



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA PEREIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE HELICASES DO TIPO *DEAD-BOX* DE
Leishmania infantum COM COMPLEXOS DO TIPO eIF4F DE INICIAÇÃO DA
TRADUÇÃO**

Recife
2025

MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA PEREIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE HELICASES DO TIPO *DEAD-BOX* DE
Leishmania infantum COM COMPLEXOS DO TIPO eIF4F DE INICIAÇÃO DA
TRADUÇÃO**

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

Orientador: Osvaldo Pompilio de Melo Neto

Coorientadora: Adriana Neuman Albuquerque Lins Moura de Brito

Recife

2025

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Rocha, Maria Eduarda de Oliveira Pereira.

Caracterização da interação de Helicases do Tipo Dead Box de *Leishmania infantum* com Complexos do Tipo eIF4F de Iniciação da Tradução / Maria Eduarda de Oliveira Pereira Rocha. - Recife, 2025.

91f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2025.

Orientação: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

Coorientação: Adriana Neuman Albuquerque Lins Moura de Brito.
Inclui Referências.

1. Tripanosomatídeos; 2. RNA Helicase; 3. Complexo EIF4F; 4. Regulação Gênica; 5. Imunoprecipitação; 6. Espectrometria de Massas. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. II. Brito, Adriana Neuman Albuquerque Lins Moura de. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

MARIA EDUARDA DE OLIVEIRA PEREIRA ROCHA

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE HELICASES DO TIPO DEAD-BOX DE
Leishmania infantum COM DOIS COMPLEXOS DO TIPO EIF4F DE INICIAÇÃO
DA TRADUÇÃO**

Área de Concentração: Biologia Molecular e Bioinformática

Aprovado em 27/11/2025

Banca Examinadora:

**Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz - PE**

**Dr^a. Jaqueline de Azevedo Silva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE**

**Dr^a. Anna Jessica Duarte Silva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE**

**Dr. Igor Vasconcelos Rocha
Instituto Aggeu Magalhães/ Fiocruz - PE**

Recife

2025

Dedico este trabalho a minha família, em especial aos meus avós, José Pereira e Maria do Rosário, por acreditarem em minhas escolhas, e por serem o meu alicerce durante toda minha jornada.

Agradecimentos

Agradeço a Deus, por guiar sempre meus passos nos momentos de conquistas e dificuldade enfrentados neste percurso. A caminhada não foi fácil, porém quando me senti só (inúmeras vezes) foram os momentos que mais senti a presença Dele junto a mim. E foi nessas horas que obtive forças para seguir em frente.

A meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto e a minha co-orientadora Adriana Neuman Albuquerque Lins Moura de Brito, agradeço pela oportunidade de realizar esse projeto, como também pela confiança depositada em mim e por todos os ensinamentos repassados ao decorrer deste trabalho. Como também a Moezio Vasconcellos, por ter intermediado e me incentivado a concretizar mais esta etapa da minha trajetória acadêmica.

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ-PE), incluindo pesquisadores, colaboradores, técnicos de laboratório e a todo o grupo do laboratório de Microbiologia, em especial ao grupo BioMolTryp, por todo apoio e experimentos realizados. Em especial a Pamella, Guilherme, Hemilly, Renata, Stéphanny, Ludmila, Álvaro, Yallen, Angela e Matheus (da Bahia) por me aconselhar, auxiliar, incentivar e instruir em diversos experimentos no laboratório como apoio e ajuda na escrita.

A minha família de modo geral, que diretamente e indiretamente, de alguma forma contribuíram para que chegasse a essa fase final. Em especial, aos meus pais, Carlos Fernando e Claudia Cristina. Aos meus avós, José Pereira e Maria do Rosário, que abdicaram de momentos de suas vidas para proporcionar tudo do bom e do melhor para mim.

Ao meu irmão Matheus e sua esposa Kyvia, que se fizeram presentes com palavras de apoio e carinho, como também dando suporte para o que precisasse, e por me presentearem com os amores da minha vida: Malu e Heitor. A minha tia Carla Cristina, por sempre me apoiar, incentivar e aconselhar nos momentos que mais precisei, e mesmo distante está de braços abertos para me acolher.

A minha avó Zefinha, tia Ana e Isabella que nessa reta final seguraram minha mão para que mantivesse força para conclusão dessa etapa. As minhas irmãs de coração: Bruna, Manu, Larissa, Layanne, Mary e Maria do Carmo. Mesmo distante, sempre estiveram me incentivando e apoiando.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, coordenadoras e funcionários. Em especial, à professora Dra. Ana Christina Brasileiro Vidal, pela humanização, acolhimento e apoio, por quem tenho imenso respeito e admiração, tanto pela profissional quanto pela pessoa que é.

Ao órgão de fomento Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Descobrir consiste em ver o que todos viram e pensar o que ninguém pensou.”
Albert Szent

Resumo

Os protozoários dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, da família *Trypanosomatidae*, são responsáveis por doenças negligenciadas de grande impacto global. Esses parasitas também apresentam peculiaridades em seus mecanismos moleculares que os diferenciam de outros eucariotos, especialmente no controle da expressão gênica. Neles, a regulação da expressão gênica ocorre majoritariamente em nível pós-transcricional, especialmente na fase de iniciação da tradução, que envolve complexos do tipo eIF4F. Entre eles, destacam-se os complexos formados por EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4. Já se sabe que o primeiro também está associado à RNA helicase EIF4A1, enquanto esta e outras helicases, como a DED1-1/HEL67, podem estar associadas ao complexo EIF4E3/EIF4G4. Este estudo teve como objetivo investigar a associação das helicases EIF4A1 e DED1-1/HEL67 com o complexo EIF4E3/EIF4G4 em *Leishmania infantum*, além de identificar novos parceiros funcionais que contribuam para o entendimento do modo de ação destas proteínas. Genes codificando estas helicases foram amplificados por PCR e clonados no vetor pSP-BT1-YneodIR para transfecção em *Leishmania*. Em seguida, as proteínas foram superexpressas em *L. infantum* como fusões ao epítipo HA, permitindo a realização de imunoprecipitação (IP) seguida de espectrometria de massas para identificação de parceiros proteicos. Os resultados indicam que as RNA helicases analisadas são expressas durante a fase exponencial de crescimento de *L. infantum* e localizam-se predominantemente na fração citoplasmática solúvel. A análise dos polipeptídeos coprecipitados revelou a presença de diferentes fatores de iniciação da tradução e outras proteínas associadas diferencialmente com as helicases investigadas. O EIF4A1 apresentou um perfil enriquecido em proteínas ribossomais, de choque térmico, chaperonas e chaperoninas, mas não mostrou uma clara associação com outros fatores de tradução, além do EIF4G4. Por sua vez, a DED1-1/HEL67 coprecipitou com inúmeras proteínas ligadas ou não a tradução, incluindo o próprio EIF4A1, indicando uma possível cooperação entre as duas helicases. Também coprecipitou com o EIF4G4 e com outro homólogo de eIF4G, o EIF4G1, sugerindo uma associação com múltiplos complexos do tipo eIF4F, mas não com o EIF4E4/EIF4G3. Esses achados reforçam a existência de funções complementares e especializadas dessas helicases na regulação da tradução e no metabolismo de RNAs, contribuindo para o entendimento da regulação traducional em *L. infantum* e oferecendo novas perspectivas para a compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos.

Palavras-chave: Tripanosomatídeos; RNA helicase; complexo EIF4F; regulação gênica; imunoprecipitação; espectrometria de massas.

Abstract

Protozoa of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma*, from the family Trypanosomatidae, are responsible for neglected diseases of major global impact. These parasites also exhibit peculiarities in their molecular mechanisms that differentiate them from other eukaryotes, especially in relation to the control of gene expression. Regulation of their gene expression occurs mainly at the post-transcriptional level, especially in the initiation phase of translation, which involves multiple eIF4F-like complexes, such as those formed by the EIF4E4/EIF4G3 and EIF4E3/EIF4G4 subunits. It is already known that the first of these complexes is also associated with the RNA helicase EIF4AI, while this and other helicases, such as DED1-1/HEL67, may be associated with the EIF4E3/EIF4G4 complex. This study aimed to investigate the association of the EIF4AI and DED1-1/HEL67 helicases with the EIF4E3/EIF4G4 complex in *Leishmania infantum*, as well as to identify new functional partners that contribute to understanding the mode of action of these proteins. Genes encoding these helicases were amplified by PCR and cloned into the pSP-BT1-YneoαIR vector for transfection into *Leishmania*. Subsequently, the proteins were overexpressed in *L. infantum* as fusions to the HA epitope, allowing immunoprecipitation (IP) followed by mass spectrometry for the identification of protein partners. The results indicate that the two RNA helicases are expressed during the exponential growth phase of *L. infantum* and are predominantly localized in the soluble cytoplasmic fraction. Analysis of the coprecipitated polypeptides revealed the presence of different translation initiation factors and other proteins differentially associated with the investigated helicases. EIF4AI showed a profile enriched in ribosomal proteins, heat shock proteins, chaperones, and chaperonins, but did not show a clear association with other translation factors besides EIF4G4. DED1-1/HEL67 co-precipitated with numerous translation-linked and non-translation-related proteins, including EIF4AI, indicating a possible cooperation between the two helicases. It also co-precipitated with EIF4G4 and another eIF4G homolog, EIF4G1, suggesting an association with multiple eIF4F-type complexes, but not with EIF4E4/EIF4G3. These findings reinforce the existence of complementary and specialized functions of these helicases in the regulation of translation and RNA metabolism, contributing to the understanding of translational regulation in *L. infantum* and offering new perspectives for the comprehension of the underlying molecular mechanisms.

Key words: Trypanosomatids; RNA helicase; EIF4F complex; gene regulation; immunoprecipitation; mass spectrometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais morfotipos dos tripanosomatídeos.	4
Figura 2: Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> spp.	9
Figura 3: Esquema de maturação do mRNA por trans-splicing e poliadenilação.	11
Figura 4: Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos.	14
Figura 5: eIF4F mediando recrutamento do mRNA.	15
Figura 6: Esquema representativo dos domínios e motivos conservados de uma RNA helicase.	20
Figura 7: Complexos eIF4F formado pelas subunidades EIF4E4 e EIF4E... ..	25
Figura 8: Etapas dos procedimentos metodológicos.	32
Figura 9: Esquema do plasmídeo pSP-BT1-YneoαIR. O plasmídeo pSP-BT1-YneoαIR provém de alterações do pSP72.	37
Figura 10: Amplificação dos genes das RNA helicases de <i>Leishmania infantum</i>	45
Figura 11: Digestão em pequena escala das clonagens dos genes EIF4AI e DED1-1/HEL67, com as enzimas BamHI e HindIII.	46
Figura 12: Genes EIF4AI e DED1-1/HEL67 inseridos no vetor pSP-BT1-YNeo-alfa-HA – confirmação de subclonagem.	48
Figura 13: Teste de expressão das linhagens EIF4AI-HA e DED1-1/HEL67-HA.	49
Figura 14: Avaliação do perfil de expressão e curva de crescimento das linhagens expressando as proteínas EIF4AI-HA e DED1-1/HEL67-HA.	50
Figura 15: Ensaio de Western blot das frações sedimentares e citoplasmáticas das linhagens LiEIF4AI e LiHEL67, todas marcadas com HA.	52
Figura 16: Ensaio de Western blot dos lisados e imunoprecipitações das linhagens LiEIF4AI e LiHEL67 todas marcadas com HA.	53
Figura 17: Gráfico de dispersão da espectrometria de massas da LiEIF4AI-HA.	55
Figura 18: Gráfico de dispersão da espectrometria de massas da DED1-1/HEL67-HA.	56

Figura 19: Localização subcelular de proteínas que coprecipitam com a EIF4AI e DED1-1/HEL67.	59
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes.

..... 34

Tabela 2: Fatores de tradução detectados na espectrometria de massas das proteínas EIF4AI e DED1-1/HEL67, marcadas com HA.57

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
DEAD	Ácido Aspártico (D) Ácido Glutâmico (E), Alanina (A), Ácido aspártico (D)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DTT	Dithiotreitol
RNA	Ácido ribonucléico
ATP	Adenosina trifosfato
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil Sulfato de Sódio
Cap	Estrutura presente na extremidade 5' do mRNA
CT	Complexo ternário
EJC	Complexo de junção exônica
eIF	Fator de Iniciação Eucariótico
FDR	False Discovery Rate
IgG	Imunoglobulina G
IP	Imunoprecipitação
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LFQ	Label-Free Quantification
<i>Li</i>	<i>Leishmania infantum</i>
µL	Microlitro
mL	Mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
OMS	Organização Mundial da Saúde
pb	Pares de base
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> - Polifluoreto de vinilideno
PABP	Proteína de ligação ao Poli-A
PCR	Reação em cadeia da polimerase
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
UTR	Região não traduzida

MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
mRNA	RNA Mensageiro
tRNA	RNA Transportador
xg	Força da gravidade
WT	Linhagem do tipo selvagem

SUMÁRIO

1. Introdução.....	1
1.1 Pergunta condutora.....	3
1.2 Hipótese	3
2 Revisão de Literatura.....	4
2.1 Tripanosomatídeos	4
2.1.1 Gênero <i>Leishmania</i>	5
2.1.2 Ciclo biológico e doença	7
2.2. Particularidades da biologia molecular dos tripanosomatídeos	10
2.2.1 Expressão gênica dos tripanosomatídeos	10
2.3 Iniciação da tradução em eucariotos e o complexo eIF4F	12
2.3.1 Complexo eIF4F de iniciação da tradução	14
2.3.2 Subunidade eIF4G do complexo eIF4F	15
2.3.3 Subunidade eIF4E do complexo eIF4F	16
2.3.4 Subunidade eIF4A do complexo eIF4F	17
2.4. Estrutura e função de RNA helicases	18
2.4.1. Papel das RNA helicases no processamento do mRNA em eucariotos ..	21
2.4.2. RNA helicases e sua ação na iniciação da tradução em eucariotos	21
2.5 Complexos do tipo eIF4F na tradução em tripanosomatídeos	24
2.5.1 Homólogos de eIF4G em tripanosomatídeos	25
2.5.2 Homólogos de eIF4E em tripanosomatídeos.....	26
2.5.3 Homólogos de eIF4A em tripanosomatídeos.....	27
2.6 Outras RNA helicases atuantes na iniciação da tradução em tripanosomatídeos	28
2.6.1 DED1-1 (HEL67) e DED1-2	28
3. Objetivos	31
3.1. Objetivo geral	31
3.2. Objetivos específicos.....	31
4. Material e Métodos.....	32
4.1 Extração do DNA genômico de <i>L. infantum</i>	33
4.2 Desenho de primers	33
4.3 PCR - Reação em cadeia da polimerase	34
4.4 Purificação de DNA	35
4.5 Clonagem em pGEM®-T Easy	35
4.6 Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial	35

4.7 Sequenciamento de DNA	36
4.8 Subclonagem dos genes em vetor de expressão de <i>Leishmania infantum</i>	37
4.9 Cultivo e transfecção de células de <i>Leishmania infantum</i>	38
4.10 Obtenção do extrato total.....	39
4.11 Curva de crescimento celular	40
4.12 Western-blot (WB)	40
4.13 Preparação de lisados celulares	41
4.14 Ensaios de imunoprecipitação e análise por espectrometria de massas	42
5. Resultados.....	45
5.1 Amplificação dos genes	45
5.2 Clonagem em vetor pGEM T-Easy	46
5.3 Subclonagem.....	47
5.4 Análise da superexpressão das proteínas fusionadas a HA em <i>L. infantum</i> ...	48
5.5 Curvas de crescimento das linhagens de <i>Leishmania infantum</i> expressando as proteínas fusionadas ao epítipo HA.....	50
5.6 Avaliação da presença das proteínas investigadas em frações citoplasmáticas solúveis	51
5.7 Análise da expressão e detecção de proteínas fusionadas ao epítipo HA.....	52
5.8 Identificação de proteínas parceiras das helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67 .	53
5.9 Coprecipitação de fatores de tradução com RNA helicases-alvo.....	56
5.10 Mapeamento subcelular de polipeptídeos interagindo com RNA helicases-alvo	58
6. Discussão	61
7. Conclusão.....	65
8. Referências.....	66

1. Introdução

A família *Trypanosomatidae*, ordem *Trypanosomatida*, é formada por um grupo de protozoários flagelados, da classe *Kinetoplastea*, onde se destacam os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, responsáveis por doenças graves de impacto mundial, como as diversas formas de Leishmanioses (*Leishmania sp.*), a Doença do sono (*Trypanosoma brucei*) e a Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*). Esses parasitas apresentam características bioquímicas, celulares e moleculares específicas que os diferenciam de outros eucariotos, como por exemplo a ausência da maioria dos promotores da RNA polimerase II. O controle da sua expressão gênica acontece então basicamente a nível pós-transcricional, sendo o processo de tradução um alvo importante desse controle.

O início da tradução é a etapa mais importante para o controle desse processo, sendo caracterizado pela interação entre os ribossomos e o mRNA, bem como pelo posicionamento correto dos ribossomos junto ao códon AUG de início da tradução. Nessa etapa estão envolvidos diversos fatores auxiliares denominados eIFs (*eukaryotic Initiation Factors*). Um desses é o complexo eIF4F, baseado nas subunidades eIF4E e eIF4G. O reconhecimento do mRNA pelo eIF4E, dentro do complexo eIF4F, leva ao recrutamento das subunidades ribossomais e é etapa chave para a tradução e sua regulação. Muitas questões ainda permaneçam não esclarecidas a respeito da função desse complexo, mas um ponto chave é o papel de RNA helicases do tipo *DEAD-box*. O eIF4A é a única destas RNA helicases sabidamente necessária para a função do eIF4F, mas outras helicases antes consideradas de menor importância, como a ded1p/DDX3 (respectivamente de leveduras e mamíferos), atualmente são vistas como de ação crítica para a tradução em eucariotos.

Os tripanosomatídeos possuem múltiplos complexos do tipo eIF4F, algo pouco visto em organismos unicelulares e envolvendo diferentes subunidades de eIF4E (EIF4E1 a 6) e eIF4G (EIF4G1 a 5), além de um único eIF4A funcional (EIF4AI). Dois complexos foram mais bem caracterizados e avaliados como tendo funções essenciais para a tradução, baseados nas subunidades EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4. Novos estudos identificaram o complexo EIF4E4/EIF4G3 interagindo especificamente com o EIF4AI, a única RNA helicase do tipo *DEAD-box* encontrada com esse complexo. Já o complexo EIF4E3/EIF4G4 parece estar associado a outras RNA helicases, como a DED1-1 de *Leishmania*, homóloga da ded1p/DDX3, e também chamada de HEL67 em espécies de *Trypanosoma*.

Os tripanosomatídeos codificam um grande número de RNA helicases do tipo *DEAD-box*. A interação preferencial das RNA helicases citadas com complexos eIF4F específicos em tripanosomatídeos indica aspectos diferenciados de sua função na tradução que necessitam de maior esclarecimento. Além disso, esses complexos têm sido associados a diferentes populações de mRNAs, o que sugere que a presença das diferentes helicases nos complexos pode determinar padrões distintos de ação e regulação.

Este estudo pretende ajudar na identificação de forma mais precisa com quais complexos do tipo eIF4F as RNA helicases citadas (EIF4AI e DED1-1/HEL67) atuam em conjunto com outros eventuais parceiros associados em *Leishmania infantum*. A identificação de seus parceiros funcionais esclarecerá pontos importantes sobre a tradução desses protozoários e fornecerá informações relevantes sobre potenciais novos mecanismos associados à tradução em diferentes eucariotos e no homem.

1.1 Pergunta condutora

Quais complexos do tipo eIF4F se associam com as RNA helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67 em *Leishmania infantum* e como essas associações podem refletir papéis funcionais distintos nos mecanismos de iniciação da tradução?

1.2 Hipótese

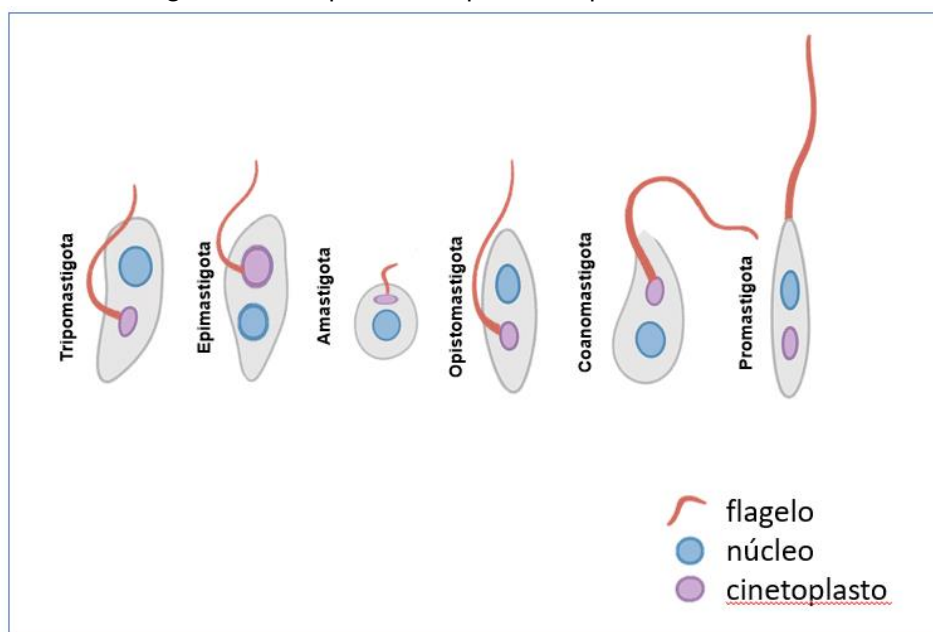
A RNA helicase EIF4AI mostra associação predominante com o complexo EIF4E4/EIF4G3, enquanto a helicase DED1-1/HEL67 se associa preferencialmente ao complexo EIF4E3/EIF4G4. Essas interações evidenciam particularidades funcionais entre os diferentes complexos do tipo eIF4F envolvidos nos mecanismos de tradução em *Leishmania infantum*.

2 Revisão de Literatura

2.1 Tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos são protozoários parasitas pertencentes a ordem *Trypanosomatida*, classe *Kinetoplastea*, classificados de acordo com suas características morfológicas bem como sua interação com diferentes hospedeiros (Kostygov *et al.*, 2021). As espécies dessa classe são caracterizadas por uma estrutura geral que é universalmente conservada, no caso uma rede entrelaçada de DNA circular conhecida como DNA cinetoplasto (kDNA) em sua mitocôndria (Figura 1). Esta estrutura está associada à base de um único flagelo, por sua vez ligado a um corpo celular delgado (Stuart *et al.*, 2008; Kaufer *et al.*, 2017).

Figura 1: Principais morfotipos dos tripanosomatídeos.



Legenda: Apresentação ilustrativa das seis morfologias comuns em tripanosomatídeos.

Fonte: adaptado de [Kaufer *et al.*, 2017] pela autora.

O ciclo de vida dos tripanosomatídeos é predominantemente monóxeno (em um único hospedeiro) embora algumas espécies apresentem ciclo heteróxico (hospedeiros diferentes). Dentre os gêneros de maior importância, destacam-se aqueles com espécies patogênicas para humanos, responsáveis por doenças de impacto mundial como: *Trypanosoma brucei*, agente etiológico da Doença do Sono; *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas; e *Leishmania spp.*, que causam as Leishmanioses Visceral e Cutânea. Essas enfermidades encontram-se inseridas entre as doenças negligenciadas listadas como de alta prioridade para a Organização Mundial de Saúde (OMS) (Parthasarathy; Kalesh, 2020).

Os tripanosomatídeos possuem uma organização genômica, estruturas celulares, e processos biológicos semelhantes, porém apresentam diferenças morfológicas significantes em seu ciclo de vida, visto que habitam nichos biológicos diferentes e são transmitidos por diferentes insetos vetores (Stuart *et al.* 2008; Lukeš *et al.*, 2018; Rajan *et al.*, 2019).

2.1.1 Gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* é representado por mais de 20 espécies responsáveis pelo grupo de doenças denominadas de Leishmanioses. A transmissão é feita por cerca de 30 espécies de flebotomíneos, insetos dípteros pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, sendo os parasitas capazes de se multiplicar em vários hospedeiros mamíferos. Entre os gêneros de protozoários parasitas de seres humanos, *Leishmania* é considerado o que abrange o maior número de espécies patogênicas (Santarém *et al.*, 2023; Akhoundi *et al.*, 2016). A classificação de

Leishmania spp. foi inicialmente relacionada a critérios clínicos e bioecoepidemiológicos, como distribuição geográfica, relação com os vetores, tropismo tissular, propriedades antigênicas e aspectos clínicos (cutânea, mucocutânea, cutânea difusa e visceral). Estudos filogenéticos têm sugerido uma grande variabilidade para este gênero, embora sua classificação taxonômica continue gerando discussões sobre a validade das espécies (Espinosa *et al.*, 2018).

O termo Leishmanioses compreende um conjunto de doenças causadas por infecções transmitidas por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos (Who, World Health Organization, 2013). Encontram-se entre as sete doenças tropicais de maior impacto, apresentando um espectro de manifestações que variam de infecção assintomática ao óbito (Pace, 2014). As manifestações dependem de fatores relacionados aos parasitas envolvidos na infecção e a aspectos imunológicos do hospedeiro. De acordo com os sintomas, consequentes aos tipos de fagócitos infectados, as Leishmanioses podem ser divididas nas seguintes formas clínicas: Tegumentar ou Cutânea; Mucocutânea; e Visceral ou Kala-Azar (Kevric *et al.*, 2015).

A Leishmaniose Tegumentar tem uma grande variedade de formas, as quais podem ser agrupadas em: Leishmaniose Cutânea, caracterizada por lesões na pele de cura espontânea ou que podem se tornar crônicas; Leishmaniose Mucocutânea, caracterizada por lesões ulcerativas e destruição da mucosa; Leishmaniose Cutânea Difusa, caracterizada por lesões nodulares as quais não são ulcerativas nem se disseminam. Já a Leishmaniose Visceral é crônica e progressiva e afeta vários órgãos que incluem o baço, fígado, medula óssea e linfonodos (Handler *et al.*, 2015; Reynolds; Billioux; Quinn, 2017).

As Leishmanioses ocorrem em 88 países, afetando cerca de 12 milhões de pessoas, com dois milhões de novos casos anuais e 350 milhões vivendo em áreas de risco. Estão amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais da América, Mediterrâneo, África e Ásia. Segundo a OMS, 90% dos casos de Leishmaniose Tegumentar concentram-se no Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Argélia, Irã, Brasil e Peru; e 90% dos casos de Leishmaniose Visceral na Índia, Bangladesh, Nepal, Sudão e Brasil (Who. World Health Organization, 2020).

2.1.2 Ciclo biológico e doença

O gênero *Leishmania* compreende espécies que possuem ciclos de vida que abrangem dois hospedeiros, um vertebrado e outro invertebrado. O grupo de hospedeiros vertebrados engloba roedores, reptéis, endentados, marsupiais, canídeos e primatas, incluindo os seres humanos e é caracterizado por distintas formas morfológicas e funcionais que garantem a adaptação do parasita a cada ambiente biológico. O grupo dos hospedeiros invertebrados, ou vetores, são formados por insetos da ordem *Díptera*, gêneros *Phlebotomus* (Velho Mundo) e *Lutzomyia* (Novo Mundo) (Maroli *et al.*, 2013).

As duas formas morfológicas predominantes dos hospedeiros vertebrados são o promastigota e o amastigota, que se diferenciam principalmente pela presença ou ausência do flagelo, pela localização e pelo papel desempenhado no ciclo infeccioso. A forma promastigota corresponde ao estágio flagelado e extracelular do parasita, essa forma está presente no trato digestivo do vetor flebotomíneo, onde se desenvolve e se multiplica. Em contraste, a forma amastigota é aflagelada, intracelular obrigatória, sendo encontrada no interior de

células fagocíticas, predominantemente macrófagos, do hospedeiro mamífero. Os amastigotas se replicam ativamente por divisão binária dentro dessas células, até promoverem a lise celular e liberarem novos parasitas capazes de invadir outras células hospedeiras (Fiebig; Kelly; Gluenz, 2015).

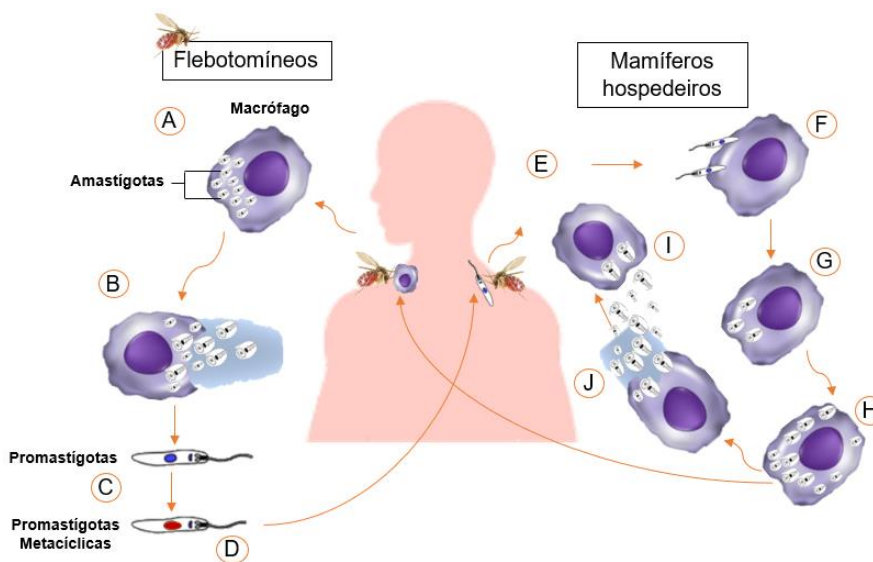
A infecção do hospedeiro vertebrado tem início durante o repasto sanguíneo de um flebotomíneo infectado, quando promastigotas metacíclicos, são inoculados juntamente com a saliva do inseto na pele do hospedeiro, no local da picada. Esses promastigotas são rapidamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos e outras células do sistema fagocítico mononuclear, dentro das quais sofrem transformação em amastigotas. No interior dos fagolisossomos, as formas amastigotas adaptam-se ao ambiente ácido e pobre em nutrientes, onde passam a se replicar por fissão binária, levando à destruição das células hospedeiras e à liberação de novos parasitas. Após a multiplicação das amastigotas por divisão binária, a infecção pode persistir por todo o tempo de vida do hospedeiro, com o risco de aparecimento de lesões cutâneas e viscerais perpetuando o ciclo infeccioso no hospedeiro mamífero (Sunter; Gull, 2017; Stuart *et al.*, 2008).

Durante a fase no vetor, a continuidade do ciclo ocorre quando a fêmea do flebotomíneo ingere sangue de um hospedeiro infectado, incorporando macrófagos que contêm amastigotas viáveis. No trato digestivo do inseto, os amastigotas liberados dos macrófagos ingeridos sofrem diferenciação para a forma promastigota procíclica, adaptada ao ambiente intestinal. Essas formas se multiplicam intensamente por divisões binárias e migram para as porções anteriores do trato digestivo, colonizando o esôfago e a faringe. Nesse estágio, os promastigotas aderem firmemente ao epitélio intestinal por meio do flagelo, o que

é essencial para evitar sua eliminação durante a excreção do conteúdo alimentar (Sunter; Gull, 2017).

Com a progressão do desenvolvimento no vetor, os promastigotas procíclicos passam por um processo de maturação, diferenciando-se em promastigotas metacíclicos, morfologicamente delgados e metabolicamente adaptados à infecção do hospedeiro vertebrado. Essas formas metacíclicas são acumuladas nas porções anteriores do trato digestivo e na probóscide do inseto, prontas para serem inoculadas no momento de um novo repasto sanguíneo. Assim, o ciclo biológico da *Leishmania* se completa quando a fêmea do flebotomíneo realiza uma nova alimentação, inoculando saliva infectada com promastigotas metacíclicos na pele do hospedeiro, reiniciando o processo infeccioso (Bates, 2008; Sunter; Gull, 2017; Stuart et al., 2008; Gonçalves et al., 2018).

Figura 2: Ciclo biológico da *Leishmania* spp.



Legenda: (A) Flebotomíneos fêmeas alimentando-se de macrófagos infectados com formas amastigotas. (B-C) Liberação de amastigotas e diferenciação em promastigotas procíclicas no intestino do inseto. (D) Transformação de promastigotas em formas infectantes pós metaciclogênese. (E) Transmissão de formas infectantes durante a alimentação sanguínea de flebotomíneos fêmeas. (F) Promastigotas anexadas à superfície celular de um macrófago para o englobamento. (G) Modificação celular em amastigotas. (H) Replicação de amastigotas no interior de macrófagos de diferentes tecidos. (I-J). Rompimento de célula infectada e infecção de novos macrófagos. Fonte: adaptada de [CDC-Centers for Disease Control and Prevention, 2015] pela autora.

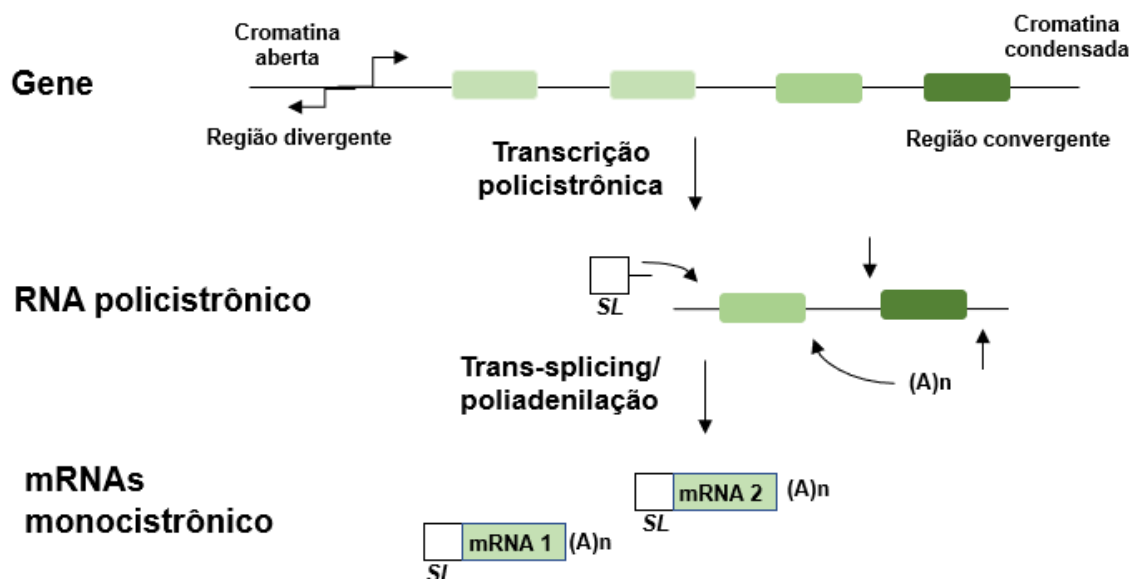
2.2. Particularidades da biologia molecular dos tripanosomatídeos

O controle das espécies patogênicas de *Leishmania* e de outros tripanosomatídeos enfrenta grandes desafios devido às suas particularidades biológicas, que os diferenciam significativamente de outros organismos eucarióticos. Tais diferenças dificultam a aplicação de estratégias terapêuticas baseadas em alvos moleculares já estabelecidos em outros patógenos, como protozoários ou fungos, restringindo as opções de substituição dos fármacos atualmente disponíveis. Ao mesmo tempo, sua alta taxa de adaptação aos mais variados vetores e hospedeiros, de modo a ocasionar diferentes doenças, exige uma maquinaria de expressão e regulação gênica complexa que ainda está sendo caracterizada (Haile; Papadopoulou, 2007).

2.2.1 Expressão gênica dos tripanosomatídeos

Em comparação com outros eucariotos complexos, como os mamíferos, os tripanosomatídeos apresentam aspectos distintos importantes associadas à sua expressão e regulação genética. Um exemplo marcante é o agrupamento de genes organizados em grupos transcricionais contendo um único elemento promotor (Figura 3). Os genes dos tripanosomatídeos são transcritos então em pré-mRNAs policistrônicos que agrupam dezenas ou centenas de regiões codificadoras distintas, gerando longos transcritos que codificam proteínas não relacionadas. Estes geram mRNAs monocistrônicos através de eventos de *trans-splicing* e poliadenilação (Liang *et al.*, 2003; Gunzl, 2010).

Figura 3: Esquema de maturação do mRNA nos tripanosomatídeos por *trans-splicing* e poliadenilação.



Legenda: A transcrição se inicia em regiões de cromatina aberta e termina em regiões de cromatina condensada. Os aglomerados de genes codificantes de proteínas são transcritos e então processados por mecanismos acoplados de *trans-splicing* e poliadenilação, dando origem a mRNAs monocistônicos maduros. SL: RNA *Spliced-Leader*; (A)_n: Cauda poli-A. Fonte: adaptado de [Gaudenzi et al., 2011] pela autora.

A característica constitutiva da transcrição em tripanosomatídeos, juntamente com a ausência de promotores definidos e a presença de extensas unidades de transcrição policistônicas, demonstra a falta de mecanismos convencionais de controle transcricional seletivo da expressão gênica, observados em outros eucariotos. Segue-se que a maioria dos processos associados à regulação da expressão genética nestes microrganismos são mediados ao nível pós-transcricional (Kolev; Ullu; Tschudi, 2014; Maslov et al., 2019). Muitos deles podem atuar no processamento, transporte, armazenamento, tradução e meia-vida do mRNA, enquanto outros provavelmente atuam posteriormente à tradução, através da regulação da modificação e degradação de proteínas, na maioria dos casos por mecanismos ainda indefinidos. A tradução é então um passo

fundamental na regulação quantitativa da expressão genética em tripanosomatídeos, e espera-se que um papel importante seja desempenhado durante a sua fase de iniciação (de Melo Neto *et al.*, 2016).

2.3 Iniciação da tradução em eucariotos e o complexo eIF4F

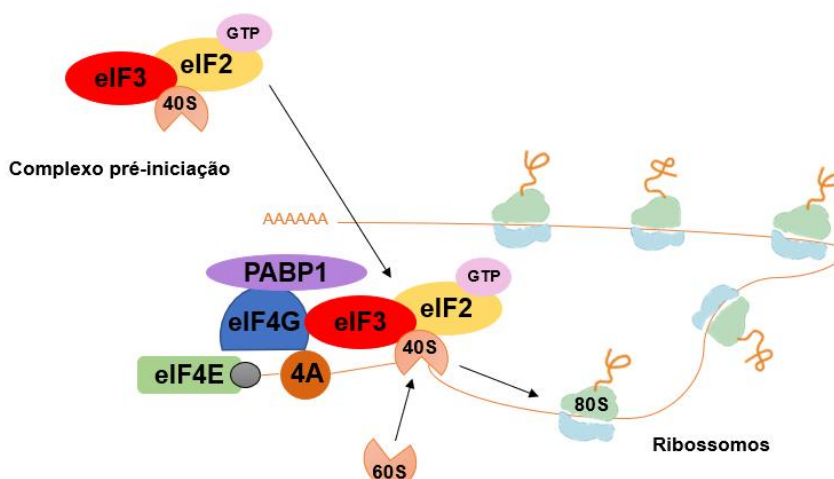
A síntese de proteínas ou tradução é subdividida em iniciação, alongamento, terminação e reciclagem de ribossomos (Dever; Green, 2012). Em organismos eucarióticos, a etapa de iniciação é a mais regulada e conta com a participação de pelo menos 12 proteínas denominadas fatores de iniciação eucariótica ou eIFs (de *eukaryotic Initiation Factors*) (Jagus *et al.*, 2012; Brito, 2023). Juntos os eIFs agem para montar as subunidades ribossomais (60S e 40S) em uma subunidade 80S pronta para a etapa de alongamento, com o RNA transportador posicionado sobre o códon AUG inicial do mRNA. Em síntese, a finalidade dessa etapa consiste na montagem do complexo ribossômico 80S, a partir das subunidades menor (40S) e maior (60S), sobre o códon de iniciação (AUG) interagindo com o RNA transportador inicial carregado com o amino ácido metionina (Met-tRNA_i). Vários dos eIFs são compostos por proteínas com múltiplas subunidades, mas cada um desempenha papéis críticos na iniciação da tradução (Jackson; Hellen; Pestova, 2010; Aitken; Lorsch, 2012; Merrick; Pavitt, 2018; Rodnina, 2018).

A tradução se inicia com o complexo ternário (CT), formado pelo fator eIF2 em sua forma ligada a GTP e o Met-tRNA_i, e sob ação dos fatores eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5, sendo carregado para a subunidade menor ribossomal e montando o pré-complexo de iniciação (PIC) 43S (Aitken; Lorsch, 2012; Hinnebusch, 2014). Em seguida, o reconhecimento do mRNA pelo PIC 43S é mediado por fatores

envolvidos na interação com o *cap* de 7-Metil-Guanosina (m7G) na sua extremidade 5', componentes do complexo de ligação ao *cap* eIF4F. Destes, a subunidade eIF4E, liga-se diretamente ao *cap* e interage com uma segunda subunidade, o eIF4G que, por sua vez, possui motivos de ligação a componentes do próprio complexo além de um segundo complexo, o eIF3, e da proteína de ligação à cauda poli(A) ou PABP (de *Poly(A) Binding Protein*). Essa última ligação garante um aumento nas taxas de tradução e estabilidade de mRNAs poliadenilados (Kühn; Whale, 2004; Ross-Kaschitzka; Altmann, 2020; Sonenberg; Hinnebusch, 2009).

O padrão de interações observado na iniciação da tradução promove a conexão do mRNA e complexo eIF4F, através do eIF3, com a subunidade 40S, transitando do pré-complexo, para o complexo de iniciação 48S (Machida *et al.*, 2018) (Figura 4). A subunidade eIF4A, do eIF4F, sendo uma RNA helicase da família *DEAD-box*, prepara o sítio de ligação ao PIC no mRNA, desfazendo estruturas secundárias na 5' UTR em direção ao AUG e com sua processividade aprimorada por estímulo do eIF4B (Hilbert *et al.*, 2011). O reconhecimento do códon de iniciação AUG, pela subunidade menor, detém sua movimentação ao longo da região 5' não traduzida do mRNA (Shirokikh; Preiss, 2018). Essa pausa permite a estabilização da interação códon-anticódon, que afeta interações e permite liberação de parte dos eIFs, como eIF1 e eIF2•GDP, pós hidrólise (Jennings *et al.*, 2017). Subsequentemente, o contato com 60S é estimulado pelo eIF5B, promovendo a montagem do ribossomo competente para a etapa seguinte da tradução, de alongamento (Hinnebusch, 2014).

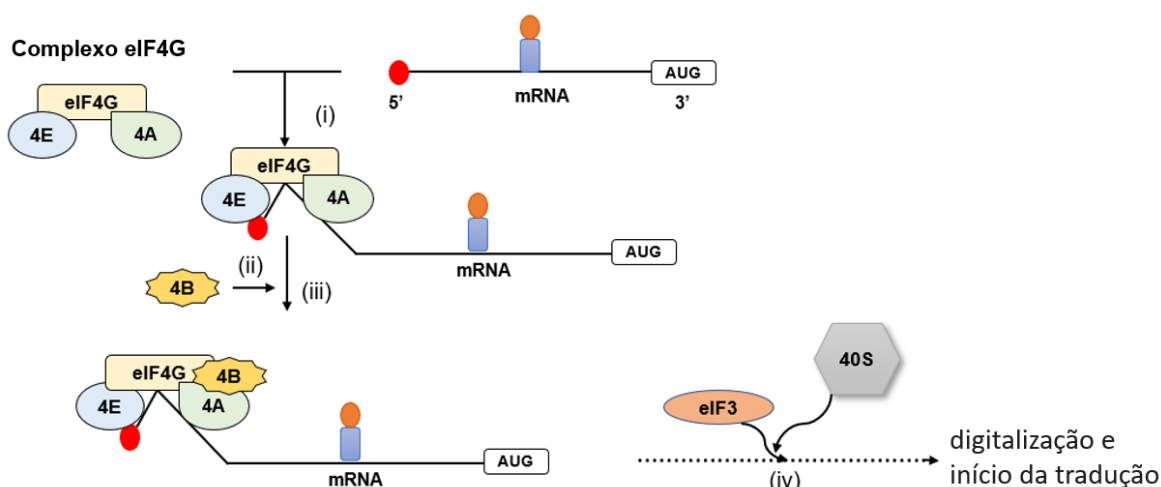
Figura 4: Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos.



Legenda: Esquema representativo do reconhecimento do cap e ligação das subunidades pertencentes ao complexo eIF4F a um mRNA maduro. Fonte: adaptado de [Yáñez e Nieto, 2011] pela autora.

2.3.1 Complexo eIF4F de iniciação da tradução

O complexo eIF4F participa como mediador da ligação entre o *cap* presente na extremidade 5' do mRNA e o complexo PIC 43S. O eIF4F apresenta três subunidades: eIF4A, uma RNA helicase *DEAD-box*; eIF4E, a proteína de ligação ao *cap*; e eIF4G, proteína ancoradora que carrega sítios de ligação para eIF4A, eIF4E, PABP e eIF3 (Jackson; Hellen; Pestova, 2010; Park *et al.*, 2011). A interação do eIF4G, ligado ao eIF4E, com o eIF3 participa diretamente do recrutamento da subunidade ribossomal 40S à molécula do mRNA para a formação do complexo 48S (Figura 5) (Merrick, 2015).

Figura 5: eIF4F mediando recrutamento do mRNA.

Legenda: (I) Contato entre complexo eIF4F e mRNA através da interação eIF4E-5'-cap. (II) Interação entre eIF4B e eIF4G no aprimoramento da atividade helicase do eIF4A. (III) Estrutura secundária (grampo) na 5'UTR a ser desfeita por eIF4B/eIF4A. (IV) Recrutamento da subunidade 40S ao mRNA por meio da interação entre eIF4G e eIF3. Início da leitura por 40S em busca do códon de iniciação. Fonte: adaptada de [Hou et al, 2012] pela autora.

2.3.2 Subunidade eIF4G do complexo eIF4F

O fator de iniciação eucariótico 4G (eIF4G) desempenha um papel central no complexo eIF4F atuando como uma ponte molecular entre eIF4A e eIF4E. O eIF4G ainda é responsável por recrutar o complexo de pré-iniciação 43S PIC à região 5' UTR do mRNA, que inicia uma varredura em busca do códon AUG de iniciação da tradução (Sonenberg; Hinnebusch, 2009). No que concerne a sua estrutura, o eIF4G apresenta na sua parte central o domínio HEAT-1, que também é chamado de MIF4G, onde se conecta ao eIF3 e à helicase eIF4A. Em mamíferos, a ligação ao eIF4A é ainda modulada pelo domínio HEAT-2, designado como MA3 e situado na região C-terminal do eIF4G. Além disso, o eIF4G apresenta um terceiro domínio HEAT, conhecido como W2 e localizado na sua extremidade C-terminal,

que se liga a uma quinase chamada Mnk (Schutz *et al.*, 2008; Marintchev *et al.*, 2009).

2.3.3 Subunidade eIF4E do complexo eIF4F

O fator de iniciação eucariótico eIF4E é uma proteína de ligação ao cap de 7-metilguanosina (m⁷GTP) presente na extremidade 5' da maioria dos mRNAs eucarióticos, desempenhando papel essencial no processo de tradução. Em conjunto com outros fatores, o eIF4E participa do recrutamento do mRNA à subunidade ribossomal 40S (Rhoads, 2009). Dentre os componentes do complexo eIF4F, o eIF4E é um dos menos abundantes, configurando-se como um fator limitante na regulação das taxas de iniciação da tradução dependente de cap. A atividade do eIF4E é modulada, entre outros mecanismos, pelas proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BPs), que competem com o eIF4G pelo mesmo sítio de interação, podendo exercer efeito inibitório sobre a tradução (Piserà *et al.*, 2018).

A descoberta de sua localização não apenas no citoplasma, mas também no núcleo e em corpos de processamento de ribonucleoproteínas citoplasmáticas (corpos P), revelou a multiplicidade de suas funções bioquímicas. Entre elas, destacam-se seu envolvimento na exportação seletiva de mRNAs específicos para o citoplasma e na modulação do equilíbrio entre retenção e degradação desses mRNAs (Romagnoli *et al.*, 2021; Piserà *et al.*, 2018).

2.3.4 Subunidade eIF4A do complexo eIF4F

O fator eIF4A é uma pequena proteína pertencente à família de proteínas relacionadas às helicases, apresentando motivos conservados característicos da família *DEAD-box* de RNA helicases. O eIF4A apresenta uma região N-terminal curta, de aproximadamente cinquenta aminoácidos, mas não apresenta elementos adicionais na sua região C-terminal, como observados em outras helicases. É uma proteína que possui atividade de helicase confirmada e se liga ao RNA de maneira dependente de ATP (Andreou and Klostermeier, 2013).

O fator eIF4A é uma parte essencial da maquinaria de iniciação da tradução em células eucarióticas. Ele desempenha um papel crucial na preparação do mRNA para o recrutamento do ribossomo, ajudando no desenrolamento de estruturas secundárias no RNA mensageiro. O eIF4A (DDX2 em mamíferos) é o protótipo da família de proteínas RNA helicases do tipo *DEAD-box*, de aproximadamente 46 kDa e com capacidade de remover estruturas secundárias da região 5'UTR dos mRNAs a serem traduzidos, de forma dependente de ATP (Marintchev, 2013; Andreou, Klostermeier, 2013; Pelletier; Sonenberg, 2019; Jackson *et al.*, 2010). Na presença de ATP, seus dois domínios RecA se unem, dando origem à conformação ativa da proteína. O eIF4A é então capaz de desfazer estruturas de RNA dupla fita através da flexibilização dos seus domínios N- e C-terminais (Eliseeva; Lyabin; Ovchinnikov, 2013). Sua estrutura pode ser sobreposta à de várias helicases, indicando uma conservação geral da sua conformação em dois domínios e compreendendo o local de ligação do RNA (Rogers *et al.*, 2002).

Três isoformas do eIF4A podem ser encontradas em mamíferos, denominados de eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII, com um elevado grau de similaridade

em sua sequência de aminoácidos. O eIF4AI e o eIF4AII encontram-se altamente relacionados, apresentando uma faixa de percentual de 90% à 95% de identidade a nível de seus aminoácidos. Já o eIF4AIII apresenta apenas 65% de semelhança referente às outras isoformas. O eIF4AI (DDX2A) é mais abundante e melhor estudado do que o eIF4AII, e embora apresentem atividades bioquímicas semelhantes *in vitro*, *in vivo* seus papéis podem não ser equivalentes (Chan *et al.*, 2004; Rogers *et al.* 2002).

Algumas diferenças entre eles podem ser citadas, como por exemplo, a predominância da síntese do eIF4AI durante o crescimento celular ativo, enquanto que no eIF4AII é produzido durante a parada do crescimento. A supressão de eIF4AI leva a níveis aumentados de eIF4AII, mas essa alteração é insuficiente para compensar a morte celular resultante da perda de eIF4AI; eIF4AI é essencial para a sobrevivência celular, diferentemente do eIF4AII (Pelletier; Sonenberg, 2019). Já o EIF4AIII possui localização nuclear, e tem uma atividade diferenciada, participando durante o *splicing* do mRNA no complexo de junção dos éxons (EJC) (Merrick, 2015). Embora exiba atividade de ATPase dependente de RNA e atividade de helicase, o EIF4AIII não tem então um papel definido na tradução (Holzmann *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2014).

2.4. Estrutura e função de RNA helicases

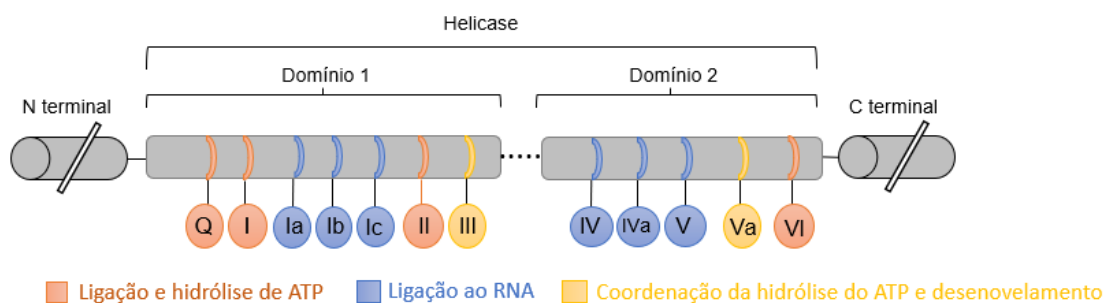
As RNA helicases representam uma família enzimática altamente conservada ao longo da evolução, presente de organismos unicelulares, como leveduras, a mamíferos, desempenhando papéis indispensáveis em diversas funções celulares. Essas enzimas se destacam pela presença de motivos

conservados e pela necessidade de um nucleotídeo trifosfatado (NTP), geralmente adenosina trifosfato (ATP), para catalisar reações bioquímicas (Sloan; Bohnsack, 2018). Elas exercem uma variedade de funções ligadas ao metabolismo do RNA, abrangendo processos como transcrição, processamento (*splicing*), transporte, tradução e degradação de mRNAs. Desempenham assim papéis fundamentais em mecanismos de expressão gênica, assegurando a precisão e a eficiência dos processos relacionados ao RNA (Cordin; Beggs, 2013; Hardwick; Luisi, 2013; Marintchev, 2013).

No que diz respeito à sua estrutura, as RNA helicases possuem áreas com um alto nível de conservação, especialmente na sua região central, que inclui os domínios RecA (RecA1 e RecA2). Esses domínios apresentam até 12 motivos conservados, que estão relacionados à interação da RNA helicase com ATP e RNA. A maior parte das RNA helicases faz parte da superfamília de helicases 2 (SF2), sendo classificadas em subfamílias como *DEAD/DExD-box* e *DEAH/DExH-box* (Sloan; Bohnsack, 2018; Jarmoskaite; Russell, 2014; Linder; Jankowsky, 2011). Essas subfamílias possuem um padrão conservado de aminoácidos (Asp-Glu-Ala-Asp/His), que formam a sigla DEAD ou DEAH. Embora a alanina esteja ausente e o último aspartato seja substituído por histidina na *DExH-box*, essa subfamília apresenta semelhanças estruturais com a subfamília *DEAD-box*, também chamada de DDX (Cordin *et al.*, 2012; Cargill *et al.*, 2021). No caso do domínio RecA1, este possui quatro motivos responsáveis pela ligação ao ATP (motivo Q, motivo I, motivo II e motivo III), sendo que o motivo "Q" não está presente na *DEAH-box*. Além disso, conta com dois motivos de ligação ao RNA (motivo Ia e Ib). Por outro lado, o domínio RecA2 é composto por um motivo VI, que regula a atividade da ATPase

durante o processo de desenrolamento de dsRNA, além de dois motivos de ligação ao RNA (motivos IV e V) (Figura 6) (Jarmoskaite and Russell 2010; Owttrim 2013).

Figura 6: Esquema representativo dos domínios e motivos conservados de uma RNA helicase.



Legenda: O núcleo da helicase apresenta dois domínios do tipo RecA, que ao todo contém 12 motivos de sequência conservados. Os motivos estão coloridos em laranja, azul e amarelo, caracterizando suas funções primárias durante o ciclo da RNA helicase. As extremidades N e C terminais variam de forma significativa a depender do tipo de RNA helicase.

Fonte: adaptado de [Sloan and Bohnsack, 2018] pela autora.

Apesar das semelhanças estruturais entre as RNA helicases, diferenças na função bioquímica podem surgir, uma vez que exibem domínios auxiliares variáveis nas extremidades N e C-terminais, atribuindo especificidade à helicase em interações com RNAs específicos ou cofatores proteicos. Contudo, seus papéis ainda não foram totalmente elucidados no que diz respeito à compreensão total dos mecanismos moleculares que desempenham suas funções e participação na iniciação da tradução (Cargill *et al.*, 2021). Neste sentido o eIF4A, associada ao início da tradução e interação com o complexo de iniciação a tradução eIF4F, é uma das RNA helicases *DEAD-box* mais bem caracterizadas e responsável por desempenhar um papel essencial na tradução geral (Rogers *et al.*, 2002; Andreou, Klostermeier, 2013).

2.4.1. Papel das RNA helicases no processamento do mRNA em eucariotos

A etapa de processamento do mRNA envolve uma série de proteínas e ribonucleoproteínas (RNP) que se juntam para formar o complexo spliceossomo. A montagem desse complexo ocorre por meio de interações ordenadas entre RNA-RNA, RNA-proteína e proteína-proteína, sendo influenciada por mudanças conformacionais e composicionais nos componentes que o constituem. As RNAs helicases desempenham um papel crucial na remodelação desse complexo, desenovelando moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) e regulando as interações entre RNA e proteína. Nesse contexto, elas podem atuar tanto como chaperonas de RNA, facilitando as interações entre as moléculas do complexo, quanto como catalisadoras que utilizam a energia liberada pela hidrólise do ATP para promover as interações necessárias até que o processamento do mRNA seja concluído (De Bortoli *et al.*, 2021; Liu; Cheng, 2015; Tanner; Linder, 2001).

2.4.2. RNA helicases e sua ação na iniciação da tradução em eucariotos

O fator eIF4A, estando associada ao complexo eIF4F, não é a única RNA helicase envolvida na iniciação da tradução. A descoberta da helicase DHX29, ou *DExH-box 29*, trouxe uma informação adicional sobre as regiões 5' UTRs do mRNA durante este processo (Parsyan *et al.*, 2009). Esta helicase tem a função de desenrolar estruturas de RNA estáveis na região 5' UTR, facilitando o correto posicionamento do mRNA no ribossomo e permitindo uma análise base a base. Por

outro lado, a helicase *DEAD-box* chamada DDX6 em humanos e Dhh1 em leveduras, está envolvida no mecanismo de repressão da tradução e na renovação dos mRNAs, ação que se inicia pela interação com o complexo Ccr4-Not. Este complexo é responsável por mediar a degradação do mRNA, removendo a cauda poli (A) (deadenilação) e, em seguida, promovendo o decapeamento da extremidade 5' do mRNA (Parker; Sheth, 2007; Pisareva *et al.*, 2008; Buschauer *et al.*, 2020).

Com relação a helicase Vasa/DDX4 e a RNA helicase A (RHA/DHX9), essas participam da estimulação da tradução de mRNAs específicos, embora os mecanismos moleculares que sustentam essas funções ainda não estejam completamente esclarecidos. A Vasa/DDX4, por exemplo, interage diretamente com o fator de iniciação eIF5B, o que pode modular a tradução de subconjuntos específicos de mRNAs. De forma semelhante, a RHA/DHX9 atua de maneira seletiva sobre mRNAs celulares e retrovirais complexos, promovendo sua tradução. No entanto, a base molecular detalhada de como essas proteínas exercem tais funções permanece em grande parte não caracterizada (Parsyan *et al.*, 2011; Shen; Pelletier, 2020).

A Ded1p/DDX3 é outra RNA helicase que desempenha papéis importantes na iniciação da tradução, além de estar envolvida em outros processos do metabolismo do RNA, incluindo transcrição, *splicing* e transporte de pré-mRNA, embora muitos desses papéis ainda estejam em processo de elucidação (Parsyan *et al.*, 2011; Shen; Pelletier, 2020). Esta proteína apresenta múltiplas funções, podendo tanto estimular quanto reprimir a tradução, dependendo do contexto celular. Evidências indicam que essa helicase também participa do transporte núcleo-citoplasma de RNA, bem como de eventos relacionados à segregação

cromossômica durante a mitose, à associação do complexo de junção exônica (EJC) e à dinâmica do spliceossomo (Lai *et al.*, 2008; Pek; Kai, 2011; Topisirović *et al.*, 2009; Ryan; Schröder, 2022).

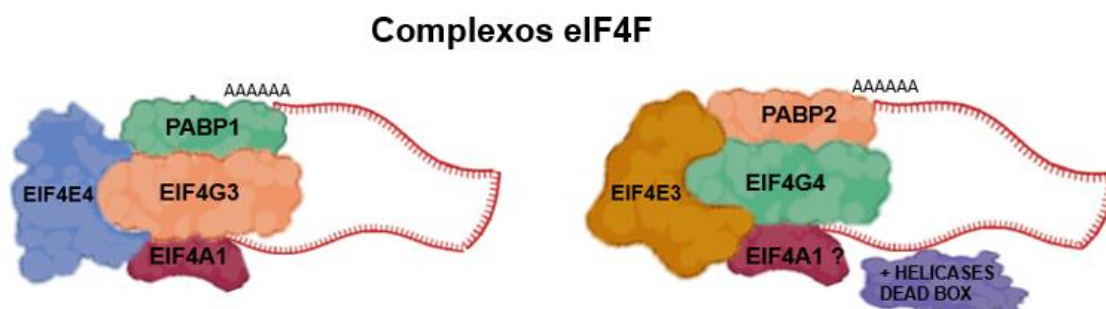
Pertencente à subfamília DDX3, a RNA helicase DDX3X é uma enzima humana que interage funcionalmente com os fatores de iniciação da tradução eIF4E e eIF3. Em leveduras, onde é denominada como Ded1p, apresenta papel análogo, associando-se inicialmente à uma forma inativa do complexo eIF4F de iniciação da tradução. Por meio de sua interação direta com eIF4G, Ded1p estimula a hidrólise de ATP, promovendo a ativação do complexo de iniciação e facilitando a varredura da subunidade ribossomal 43S ao longo do mRNA até o complexo eIF4F (Shih *et al.*, 2011; Gulay *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2019). Durante esse processo, Ded1p atua no desdobramento de estruturas de dupla fita localizadas nas regiões 5' UTR dos mRNAs, favorecendo o recrutamento ribossomal e o início eficiente da tradução. Notavelmente, Ded1p demonstra maior eficiência nesse desdobramento do que a própria helicase eIF4A (Lai *et al.*, 2008; Hilliker *et al.*, 2011; Berthelot *et al.*, 2003; Marsden *et al.*, 2006). A subfamília Ded1/DDX3 distingue-se pela presença de motivos estruturais específicos localizados nos domínios amino- e carboxil-terminal, incluindo o sinal de exportação nuclear (NES de *Nuclear Export Signal*) e o domínio de ligação ao eIF4E, ambos situados na região N-terminal da proteína (Mokdadi *et al.*, 2021).

2.5 Complexos do tipo eIF4F na tradução em tripanosomatídeos

Em tripanosomatídeos, as subunidades que compõem os complexos do tipo eIF4F têm sido alvo de investigações, as quais vêm contribuindo para o esclarecimento de seu papel na iniciação da tradução e para a caracterização de um padrão peculiar desses complexos em relação aos eucariotos convencionais. Múltiplos homólogos para as subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G foram então descritos, conservados em diferentes espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, que se associam em múltiplos complexos do tipo eIF4F (de Melo Neto *et al.*, 2016).

Dos componentes do eIF4F de tripanosomatídeos, são descritos: dois homólogos do eIF4A, mas apenas um deles, o EIF4AI, atuante na tradução (Dhalia *et al.*, 2006; Yoffe *et al.*, 2004, 2006); seis referentes ao eIF4E (Freire *et al.*, 2014); e cinco homólogos de eIF4G (Dhalia *et al.*, 2005). Todos esses homólogos exibem um dado grau de conservação funcional entre as diferentes espécies dessa família. Os EIF4E3 e EIF4E4 são os homólogos de eIF4E mais longos em decorrência da presença de extensões N-terminais sem equivalentes nos demais eIF4Es. Ambos também são capazes de participar de interações que promovem a formação de complexos típicos de eIF4F (Freire *et al.*, 2011). Dois principais complexos foram então caracterizados nesses organismos (Figura 7), que envolvem os dois homólogos citados de eIF4E: EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI e EIF4E3/EIF4G4/EIF4AI (Freire *et al.*, 2011, 2017; Moura *et al.*, 2015). O primeiro deles foi o primeiro a ser associado a um papel importante na iniciação da tradução e suas subunidades eIF4E e eIF4G foram encontradas em *Leishmania* associadas a polissomas após fracionamento em gradientes de sacarose (Yoffe *et al.*, 2009).

Figura 7: Dois complexos do tipo eIF4F encontrados em tripanosomatídeos.



Legenda: O EIF4E4 compõe um primeiro complexo, interagindo com EIF4G3, EIF4A1 e o homólogo PABP1 através de sua extremidade N-terminal. Por outro lado, o EIF4E3 interage com o EIF4G4 em um segundo complexo que presumivelmente se associa a PABP2 (um segundo homólogo de PABP), ao EIF4A1 e também a outras helicases.

Fonte: adaptada de [Freire *et al.*, 2017] pela autora.

2.5.1 Homólogos de eIF4G em tripanosomatídeos

Os cinco homólogos distintos de eIF4G de tripanosomatídeos (denominados EIF4G1 a EIF4G5) foram originalmente identificados através de pesquisas usando o domínio HEAT1-MIF4G de mamíferos como consulta contra as sequências do genoma de *L. major*. Todos os cinco polipeptídeos identificados partilham o domínio central conservado HEAT1-MIF4G e, em pesquisas, recíprocas do BLAST contra sequências de mamíferos, plantas e leveduras, produziram homólogos de eIF4G como as proteínas mais semelhantes (Dhalia *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2019). Os ortólogos de todas as cinco proteínas foram facilmente identificáveis em outras espécies de tripanosomatídeos, mas além de EIF4G3 e EIF4G4, que estão claramente relacionados, a homologia entre essas proteínas é restrita ao domínio HEAT1-MIF4G (Moura *et al.*, 2015).

Tanto em *T. brucei* quanto em *Leishmania*, foi posteriormente demonstrado que EIF4G3 e EIF4G4 se ligam especificamente a dois homólogos diferentes de eIF4E, EIF4E3 e EIF4E4, formando complexos distintos do tipo eIF4F que foram

implicados na síntese de proteínas e foram posteriormente estudados em mais detalhes (Yoffe *et al.*, 2009; Freire *et al.*, 2011; Zinoviev *et al.*, 2012; Tupperwar *et al.*, 2020).

2.5.2 Homólogos de eIF4E em tripanosomatídeos

Os estudos iniciais realizados com o objetivo de caracterizar os homólogos de eIF4E de tripanosomatídeos foram baseados em pesquisas de homologia utilizando sequências de eIF4E de mamíferos ou leveduras como consultas contra sequências genômicas de *Leishmania*. Isso resultou na identificação de quatro homólogos que foram posteriormente direcionados para estudos funcionais (Dhalia *et al.*, 2005; Yoffe *et al.*, 2009; Freire *et al.*, 2011). Posteriormente, dois outros homólogos de eIF4E, mais divergentes em sequência, foram identificados em *T. brucei*, com ortólogos em outras espécies de tripanosomatídeos (Freire *et al.*, 2014). Foram então identificados seis homólogos de eIF4E de tripanosomatídeos (EIF4E1 a E6), conservados em espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* e que podem ser pareados em três grupos distintos, com base em propriedades estruturais e moleculares e em parceiros proteicos associados (Freire *et al.*, 2017).

Os EIF4E3 e EIF4E4 têm a capacidade de interagir com homólogos de eIF4G formando potenciais complexos eIF4F: EIF4E3 liga-se a EIF4G4 e EIF4E4 a EIF4G3, e ambos os complexos podem interagir com EIF4A1. Para o EIF4E4 de *L. infantum*, que teve sua fosforilação caracterizada mais detalhadamente, este foi encontrado constitutivamente expresso nos dois estágios do ciclo celular do parasita, e a fosforilação foi vista como típica de crescimento exponencial em

ambas as fases da vida do seu ciclo de vida (Zinoviev *et al.*, 2011 e 2012; Freire *et al.*, 2011; de Melo Neto *et al.*, 2015).

2.5.3 Homólogos de eIF4A em tripanosomatídeos

O primeiro fator de iniciação da tradução identificado em tripanosomatídeos foi um homólogo de eIF4A, identificado após a triagem de uma biblioteca de expressão genômica de *Leishmania braziliensis* para proteínas imunologicamente relevantes (de Melo Neto *et al.*, 2016). Posteriormente, um segundo homólogo foi descrito em *L. major*, inicialmente chamado EIF4A2, e hoje conhecido como EIF4AIII, por se tratar do ortólogo funcional do EIF4AIII presente em mamíferos (Dhalia *et al.*, 2006). Ambos os homólogos, EIF4AI e EIF4AIII, estão conservados em *T. brucei* com análises de sequência revelando identidades de 88% e 82%, respectivamente, para EIF4AI e EIF4AIII, quando comparados aos seus ortólogos em *L. major* (Dhalia *et al.*, 2005). Nas bases de dados, essas proteínas são as mais próximas do eIF4A humano, compartilhando mais de 50% de identidade, além da presença dos motivos característicos das RNA helicases da família *DEAD-box* (Dhalia *et al.*, 2006).

Além de compartilharem mais de 50% de identidade com o eIF4A humano, os EIF4AI e EIF4AIII em tripanosomatídeos também apresentam similaridades com outros eucariotos quanto à sua abundância, localização subcelular e funções relacionadas à tradução. O EIF4AI é a forma mais abundante, com localização citoplasmática, e demonstra capacidade de interagir com o domínio HEAT das proteínas EIF4G3 e EIF4G4, indicando sua participação ativa na iniciação da tradução. Em contraste, o EIF4AIII é menos abundante, possui localização

predominantemente nuclear, e não participa do processo de iniciação da tradução, o que sugere um papel voltado para o metabolismo de RNAs no núcleo (Dhalia *et al.*, 2005, 2006).

2.6 Outras RNA helicases atuantes na iniciação da tradução em tripanosomatídeos

Como citada acima, as RNA helicases da família *DEAD-box* são enzimas que desempenham papéis cruciais na remodelação de estruturas de RNA, desestabilizando ou desenrolando estruturas secundárias para facilitar processos celulares. Nos tripanosomatídeos, como *T. brucei* e *Leishmania spp.*, essas helicases devem estar envolvidas em uma variedade de funções celulares, incluindo a iniciação da tradução (Gargantini *et al.*, 2012). Além do fator EIF4AI, outras RNA helicases da família *DEAD-box* precisam ser estudadas, pois essas podem desempenhar uma função tão crucial quanto o EIF4AI no início da tradução, em conjunto com diferentes complexos do tipo eIF4F (Brito *et al.*, 2024; Abdelkrim *et al.*, 2018; Moura *et al.*, 2015).

2.6.1 DED1-1 (HEL67) e DED1-2

A helicase Ded1p/DDX3 pode tanto estimular quanto inibir a tradução, além de desempenhar funções no transporte de mRNAs entre o núcleo e o citoplasma e participar de eventos como a segregação cromossômica durante a mitose, a associação com o EJC (complexo de junção exônica) e o spliceossomo (Yedavalli *et al.*, 2004; Pek; Kai, 2011; Topisirović *et al.*, 2009). Com o avanço das pesquisas

em bancos de dados genômicos de *Leishmania* e *Trypanosoma*, foram identificadas duas proteínas parálogas da Ded1/DDX3. Essas proteínas compartilham aproximadamente 67% de similaridade de sequência, sugerindo que tenham se originado a partir de um evento de duplicação gênica de um gene ancestral comum. As duas variantes identificadas, denominadas DED1-1 (também conhecida como HEL67) e DED1-2 (também referida apenas como DED1), foram primeiramente descritas em *Leishmania*, onde se observou que sua expressão é diferencial ao longo do ciclo de vida do parasita. A DED1-1/HEL67 é mais abundante na fase promastigota, enquanto a DED1-2 predomina na fase amastigota (Zinoviev *et al.*, 2012).

A partir de análises bioinformáticas envolvendo a sequência consenso de um subconjunto da subfamília Ded1/DDX3, foi possível identificar que as proteínas DED1-2 e DED1-1/HEL67 de *Leishmania infantum* e *Trypanosoma brucei* compartilham parcialmente características estruturais e funcionais (Floor *et al.*, 2016; Mokdadi *et al.*, 2021). No caso específico da DED1-1/HEL67, essa proteína tem se mostrado essencial para o metabolismo de RNA, além de desempenhar papéis fundamentais na infectividade e diferenciação celular em *L. infantum* e *L. major*. Um estudo funcional em *L. infantum* demonstrou que a deleção genômica de DED1-1/HEL67 resultou em uma redução significativa do crescimento das formas promastigotas, além de prejudicar a diferenciação para a forma amastigota (Satish Chandra Pandey *et al.*, 2020; Padmanabhan *et al.*, 2012, 2016).

Em *L. donovani*, a DED1-1/HEL67 também se mostrou relevante como alvo vacinal, uma vez que uma vacina candidata contra a leishmaniose visceral foi proposta com base na mutação nula da DED1-1/HEL67 (*LdHel67*^{-/-}), que impediu a diferenciação para amastigotas axênicos. Como consequência, os parasitas

tornaram-se incapazes de infectar hamsters, além de induzirem uma resposta imune protetora sugerindo o potencial dessa abordagem para estratégias profiláticas em leishmanioses causadas por *L. infantum* (Satish Chandra Pandey; Pande; Samant, 2020).

Estudos subsequentes sobre o processo de iniciação da tradução nos tripanosomatídeos demonstraram que ambas as proteínas homólogas de Ded1p/DDX3 se associam ao complexo de ligação ao *cap*, sugerindo funções específicas na regulação da tradução em diferentes estágios do desenvolvimento (Zinoviev *et al.*, 2011; Hilliker *et al.*, 2011). Ensaio realizados em *Leishmania infantum* e *Leishmania amazonensis*, confirmaram a presença das proteínas DED1-1/HEL67 e DED1-2 associadas ao complexo EIF4E3/EIF4G4 em ambas as espécies de *Leishmania*. Esses resultados sugerem uma possível conservação funcional dessas RNA helicases *DEAD-box* e sua associação com um dos complexos semelhantes ao eIF4F mais bem caracterizados em tripanosomatídeos. A conservação dessas interações entre diferentes espécies reforça a relevância do complexo EIF4E3/EIF4G4 como um elemento chave na regulação da tradução em *Leishmania*, além de destacar o papel funcional de helicases como a DED1-1/HEL67 em processos pós-transcricionais relacionados ao desenvolvimento e infectividade do parasita (Brito, 2023).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar de forma comparativa, o perfil de proteínas co-precipitadas com as helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67, bem como a associação destas com complexos do tipo eIF4F de *Leishmania infantum* na fase exponencial da forma promastigota do parasita.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de expressão das proteínas EIF4AI e DED1-1/HEL67 fusionadas a epítipo específico, em linhagens transgênicas de *Leishmania infantum*.

Definir o perfil completo de proteínas co-precipitadas com as helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67, na fase exponencial da forma promastigota do parasita.

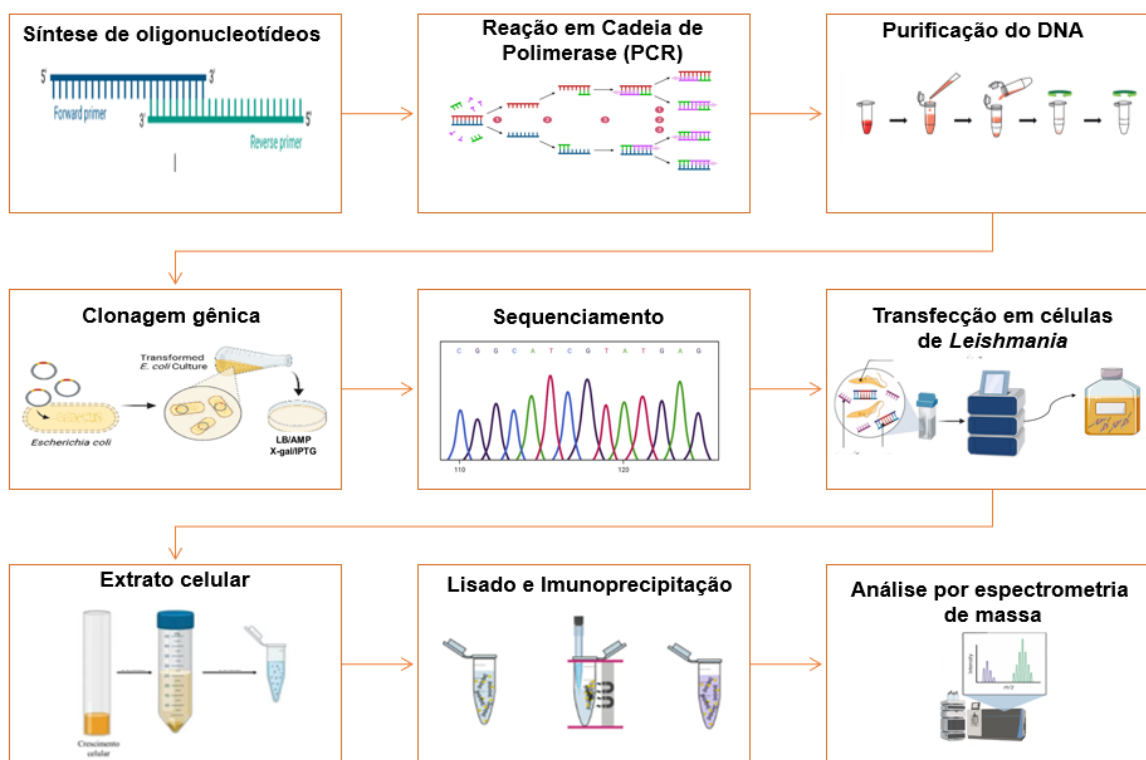
- Identificar possíveis associações das helicases-alvo com complexos do tipo eIF4F, bem como com demais fatores envolvidos na iniciação da tradução.

- Determinar os compartimentos celulares das proteínas associadas às RNA helicases-alvo.

4. Material e Métodos

A Figura 8 apresenta uma síntese das abordagens metodológicas que foram realizadas neste trabalho para avaliar a interação das helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67 com complexos do tipo eIF4F e outras proteínas associadas ao metabolismo de RNAs de *Leishmania infantum*.

Figura 8: Etapas dos procedimentos metodológicos.



Fonte: elaborada pela autora (2025).

4.1 Extração do DNA genômico de *L. infantum*

Para a etapa de extração de DNA genômico, células de *L. infantum* em meio Schneider foram cultivadas até atingirem uma concentração de 1×10^7 em 10 ml. Após centrifugações ($\sim 3000 \times g$ por 10 minutos), obteve-se um sedimento de cerca de 1×10^8 células. O sedimento resultante foi ressuspensionado com o tampão apropriado para a lise celular e extração do DNA, seguindo o protocolo do kit de extração “DNeasy Mini Kit (Qiagen)”. Para isso ao sedimento foi adicionado 500 μ l do reagente DNAzol e, após ressuspensão branda, adicionado 500 μ l de etanol, sendo pipetado pela parede do tubo lentamente. Após adição do etanol, e homogenização branda, o DNA precipitado foi retirado com o auxílio de alça bacteriológica, e transferido para um novo tubo e ressuspensionado em 200 μ l de água ultrapura. O DNA em solução foi então quantificado no NanoDrop e, em paralelo, avaliado em um gel de agarose 1%, para confirmação da qualidade do DNA obtido.

4.2 Desenho de primers

Para realizar a reação em cadeia da polimerase (PCR) dos genes de interesse EIF4AI (*LINF_010012800*) e DED1-1/HEL67 (*LINF_320009100*), foi realizado o desenho dos primers de cada um dos genes, utilizando o banco de dados TriTrypDB (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app/>) para se adquirir a sequência de nucleotídeos de cada gene. Em seguida, através do programa de APE ou EditSeq foi realizado o desenho dos primers de cerca de 20 nucleotídeos.

4.3 PCR - Reação em cadeia da polimerase

Para amplificação dos genes de interesse, foi realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como molde o DNA genômico extraído de *L. infantum*, utilizando diferentes condições para cada gene que seria amplificado. Foram amplificados os genes codificantes do EIF4AI (*LINF_010012800*) e DED1-1/HEL67 (*LINF_320009100*) seguindo as condições recomendadas pelo sistema Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs, Thermo Científico®) e determinando a temperatura de anelamento de cada primer através da ferramenta Oligo Calc: Oligonucleotide Properties Calculator (<http://biotools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>) (Tabela 1).

Tabela 1: Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes.

Primers	Sequência 5'-3'	Tamanho do amplicon
EIF4AI F	<u>GGATCC</u> ATGGCGCAGAATGATAAGATCG	1212 pb
EIF4AI R	<u>AAGCTT</u> CTCGCCAAGGTAGGCAGCGA	
DED1-1/HEL67 F	GC <u>GGATCC</u> ATGTATAAGAATCAGGCG	1845pb
DED1-1/HEL67 R	<u>AAGCTT</u> CTGACCAAAGACGTCAGA	

Legenda: Sequências sublinhadas correspondem aos sítios de enzimas de restrição utilizados; AAGCTT – HindIII (vermelho) e GGATCC – BamHI (azul).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

4.4 Purificação de DNA

Os fragmentos amplificados, após serem submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% e visualizados em fotodocumentador, foram purificados com excisão da banda correspondente ao tamanho do gene. A purificação foi realizada por meio do sistema “*GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Cytiva)*”, seguindo o protocolo do fabricante.

4.5 Clonagem em pGEM®-T Easy

Para a clonagem, foi realizada primeiro a adenilação dos fragmentos amplificados com a enzima *GoTaq® DNA Polymerase* (Promega) com a reação incubada em termociclador a 72°C por 30 min. A reação de ligação no plasmídeo pGEM®-T Easy foi então realizada de acordo com o fabricante pGEM®-T Easy Vector Systems (Promega), incubando-se em termociclador a 16°C por 16 h.

4.6 Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial

Para realização da transformação bacteriana com as construções plasmidiais no vetor pGEMT-Easy foi utilizado o protocolo de choque térmico em bactéria *Escherichia coli* linhagem Top10. Para isso, cerca de 50 µL das células competentes de *E. coli* foram transformadas com metade da ligação contendo o DNA recombinante, submetendo a amostra a uma incubação inicial por 30 minutos em gelo, seguida de 45 segundos em 42°C e 2 minutos em gelo. As transformações foram então semeadas em placa de Petri contendo meio Ágar LB (Luria Bertani)

sólido, com adição de ampicilina (100 µL/mL) e previamente suplementado com X-GAL (50 mg/mL) e IPTG - Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido (1 M) em proporção molar 1:2. Colônias brancas foram inoculadas em meio LB líquido e incubadas em agitador orbital à 37°C por aproximadamente 16 horas. Em seguida, a extração plasmidial foi realizada utilizando o sistema *Quick-DNA™ Miniprep Kit* - Zymo Research, conforme orientações do fabricante. Para se confirmar a extração e a clonagem, os plasmídeos foram submetidos à digestão enzimática com a enzima de restrição EcoRI (New England Biolabs), com sítios de corte presente no vetor.

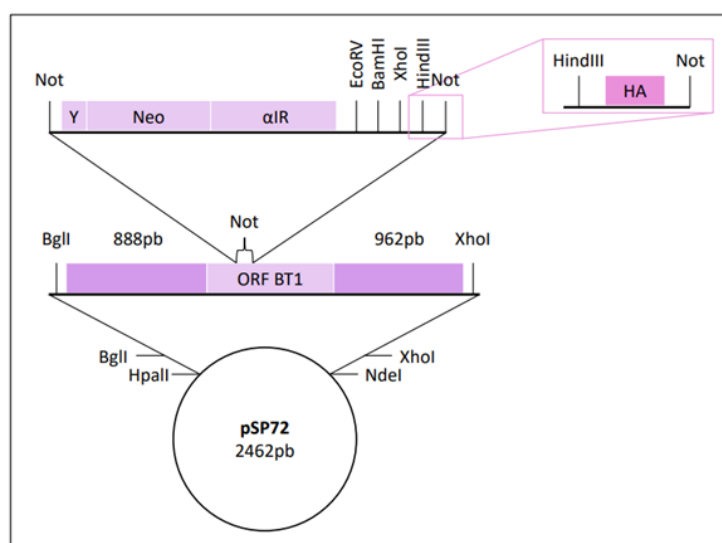
4.7 Sequenciamento de DNA

Com a confirmação do padrão de digestão característico a cada gene alvo desse estudo, as amostras de DNA recombinante oriundas da clonagem foram enviadas para sequenciamento capilar de *Sanger ABI Prism 3100* (Applied Biosystems®) disponível no Núcleo de Plataforma Tecnológica do Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz, Pernambuco. A integridade das sequências foi então validada através de comparação com o gene de referência correspondente ao gene clonado, anexada juntamente com os clones sequenciados em programas como Seqman e SeqBuilder (DNASTAR®).

4.8 Subclonagem dos genes em vetor de expressão de *Leishmania infantum*

Após a confirmação do sequenciamento, foi realizada a recuperação dos insertos clonados no vetor pGEM®-T Easy, através de uma dupla digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III das construções no pGEM®-T Easy. De forma paralela também foi realizada, através de dupla digestão com *Bam*HI e *Hind*III, a recuperação do vetor pSP-BT1-YneoαIR-HA. O vetor pSP-BT1-YneoαIR, além de conter o gene de resistência à neomicina como marcador de seleção, codifica o peptídeo HA (hemaglutinina) à jusante do sítio de clonagem *Hind*III (Figura 9). Uma extração plasmidial contendo este vetor também foi submetida à digestão de 5 µg do seu conteúdo com as mesmas enzimas utilizadas para a liberação dos insertos. Os fragmentos de ambas as digestões foram purificados por meio do sistema *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit*, seguindo o recomendado pelo fabricante.

Figura 9: Esquema do plasmídeo pSP-BT1-YneoαIR. O plasmídeo pSP-BT1-YneoαIR provém de alterações do pSP72.



Legenda: As modificações envolvem a adição da ORF do BT1 contendo o gene de resistência à neomicina e de uma sequência codificante do epítipo de hemaglutinina após o sítio *HindIII*. Fonte: adaptada de [Padmanabhan et al. 2012; Cavalcanti, 2018] pela autora.

Para a subclonagem, o vetor linearizado e purificado foi utilizado para a ligação com os insertos pela ação da *T4 DNA ligase* (New England Biolabs). A reação de ligação passou pelos mesmos processos de transformação bacteriana, extração plasmidial, confirmação por digestões e envio para o sequenciamento e as análises de sequências, como previamente descrito.

4.9 Cultivo e transfecção de células de *Leishmania infantum*

Células de *Leishmania infantum* (cepa: JPCM5) foram mantidas em crescimento logarítmico através de repasses em meio Schneider pH 7,2 com suplementação de 10% de Soro Fetal Bovino (SFB) e 0,1% de solução de Penicilina e Streptomicina (Sigma-Aldrich). O crescimento se deu em estufa BOD a 26°C. As células foram transfectadas, com DNAs episomais e, após recuperação, o seu crescimento foi acompanhado através da contagem de células a partir de inóculos de 1×10^6 células por mL. O acompanhamento diário permitiu a observação da densidade celular, motilidade, morfologia e viabilidade dessas linhagens. Para cada transfecção, aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial foram utilizadas para a realização de eletroporação com o DNA recombinante. Após centrifugação ($\sim 1700 \times g$ por 5 minutos) de volume compatível com a quantidade de células necessária, o sedimento gerado foi lavado com 1 mL de tampão Hepes-NaCl pH 7,05 (Hepes 20 mM, NaCl 85 mM, KCl 5 mM, Na_2PO_4 0,7 mM e glicose 20 mM) e ressuspenso em 450 μL do mesmo tampão. Em

seguida, as células foram transferidas para cuvetas de eletroporação de 2 mm (Bio-Rad) contendo de 5 a 10 µg do DNA plasmídial a ser transfectado e então, mantidas no gelo durante 10 minutos. Para o controle negativo foi utilizado o mesmo procedimento, porém sem a presença de DNA.

As células foram eletroporadas com 1 pulso de 450 Volts e capacitância de 500 µF, utilizando o eletroporador *Gene Pulser Xcell™ system (BIO-RAD)*. Após o choque, o material foi repassado para meio Schneider pH 7,2 e incubado na B.O.D a 26°C, por 24 horas, antes da pré-seleção no mesmo meio em presença de neomicina G418 a 0,04 mg/mL. Na seleção final foi feita a passagem de 1 mL da pré-seleção em 9 mL de meio Schneider com neomicina G418 a 0,08 mg/mL, com as culturas incubadas em B.O.D à 26°C por aproximadamente 15 dias ou até apresentarem crescimento celular consistente.

4.10 Obtenção do extrato total

Cerca de 2×10^8 células de *L. infantum* em crescimento exponencial, transgênicas ou não, foram centrifugadas por $\sim 1700 \times g$ por 5 minutos e posteriormente lavadas em tampão fosfato salino (PBS) à 4°C. Após uma nova centrifugação, o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra para gel de SDS-PAGE (15% SDS, 1 M Tris-HCl, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 µL/mL de 2-mercaptoetanol, pH 6,8) e submetido à fervura a 100°C por 5 minutos, seguido de armazenamento à -80°C para posterior fracionamento em gel SDS-PAGE e análise por ensaio de *Western-blot*. Vale ressaltar, que a concentração final foi de 5×10^5 células/µL, onde 10 µL foram aplicados por poço, resultando em um total de 5×10^6 por poço do gel.

4.11 Curva de crescimento celular

A princípio, foi realizada uma expansão celular tendo de início 1×10^6 células por mL de meio, sendo incubadas durante cerca de 48 a 72 horas em estufa B.O.D a 26°C , permitindo que as células pudessem atingir a fase final de crescimento exponencial (2×10^7 células/mL). Após 72 horas, foi realizada a contagem em câmara de *Neubauer*, com o intuito de diluir as culturas para fase exponencial, em uma concentração de 10^6 células/mL (estágio inicial 0h). Em 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h pós-curva, foram retiradas alíquotas das culturas, correspondendo a uma concentração total de 5×10^7 células. A cada dia, as alíquotas foram centrifugadas a $\sim 1700 \times g$ por 5 minutos e o sedimento resultante ressuspenso em 100 μL de tampão de corrida para SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol e 50 $\mu\text{L/mL}$ de 2-mercaptoetanol). Posteriormente, foram submetidas à fervura por 3 minutos a 100°C e aplicado 10 μL de cada amostra no gel SDS-PAGE para posterior análise da expressão proteica por *Western-blot* (WB).

4.12 *Western-blot* (WB)

As amostras de extratos proteicos foram submetidas ao ensaio de *Western-blot* onde, após corrida eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15%, as proteínas no gel foram transferidas para membrana de *PVDF* (Immobilon-P, Millipore®) através do equipamento *Power Blotter XL System* (ThermoFischer). A membrana foi então bloqueada durante uma hora em solução de leite 5% contendo TBS-Tween-20 1% (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5) a temperatura

ambiente. Foi feita então a incubação de anticorpos primários anti-Hemaglutinina (Abcam) na diluição de 1:3000 ou 1:5000, em solução de leite 5% em TBS-Tween-20 1% durante uma hora. Após três lavagens em TBS-Tween-20 1% por dez minutos cada, foi realizada a incubação do anticorpo secundário (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase) (Jackson) na diluição de 1:10000 em solução de leite 5% em TBS-Tween-20 1% por mais uma hora, seguida de mais três lavagens com TBS-Tween-20 1% por dez minutos cada lavagem. A revelação das bandas se deu por meio de uma reação de quimiluminescência com a adição do *Immobilon Forte Western HRP Substrate* (Merck Millipore) durante dois minutos, com leitura através do equipamento *iBright Imaging Systems* (Thermo Fischer Scientific), com exposições que variaram entre dez segundos e três minutos, de acordo com a intensidade das reações.

4.13 Preparação de lisados celulares

Para a obtenção de fração citoplasmática, células de *L. infantum* expressando as proteínas EIF4A1 e DED1-1/HEL67 fusionadas ao epítipo marcador HA, ou células não transfectadas (controle negativo), foram expandidas em triplicata com densidade inicial de 1×10^6 por mL em 30 mL, tendo atingido a fase final do seu crescimento exponencial entre 48 e 72 horas. Ao atingir a densidade esperada (1×10^7) foram retiradas alíquotas para preparação de extrato celular e para se confirmar a presença das proteínas de interesse por SDS-PAGE e *Western-blot*, como já descrito. Na preparação dos lisados celulares, fração citoplasmática, sedimentos celulares coletados como já descrito, com um total de 1×10^8 células, foram primeiro lavados com PBS gelado contendo 10% de solução

de inibidores de protease (*EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* da Roche®). Os novos sedimentos foram então ressuspensos em tampão de lise (20 mM HEPES-KOH pH 7,4, 75 mM CH₃CO₂K, 4 mM C₄H₆MgO₄, 2 mM de DTT), também suplementado com o inibidor de protease citado anteriormente, e submetidos ao processo de lise por cavitação, utilizando cilindro de alta pressão de nitrogênio, com pressão atmosférica de 70 Bar por 15 minutos, a 4°C. Após lise por descompressão, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos à ~19000xg à 4°C, com o sobrenadante, o lisado celular ou fração citoplasmática solúvel, armazenado a -80°C.

4.14 Ensaios de imunoprecipitação e análise por espectrometria de massas

Nestes ensaios foi utilizada resina formada por microesferas magnéticas (beads magnéticas) anti-HA (*Pierce™ Anti-HA Magnetic Beads Thermo Scientific™*), previamente lavada três vezes com 500 µL PBS a 4°C contendo inibidores de proteases (*EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (Roche®). Nos ensaios, realizados em triplicata para cada proteína e controle negativo, 5 µL da resina lavada foram incubados com 250 µL de lisado celular sob agitação branda por 30 minutos a 4°C. Após separação da resina, o sobrenadante depletado foi coletado e a resina lavada três vezes com PBS, como já descrito. A eluição das proteínas retidas na resina foi realizada por ressuspensão em 50 µL da solução SDS 2% + DTT 10mM e aquecimento a 99°C por 5 minutos. Os sobrenadantes correspondentes às imunoprecipitações, foram então acondicionados a -80°C para posterior envio para análise por espectrometria de massas. Alíquotas dos lisados

depletados, imunoprecipitados e resina pós-imunoprecipitação foram separadas para análise por SDS-PAGE e *Western-blot* com anticorpo anti-HA para confirmação da eficiência das IPs.

Após a confirmação, as imunoprecipitações foram enviadas em gelo seco para o núcleo de Plataforma Tecnológica de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas (Fiocruz - Curitiba) e após tripsinização foram direcionadas para análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS) no sistema de alta resolução Orbitrap Exploris 120 (Thermo Fischer Scientific). A análise dos dados se deu através da identificação de peptídeos que co-precipitaram com as proteínas de interesse.

Ao receber as análises, a identificação dos peptídeos foi realizada no *software* MaxQuant, utilizando os espectros de MS/MS obtidos na análise proteômica e o banco de proteínas do *TriTrypDB*. Para a análise estatística, foi utilizado o *software* Perseus. Inicialmente, os arquivos *proteinGroups.txt* gerados pelo MaxQuant foram importados e processados, sendo excluídas todas as entradas identificadas como contaminantes, *reverse hits* ou identificações apenas por *site*. As intensidades LFQ foram transformadas para escala $\log_2$, a fim de normalizar a distribuição dos dados.

As amostras foram agrupadas em duas categorias: proteína alvo e controle negativo, e para cada proteína foi calculada a diferença média de abundância entre os grupos. A comparação foi realizada por meio de teste *t* bilateral, que avalia diferenças de média em ambas as direções (aumento ou redução de abundância). Para minimizar o risco de falsos positivos decorrentes de múltiplos testes simultâneos, aplicou-se a correção de Benjamini–Hochberg, com *False Discovery*

Rate (FDR) estabelecido em 0,05. Os valores de p obtidos foram convertidos em $-\log_{10}(p)$ para posterior representação gráfica.

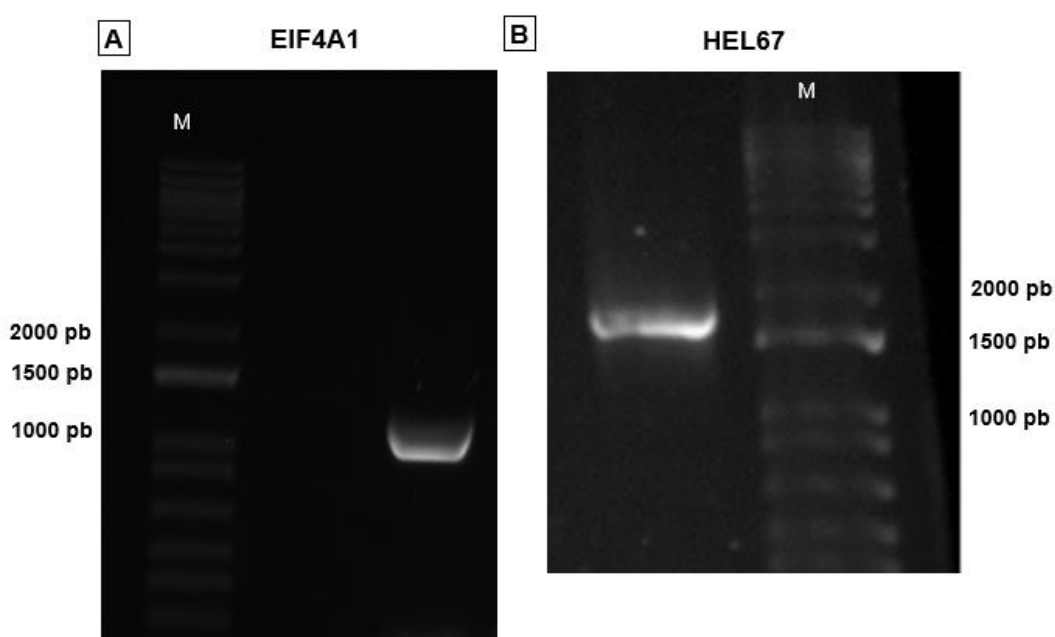
Os resultados foram visualizados em *Volcano plots*, nos quais o eixo X representa a diferença média entre os grupos (em escala $\log_2$) e o eixo Y indica a significância estatística ($-\log_{10}(p)$). Proteínas localizadas acima do limiar de significância e com variação positiva ou negativa acima dos limites estabelecidos foram consideradas diferencialmente expressas.

5. Resultados

5.1 Amplificação dos genes

Os genes codificantes das proteínas EIF4AI (*LINF_010012800*) e *DED1-1/HEL67* (*LINF_320009100*), foram amplificados apresentando os tamanhos esperados de 1212 pb e 1845 pb, respectivamente, conforme mostra a Figura 10. Com essa confirmação, os fragmentos foram purificados, quantificados e submetidos à adenilação para clonagem no vetor pGEM®-T Easy.

Figura 10: Amplificação dos genes das RNA helicases de *Leishmania infantum*.



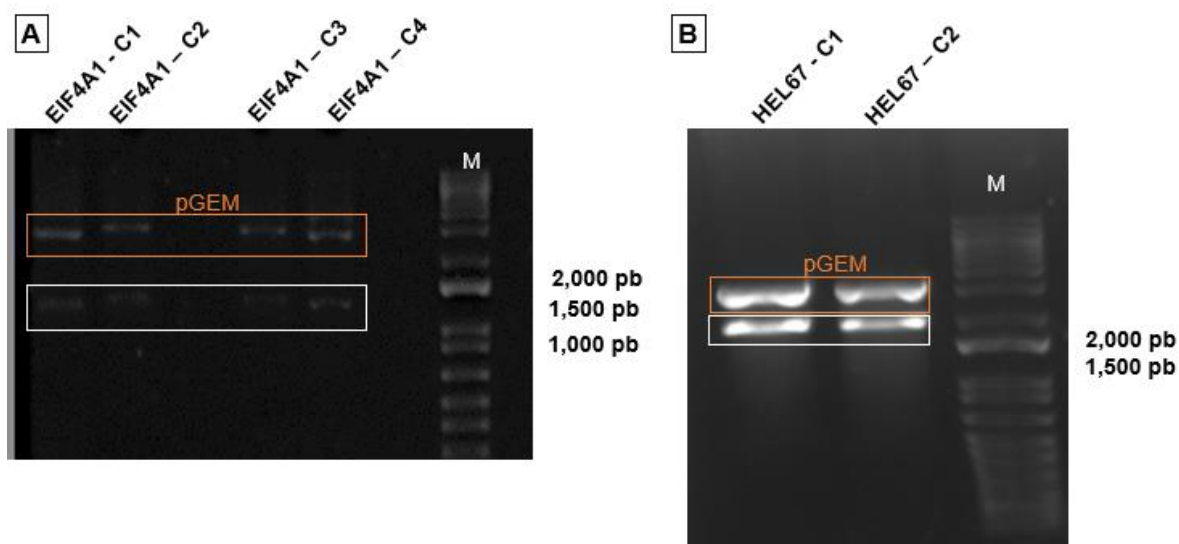
Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando o produto da amplificação por PCR dos genes EIF4AI e DED1-1/HEL67. Amplicons correspondentes ao tamanho de: (A) 1212 pb para EIF4AI e (B) 1845 pb para DED1-1/HEL67. M - À esquerda o marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (*Invitrogen*).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

5.2 Clonagem em vetor pGEM T-Easy

Após a purificação e adenilação, os genes das helicases foram clonados no vetor pGEM®-T Easy e utilizados para transformar células competentes de *E. coli*. O crescimento das colônias permitiu a amplificação do DNA recombinante, confirmando o sucesso da clonagem. Em seguida, o DNA plasmidial foi extraído por minipreparações e submetido à digestão enzimática com EcoRI, HindIII e BamHI, conforme mostrado na Figura 11. Os resultados obtidos demonstram o sucesso da clonagem, com a liberação dos fragmentos nos tamanhos esperados: 1212 pb para EIF4A1 e 1845 pb para DED1-1/HEL67, juntamente com o tamanho do vetor pGEM®-T Easy de aproximadamente 3000 pb.

Figura 11: Digestão em pequena escala das clonagens dos genes EIF4A1 e DED1-1/HEL67, com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III.



Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando a digestão enzimática das construções formadas pelos genes das RNA helicases com o vetor pGEM®-T Easy. (A) Digestão do gene EIF4A1/pGEM®-T Easy liberando o fragmento de 1212 pb. (B) Digestão do gene DED1-1/HEL67/pGEM®-T Easy liberando o fragmento de 1845 pb. C: clone. M: À direita dos géis, o marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (*Invitrogen*).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

Posteriormente, foi realizada uma confirmação da integridade da sequência do DNA clonado por meio de sequenciamento capilar de Sanger. Os clones de cada gene foram submetidos a essa análise e foi constatado 100% de identidade da sequência de DNA com o seu gene de referência correspondente no banco de dados do *TritypDB*.

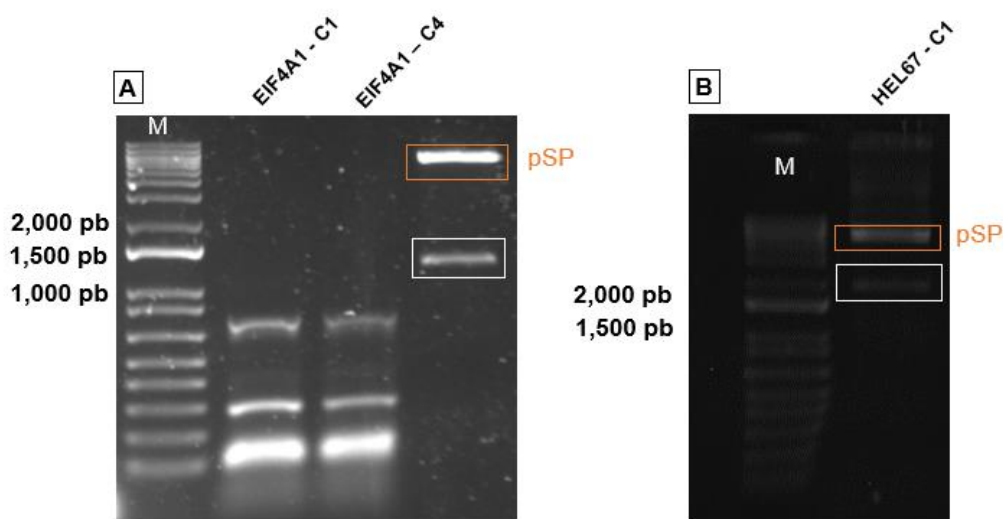
5.3 Subclonagem

A integridade e identidade das sequências correspondentes aos fragmentos clonados foram confirmadas por sequenciamento, e um clone representativo de cada construção (pGEM®-T Easy-EIF4AI e pGEM®-T Easy-DED1-1/HEL67) foi selecionado para digestão enzimática em larga escala. Os fragmentos obtidos foram então ligados ao plasmídeo derivado do vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa (Padmanabhan et al., 2012), modificado pela inserção de oligonucleotídeos codificando para o peptídeo HA imediatamente após o sítio de *HindIII*. Este plasmídeo pode ser utilizado com sequências codificadoras onde o sítio desta enzima tenha sido adicionado imediatamente antes do códon de parada, de forma que este códon esteja ausente do fragmento amplificado. O referido vetor permite a integração de genes heterólogos dentro do gene BT1 de *L. infantum*, conferindo resistência à neomicina e expressão constitutiva das proteínas de interesses. Com isso, as células de *L. infantum* transfectadas expressam tanto as proteínas endógenas quanto as proteínas contendo as sequências marcadoras, possibilitando a análise dos efeitos desta superexpressão.

A subclonagem dos genes de interesse entre os sítios *BamHI/HindIII* do vetor pSPBT1-Y-Neo-alfa-HA permitiu então a obtenção das seguintes construções plasmidiais: EIF4AI/pSP-BT1-Y-Neo-alfa e DED1-1/HEL67/pSP-BT1-Y-Neo-alfa-

HA. Estas foram confirmadas por digestão utilizando as enzimas *Bam*HI/*Hind*III, liberando assim os fragmentos esperados (Figura 12).

Figura 12: Genes EIF4AI e DED1-1/HEL67 inseridos no vetor pSP-BT1-YNeo-alfa-HA – confirmação de subclonagem.



Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando a digestão enzimática das construções formadas pelos genes das RNA helicases com o vetor pSPBT1-Y-Neo-alfa-HA. (A) Digestão do gene EIF4AI/ pSPBT1-Y-Neo-alfa-HA liberando o fragmento de 1212 pb. (B) Digestão do gene DED1-1/HEL67/pSPBT1-Y-Neo-alfa-HA liberando o fragmento de 1845 pb. C: clone. M: À esquerda dos géis, o marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (*Invitrogen*).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

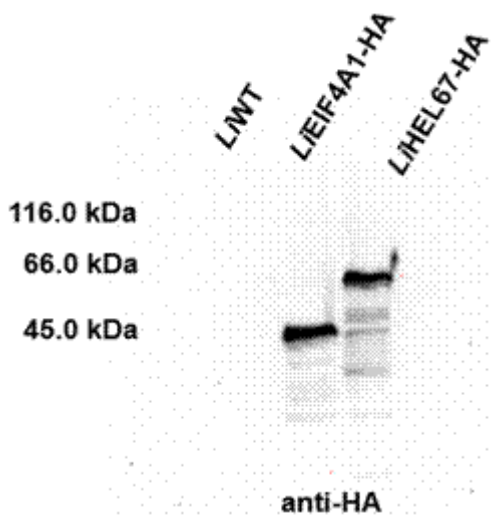
5.4 Análise da superexpressão das proteínas fusionadas a HA em *L.*

infantum

Células na fase exponencial foram utilizadas na preparação de extratos celulares para fracionamento em gel SDS-PAGE e lisados citoplasmáticos, para uso futuro em ensaios de imunoprecipitação. As células transfectadas não sofreram nenhuma mudança morfológica ou de motilidade que pudesse ser observada em visualização em microscópio óptico.

Ao concluir a seleção das transfecções, foram realizados três repasses por repique com antibiótico neomicina G418 (0,08 mg/mL) (Sigma) em meio Schneider pH 7,2 e seu crescimento foi acompanhado diariamente por visualização em microscópio invertido. Foram produzidos então extratos proteicos, com o intuito de confirmar a expressão das proteínas através de ensaio de *Western blot* com o uso do anticorpo anti-HA (Abcam®). Com a revelação da reação, foi possível identificar a expressão das proteínas fusionadas com o epítipo HA, com o EIF4AI apresentando peso molecular aproximado de ~45 kDa e a DED1-1/HEL67 de ~66 kDa, conforme visualizada na (Figura 13), fusionadas com o epítipo HA de 6,6 kDa.

Figura 13: Teste de expressão das linhagens EIF4AI-HA e DED1-1/HEL67-HA.

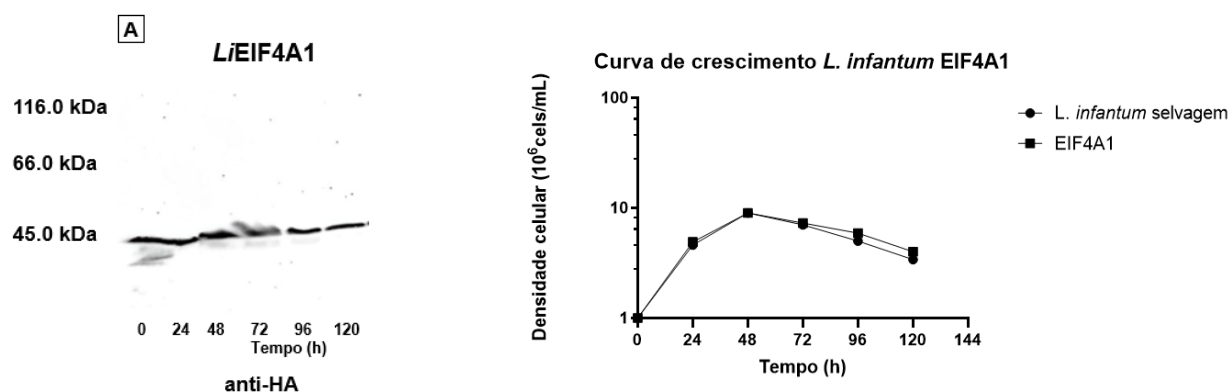


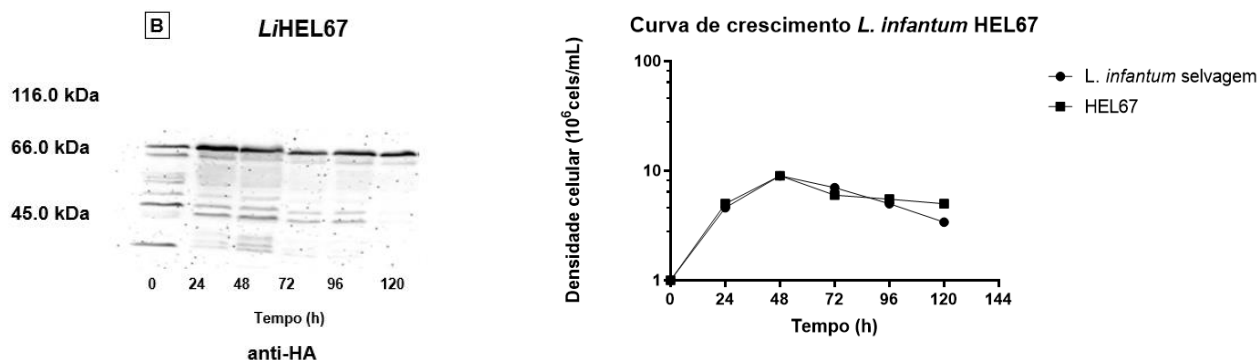
Legenda: Ensaio de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-HA. O extrato foi fracionado em gel SDS-PAGE 15% e a membrana foi incubada com o anticorpo anti-HA Abcam®, na diluição de 1:3000. *LWT*: controle da linhagem selvagem que corresponde a células de *L. infantum*.
Fonte: elaborada pela autora (2025).

5.5 Curvas de crescimento das linhagens de *Leishmania infantum* expressando as proteínas fusionadas ao epítipo HA

Além do teste inicial de expressão das proteínas, foi realizada uma avaliação das linhagens expressando as EIF4A1 e DED1-1/HEL67 em curvas de crescimento no período de 0 a 120 horas, com o intuito de verificar se a expressão induzida dessas proteínas se mantinha no período de 48 horas, em fase estacionária do crescimento. Os extratos proteicos foram submetidos a eletroforese e *Western-blot*, como já descrito, sendo possível verificar a expressão contínua de ambas as proteínas até 48h (Figura 14).

Figura 14: Avaliação do perfil de expressão e curva de crescimento das linhagens expressando as proteínas EIF4A1-HA e DED1-1/HEL67-HA.





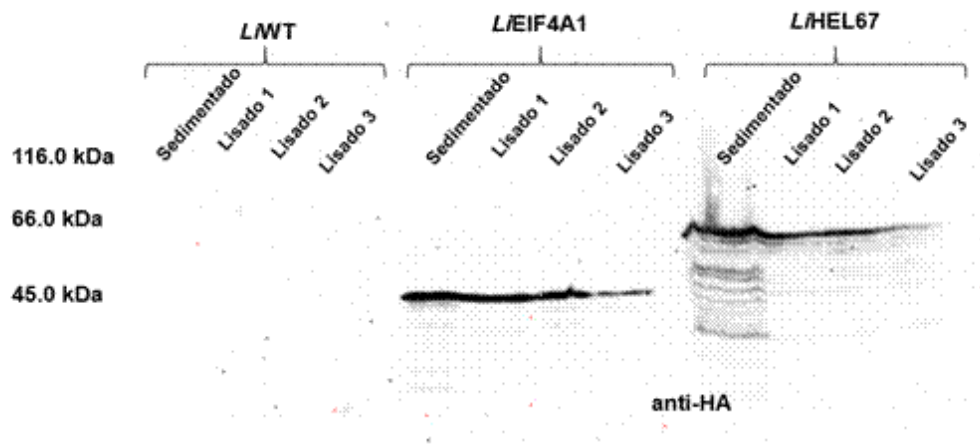
Legenda: Curvas de crescimento no período de 0 a 120 horas e ensaio de *western-blot* avaliando o impacto da expressão das proteínas EIF4AI-HA e DED1-1/HEL67-HA no crescimento das linhagens transgênicas de *L. infantum*. (A) Gráfico representativo da curva de crescimento, evidenciando a média de crescimento da linhagem expressando o EIF4AI-HA (*LiEIF4AI*), comparando a média de crescimento da cultura controle da linhagem selvagem que corresponde às células de *L. infantum* (*LWT*). (B) Gráfico representativo da curva de crescimento, evidenciando a média de crescimento da linhagem expressando a DED1-1/HEL67-HA (*LiHEL67*), também em comparação com linhagem selvagem controle.

Fonte: elaborada pela autora (2025).

5.6 Avaliação da presença das proteínas investigadas em frações citoplasmáticas solúveis

Após a confirmação da expressão das proteínas fusionadas ao epítipo HA, foram obtidas frações solúveis citoplasmáticas (lisados) das respectivas linhagens celulares através da lise por cavitação. Alíquotas em triplicata de cada lisado celular foram fracionadas em gel SDS-PAGE para a verificação da presença nas mesmas das proteínas recombinantes correspondentes (Figura 15). Os resultados confirmam a presença das proteínas EIF4AI-HA e DED1-1/HEL67-HA nas frações solúveis esperadas e sua ausência em lisados de células da linhagem selvagem não transfectada usadas como controle. Também nota-se uma quantidade substancial das proteínas EIF4AI e DED1-1/HEL67 na fração do sedimento pós-lise, não solúvel.

Figura 15: Ensaio de *Western blot* das frações sedimentares e citoplasmáticas das linhagens *LiEIF4A1* e *LiHEL67*, todas marcadas com HA.



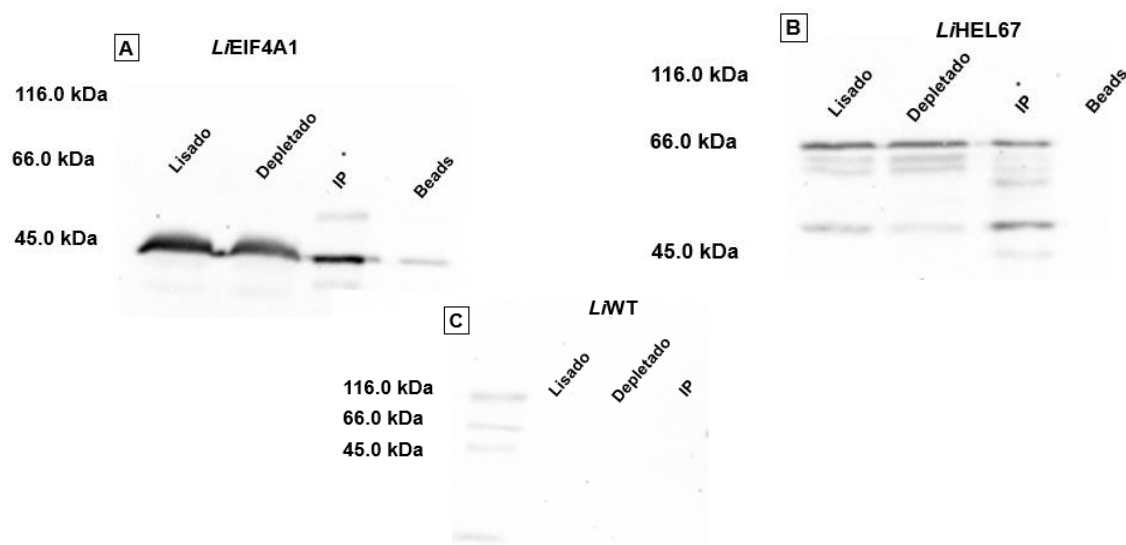
Legenda: Ensaio de *western blot* para análise das frações sedimentares e citoplasmáticas pós-lise por cavitação das linhagens *LiEIF4A1* (~45 kDa) e *LiHEL67* (~66 kDa). *LWT*: controle da linhagem selvagem que corresponde a células de *L. infantum*.

Fonte: elaborada pela autora (2025).

5.7 Análise da expressão e detecção de proteínas fusionadas ao epítopo HA

A confirmação da presença das proteínas investigadas nos respectivos lisados permitiu a utilização das amostras para ensaios de imunoprecipitação. Nessa etapa, alíquotas de lisado celular, fração depletada e fração imunoprecipitada (lisados e esferas magnéticas anti-HA) foram submetidos a novos ensaios de *Western blot* com anticorpo anti-HA (Figura 16), confirmando a imunoprecipitação. Com a conclusão destes experimentos o produto das imunoprecipitações foi enviado para análise de proteínas co-precipitadas por espectrometria de massas, atividade realizada na plataforma de proteômica do Instituto Carlos Chagas, com os resultados obtidos descritos nos tópicos a seguir.

Figura 16: Ensaio de *Western blot* dos lisados e imunoprecipitações das linhagens *LiEIF4AI* e *LiHEL67* todas marcadas com HA.



Legenda: Ensaio de *Western blot* de confirmação das imunoprecipitações (IP) das proteínas EIF4AI-HA (*LiEIF4AI*) (A), DED1-1/HEL67 (*LiHEL67*) (B) e controle da linhagem selvagem que corresponde a células de *L. infantum* (*LiWT*) (C).

Fonte: elaborada pela autora (2025).

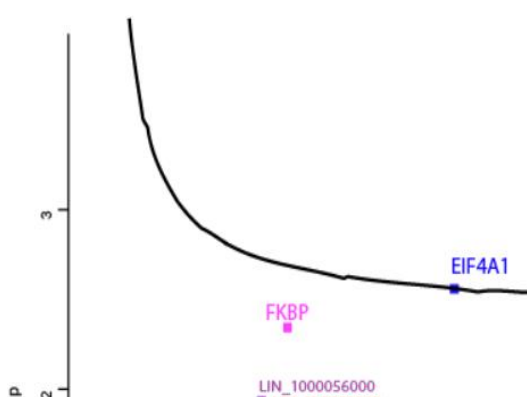
5.8 Identificação de proteínas parceiras das helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67

A partir dos dados obtidos por espectrometria de massas, foi realizada uma análise dos gráficos de dispersão do tipo *volcano plot*, gerados no software Perseus e detalhando as proteínas coimunoprecipitadas com as RNA helicases-alvo (EIF4AI e DED1-1/HEL67) em *Leishmania infantum*, fusionadas ao epítipo HA. Esta análise fornece informações detalhadas sobre a dinâmica e a composição temporal desses complexos proteicos. O conjunto de resultados obtidos estão representados nas Figuras 17 e 18, onde o eixo X representa a diferença de intensidade entre as amostras contendo EIF4AI-HA e DED1-1/HEL67-HA e o controle negativo (*LiWT*), enquanto o eixo Y indica a significância estatística das diferenças observadas (-log p).

Nas condições avaliadas, a análise dos gráficos de dispersão das proteínas co-precipitadas com a *LiEIF4AI*-HA (Figura 17) revelou uma predominância de proteínas ribossomais, como RPS15A sendo uma proteína do componente da subunidade ribossomal 40S e está envolvida na função geral do ribossomo, como também demonstrou a presença de proteínas de choque térmico, chaperonas e chaperoninas e enzimas metabólicas que apresenta um papel vital no metabolismo do parasita, sendo considerada essencial para a sua sobrevivência.

Proteínas previamente descritas como associadas a tradução foram também identificadas, se destacando o próprio *EIF4AI*, e bem como *EIF3K*, *EIF3A*, *EIF2A*, *EIF4G4*, *EIF4E3*. Além destas, proteínas hipotéticas foram detectadas com altos valores de significância quando comparadas ao controle negativo, como as *LIN_120009000*, *LIN_360019900*, *LIN_1100139000* e *LIN_360062000*. Também foram identificadas, em valor baixo, a *DED1-1/HEL67* e proteínas de ligação ao RNA que atuam tanto como helicases, envolvidas no metabolismo e remodelamento de RNA, ou com o domínio RRM1, associado à ligação e regulação pós-transcricional de moléculas de RNA. Em conjunto, esses achados reforçam o papel do *EIF4AI* associado a complexos multiproteicos que interagem em sinalização, controle do ciclo celular e metabolismo, aspectos essenciais para a adaptação dos tripanosomatídeos.

Figura 17: Gráfico de dispersão da espectrometria de massas da *LiEIF4AI*-HA.

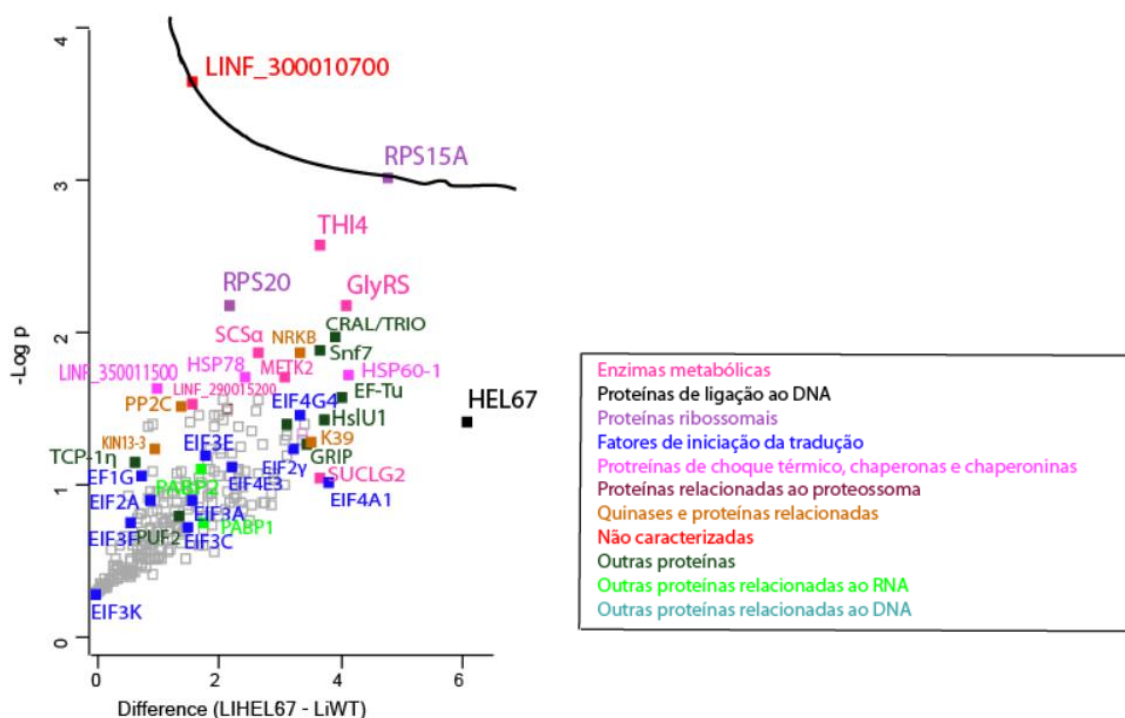


Legenda: Gráfico de dispersão mostrando as proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens EIF4AI e a linhagem controle LiWT de *Leishmania infantum* após 24 horas de crescimento celular. O eixo X representa a diferença de abundância relativa das proteínas entre as duas linhagens (T-difference EIF4AI - LiWT), e o eixo Y mostra o valor de significância estatística da diferença observada ($-\log_{10}P$). Cada ponto corresponde a uma proteína individual; as proteínas com maior significância estatística e relevância funcional são destacadas em cores.
 Fonte: elaborada pela autora (2025).

Com relação a análise do gráfico das proteínas co-precipitadas com a DED1-1/HEL67-HA (Figura 18), entre vários possíveis parceiros funcionais de diferentes classes, destacam-se as proteínas ribossomais, como RPS15A e enzimas metabólicas. Também foram identificados fatores relacionados ao processo de tradução, incluindo o EIF4G4, EIF3E, EIF2 γ , EIF4AI, EIF4E3, EIF3C, EIF3A, EIF2A, EIF3F, EF1G e EIF3K, indicando uma possível associação da DED1-1/HEL67 com complexos de iniciação da tradução ou mecanismos de controle pós-transcricional, o que pode contribuir para a regulação da expressão gênica em diferentes fases do ciclo celular. Destaca-se também a presença de uma única proteína ainda não caracterizada, que apresenta valor significativo, como *LINF_300010700*. No conjunto, esses achados indicam potenciais interação da DED1-1/HEL67 que podem desempenhar papéis relevantes, mas que requerem investigações

adicionais para esclarecer suas funções e possíveis contribuições para os processos de regulação e diferenciação celular.

Figura 18: Gráfico de dispersão da espectrometria de massas da L/HEL67-HA.



Legenda: Gráfico de dispersão mostrando as proteínas diferencialmente expressas entre as linhagens DED1-1/HEL67 e a linhagem controle LiWT de *Leishmania infantum* após 24 horas de crescimento celular. O eixo X representa a diferença de abundância relativa das proteínas entre as duas linhagens (T-difference DED1-1/HEL67 - LiWT), e o eixo Y mostra o valor de significância estatística da diferença observada ($-\log_{10}P$). Cada ponto corresponde a uma proteína individual; as proteínas com maior significância estatística e relevância funcional são destacadas em cores.

Fonte: elaborada pela autora (2025).

5.9 Coprecipitação de fatores de tradução com RNA helicases-alvo

Para se investigar diretamente a associação das helicases EIF4A1 e DED1-1/HEL67 com fatores de tradução, foram avaliadas individualmente todos aqueles

que coprecipitaram com as proteínas alvo mesmo que com razões de enriquecimento menor do que 1,5 em relação ao controle negativo (Tabela 2).

Tabela 2: Fatores de tradução detectados na espectrometria de massas das proteínas EIF4AI e DED1-1/HEL67, marcadas com HA.

Proteínas IDs	Nome da proteína	Média de intensidade (EIF4AI)	Média de intensidade (HEL67)	Razão EIF4AI/ Controle	Razão HEL67/ Controle
LINF_250013100	EIF5A2	0,00E+00	5,43E+07	*	*
LINF_270023100	EIF4E1	0,00E+00	1,08E+06	*	*
LINF_010012900	EIF4AI	4,98E+09	9,42E+08	211,04	39,90
LINF_360047700	EIF3I	0,00E+00	2,18E+08	0,00	7,38
LINF_360070500	EIF4G4	3,39E+08	8,47E+08	2,29	5,72
LINF_150005500	EIF4G1	3,29E+07	8,83E+07	1,31	3,52
LINF_360081900	EIF3C	5,03E+07	2,09E+08	0,74	3,05
LINF_170020200	EIF3B	3,95E+07	1,05E+08	0,81	2,14
LINF_300036000	EIF3D	6,92E+07	1,50E+08	0,87	1,88
LINF_150021000	EIF4G2	0,00E+00	1,52E+07	0,00	1,79
LINF_100017900	EIF4G5	0,00E+00	1,75E+07	0,00	1,56
LINF_280032200	EIF4E3	6,65E+08	7,62E+08	0,97	1,11
LINF_090018100	eIF2 γ	2,08E+08	9,69E+08	0,24	1,10
LINF_160022100	EIF4G3	1,07E+08	7,63E+07	1,35	0,97
LINF_280029900	EIF3E	1,20E+08	2,25E+08	0,48	0,89
LINF_030014900	EIF2A	4,99E+09	3,47E+09	1,14	0,79

Legenda: Os resultados das proteínas que copurificam com a EIF4AI e DED1-1/HEL67 com razão $\geq 1,5$ em relação ao controle negativo. (*) - Proteínas não identificadas no controle.

Fonte: elaborada pela autora (2025).

As análises comparativas entre os coprecipitados das helicases evidenciaram que o EIF4AI de uma forma geral apresenta enriquecimento menor do que a helicase DED1-1/HEL67 em relação a diferentes fatores de tradução, quando comparado com o controle negativo. De fato, apenas a associação com o EIF4G4 mostrou um enriquecimento $\geq 1,5$ para o EIF4AI, indicando sua associação com um dos principais complexos do tipo eIF4F envolvidos na tradução geral em *Leishmania*, composto pelas subunidades EIF4E3 e EIF4G4. Ainda assim, o único enriquecimento observado maior para o EIF4AI do que a DED1-1/HEL67, ainda que menor do que 1,5, foi para o EIF4G3, possivelmente refletindo a interação já sabida

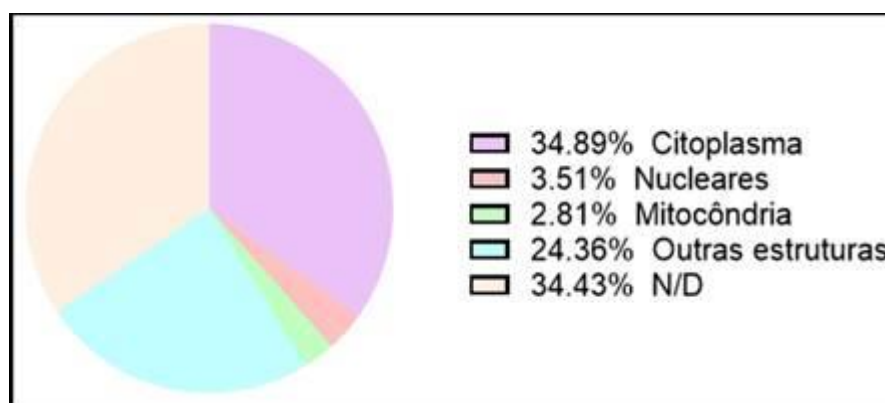
entre o EIF4AI e o complexo EIF4E4/EIF4G3. Já a DED1-1/HEL67 também demonstrou enriquecimento diferencial com a subunidade EIF4G4, sugerindo que ambas as proteínas podem integrar ou interagir funcionalmente com o segundo complexo eIF4F, caracterizado pela combinação EIF4E3/EIF4G4. Outra associação da DED1-1/HEL67 foi com o EIF4G1, indicando uma interação com um terceiro complexo do tipo eIF4F, formado pelas subunidades EIF4E5/EIF4G1.

A subunidade EIF4AI, também coprecipitou com a DED1-1/HEL67, mas a recíproca não foi verdadeira. Além das interações com as principais subunidades dos complexos eIF4F, a DED1-1/HEL67, mas não o EIF4AI, também se associou a diversos fatores de tradução amplamente conservados, como eIF2A, eIF2 γ , EIF5A2 e subunidades do complexo eIF3. De uma forma geral, os resultados obtidos reforçam a hipótese de que as helicases investigadas exercem funções complementares na regulação pós-transcricional da expressão gênica, possivelmente participando de etapas distintas do processo de tradução. As associações evidenciadas fornecem indícios da localização espacial e funcional dessas helicases em relação aos complexos tipo eIF4F, sugerindo seu potencial papel na regulação e organização da maquinaria de tradução em *L. infantum*.

5.10 Mapeamento subcelular de polipeptídeos interagindo com RNA helicases-alvo

As proteínas coprecipitados com as helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67 foram classificadas de acordo com a predição de sua localização subcelular, com base nas anotações de Gene Ontology (GO) disponíveis na plataforma *TriTrypDB* (Figura 18). Entre os transcritos identificados, 34,43% correspondem a genes cuja localização subcelular permanece não determinada (N/D), refletindo lacunas ainda existentes na anotação funcional desses genomas. Aproximadamente 35% das proteínas estão associadas ao citoplasma, 3% à mitocôndria, 24,36% a outras estruturas celulares e 3,51% correspondem a proteínas com localização nuclear.

Figura 19: Localização subcelular de proteínas que coprecipitam com a EIF4AI e DED1-1/HEL67.



Legenda: Representação da localização celular das proteínas co-precipitadas com a EIF4A e DED1-1/HEL67. Bege: não determinada; roxo: citoplasma; verde: mitocôndria; azul: outras estruturas; rosa: nucleares.

Fonte: elaborada pela autora (2025).

Os dados obtidos sugerem que as proteínas associadas às helicases-alvo apresentam uma notável diversidade funcional, com ênfase em transcritos que codificam proteínas de localização citoplasmática e estrutural. Essa predominância funcional reforça a ideia de que as helicases podem desempenhar papéis centrais na regulação pós-transcricional da expressão gênica, atuando em diferentes contextos celulares e possivelmente modulando processos específicos, como a organização e dinamismo do citoesqueleto, a motilidade celular e etapas de

diferenciação parasitária, indicando uma contribuição multifacetada dessas proteínas na fisiologia e adaptação do parasita.

6. Discussão

Os tripanosomatídeos apresentam várias peculiaridades no que diz respeito a sua biologia molecular. Diferentemente dos demais eucariotos, nestes organismos praticamente não há controle transcricional, sendo o controle da expressão gênica desempenhado em etapas posteriores à transcrição, principalmente através do controle da estabilidade e degradação dos mRNAs e da iniciação da tradução (Fernández-Moya; Estévez, 2010). O ciclo de vida destes parasitas é bastante complexo e o controle traducional da expressão gênica torna-se então um mecanismo bastante importante, uma vez que permite mudanças rápidas na concentração de proteínas codificadas, podendo promover mudanças na fisiologia e destino celular (Pichon *et al.*, 2012).

A literatura mostra que a identificação de múltiplos homólogos das subunidades do complexo eIF4F nos tripanosomatídeos ampliou as possibilidades para uma compreensão mais aprofundada do processo de tradução, facilitando a identificação de proteínas auxiliares que podem ter funções cruciais na tradução (Penteado *et al.*, 2024; Bezerra *et al.*, 2022). Neste estudo, buscou-se avaliar comparativamente a interação das helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67 com complexos do tipo eIF4F de *Leishmania infantum*, os quais são considerados componentes-chave no controle traducional desses parasitas.

Com a obtenção da superexpressão das proteínas e nos ensaios de imunoprecipitação, as amostras em triplicata referentes às proteínas EIF4AI e DED1-1/HEL67, foram enviadas para análise por espectrometria de massas, com o objetivo de identificar suas interações com os complexos tipo eIF4F e outras proteínas parceiras funcionais. As análises de lisados celulares mostrando tanto o EIF4AI como a DED1-1/HEL67 presentes na fração do sedimento pós-lise, contudo,

sugerem que essas proteínas podem também estar associadas a estruturas de tradução de maior tamanho, como polissomos e grânulos de estresse, ou organelas, como núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndrias, não rompidos após a cavitação.

Dentre as proteínas investigadas aqui, a RNA helicase EIF4AI é uma das principais parceiras nos complexos eIF4F em organismos eucariotos, desempenhando um papel fundamental na remodelagem da estrutura do mRNA para facilitar a entrada do ribossomo. Como uma helicase dependente de ATP, o EIF4AI atua desenrolando sequências estruturadas na região 5' UTR dos mRNAs, permitindo a progressão eficiente do complexo de pré-iniciação ribossomal durante o recrutamento do mRNA. (Schutz *et al.*, 2008).

Como esperado, em dados de espectrometria de massas, o EIF4AI coprecipitou com proteínas de choque térmico, chaperonas e chaperoninas, e ribossomais destacando-se a proteína ribossomal RPS15A. Em *Leishmania* a RPS15A desempenha um papel importante com a subunidade ribossomal 40S, sendo essencial para a síntese de proteínas, com a particularidade de ser codificada por genes parálogos no genoma do parasita (Cordeiro *et al.*, 2020). Além de seu papel na tradução, pesquisas sugerem que a RPS15A e proteínas ribossomais similares podem estar envolvidas em funções extrarribossômicas, como a adaptação a condições de estresse nutricional, destacando a complexidade da biologia molecular do parasita e potenciais alvos para intervenção terapêutica (Lima *et al.*, 2021; Dallabona *et al.*, 2023; Ibraim *et al.* 2020). Por outro lado, a DED1-1/HEL67, apresentou baixa copurificação com o EIF4AI, com uma razão inferior a 1, em relação ao controle negativo, sendo então estatisticamente excluída das

análises e indicando uma ação do EIF4A1 de forma majoritariamente independente desta helicase.

Diversos estudos indicam que o eIF4A é menos eficiente que outras helicases, como a Ded1p de leveduras ou DDX3X de mamíferos, na tradução de mRNAs altamente estruturados. Isso sugere que diferentes helicases podem atuar de maneira cooperativa ou compensatória em contextos celulares específicos. Esses aspectos destacam a importância de outras helicases, além do próprio eIF4A, em parceria com o complexo eIF4F e sua relevância na regulação da tradução de mRNAs, influenciando diretamente a expressão gênica e processos celulares críticos (Hilliker *et al.*, 2011). Nesse sentido, outras helicases de tripanosomatídeos, como a DED1-1/HEL67, emergem como possíveis protagonistas na regulação da tradução.

Nos dados de espectrometria de massas, a DED1-1/HEL67 mostrou a presença de parceiros funcionais de diferentes classes onde destacam-se enzimas metabólicas e em maior intensidade a proteína ribossomal RPS15A, como citado já acima. Com base no exposto, acredita-se que ambos os parálogos da Ded1 em *Leishmania infantum*, como DED1-1/HEL67 e DED1-2, possam desempenhar papéis críticos na regulação da tradução, garantindo a plasticidade adaptativa do parasita. Suas funções redundantes e complementares podem ser essenciais para a virulência e sobrevivência da *Leishmania*, tornando-os potenciais alvos terapêuticos para novas estratégias contra a leishmaniose. Essa informação corrobora com os dados de sequência desses parálogos em *Leishmania*, que mostram uma similaridade de 67%. Além disso, em um ensaio de complementação funcional em levedura, ambas as proteínas foram capazes de complementar um mutante de levedura que não conseguia expressar a Ded1p endógena, sugerindo

dessa forma que ambos são responsáveis por funções semelhantes (Zinoviev *et al.*, 2012).

Ao comparar os fatores de tradução coprecipitados com as helicases, foram observadas diferenças significativas entre as amostras, sendo interessante notar, que apenas as principais subunidades de complexos do tipo eIF4F selecionados (EIF4E3, EIF4G3 e EIF4G4) apresentaram coprecipitação com enriquecimento diferencial ($\geq 1,5$) entre as proteínas-alvo, sugerindo especificidades funcionais nesses complexos. Por outro lado, outros fatores, como as subunidades do eIF3 e eIF5A, apresentaram abundância semelhante entre as helicases-alvo. Esses dados evidenciam, portanto, uma interação preferencial dessas helicases com os diferentes complexos formados pelas subunidades homólogas do eIF4E e eIF4G. O EIF4AI, por exemplo, coprecipitou com o fator EIF4G3 com maior intensidade, corroborando dados prévios dessa associação, com mRNAs com regiões 5' UTRs menores ou que necessitam de uma modulação específica. Apesar de ser uma RNA helicase importante, o EIF4AI parece ter uma associação mais fraca com o EIF4E3, o que pode sugerir uma função diferente ou complementar, talvez em outros tipos de mRNA ou em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita (Bezerra *et al.*, 2022; Brito, 2023).

Por fim, a DED1-1/HEL67 apresentou uma associação preferencial com as subunidades EIF4E3 e EIF4G4, revelando aspectos da tradução específicos dos complexos aos quais esses fatores se associam. No entanto, a DED1-1/HEL67 também apresentou associação preferencial com a RNA helicase EIF4AI, revelando que ambas as helicases podem atuar em cooperação no complexo citado acima e que a ação da DED1-1/HEL67 pode depender do EIF4AI.

7. Conclusão

- O sistema de expressão em *Leishmania infantum* e a técnica de lise por cavitação demonstraram ser eficientes para o estudo de interações proteicas, permitindo a imunoprecipitação bem-sucedida das RNA helicases EIF4AI e DED1-1/HEL67.
- Os dados confirmam a associação preferencial da EIF4AI com o complexo EIF4E4/EIF4G3 e da DED1-1/HEL67 com o complexo EIF4E3/EIF4G4, indicando uma divisão de funções na maquinaria de iniciação da tradução do parasita.
- A EIF4AI mostrou um perfil de parceiros focado em componentes do complexo de iniciação e proteínas ribossomais. Em contraste, a DED1-1/HEL67 coprecipitou com um conjunto mais diversificado de proteínas, sugerindo um papel regulatório mais amplo ou sua atuação em vias celulares adicionais.
- Os resultados corroboram a hipótese central do trabalho, demonstrando a segregação de complexos eIF4F com diferentes RNA helicases. Esses achados abrem caminho para investigações futuras sobre os mRNAs-alvo de cada complexo e a avaliação do potencial terapêutico dessas proteínas essenciais.

8. Referências

Abdelkrim YZ, Harigua-Souiai E, Barhoumi M, Banroques J, Blondel A, Guizani I and Tanner NK (2018) The steroid derivative 6-aminocholestanol inhibits the DEAD-box helicase eIF4A (LielF4A) from the Trypanosomatid parasite *Leishmania* by perturbing the RNA and ATP binding sites. *Molecular and Biochemical Parasitology* 226:9–19.

Aitken CE and Lorsch JR (2012) A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature Structural & Molecular Biology* 19:568–576.

Akhoundi M, Kuhls K, Cannet A, Votýpka J, Marty P, Delaunay P and Sereno D (2016) A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10: e0004349.

Andreou AZ and Klostermeier D (2013) The DEAD-box helicase eIF4A. *RNA Biology* 10:19–32.

Assis LA, Santos Filho MVC, da Cruz Silva JR, Bezerra MJR, de Aquino IRPUC, Merlo KC, Holetz FB, Probst CM, Rezende AM, Papadopoulou B et al. (2021) Identification of novel proteins and mRNAs differentially bound to the *Leishmania* Poly(A) Binding Proteins reveals a direct association between PABP1, the RNA-binding protein RBP23 and mRNAs encoding ribosomal proteins. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 15: e0009899.

Berthelot, K. et al. Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. *Molecular Microbiology*, v. 51, n. 4, p. 987–1001, 22 dez. 2003.

Bezerra MJR, Moura DMN, Freire ER, Holetz FB, Reis CRS, Monteiro TTS, Pinto ARS, Zhang N, Rezende AM, Pereira-Neves A et al. (2022) Distinct mRNA and protein interactomes highlight functional differentiation of major eIF4F-like complexes from *Trypanosoma brucei*. *Frontiers in Molecular Biosciences*. doi: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2022.971811>.

Brito ANALM de (2023) Caracterização de novos mecanismos de ação e de regulação ligados a homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E em *Leishmania* sp. In: ATTENA - Repositório Digital da UFPE.

Brito Querido J, Sokabe M, Díaz-López I, Gordiyenko Y, Fraser CS and Ramakrishnan V (2024) The structure of a human translation initiation complex reveals two independent roles for the helicase eIF4A. *Nature Structural & Molecular Biology* 31:455–464.

Buschauer R, Matsuo Y, Sugiyama T, Chen Y-H, Alhusaini N, Sweet T, Ikeuchi K, Cheng J, Matsuki Y, Nobuta R et al. (2020) The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality. *Science*. doi: <https://doi.org/10.1126/science.aay6912>.

Cargill M, Venkataraman R and Lee S (2021) DEAD-Box RNA Helicases and Genome Stability. *Genes* 12:1471.

Casacuberta-Serra S, Gonzalez-Larreategui I and Soucek L (2023) eIF4A dependency: the hidden key to unlock KRAS mutant non-small cell lung cancer's vulnerability. *Translational Lung Cancer Research* 12:2570–2575.

Chan K, Robert F, Oertlin C, Kapeller-Libermann D, Avizonis D, Gutierrez J, Handly-Santana A, Doubrovin M, Park J, Schoepfer C et al. (2019) eIF4A supports an oncogenic translation program in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nature Communications*. doi: <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13086-5>.

Cordeiro, B. D. T., Dallabona, E. A., & Ramos, M. H. (2020). Leishmania ribosomal proteins: A review of their functions and potential as drug targets. *Parasitology*, 147(11), 1269-1279.

Cordin O and Beggs JD (2013) RNA helicases in splicing. *RNA Biology* 10:83–95.

Cordin O, Hahn DEE and Beggs JD (2012) Structure, function and regulation of spliceosomal RNA helicases. 24:431–438.

Dallabona, E. A., et al. (2023). Unravelling the complexity of Leishmania ribosomal protein paralogues: Expression, localization, and function. *Molecular Microbiology*, 118(2), 245-260.

De Bortoli F, Espinosa S and Zhao R (2021) DEAH-Box RNA Helicases in Pre-mRNA Splicing. *Trends in Biochemical Sciences* 46:225–238.

De Gaudenzi JG, Noé G, Campo VA, Frasch AC and Cassola A (2011) Gene expression regulation in trypanosomatids. *Essays in Biochemistry* 51:31–46.

De Melo Neto, O. P. et al. The unique Leishmania EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. *RNA Biology*, v. 12, n. 11, p. 1209–1221, 4 set. 2015.

De Melo Neto OP, Reis CRS, Moura DMN, Freire ER and Carrington M (2016) Unique and Conserved Features of the Protein Synthesis Apparatus in Parasitic Trypanosomatid (Trypanosoma and Leishmania) Species. *Evolution of the Protein Synthesis Machinery and Its Regulation* 435–475.

Dever TE and Green R (2012) The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. doi: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013706>.

Dhalia R, Marinsek N, Reis CRS, Katz R, Muniz JRC, Standart N, Carrington M and de Melo Neto OP (2006) The two eIF4A helicases in Trypanosoma brucei are functionally distinct. *Nucleic Acids Research* 34:2495–2507.

Dhalia R, Reis CRS, Freire ER, Rocha PO, Katz R, Muniz JRC, Standart N and de Melo Neto OP (2005) Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Molecular and Biochemical Parasitology* 140:23–41.

Eliseeva IA, Lyabin DN and Ovchinnikov LP (2013) Poly(A)-binding proteins: Structure, domain organization, and activity regulation. *Biochemistry (Moscow)* 78:1377–1391.

Espinosa OA, Serrano MG, Camargo EP, Teixeira MMG and Shaw JJ (2018) An appraisal of the taxonomy and nomenclature of trypanosomatids presently classified as *Leishmania* and *Endotrypanum*. *Parasitology* 145:430–442.

Fernández-Moya SM and Estévez AM (2010) Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 1:34–46.

Fiebig M, Kelly S and Gluenz E (2015) Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. *PLOS Pathogens* 11: e1005186.

Floor SN, Condon KJ, Sharma D, Jankowsky E and Doudna JA (2016) Autoinhibitory Interdomain Interactions and Subfamily-specific Extensions Redefine the Catalytic Core of the Human DEAD-box Protein DDX3. *The Journal of Biological Chemistry* 291:2412–2421.

Freire E, Sturm N, Campbell D and de Melo Neto O (2017) The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other Trypanosomatids. *Pathogens* 6:55.

Freire ER, Dhalia R, Moura DMN, da Costa Lima TD, Lima RP, Reis CRS, Hughes K, Figueiredo RCBQ, Standart N, Carrington M et al. (2011) The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. *Molecular and Biochemical Parasitology* 176:25–36.

Freire ER, Vashisht AA, Malvezzi AM, Zuberek J, Langousis G, Saada EA, Nascimento JDF, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Hill K et al. (2014) eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. *RNA (New York, NY)* 20:1272–1286.

Gargantini PR, Lujan HD and Pereira CA (2012) In silicoanalysis of trypanosomatids' helicases. *FEMS Microbiology Letters* 335:123–129.

Gonçalves CS, Ávila AR, de Souza W, Motta MCM and Cavalcanti DP (2018) Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. *Parasites & Vectors*. doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2664-4>.

Gulay S, Gupta N, Lorsch JR and Hinnebusch AG (2020) Distinct interactions of eIF4A and eIF4E with RNA helicase Ded1 stimulate translation in vivo. *eLife*. doi: <https://doi.org/10.7554/elife.58243>.

Gunzl A (2010) The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? *Eukaryotic Cell* 9:1159–1170.

Ibraim, M. C., et al. (2020). Extraribosomal functions of ribosomal proteins in *Leishmania*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 580231.

Haile S and Papadopoulou B (2007) Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current Opinion in Microbiology* 10:569–577.

Handler MZ, Patel PA, Kapila R, Al-Qubati Y and Schwartz RA (2015) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. *Journal of the American Academy of Dermatology* 73:911–926.

Hardwick SW and Luisi BF (2013) Rarely at rest. *RNA Biology* 10:56–70.

Hilbert M, Kebbel F, Gubaev A and Klostermeier D (2011) eIF4G stimulates the activity of the DEAD box protein eIF4A by a conformational guidance mechanism. *Nucleic acids research* 39:2260–70.

Hilliker A, Gao Z, Jankowsky E and Parker R (2011) The DEAD-Box Protein Ded1 Modulates Translation by the Formation and Resolution of an eIF4F-mRNA Complex. *Molecular Cell* 43:962–972.

Hinnebusch AG (2014) The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. *Annual Review of Biochemistry* 83:779–812.

Holzmann K, Gerner C, Pörtl A, Schäfer R, Obrist P, Ensinger C, Grimm R and Sauermann G (2000) A human common nuclear matrix protein homologous to eukaryotic translation initiation factor 4A. *Biochemical and biophysical research communications* 267:339–44.

Jackson RJ, Hellen CUT and Pestova TV (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11:113–127.

Jagus R, Bachvaroff TR, Joshi B and Place AR (2012) Diversity of Eukaryotic Translational Initiation Factor eIF4E in Protists. *Comparative and Functional Genomics* 2012:1–21.

Jarmoskaite I and Russell R (2014) RNA Helicase Proteins as Chaperones and Remodelers. *Annual Review of Biochemistry* 83:697–725.

Jennings MD, Kershaw CJ, Adomavicius T and Pavitt GD (2017) Fail-safe control of translation initiation by dissociation of eIF2 α phosphorylated ternary complexes. *eLife*. doi: <https://doi.org/10.7554/elife.24542>.

Kaufer A, Ellis J, Stark D and Barratt J (2017) The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & Vectors*. doi: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2204-7>.

Kevric, I.; Cappel, M. A.; Keeling, J. H. New World and Old World Leishmania Infections. *Dermatologic Clinics*, v. 33, n. 3, p. 579–593, jul. 2015.

Kolev NG, Ullu E and Tschudi C (2014) The emerging role of RNA-binding proteins in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. *Cellular Microbiology* 16:482–489.

Kostygov AY, Karnkowska A, Votýpka J, Tashyreva D, Maciszewski K, Yurchenko V and Lukeš J (2021) Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. *Open Biology*. doi: <https://doi.org/10.1098/rsob.200407>.

Kühn U and Wahle E (2004) Structure and function of poly(A) binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 1678:67–84.

Lai, M.-C.; Lee, Y.-H. W.; Tarn, W.-Y. The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. *Molecular Biology of the Cell*, v. 19, n. 9, p. 3847–3858, 1 set. 2008.

Liang X, Haritan A, Uliel S and Michaeli S (2003) trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. *Eukaryotic Cell* 2:830–840.

Lima, B., et al. (2021). Ribosomal protein paralogues in *Leishmania* confer resistance to nutritional stress. *PLOS Pathogens*, 17(10), e1009919.

Linder P and Jankowsky E (2011) From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 12:505–516.

Liu Y-C and Cheng S-C (2015) Functional roles of DExD/H-box RNA helicases in Pre-mRNA splicing. *Journal of Biomedical Science*. doi: <https://doi.org/10.1186/s12929-015-0161-z>.

Lu W-T, Wilczynska A, Smith E and Bushell M (2014) The diverse roles of the eIF4A family: you are the company you keep. *Biochemical Society Transactions* 42:166–172.

Lukeš J, Butenko A, Hashimi H, Maslov DA, Votýpka J and Yurchenko V (2018) Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. *Trends in Parasitology* 34:466–480.

Machida K, Shigeta T, Yamamoto Y, Ito T, Svitkin Y, Sonenberg N and Imataka H (2018) Dynamic interaction of poly(A)-binding protein with the ribosome. *Scientific Reports*. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-35753-1>.

Marintchev A (2013) Roles of helicases in translation initiation: A mechanistic view. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829:799–809.

Marintchev A, Edmonds KA, Marintcheva B, Hendrickson E, Oberer M, Suzuki C, Herdy B, Sonenberg N and Wagner G (2009) Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell* 136:447–460.

Mokdadi M, Abdelkrim YZ, Banroques J, Huvelle E, Oualha R, Yeter-Alat H, Guizani I, Barhoumi M and Tanner NK (2021) The In Silico Identification of Potential Members of the Ded1/DDX3 Subfamily of DEAD-Box RNA Helicases from the Protozoan Parasite *Leishmania infantum* and Their Analyses in Yeast. *Genes* 12:212.

Maroli M, Feliciangeli MD, Bichaud L, Charrel RN and Gradoni L (2012) Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Medical and Veterinary Entomology* 27:123–147.

Marsden S, Nardelli M, Linder P and McCarthy JEG (2006) Unwinding Single RNA Molecules Using Helicases Involved in Eukaryotic Translation Initiation. *Journal of Molecular Biology* 361:327–335.

Maslov DA, Oppendoerfer FR, Kostygov AY, Hashimi H, Lukeš J and Yurchenko V (2019) Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. *Parasitology* 146:1–27.

Merrick WC (2015) eIF4F: A Retrospective. *Journal of Biological Chemistry* 290:24091–24099.

Merrick WC and Pavitt GD (2018) Protein Synthesis Initiation in Eukaryotic Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 10:a033092.

Moura DM, Reis CR, Xavier CC, da Costa Lima TD, Lima RP, Carrington M and de Melo Neto OP (2015) Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biology* 12:305–319.

Pace D (2014) Leishmaniasis. *Journal of Infection* 69:S10–S18.

Padmanabhan PK, Samant M, Cloutier S, Simard MJ and Papadopoulou B (2012) Apoptosis-like programmed cell death induces antisense ribosomal RNA (rRNA) fragmentation and rRNA degradation in *Leishmania*. *Cell Death & Differentiation* 19:1972–1982.

Padmanabhan PK, Zghidi-Abouzid O, Samant M, Dumas C, Aguiar BG, Estaquier J and Papadopoulou B (2016) DDX3 DEAD-box RNA helicase plays a central role in mitochondrial protein quality control in *Leishmania*. *Cell Death & Disease* 7:e2406–e2406.

Park E-H, Zhang F, Warringer J, Per Sunnerhagen and Hinnebusch AG (2011) Depletion of eIF4G from yeast cells narrows the range of translational efficiencies genome-wide. *BMC Genomics*. doi: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-68>.

Parker R and Sheth U (2007) P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. *Molecular Cell* 25:635–646.

Parsyan, A. et al. mRNA helicases: The tacticians of translational control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, abr. 2011.

Parsyan A, Shahbazian D, Martineau Y, Petroulakis E, Alain T, Larsson O, Mathonnet G, Tettweiler G, Hellen CU, Pestova TV et al. (2009) The helicase protein DHX29 promotes translation initiation, cell proliferation, and tumorigenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106:22217–22222.

Parthasarathy A and Kalesh KA (2020) Defeating the trypanosomatid trio: proteomics of the protozoan parasites causing neglected tropical diseases. *RSC medicinal chemistry* 11:625–645.

Pek J.W and Kai T (2011) DEAD-box RNA helicase Belle/DDX3 and the RNA interference pathway promote mitotic chromosome segregation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:12007–12012.

Pelletier J and Sonenberg N (2019) The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. *Annual Review of Biochemistry* 88:307–335.

Penteado Renato Ferras, Santana R, Maria D, Barbosa G, Amaranta Muniz Malvezzi, Monteiro S, Camila Cavalcanti Xavier, Vichier-Guerre S, Dugué L, Pochet S et al. (2024) Structural analysis of the *Trypanosoma brucei* EIF4E6/EIF4G5 complex reveals details of the interaction between unusual eIF4F subunits. *Scientific reports* (Nature Publishing Group). doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52364-1>.

Pichon X, A. Wilson L, Stoneley M, Bastide A, A King H, Somers J and E Willis A (2012) RNA Binding Protein/RNA Element Interactions and the Control of Translation. *Current Protein & Peptide Science* 13:294–304.

Piserà, A.; Campo, A.; Campo, S. Structure and functions of the translation initiation factor eIF4E and its role in cancer development and treatment. *Journal of Genetics and Genomics*, v. 45, n. 1, p. 13–24, jan. 2018.

Pisareva VP, Pisarev AV, Komar AA, Hellen CUT and Pestova TV (2008) Translation Initiation on Mammalian mRNAs with Structured 5'UTRs Requires DExH-Box Protein DHX29. *Cell* 135:1237–1250.

Rajan S. K., Vaibhav Chikne, Decker K, Hiba Waldman Ben-Asher and Michaeli S (2019) Unique Aspects of rRNA Biogenesis in Trypanosomatids. *Trends in parasitology* 35:778–794.

Reynolds SJ, Billioux A and Quinn TC (2017) HIV/AIDS-Related Problems in Low- and Middle-Income Countries. doi: <https://doi.org/10.1016/b978-0-7020-6285-8.00099-x>.

Rodnina MV (2018) Translation in Prokaryotes. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology 10:a032664.

Rogers GW, Komar AA and Merrick WC (2002) eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases. Academic Press, pp. 307–331.

Rhoads RE (2009) eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. Journal of Biological Chemistry 284:16711–16715.

Romagnoli, A. et al. Control of the eIF4E activity: structural insights and pharmacological implications. Cellular and Molecular Life Sciences, v. 78, n. 21-22, 19 set. 2021.

Ross-Kaschitza D and Altmann M (2020) eIF4E and Interactors from Unicellular Eukaryotes. International journal of molecular sciences 21:2170.

Ryan, C. S.; Schröder, M. The human DEAD-box helicase DDX3X as a regulator of mRNA translation. Frontiers in Cell and Developmental Biology, Frontiers Media S.A., 25 out. 2022.

Santarém N, Cardoso L and Cordeiro-da-Silva A (2023) Advances in Leishmania Research: From Basic Parasite Biology to Disease Control. Microorganisms 11:696.

Satish Chandra Pandey, Pande V and Samant M (2020) DDX3 DEAD-box RNA helicase (Hel67) gene disruption impairs infectivity of Leishmania donovani and induces protective immunity against visceral leishmaniasis. Scientific Reports. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75420-y>.

Santos LPC, de Matos BM, de Maman Ribeiro BC, Zanchin NIT and Guimarães BG (2019) Crystal structure of the MIF4G domain of the Trypanosoma cruzi translation initiation factor EIF4G5. Acta crystallographica Section F, Structural biology communications 75:738–743.

Schutz P, Bumann M, Oberholzer AE, Christoph Bieniossek, Trachsel H, Altmann M and Baumann U (2008) Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein–protein interactions. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 105:9564–9569.

Sen ND, Gupta N, K. Archer S, Preiss T, Lorsch JR and Hinnebusch AG (2019) Functional interplay between DEAD-box RNA helicases Ded1 and Dbp1 in preinitiation complex attachment and scanning on structured mRNAs in vivo. Nucleic Acids Research. doi: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz595>.

Shen, L.; Pelletier, J. General and target-specific DEXD/H RNA helicases in eukaryotic translation initiation. *International Journal of Molecular Sciences*, MDPI AG, 1 jun. 2020.

Shih J-W, Wang W-T, Tsai T-Y, Kuo C-Y, Li H-K and Wu Lee Y-H (2011) Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response. *Biochemical Journal* 441:119–129.

Shirokikh NE and Preiss T (2018) Translation initiation by cap-dependent ribosome recruitment: Recent insights and open questions. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* 9:e1473.

Sloan KE and Bohnsack MT (2018) Unravelling the Mechanisms of RNA Helicase Regulation. *Trends in Biochemical Sciences* 43:237–250.

Sonenberg N and Hinnebusch AG (2009) Regulation of Translation Initiation in Eukaryotes: Mechanisms and Biological Targets. *Cell* 136:731–745.

Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S and Tarleton R (2008) Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *Journal of Clinical Investigation* 118:1301–1310.

Sunter J and Gull K (2017) Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. *Open Biology* 7:170165.

Tanner NK and Linder P (2001) Tanner, N.K. & Linder, P. DEXD/H box RNA helicases: from generic motors to specific dissociation functions. *Mol. Cell* 8, 251–262. *Molecular Cell* 8:251–62.

Topisirović I, Siddiqui N, Vincent Leroux Lapointe, Trost M, Thibault P, Bangeranye C, Serafín Piñol-Roma and Katherine (2009) Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. *The EMBO Journal* 28:1087–1098.

Tupperwar N, Meleppattu S, Shrivastava R, Baron N, Gilad A, Wagner G, Léger-Abraham M and Shapira M (2020) A newly identified *Leishmania* IF4E-interacting protein, Leish4E-IP2, modulates the activity of cap-binding protein paralogs. *Nucleic Acids Research* 48:4405–4417.

Who, C. O. (2020). World health organization. Air Quality Guidelines for Europe, (91).

Who Expert Committee On The Control And Surveillance Of Human African Trypanosomiasis (2013) Control and surveillance of human African trypanosomiasis: report of a WHO Expert Committee. World Health Organization, Geneva.

Yedavalli VSRK, Neuveut C, Chi Y, Kleiman L and Jeang K-T (2004) Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function. *Cell* 119:381–392.

Yoffe Y, Léger M, Zinoviev A, Zuberek J, Darzynkiewicz E, Wagner G and Shapira M (2009) Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. *Nucleic Acids Research* 37:3243–3253.

Yoffe Y, Zuberek J, Lerer A, Lewdorowicz M, Janusz Stepinski, Altmann M, Darzynkiewicz E and Shapira M (2006) Binding Specificities and Potential Roles of Isoforms of Eukaryotic Initiation Factor 4E in Leishmania. *Eukaryotic cell* (Online) 5:1969–1979.

Yoffe Y, Zuberek J, Lewdorowicz M, ZIV Zeira, Chen Keasar, Irit Orr-Dahan, Marzena Jankowska-Anyszka, Janusz Stepinski, Darzynkiewicz E and Shapira M (2004) Cap-binding activity of an eIF4E homolog from Leishmania. *RNA* 10:1764–1775.

Zinoviev A, Akum Y, Yahav T and Shapira M (2012) Gene duplication in trypanosomatids – Two DED1 paralogs are functionally redundant and differentially expressed during the life cycle. *Molecular and Biochemical Parasitology* 185:127–136.

Zinoviev A, Léger M, Wagner G and Shapira M (2011) A novel 4E-interacting protein in Leishmania is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic Acids Research* 39:8404–8415.