



Universidade Federal de
Pernambuco Centro de Biociências

SAMARA SILVA ANDRADE

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS
RIBOSSOMAS DE *LEISHMANIA*
*SPP***

Recife
2024

SAMARA SILVA ANDRADE

**EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS DE *LEISHMANIA*
SPP**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação em
Biomedicina da Universidade Federal de
Pernambuco, como pré-requisito à
obtenção do título de Bacharel em
Biomedicina.

Orientador: Osvaldo pompílio de Melo
Neto

Co-orientadora: Adalúcia da Silva

Recife
2024

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

Andrade, Samara .

Expressão e purificação de proteínas ribossomais de *Leishmania spp* / Samara
Andrade. - Recife, 2024.
41 : il.

Orientador(a): Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Coorientador(a): Adalúcia da Silva
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal de
Pernambuco, Centro de Biociências, Biomedicina, 2024.

1. Tripanosomatídeos. 2. Tradução. 3. Soros Policlonais. 4. Diferenciação . 5.
Proteínas. I. Neto, Osvaldo Pompílio de Melo. (Orientação). II. Silva, Adalúcia
da. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

EXPRESSION E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS DE LEISHMANIA SPP

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Graduação
em Biomedicina da Universidade
Federal de Pernambuco, como
pré-requisito à obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Prof. Dr. Osvaldo Pompilio de Melo Neto.
Instituto Aggeu Magalhães/ Departamento de Microbiologia

Prof. Dr. Gustavo Barbosa de Lima.
Instituto Aggeu Magalhães/ Departamento de Microbiologia

Prof. Me. Deyvisson Wesley Gualberto
Bezerra.
Instituto Aggeu Magalhães/ Departamento de Microbiologia

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Dr Osvaldo, pela oportunidade e apoio durante meu projeto.

Agradeço as minhas co-orientadoras, Dra Adalúcia e Msc Rafaela, pela paciência e excelência em me auxiliar durante todo o projeto.

Agradeço aos meus professores, pela formação e conhecimento que serão sempre mantidos em mim.

Agradeço ao grupo Biomoltryp, do departamento de Microbiologia, por todo amparo que precisei dentro do laboratório.

Agradeço a Fiocruz PIBIC, pelo auxílio financeiro dado durante toda a construção do projeto.

Agradeço aos meus pais, Luís e Soraya, e irmãs, Ingrid e Débora, que sempre acreditaram e serviram de força e refúgio para mim durante todos esses anos. Não seria nada sem vocês.

Agradeço a Cleber Victor Jr, pelo companheirismo e sua família, que me serviu de grande apoio e alegria durante esse momento.

Agradeço também a todos os amigos que fiz durante essa formação, pelas risadas que tornaram meus dias mais leves e memórias que irei sempre guardar com carinho. Em especial, Mariana, João, Letícia Almeida, Letícia Vasconcelos, Gabriel Aragão e Álvaro. Meus amigos de profissão!

E não poderia deixar de agradecer também ao Senhor, que me deu toda capacidade e graça de começar e terminar com excelência aquilo que ele me deu.

Andrade, Samara. **Expressão e purificação de proteínas ribossomais da *Leishmania spp.*** 2024. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

RESUMO

Os tripanosomatídeos são uma família de protozoários responsáveis por causar doenças que infectam tanto animais como seres humanos. Essa família inclui o gênero *Leishmania*, parasita com formas de vida tanto intracelular como extracelular com morfologia dependendo do seu ciclo de vida. Essas variações morfológicas costumam ser reguladas pela produção de proteínas que podem ser usadas como marcadores específicos do parasita. Esse trabalho tem como objetivo a produção e purificação de duas proteínas responsáveis pelo crescimento celular. Essas proteínas, S6 e L23A, são proteínas ribossomais presentes nas subunidades 40s e 60s do ribossomo, respectivamente, estando associadas ao crescimento exponencial do parasita e podendo ser avaliadas como promissores marcadores. Como objetivos, buscou-se realizar a clonagem, expressão e purificação das proteínas S6 e L23A de *L. infantum*. Os genes codificantes das proteínas de interesse foram amplificados por PCR a partir do genoma de *L. Infantum* e clonados no vetor pGEM-T Easy em etapa prévia. Neste trabalho, estas construções foram utilizadas para subclonagem no vetor de expressão pET21A e tiveram sua integridade confirmada pelo sequenciamento genético. Foram realizadas otimizações das expressões das proteínas S6 e L23A em diferentes temperaturas. Também foram realizados testes de solubilidade em ureia das proteínas, importante passo na purificação que se seguiu. Esta foi realizada através de cromatografia de afinidade. A eficiência da purificação foi comprovada por ensaio de fracionamento no qual as proteínas purificadas foram visualizadas. A partir deste trabalho de purificação das duas proteínas aqui estudadas, estudos futuros utilizarão essas proteínas para realizar a imunização em coelhos com o objetivo final de obtenção de anticorpos contra as proteínas alvos que serão então utilizados na avaliação da sua expressão em diferentes fases de *Leishmania spp.*

Palavras-chave: Tripanosomatídeos. Tradução. Soros policlonais. Diferenciação. Proteínas.

Andrade, Samara. **Expression and purification of Leishmania ribosomal** 2024. Número total de folhas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2024.

ABSTRACT

Trypanosomatids are a family of protozoa responsible for diseases that infect both animals and humans. This family includes the *Leishmania* genus, parasites with both intracellular and extracellular life forms and morphology depending on its life cycle. These morphological variations are usually regulated by the production of proteins that can be used as specific markers of the parasite. This work aims to produce and purify two proteins responsible for cell growth. These proteins, S6 and L23A, are ribosomal proteins found within the 40S and 60S ribosomal subunits, respectively, which are associated with the exponential growth of the parasite. The objectives here were to clone, express and purify the *L. infantum* S6 and L23A proteins. Their genes were previously amplified by PCR from the *L. infantum* genome and cloned into the pGEM-T Easy vector. Here, these constructs were used for subcloning into the pET21A expression vector with the integrity of the resulting plasmids confirmed by genetic sequencing. Optimizations were made for the expression of the S6 and L23A proteins at different temperatures. Urea solubility tests were also carried out, an important step for the following purification. This was carried out using immobilized metal affinity. The efficiency of the purification was verified by fractionation, in which the purified proteins were visualized. Based on the purification results for both proteins studied here, future studies will use these proteins to immunize rabbits with the ultimate aim of obtaining antibodies against them that will then be used to evaluate their expression in different stages of *Leishmania spp.*

Key words: Trypanosomatids. Translation. Polyclonal sera. Differentiation. Proteins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 01 – Ciclo de vida da <i>Leishmania</i>	16
Figura 02 – Digestões das extrações plasmidiais com os genes codificantes das proteínas L23A e S6 clonados.....	26
Figura 03 – Digestão dos genes L23A (447 pb), S6 (759 pb) e pET21A (5336 pb).....	27
Figura 04 – Purificações dos fragmentos utilizados para subclonagem.....	28
Figura 05 – Extrações plasmidiais de L23A e S6 diluídas (1:10) em pET21.....	29
Figura 06 – Digestões dos genes no pET21.Extrações plasmidiais do S6 em pET21A.....	30
Figura 07 – Mini Indução das proteínas L23A (17 kDa) e S6 (33 kDa).....	31
Figura 08 – Maxi Indução.....	32
Figura 09 – Teste de solubilidade da proteína L23A.....	33
Figura 10 – Teste de solubilidade da proteína S6.....	33
Figura 11 – Purificação da S6.....	34
Figura 12 – Purificação da L23A.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS OU SIGLAS

APCs	- C ÉLULAS APRESENTADORAS DE ANTÍGENOS
DNA	- Á CIDO D ESOXIRRIBONUCLEICO
EIFs	- F ATORES DE INICIAÇÃO EUCARIÓTICA
GTE	- G LICOSE, T RIS E E DTA
IFN-γ	- I NTERFERON- G AMA
IPTG	- I SOPROPYLTHIO- B - G ALACTOSIDE
kDa	- K ILODALTONS
LB	- L URIA- B ERTANI
LC	- L EISHMANIOSE CUTÂNEA
LMC	- L EISHMANIOSE MONOCUTÂNEA
LV	- L EISHMANIOSE V ISCERAL
L2X	- T AMPÃO L AEMMLI 2X
mRNAs	- Á CIDO RIBONUCLEICO MENSAGEIRO
NAOH	- H IDRÓXIDO DE SÓDIO
OD	- D ENSIDADE ÓPTICA
PB	- P ARES DE BASES
PCR	- R EACÃO EM CADEIA POLIMERASE
RNA	- Á CIDO RIBONUCLEICO
RPM	- R OTAÇÕES POR MINUTO
SDS-PAGE	- D ODECIL S ULFATO DE SÓDIO
TBS	- T AMPÃO T RIS S ALINO
Th1	- T - H ELPER 1
40S	- SUBUNIDADE MENOR RIBOSSOMAL EUCARIÓTICA
60S	- S UBUNIDADE MAIOR RIBOSSOMAL EUCARIÓTICA

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1	O GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	14
2.2	CICLO DE VIDA DO PARASITA DO GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	14
2.3	FORMAS CLÍNICA E TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	16
2.4	ASPECTOS MOLECULARES DA <i>LEISHMANIA</i>	18
2.5	PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS S6 E L23A DA <i>LEISHMANIA</i>	19
3	OBJETIVOS.....	21
3.1	OBJETIVO GERAL.....	21
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4	METODOLOGIA.....	22
4.1	CLONAGEM DOS GENES L23A, S6.....	22
4.2	EXTRAÇÕES PLASMIDIAIS.....	22
4.3	DIGESTÕES E LIGAÇÕES.....	23
4.4	SEQUENCIAMENTO DE DNA.....	23
4.5	EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES.....	23
4.6	PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA E PURIFICAÇÃO PROTEICA.....	24
5	RESULTADOS.....	25
5.1	DIGESTÕES PLASMIDIAIS.....	25
5.2	PURIFICAÇÃO E LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS.....	27
5.3	EXTRAÇÃO DOS DNAs PLASMIDIAIS NO VETOR DE EXPRESSÃO.....	28
5.4	DIGESTÕES PLASMIDIAIS.....	29
5.5	SEQUENCIAMENTO.....	31
5.6	INDUÇÕES.....	31
5.7	TESTE DE SOLUBILIDADE.....	32

5.8	PURIFICAÇÃO.....	34
6	DISCUSSÃO.....	36
7	CONCLUSÃO.....	38
	REFERÊNCIAS.....	39

1 INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos, protozoários da família Trypanosomatidae, são responsáveis por diversos tipos de doenças, tanto em animais como em seres humanos, que fazem parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas. Dentro dessa família, destacam-se as espécies do gênero *Leishmania sp*, responsáveis pelas leishmanioses, tanto visceral como tegumentar (KAUFER; STARK; ELLIS, 2019). A prevalência e características específicas dos tripanosomatídeos se dá pela separação dos traços eucariontes, apresentando diferenças no controle gênico e sua expressão (CLAYTON, 2019a). Entretanto, apesar da grande incidência na população, principalmente no Brasil, ainda há poucos estudos sobre os mecanismos moleculares de resistência deste parasita, impedindo o desenvolvimento de fármacos que possam prevenir o crescimento do parasita no organismo humano.

Dentro da família Trypanosomatidae, existem características únicas na expressão dos genes, como no processamento de mRNAs e sua regulação, conforme os diferentes estágios que esses parasitas alcançam dentro dos hospedeiros intermediários e definitivos (CLAYTON, 2019a). Essas mudanças do parasita em seu metabolismo e morfologia, em seus diferentes ciclos de vida, revelam a chave do mecanismo de sua patologia, a partir dos diferentes genes expressos nessas fases, sendo importante o conhecimento desses mecanismos de funcionamento do parasita para estudos que contribuam com uma melhora na qualidade de vida populacional (COUTINHO-ABREU *et al.*, 2020). A expressão das proteínas que regulam fases intracelular e extracelular da *Leishmania*, por exemplo, pode ocorrer através do controle da tradução dos mRNAs, que por sua vez é dividida em três partes: iniciação, alongamento e término. A parte de iniciação costuma apresentar várias etapas de regulação, que são administradas pelos fatores de iniciação eucarióticos (*eIFs- eukaryotic initiation Factors*) e diversas outras proteínas regulatórias, como as proteínas ribossomais (REZENDE *et al.*, 2014).

Este trabalho visa avançar no estudo de duas proteínas ribossomais de *Leishmania*. A proteína L23a é um dos componentes da subunidade ribossomal 60S, formada por inúmeras proteínas ribossomais cuja ação pode interferir no crescimento celular e apoptose. Esta proteína possui um peso molecular de

aproximadamente 17kDa e tornou-se alvo de estudos no gênero *Leishmania* devido a sua função no controle da expressão gênica (DAS *et al.*, 2013a). Já a proteína S6 realiza a fosforilação de outras proteínas ribossomais na subunidade 40S de células eucarióticas, apresentando 33kDa (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA *et al.*, 1998; MEYUHAS, 2015). Ambas as proteínas podem estar envolvidas em mecanismos de controle da expressão gênica e consequentemente do crescimento de parasitas, tendo sido usadas como alvos de estudo que visam o entendimento exato da sua função e organização em *Leishmania* (DAS *et al.*, 2013; MEYUHAS, 2015).

Diante do tema acima exposto, este trabalho de conclusão de curso visa contribuir para o estudo dessas proteínas da espécie *Leishmania infantum*, utilizando-se de construções gênicas e proteínas recombinantes para a sua produção em bactérias, o que irá permitir o estudo aprofundado do seu funcionamento nos diferentes estágios do parasita.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 O GÊNERO *LEISHMANIA*

Os protozoários do gênero *Leishmania* constituem um grupo diverso de parasitas presentes na família dos Tripanossomatídeos, responsáveis por serem causadores de doenças que afetam animais e seres humanos. Estes parasitas são transmitidos através de insetos flebotomíneos fêmeas dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* que se utilizam do sangue de mamíferos para realizar a nutrição e produção de seus ovos. Além do flebotomíneo, outras vias de infecção incluem transmissão congênita, transfusão de sangue e transplante de órgãos, bem como acidentes de exposição dentro de laboratórios (PEDERIVA *et al.*, 2023). Entre os mamíferos infectados, inclui-se os seres humanos, reservatórios naturais desses parasitas que a depender do seu grau de patogenia, podem causar infecções crônicas na pele e vísceras (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014).

A infecção por *Leishmania*, provocando as leishmanioses, encontra-se espalhada nas áreas tropicais e subtropicais e afeta cerca de 2 milhões de pessoas a cada ano, com uma incidência mundial estimada de 0,7 - 1,2 milhões de casos de Leishmaniose cutânea e 0,2 - 0,4 milhões de casos de Leishmaniose visceral (LV) (AKHOUNDI M, *et al.*, 2017). Esse gênero pode ser dividido em dois subgêneros dependendo da parte que é colonizada pelo parasita no intestino do flebotomíneo, sendo estes o subgênero *Leishmania*, em que o parasita se desenvolve nas partes supra-pilóricas, e o subgênero menos conhecido, *Viannia*, restrito a parte peri-pilórica do flebotomíneo (BATES, 2007).

2.2 CICLO DE VIDA DO PARASITA DO GÊNERO *LEISHMANIA*

Tanto os mamíferos como os flebotomíneos são os hospedeiros principais nos diferentes estágios de crescimento e diferenciação do parasita *Leishmania*. Nos hospedeiros mamíferos, há dois estágios conhecidos que são utilizados comumente pela espécie *Leishmania*: promastigotas metacíclicas, que são inoculadas pela mordida do flebotomíneo, sendo a forma extracelular e infectante; e quando são introduzidas para dentro do macrófago, células apresentadoras de antígeno (APCs),

seguem para o estágio intracelular conhecido como amastigotas, permanecendo nessa forma com o objetivo de manutenção do parasita (GOSSAGE; ROGERS; BATES; 2003). Já as promastigotas são reproduzidas pela *Leishmania* dentro do hospedeiro invertebrado, especificamente no seu trato digestivo, sendo células alongadas, flageladas e altamente proliferativas.

A partir da mordida do flebotomíneo em outro hospedeiro, as células promastigotas são internalizadas no novo organismo através do repasto sanguíneo. Estas células são fagocitadas por neutrófilos, células dendríticas e macrófagos, e a partir da temperatura do hospedeiro e o ambiente ácido dos vacúolos onde se encontram nas células fagocíticas, elas passam para o estágio de células ovoides, sem flagelo, nomeadas de amastigotas, apresentando nível baixo de reprodução. Por último, as células fagocíticas se rompem, liberando as células amastigotas que são fagocitadas por outras células fagocíticas, continuando o ciclo de vida do parasita. Essa destruição das células hospedeiras gera ativação do sistema imune, provocando os sintomas clínicos manifestados nesta infecção (GRÜNEBAST *et al.*, 2021)

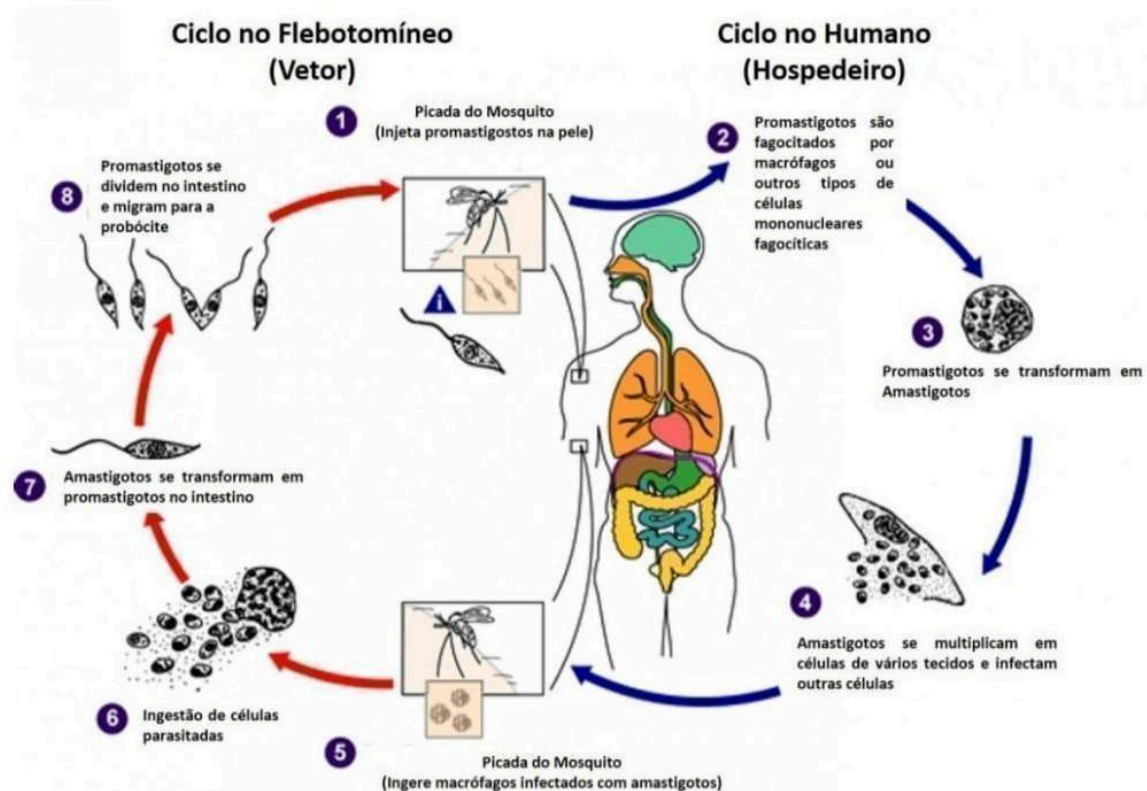


Figura 01: Ciclo de vida da *Leishmania*.(1) O ciclo se inicia com a picada do mosquito infectado com promastigotas no hospedeiro humano (2), a transformação das promastigotas em amastigotas (3), a multiplicação dessas amastigotas (4), a infecção do mosquito (5), ingerindo amastigotas do hospedeiro (6), transformação de amastigotas em promastigotas (7), e, por fim, a migração dessas promastigotas para a probóscide do vetor (8), iniciando o ciclo novamente.

Fonte: DPDx Laboratory Identification Of Parasites of Public Health Concern. Disponível em: <https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 13. fev. 2024

2.3 FORMAS CLÍNICAS E TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

As formas clínicas e desenvolvimento das espécies de *Leishmania* no organismo hospedeiro são manifestadas de forma diferente a depender da espécie e da leishmaniose, sendo possível a presença de pacientes assintomáticos e sintomáticos, apresentando manifestações gerais que incluem febre, cansaço físico, esplenomegalia, anemia e imunossupressão. Estudos recentes revelam que as respostas imunes contra as leishmanioses estão relacionadas com a produção de Interferon-gama (IFN- γ) pelas células T-helper 1 (Th1), aumentando a proteção e destruição do parasita em espécies como a *L. major*. As principais doenças manifestadas pela Leishmaniose são a cutânea (LC), visceral (LV) e mucocutânea (LMC), sendo esta última uma severa doença crônica (GHORBANI; FARHOUDI, 2018). A leishmaniose visceral é causada pela espécie *Leishmania donovani* no velho mundo e pela *Leishmania infantum* no novo mundo, causando episódios de febre, anemia e esplenomegalia, sendo fatal em 95% dos casos não tratados. Por outro lado, a Leishmaniose cutânea, a forma mais comum, é provocada por espécies pertencentes aos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*, gerando úlceras na pele.

A Leishmaniose Cutânea (LC) é considerada a mais comum dentre as leishmanioses, sendo causada pela *L. major* e *L. tropica* no Oriente Médio, e *L. braziliensis* e *L. mexicana*, entre outras, nas Américas. Suas úlceras localizadas na pele são resultantes dos sítios de inoculação do parasita pelo flebotomíneo, sendo originalmente pápulas que evoluem para nódulos com tendência à ulceração. Esses nódulos podem ser tanto solitários como múltiplos pelo corpo e se propagam pelos vasos linfáticos, favorecendo o surgimento de adenopatias.

A Leishmaniose Mucocutânea (LMC) é considerada mais severa que a Leishmaniose Cutânea, e costuma coexistir com esta em detrimento de uma

infecção crônica. As lesões aparecem em formas de úlceras, afetando mais comumente mucosas, como narinas, bocas, podendo se estender para partes da orofaringe e laringe. Essas lesões podem ser disseminadas pelo sistema linfático e sanguíneo, sendo fundamental o tratamento preciso e eficaz para o controle da infecção.

A Leishmaniose Visceral (LV) é causada por espécies como *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*, se apresentando com sintomas como febre, esplenomegalia e perda de peso, podendo também ser identificado úlceras como hipersegmentação. Essa doença é o resultado da disseminação dos macrófagos infectados, afetando órgãos como baço, medula óssea e fígado, podendo ser fatal quando não tratada (ABADÍAS-GRANADO *et al.*, 2021).

Apesar de hoje em dia ainda não haver vacinas eficazes contra a Leishmaniose, existem tratamentos tanto locais como sistêmicos que servem de medidas terapêuticas para diferentes espécies de *Leishmania*, como por exemplo o antimônio pentavalente, agindo diretamente na base molecular do parasita e influenciando a atividade parasiticida dos macrófagos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). Porém, nenhum desses tratamentos são considerados 100% eficientes, sendo necessários estudos maiores da biologia molecular do parasita.

2.4 ASPECTOS MOLECULARES DE ESPÉCIES DE *LEISHMANIA*

Os parasitas do gênero *Leishmania* são organizados de forma unicelular com genoma diplóide, contando com 34 a 36 cromossomos (COUTINHO-ABREU *et al.*, 2020). Além de sua estrutura da cromatina que é formada de grande parte por nucleossomos, baseando-se em um octâmero central envolto pelo DNA genômico. Essa cromatina quando não condensada apresenta 10 nm de fibra, sendo responsável por deixar o DNA acessível, enquanto que a cromatina condensada pode apresentar fibra de 30 nm e dificulta o acesso do DNA para eventos como transcrição e RNA polimerases. Durante a conversão de estágio da *Leishmania*, a eucromatina é responsável por permitir a expressão genética necessária para a mudança de estado do parasita, esta mudança de estágio também é feita por variações de temperatura e pH, além da síntese de proteínas específicas (CLOS; GRÜNEBAST; HOLM, 2022).

Nesse sentido, a síntese de proteínas, através da tradução dos mRNAs, é uma das etapas mais importantes de desenvolvimento desses patógenos, sendo a tradução dividida em três partes cruciais: iniciação, alongamento e término. A

iniciação da tradução é a etapa que mais apresenta regulação, com os fatores de iniciação eucarióticos (eIFs – *eukaryotic initiation Factors*) responsáveis pelos mecanismos de iniciação, contribuindo na estabilização estrutural do complexo ribossomal e no posicionamento do mRNA. Outro aspecto importante a ser mais estudado, é a participação de certos complexos que estão ligados ao controle e desenvolvimento da expressão gênica nas fases de diferenciação celular dos patógenos. Sua ação deve ser de suma importância na sobrevivência desses organismos nos hospedeiros e em diferentes condições ambientais, alterando sua expressão gênica, morfologia e patogenicidade (GARDE et al., 2018).

Diferentes espécies de *Leishmania* apresentam semelhantes estágios durante seu ciclo de vida, apresentando formas promastigotas extracelulares dentro do inseto vetor e depois formando promastigotas metacíclicas. Nos hospedeiros mamíferos, diferentes tipos de leishmaniose podem ser gerados a partir da diferenciação das espécies.(ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017). Em cultivos *in vitro*, a diferenciação das formas promastigotas em outros estágios do seu ciclo de vida costuma depender da espécie do parasita, podendo apresentar certas dificuldades de mudança de ciclo. Essas dificuldades ocorrem devido a múltiplas situações como perda da capacidade do parasita de se diferenciar após um longo período, sendo necessário a expressão de proteínas estágio-específico que confirmam uma possível diferenciação. Porém, apesar da importância de marcadores, tanto estágio específicos como marcador de desenvolvimento do parasita, ainda existe uma grande lacuna em trabalhos que estudem de forma aprofundada esses marcadores que podem ser alvos de estudo de sua patogênese (COUTINHO-ABREU et al., 2020).

2.5 PROTEÍNAS RIBOSSOMAIS S6 E L23A DE *LEISHMANIA*

As proteínas ribossomais são partes estruturais importantes para o funcionamento do ribossomo, apresentando importante papel devido sua função universal em diferentes organismos, além de altamente conservadas. A função principal dos ribossomos é a síntese de proteínas a partir da informação genética trazida pelos RNA mensageiros. A depender das diversas funções dos polipeptídeos gerados, diferentes fenótipos são gerados em células e organismos, existindo então uma relação genótipo-fenótipo em diversas espécies. Logo, a biogênese do ribossomo como a tradução de proteínas específicas é finamente regulada e

responsável pelo desenvolvimento, proliferação e diferenciação das células presentes no organismo, podendo qualquer deficiência desse processo atingir ou retardar o crescimento celular e perturbar o desenvolvimento da espécie (POLYMENIS, 2020).

Nos eucariotos, quatro moléculas de RNA ribossômico e mais de 70 proteínas ribossômicas estão envolvidas no processo de biogênese dos ribossomos. Estes são divididos em duas subunidades funcionais, sendo a subunidade menor, 40s, e a subunidade maior, 60s. A subunidade menor é composta por uma simples molécula de RNA e 33 proteínas, uma delas sendo a proteína S6, muito estudada devido a seu papel na diferenciação celular na *Leishmania*. A proteína S6, que possui 33 KDa (seu gene contendo 759 pares de base), é conhecida por ser uma proteína evolutivamente conservada que abrange de 236 a 253 resíduos de aminoácidos em espécies distintas como plantas, leveduras, vertebrados e invertebrados. Essa proteína é considerada indispensável devido a sua fosforilação induzida por diversos estímulos, desempenhando funções reguladoras essenciais em vários processos celulares de diversos organismos como oncogênese, transporte celular, apoptose, etc (MEYUHAS, 2008). Estudos mostraram que a proteína S6 é fosforilada por diversas vezes em resíduos de serina a partir de estimulação de diversas células por diferentes agentes, como vírus, produtos oncogênicos, insulina etc. Durante a transformação da *Leishmania*, são identificadas fosforilações desta proteína, interferindo em diversos processos como diferenciação e proliferação celular do parasita (GONZALEZ-ASEGUINOLAZA *et al.*, 1998).

Diferentemente da proteína S6, a proteína L23A está localizada na subunidade ribossomal maior, 60S, que contém três moléculas de RNA (5S, 5.8S e 28S RNAs) e 46 proteínas ao todo. Antigamente acreditava-se que essas proteínas colaboravam apenas com a facilitação da síntese de proteínas, porém, estudos têm revelado que a proteína L23a está ligada a diversas funções extra ribossomais, como crescimento celular e apoptose, além de função moduladora, que pode contribuir para a resistência do parasita contra os tratamentos atuais (DAS *et al.*, 2013a). Apesar de nos seres humanos existirem mais estudos sobre esta proteína, como sua regulação negativa em melanoma humano e em outros tipos de célula tratados com interferon- β (JIANG *et al.*, 1997), ainda há poucos estudos que explorem as funções desta proteína em *Leishmania spp*, sendo de suma importância a produção destas proteínas em laboratório para a continuação de investigações do seu papel exato.

Considerando que nas diferentes etapas do ciclo de vida da *Leishmania*, as proteínas S6 e L23 podem ter uma expressão associada à regulação do crescimento celular, apoptose e regulação da tradução, elas podem ser utilizadas como marcadores para confirmar o tipo de crescimento celular (DAS *et al.*, 2013b) e, dessa forma, foram selecionadas neste trabalho para uma maior investigação.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Clonar e expressar os genes das proteínas ribossomais L23A e S6 de *Leishmania infantum* em sistema de expressão por *Escherichia coli*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter clones plasmidiais, genes codificantes das proteínas L23A e S6 de *Leishmania infantum*;
- Expressar e otimizar os parâmetros de expressão das proteínas L23A e S6 de *Leishmania* em *E. coli*.
- Purificar as respectivas proteínas recombinantes por cromatografia de afinidade.

4 METODOLOGIA

4.1 CLONAGEM DOS GENES L23A, S6 NO pGEM-T-EASY

Os genes codificantes das proteínas alvos desse estudo foram amplificados por outros membros do grupo de pesquisa utilizando o DNA genômico de *Leishmania infantum* através de PCR utilizando *primers* específicos para cada gene que foram então clonados em vetor plasmidial pGEM-T-Easy.

4.2 EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

Após todas as clonagens e subclonagens que foram transformadas em *Escherichia coli* linhagem DH10b, foi feita a extração plasmidial seguindo as seguintes etapas.

Após o crescimento de colônias, foram realizados os pré-inóculos com meio LB (Luria-Bertani) com ampicilina a uma concentração de 100 µg/mL em agitador por, aproximadamente, 16 horas a 37°C. As amostras foram centrifugadas a 5.000 G por 5 minutos e foi descartado o sobrenadante. Em seguida foram adicionados 100 µL de GTE (50 mM de glicose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris-HCl pH 8), homogeneizado e adicionado 200 µL de NaOH (0,2 N 1% SDS -dodecil sulfato de sódio), misturado e incubado por 5 minutos no gelo. Posteriormente foram acrescentados 150 µL de acetato de potássio e misturado por inversão e incubado mais uma vez no gelo por 5 minutos. Após esses procedimentos as amostras foram centrifugadas a 12.000 G por 10 minutos e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo e nele foi inserido 900 µL de etanol. Para otimizar a precipitação do DNA, as amostras foram colocadas à temperatura de -20°C durante 30 minutos. Para finalizar as minipreparações, as amostras foram centrifugadas a 12.000 G durante 10 minutos. Retirado o sobrenadante, as amostras foram postas em papel toalha para a secagem dos tubos. Após 15 minutos, os pellets foram ressuspensos em 20 µL de água com RNase (20 µg/mL) e deixados em banho maria a 37°C por 30 minutos.

4.3 DIGESTÕES E LIGAÇÕES

Os genes L23A e S6 já clonados no pGEM-T-Easy foram liberados por digestão com as enzimas de restrição BamHI e XhoI de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs). Na purificação destes foi utilizado o sistema de purificação GFX (Cytiva). Já para o vetor pET21a, foi feita sua desfosforilação com a enzima *Phosphatase antartica* (New England Biolabs) com seu respectivo tampão 10x *phosphatase* (New England Biolabs) e depois observadas as bandas por eletroforese em gel de agarose. Após a purificação, os genes foram introduzidos no vetor de clonagem pET21a por ligação com a enzima T4 Ligase (New England Biolabs) e em seguida foi feita a transformação em *Escherichia coli* linhagem TOP10. Posteriormente foi realizada extração plasmidial e digestão novamente com enzimas de restrição, BamHI e XhoI de acordo com as instruções do fabricante (New England Biolabs). As digestões foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose e, posteriormente, por sequenciamento.

4.4 SEQUENCIAMENTO DE DNA

As amostras de DNAs obtidas a partir das extrações plasmidiais foram enviadas para o sequenciamento e foram analisadas através do sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®) disponível para utilização no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM / FIOCRUZ. A integridade das sequências foi confirmada através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), presente em bancos de dados públicos.

4.5 EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As transformações para expressão foram realizadas através de choque térmico de *E. coli* das cepas BL21 star. Para expressão de proteínas recombinantes, células transformadas com as construções plasmidiais geradas, foram crescidas em meio Luria-Bertani (LB) na presença de ampicilina (100 µg/ml) crescidos a 37°C, sob agitação. Ao atingir uma O.D (densidade) de 0,6 num comprimento de onda de 600 nm, foi

acrescentado IPTG (Isopropylthio-B-galactoside) para uma concentração final de 0,1 mM. Após 3 horas de agitação, foi retirada uma alíquota, que foi fracionada em SDS-PAGE 20%, onde o resultado pôde ser visualizado após coloração do gel com azul de Coomassie R-250. Para o teste de solubilidade, os sedimentos celulares foram ressuspensos em diferentes concentrações molares de ureia: sem uréia, 1M, 2M, 4M e 8M, após a lise por 10 ciclos de congelamento/descongelamento o lisado foi centrifugado 10.000 G por 20 min e as frações solúvel (sobrenadante) e insolúvel (sedimento) de cada concentração foram separadas e fracionadas em SDS-PAGE 20% para observação das bandas.

4.6 PRODUÇÃO EM LARGA ESCALA E PURIFICAÇÃO PROTEICA

Para a purificação das proteínas recombinantes foi feita a seleção das condições de expressão mais eficientemente, onde as bactérias foram novamente inoculadas em meio de crescimento para a indução em larga escala, nas mesmas condições citadas acima, em um volume final de 500 ml. Para os passos de purificação foi utilizado resina de níquel através do sistema AKTA Pure (Cytiva). Após os passos de Indução, foi realizado a suspensão das culturas através de Tampão A (300mM de NaCl, 50 mM de NaH_2PO_4 e 10mM de Imidazol e pH 8,0) de coluna e sonicadas com o propósito de liberação das proteínas citoplasmáticas e o sobrenadante contendo o extrato proteico total. Após sucessivas lavagens com tampão A, as proteínas recombinantes foram eluídas com tampão B (300mM de NaCl, 50mM de NaH_2PO_4 e 300 mM de Imidazol, UREIA 4M pH 8,0). Essas amostras foram por fim coletadas e submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 20% e visualizadas por coloração com azul de Coomassie.

5 RESULTADOS

5.1 DIGESTÕES PLASMIDIAIS

Os genes codificantes das proteínas L23A e S6 de *L. infantum* já haviam sido amplificados e clonados em pGEM-T Easy. Posteriormente foi realizada extração plasmidial (mini preparações manuais) dos plasmídeos contendo ambos os genes L23A, S6 e do vetor de expressão pET21a com o intuito de obter mais DNA para os próximos passos. Após a recuperação dos DNAs plasmidiais, foram feitas digestões confirmatórias em pequena escala com as enzimas de restrição BamHI e XhoI (New England Biolabs) a fim de confirmar os tamanhos dos genes de interesse, como observado nas Figuras 2a e 2b. A l23a apresenta cerca de 447 pb, enquanto que a S6 apresenta 759 pb.

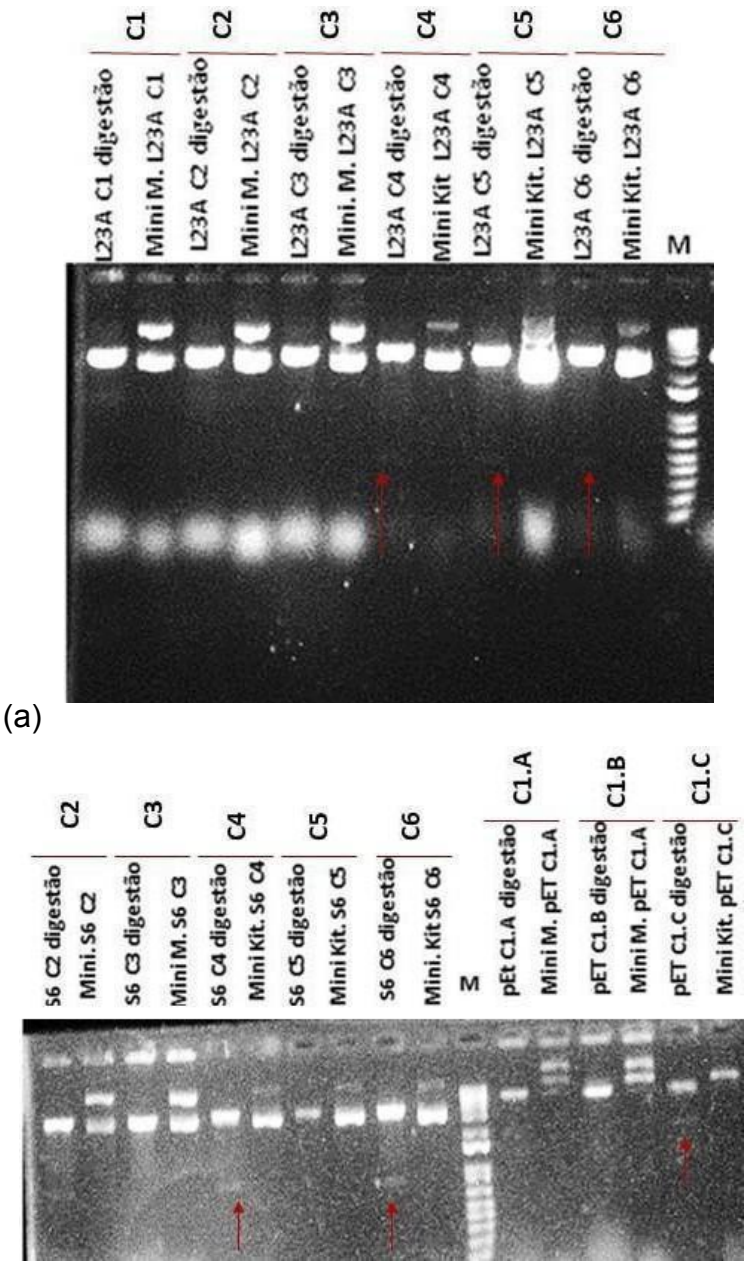


Figura 02: Digestões das extrações plasmidiais com os genes codificantes das proteínas L23A e S6 clonados. a) L23A (447pb) Áreas em vermelho destacam os fragmentos liberados de aproximadamente 500 pb das colônias C4, C5 e C6 do gene L23A após a digestão b) S6 (759pb) e vetor pET21A (5336 pb) os fragmentos de interesse liberados após a digestão, de aproximadamente 800pb das colônias C4 e C6 do S6 e de 5000pb do pET21a usado para obtenção do vetor. Gel de agarose 1% com sybr safe.

Depois da primeira digestão dos genes L23A, S6 e pET21a, foram escolhidas as colônias que liberaram os fragmentos nos tamanhos esperados, sendo respectivamente 447pb, 759pb e 5000pb. As colônias escolhidas foram as L23A C5, S6 C4 e pET C1. Foram realizadas digestões em larga escala com as enzimas de restrição BamHI e XhoI (New England Biolabs) para obtenção dos genes e vetor (Figura 3).

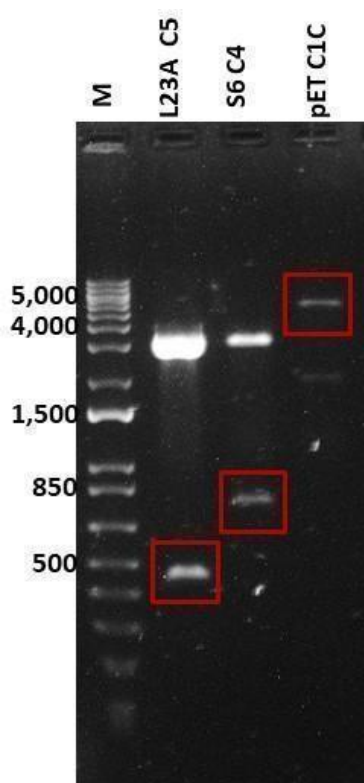


Figura 03: Digestão dos genes L23A (447 pb), S6 (759 pb) e pET21A (5336 pb). Gel agarose 1% com sybr safe. Áreas em vermelho destacam os fragmentos de interesse após a digestão, de aproximadamente 500 pb do L23A, 800 pb do S6 e 5336 pb do pET21a.

5.2 PURIFICAÇÃO E LIGAÇÃO DOS FRAGMENTOS

Após a liberação no tamanho esperado dos genes L23a e S6 pela digestão, foi realizada a purificação destes em gel de agarose e sistema de purificação (Cytiva) (Figura 04). Já para o vetor, foi feita a desfosforilação do pET21a com a enzima *Phosphatase antartic* (New England Biolabs) com seu respectivo tampão 10x

phosphatase (New England Biolabs). A purificação revelou os fragmentos da L23a e S6 com seus respectivos tamanhos esperados.

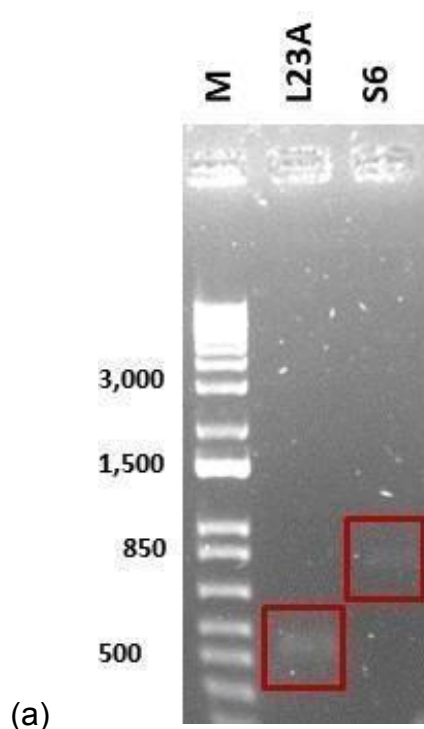


Figura 04: Purificações dos fragmentos utilizados para subclonagem. L23A e S6. Áreas em vermelho destacam os fragmentos purificados com seus respectivos pesos moleculares, de aproximadamente 500 pb do L23A e 800 pb do S6..

5.3 EXTRAÇÃO DOS DNAs PLASMIDIAIS NO VETOR DE EXPRESSÃO

Após a clonagem dos genes L23A e S6 no vetor pET21a com proporções de 1:1 e 1:3 no L23A e S6, foram realizadas diluições das extrações plasmidiais com proporção de 1:10 com o objetivo de uma melhor visualização das bandas das colônias dos genes S6 e L23a (Figura 5). As Mini Preparações escolhidas para a digestão da L23a foram as colônias C1, C7 e C9 e para a S6 foi a minipreparação C8. O vetor pET21a utilizado para clonagem foi utilizado como controle.

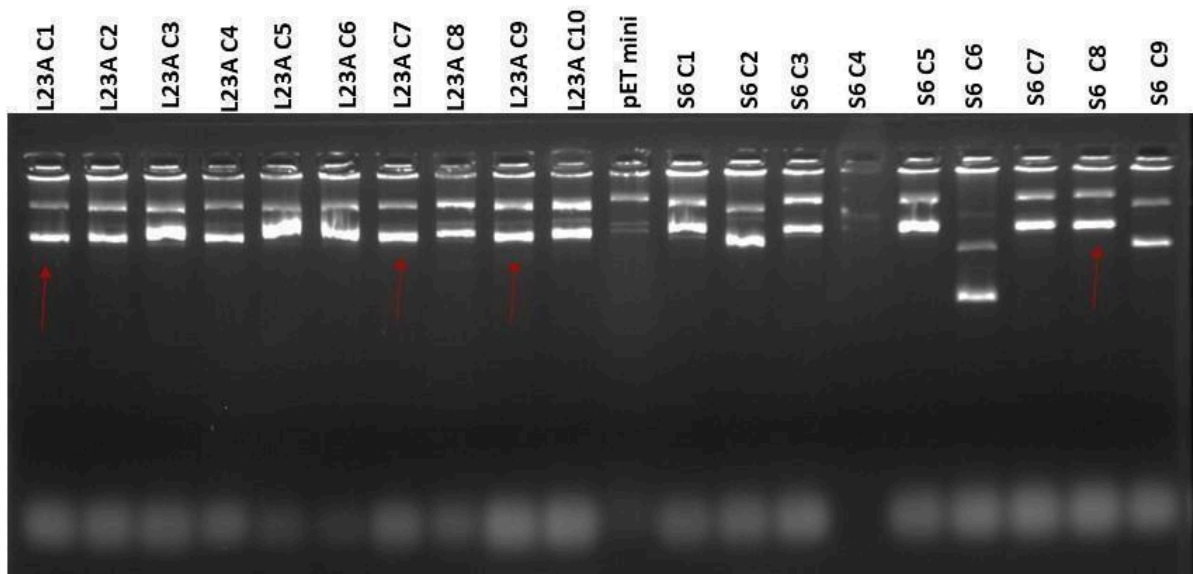
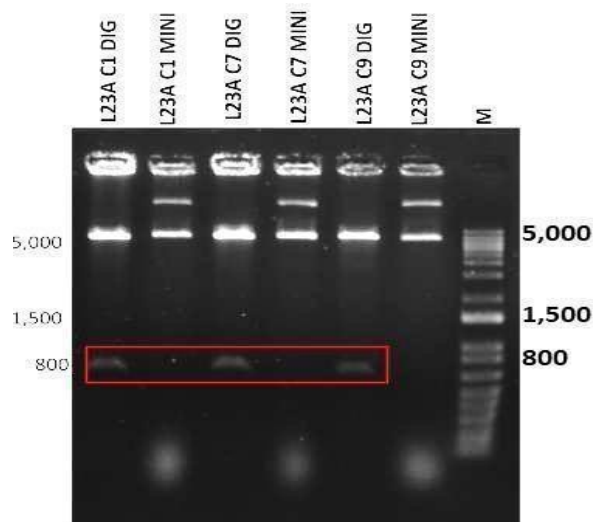


Figura 05: Extrações plasmidiais de L23A e S6 diluídas (1:10). Gel de agarose 1% com GelRed. Áreas em vermelho destacam as colônias escolhidas de cada gene.

5.4 DIGESTÕES PLASMIDIAIS no pET21A

Após a recuperação dos DNAs plasmidiais, foram realizadas digestões com as enzimas de restrição, BamHI e XhoI a fim de liberar os fragmentos nos tamanhos esperados (Figura 6a e 6b). As colônias escolhidas para o sequenciamento da L23A foram C1, C7 e C9 (a). A colônia escolhida do S6 para o sequenciamento foi a C8 (b). Por conta de erros na composição do gel de agarose, a colônia C8 não apresentou o tamanho esperado, porém foi confirmado sua clonagem no sequenciamento, seguindo para os próximos passos



(a)

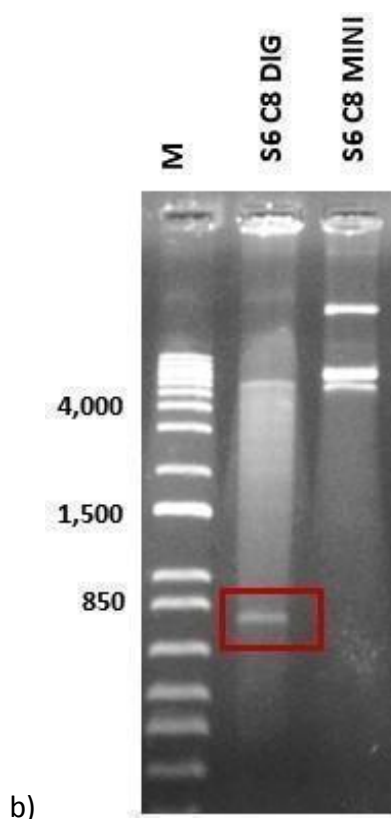


Figura 06: Digestões dos genes no pET21. a) L23A áreas em vermelho destacam fragmentos do L23A em aproximadamente 500 pb b) S6 fragmentos do S6 em aproximadamente 700 pb. Gel de agarose 1% com GelRed

5.5 SEQUENCIAMENTO

Após a digestão dos genes L23A e S6, as amostras que apresentaram a liberação dos fragmentos nos tamanhos corretos foram encaminhadas para o sequenciamento para confirmação das clonagens. O sequenciamento revelou que tanto os genes L23a como S6 haviam sido clonados com êxito, sendo possível os próximos passos de indução.

5.6 Expressões

Após a análise do sequenciamento, foi realizada uma mini indução com IPTG referente aos genes L23A e S6 em três diferentes temperaturas: 37°C, 30°C e 18°C. Na figura 07 podemos observar a expressão das proteínas de interesse após a adição do IPTG nas três temperaturas testadas. A L23a, apesar do tamanho predito ser aproximadamente 17 kDa, apareceu num tamanho de 22kDa e a S6 próximo de 35kDa, porém ambas as proteínas induziram melhor a uma temperatura de 30°C

devido a largura da banda, sendo esta utilizada nas próximas etapas de indução.

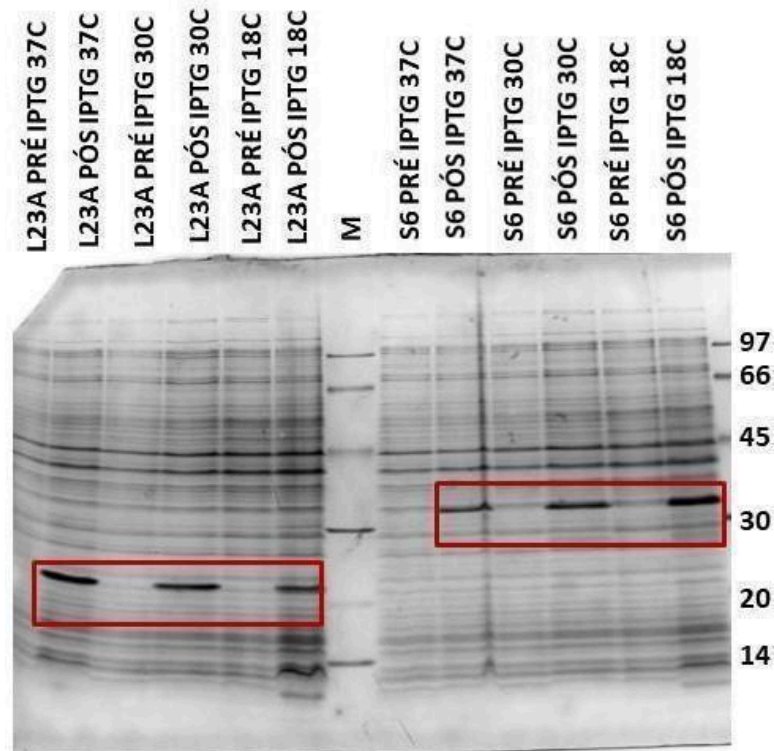


Figura 07: Mini Indução das proteínas L23A (17 kDa) e S6 (33 kDa). Gel SDS 20%. As áreas destacadas em vermelho representam as proteínas mais expressas após a adição do IPTG

Após a confirmação das bandas expressas pela mini indução, foram realizadas max indução dos genes S6 e L23A na temperatura escolhida de 30°C, expressando com êxito estas proteínas no seu peso esperado.

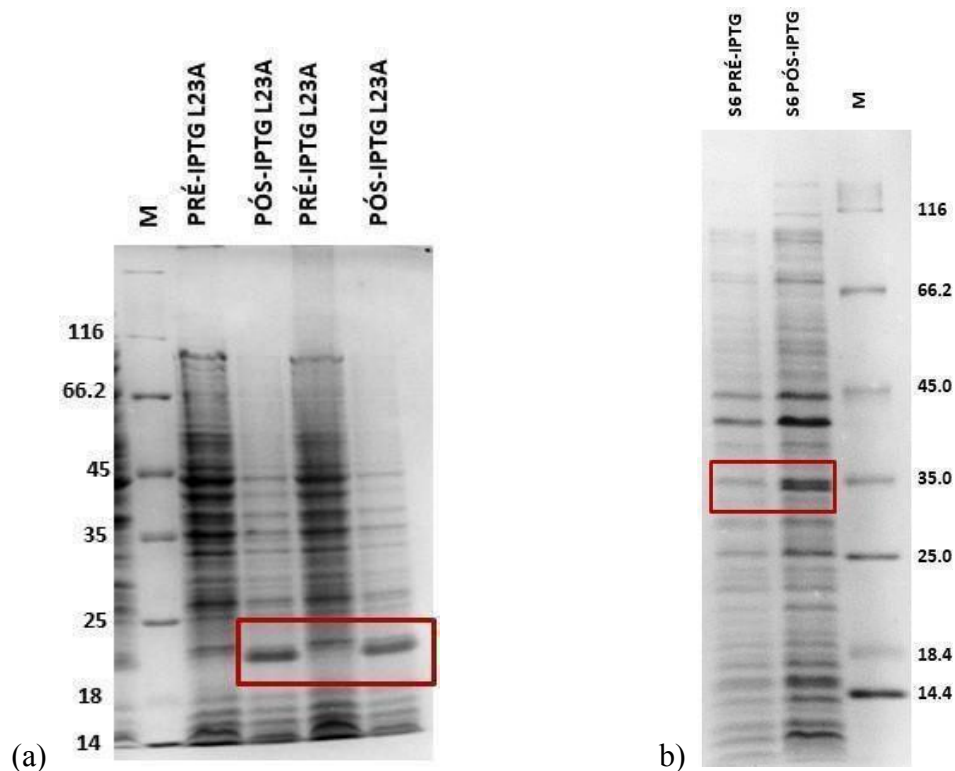


Figura 08: Max Indução. a) L23A. b) S6. Gel de poliácridamida 20%. A área destacada revela as bandas expressas após adição do indutor IPTG.

5.7 TESTES DE SOLUBILIDADE

Após a produção dessas proteínas em larga escala, foi realizado o teste de solubilidade com o objetivo de descobrir a concentração necessária. O resultado do experimento provou que a molaridade de ureia indicada é a de concentração 4M, onde foi visto a presença da proteína no sobrenadante.

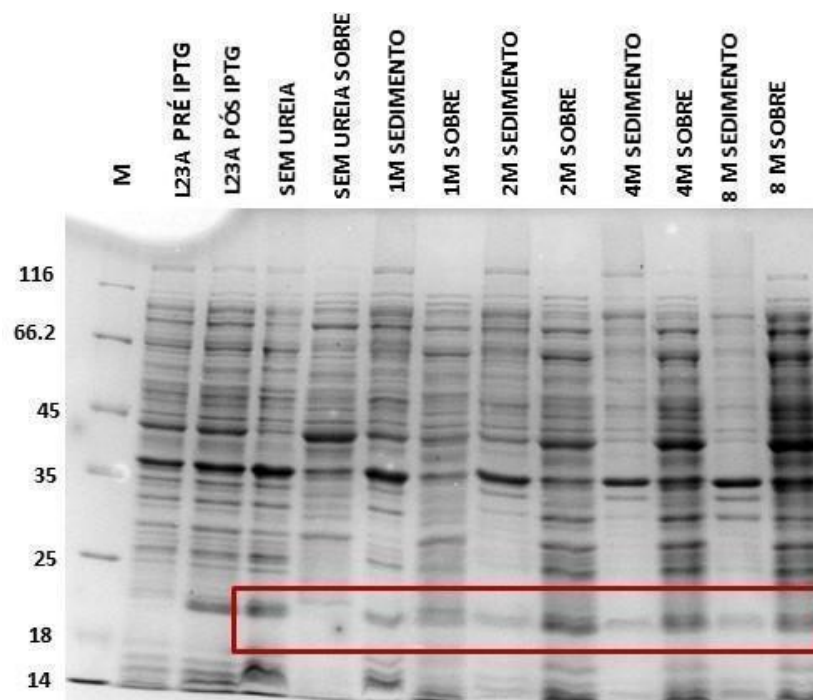


Figura 09: Teste de solubilidade da proteína L23A. Gel de poliacrilamida 20%. As áreas em vermelho destacadas revelam a concentração em que houve solubilidade da proteína.

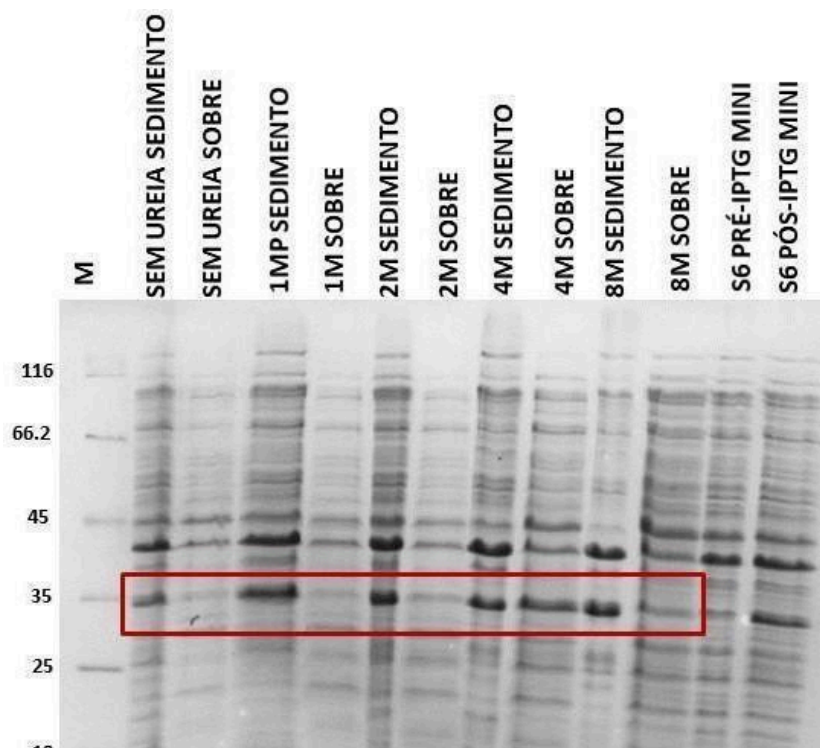
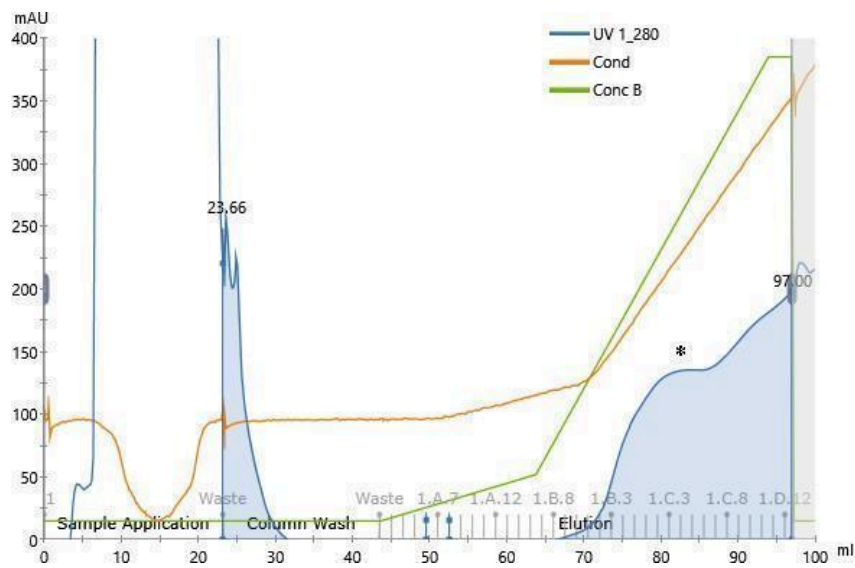


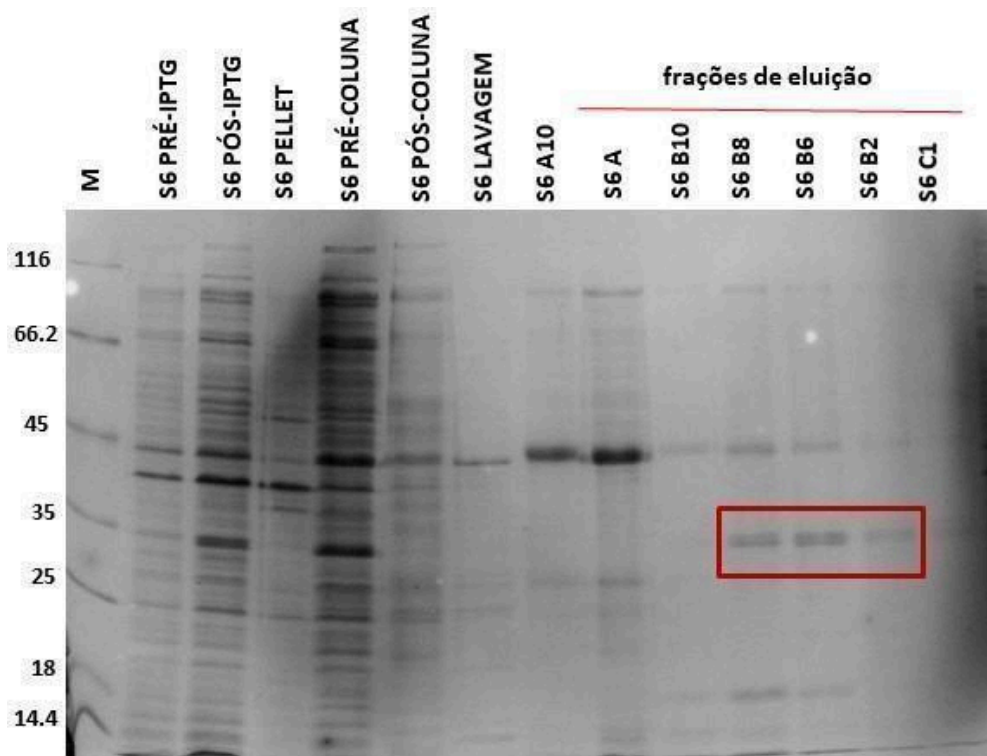
Figura 10: Teste de solubilidade da proteína S6. Gel de poliacrilamida 20%. As áreas em vermelho destacadas revelam a concentração em que houve solubilidade da proteína.

5.8 PURIFICAÇÃO

Após o teste de solubilidade, foi realizada a purificação das proteínas L23A e S6 por cromatografia de afinidade, seguindo de fracionamento por SDS-PAGE para a visualização das proteínas esperadas. Tanto a proteína S6 como a L23a apareceram purificadas nas frações de eluição com seu peso esperado como podemos observar nas figuras 11b e 12.



(a)



b)

Figura 11: Purificação da S6. a) Cromatograma da purificação da proteína S6 (33 KDa), mostrando a purificação da proteína. b) Separação por eletroforese em gel de SDS-PAGE 20%, onde observa-se a proteína S6 nas frações B8, B6 e B2.

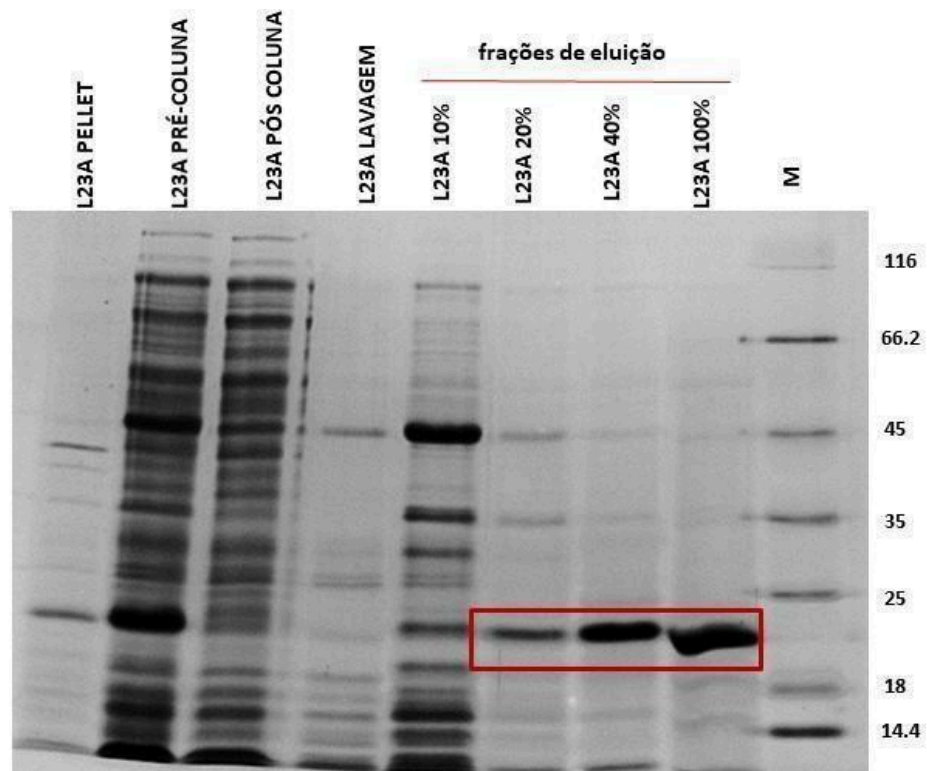


Figura 12: Purificação da L23A. Gel de poliacrilamida 20%. Áreas em vermelho destacam a purificação das seguintes proteínas. Devido alguns problemas técnicos durante a eluição da proteína L23A, não foi gerado cromatograma da purificação da mesma, porém foi possível observar no gel de poliacrilamida que a mesma foi purificada nas frações 20%, 40% e 100%.

6 DISCUSSÃO

Os parasitas tripanosomatídeos que englobam as espécies de *Leishmania* são causadores de doenças infecciosas presentes notavelmente em países tropicais e subtropicais, onde normalmente não há um cuidado básico de saúde acessível para toda a população (DEPLEDGE *et al.*, 2010). Logo, a importância de estudos que visam entender os mecanismos da infecção e consequente patogênese faz-se de extrema importância com o intuito de entendê-la e procurar ferramentas genéticas que possam contribuir para o combate dessas atuais doenças.

Espécies de *Leishmania* costumam apresentar duas formas distintas em seu ciclo de vida: forma promastigota presente no mosquito vetor, e forma amastigota presente nos hospedeiros mamíferos. Durante esse ciclo, fosforilação e desfosforilação são eventos responsáveis por sinalizar as células de eventos internos e externos do organismo, possibilitando respostas específicas. Essas respostas são mediadas por proteínas que usam ferramentas de tradução genética, possibilitando o desenvolvimento do parasita dentro do organismo como sua mudança de ciclo, podendo servir como ponto de partida para estudos que visam estudar diretamente essas proteínas e suas funções específicas (FREITAS-MESQUITA; DOS-SANTOS; MEYER-FERNANDES, 2021).

Essa monografia teve como objetivo o estudo de duas proteínas presentes na espécie de *Leishmania infantum*, presentes na unidade ribossomal: L23A e S6. Estas duas proteínas foram escolhidas para o estudo devido sua pouca informação na literatura e por apresentarem importância ligada a eventos de resistência contra tratamentos atuais das Leishmanioses (L23) e por mudanças na sua fosforilação permitir o desenvolvimento e manutenção do parasita nas suas diferentes fases (S6). Sabe-se que as leishmanioses são doenças que afetam a população na dimensão global, e principalmente países tropicais e subtropicais, sendo conhecida como uma doença tropical negligenciada (MENDOZA-ROLDAN *et al.*, 2022).

Através da purificação destas proteínas, realizada nesta monografia, será possível futuros experimentos que visam realizar imunizações em coelhos. Estas imunizações permitirão a continuação de estudos com anticorpos específicos das proteínas S6 e L23a, estudando mais a fundo seus mecanismos de resistência e contribuindo com informações que permitirão a produção de vacinas eficazes contra estas leishmanioses. Ambas as proteínas, durante os experimentos realizados,

apresentaram sucesso e facilidade na etapa de clonagem, porém a proteína S6 apresentou dificuldade no processo de expressão em pequena e larga escala, o que refletiu a purificação diminuída, se comparada a purificação da proteína L23a. A S6 também apresentou uma banda contaminante significativa na purificação em um tamanho não esperado. Suspeita-se que haja duas isoformas distintas da proteína S6, sendo algo que será mais investigado nos próximos passos. Apesar disso, ambas apresentaram um resultado final satisfatório, revelando as proteínas esperadas, sendo possível então a continuação das próximas etapas, que serão realizadas em etapa posterior.

7 CONCLUSÃO

- Foi realizada a subclonagem dos insertos dos genes L23A e S6 no vetor de expressão pET21a, podendo assim seguir para a indução de proteínas após a confirmação do sequenciamento.
- Foram realizadas otimizações das induções com IPTG dos genes L23A e S6 em diferentes temperaturas: 37°C, 30°C e 18°C. E posteriormente realizadas max induções na temperatura fixa de 30°C.
- Foram realizados testes de solubilidade em ureia das proteínas de interesse, mostrando que ambas proteínas são solúveis em uma concentração de ureia de 4M.
- Foram realizadas as purificações das proteínas L23A e S6 por cromatografia de afinidade, revelando as bandas esperadas fracionadas. Demonstrando a eficácia das metodologias otimizadas para expressão e purificação dessas proteínas.
- Por fim, trabalhos futuros poderão utilizar as proteínas aqui produzidas para produção de anticorpos policlonais contra essas proteínas, uma ferramenta que poderá ser utilizada para melhor compreender o papel dessas proteínas no ciclo da *Leishmania spp.*

REFERÊNCIAS

ABADÍAS-GRANADO, I. *et al.* **Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. Actas Dermo-Sifiliograficas Elsevier Doyma**, , 1 jul. 2021.

ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review On Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, v. 11, n. 4, 2017.

BATES, P. A. **Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. International Journal for Parasitology**, ago. 2007.

CLAYTON, C. Regulation Of gene expression in trypanosomatids: Living with polycistronic transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2019a.

CLOS, J.; GRÜNEBAST, J.; HOLM, M. **Promastigote-to-Amastigote Conversion in Leishmania spp.—A Molecular View. Pathogens. MDPI**, 1 set. 2022.

COUTINHO-ABREU, I. V. *et al.* Distinct gene expression patterns in vector-residing *Leishmania infantum* identify parasite stage-enriched markers. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 14, n. 3, 1 mar. 2020.

DAS, S. *et al.* Over-Expression of 60s Ribosomal L23a Is Associated with Cellular Proliferation in SAG Resistant Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013a.

DAS, S. *et al.* Over-Expression of 60s Ribosomal L23a Is Associated with Cellular Proliferation in SAG Resistant Clinical Isolates of *Leishmania donovani*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 12, 2013b.

DEPLEDGE, D. P. *et al.* *Leishmania*-specific surface antigens show sub-genus sequence variation immune recognition. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 9, set. 2010.

GHORBANI, M.; FARHOUDI, R. **Leishmaniasis in humans: Drug Or Vaccine Therapy? Drug Design, Development and Therapy**, Dove Medical Press Ltd., 2018.

GONZALEZ-ASEGUINOLAZA, G. *et al.* **Cloning and Structural Analysis of the Gene Encoding the Ribosomal Protein S6 from the Parasite *Leishmania Infantum*. BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL RESEARCH COMMUNICATIONS.**

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. **Two separate growth phases during the development of Leishmania in sandflies: implications for understanding the life cycle.**

GRÜNEBAST, J. *et al.* **Life CycleStage-Specific Accessibility of Leishmania donovani Chromatin at Transcription Start Regions.** 2021.

JACKSON, A. P. The evolution of amastin surface glycoproteins in trypanosomatid parasites. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, n. 1, p. 33–45, jan. 2010.

KAUFER, A.; STARK, D.; ELLIS, J. Evolutionary insight into the trypanosomatidae using alignment-free phylogenomics of the kinetoplast. **Pathogens**, v. 8, n. 3, 1 set. 2019.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical Syndromes And Treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 1 jan. 2014.

MEYUHAS, O. Ribosomal Protein S6 Phosphorylation: Four Decades of Research. **International Review of Cell and Molecular Biology**, v. 320, p. 41–73, 2015.

PEDERIVA, M. M. C. *et al.* **Asymptomatic Leishmania Infection in humans: A systematic review.** **Journal of Infection And Public Health.** ElsevierLtd, , 1 fev. 2023.

PISCOPO, T. V.; MALLIA, A. C. **Leishmaniasis.** **Postgraduate Medical Journal**, out. 2006.

RIBEIRO, P. A. F. *et al.* Leishmania Infantum Amastin protein Incorporated in distinct adjuvant systems induce protection against visceral leishmaniasis. **Cytokine**, v. 129, 1 maio 2020.

AKHOUNDI M. *et al.* **Leishmania Infections: Molecular targets and diagnostics.** 31 jan 2017.

FREITAS-MESQUITA, A. L.; DOS-SANTOS, A. L. A.; MEYER-FERNANDES, J. R. **Involvement of Leishmania Phosphatases in Parasite Biology and Pathology.** **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology** Frontiers Media S.A., , 22 abr. 2021.

GARDE, E. *et al.* Analysis of the antigenic and prophylactic properties of the Leishmania translation initiation factor eIF2 and eIF2B in natural and experimental leishmaniasis. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 8, n. APR, 5 abr. 2018.

JIANG, H. *et al.* **Suppression Of Human Ribosomal Protein L23A expression during cell growth inhibition by interferon- β .**

MENDOZA-ROLDAN, J. A. *et al.* ***Leishmania Tarentolae*: A new frontier in the epidemiology and control of the leishmaniasis.** Transboundary and Emerging Diseases John Wileyand Sons Inc, , 1 set. 2022.

MEYUHAS, O. **Chapter 1 Physiological Roles of Ribosomal Protein S6: One of Its Kind.** International Review of Cell and Molecular Biology, 2008.

POLYMENIS, M. **Ribosomal proteins: Mutant Phenotypes By The Numbers And Associated gene expression changes.** Open Biology Royal Society Publishing, , 1 ago. 2020.

REZENDE, A. M. *et al.* **The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other pathogenic excavates - identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis.** BMC Genomics, v. 15, n. 1, 24 dez. 2014.