificar cerca de 500 pb das regiões 3' e 5' UTR que flanqueiam os genes alvo a serem silenciados. Foram amplificados também genes de resistência aos antibióticos higromicina e puromicina. Posteriormente, foram realizadas reações de PCR de fusão com as regiões flanqueadoras e o gene de resistência aos antibióticos a fim de obter o cassete de silenciamento contendo as duas regiões flanqueadoras do gene alvo fusionadas a um dos dois genes de resistência aos antibióticos higromicina e puromicina (Lima GB, 2016).

Para os experimentos de complementação, após o primeiro evento de deleção gênica as células foram transfectadas com plasmídeos que permitem a superexpressão de *L*eIF4E5 selvagem e mutantes seguidos do segundo evento de deleção. Células viáveis só são recuperadas em condições onde a proteína mutante superexpressa é capaz de substituir a ausência da proteína nativa.

A linhagem *L*iSKOE5+pSPE5HA e seus variantes mutantes foram cultivadas em garrafa de cultura celular contendo meio Schneider pH 7,2 e depois as células foram incubadas a 26 °C e utilizadas para transfecção com as construções dos cassetes de deleção gênica. Isso se deu com o intuito de avaliar se as linhagens dos

genes ligados ao plasmídeo de superexpressão pSP-BT1-Y- Neo-alfa são suficientes para manter a célula viável.

### 3.11 ANÁLISE MORFOLÓGICA POR MICROSCOPIA CONFOCAL

Para analisar o Contraste por Interferência Diferencial (DIC) por microscopia confocal, as células promastigotas de *L. infantum wt*, servindo como controle negativo, e as células *LiSKOE5+pSPE5HA*, *LiEIF4E5<sub>W53A</sub>* e *LiEIF4E5<sub>W45A</sub>* em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas a 1000 g por 10 minutos e ressuspensas em 300 µL de meio *Schneider* puro (sem soro fetal bovino e sem hemina) e em 200 µL de paraformaldeído a 3% e então mantidas a 4 °C até a leitura no dia seguinte.

Antes da visualização por microscopia confocal, as células foram lavadas três vezes em PBS e depois ressuspensas em 200 µL de PBS. Cerca de 20 µL dessa ressuspensão foi colocada sobre uma placa para microscopia de 35 mm de diâmetro e a visualização foi realizada no microscópio confocal modelo SPII da LEICA e as imagens foram processadas no Leica Confocal *software*.

### 3.12 LISE CELULAR POR CAVITAÇÃO EM CILINDRO DE ALTA PRESSÃO

As linhagens utilizadas para os lisados celulares foram: *LiSKOE5+pSPE5HA*, *LiSKOE5+pSPE5<sub>W53A</sub>*, *LiSKOE5+pSPE5<sub>W45A</sub>* e *L. infantum wt* nativa não transfectada, que serviu como controle negativo. Estas linhagens foram inicialmente expandidas para uma concentração de  $1 \times 10^6$ /mL em 40 mL de meio *Schneider*. O processo de lise se deu por cavitação utilizando o cilindro de alta pressão. Para isso, as culturas de células expandidas passaram por centrifugação à 1000 g por 5 minutos, os sobrenadantes obtidos foram descartados e os sedimentos ressuspensos em 1 mL de PBS adicionado de inibidor de protease EasyPack® (Roche) e transferidos para tubos de microcentrífuga. As amostras foram centrifugadas novamente por 17.000 g por 5 minutos em centrífuga refrigerada a 4

°C, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos ressuspendidos em 550 µL de tampão de lise (200 mM HEPES KOH pH 7,4, 75 mM de acetato de potássio, 4 mM acetato de magnésio, 2 mM DTT) com inibidor de protease. Em seguida os sedimentos ressuspendidos passaram pelo procedimento de cavitação utilizando cilindro de alta pressão, sendo a pressão atmosférica utilizada de 70 atm, essa pressão permaneceu no compartimento por 45 minutos, esse tempo permite a estabilização da pressão. Em seguida a pressão foi liberada e o lisado foi coletado em tubo cônico, levando a um rompimento celular brando. As células lisadas foram em seguida transferidas para tubos de microcentrífuga e centrifugadas por 17.000 g por 10 minutos. O sobrenadante adquirido de cada linhagem celular se refere ao lisado contendo a fração solúvel que foram aliqüotados para testes por *Western blot* com o uso do anticorpo primário anti-HA (Sigma) numa concentração de 1:3000 e do anticorpo secundário anti-IgG de camundongo na concentração 1:3000. O Teste de *Western blot* permitiu analisar o reconhecimento das proteínas que contém o *tag* de HA e com a confirmação desse experimento foi possível realizar o experimento de imunoprecipitação.

### 3.13 IMUNOPRECIPITAÇÃO E ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após confirmado por *Western blot* a presença das proteínas nos lisados celulares, as mesmas foram imunoprecipitadas com o anticorpo comercial anti-HA por meio do uso de 40 µL do anticorpo monoclonal anti-HA agarose® (Sigma). Para tal fim, procedeu-se a lavagem desta resina com PBS adicionado de inibidor de protease EasyPack® (Roche). Ao todo foram realizadas cinco lavagens e posteriormente a resina foi incubada com 100 µL dos lisados por 2 horas a 4 °C. Após este processo, houve a separação do lisado da resina, que foi denominado lisado depletado (LD), e a resina foi lavada quatro vezes com PBS adicionado de inibidor de protease para remoção das ligações inespecíficas. As proteínas retidas na resina foram eluídas por meio da adição de tampão de amostra para gel SDS-PAGE. Tanto o procedimento de preparação do lisado celular quanto o de imunoprecipitação foram realizados em duplicata.

As proteínas co-imunoprecipitadas (IP), o LD e o lisado total foram fracionados em gel SDS-PAGE 15%, e analisadas por *Western-blot* com anticorpo monoclonal anti-HA (Sigma®) numa concentração de 1:3000 e com anticorpo secundário o anti IgG de camundongo numa concentração de 1:3000. Após a confirmação da co-imunoprecipitação por *Western blot* as amostras das IPs foram fracionadas em novo gel SDS-PAGE 15%, mas a corrida foi interrompida quando as amostras entraram na malha de poliacrilamida mais concentrada do gel. O gel foi então corado com azul de Comassie Blue 250-R (*staining*) e depois descorado durante a noite com a solução descorante (metanol, ácido acético e água destilada).

O conjunto de proteínas foi então excisado do gel e enviado em tubos de microcentrífuga com água destilada para a subunidade RPT02H - Espectrometria de Massas - PR no Instituto Carlos Chagas da Rede de Plataformas Tecnológicas/Fiocruz que realiza a análise proteômica baseada em nano cromatografia líquida acoplada a ionização eletrospray e espectrometria de massas sequencial (nanoLC-ESI-MS/MS), utilizando o espectrômetro de massas LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific). Essa tecnologia atinge uma acurácia de massa abaixo de uma parte por milhão (ppm), tanto na determinação da massa de peptídeos (MS), quanto no sequenciamento dos mesmos (MS/MS). O espectro de massas permite registrar a intensidade, abundância e razão da massa sobre a carga dos peptídeos ou fragmentos das amostras proteicas (Hassell et al., 2011). O alto poder de resolução desse equipamento faz com que os dados obtidos sejam de alta qualidade e confiabilidade, reduzindo a presença de falsos positivos nas análises.

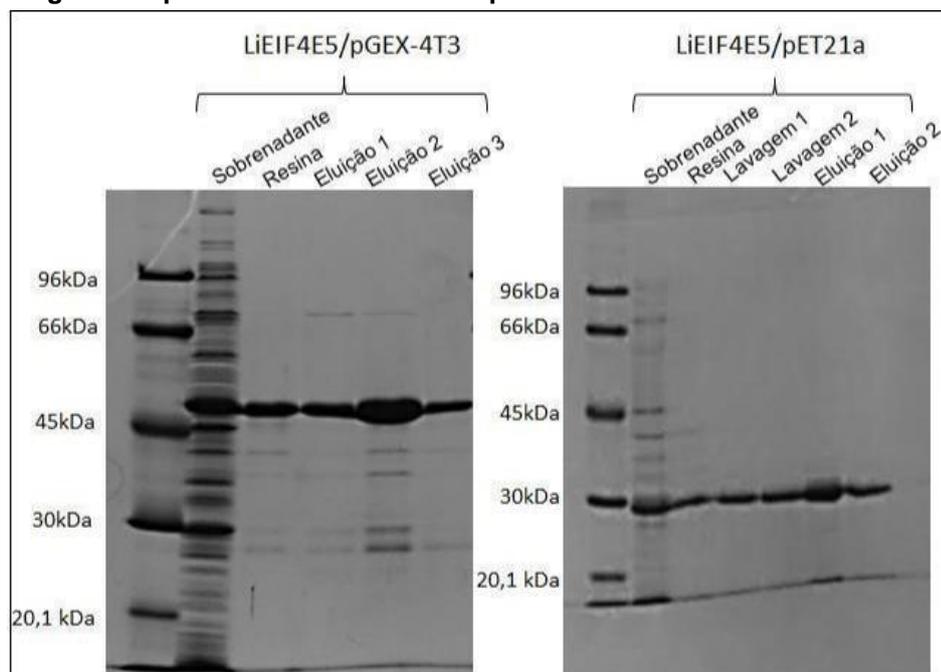
Após os dados brutos resultantes do espectrômetro de massas, foi calculado por meio do *Microsoft excel* a razão da intensidade de massa da amostra teste (provenientes das imunoprecipitações dos lisados das células transfectadas) pela amostra controle (lisado da célula *L. infantum* selvagem). Posteriormente foi calculado o Log na base 2 para saber o quão intensa é a abundância dos peptídeos em relação ao controle negativo. Então foi organizada uma lista com os peptídeos mais abundantes, do maior para o menor, e foi adotado um *score* do  $\text{Log}_2$ , que nesse estudo foi considerado  $\text{Log}_2 =$  ou  $> 2$ . Diante desses dados foram analisadas as identidades dos peptídeos por meio dos números de acesso presente no banco de dados de tripanosomatídeos, *TritypDB database*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE DA EFICIÊNCIA DE ANTICORPOS PURIFICADOS UTILIZANDO PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Em etapa que antecede a realização deste trabalho, foi produzido soro policlonal específico contra a proteína *L*EIF4E5 (Nascimento, 2012). Para iniciar este trabalho, então, este soro foi testado quanto a sua capacidade de reconhecimento de proteínas recombinantes produzidas por expressão em *Escherichia coli* e fusionadas tanto com *tag* de poli-histidinas quanto com a proteína Glutathione S-Transferase ou GST (expressas pelos plasmídeos *L*EIF4E5/pET21a e *L*EIF4E5/pGEX-4T3, respectivamente - Figura 12). Foram utilizados anticorpos anti-EIF4E5 purificados a partir dos soros policlonais com as próprias proteínas recombinantes, de forma a aumentar a sua especificidade de reconhecimento. Para testar a eficiência e especificidade destes anticorpos anti- EIF4E5, foram também utilizadas as mesmas proteínas recombinantes e como controle negativo proteínas recombinantes do fator EIF4E6. Os anticorpos purificados foram testados e a sua especificidade comprovada uma vez que só reconhecem a proteína *L*EIF4E5 e não a *L*EIF4E6 (Figura 13).

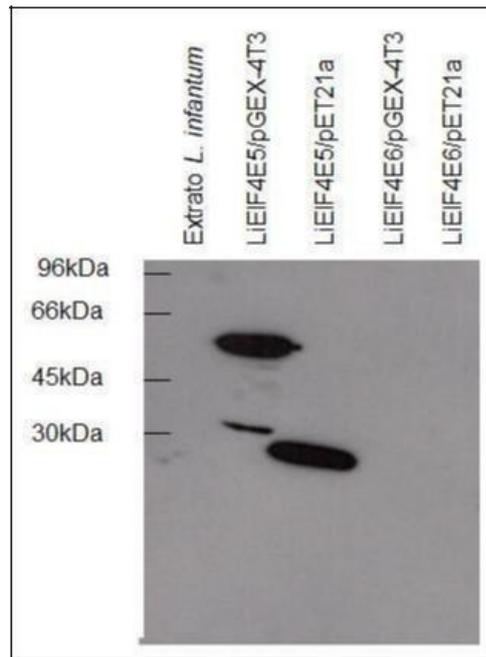
**Figura 12 - Imagem das proteínas recombinantes purificadas**



**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** Géis de SDS PAGE corado com Comassie Blue. Na ordem as amostras das etapas de purificação com resina de glutationa sefarose para *LiEIF4E5/pGEX-4T3* com *tag* de GST e a amostras das etapas de purificação com resina de níquel, para a proteína *LiEIF4E5/pET21a* com *tag* de histidina. Os tamanhos correspondem aos preditos, uma vez que em *LiEIF4E5/pGEX-4T3* o *tag* de GST possui 26,6 kDa, ficando a proteína *LiEIF4E5* com tamanho de aproximadamente 48kDa, já que a mesma sem o *tag* tem aproximadamente 22kDa. Na sequência tem a proteína *LiEIF4E5/pET21a* com *tag* de histidina que possui 6 kDa, ficando a proteína *LiEIF4E5* com aproximadamente 28kDa.

**Figura 13 - Imagem do teste dos anticorpos purificados**



**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** Na ordem as amostras utilizadas para o ensaio por *Western blot* são: Extrato total de *L. infantum*, proteínas: *LiEIF4E5/pGEX-4T3*, *LiEIF4E5/pET21a*, *LiEIF4E6/pGEX-4T3* e *LiEIF4E6/pET21a*. O resultado mostra a especificidade dos anticorpos purificados para as proteínas purificadas *LiEIF4E5*. Foi utilizado 30 ng de cada proteína recombinante e 1:500 de cada anticorpo purificado.

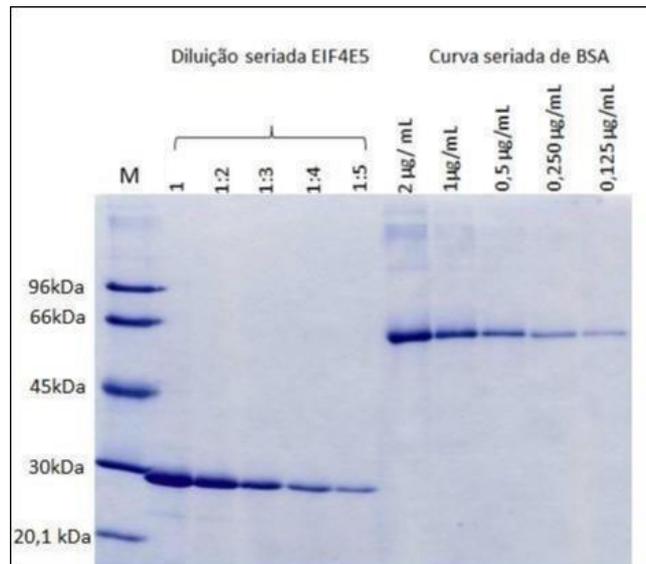
Os anticorpos testados se mostraram então de qualidade suficiente para se tentar avaliar a expressão endógena de *LiEIF4E5* em células de *L. infantum*, bem como também para ensaios de imunofluorescência para determinação da localização subcelular da proteína, como descrito a seguir.

#### 4.2 QUANTIFICAÇÃO DE *LiEIF4E5* EM *L. infantum*

Para avaliar a expressão da proteína EIF4E5 endógena e mensurar a sua concentração em formas promastigotas de *L. infantum* foi necessário quantificar a

proteína recombinante com o *tag* de histidina (Figura 14). Com a quantificação precisa da proteína teríamos condições de avaliar melhor a capacidade do soro disponível de detectar a presença da proteína endógena em lisados de *L. infantum*. Para essa quantificação foram realizadas diluições seriadas do EIF4E5 recombinante e comparada com diluições seriadas de concentração conhecida da proteína BSA, como mostrado na Figura 14.

**Figura 14 - Quantificação da proteína recombinante *L*EIF4E5**

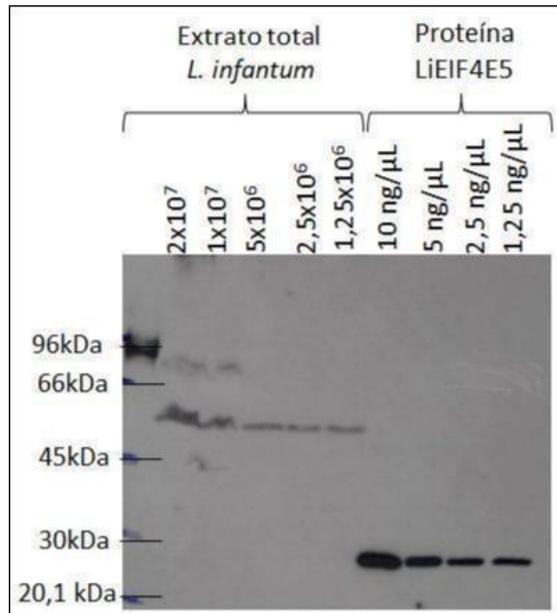


**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** Gel de SDSPAGE corado com Comassie Blue. A imagem mostra as diluições seriadas da proteína *L*EIF4E5 e sua comparação com a curva seriada de BSA em concentrações conhecidas em gel de poliacrilamida corado com azul de comassie. M, representa o marcador de peso molecular, mostrando o tamanho estimado para a proteína *L*EIF4E5.

Diante da análise realizada pela câmera digital, Kodak 1D *Image Analysis Software* foi utilizado o ponto 1:2 da proteína recombinante e comparado com o ponto de 2 µg/mL de BSA. O valor obtido de proteína recombinante, foi transformado para nanograma, tendo uma concentração de 335,2 ng/µL. Diante desse valor foi utilizado 10, 5, 2,5 e 1,25 ng/µL de proteína recombinante e  $2 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^6$  e  $1,25 \times 10^6$  de extrato total de *L. infantum* para analisar o reconhecimento do anti-*L*EIF4E5 por ensaio de *Western blot* (Figura 15).

Figura 15 - Quantificação da proteína endógena *LiEIF4E5* de *L. infantum*



**Fonte:** O autor (2018).

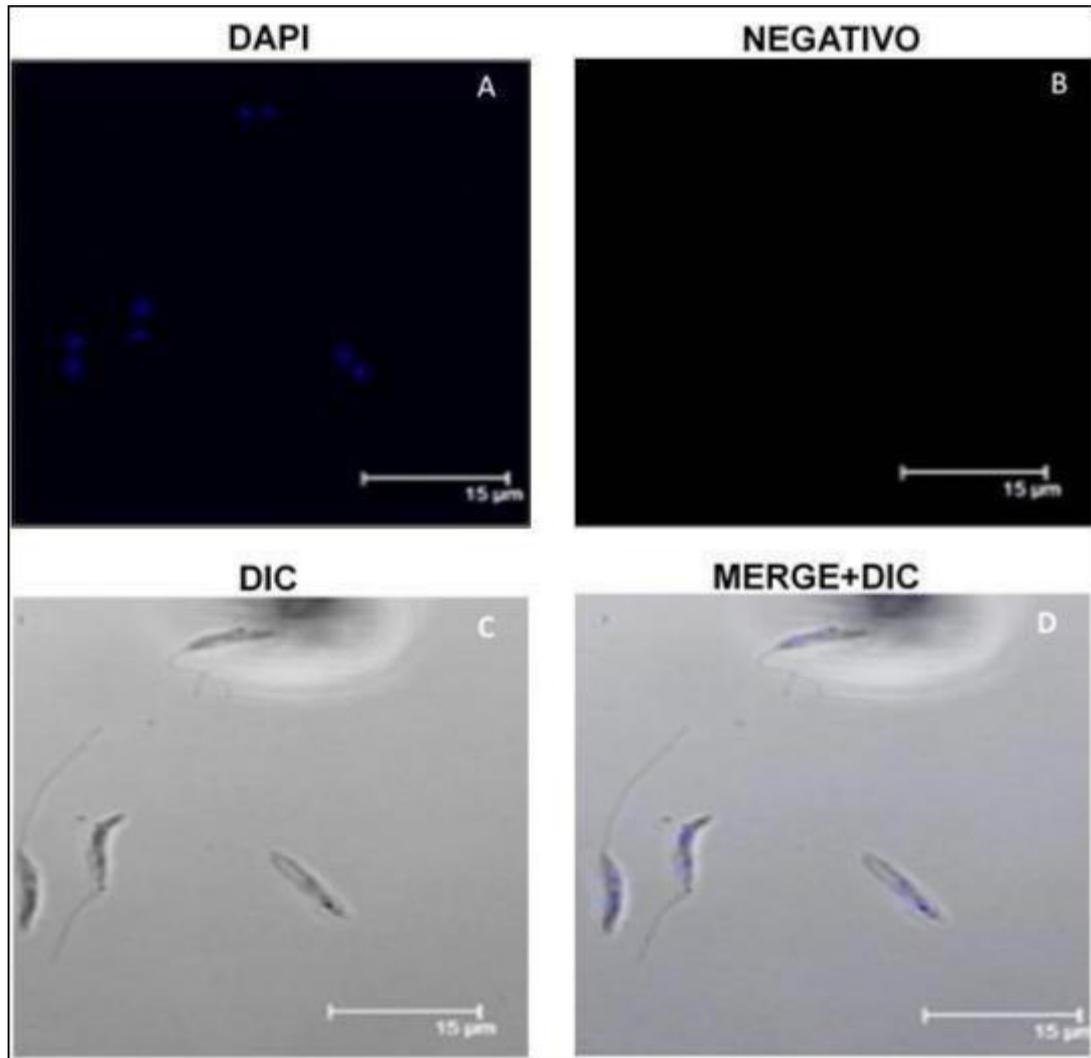
**Nota:** A imagem mostra o resultado de um *Western blot* contendo várias concentrações de extratos totais de *L. infantum* e várias concentrações da proteína recombinante *LiEIF4E5/pET21a* testada com o anticorpo anti- *LiEIF4E5*. O marcador de peso molecular indica o tamanho correto da proteína recombinante de aproximadamente 28 kDa (sendo: 22kDa da proteína com 6 kDa a mais da cauda de histidina).

De acordo com o resultado mostrado na figura, não houve o reconhecimento da proteína no extrato total de *L. infantum* e as bandas presentes nos extratos totais são inespecíficas. Este resultado indica que a proteína endógena está em quantidade insuficiente para ser reconhecida pelo anticorpo anti-*LiEIF4E5*, ou seja, em concentrações inferiores a 0,5 ng por  $10^7$  células.

#### 4.3 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DA PROTEÍNA *LiEIF4E5*

Apesar do resultado negativo no *Western-blot*, o experimento de imunofluorescência permitiu a visualização por microscopia confocal da expressão e localização celular do *LiEIF4E5* em células promastigotas de *L. infantum*, em sua fase exponencial de crescimento. Para este experimento como controle negativo foram utilizadas células promastigotas de *L. infantum*, em sua fase exponencial, avaliadas sem a presença do anticorpo primário anti-*EIF4E5* (Figura 16).

Figura 16 - Imagens de *L. infantum* em microscopia confocal

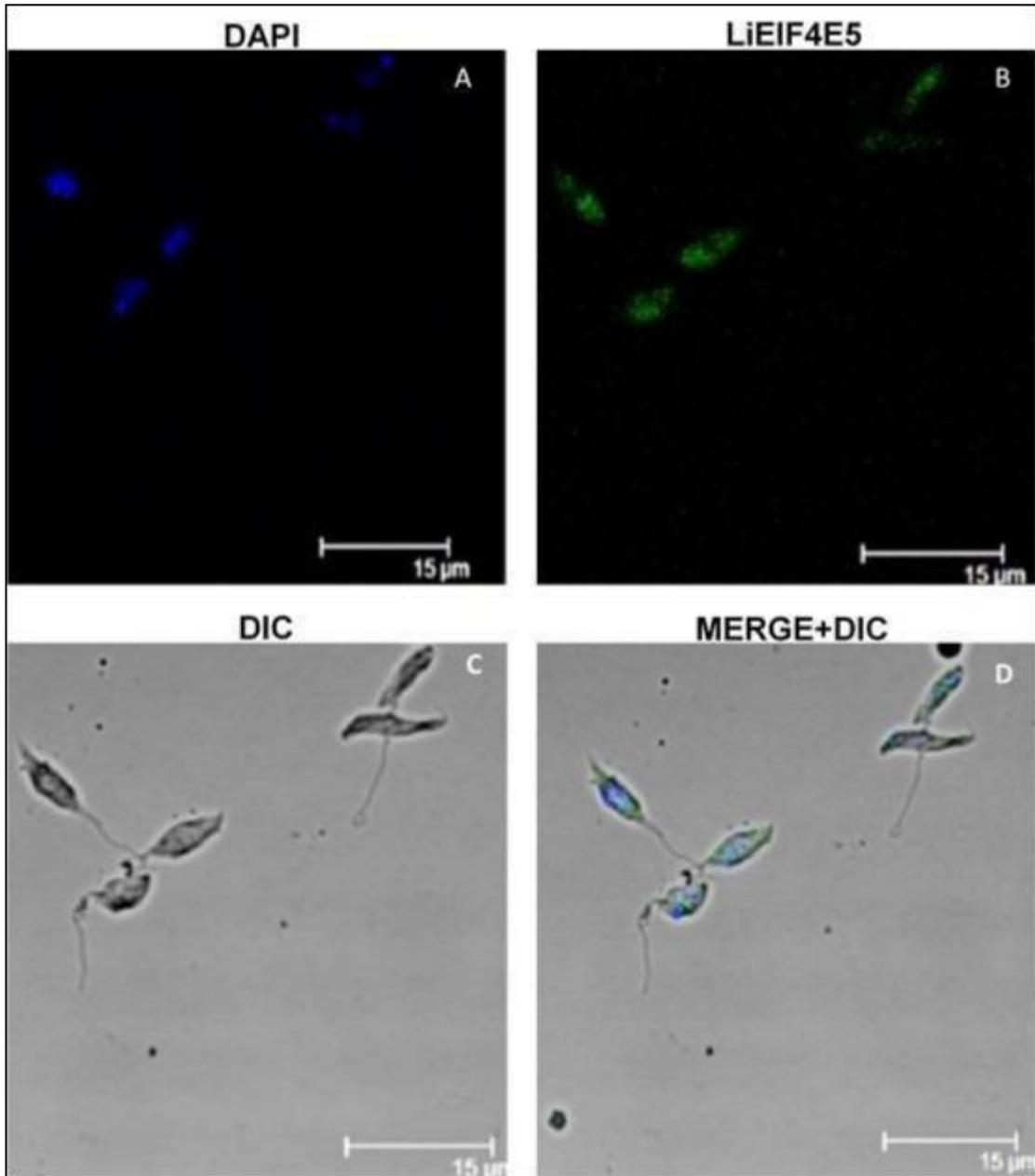


**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** A imagem apresenta células de *Leishmania infantum* coradas com DAPI (A). O negativo refere-se as células de *L. infantum* sem fazer uso de anticorpo anti-*L*EIF4E5 (B), servindo como controle negativo. O DIC (Contraste de Interferência Diferencial) é a transmissão da célula pelo microscópio confocal (C). Por fim, o MERGE+DIC (D) é a transmissão das células com a sobreposição de A, B e C.

As células de *L. infantum* foram então incubadas com o anticorpo anti-EIF4E5 para analisar a localização subcelular da proteína *L*EIF4E5. Depois as células foram incubadas com o anticorpo secundário Alexa Fluor 488. As células também foram coradas com DAPI a fim de identificar o núcleo celular (Figura 17).

Figura 17 - Localização subcelular da *L*EIF4E5



**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** A imagem apresenta células de *Leishmania infantum* coradas com DAPI (A). O *L*EIF4E5 refere-se às células de *L. infantum* incubadas com anticorpo anti-*L*EIF4E5 (B). O DIC (Contraste de Interferência Diferencial) é a transmissão da célula selvagem pelo microscópio confocal (C). Por fim, o MERGE+DIC (D) é a transmissão das células com a sobreposição de A, B e C.

Foi visto que a localização subcelular da *L*EIF4E5 é citoplasmática. A proteína *L*EIF4E5 é abundante em toda fração citoplasmática. Estes resultados foram comparados com o controle negativo, ou seja, com a *Ldi wt* sem superexpressão da proteína em estudo.

#### 4.4 OBTENÇÃO DE LINHAGENS MUTANTES DE SUPEREXPRESSORES DA PROTEÍNA EIF4E5

Devido ao pouco reconhecimento da proteína EIF4E5 endógena pelo anticorpo produzido e como uma nova estratégia para caracterizá-la em *L. infantum* optou-se por trabalhar com a proteína superexpressa fusionada a um epitopo sintético, no caso o HA. Antes, genes mutados foram construídos buscando modificar o motivo de ligação do EIF4E5 a seus parceiros homólogos de eIF4G. Isso foi possível por meio da mutação sítio dirigida de resíduos de aminoácidos aromáticos localizados dentro da região provavelmente envolvida na interação com estes parceiros. O primeiro resíduo selecionado para mutagênese foi o W53 do EIF4E5 que é equivalente ao resíduo W73 do eIF4E de humanos envolvido na interação com seu parceiro eIF4G. O segundo resíduo mutado se trata de um aminoácido de natureza idêntica ao selecionado para a primeira mutagênese e posicionado próximo ao mesmo, porém que a princípio não deveriam estar envolvidos na interação com homólogos de eIF4G (W45). Os genes mutados *L/EIF4E5<sub>W53A</sub>*, *L/EIF4E5<sub>W45A</sub>*, foram construídos com base em alinhamentos de sequências existentes dos EIF4E5 de várias espécies como mostrado na Figura 18.

**Figura 18 - Análise comparativa de seqüências de EIF4E5 de diferentes espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma***

TbEIF4E5	1	NEE--	-----E	SHALKDPWEV	SYIPQLTTEI	VKNVYEGDWN	LAKEALQOPL	DYWRVWEDFW	STUNSLPKLH
TcEIF4E5	1	NKE--	-----T	AHALKDPWEL	SYIPQLTPDT	VKYDFKGDWN	KAKQALQOPL	DYIRTVWEDFW	STUNSLPKLH
Tc1EIF4E5	1	NG--	-----E	SHALKDPWEL	SYIPQITTDI	VKNDFKGDWN	SAKDALQOPL	DYWRVWEDFW	STUNSLPKLH
LmEIF4E5	1	MKSATNS	-----A	THALRDKWEV	SEIPLLLTADM	VNTDYKGNWQ	LAAQERTOKL	DWITSVDELW	STUNSLPKVH
LiEIF4E5	1	NS--	-----A	THALRDKWEV	SEIPLLLTADM	VNTDYKGNWQ	LAAQERTOKL	DWITSVDELW	STUNSLPKVH
LmxEIF4E5	1	NS--	-----A	THALRDKWEV	SEIPLLLTADM	VNTDYKGNWQ	LAAQERTOKL	DWITSVDELW	STUNSLPKVH
LbEIF4E5	1	NS--	-----A	THALRDKWEV	SEIPLLLTADM	VNTDYKGNWQ	LAAQERTOKL	DWITSVDELW	STUNSLPKVH

TbEIF4E5	65	QLESSSTFVE	ARNNVV-ASY	EAFPNCTRII	VDIRKAAMAE	KGTAVI <sup>▼</sup> ISSV	IGESVVSQEV	CEKPICDVLR	LSSRPNKESP
TcEIF4E5	65	QLGNGSTFIF	ARNNVV-ASY	EAFPNCTRVL	VDLYKASVAE	KGMDFVSSV	IGEGLTVDVC	NGKTVCDVWR	LSSRPNQESP
Tc1EIF4E5	64	QLANGSTFVE	ARNNVV-ASY	EAFPDCTRIIF	VDIQKAAVAD	KGLAVV <sup>▼</sup> SSI	IGESLSQEAC	EAKPVCDVLR	LSSRPNRDFP
LmEIF4E5	69	QLGMGSTLIE	ARNNKDPPSY	EAYPNCGRIM	INLLKPPTTD	AGLELV <sup>▼</sup> LAVV	NGETAAEKAS	DCKPVCDVLR	DAARFSREHS
LiEIF4E5	64	QLGMGSTLIE	ARNNKDPPSY	EAYPNCGRIM	INLLKPPTTD	AGLELV <sup>▼</sup> LAVV	NGETAAEKAS	DCKPVCDVLR	DAARFSREHS
LmxEIF4E5	64	QLGMGSTLIE	ARNNKDPPSY	EAYPNCGRIM	INLLKPPTTD	AGLELV <sup>▼</sup> LAVV	NGETAAEKAS	DCKPVCDVLR	DAARFSREHS
LbEIF4E5	64	QLGMGSTLIE	TRNNKDPPSY	EAYPNCGRIM	INLLKPPTTD	TGLELV <sup>▼</sup> LAVV	NGETVAEKAS	DCKPVCDVLR	DAARFSREHS

TbEIF4E5	144	ELVRDEVWLS	DQTYGEAVLA	VYRKALND-V	EMSQPHVIFG	ESLFE-----	KEKKKKGK		
TcEIF4E5	144	ELVRDEVWLS	DQLYAKDVIP	YIRRGINE-A	CLSFTDFIMG	ESTFE-----	KDKKKPSVSG	AKN	
Tc1EIF4E5	142	ELVRDEVWLN	DKSYNRVLA	YIRKVLKD-S	GLDHSQVLFG	ESSFQ-----	KEKKK-GM		
LmEIF4E5	149	ELVRDEVWLS	DSTRSHAVAE	FLAEAMRA-K	GLAANSYNIA	EASEDAAAPG	KDKKKVLAAS	MPSPSSPPMV	KD
LiEIF4E5	144	ELVRDEVWLS	DSTRSHAVAE	FLAEAMRE-K	GLAANSYNIA	EASEDAAAPS	KDKKKVLAAS	TLSPSSPPMM	KD
LmxEIF4E5	144	ELVRDEVWLS	DSTRSHAVAE	FLAEAMKE-K	GLAANSYNIA	EASEDAAAPS	KDKKKVLTAS	MLSPSSPPMV	KD
LbEIF4E5	144	ELVRDEVWLS	DSTRSHAVAE	FLAEAMKE-K	GLAANSYNIA	EASEDAAASS	KDKKKVLTAS	VLSPALPMV	KD

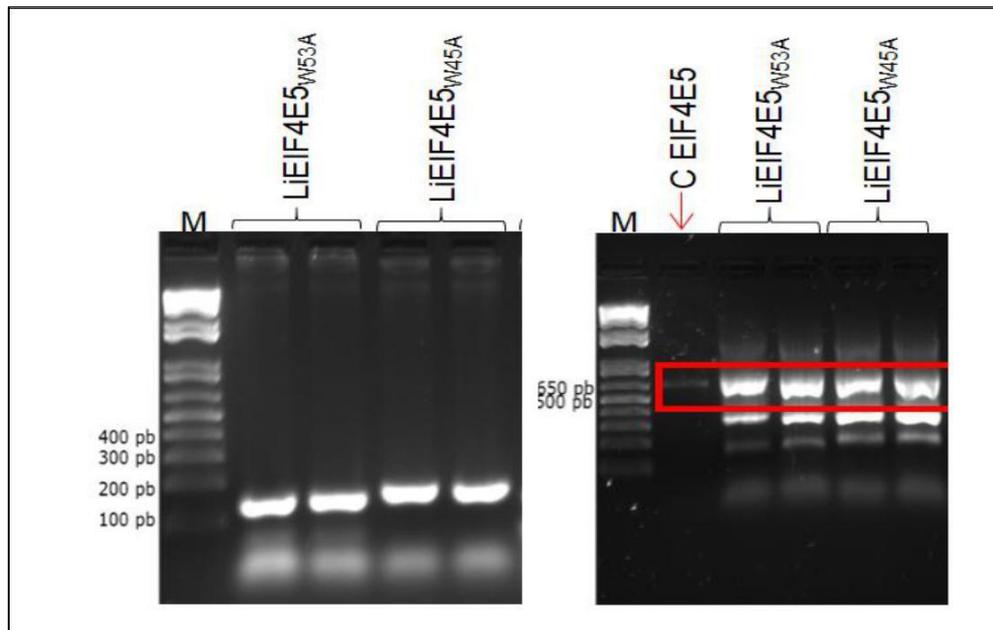
Fonte: O autor (2018).

**Nota:** Alinhamento realizado por ClustalW com base na matriz BLOSUM 62 com os aminoácidos idênticos em mais de 60% das seqüências destacados em preto, enquanto os aminoácidos definidos como semelhantes em mais de 60% das seqüências, são mostrados em cinza. O símbolo \* define a posição dos oito resíduos de triptofano característicos do eIF4E de metazoários. ▼ indica a posição de resíduos de triptofano que podem está implicados na ligação ao *cap* que mostraram interagir com o RNA, enquanto que ◊ destaca a posição do resíduo W73 de humano envolvido na ligação a homólogos de eIF4G e o símbolo # indica aminoácidos carregados positivamente e que também contribuem para a ligação ao *cap*. Os aminoácidos selecionados para a mutagênese estão indicados pela cor vermelha. Potenciais sítios de fosforilação por enzimas do tipo cdk na extremidade C-terminal do EIF4E5 de *Leishmania* estão indicados em azul.

#### 4.4.1 Amplificação das seqüências de interesse

Duas reações de PCRs foram realizadas que apresentaram fragmentos de tamanhos específicos para os genes mutantes. Na 1ª PCR, que gerou os fragmentos denominados *megaprimers* os tamanhos obtidos foram de aproximadamente 149 pb para o *megaprimer* com mutação do *L*EIF4E5 na posição W53 e 173 pb para o *megaprimer* com mutação na posição W45. Posteriormente, ao se utilizar o produto da 1ª PCR, *megaprimer*, juntamente com *primer* reverso da proteína selvagem foi possível a obtenção do gene completo com cada mutação desejada. O gene eIF4E5 possui aproximadamente 645 pb, como observado na Figura 19.

**Figura 19 - Gel de agarose resultante de corrida eletroforética dos fragmentos da 1ª PCR e 2ª PCR**



**Fonte:** O autor (2018).

**Nota: A)** o gel mostra o resultado da 1ª PCR resultante da mutação *LiEIF4E5<sub>W53A</sub>*, e *LiEIF4E5<sub>W45A</sub>*, com os respectivos tamanhos. A figura mostra o tamanho do marcador de peso molecular utilizado para comparação com os fragmentos denominados *megaprimers*. **B)** O gel mostra o resultado da 2ª PCR fazendo uso dos fragmentos da 1ª PCR e obtendo os genes completos com as devidas mutações.

Os fragmentos obtidos na 2ª PCR foram purificados permitindo a obtenção dos fragmentos específicos dos produtos de mutagênese e a remoção de possíveis contaminantes. Os produtos purificados serviram para clonagem no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, USA).

#### 4.4.2 Clonagem em vetor pGEM T-easy

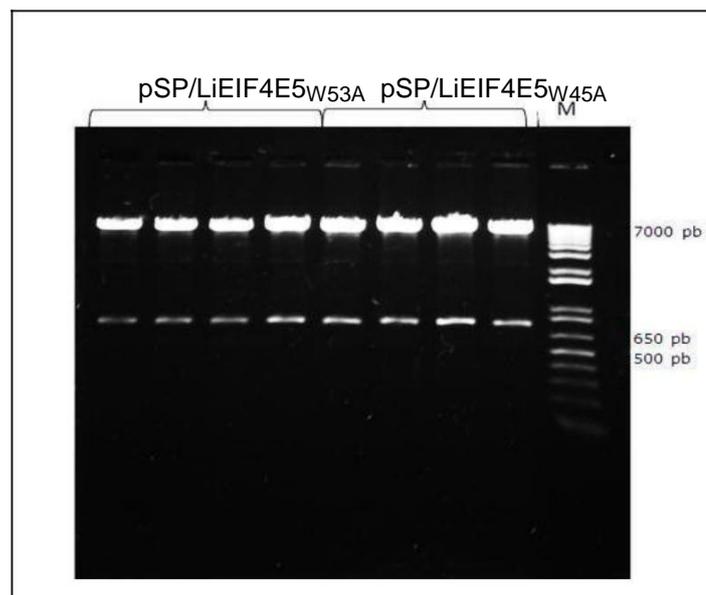
A clonagem dos genes *LiEIF4E5<sub>W53A</sub>* e *LiEIF4E5<sub>W45A</sub>* no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, USA) foi confirmada inicialmente por digestão enzimática usando a enzima *EcoRI High Fidelity*, uma vez que este plasmídeo possui sítios de *EcoRI High Fidelity*, que flanqueiam a região onde o gene foi inserido. A digestão liberou fragmentos dos genes nos tamanhos esperados. A segunda confirmação da clonagem se deu por meio do sequenciamento dos genes

obtidos com o intuito de identificar os resíduos mutados. A análise das sequências foi realizada por meio do programa *DNAstar - Software for Molecular Biology*, comprovando a integridade das sequências e suas mutações nos sítios desejados.

#### 4.4.3 Subclonagem no vetor de superexpressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa

Após a confirmação da clonagem no vetor pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega, Madison, USA), os produtos foram subclonados no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa que permite a superexpressão das proteínas com o epítipo HA. A subclonagem foi confirmada por digestão enzimática com *Bam*HI e *Hind*III, como pode ser visto na Figura 20 que representa a obtenção das seguintes construções: pSP-BT1-Y-Neo-alfa/*L*/EIF4E5<sub>W53A</sub> e pSP-BT1Y-Neo-alfa/*L*/EIF4E5<sub>W45A</sub>, na qual o plasmídeo tem aproximadamente 7000 pb. A integridade das construções geradas também foi confirmada por meio de análises dos resultados obtidos pelo sequenciamento de DNA.

**Figura 20 - Gel de agarose confirmando a subclonagem em plasmídeo pSP-BT1Y-Neo-alfa**



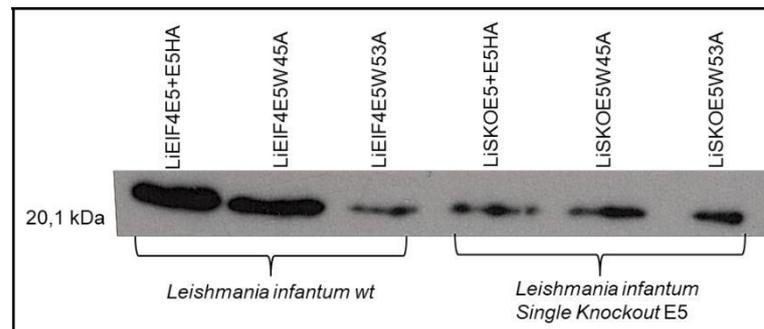
**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** A imagem mostra a confirmação da subclonagem dos genes de interesse no vetor de superexpressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa por meio de digestão enzimática com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III dos vetores previamente extraídos, apresentando os tamanhos esperados observados de acordo com o marcador de peso molecular.

#### 4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG HA E CURVAS DE CRESCIMENTO

O plasmídeo pSP-BT1Y-Neo-alfa permite a expressão constitutiva das proteínas em uma intensidade maior. Então foram feitas transfecções com essas construções para avaliar a expressão dessas proteínas em *L. infantum*. Extratos proteicos das células transfectadas utilizando as construções obtidas, bem como com plasmídeos contendo o gene eIF4E5 selvagem, foram fracionados em gel SDS-PAGE. A superexpressão foi testada por *Western blot* com o uso do anticorpo anti-HA (Sigma), que confirmou a superexpressão da proteína de interesse, no tamanho de aproximadamente 22 kDa como predito por análise de bioinformática, como visto na Figura 21.

**Figura 21 - *Western blot* confirmando a superexpressão de *LiEIF4E5* em *L. infantum***

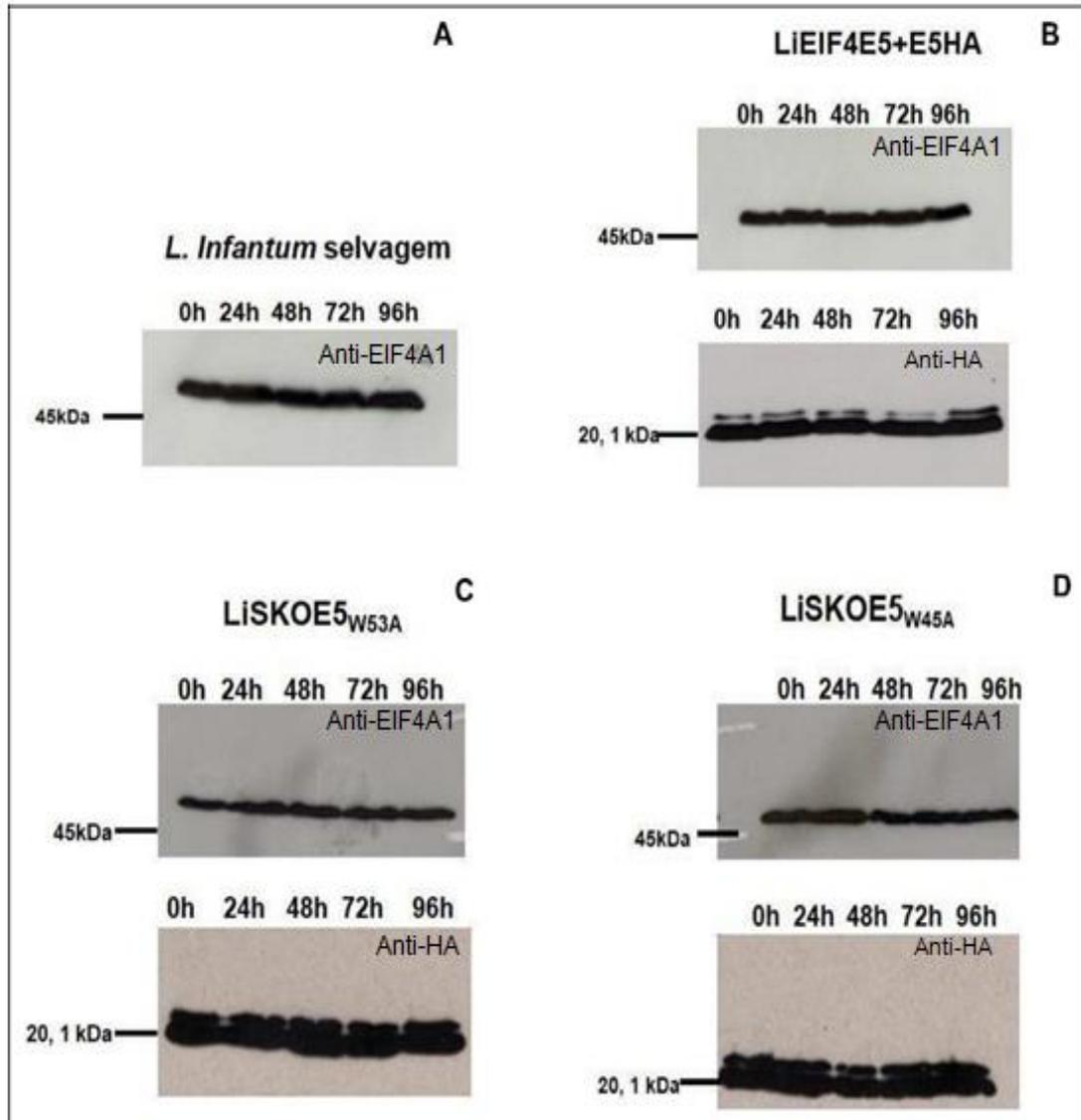


**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** Confirmação da expressão das proteínas de linhagens transgênicas obtidas após a transfecção em células de *L. infantum*, onde *LiEIF4E5+E5HA* significa transfecção da linhagem selvagem com o gene que superexpressa a proteína EIF4E5 selvagem. As células intituladas de *LiSKOE5+E5HA*, *LiSKOE5<sub>W45A</sub>* e *LiSKOE5<sub>W53A</sub>* são resultantes de transfecções em células com uma única cópia endógena do gene E5, ou seja, *Single Knockout (SKO)* com os mesmos construtos gênicos utilizados nas transfecções da linhagem selvagem. As proteínas expressas apresentaram o tamanho de aproximadamente 22kDa.

Foram realizadas curvas de crescimento dessas células que superexpressam o EIF4E5. Essas curvas foram analisadas por *Western blot* utilizando o anticorpo anti-HA, e também um anticorpo de controle de carga, o anti-EIF4A1, como pode ser visto na Figura 22.

Figura 22 - *Western blot* confirmando a expressão das proteínas em curvas de crescimento



**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** As imagens mostram a expressão do controle de carga o EIF4A1 durante todo ciclo de vida de *Leishmania infantum* (A). A curva do *LiE5+E5HA* também mostra a expressão constitutiva do EIF4A1, bem como a superexpressão do *LiEIF4E5* fusionado ao *tag* de HA (B), o mesmo ocorre com as curvas do *LiSKOE5<sub>W53A</sub>* (C) e do *LiSKOE5<sub>W45A</sub>* (D).

Os resultados revelam que tanto a proteína selvagem superexpressando o *LiEIF4E5*, quanto as proteínas mutadas são expressas por toda a fase de crescimento da forma promastigota de *L. infantum*. De acordo com os resultados utilizando o anticorpo anti-EIF4A1 foi visto uma padronização da expressão gênica durante esta curva. Não foi possível realizar testes que pudessem esclarecer porque o *Western blot* utilizando o anticorpo anti-HA revelou um padrão de duas bandas

vistas no filme autorradiográfico exposto, mas é possível que a banda de maior tamanho seja indicativa de fosforilação do EIF4E5.

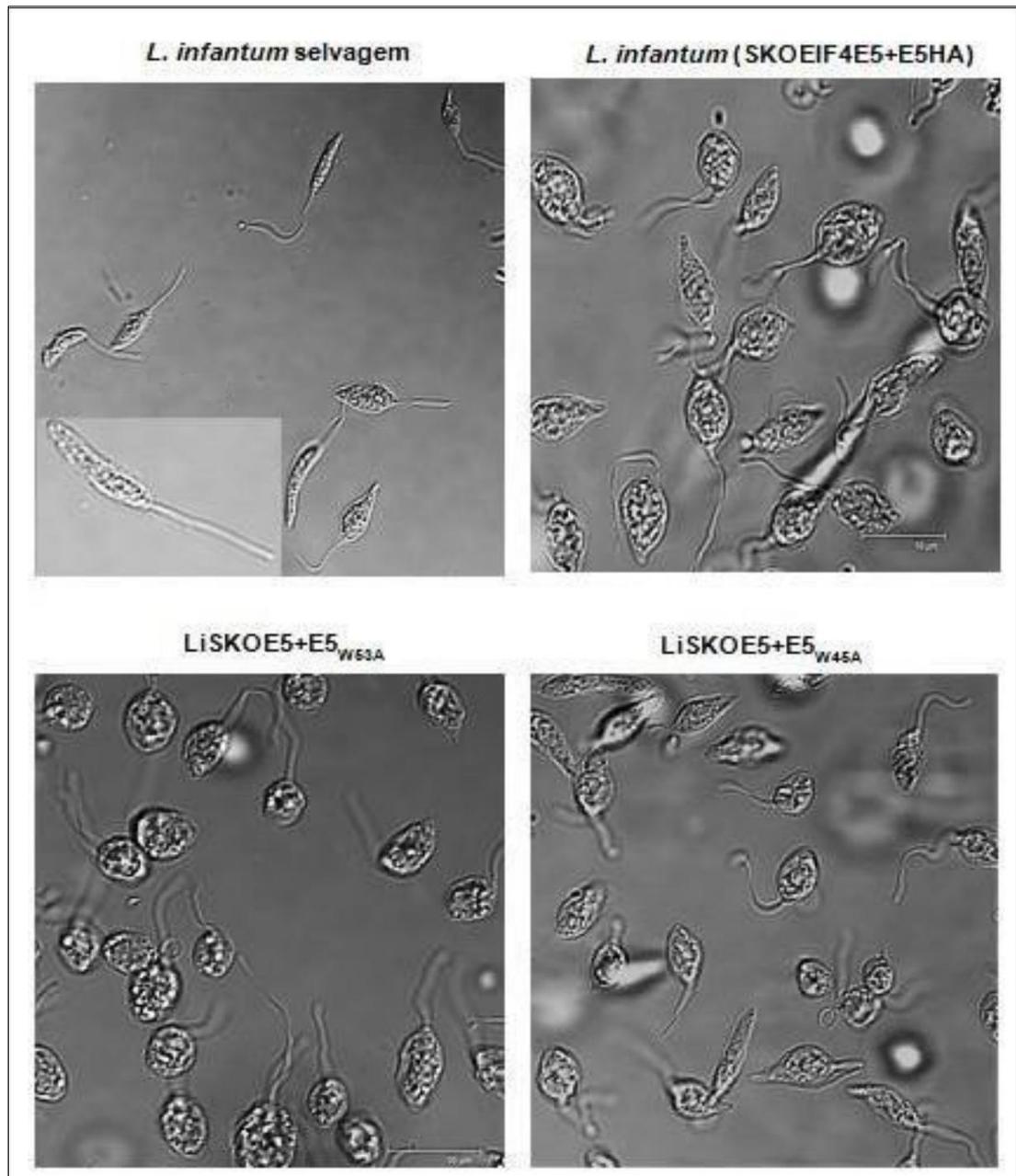
#### 4.6 DELEÇÃO GÊNICA

As células com deleção dupla (*Double knockout*), ou seja, sem as duas cópias do gene eIF4E5, mas com a complementação do gene eIF4E5 superexpresso com plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA não sobreviveram. Então uma estratégia de diminuição progressiva da concentração do antibiótico puromicina foi adotada, pois este antibiótico é usado normalmente em uma concentração muito alta o que poderia ser tóxico para a célula. Mesmo diante disso, as células não resistiram. O que pode indicar que a cópia do gene eIF4E5 com o plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa-HA não é suficiente para manter as células vivas.

#### 4.7 ANÁLISE MORFOLÓGICA CELULAR POR MICROSCOPIA CONFOCAL

A fim de avaliar alguma possível alteração morfológica em células superexpressando a proteína *LiEIF4E5* foi realizado um procedimento que permitiu avaliar apenas a imagem celular por meio do microscópio confocal. Não foi usado nenhum tipo de corante para esta técnica. As células analisadas no microscópio confocal apresentaram em *Li wt* aspecto alongado e fusiforme, típico de células promastigotas em sua fase exponencial. Já as células *LiE5+E5HA* e *LiSKOE5+E5HA*, onde há a superexpressão da proteína *LiEIF4E5*, apresentaram um efeito fenotípico diferente, também foi vista essa alteração em células com as linhagens mutantes: *LiSKOE5+E5W53A* e *LiSKOE5+E5W45A* (Figura 23).

Figura 23 - Morfologia Celular analisada por Contraste de Interferência Diferencial (DIC)



**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** A figura apresenta as imagens analisadas por luz transmitida. A célula representada como *Ldi wt* indica a célula selvagem, sem nenhuma modificação genética. *LiSKOEIF45+E5HA* indica a célula superexpressando a proteína EIF4E5, ou seja, a célula *Ldi wt* transfectada com uma construção gênica que permite a superexpressão da proteína EIF4E5. As células *LiSKOE5+E5<sub>W45A</sub>* e *LiSKOE5+E5<sub>W53A</sub>* referem-se as células sem uma das cópias endógenas, mas que contém uma construção gênica com mutação nos sítios requeridos de interação do EIF4E5 a parceiros funcionais.

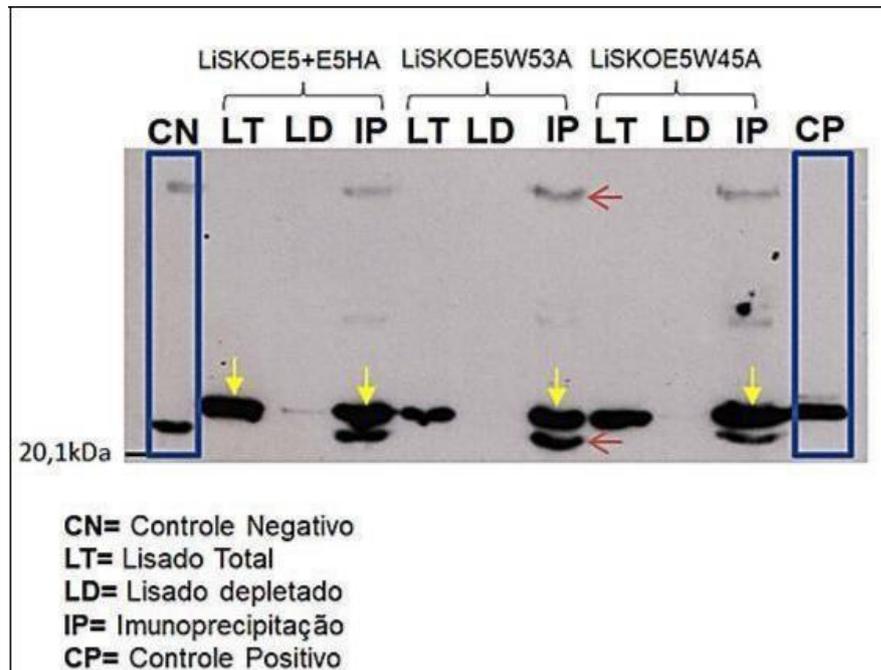
#### 4.8 ANÁLISE DA EXTRAÇÃO PROTEICA DOS LISADOS CELULARES E IMUNOPRECIPITAÇÃO

A confirmação da superexpressão do EIF4E5 selvagem e mutantes permitiu também a preparação de lisados celulares pelo método de cavitação por cilindro de alta pressão e desta forma a obtenção da proteína superexpressa em condições fisiológicas em maior quantidade. Os lisados apresentaram resultados satisfatórios confirmando a extração proteica das linhagens celulares *LiSKOE5+E5HA*, *LiSKOE5<sub>W53A</sub>* e *LiSKOE5<sub>W45A</sub>*.

Por sua vez, este resultado serviu para a continuidade dos experimentos, onde foi realizada a imunoprecipitação (IP) com a finalidade de avaliar a interação de subunidades do complexo eIF4F à proteína EIF4E5, bem como de possíveis parceiros funcionais adicionais, a fim de melhor caracterizá-la. As amostras deste ensaio foram analisadas por *Western blot* e o resultado demonstrou que as proteínas detectadas no imunoprecipitado apresentaram os tamanhos esperados de aproximadamente 22 kDa para a proteína EIF4E5. As bandas inespecíficas com cerca de 66 kDa e 30 kDa pertencem as cadeias do IgG que são reconhecidas pelo anti-IgG de camundongo. Assim, os resultados confirmam a presença da proteína e com isso a eficácia do procedimento da imunoprecipitação como visto na Figura 24.

É possível identificar o reconhecimento das bandas de IgG no controle negativo, que se refere a IP realizada em células lisadas de *L. infantum* selvagem. Já o lisado depletado de todas as imunoprecipitações não apresentou bandas, indicando que a totalidade das proteínas com o HA ficou aderida a resina de agarose.

Figura 24 - Imagem dos lisados celulares e imunoprecipitação



**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** Na imagem é visto o CN (Controle Negativo) representado pela IP realizada pelo lisado total de *Leishmania infantum* wt, em seguida o LT (Lisado Total), LD (Lisado Depletado) e IP (Imunoprecipitação) da célula *LiSKOE5+E5HA*, seguida de *LiSKOE5<sub>W53A</sub>* e *LiSKOE5<sub>W45A</sub>* respectivamente. O CP (Controle Positivo), se refere a um extrato total de *LiSKOE5+E5HA*. As setas em vermelho indicam bandas que correspondem ao anticorpo anti-IgG, reconhecidas pelo anti IgG de camundongo, já as setas em amarelo ndicam a imunoprecipitação.

Novas reações de IP foram realizadas (imagens não apresentadas) com o intuito de enviá-las para a análise por espectrometria de massas, a fim de analisar a possível interação destes fatores de estudo a possíveis parceiros funcionais do complexo eIF4F, como os EIF4G1 e EIF4G2, uma vez que foi visto no EIF4E5 de *T. brucei* que existe uma interação entre esses fatores (Freire et al., 2014).

#### 4.9 ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Serão descritos os dados da espectrometria de massas tidos como mais relevantes para processos biológicos de *L. infantum*. Estes dados estão resumidos na Tabela 1 e levam em conta apenas as proteínas co-precipitadas com o EIF4E5 e substancialmente enriquecidas em relação ao extrato celular utilizado como controle negativo nos experimentos de imunoprecipitação.

Foi visto que a proteína *LiEIF4E5* foi a mais abundante dentre todos os peptídeos identificados, confirmando assim sua integridade após os processos de lise celular e imunoprecipitação. Foi visto ainda que a proteína *LiEIF4E5* apresenta co-imunoprecipitação com apenas um homólogo de eIF4G (EIF4G1), visto tanto na proteína selvagem, *LiEIF4E5+E5HA*, como em ambos os mutantes *LiEIF4E5<sub>W53A</sub>* e *LiEIF4E5<sub>W45A</sub>*. Então mesmo havendo a mutação do triptofano responsável pela ligação entre homólogos de eIF4E e eIF4G, W53, esta mutação não foi suficiente para abolir essa interação. Este resultado sugere que outros resíduos de aminoácidos também precisem ser mutados para um desligamento completo.

Os dados também revelaram que o EIF4E5 (*LiEIF4E5+E5HA*) e sua versão mutada no triptofano implicado na ligação a homólogos de eIF4G (*LiEIF4E5<sub>W53A</sub>*) interagem com proteínas já descritas como parceiras do EIF4E5, como os ortólogos de *L. infantum* das proteínas nomeadas de G1-IP e G1-IP2 (Freire ER et al., 2017). Da mesma forma foram observadas interações com ortólogos das proteínas 14-3-3 I e 14-3-3 II, sendo que no caso da segunda esta interação não foi observada em *T. brucei*. Chama a atenção que nenhuma dessas interações foram vistas na versão do EIF4E5 (*LiEIF4E5+E5HA*) mutada no segundo resíduo de triptofano testado (*LiEIF4E5<sub>W45A</sub>*), mesmo em presença do EIF4G1. Estes resultados foram bastante importantes, pois revelaram de forma inédita em *L. infantum*, proteínas que parecem fazer parte de um subcomplexo proteico que a princípio interage com o EIF4E5 via EIF4G1. Como essa interação não foi vista na versão do EIF4E5 (*LiEIF4E5+E5HA*) mutada no W45, isso pode indicar que esse sítio mutado é importante para a manutenção da interação das G1-IP, G1-IP2, 14- 3-3 I e 14-3-3 II com o EIF4G1 ou então estas proteína interagem diretamente com o EIF4E5.

Os resultados de espectrometria de massas revelaram outras proteínas potencialmente parceiras do EIF4E5 e com possíveis implicações biológicas. Seis proteínas foram identificadas co-precipitando com a proteína selvagem e ambos os mutantes e enriquecidas em relação ao controle negativo. Destas, contudo, duas são proteínas de localização nuclear (histonas) e outras duas são proteínas que por sua função biológica conhecida e por comumente serem encontradas em experimentos de espectrometria de massas dificilmente devem ter uma associação real com o EIF4E5 (Fosfoglicerato quinase e DNAJ). Outras duas proteínas merecem

ser melhor investigadas e são a “Proteína de transporte vesicular” e o “Fator de ribosilação do ADP”. Mais relevante ainda foi a identificação de sete outras proteínas que se ligam apenas ao EIF4E5 selvagem e a proteína mutada no triptofano W53 e estão ausentes do mutante W45, com comportamento idêntico aos parceiros conhecidos do EIF4E5. Destas algumas também podem ser de ligação inespecífica uma vez que sua função ou localização subcelular não é compatível com a associação a este fator de tradução. Entretanto ao menos duas proteínas identificadas, duas quinases, a “Quinase 2 repressora de diferenciação” e a “Quinase dependente de Ciclina cdc2-CRK3”, podem ter algum papel fisiológico real tendo em vista que estas proteínas não são comumente identificadas em experimentos de co-precipitação. Como o EIF4E5 superexpresso apresenta comportamento indicativo de fosforilação, se liga a proteínas normalmente parceiras de fosfoproteínas (14-3-3 I e 14-3-3 II) e apresenta sítios potenciais de fosforilação por quinases do tipo CRK na sua extremidade C-terminal, estas quinases podem ter algum papel direto regulando a atividade do EIF4E5.

Outras proteínas associadas as três construções do EIF4E5 podem ser observadas no Quadro 2, mas em sua grande maioria não parecem ter impacto funcional claro ou real. Os resultados obtidos, contudo, contribuem de forma significativa para o conhecimento da função desta proteína e devem ser alvo de novos estudos futuros.

Quadro 2 - Proteínas co-imunoprecipitadas com o EIF4E5 em *L. infantum*

Identidade	TriTrypDB ID	LiEIF4E5+E5HA			LiEIF4E5 <sub>W53A</sub>			LiEIF4E5 <sub>W45A</sub>		
		Log <sub>2</sub> IR		Média do Log <sub>2</sub> >2	Log <sub>2</sub> IR		Média do Log <sub>2</sub> >2	Log <sub>2</sub> IR		Média do Log <sub>2</sub> >2
		1º Exp	2º Exp		1º Exp	2º Exp		1º Exp	2º Exp	
<b>Ortólogos conhecidos do complexo EIF4E5-EIF4G1</b>										
EIF4E5	LinJ.36.0650	10,30	9,65	9,98	10,10	9,83	9,96	8,41	6,80	7,60
EIF4G1	LinJ.15.0060	2,81	2,83	2,82	3,10	2,40	2,75	3,16	1,11	2,13
G1-IP mRNA cap N7-guanina metiltransferase	Linj.11.0590	3,47	4,03	3,75	4,00	3,87	3,93	-----	-----	-----
G1-IP2 Proteína de ligação ao RNA	Linj.25.0290	4,24	4,0	4,12	3,81	4,30	4,05	-----	-----	-----
14-3-3 I	LinJ.36.3360	3,59	3,43	3,51	3,73	1,48	2,60	-----	-----	-----
14-3-3 II	LinJ.11.0350	2,09	2,21	2,15	2,51	1,78	2,14	-----	-----	-----
<b>Proteínas co-precipitadas em todas as condições</b>										
Proteína de transporte vesicular (Homólogo CDC48)	Linj.27.0920	3,88	3,91	3,89	4,78	3,55	4,16	4,97	3,22	4,09
Fator de ribosilação do ADP	Linj.30.2380	3,67	3,17	3,42	3,95	3,65	3,8	1,94	2,74	2,34
Fosfoglicerato quinase C	LinJ.20.0110	2,82	2,25	2,53	3,13	1,82	2,47	4,62	1,90	3,26
Proteína DnaJ	Linj.21.0550	2,51	1,85	2,18	2,42	1,62	2,02	2,57	2,09	2,33
Histona H2B	Linj.19.0040	2,08	2,11	2,09	2,61	1,90	2,25	6,56	4,58	5,57
Histona H4	Linj.06.0010	1,77	2,38	2,07	3,33	3,21	3,27	5,67	5,57	5,62

<b>Proteínas co-precipitadas em duas condições</b>										
<b>Quinase 2 repressora de diferenciação</b>	Linj.31.3070	3,87	3,96	3,91	3,85	3,55	3,70	-----	-----	-----
Cinesina 13-6	Linj.35.4770	4,36	2,97	3,66	4,31	2,97	3,64	-----	-----	-----
<b>Quinase dependente de Ciclina cdc2-CRK3</b>	Linj.36.0600	2,85	1,50	2,17	2,73	1,27	2,00	-----	-----	-----
RuvB-like DNA helicase	Linj.34.2440	2,01	2,40	2,20	2,38	1,93	2,15	-----	-----	-----
Proteína de Choque Térmico DNAJ	Linj.22.0009	2,49	2,31	2,40	2,89	1,98	2,43	-----	-----	-----
Proteína de resistência ao antimônio de 56kDa	Linj.34.0210	1,44	2,66	2,05	3,59	4,27	3,93	-----	-----	-----
Proteína nucleolar de ligação ao RNA	Linj.15.1430	2,30	2,70	2,5	2,27	2,37	2,32	-----	-----	-----
Histona H2A	Linj.21.1170	2,09	3,14	2,61	-----	-----	-----	1,90	5,30	3,60
Proteína hipotética	Linj.11.0710	-----	-----	-----	1,29	3,11	2,2	1,29	3,11	2,2
<b>Proteínas co-precipitadas em uma condição</b>										
Proteína Pumilio 10	Linj.11.0470	2,91	2,65	2,78	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Fosfoglicerato quinase	Linj.20.0110	2,82	2,25	2,53	-----	-----	-----	-----	-----	-----
Subunidade regulatória da	Linj.34.2680	-----	-----	-----	2,35	2,74	2,54	-----	-----	-----

proteína quinase										
Proteína Putativa de ligação a G-actina	Linj.34.2060	-----	-----	-----	1,90	2,64	2,27	-----	-----	-----
Histona H4	Linj.15.0010	-----	-----	-----	2,54	1,76	2,15	-----	-----	-----
Proteína hipotética	Linj.33.2570	-----	-----	-----	1,29	3,11	2,22	-----	-----	-----
PABP2	LinJ.35.4200	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,49	1,14	2,31
Proteína Pumilio 7	Linj.32.1830	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2,81	1,54	2,17
Cinesina C	Linj.23.0720	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5,20	4,08	4,64
ATP sintase proteina F1 subunidade gama	Linj.21.2140	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4,02	3,73	3,87
Chaperonina HSP60/CNP60	Linj.30.2830	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4,23	2,04	3,,13
ATP fosfoenolpiruvato carboxiquinasa	Linj.27.1710	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2,52	3,36	2,94
Ciclofilina 2	Linj.06.0120	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2,42	2,95	2,68
ATP sintase subunidade beta mitocondrial	Linj.25.1210	-----	-----	-----	-----	-----	-----	7,39	2,05	4,72
Piruvato desidrogenase subunidade beta E1	Linj.25.1790	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5,84	1,89	3,86
Ubiquinol-citocromo c redutase	Linj.35.0110	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5,41	1,22	3,31

subunidade 14kD										
Piruvato Fosfato Diquinase	Linj.11.1000	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4,68	1,87	3,27
Fatty ácida elongase	LinJ.14.0670	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4,03	1,07	2,55
Proteína Heat 10kDa	Linj.26.0590	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,46	2,86	3,16
Metilcrotonoil-3 - CoA carboxilase subunidade beta	Linj.11.0600	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,44	1,43	2,43
Tirosina Fosfatase	Linj.05.0280	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,31	1,54	2,42
Membrana glicosomal	Linj.28.2430	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,28	1,42	2,35
Cadeia longa fatty ácida CoA ligase	Linj.01.0510	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,21	1,05	2,13
Chaperonina HSP60 mitocondrial precursora	Linj.36.2140	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,13	1,19	2,16
Desidrogenase de cadeia curta	Linj.34.0010	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2,94	1,19	2,06
Proteína de ligação a GTP- Rab1	Linj.27.0620	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1,34	2,71	2,05
Proteína de haste paraflagelar rod 1D	Linj.29.1880	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5,50	1,34	3,42
Proteína	Linj.16.1510	-----	-----	-----	-----	-----	-----	4,80	1,55	3,17

paraflagelar										
Proteína 16 de Paralisia flagelar	Linj.20.1450	-----	-----	-----	-----	-----	-----	3,68	2,06	2,87
Proteína hipotética	Linj.25.1680	-----	-----	-----	-----	-----	-----	2,68	4,91	3,79
Proteína hipotética	Linj.08.1010	-----	-----	-----	-----	-----	-----	5,63	4,06	4,84
Proteína hipotética	Linj.23.0090	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1,59	3,73	2,66
Proteína hipotética	Linj.26.1960	-----	-----	-----	-----	-----	-----	6,27	2,5	4,38

**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** Quadro com os principais dados da espectrometria de massas, na qual é vista a identidade das proteínas co-imuprecipitadas com o EIF4E5 com base no número de acesso disponível no banco de dados TriTrypDB ID; 1º Exp e 2º Exp, referem-se aos experimentos realizados em duplicata. Para saber a relação da abundância de peptídeos da amostra de interesse, é calculada a razão entre a amostra teste (células transfectadas *L*/EIF4E5+E5HA, *L*/EIF4E5W53 e *L*/EIF4E5W45A) e a amostra controle (célula de *L. infantum* selvagem sem está transfectada), posteriormente é calculado o Log<sub>2</sub> IR, que permite a análise da relação da intensidade entre os extratos derivados de células que expressam EIF4E5 dividido pela intensidade observada para os extratos das células controle.

## 5 DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos por serem responsáveis por doenças negligenciadas de impacto mundial e por apresentarem peculiaridades em sua biologia molecular vêm sendo alvo de diversos estudos que visam uma maior compreensão dos mecanismos adotados para sua expressão gênica. A iniciação da tradução, que consiste no momento primordial para a síntese proteica, é regulada por um conjunto de fatores de iniciação da tradução eucariótico, denominado eIFs (*eukaryotic Initiation Factors*). O complexo eIF4F, composto por diversas subunidades, representa o quão complexa é a iniciação da síntese proteica em tripanossomatídeos e o quanto os fatores presentes no complexo eIF4F assumem vários papéis cruciais para esta etapa, fundamental para a síntese proteica, e com isso para o funcionamento celular. Então tentar compreender um pouco mais dessa maquinaria proteica é necessário, pois os resultados poderão contribuir com a caracterização funcional de um homólogo da proteína eIF4E, o EIF4E5, que ainda não foi descrito formalmente em *Leishmania*.

A regulação pós transcricional exerce um papel fundamental na expressão de genes eucarióticos. O passo necessário para regular a produção de proteínas é durante a tradução do mRNA, que por sua vez é controlada por diversos fatores de iniciação da tradução (Min et al., 2017). O fator eIF4E, tem um papel muito importante na ligação ao *cap* dos mRNAs, lhe conferindo uma maior estabilidade e proporcionando o seu recrutamento para a montagem do complexo de iniciação da tradução dos tripanossomatídeos (Yoffe et al., 2004). A análise *in vitro* da ligação do *cap4* ao eIF4E de *Leishmania* indica o importante papel desta interação no mecanismo da tradução (Lewdorowicz et al., 2004). Experimentos demonstraram que a proteína EIF4E5 em *T. brucei* é citosólica e se liga ao *cap in vitro* (Freire et al., 2014).

No presente estudo foi visto por imunofluorescência que a localização subcelular da proteína EIF4E5 está presente em toda fração citoplasmática da célula. Este resultado corroborou com o estudo de Nascimento, 2012 onde foi visto que o fator TbEIF4E5-YFP (EIF4E5 de *T. brucei*) apresentou-se predominantemente no citoplasma celular e uma pequena fração nuclear.

No entanto, não foi possível estimar por *Western blot* a quantidade de proteína LiEIF4E5 expressa endogenamente em *L. infantum*, pois não houve o

reconhecimento pelo o anticorpo purificado anti-*L*EIF4E5 da proteína endógena. O reconhecimento foi visto apenas na proteína recombinante. Isso não se deu devido à ineficiência do anticorpo purificado, uma vez que o mesmo foi capaz de reconhecer a proteína recombinante em concentrações baixas.

Os extratos celulares *L. infantum* continham uma grande concentração de células, e mesmo assim não foi possível a detecção do *L*EIF4E5. Sugerindo que a proteína endógena tem uma baixa concentração em extrato total de *L. infantum*. Diante disso, ainda assim são necessários novos experimentos para analisar o reconhecimento da proteína endógena em *L. infantum*.

Os fatores EIF4E5 e EIF4E6 foram inicialmente caracterizados em *Trypanosoma brucei* e análises por bioinformática sugerem que estes homólogos possuem uma relação maior entre si do que com os outros homólogos da família EIF4E (Freire et al., 2014). Em um trabalho prévio foi visto que ao complementar uma célula SKO com o gene EIF4E5 selvagem ocorreu uma alteração morfológica identificada em microscópio óptico, sendo caracterizada como uma diminuição do comprimento e uma forma ovalar na célula (Lima, 2016). Em outro trabalho ao realizar a análise de cultura submetidas ao RNAi do fator *Tb*EIF4E6, foi visto que a sua depleção causou alterações morfológicas relacionadas como células pequenas e levemente arredondadas em comparação com a cultura controle (Nascimento, 2012). No entanto, estas alterações não foram documentadas.

No presente trabalho foi visto alterações morfológicas com características semelhantes as descritas anteriormente, isso foi constatado por meio de microscopia confocal. As alterações foram vistas tanto em células superexpressando o gene EIF4E5 selvagem, quanto nas células que continham a expressão dos genes mutantes. Este fenótipo atípico observado em células promastigotas de *L. infantum* precisa ser melhor estudado. É sugestivo que seja realizada uma análise mais aprofundada por meio de microscopia eletrônica.

Na iniciação da tradução, ao ocorrer a interação do fator eIF4E com o eIF4G a partícula ribossomal é recrutada para a extremidade 5' dos mRNAs, facilitando o início da síntese proteica pelo *start* códon, AUG. A inibição da ligação do eIF4E ao eIF4G em estudos de biologia do câncer e neurobiologia sugerem que esta inibição pode ser alvo para o desenvolvimento de agentes anticancerígenos (Papadopoulos et al., 2014). Por isso, no trabalho apresentado, o triptofano na posição 53 que potencialmente exerceria a função na ligação do EIF4E5 a homólogos de eIF4G e

outros parceiros funcionais foi mutado, a fim de identificar o que ocorreria com suas interações proteicas. Entretanto, os ensaios de espectrometria de massas mostraram que mesmo mutando o W53 do EIF4E5 houve uma interação do EIF4E5 ao EIF4G1. Isso mostra que o triptofano de posição 53 não é essencial para a interação do EIF4E5 ao EIF4G1, e outros resíduos adicionais podem estar envolvidos nessa ligação.

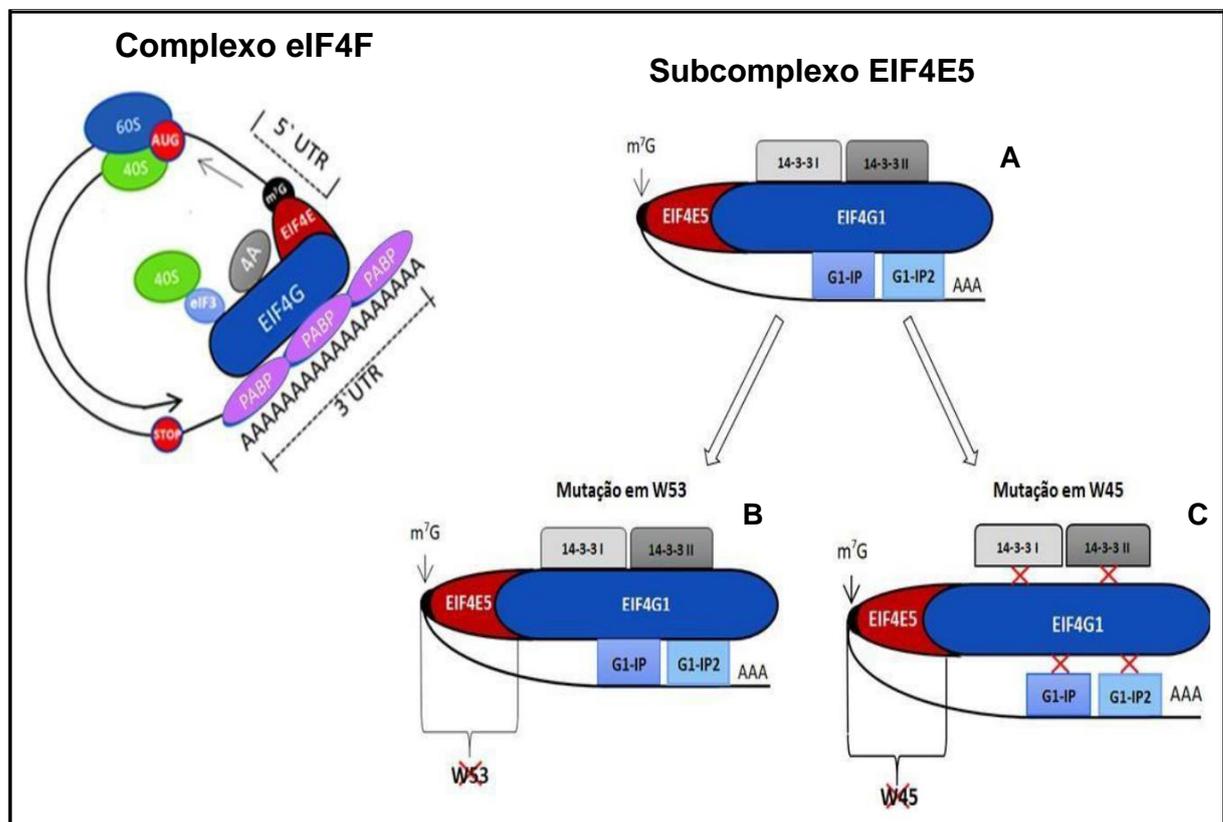
Foi visto em *T. brucei* que o EIF4E5 interage com dois dos cinco homólogos do eIF4G deste organismo, o EIF4G1 e o EIF4G2 (Freire et al., 2014), sendo que com o EIF4G2 a interação parece ser mais intensa. Análises de interação do EIF4E5 de *L. infantum* com parceiros funcionais mostraram que o EIF4E5 interage com um único homólogo de eIF4G, o EIF4G1, e também com proteínas parceiras, como as proteínas 14-3-3 e as G1-IP e G1-IP 2. A interação do EIF4E5 com essas proteínas foi vista em *T. brucei* foi sugerido a formação de complexos eIF4F distintos que parecem não ter funções primordiais na tradução (Freire et al., 2014).

Nos mamíferos a proteína 14-3-3 e seus homólogos são capazes de interagir com mais de 200 parceiros funcionais, e isso permite compreender o papel dessas proteínas em uma variedade de atividades nos processos celulares (van Hemert, 2002). A interação com proteínas 14-3-3 apresentam várias finalidades na interação com seus parceiros funcionais, que incluem proteínas quinases, fosfatases, proteínas de citoesqueleto, proteínas reguladoras do ciclo celular, proteínas G, proteínas transportadoras e outras. E isso faz com que essas proteínas estejam envolvidas em quase todos os processos biológicos, como a transdução de sinal, o controle do ciclo celular, a apoptose, o desenvolvimento e resposta ao estresse e outros (MacKintosh, 2004). As proteínas 14-3-3, identificadas no presente estudo e em *T. brucei* (Freire et al., 2017) foram identificadas em *L. infantum* interagindo com o fator EIF4E5, porém não foi vista a interação destas na presença da mutação do resíduo de triptofano na posição 45. Isso sugere que o W45 do *L*EIF4E5 possa desempenhar um papel importante nas suas interações proteicas e a importância de analisar a viabilidade celular de *L. infantum* nessa linhagem mutada requer experimentos específicos que sejam voltados para essa análise.

Ainda foi visto na análise dos dados da espectrometria de massas que o sítio mutado do triptofano na posição 45 impede a interação do EIF4E5 com a proteína denominada de G1-IP, uma proteína possivelmente envolvida na formação do *cap* ou sua modificação. É sabido que o *cap* metilado presente na extremidade 5' do

mRNA é fundamental para promover o empacotamento, exportação e início da tradução proteica (Aitken e Lorsh, 2012). O *cap* participa de funções extremamente importantes para o processamento do pré-mRNA e exportação nuclear (Ramanathan, Robb e Chan, 2016). A síntese e modificação do *cap* ocorrem no núcleo, então chama a atenção mais uma vez a associação da G1-IP com uma proteína citoplasmática como o EIF4E5 e o efeito da mutação do triptofano na posição 45, que impede esta interação, deve ser ressaltado. A Figura 25 resume o que se conhece até o momento sobre os complexos do EIF4E5 em *L. infantum*.

Figura 25 - Imagem representativa do subcomplexo do EIF4E5 e suas versões



**Fonte:** O autor (2018).

**Nota:** A imagem representa o complexo eIF4F à esquerda, mostrando suas subunidades principais, como também suas principais interações, como por exemplo: a interação do EIF4E ao EIF4G e do EIF4E ao *cap*. Na imagem A é visto um suposto complexo formado pela interação do EIF4E5 ao EIF4G1, e este interagindo com G1-IP e com G1-IP2. Ainda é vista a interação com as proteínas 14-3-3 I e 14-3-3 II. O subcomplexo do EIF4E5 apresenta versões diferentes ao se mutar resíduos de triptofanos conservados. Ao se mutar o W53 (B), não são observadas mudanças de interação ao se comparar com A. Em C a imagem mostra o complexo EIF4E5 contendo a mutação do W45, que por sua vez é observado a perda da interação do EIF4E5 ao G1-IP e G1-IP2, e ainda a perda da interação do EIF4E5 com as proteínas 14-3-3 I e 14-3-3 II.

Na presença do mutante W45 também não ocorreu a interação do EIF4E5 com a quinase 3 relacionada à Cdc2 (CRK3), embora essa interação tenha sido vista com a proteína selvagem e o mutante W53. Isso sugere que o W45 possa ser importante para alguma função do ciclo celular da *L. infantum*, pois as CDKs de tripanossomatídeos tem função importante no seu controle. Em um estudo realizado com *L. mexicana* para elucidar o papel de CRK3 no ciclo celular foi visto que a deleção de um gene envolvido com a expressão de CRK3 em células promastigotas resultou na parada de crescimento em G2/M do ciclo celular (Duncan et al., 2016). A deleção induzível de CRK3 em células promastigotas também atenua a infecção em hospedeiro murino, indicando que a CRK3 é um grande potencial para o desenvolvimento de um alvo molecular (Grant et al., 2004; Walker et al., 2011). Então é questionável saber se a mutação no aminoácido conservado de triptofano na posição 45 ao abolir a interação do EIF4E5 a CRK3, pode de alguma forma ser crítico para o funcionamento normal do ciclo celular de *L. infantum*. Estudos posteriores poderão utilizar as informações obtidas no presente trabalho para realizar por meio de programas de bioinformática a modelagem da proteína EIF4E5 de *L. infantum* e analisar a sua conformação estrutural ao abolir os sítios de triptofano nas posições 53 e 45.

Este estudo permitiu o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares que serviram para uma melhor compreensão do homólogo EIF4E5. Os resultados apresentados contribuíram de forma relevante para o entendimento das interações funcionais da proteína em estudo com outros componentes proteicos. Ainda foi possível identificar em *L. infantum* um subcomplexo proteico que parece está envolvido em processos biológicos importantes para a célula.

Os resultados obtidos definem propriedades do EIF4E5, com a identificação de sua localização subcelular, parceiros proteicos e outras propriedades, contribuindo assim para o progresso no estudo da iniciação da tradução e sua regulação nos tripanossomatídeos.

## 6 CONCLUSÕES

1. As construções plasmidiais dos genes que codificam o EIF4E5 tanto selvagem quanto mutantes são viáveis e os produtos clonados são expressos em *L. infantum*.
2. As células de *Leishmania infantum* quando superexpressam o fator LiEIF4E5 apresentam alterações na morfologia celular quando comparada com a *Leishmania infantum* selvagem
3. Os lisados das células expressando o L~~I~~EIF4E5 selvagem e suas versões mutantes e os ensaios de imunoprecipitação são eficazes para a avaliação da interação entre as proteínas estudadas com parceiros funcionais.
4. Foi identificado um complexo proteico de interação ao L~~I~~EIF4E5 denominado EIF4G1-G1-IP-G1-IP2, no qual pertencem proteínas que são envolvidas em processos biológicos cruciais para a vida da célula.
5. A mutação do resíduo de triptofano na posição 45 resulta em perda da interação do L~~I~~EIF4E5 com subunidades proteicas importantes para a síntese proteica e funcionamento celular.

## REFERÊNCIAS

- AITKEN, C.E.; LORSCH, J.R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nat Struct Mol Biol**, v. 19, p. 568–576, jun, 2012.
- ANDREOU, A. Z.; KLOSTERMEIER, D. The DEAD-box helicase eIF4A Paradigm or the odd one out? **RNA Biology**, v. 10, n. 1, p. 19–32, jan, 2013.
- ANDAYA, A. et al. Phosphorylation stoichiometries of human Eukaryotic initiation factors. **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 7, p. 11523–11538, jun, 2014.
- ACKER, M.G.; LORSCH, J.R. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. **Biochem. Soc. Trans**, v. 36, n. 4 p. 653-657, aug, 2008.
- ADL, S.M. et al. The revised classification of eukaryotes. **J Eukaryot Microbiol**, v. 59, n. 5, p. 429–93, sep, 2012.
- ALVAR, J. et al. WHO leishmaniasis control team. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, n. 5, 7:e35671, may, 2012.
- AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution and Dispersion of Leishmania **PLoS Negl. Trop. Dis**, v. 10, n. 3, p. 1–40, mar, 2016.
- ALSFORD, S. et al. High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. **Genome Res**, v. 21, n. 6, p. 915–924, jun, 2011.
- BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniasis: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. **Advances in parasitology**, v. 64, p. 1-109, 455-458, may, 2007.
- BLANCO, V.R.; NASCIMENTO-JÚNIOR, N. M. Leishmaniose: Aspectos Gerais Relacionados com a Doença, o Ciclo do Parasita, Fármacos Disponíveis, Novos Protótipos e Vacinas. **Rev. Virtual Quim**, v. 9, n. 3, p. 861-876, abr, 2017.  
Disponível em: <http://rvq.s bq.org.br/imagebank/pdf/v9n3a04.pdf>. Acessado em Maio de 2017.
- BEST, M.P. et al. diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. **Vet Parasitol**, v. 202, n. 3-4, p. 292-295, may, 2014.
- Besteiro, S. et al. Protein turnover and differentiation in Leishmania. **Int J Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1063–1075, aug, 2007.
- BENZINGER, A. et al. Targeted proteomic analysis of 14-3-3 $\sigma$ , a p53 effector commonly silenced in cancer. **Mol Cell Proteomics**, v. 4, p. 785-795, jun, 2005.
- BURRI, C.; BRUN, R. Human African trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 148-159, jan, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar**. Brasília: Editora MS, p. 191, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Editora MS, p.122, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Editora MS, p. 122, 2006.

BRITTINGHAM A. et al. Regulation of GP63 mRNA stability in promastigotes of virulent and attenuated *Leishmania chagasi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 112, n. 1, p. 51-9, 15 jan, 2001.

CLAYTON, C.E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J**, v. 21, n. 8, p. 1881-2053, 15, apr, 2002.

CLAYTON, C.E.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**, v. 156, n. 2, p. 93–101, dec, 2007.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N.R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes Infect**, v. 5, n. 13, p.1231–1240, nov, 2003.

CARROLL M, E.; BORDEN, K.L. The oncogene eIF4E: using biochemical insights to target cancer. **J Interferon Cytokine Res**, v. 33, n. 5, p. 227–238, may, 2013.

CUPOLILLO, E. et al. A Revised Classification for *Leishmania* and *Endotrypanum*. **Trends in Parasitology**, v. 16, n. 4, p. 142-144, apr, 2000.

CNUDDE, F. et al. Diffuse cutaneous leishmaniasis with visceral dissemination in an AIDS patient in Guadeloupe, West Indies. v. 8, n. 4, p. 559-60, apr, 1994.

DANIELS, J.; GULL, K.; WICKSTEAD, B. Cell Biology of the Trypanosome Genome. **Microbiol Mol Biol Rev**, v. 74, n. 4, p. 552–569, dec, 2010.

DA SILVA, M.S.; CANO, M.I.N. **Molecular and Cellular Biology of Pathogenic Trypanosomatids**. Trypanosomatid Genome Organization and Ploidy. 1<sup>a</sup> ed. Sharjah UAE:Publishing company: Bentham books p. 61-103, 2017.

DA-CRUZ AM, PIRMEZ C. **Leishmaniose tegumentar americana**. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. Rio de Janeiro: Editora: G Koogan p. 697-712, 2005.

DHALIA, R. et al. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. **Mol Biochem Parasitol**. v. 140, n. 1, p. 23–41, mar, 2005.

DHALIA, R. et al. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic Acids Res**. v. 34, n. 9, p. 2495–507, may, 2006.

DERBISE, A. et al. A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. **FEMS Immunol Med Microbiol.** v. 38, n.2, p. 113–116, sep. 2003.

DE GAUDENZI, J.G.; D'ORSO, I.; FRASCH, A.C.C. RNA recognition motif type RNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* form a family involved in the interaction with specific transcripts in vivo. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 278, n. 21, p. 18884-94, mar, 2003.

DOUGALL, A. et al. New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. **Epidemiol Infect.** v. 137, n. 10, p. 1516–1520, mar, 2009.

DUNCAN, S.M.,; MYBURGH, E.; PHILIPON, C. et al. Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. **Molecular Microbiology.** v. 100, n. 6, p. 931-944, jun, 2016.

EL-SAYED, N. M. et al. Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. **Science.** v. 309, p. 404-409, 2005.

ERBEN, E.D. et al. A genome-wide tethering screen reveals novel potential post-transcriptional regulators in *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathog.** n.10, v. 6, p. e1004178, jun, 2014.

FERRAIUOLO, M.A. et al. “A nuclear translation-like factor eIF4AIII is recruited to the mRNA during splicing and functions in nonsense-mediated decay,” **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.** v. 101, n. 12, p. 4118–4123, mar, 2004.

FREIRE, E. et al. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Mol Biochem. Parasitol.** v. 176, n. 1, p. 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.** v. 13, n. 7, p. 896–908. jul, 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.** v. 20, n. 8, p. 1272-1286, aug, 2014b.

FREIRE, E.R. et al. The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. **Pathogens,** v. 6, n. 4, p. 55, oct, 2017.

FURUICHI, Y. Discovery of m(7)G-cap in eukaryotic mRNAs. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci** v. 91, n. 8, p. 394-409 jun, 2015.

Fundação Oswaldo Cruz (2015). Disponível em <<https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>>. Acessado em Junho de 2017.

GRANT, K.M. et al. Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 cyclin-dependent kinase: chemical library screen and antileishmanial activity. **Antimicrob Agents Chemother** v. 48, n. 8, p. 3033–3042, aug, 2004.

GEBAUER, F.; HENTZE, M.W. Molecular mechanisms of translational control. **Nat. Rev.Mol.Cell Biol.** v. 5, n. 10 p. 827-835, oct, 2004.

GOODFELLOW, I.G.; ROBERTS, L.O. Molecules in Focus Eukaryotic initiation factor 4E. **Int J Biochem Cell Biol.** v. 40, n. 12, p. 2675–2680, mar, 2011.

GHOSH, A.; LIMA, C.D. Enzymology of RNA cap synthesis. Wiley Interdiscip. **Rev. RNA**, v. 1, n. 1, p. 152–172, jul, 2010.

GINGRAS, A.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu. Rev. Biochem.** v. 68, p. 913-963, jul, 1999.

GROSS, J.D. et al. Ribosome loading onto the mRNA cap is driven by conformational coupling between eIF4G and eIF4E. **Cell**, Cambridge, v. 115, p. 739-750, dec, 2003.

GRÜNER, et al. The Structures of eIF4E-eIF4G Complexes Reveal an Extended Interface to Regulate Translation Initiation. **Molecular Cell**, v. 64, n. 3, p. 467-479, nov. 2016.

HASSELL, K.M.; LEBLANC, Y.; MCLUCKEY, A.S. “Chemical Noise Reduction via Mass Spectrometry and Ion/Ion Charge Inversion: Amino Acids”. **Analytical Chemistry**, v. 83, n. 9, p. 3252–3255, may, 2011.

HARHAY, M.O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol**, v. 27, n. 9, p. 403-409, sep. 2011.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. “Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa,” **Curr Opin Microbiology**, vol. 10, n. 6, p. 569–577, dec, 2007.

HALDAR, A.K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: Current status and future directions. **Mol Biol Int.** mar, 2011.

HAGHIGHAT, A.; MADER, S.; PAUSE, A.; SONENBERG, N. Repression of cap-dependent translation by 4E-binding protein 1: competition with p220 for binding to eukaryotic initiation factor-4E. **EMBO J.** v. 14, n. 22, p. 5701–5709, nov, 1995.

HINNEBUSCH, A.G. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. **Annu Rev Biochem.** v. 83, p. 779-812, jan, 2014.

HO, D. J.J. and Lee, S. Cap for Every Occasion: Alternative eIF4F Complexes. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 41, n. 10, p. 821 – 823, oct. 2016.

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

JACKSON, R.; HELLEN, C.; PESTOVA, T. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** v. 11, n. 2, p. 113-127, feb. 2010.

JACKSON, A.P. et al. Kinetoplastid Phylogenomics Reveals the Evolutionary Innovations Associated with the Origins of Parasitism. **Curr Biol.** v. 26, n. 2, p. 161–172, jan. 2016.

KAUFER, A. et al. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites & Vectors.** v. 10, n. 1, jun. 2017.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M.A.; KEELING, J.H. New World and Old World *Leishmania* Infections a Practical Review. **Dermatologic Clinics.** v. 33, n. 3, p. 579-93, jul. 2015.

KISSINGER, J.C. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. **Trends Parasitol.** v. 22, n. 6, p. 238–240, jun. 2006.

KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends in Parasitol.** v.27, n. 1, p. 23-30, jan. 2011.

LEARY, E.O. et al. Article Dynamic Recognition of the mRNA Cap by *Saccharomyces cerevisiae* eIF4E. **Structure.** v. 21, n. 12, p. 2197–2207, dec. 2013.

LIMA, G.B. **Avaliação da importância para a viabilidade celular de três homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E de *Leishmania* sp.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

LUKES, J. et al. MINIREVIEW Kinetoplast DNA Network : Evolution of an Improbable **Eukaryot Cell.** v. 1, n. 4, p. 495-502, aug, 2002.

LUEONG, S. et al. Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. **Mol. Microbiol.** v. 100, n. 3, p. 457–471, marc. 2016.

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

MACKINTOSH, C. Dynamic interactions between 14-3-3 proteins and phosphoproteins regulate diverse cellular processes. **Biochemical Journal.** v. 381, p. 329–342, jul. 2004.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. **Med Vet Entomol.** v. 27, n. 2, p. 123–47. jun. 2013.

MARINTCHEV, A.; WAGNER, G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. **Q. Rev. Biophys.** v. 37, n. 3-4, p. 197-284, nov. 2004.

MARINTCHEV, A.; WAGNER, G. "eIF4G and CBP80 share a common origin and similar domain organization: implications for the structure and function of eIF4G," **Biochemistry**, v. 44, n. 37, p. 12265–12272, aug. 2005.

MARINTCHEV, A. et al. Complex in Translation Initiation. **Cell.** v. 136, p. 447–460. 2009.

MADER, S. et al. "The translation initiation factor eIF-4E binds to a common motif shared by the translation factor eIF-4 $\gamma$  and the translational repressors 4E-binding proteins," **Molecular and Cellular Biology**, v. 15, n. 9, p. 4990–4997, 1995.

MARCOTRIGIANO, J. et al. "A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery," **Molecular Cell**, v. 7, n. 1, p. 193–203, 2001.

McCONVILLE MJ. et al. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends Parasitol**, v. 23, n. 8, p. 368–375, aug, 2007.

MIN, K. et al. eIF4E phosphorylation by MST1 reduces translation of a subset of mRNAs, but increases lncRNA translation. **Biochim Biophys Acta.** v. 1860, n. 7, p. 761-772, may, 2017.

MONZINGO, A.F. et al. The structure of eukaryotic translation initiation factor-4E from wheat reveals a novel disulfide bond. **Plant Physiol** 143 p.1504–1518, 2007.

MOURA, D.M. et al. Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA Biology**, v. 12, n. 3, p. 305-319, 2015.

MUSKUS, C.E.; MARÍN VILLA, M. Metacyclogenesis: a basic process in the biology of *Leishmania*. **Biomedica.** v. 22, n. 2, p.167-77, jun. 2002.

NASCIMENTO, M.B. **Mapeamento de motivos antigênicos e caracterização de novas proteínas de *Leishmania infantum* com potencial para uso no diagnóstico contra a Leishmaniose Visceral.** 2014. Tese (Doutorado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

NASCIMENTO, J.F. **Caracterização de dois homólogos da proteína de ligação ao cap, EIF4E5 E 6, de *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major*.** Dissertação (Mestrado em Genética) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2012.

NIEDZWIECKA, A. et al. Biophysical studies of eIF4E cap-binding protein: recognition of mRNA 5' cap structure and synthetic fragments of eIF4G and 4E-BP1 proteins. **J Mol Biol.** Baltimore, v. 319, n. 3, p. 615-635, 2002.

NANDAN, D. et al. Comprehensive Identification of mRNA- Binding Proteins of *Leishmania donovani* by Interactome Capture. **Plos One.** jan. 2017.

Organização Pan-Americana da Saúde. Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas: Washington: Organização Pan-Americana da Saúde; 2017  
Disponível em: <[http://www.paho.org/hq/index.php?option=com\\_topics&view=article&id=29&Itemid=40754](http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=29&Itemid=40754)> Acessado em Maio de 2017.

OBSILOVA, V. et al. (2014) Mechanisms of the 14-3-3 protein function: Regulation of protein function through conformational modulation. **Physiol.** 63 (Suppl. 1), S155–S164.

PAPADOPOULOS, E. et al. Structure of the eukaryotic translation initiation factor eIF4E in complex with 4EGI-1 reveals an allosteric mechanism for dissociating eIF4G. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 111, n. 31, p. 187-95, jul. 2014.

PAYS, E.; LUC, V.; MORGA, D.P. Antigenic variation in *Trypanosoma brucei* : facts, challenges and mysteries. **Curr Opin Microbiol.** v. 7, n. 4, p. 369–374, aug. 2004.

PATINO, L.H.; RAMÍREZ, J.D. RNA-seq in kinetoplastids: A powerful tool for the understanding of the biology and host-pathogen interactions. **Infect Genet Evol.** v. 49, p. 273-282, feb. 2017.

PESTOVA, T.V.; HELLEN, C.U. Coupled folding during translation initiation. **Cell.** v. 115, n. 6, p. 650- 652, dec, 2003.

PESTOVA, T.V. et al. Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. **PNAS. Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 19, n. 13, p. 7029-7036, jun. 2007.

PARK ,H-S, et al. Eucaryotic initiation factor 4B controls eIF3-mediated ribosomal entry of viral reinitiation factor. **EMBO J.** v. 23, n. 6, p. 1381–1391, mar. 2004.

PEACOCK, C.S. et al. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nat. Genet.** v. 39, p. 839-847, jul. 2007.

RAMANATHAN, A.; ROBB, G.B.; CHAN, S.H. mRNA capping: Biological functions and applications. **Nucleic Acids Res.** v. 44, n. 16, p. :7511–7526, sep. 2016.

ROSE, K. et al. Cutaneous leishmaniasis in red kangaroos : isolation and characterisation of the causative organisms. **International Journal for Parasitology.** v. 34, n. 2004, p. 655–664.

RHOADS, R.E. eIF4E: New family members, new binding partners, new roles. **J Biol Chem;** v. 284, n. 25, p. 16711-5. jun. 2009.

RUDENKO, G. Epigenetics and transcriptional control in African trypanosomes. **Essays Biochem.** v. 48, p. 201–219, 2010.

RUBIO, M.P.; GERAGHTY, K.M.; WONG, B.H. et al. 14-3-3-affinity purification of over 200 human phosphoproteins reveals new links to regulation of cellular metabolism, proliferation, and trafficking. **Biochem J.** v. 379, p. 395– 408, 2004.

SAHA, S. et al. Immune responses in kala-azar. **Indian J Med Res.** v. 123, p. 245-266, 2006.

SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. Molecular cloning: a laboratory manual. Third Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2100, 2001.

SHARMA, D.K. et al. Role of eukaryotic initiation factors during cellular stress and cancer progression. **J Nucleic Acids.** 2016.

SIMPSON, A.G.B.; STEVENS, J.R.; LUKES, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends Parasitol.** v. 22, n. 4, p. 168-74 apr. 2006.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A.G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell.** v. 136, n. 4, p. 731-745. 2009.

SMITH, R.W.P. et al. Viral and cellular mRNA-specific activators harness PABP and eIF4G to promote translation initiation downstream of cap binding. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 114, n. 24, p. 6310-6315, jun. 2017.

STEVENS, J.R. et al. The molecular evolution of Trypanosomatidae. **Adv Parasitol.** v. 48, p.1–56, 2001.

STUART, K. et al. Review series Kinetoplastids : related protozoan pathogens, diferente diseases. **J Clin Invest.** v. 118, p. 1301–1310, apr. 2008.

TEIXEIRA, M.M.G. et al. Phylogenetic validation of the genera Angomonas and Strigomonas of Trypanosomatids harboring bacterial endosymbionts with the description of new species of Trypanosomatids and of Proteobacterial symbionts. **Protist,** v. 162, n. 3, p. 503-24, 2001.

TOMOO, K. et al. Crystal structures of 7-methylguanosine 5' -triphosphate (m(7)GTP)- and P(1)-7-methylguanosine-P (3)-adenosine-5',5' -triphosphate (m(7)GpppA)- bound human full length eukaryotic initiation factor 4E: biological importance of the C terminal flexible region. **Biochem. J.** v. 262, p. 539– 544, 2002.

VAN HEMERT, M.J.; STEENSMA, H.Y.; VAN HEUSDEN, G.P.H. 14-3-3 proteins: Key regulators of cell division, signalling and apoptosis. **Bioessays** v. 23, p. 936 – 946, 2001.

VAN HEUSDEN, G.P. 14-3-3 Proteínas: Reguladores de numerosas proteínas eucarióticas. **International Union Biochem Mol Biol Life.** v. 57, p. 623-9, 2005.

VANHAMME, L.; PAYS, E. (1995) Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiology Reviews,** v.59, p.223-240.

VALÁSEK, L.S. Ribozoominí Translational initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). **Curr. Protein Pept. Sci., Hilversum,** v. 13, n. 4, p. 305-330, 2012.

VOLPON, L. et al. Cap-free structure of eIF4E suggests a basis for conformational regulation by its ligands. **EMBO J.** v. 25, p. 5138–49, 2006.

VOLPON, L. et al. A biochemical framework for eIF4E-dependent mRNA export and nuclear recycling of the export machinery. **RNA.** v. 23, n.6, p. 927–937, 2017.

VON DER HAAR, T.; BALL, P.D.; MCCARTHY, J.E.G. Stabilization of Eukaryotic Initiation Factor 4E Binding to the mRNA 5'-Cap by Domains of eIF4G. v. 275, p. 30551–30555, 2000.

VON DER HAAR, T. et al. (2004). The mRNA cap-binding protein eIF4E in post-transcriptional gene expression. **Nat Struct Mol Biol.** v. 11, p. 503-11, 2004.

WALKER, R.G. et al (2011) High throughput screens yield small molecule inhibitors of Leishmania CRK3:CYC6 cyclin-dependent kinase. **PLoS Negl Trop Dis** 5: e1033.

WHEELER, R.J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The Limits on Trypanosomatid Morphological Diversity. **PLOS ONE.** v. 8, n. 11, nov. 2013.

YAO, C.; DONELSON, J.E.; WILSON, M.E. The major surface protease (MSP or GP63) of Leishmania sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 132, n. 1, p. 1-16, 2003.

YOFFE, Y. et al. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from Leishmania. **RNA.** v. 10, p. 1764–1775, 2004.

YOFFE, Y. et al. Binding Specificities and Potential Roles of Isoforms of Eukaryotic Initiation Factor 4E in Leishmania. v. 5, n. 12, p. 1969–1979, dec. 2006.

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Evolutionary Conservation and Diversification of the Translation Initiation Apparatus in Trypanosomatids. **International Journal of Genomics.** v. 2012, mar. 2012.