

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

RÔMULO MURILO DO NASCIMENTO MORAES

IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS RELEVANTES PARA A FUNÇÃO DO FATOR DE
INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4E3 DE *LEISHMANIA SP.*

RECIFE
2015

RÔMULO MURILO DO NASCIMENTO MORAES

**IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS RELEVANTES PARA A FUNÇÃO DO FATOR DE
INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4E3 DE *LEISHMANIA SP.***

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Co-orientador: Dr. Christian Robson de Souza Reis

RECIFE

2015

Catálogo na fonte: Biblioteca do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

- M827i Moraes, Rômulo Murilo do Nascimento.
Identificação de motivos relevantes para a função do fator de iniciação da tradução EIF4E3 de *Leishmania* sp / Rômulo Murilo do Nascimento Moraes. - Recife: [s.n.], 2015.
74 p. : il., graf., tab.
- Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.
Coorientador: Christian Robson de Souza Reis.
1. *Leishmania*. 2. Fator de Iniciação 4F em Eucariotos. 3. Expressão Gênica. 4. Ligação Proteica. 5. Biossíntese de Proteínas. 6. Homologia de Sequência do Ácido Nucleico. 1. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. 2. Reis, Christian Robson de Souza. III. Título.

CDU 616.993.161

RÔMULO MURILO DO NASCIMENTO MORAES

IDENTIFICAÇÃO DE MOTIVOS RELEVANTES PARA A FUNÇÃO DO FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO EIF4E3 DE *LEISHMANIA SP.*

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz para a obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 29/06/2015

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto – Orientador
Departamento de Microbiologia – CPqAM – FIOCRUZ/PE

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Departamento de Entomologia – CPqAM – FIOCRUZ/PE

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Departamento de Entomologia – CPqAM – FIOCRUZ/PE

Ao grupo BioMolTryp

AGRADECIMENTOS

Agradeço a meu orientador Dr. Osvaldo pela orientação, paciência e oportunidade de participação no grupo. Tenho admiração pelo seu trabalho e espero que cada vez mais dê frutos.

A meu co-orientador Dr. Christian pelo suporte e conselhos nos momentos de necessidade.

À Dra. Mariana Marques, minha co-orientadora da Iniciação Científica, por ter me ensinado de perto o bê-á-bá do laboratório, contribuindo muito com minha formação profissional.

A Irassandra, Gustavo e Ludmila pela ajuda que me deram na realização de experimentos, de forma especial à Irassandra por ter sido o socorro nos momentos de necessidade, sempre com muita boa vontade. Obrigado!

Aos meus amigos do BioMolTryp por todos os ensinamentos, auxílios e momentos de descontração do dia-a-dia, dividindo as alegrias e frustrações da bancada e da vida, em especial Camila, Ludmila e Wagner, por compartilharem comigo as aflições do mestrado. Obrigado por todo o carinho e pela amizade de vocês.

Aos Hot Polares Artur, Carol, Felipe, Ludmila, Janaína, Marília, Nathaly, Rodrigo e Wagner. É muito bom ter um grupo com quem podemos falar sobre tudo e por quem temos um sentimento de pertencer. Vocês fazem muito bem a mim.

À Adriana Burgo, pelas várias caronas do trabalho ao Aggeu.

Aos meus colegas de turma do Mestrado pelo companheirismo e pela fé que tem em mim.

Aos técnicos do Departamento de Microbiologia, que direta ou indiretamente participaram da execução deste trabalho, especialmente Bruna.

À FIOCRUZ, pela bolsa de mestrado.

Ao CPqAM, por fornecer a infraestrutura e equipamentos necessários.

E por fim à Grande Ordem, à Primeira Causa, por ter produzido um universo tão cheio de mistérios e nos dotar com a curiosidade e a capacidade de investigar.

"Às vezes dá tudo errado. E aí acontecem coisas maravilhosas que jamais teriam acontecido se tudo tivesse dado certo."

Autor desconhecido

"Saudade é ser, depois de ter."

Guimarães Rosa

MORAES, R. M. N. **Identificação de motivos relevantes para a função do fator de iniciação da tradução EIF4E3 de *Leishmania* sp.** 2015. Dissertação (Mestrado e Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

RESUMO

Os tripanossomatídeos são organismos caracterizados pelo controle pós-transcricional da expressão gênica, principalmente em nível de tradução. Na tradução em eucariotos, tem grande destaque o complexo eIF4F, sendo um de seus principais componentes o fator de iniciação da tradução eIF4E. Já foram descritos em tripanossomatídeos seis homólogos para o eIF4E, nomeados EIF4E1 a 6. Em um estudo com *Leishmania amazonensis*, focado no EIF4E3, percebeu-se que seu perfil de expressão se alterava rapidamente numa curva de crescimento, com este apresentando ao menos duas bandas. As mudanças observadas sugeriam modificações pós-traducionais do tipo fosforilação, algo posteriormente confirmado. Analisando-se a sequência do EIF4E3 de *Leishmania*, foi possível identificar a presença de possíveis sítios de fosforilação e de ligação a parceiros funcionais como homólogos do eIF4G, outro componente do complexo eIF4F, e da proteína de ligação á cauda poli-A (PABP). No presente estudo foi analisado o perfil de expressão e a capacidade de ligação a parceiros funcionais do EIF4E3 de *Leishmania* superexpresso em células transfectadas e no qual foram introduzidas mutações em motivos específicos. Os resultados mostraram um perfil de expressão de ao menos três bandas para o EIF4E3 de *L. amazonensis* e duas para *L. infantum*, com o sítio S75, presente apenas na primeira, sendo o responsável por esta diferença. Em ensaios de imunoprecipitação, foi identificado um motivo que, quando mutado, aboliu a ligação do EIF4E3 com a PABP3, sugerindo este como o sítio de interação entre os fatores. Com a análise do efeito de mutações no EIF4E3 de *L. amazonensis*, foi percebido que ao se mutar três motivos implicados na à PABP e o possível sítio de ligação ao EIF4G, sua fosforilação diminuiu drasticamente, sugerindo a necessidade destas interações para que a fosforilação ocorra. Estes resultados indicam um complexo mecanismo de modificações pós-traducionais responsáveis pela regulação do EIF4E3 e contribuem a para a caracterização da sua função em *Leishmania*.

Palavras-chave: *Leishmania*, EIF4E3, modificações pós-traducionais

MORAES, R. M. N. **Identification of relevant motifs to translation initiation factor EIF4E3 function in *Leishmania* sp.** 2015. Dissertation (Master's Degree in Life Sciences and Biotechnology in Health) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2015.

ABSTRACT

The trypanosomatids are organisms characterized by the post-transcriptional control of their gene expression, particularly at the translation level. In eukaryotic translation, the eIF4F complex plays an important role, and one of its main components is the translation initiation factor eIF4E. In trypanosomatids, there have been described six eIF4E homologues, named EIF4E1 to 6. In a study of *Leishmania amazonensis*, focusing on EIF4E3, it was noticed that its expression profile was altered quickly during a growth curve, with it being represented by at least two bands. The changes seen were consistent with post-translational modifications, like phosphorylation, which were confirmed later. Analyzing the sequence of the *Leishmania* EIF4E3, it was possible to identify the presence of putative phosphorylation sites and binding motifs to partners such as eIF4G homologues, another component of eIF4F complex, and to the poly-A tail binding protein (PABP). In the present study we analyzed the expression profile and the ability to bind to functional partners of *Leishmania* EIF4E3 overexpressed in transfected cells and in which mutations targeted to specific motifs were introduced. The results showed an expression profile of at least three bands for *L. amazonensis* EIF4E3 and two for *L. infantum*, with the S75 site, found just in the first protein, being responsible for this difference. In immunoprecipitation tests, a motif was identified which, when mutated, abolished the binding of EIF4E3 to PABP3, suggesting this as the site of interaction between these factors. With the analysis of the effect of mutations in *L. amazonensis* EIF4E3, it was noticed that mutations in the three motifs involved in binding to different PABP homologues and the tryptophan responsible for binding to eIF4G dramatically decreased phosphorylation, suggesting the need for these interactions for phosphorylation to occur. These results indicate a complex mechanism of post-translational modifications responsible for regulating EIF4E3 and contribute to the characterization of its function in *Leishmania*.

Key-words: *Leishmania*, EIF4E3, post-translational modifications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Formas evolutivas do gênero <i>Leishmania</i>	18
Figura 2 - Insetos vetores da Leishmaniose.....	18
Figura 3 - Ciclo biológico do gênero <i>Leishmania</i>	20
Figura 4 - As diversas manifestações clínicas da leishmaniose.....	23
Figura 5 - Transcrição e processamento de mRNAs nos tripanossomatídeos.....	27
Figura 6 - Esquema simplificado da iniciação da tradução em eucariotos.....	29
Figura 7 - Complexo eIF4F e circularização do mRNA através da PABP.....	30
Figura 8 - Modelo tridimensional do eIF4E murino.....	32
Figura 9 - Esquema de PCRs utilizado para a construção dos genes mutantes.....	41
Figura 10 - Alinhamento das sequências proteicas do EIF4E3 de espécies de <i>Leishmania</i>	49
Figura 11 - Géis representativos das amplificações dos <i>megaprimers</i> e dos genes do EIF4E3 mutados.....	51
Figura 12. Esquema do EIF4E3 e de seus aminoácidos mutados.....	52
Figura 13 - Comparação entre os perfis de expressão das proteínas com as mutações S75A e S75D.....	54
Figura 14 - Expressão dos mutantes do EIF4E3 dos sítios de fosforilação.....	54
Figura 15. Expressão de 4E3 La, 4E3 Li e 4E3ΔS75A em <i>L. amazonensis</i>	56
Figura 16. Expressão de 4E3 La, 4E3 Li e 4E3ΔS75A em <i>L. infantum</i>	57
Figura 17. Imunoprecipitação de construções mutantes do EIF4E3 e sua interação com a PABP3.....	58

Figura 18. Comparação do perfil de expressão de mutantes do EIF4E3.....59

Figura 19. Alinhamento da região N-terminal do EIF4E3 de *Leishmania* com outros possíveis sítios de fosforilação.....64

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Sequência dos <i>primers</i> utilizados na mutagênese do EIF4E3.....	42
Quadro 2 - Esquema de <i>primers</i> utilizado nas construções dos genes mutantes.....	50
Quadro 3 - Construções do EIF4E3 utilizadas neste estudo.....	52

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

dATP – Trifosfato de adenosina (*Deoxyadenosine triphosphates*)

DNA – Ácido Desoxirribonucléico (*Desoxyribonucleic Acid*)

eIF – Fator de Iniciação Eucariótico (*eukaryotic Initiation Factor*)

g - gravidade

HA – Hemaglutinina

HEAT – Domínio protéico denominado de acordo com as proteínas em que foi inicialmente descrito (Huntingtina, Fator de Elongação 3, subunidade A da fosfatase 2A e proteína alvo da rampamicina - 1/TOR1)

HEPES - *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*

IgG - Imunoglobulina G

IP - Imunoprecipitação

mL – Mililitro

mTOR – Alvo Molecular da Ramapmicina (*Mammalian Target of Ramapamycin*)

kDa – QuiloDalton

La – complemento utilizado neste trabalho para designar proteínas de *Leishmania amazonenses*

Li – complemento utilizado neste trabalho para designar proteínas de *Leishmania infantum*

LC – Leishmaniose cutânea

LCD – Leishmaniose cutânea difusa

LDPK – Leishmaniose dérmica pós-calazar

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LV – Leishmaniose Visceral

LB – Meio de cultura Luria Bertani

MAPK - Proteínas quinases ativadas por mitógenos (*Mitogen Activeted Protein Kinases*)

Mb - Megabases

Mnk – Proteína quinase ativada por mitógenos (*Mitogen Activated Protein Kinase*)

Mrna – RNA Mensageiro (*Messenger RNA*)

PABP – Proteína de Ligação à Cauda Poli-A (*Poly-A Binding Protein*)

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

RNAi – Técnica de RNA de interferência

PVDF – Fluoreto de Polivinilideno

RNA pol - RNA polimerase

RPM – Rotações por minuto

RRM – Domínio de Reconhecimento do RNA (*RNA Recognition Motifs*)

SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (*Sodium Disulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis*)

SFB – Soro fetal bovino

SL – Sequência *spliced leader* ou mini-éxon

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

UTR – Região não traduzida (*Untranslated Region*)

WB – *Western Blot*

WHO – Organização Mundial da Saúde (*World Health Organization*)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1 A ORDEM KINETOPLASTIDA E A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE	18
2.2 GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	19
2.3 VETORES DE TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO	20
2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS	22
2.5 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS	25
2.5.1 Organização Genômica e Transcrição Policistrônica	25
2.5.2 O Trans-splicing	26
2.6 BIOSÍNTESE PROTÉICA EM EUCARIOTOS	28
2.6.1 O Complexo eIF4F e a PABP	30
2.6.1.1 eIF4E - estrutura e função	32
2.6.1.1 eIF4E - fosforilação e 4E-BPs	34
2.7 COMPLEXO EIF4F E PABP EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	35
2.7.1 O eIF4E em tripanossomatídeos	37
2.8 RESULTADOS PRÉVIOS QUE DERAM ORIGEM A ESTE TRABALHO	38
3 JUSTIFICATIVA	40
4 OBJETIVOS	41
4.1 OBJETIVO GERAL	41
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
5 MATERIAIS E MÉTODOS	42
5.1 CONSTRUÇÃO DOS GENES MUTANTES DO <i>EIF4E3</i>	42
5.2 CLONAGEM E SUBCLONAGEM DOS GENES MUTANTES	44
5.3 CULTIVO E TRANSFECCÃO DE CÉLULAS DE <i>LEISHMANIA</i>	45
5.4 CURVAS DE CRESCIMENTO E PREPARAÇÃO DE EXTRATOS TOTAIS	46
5.5 PREPARAÇÃO DE LISADOS CELULARES E ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO	47
5.6 ENSAIOS DE <i>WESTERN-BLOT</i>	48

6 RESULTADOS	49
6.1 CONSTRUÇÃO DOS GENES <i>EIF4E3</i> MUTANTES	49
6.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MUTANTES DO EIF4E3 EM SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO	54
6.3 EXPRESSÃO DO EIF4E3 EM <i>L. AMAZONENSIS</i> E <i>L. INFANTUM</i>	55
6.4 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE MUTAÇÕES NO EIF4E3 EM SUA INTERAÇÃO COM A PABP3.....	58
6.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS DE MAIS MUTANTES DO EIF4E3.....	59
7 DISCUSSÃO	61
8 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

A família Trypanosomatidae, pertencente à ordem Kinetoplastida, é formada por protozoários que possuem importância médico-veterinária a nível mundial por ocasionarem doenças como a Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, a Doença do Sono, causada pelo *Trypanosoma brucei* e as diversas formas clínicas de Leishmaniose, causadas pelas diferentes espécies do gênero *Leishmania*. No caso da Leishmaniose, esta é endêmica em 98 países e atinge anualmente milhões de pessoas no mundo, uma situação preocupante e que desperta o maior interesse pelo estudo tanto da biologia celular quanto molecular destes organismos.

Os vetores que transmitem a Leishmaniose são insetos hematófagos da família Psychodidae. A infecção acontece quando fêmeas infectadas fazem o repasto sanguíneo em hospedeiros mamíferos (incluindo o homem) inoculando formas infectivas do parasita no sangue. De um hospedeiro a outro, o parasita precisa se adaptar a condições adversas, como diferenças de temperatura e pH e disponibilidade de nutrientes. Esta adaptação se reflete numa mudança grande de sua morfologia, sugerindo que estes parasitas tenham uma complexa regulação gênica.

Do ponto de vista de sua biologia molecular, os tripanossomatídeos como um todo possuem características bastante distintas em relação a outros eucariotos. A síntese dos seus mRNAs ocorre de forma policistrônica, com a formação de grande transcritos primários contendo regiões codificantes para vários genes. Estes são separados em mRNAs monocistrônicos através de dois processos concomitantes: o *trans-splicing* e a poliadenilação. Juntando a transcrição policistrônica à ausência de promotores de transcrição clássicos dos eucariotos, não parece haver controle transcricional para estes parasitas, sendo a regulação gênica feita pós-transcricionalmente ao longo de várias etapas, como durante a tradução.

A biossíntese protéica, ou tradução, tem um papel fundamental na biologia de todo ser vivo. Esta é dividida em iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos, sendo a iniciação a etapa mais complexa e da qual participa um grande número de moléculas denominadas eIFs (do inglês, *eukaryotic Initiation Factor*). Pelo fato de compreender várias moléculas adicionais e muitos passos sucessivos, a etapa de iniciação da tradução é mais sujeita a eventos de regulação. Dentre suas várias moléculas, existe um complexo de papel fundamental chamado

eIF4F. Este é formado por três subunidades: o eIF4A, uma RNA helicase; o eIF4E, uma proteína que se liga diretamente ao *cap* na extremidade 5' do mRNA e o eIF4G, a proteína estruturadora deste complexo que interage com os dois fatores já citados e com outras proteínas. Uma das proteínas parceiras do complexo eIF4F é a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP – *Poly-A Binding Protein*) que promove a circularização do mRNA, via interação com o eIF4G, e apresenta funções importantes na iniciação da tradução.

Em tripanossomatídeos, um ponto chave para o entendimento de seu processo de iniciação da tradução foi a descoberta de vários homólogos para os fatores do complexo eIF4F nestes organismo: dois para o eIF4A (EIF4AI e III), seis para o eIF4E (EIF4E1 a 6) e cinco para o eIF4G (EIF4G1 a 5). Além destes, também foram identificados e caracterizados homólogos da PABP em *Leishmania* (PABP1 a 3) e em *Trypanosoma brucei* (PABP1 e 2). Atualmente, maiores estudos vêm sendo desenvolvidos acerca destes homólogos no intuito de elucidar suas funções na fisiologia desses organismos, uma vez que nem todos parecem estar envolvidos diretamente com a iniciação da tradução. Um desses estudos avaliou a expressão dos quatro primeiros homólogos do eIF4E de *Leishmania amazonensis* ao longo de curvas de crescimento em meio de cultura. Os resultados mostraram um perfil de isoformas sujeitas a modificações pós-traducionais, posteriormente confirmadas como contendo múltiplas fosforilações.

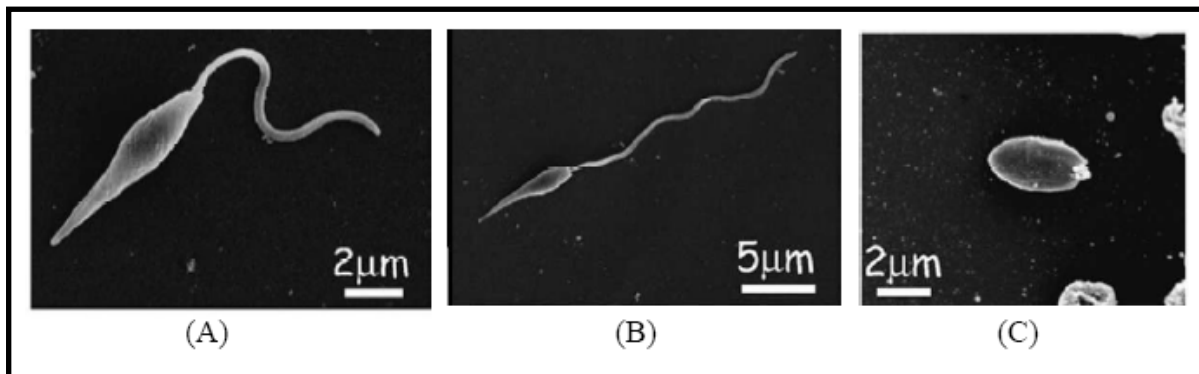
Em outro estudo, foi analisada a sequência do EIF4E3 de *Leishmania amazonensis* e se percebeu a existência de prováveis domínios envolvidos com sua ligação a parceiros funcionais e sítios de fosforilação. Construções mutantes foram criadas direcionadas para alguns dos prováveis domínios de interação desta proteína com homólogos da PABP e para alguns de seus possíveis sítios de fosforilação. Os resultados mostraram abolição de determinadas isoformas em curvas de crescimento para algumas das construções mutantes. Este estudo visou continuar esta caracterização do EIF4E3 de *Leishmania*, utilizando algumas construções mutantes obtidas anteriormente e outras geradas neste momento, visando melhor avaliar o efeito que diferentes mutações causariam no perfil de isoformas desta proteína e na sua capacidade de ligação a seus parceiros funcionais, como homólogos do EIF4G e PABP.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 A ORDEM KINETOPLASTIDA E A FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

A ordem Kinetoplastida é composta por protozoários unicelulares, compreendendo parasitas intra e extracelulares responsáveis por diversas doenças em humanos e animais e também por organismos de vida livre que vivem no solo e em ambientes aquáticos (SZÖÖR, 2010). Os organismos desta ordem são caracterizados por possuírem uma única e grande mitocôndria que contém uma região em forma de disco, rica em DNA, o cinetoplasto. O DNA do cinetoplasto (kDNA) é organizado de forma bem diversa do DNA cromossomal, formando até 20.000 moléculas circulares pequenas não codificantes de proteínas (minicírculos) e de 20 a 50 moléculas maiores que codificam basicamente proteínas da cadeia respiratória e da maquinaria de tradução mitocondrial (maxicírculos). Numa região próxima à mitocôndria, em uma estrutura em forma de bolsa na membrana celular, a bolsa flagelar, origina-se um único flagelo, dotando estes organismos de motilidade. Em algumas espécies há ainda projeções longitudinais na membrana, conhecidas como membrana ondulante (SCHMIDT; ROBERTS, 2009; STUART *et al.*, 2008).

Os organismos da ordem Kinetoplastida diferem consideravelmente quanto ao seus hospedeiros, ciclos de vida e importâncias médico-veterinária. Esta ordem compreende duas famílias: a Bodonidae, da qual fazem parte espécies de vida livre e parasitas de peixes e invertebrados, e a Trypanosomatidae, composta por organismos bem-sucedidos evolucionariamente, não apenas por serem encontrados em quase todo o planeta como também por parasitarem todos os grupos de vertebrados, várias espécies de invertebrados e até mesmo plantas (LOPES *et al.*, 2010; SCHMIDT; ROBERTS, 2009). Nesta família estão presentes os causadores de algumas das mais importantes doenças infecciosas do ser humano, as espécies do gênero *Trypanosoma* - causadoras da Doença do Sono e da Doença de Chagas - e as do gênero *Leishmania* - causadoras das formas clínicas da Leishmaniose, doenças que afetam principalmente populações de baixa renda nas regiões tropicais e subtropicais do planeta (FIDALGO; GILLE, 2011).

Figura 1 - Formas evolutivas do gênero *Leishmania*

Fonte: adaptado de Besteiro *et al.* (2007).

Legenda: Micrografia eletrônica das formas promastigota procíclica (A) e promastigota metacíclica (B), ambas de parasitas crescidos em cultura e da forma amastigota (C) isolada de um macrófago de camundongo.

2.2 GÊNERO *LEISHMANIA*

O gênero *Leishmania* inclui mais de 20 espécies que infectam seres humanos, tendo como vetores de transmissão insetos dípteros da família Psychodidae (sub-família Phlebotominae). Este gênero se divide em dois subgêneros de acordo com o local do trato digestivo do vetor em que ocorre a colonização e o desenvolvimento dos parasitas: o subgênero *Leishmania* se desenvolve preferencialmente no intestino médio e anterior, enquanto o subgênero *Viannia* preferencialmente nas porções posteriores do intestino. Embora todas as espécies do gênero sejam patogênicas, as manifestações da doença dependem de qual está causando a infecção, variando desde lesões auto-resolutivas na pele, passando por formas desfigurantes, nas mucosas, até a forma visceral letal (CUERVO, 2011; SCHELTEMA, 2010).

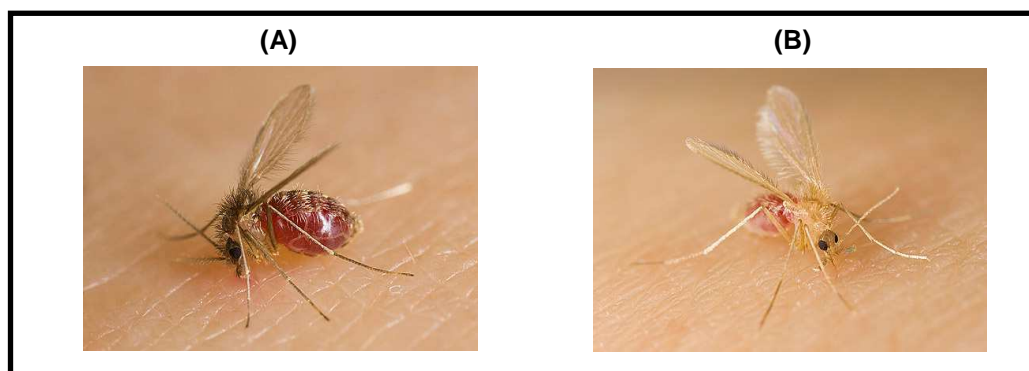
Quanto à morfologia, as espécies de *Leishmania* são bastante semelhantes e basicamente duas formas evolutivas são encontradas. A amastigota, forma parasitária, encontrada em células fagocitárias (sendo obrigatoriamente intracelular), possui formato oval ou esférico com ausência de flagelo aparente e mede em média de 1,5 a 3 µm de comprimento por 3 a 6 µm de diâmetro. Já a forma promastigota, encontrada no trato digestivo dos vetores (extracelular), é alongada, com flagelo livre e de dimensões maiores que as amastigotas, variando entre 10 a 40 µm de comprimento e 1,5 a 3 µm de diâmetro (NEVES, 2011). Além disso, pode-se ainda fazer distinção entre subgrupos nas formas promastigotas, sendo as principais: a

promastigota procíclica, capaz de se replicar por divisão binária, encontrada no intestino do vetor e desprovida de capacidade infectiva no hospedeiro mamífero; e a forma promastigota metacíclica, incapaz de se replicar e encontrada nas porções torácicas e glândulas salivares do vetor, sendo a forma infectiva (BESTEIRO, 2007) (Figura 1).

2.3 VETORES DE TRANSMISSÃO E CICLO BIOLÓGICO

Das 500 espécies conhecidas de flebotomíneos (como podem ser denominados os membros da sub-família Phlebotominae), cerca de 30 estão envolvidos com a transmissão da leishmaniose nas Américas - cujo principal gênero transmissor é o *Lutzomyia* - e 40 nos demais continentes onde a Leishmaniose é encontrada - cujo principal transmissor é o gênero *Phlebotomus* (Figura 2). Estes insetos, quando adultos, possuem de 2 a 4 mm de comprimento e são mais ativos ao anoitecer e no período noturno. Apesar de suas pequenas proporções e delicadeza, os flebotomíneos podem ser vetores não apenas da Leishmaniose, mas também de algumas outras zoonoses como a bartonelose, e algumas viroses, requerendo seu controle populacional mesmo em área onde não sejam ativos como vetores. Apenas as fêmeas participam da transmissão de parasitas, realizando atividade hematófaga, ingerindo sangue infectado ao fazer o repasto sanguíneo necessário para a obtenção de nutrientes para o desenvolvimento de seus ovos. Quando este mesmo inseto faz o repasto em outro indivíduo, saudável, ele inocula o parasita, infectando um novo hospedeiro (ALEXANDER; MAROLI, 2003; GRIENSVEN; DIRO, 2012; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015a).

Figura 2 - Insetos vetores da Leishmaniose

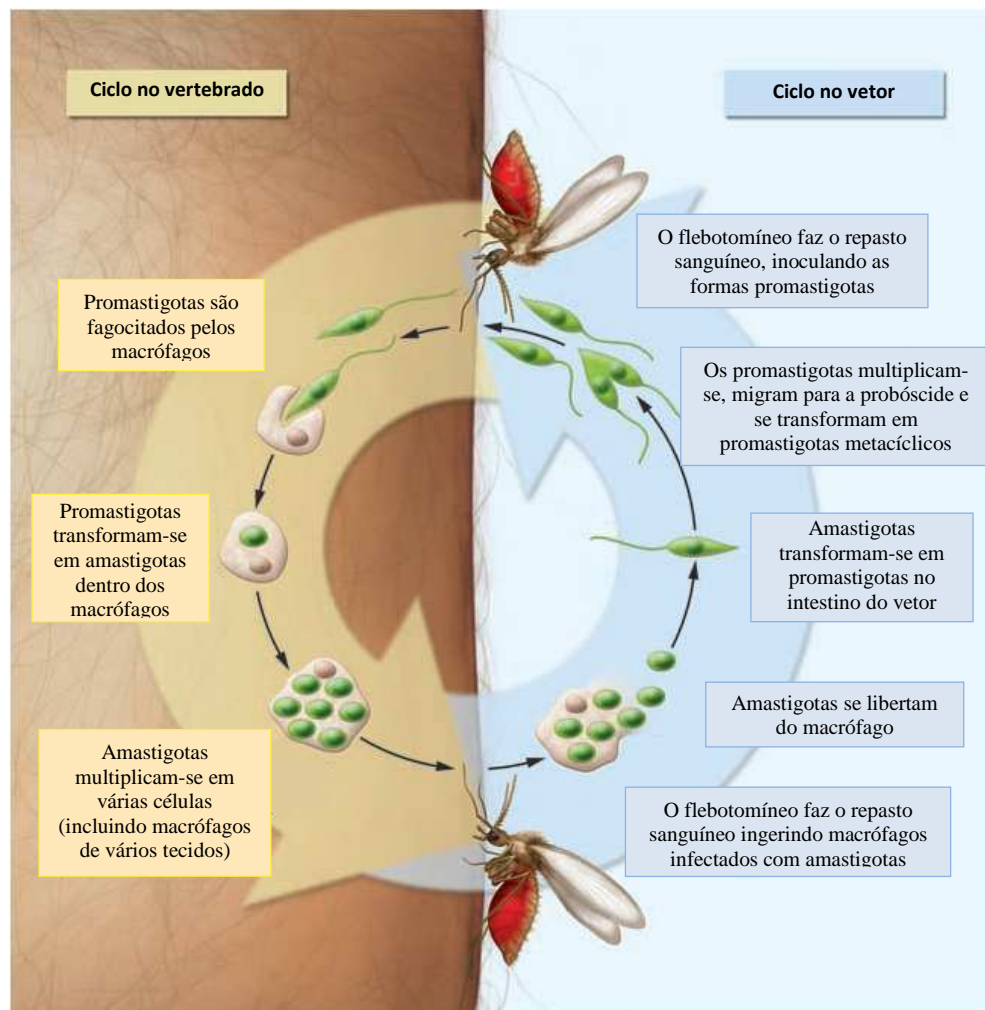


Fonte: Wilson (2015a, 2015b)

Legenda: em (A), um representante do gênero *Lutzomyia* (*L. longipalpis*), presente principalmente no Novo Mundo; em (B), representante do gênero *Phlebotomus* (*P. papatasi*), encontrado principalmente no Velho Mundo.

O ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania* se alterna entre o trato digestivo do vetor, onde as formas promastigotas (procíclicas ou metacíclicas) são encontradas, e o fagolisossomo dos macrófagos, onde as promastigotas se diferenciam na forma intracelular amastigota, responsável pelas manifestações da doença (CUERVO, 2011). Quando as fêmeas dos flebotomíneos fazem o repasto sanguíneo ingerindo sangue infectado, os parasitas, juntamente com o sangue, são revestidos no intestino do vetor pela matriz peritrófica, uma membrana quitinosa secretada pelo epitélio intestinal, com as primeiras formas promastigotas aparecendo após 4 a 5 dias. Com mais alguns dias de desenvolvimento, as promastigotas migram para a porção torácica do trato digestivo, transformando-se em metacíclicas, e chegando posteriormente a porções mais anteriores como a faringe, o cibário e a probóscide. Estas promastigotas metacíclicas são então inoculadas em um hospedeiro vertebrado durante outro repasto sanguíneo. A infecção é facilitada pela ação vasodilatadora e antiagregante plaquetária da saliva do vetor, além da ação quimiotática sobre os macrófagos. Estes internalizam as promastigotas que mudam rapidamente sua morfologia, transformando-se em amastigotas, capazes de sobreviver e se reproduzir no fagolisossomo. Após várias divisões mitóticas, a grande quantidade de parasitas dentro do macrófago promove a sua lise, liberando-os para infectarem novas células (NEVES, 2009) (Figura 3).

Durante o ciclo de vida da *Leishmania* algumas moléculas de superfície nos promastigotas auxiliam na sua sobrevivência e no processo de infecção. É o caso do lipofosfoglicano (LPG) e da glicoproteína de 63 kDa (gp63). A primeira promove ação protetora contra enzimas hidrolíticas, no flebotomíneo, enquanto que a segunda permite a evasão do parasita da matriz peritrófica para a luz do intestino, digerindo-a. No vertebrado, estas moléculas agem em conjunto protegendo o parasita contra a ativação do sistema complemento, embora atuem suas reações iniciais com a formação de C3b e C3bi, opsoninas que recobrem o parasita e promovem sua “entrada silenciosa” no macrófago. Outras funções da LPG envolvem a atenuação da acidificação do vacúolo digestivo e da ação de enzimas lisossomais no macrófago (FRANCO *et al.*, 2012).

Figura 3 - Ciclo biológico do gênero *Leishmania*

Fonte: adaptada de Stuart *et al.* (2008).

Nota: Foto ilustrativa mostrando as formas do parasita encontradas nos hospedeiros vertebrados e no vetor e suas transformações.

2.4 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações da Leishmaniose envolvem um amplo espectro de formas clínicas que vão desde lesões auto-resolutivas na pele, passando por lesões desfigurantes das mucosas até a perigosa forma visceral. Estas variações estão bastante relacionadas à espécie infectante e ao estado imunológico do hospedeiro (NEVES, 2009).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é causada no Brasil por espécies como a *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensi*, com participação também de *L. mexicana* e *L. panamensis* na América como um todo. Apesar de causar lesões potencialmente desfigurativas a LC não é realmente uma ameaça à vida. É

caracterizada pelo aparecimento de úlceras na pele (Figura 4A), indolores ou não tão dolorosas quanto sua aparência possa denotar, geralmente em área expostas do corpo como braços, pernas e face. Os pacientes podem apresentar mais de uma lesão que, em casos estritos de LC, representam picadas individuais dos vetores. As lesões geralmente começam com pequenas pápulas avermelhadas e, dependendo da espécie, num período de 1 a 3 meses se desenvolvem formando nódulos eritematosos, placas endurecidas e úlceras com bordas levantadas e escurecidas. Caso não tratadas, essas lesões evoluem para a cura espontânea, deixando cicatrizes deprimidas de superfície lisa, com coloração ligeiramente diferente da pele. A LC pode evoluir em alguns casos (1% a 10%) para uma forma mais grave e que pode levar ao óbito, a Leishmaniose Mucocutânea (LMC), também chamada de espúndia. Geralmente ocorre após a cura clínica da LC e tem início insidioso e assintomático. Atinge com mais frequência indivíduos do sexo masculino e se caracteriza por lesões desfigurantes em mucosas principalmente das vias aéreas superiores (Figura 4B), contíguas a lesões cutâneas ou resultantes de metástases hematogênicas ou linfáticas. A evolução clínica depende de uma combinação entre a virulência da espécie e a imunidade celular do hospedeiro. É causada em sua maioria pela espécie *L. braziliensis*, mas também está associada em alguns casos à *L. guyanensi* e *L. amazonensis*. (BRASIL, 2009; DAVID; CRAFT, 2010; RAMOS-E-SILVA; JACQUES, 2002)

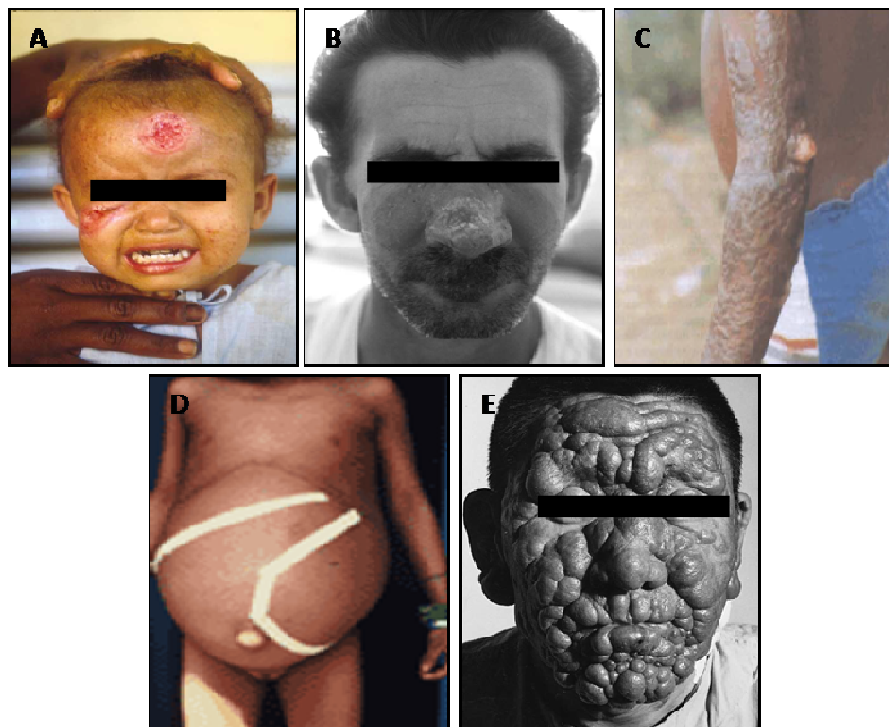
A LC pode evoluir ainda para uma forma rara: a Leishmaniose Cutâneo-Difusa (LCD). Ela é causada no Brasil pela espécie *L. amazonensis* e se caracteriza pelo aparecimento de lesões nodulares, não ulceradas, em áreas extensas da pele (Figura 4C). Neste caso, as múltiplas lesões não são consequência de picadas independentes, mas de metástases dos parasitas do local de origem para outras partes através do sistema imunológico. Esta manifestação está intimamente associada a um estado de anergia do sistema imunológico do paciente aos antígenos de *Leishmania* (NEVES, 2009).

Uma outra forma de Leishmaniose, bem mais grave que as já citadas, é a Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar. Os pacientes apresentam febre persistente, perda de peso e aumento do tamanho de determinados órgãos, sendo a esplenomegalia o mais frequente (Figura 4D). Outros sintomas como anemia, trombocitopenia e neutropenia também são frequentes, ocasionados pela supressão da medula óssea e pelo sequestro esplênicos desses

elementos do sangue. Como o fígado pode ser afetado, hipoalbuminemia também é um sintoma possível, podendo causar caquexia e edema nos pacientes (GRIENSVEN; DIRO, 2012). Esta forma da doença é bastante grave, sendo letal se não tratada. A principal espécie causadora desta forma nas Américas é a *L. infantum* (BRASIL, 2009). Em alguns casos, após a cura clínica da LV, pode aparecer uma manifestação cutânea conhecida como Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar (LDPK), que envolve o aparecimento de máculas hipopigmentadas ou nódulos infiltrados em sua maioria na face e regiões perifaciais e que depois se espalham para outras partes, podendo ter o envolvimento de mucosas (Figura 4E). Estas manifestações são encontradas principalmente na Índia e no leste africano e são causadas em sua maioria por *L. donovani* (SINGH *et al.*, 2011).

Apesar dos consideráveis avanços no entendimento da biologia celular e molecular de *Leishmania*, não há ainda vacinas e/o métodos de controle de seu vetor realmente efetivos. Isso faz com que o tratamento com quimioterápicos seja a ferramenta principal no combate à doença, embora haja várias complicações (LEANDRO; CAMPINO, 2003).

Figura 4 - As diversas manifestações clínicas da leishmaniose



Fonte: Organização Mundial da Saúde (2015a), Neves (2005), Ramos-e-Silva e Jacques (2002), Schimidit e Rogers (2009).

Legenda: (A) Leishmaniose Cutânea; (B) Leishmaniose Mucocutânea; (C) Leishmaniose Cutâneo-difusa; (D) Leishmaniose Visceral; (E) Leishmaniose Dérmica Pós-Calazar.

Atualmente, 98 países são endêmicos para a Leishmaniose, sendo anualmente relatados de 700 mil a 1,2 milhões de novos casos de LC e 200 a 400 mil de LV em todo o mundo. De todos estes casos, 90% se concentram num grupo de seis países, dentre os quais o Brasil faz parte, juntamente com Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão. Como pode-se perceber, trata-se de um problema de saúde pública mundial, afetando principalmente populações pobres (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE, 2015b).

2.5 CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

De um modo geral, não só as espécies de *Leishmania* mas boa parte das espécies de tripanossomatídeos possuem um ciclo biológico que envolve mais de um hospedeiro, como no caso hospedeiro vertebrado e do inseto vetor. Sendo assim, estes parasitas precisam se adaptar a diferentes ambientes, com diferentes temperaturas, disponibilidade de nutrientes e mecanismos de defesa, requerendo grandes alterações na expressão gênica que, neste caso, é bastante complexa (CLAYTON, 2002).

Na última década, houve uma revolução na compreensão dos genomas eucarióticos através do seqüenciamento de um número crescente de genomas de diferentes organismos, dentre os quais tripanossomatídeos *Trypanosoma brucei* (BERRIMAN *et al.*, 2005), *Trypanosoma cruzi* (EL-SAYED *et al.*, 2005) e *Leishmania major* (IVENS *et al.*, 2005). Este grupo tem atraído a atenção de biólogos moleculares por apresentarem mecanismos de expressão gênica únicos que estão associados à organização de seus genes e a transcrição e edição de seus RNAs, bem como outros processos (MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

2.5.1 Organização Genômica e Transcrição Policistrônica

O genoma dos tripanossomatídeos varia bastante quanto ao seu tamanho e organização cromossômica, quando se compara às três principais espécies estudadas: *Leishmania major*, *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. *L. major* possui 32,8 Mb de DNA genômico, organizados em 36 cromossomos relativamente pequenos. *T. cruzi* apresenta quase o dobro do tamanho do genoma - 60,3 Mb - organizados em 41 cromossomos pequenos. Com o menor genoma dos três, o *T.*

brucei apresente 26 Mb em 11 cromossomos grandes (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010). Apesar dessas diferenças entre os tripanossomatídeos, o genoma das espécies de *Leishmania* possuem tamanho similar (em torno de 32 Mb), com conservação cariotípica (embora haja polimorfismos quanto ao tamanho) e sintonia alta (99%), mesmo havendo uma variação no número de cromossomos entre as espécies originárias do Velho Mundo (*L. major*, *L. infantum* e outras, com 36 cromossomos) e as do Novo Mundo (*L. braziliensis* e relacionadas com 35 e *L. mexicana* com 34 cromossomos) (GOMEZ *et al.*, 2010).

Quanto a sua organização gênica, os genes dos tripanossomatídeos se encontram organizados nos cromossomos em grandes blocos de regiões codificadoras, arranjadas em sequência (em *tandem*). Estes blocos gênicos são co-transcritos pela RNA polimerase II a partir de promotores desconhecidos, não havendo relação funcional óbvia entre os genes de um mesmo bloco (KRAMER; CARRINGTON, 2011). Esta organização não comum foi observada pela primeira vez no cromossomo 1 de *Leishmania major*, da cepa *Friedlin*, que possui 85 regiões codificadoras de proteínas das quais 53 estão orientadas para uma direção em uma das fitas e 32 para a outra direção, na outra fita (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010). Os genes presentes num mesmo bloco, posicionados em uma mesma orientação são co-transcritos em grandes RNAs policistrônicas, diferentemente dos demais eucariotos, que transcrevem RNAs monocistrônicos, cada um correspondendo a uma região codificante (CLAYTON, 2002). A região entre esses dois blocos de genes é chamada de região de troca de fita e é de onde a transcrição se inicia. Entretanto, uma análise dessa região demonstra uma carência de promotores eucarióticos clássicos, como o TATA *box*. Isto indica que a transcrição ocorre randomicamente ou que os promotores nestes organismos são incomuns (PALENCHAR; BELLOFATTO, 2006).

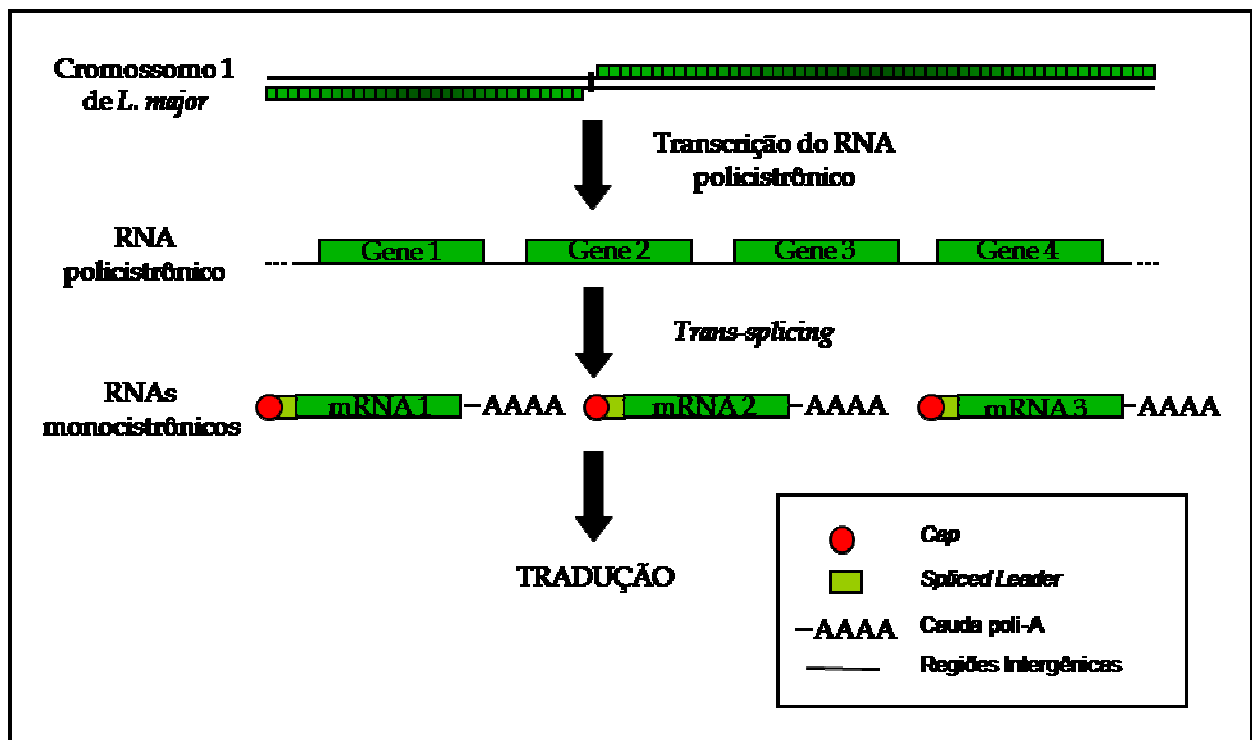
2.5.2 O *Trans-splicing*

A maioria dos eucariotos possui regiões codificadoras interrompidas, formadas por éxons e íntrons alternados. Após a transcrição, os íntrons precisam ser retirados e os éxons, encadeados de forma precisa para a formação de um mRNA maduro, em um processo chamado de *cis-splicing*. Como os tripanossomatídeos possuem a transcrição policistrônica, o processamento dos RNAs ocorre de maneira

bastante diversa, através do *trans-splicing*. Este mecanismo foi primeiramente descrito em *T. brucei*, através da observação de que vários dos seus mRNAs possuíam em suas extremidades 5' uma mesma sequência líder, ausente na sequência genômica correspondente (MAYER; FLOETER-WINTER, 2005; PREUßER; JAÉ; BINDEREIF, 2012).

O *trans-splicing* é uma etapa essencial à maturação do mRNAs em tripanossomatídeos. Ele atua separando as regiões codificantes do RNA policistrônico através da adição de uma sequência conservada de 39 nucleotídeos chamada de *spliced leader RNA* (SL RNA) ou mini-éxon à extremidade 5' de cada sequência codificante. Concomitantemente e de forma acoplada, ocorre o processo de poliadenilação nas extremidades 3', possibilitando a formação de mRNAs passíveis de serem traduzidos (Figura 5) (CLAYTON, 2002; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012). Como todos os transcritos maduros possuem o SL RNA em suas sequências, os tripanossomatídeos dependem que esse tenha uma alta taxa de síntese, o que está de acordo com a presença de cerca de 200 genes codificantes para o SL RNA, e seu alto *turnover*, com tempo de meia-vida de aproximadamente quatro minutos (PREUßER; JAÉ; BINDEREIF, 2012).

Figura 5 - Transcrição e processamento de mRNAs nos tripanossomatídeos



Fonte: o autor.

Nota: Os genes do cromossomo 1 de *L. major* são co-transcritos policisticamente a partir da região de troca de fita (haste negra no centro do cromossomo) e processados pelo mecanismo de *trans-splicing*.

O SL RNA é ainda caracterizado por possuir em sua extremidade 5' um *cap* com uma molécula de 7-metil-guanosina invertida (na posição 3'-5') e metilações nas riboses dos quatro primeiros nucleotídeos. Algumas dessas metilações são únicas dos tripanossomatídeos, diferentemente do *cap* dos demais eucariotos que apresentam no geral apenas uma metilação. Esta estrutura diferenciada é chamada de *cap4* e uma vez que este faz parte do SL RNA, o *trans-splicing* representa uma forma pós-transcricional de adição do *cap4*, etapa essencial para a produção de mRNAs funcionais (CAMPBELL *et al.*, 2003; GUNZL, 2010).

Pelo fato de o *trans-splicing* e a poliadenilação serem processos acoplados e não haver relação funcional entre os genes co-transcritos policistronicamente, não parece haver regulação da expressão gênica em nível de transcrição nos tripanossomatídeos. Aliando isso ao fato de não existir nesses organismos promotores clássicos para a RNA pol II nos genes codificantes, pode-se dizer que a regulação gênica em tripanossomatídeos ocorre quase que exclusivamente a nível pós-transcricional (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

2.6 BIOSÍNTESE PROTÉICA EM EUCARIOTOS

A síntese protéica, também conhecida como tradução, é o último passo do dogma central da biologia molecular, sendo um ponto de controle crítico na regulação da expressão gênica. Comparada com a regulação transcricional, a regulação da tradução permite à célula fazer mudanças mais rápidas na concentração das proteínas, sendo utilizada para a manutenção da homeostase e para a modulação de mudanças mais permanentes na fisiologia e no destino celular (VALÁSEK, 2012). Esta regulação pode ser feita globalmente, com atuação sobre quase todos os mRNAs da célula ou pode ser feita sobre mRNAs mensageiros específicos sem afetar a tradução global (GEBAUER; HENTZE, 2004).

A tradução pode ser dividida em quatro fases: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A iniciação da tradução é a fase onde ocorre a maior parte dos eventos de regulação da expressão gênica. Esta fase compreende uma série de reações que promovem o posicionamento do códon de iniciação AUG no sítio P do ribossomo, pareando com o anti-códon do tRNA iniciador (Met-tRNA_i). Ela é promovida pelos chamados fatores de iniciação da tradução,

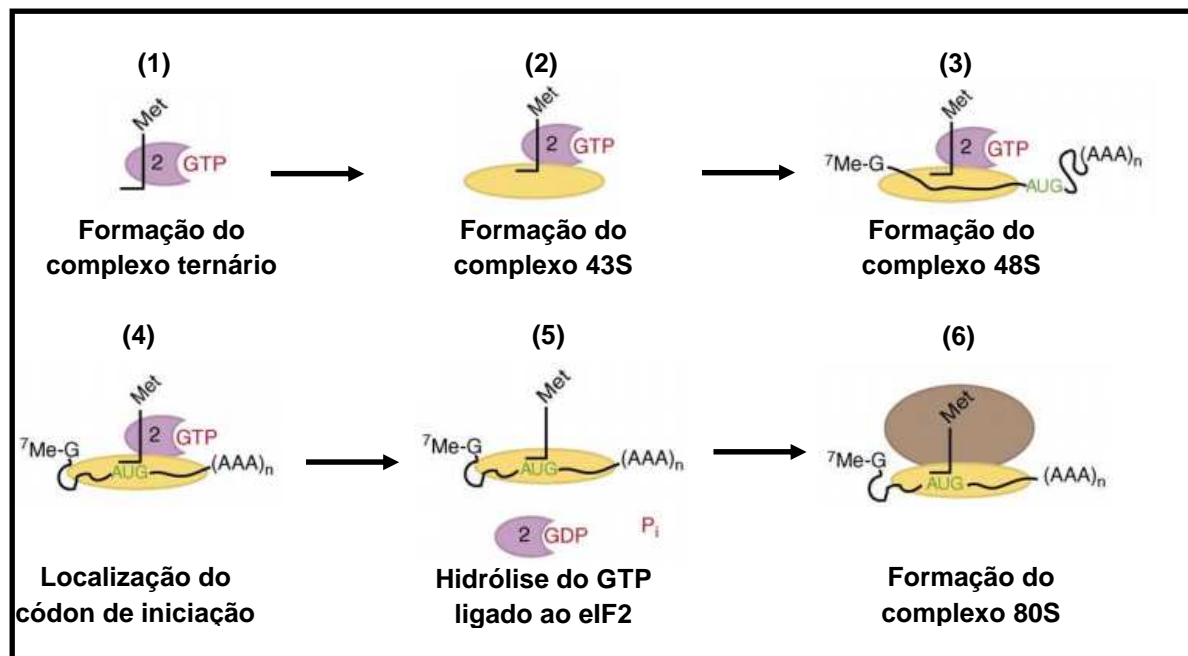
conhecidos com eIFs (*eukaryotic Initiation Factors*) (SONENBERG, 2009), e pode ser resumida da seguinte forma:

- a) Formação do complexo ternário, através da ligação do fator eIF2 a uma molécula de GTP e ao tRNA iniciador (Met-tRNA_i).
- b) Formação do complexo de pré-iniciação 43S, através do recrutamento para a subunidade menor ribossomal (40S) do complexo ternário, mediado pelo eIF5 e com a participação também de outros três fatores (eIF1, eIF1A e eIF3).
- c) Concomitantemente, no *cap* do mRNA, ocorre a ligação do complexo eIF4F. Este é formado por três subunidades e inclui uma RNA helicase (eIF4A) que desfaz estruturas secundárias na 5'UTR e facilita o ancoramento do complexo de pré-iniciação 43S que, ligado ao mRNA, forma o complexo 48S. Além da atividade helicase, o complexo eIF4F possui também outras duas subunidades muito importantes: o eIF4E, responsável pela ligação do complexo ao *cap* e o eIF4G, uma proteína mutidomínio que interage com várias proteínas envolvidas na tradução e, através da sua interação com o complexo eIF3, recruta o complexo 43S para o mRNA. Outro fator, o eIF4B, reforça a atividade helicase do eIF4A.
- d) Em seguida a subunidade menor do ribossomo, dentro do complexo 43S, “desloca-se” (processo de *scanning*) ao longo da 5'UTR até encontrar o códon de iniciação da tradução AUG, onde ocorrerá pareamento deste com o seu anti-códon no Met-tRNA_i, associado ainda ao eIF2.
- e) O pareamento do códon de iniciação com o anti-códon do Met-tRNA_i provoca a hidrólise do eIF2-GTP em eIF2-GDP, promovendo a dissociação de todos os fatores da subunidade menor ribossomal. Esta fica livre para se ligar à subunidade maior (60S), formando o complexo 80S ativo, responsável pelo alongamento da cadeia peptídica nascente. Esta etapa é facilitada pelo eIF5B (Figura 6) (JACKSON *et al.*, 2010; PESTOVA; HELLEN 2006; SONENBERG, 2009; WATSON *et al.*, 2006).

As etapas acima são parte do mecanismo de tradução *cap*-dependente, ao qual está sujeita a grande maioria dos mRNAs eucarióticos. Porém, alguns mRNAs possuem mecanismos de tradução que não seguem à risca esses eventos. Tais mRNAs possuem em suas regiões 5' não traduzidas estruturas chamadas IRES

(*Internal Ribosome-Entry Site*). As IRES recrutam diretamente o ribossomo sem a necessidade da ligação de qualquer fator ao *cap*, sendo este o mecanismo de tradução *cap*-independente. Muitos dos mRNAs que contém IRES são codificantes para proteínas envolvidas com resposta ao estresse, crescimento, proliferação e diferenciação celular. Estes são processos que precisam de uma regulação da expressão gênica bastante rígida, sendo a tradução mediada por IRES importante nos processos de morte e sobrevivência celular, através da tradução de mRNAs específicos, uma vez que a tradução global está diminuída nesses casos (HELLEN; SARNOW, 2001; HOLCIK; SONENBERG, 2005).

Figura 6 - Esquema simplificado da iniciação da tradução em eucariotos



Fonte: adaptada de Algire e Lorsch (2006).

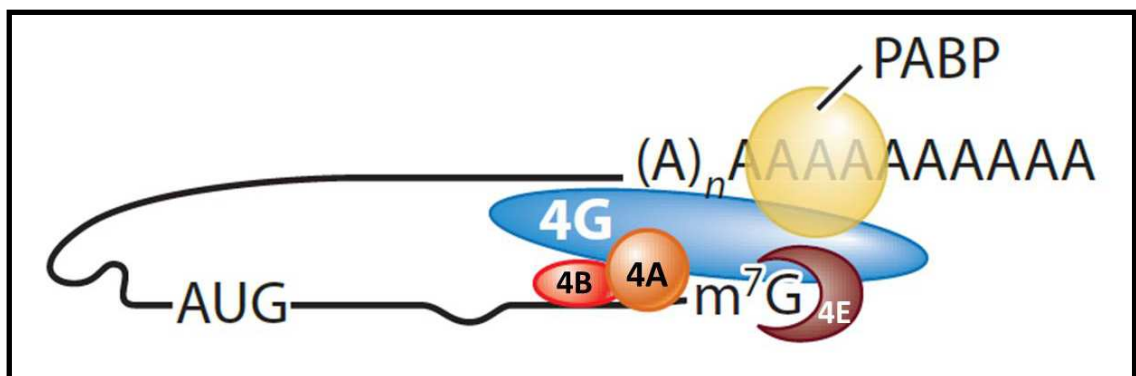
Legenda: (1) Formação do complexo ternário formado pelo eIF2 e o Met-tRNA_i; (2) Formação do complexo 43S através da ligação da subunidade 40S do ribossomo ao complexo ternário; (3) Ancoramento do complexo 43S ao mRNA, formando o complexo 48S; (4) Localização do códon inicial e pareamento do Met-tRNA_i; (5) Hidrólise do GTP ligado ao eIF2 com consequente dissociação dos demais fatores (não representados na figura); (6) Ligação da subunidade 60S do ribossomo com formação do complexo 80S.

2.6.1 O Complexo eIF4F e a PABP

A iniciação da tradução *cap*-dependente em eucariotos requer pelo menos 13 fatores de iniciação da tradução. O eIF4F é um complexo protéico heterotrimérico que participa neste processo de iniciação, tendo um papel de destaque no recrutamento do ribossomo ao mRNA. Este complexo é formado por três

subunidades com funções distintas: o eIF4A, uma RNA helicase dependente de ATP; o eIF4G, um grande polipeptídeo com sítios de ligação para o eIF4E, o eIF4A, a proteína de ligação a cauda poli-A (PABP - *Poly-A Binding Protein*) e o eIF3, fator que faz a ponte entre o complexo e o ribossomo; o eIF4E, a proteína do complexo que se liga diretamente ao *cap* (GINGRAS *et al.*, 1999; PARSYAN *et al.*, 2011). De acordo com o modelo prevalente, o eIF4E reconhece a estrutura do *cap* e, juntamente com as regiões de ligação ao RNA no eIF4G, ancora o eIF4A à extremidade 5' do mRNA. Essas ligações permitem a interação do eIF4A com o eIF4B, que estimula sua atividade de helicase. Além disso, o eIF4G interage com a PABP, promovendo a união das extremidades 5' e 3' do mRNA, permitindo o acoplamento da terminação da tradução com o processo de reciclagem dos ribossomos, para subsequentes estágios de iniciação no mesmo mRNA (Figura 7) (AITKEN; LORSCH, 2012).

Figura 7 - Complexo eIF4F e circularização do mRNA através da PABP



Fonte: adaptada de Hinnebusch (2014).

Nota: O eIF4E é responsável pela ligação direta ao *cap*; o eIF4A, uma RNA helicase, desfaz as estruturas secundárias que possam existir na 5'UTR facilitando o processo de "scanning"; o eIF4G promove a estruturação do complexo eIF4F interagindo com várias proteínas; a PABP promove a circularização do mRNA através da interação com a cauda poli-A e o eIF4G, aproximando as extremidades do mRNA e facilitando a reciclagem dos ribossomos.

O eIF4A tem como principal função o desmanche de estruturas secundárias que possa haver na 5'UTR, próximo à estrutura do *cap*, facilitando a ligação da subunidade 40S do ribossomo ao mRNA e o processo de *scanning*. Essencialmente, o eIF4A contém um *core* de helicase, com porções C- e N-terminais muito curtas. Comparando-o com outras helicases da mesma família, ele apresenta baixa afinidade pelo RNA e baixa atividade ATPásica. Estas são aumentadas quando o

fator faz parte do complexo eIF4F, e reforçadas quando na interação com o eIF4B (LINDER; JANKOWSKY, 2011; MARINTCHEV; WAGNER, 2004).

O eIF4G é uma proteína formado por três domínios principais: o N-terminal, onde estão os domínios de ligação ao eIF4E e a PABP; o central, crítico para a montagem do complexo eIF4F como um todo; e o C-terminal que desempenha uma função moduladora na tradução. A sua porção central apresenta um domínio encontrado em proteínas envolvidas com a montagem de grandes complexos multiprotéicos, denominado HEAT (nomeado de acordo com as proteínas em que ele foi inicialmente descrito – Huntingtina, Fator de Elongação 3, subunidade A da fosfatase 2A e proteína alvo da rampamicina 1/TOR1). A presença deste domínio é mais um indício de sua função na co-ordenação dos componentes necessários à formação do complexo de pré-iniciação da tradução (PREVOT *et al.*, 2003).

A PABP, que também atua como um fator de iniciação da tradução, possui em sua porção N-terminal quatro domínios de ligação ao RNA altamente conservados (RRMs – do inglês, *RNA Recognition Motifs*), permitindo que ela interaja com a cauda poli-A dos mRNAs eucarióticos. Além disso, a PABP interage ainda com outras proteínas como o eIF4B, o fator de terminação eRF3 e o eIF4G. A interação com este último permite a circularização do mRNA (Figura 9), estimulando a tradução através da facilitação da reciclagem dos ribossomos pela aproximação das extremidades do mRNA (SONEMBERG, 2003; WATSON *et al.*, 2006).

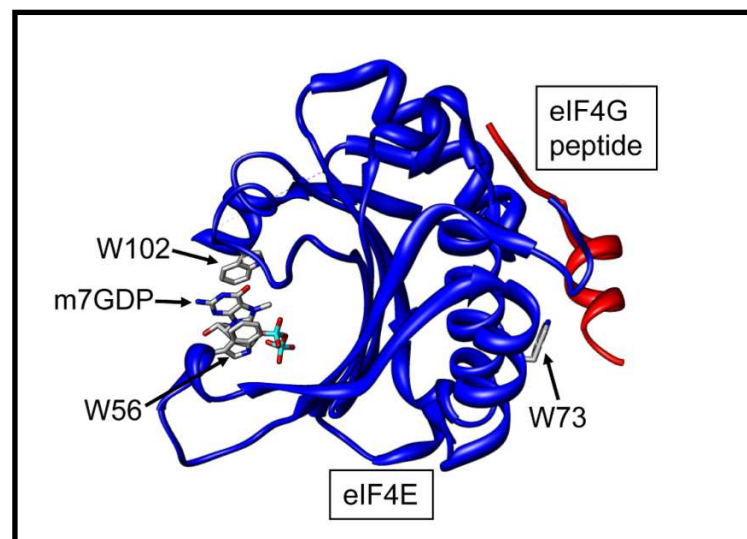
2.6.1.1 eIF4E - estrutura e função

O fator eIF4E é uma proteína pequena, de cerca de 25 kDa, que possui uma grande importância na biossíntese proteica. Esta proteína é encontrada virtualmente em todos os eucariotos, participa não somente na tradução, mas em outras funções celulares associadas ao metabolismo de mRNAs, como transporte núcleo-citoplasma, sequestro de mRNAs para repressão da tradução e a estabilização de mRNAs contra a degradação (RHOADS, 2009; RHOADS *et al.*, 2007).

Considerando o papel crítico que o eIF4E desempenha na célula, não é de se espantar a sua alta conservação em sequência de aminoácidos, que apresenta a incomum característica de ter um alto conteúdo de triptofanos, alguns dos quais envolvidos com a ligação ao *cap* e ao eIF4G (RHOADS, 2009). A estrutura tridimensional de seu núcleo central lembra uma mão em forma de concha, com a

porção côncava formada por oito folhas β antiparalelas, onde se encontra o sítio que promove sua interação com o *cap* - com seus dois resíduos de triptofano conservados nas posições 56 e 102 (W56 e W102) em murinos (GOODFELLOW; ROBERTS, 2008). Esta interação é estabilizada através de três pontes de hidrogênio entre a 7'-metil-guanosina do *cap* com o triptofano 102 e o glutamato 103 (W102 e E103). A ribose do *cap* não parece exercer uma contribuição significativa na ligação, ao contrário do grupamento trifosfato que participa de várias interações polares entre o eIF4E e seus ligantes (FISCHER, 2009). Já a porção convexa do eIF4E, formada por três longas α -hélices, é onde a maioria de seus parceiros interagem. Um dos principais é o eIF4G, que se liga por um resíduo de triptofano conservado na posição 73 (W73) (Figura 8) (GOODFELLOW; ROBERTS, 2008; MCKENDRIK *et al.*, 1999).

Figura 8 - Modelo tridimensional do eIF4E murino



Fonte: adaptada de Goodfellow e Roberts (2008).

Nota: A estrutura do eIF4E de murinos lembra uma mão em forma de concha, cuja "palma" abarca os triptofanos 56 e 102, responsáveis pela ligação ao *cap* de 7-metil-guanosina; no "dorso", está presente o triptofano 73, sítio de ligação ao eIF4G.

Atualmente já foram identificadas várias proteínas da família eIF4E em diferentes tipos de organismos como plantas, artrópodes, mamíferos, anfíbios, peixes e protozoários. Essa diversidade sugere que as mesmas foram resultado de duplicações de um gene do eIF4E ancestral (JAGUS *et al.*, 2012). As proteínas desta família foram então separadas em três classes de acordo com os resíduos correspondentes aos triptofanos 43 e 56 do eIF4E-1 de humanos. Os membros da classe I possuem os dois resíduos conservados; os membros da classe II contém

uma tirosina, uma fenilalanina ou uma leucina no lugar do primeiro resíduo e uma tirosina ou fenilalanina no lugar no segundo; e na classe III, os membros possuem o triptofano na primeira posição e uma cisteína ou tirosina no lugar no segundo resíduo (JOSHI *et al.*, 2005).

2.6.1.1 eIF4E - fosforilação e 4E-BPs

É sabido que o eIF4E em humanos é fosforilado no resíduo de serina na posição 209 (GINGRAS *et al.*, 1999). Esta fosforilação é executada pelas enzimas Mnk1 e Mnk2 e, em humanos, é preciso que o eIF4E esteja ligado ao eIF4G para que ela ocorra. Enquanto a Mnk1 é ativada por diferentes estímulos como fatores de crescimento, citocinas e estresse, a Mnk2 é ativa constitutivamente, não ocorrendo aumento de sua função na existência dos estímulos supracitados (PYRONNET *et al.*, 1999; TOPSIROVIC *et al.*, 2011). Embora a fosforilação da serina 209 seja considerada como uma forma de aumentar a ligação do eIF4E ao *cap*, por ser próxima ao sítio de ligação, ainda não é claro a nível atômico como esta afeta a função do fator (TOMOO *et al.*, 2003).

Por ser a fosforilação do eIF4E induzida por fatores de crescimento, alguns grupos postulam que a presença desta fosforilação aumenta a eficiência de tradução (SCHEPER; PROUD, 2002). Alguns estudos inclusive suportam esta teoria, como a observação da redução da viabilidade e do tamanho do corpo de larvas de *Drosophila* quando esta teve seu eIF4E mutado pontualmente no sítio de fosforilação (LACHANCE *et al.*, 2002). Entretanto, outros estudos sugerem que a fosforilação não tem relação direta com a tradução, como por exemplo quando realizado o nocaute duplo em camundongos das Mnks 1 e 2. Sem estas enzimas, não ocorre a fosforilação do eIF4E, porém os camundongos não apresentaram nenhum efeito negativo em seu crescimento, levando a crer que a fosforilação deste fator não seja essencial para a síntese protéica (UEDA *et al.*, 2004).

Embora o efeito da fosforilação do eIF4E permaneça obscuro e suas vias de regulação não sejam totalmente compreendidas, um maior aumento da atividade do eIF4E, seja por mutações ou amplificação das suas vias de regulação, está envolvido com o surgimento de cânceres em humanos (HSIEH; RUGGERO, 2010).

Outra forma de regulação do eIF4E por meio de fosforilação acontece de forma indireta através das proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BPs – *eIF4E-Binding*

Proteins). Estas possuem três homólogos em mamíferos (4E-BPs 1-3) e apresentam múltiplos sítos de fosforilação. Num estado hipofosforilado, a 4E-BP liga-se ao eIF4E num complexo binário impedindo a formação do complexo eIF4F através do impedimento da interação com o eIF4G, por ocupar o mesmo sítio de interação que este último. A fosforilação da 4E-BP reverte esse estado, provocando sua dissociação do eIF4E, liberando-o para utilização na iniciação da tradução (JACKSON *et al.*, 2010; LOPEZ-LASTRA *et al.*, 2005). A ligação da 4E-BP é regulada através da via do mTOR (*Mammalian Target of Rapamycin*), através de estímulos como aminoácidos, insulina, fatores de crescimento e nutrientes, levando à fosforilação de treoninas específicas e sua dissociação do eIF4E (TOPSIROVIC *et al.*, 2011).

2.7 COMPLEXO EIF4F E PABP EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Embora vários esforços tenham sido direcionados à elucidação da iniciação da tradução em tripanossomatídeos, este processo ainda não está muito bem caracterizado. Um ponto chave, entretanto, foi a identificação de alguns fatores de iniciação da tradução em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* de homólogos aos fatores canônicos do complexo eIF4F: dois para o eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII – numerados assim pela similaridade funcional com os fatores equivalentes de humanos); cinco para o eIF4G (EIF4G1 a EIF4G5) e seis para o eIF4E (EIF4E1 a EIF4E6) (DHALLIA *et al.*, 2005; FREIRE *et al.*, 2014a, 2014b).

Alguns estudos direcionados para a caracterização dos homólogos de eIF4A levaram à conclusão de que o EIF4AI é o homólogo envolvido na iniciação da síntese protéica (DHALLIA *et al.*, 2006). Na forma promastigota de *L. major*, esta é uma proteína bastante abundante e capaz de se ligar ao EIF4G3, em contraste com o EIF4AIII que se encontra em pequena quantidade na célula e não apresenta a interação anteriormente citada (DHALLIA *et al.*, 2005). Os dados obtidos em *T. brucei* suportam esses achados, com o EIF4AI possuindo localização citoplasmática e, através de sua depleção por RNAi, promovendo inviabilidade celular e diminuição da tradução global. Já o EIF4AIII, embora mostrando-se essencial à célula quando submetido a RNAi, tem localização nuclear e não leva à diminuição da produção protéica quando abolida sua função de helicase, ao contrário do observado para o

EIF4AI, levando a crer que sua função seja outra que não na iniciação da tradução (DHALLIA *et al.*, 2006).

Quanto ao eIF4G, os cinco homólogos encontrados em *L. major* diferem significativamente em tamanho (sendo o EIF4G2 o maior com 1425 aminoácidos e o EIF4G3 o menor, com 635), em carga elétrica geral (positiva para o EIF4G1 e negativa para os demais) e localização do domínio HEAT que caracteriza os eIF4Gs (central para EIF4G1, 2 e 5 e no N-terminal para EIF4G3 e 4, diferentemente do encontrado em humanos). Ortólogos para essas cinco proteínas também foram descritos para *T. brucei* (DHALLIA *et al.*, 2005). Atualmente, há indicativos de que dos cinco homólogos do eIF4G de *L. major*, apenas o EIF4G3 e 4 participam da iniciação da tradução com formação de complexos eIF4F. Um estudo realizado em 2009 demonstrou haver interação tanto *in vitro* quanto *in vivo* do EIF4G3 com o EIF4E1, EIF4E4 e EIF4AI, inclusive co-migrando em um gradiente de sacarose nesta espécie (YOFFE *et al.*, 2009). Outros estudos corroboraram esses resultados mostrando a existência de interações distintas para os fatores EIF4G3 e EIF4G4. Enquanto o primeiro apresentou ligação com o EIF4E4 e o EIF4AI, o segundo se ligou ao EIF4E3 e ao EIF4AI, sugerindo a existência de dois complexos eIF4F distintos. Porém, apenas o EIF4G3 apresentou ligação à PABP e sua depleção por RNAi levou a uma inibição rápida e substancial na síntese de proteínas (FREIRE *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2015). O EIF4G3, portanto, seria o mais apto a atuar como o complexo de iniciação da tradução, já que possui todas as propriedades necessárias para atuar nessa função.

Para a PABP, foram reportados três homólogos para *L. major* (PABP1 a PABP3) e dois para *T. brucei* (PABP1 e PABP2). As PABPs 1, 2 e 3 de *L. major* são proteínas bastante abundantes que, apesar de possuírem a estrutura clássica da PABP com os quatro domínios RRM, apresentam uma similaridade bastante baixa entre si. Entretanto, alguns dados suportam a ideia de que apenas a PABP1 parece estar envolvida na formação do complexo eIF4F iniciador da tradução. Os três homólogos de *L. major* apresentam localização citoplasmática, mas em condição de inibição da transcrição, PABP2 e 3 migram para o núcleo, enquanto a PABP1 continua citoplasmática. Além disso, apenas esta última apresenta interação *in vivo* e *in vitro* com o EIF4G3, acima citado como sendo um dos fatores mais cotados a participação na tradução em tripanossomatídeos (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010).

2.7.1 O eIF4E em tripanossomatídeos

O primeiro candidato a homólogo do eIF4E em *Leishmania* foi inicialmente identificado e caracterizado em *L. major* - denominado *LeishIF4E-1* - como uma proteína citoplasmática e com capacidade de ligação tanto ao *cap* monometilado quanto ao tetrametilado (YOFFE *et al.*, 2004). Mais tarde, outros três homólogos foram identificados e, embora já tenham sido feitos trabalhos para sua caracterização, juntamente com o primeiro descrito, suas funções ainda não foram totalmente elucidadas. Comparadas as sequências dos homólogos de *L. major* com as de camundongo e levedura, eles apresentaram baixa similaridade (de 30% a 40%). Isto é compreensível, considerando que eles provavelmente devem ter passado por alterações estruturais ao longo da evolução para se adaptarem à estrutura modificada do *cap4* dos tripanossomatídeos. Entretanto, apesar dessa baixa similaridade, o núcleo central da proteína, responsável pela ligação ao *cap* e que contém os resíduos importantes para esta atividade, encontra-se conservado. Apesar disso, numa abordagem mais funcional, nenhum desses ortólogos conseguiu suprir as funções de um mutante deficiente em eIF4E de levedura (YOFFE *et al.*, 2006; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012).

Analisando sequência e expressão, foram realizados alguns estudos em que se viu que os quatro primeiros homólogos de eIF4E de *L. major* são expressos constitutivamente e apresentam similaridade razoável entre si e com os homólogos de *T. brucei*. Em ambas as espécies, o EIF4E3 é o mais abundante embora seja o único que apresenta baixa ou nenhuma capacidade de ligação ao *cap* clássico. Curiosamente este é também o único homólogo que provoca inviabilidade celular em experimentos de RNAi na forma procíclica (encontrada do vetor) de *T. brucei*. Quanto à localização subcelular, estes quatro homólogos de eIF4E de *T. brucei* são proteínas citoplasmáticas, sendo os EIF4E1 e 2 também encontrados no núcleo. Quanto às interações com outros fatores, como já citado anteriormente, apenas os EIF4E3 e 4 estão associados à formação de complexos eIF4F típicos nesta espécie interagindo com o EIF4G4 e 3 respectivamente (FREIRE *et al.*, 2011; MOURA *et al.*, 2015; YOFFE *et al.*, 2004, 2006). Recentemente, foram identificados mais dois homólogos do eIF4E tanto em *L. major* quanto em *T. brucei* (EIF4E5 e 6) e sua caracterização iniciada com a localização subcelular, sendo também proteínas

citoplasmáticas e a identificação de suas interações com homólogos do eIF4G (FREIRE *et al.*, 2014a, 2014b).

Em um estudo focado no EIF4E4 com promastigotas de *L. amazonensis* procurou-se identificar parceiros de ligação para elucidar melhor sua participação no processo de iniciação da tradução. Os resultados mostraram a associação do EIF4E4 com o EIF4G3 e o EIF4A1, supracitados como um dos prováveis complexos eIF4F ativos na tradução em tripanossomatídeos. Além disso, o EIF4E4 apresentou interações também com as PABPs 1 e 2 e outros fatores como o EIF5 e o EIF5B, reforçando a idéia de participação desse fator na tradução (ZINOVIEV *et al.*, 2011). O EIF4E1, foi outro homólogo que apresentou ligações semelhantes ao EIF4E4, como com o EIF4A1 e as PABPs 1 e 2, além de outros fatores de iniciação da tradução, porém não apresentou ligação com nenhum dos homólogos do EIF4G, sugerindo que não esteja ligado a eventos diretamente relacionados à tradução (ZINOVIEV *et al.*, 2011).

Mais recentemente, estudos analisaram a interação entre o EIF4E3 e o EIF4G4. Em ensaios de *pull-down*, foi demonstrada uma forte ligação entre os dois fatores, inclusive com o mapeamento da região desta interação no EIF4G4 (MOURA *et al.*, 2015). Este resultado também foi obtido em ensaios de duplo-híbrido. Entretanto, em um gradiente de sacarose estes dois fatores não co-migraram nas porções correspondentes aos polissomos (o que denotaria atividade na tradução). Aliando estes resultados, ao fato de que a ligação do EIF4E3 ao *cap4* é baixa, é provável que não atuem globalmente na tradução. Além disso, a interação entre essas duas proteínas é sensível a condições estressantes à célula. Em condições normais, ambos encontram-se dispersos pelo citoplasma, mas durante estresse nutricional, o EIF4E3 é encontrado em grânulos induzidos por estresse e o EIFG4, não (ZINOVIEV; MANOR; SHAPIRA, 2012).

2.8 RESULTADOS PRÉVIOS QUE DERAM ORIGEM A ESTE TRABALHO

Em trabalhos prévios que deram origem a este estudo, realizados em *L. amazonensis*, foi analisado através de curvas de crescimento o perfil de expressão dos homólogos EIF4E1 a EIF4E4, nos quais foi possível detectar a presença de múltiplas isoformas para o EIF4E3 e o EIF4E4, ausentes nos demais homólogos de eIF4E. Chamou a atenção que o perfil destas isoformas alterava-se rapidamente ao

longo da curva, sugerindo modificações pós-traducionais. Estas modificações apresentadas foram analisadas posteriormente, com a descoberta de que envolviam fosforilações (PEREIRA *et al.*, 2013). Uma mudança neste perfil de isoformas foi observada quando as culturas foram submetidas a condições de estresse, como a ausência no meio de soro fetal bovino, componente de suplementação do meio de cultivo, com uma expressão preferencial de isoformas de maior peso molecular para o EIF4E3 e menor para o EIF4E4 nestas condições estressantes (PEREIRA, 2008).

Em uma outra abordagem, a sequência de aminoácidos do EIF4E3 de *L. amazonensis* foi analisada em comparação as de *L. infantum* e *L. major*. Essas sequências são bem conservadas, possuindo em suas regiões N-terminais motivos que podem estar envolvidos com a ligação a parceiros funcionais, como a PABP. Além disso, elas possuíam triptofanos conservados nas posições 187 e 216, sendo possíveis sítios de ligação ao EIF4G e ao *cap*, respectivamente. Ainda estavam presentes na sequência de *L. amazonensis* três prováveis sítios de fosforilação para MAP quinases (serinas seguidas de prolinas) nas posições 75, 165 e 344, sendo o primeiro exclusivo desta espécie (PEREIRA, 2013). Foram então construídos mutantes de EIF4E3 alterando alguns destes seus possíveis sítios de fosforilação bem como candidatos a domínios de ligação a PABPs. A superexpressão destes mutantes em células de *L. amazonensis* transfectadas foi analisada por ensaios de *Western-blot* e em ensaios preliminares percebeu-se que existiam algumas alterações de expressão em relação ao controle como, por exemplo, o desaparecimento das isoformas de maior peso molecular no mutante da serina 75 e de uma das isoformas de menor peso molecular do mutante para a serina 344 (PEREIRA, 2013).

Sendo assim, este projeto tem como objetivo dar continuidade a caracterização funcional da proteína EIF4E3 de *Leishmania* e ao estudo de suas modificações pós-traducionais. Para isso fez-se uso de mutantes já obtidos em estudos anteriores e de outros que foram construídos neste projeto como, por exemplo, os que tiveram os motivos identificados na sua região N-terminal e os triptofanos candidatos a sítios de ligação ao EIF4G e *cap* mutagenizados, bem como combinações dessas mutações. Com isso, pretendemos avaliar o impacto que essas mutações causarão no perfil de isoformas do EIF4E3 e em sua capacidade de ligação a parceiros funcionais.

3 JUSTIFICATIVA

Esta pesquisa faz parte de um estudo maior que visa investigar a iniciação da tradução em tripanossomatídeos, processo complexo e crucial à vida de qualquer organismo. Apesar dos vários estudos já feitos com o objetivo de elucidar este processo nos tripanossomatídeos, falta ainda muito a ser conhecido. Estudos já realizados, porém, apontam que estes organismos possuem um processo de iniciação da tradução mais complexo que outros eucariotos, necessitando que estudos complementares sejam realizados. Some-se isso ao fato dos tripanossomatídeos serem patógenos de impacto mundial, causadores de doenças debilitantes e de difícil tratamento, este projeto visa contribuir para a produção de conhecimentos com uma possível aplicabilidade no tratamento destas enfermidades, a partir da identificação de diferenças entre mecanismos moleculares básicos no processo de tradução de *Leishmania* e seus hospedeiros mamíferos (incluindo o ser humano).

Portanto, as informações geradas a partir desta pesquisa podem contribuir com a descoberta de um alvo molecular específico para ação de quimioterápicos que combatam o parasita de forma eficiente, causando danos mínimos ao seu hospedeiro. Isto é de grande valia já que a leishmaniose é um problema de saúde pública mundial, endêmica no Brasil, com um grande número de pessoas sendo afetadas na região Nordeste.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Identificar motivos da proteína EIF4E3 de *Leishmania sp.* que estão associados a eventos de modificação pós-traducional e a ligação a parceiros funcionais do complexo de iniciação da tradução.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o efeito de mutações em sítios de fosforilação da proteína EIF4E3 em seu perfil de expressão em *L. amazonensis* e *L. infantum*;
- b) Identificar diferenças e novos elementos de modificação pós-traducional do EIF4E3 comuns as duas espécies de *Leishmania* estudadas;
- c) Identificar motivos do EIF4E3 de *L. amazonensis* que são responsáveis pela sua interação com parceiros do complexo de iniciação da tradução;
- d) Investigar como a eliminação de interações entre o EIF4E3 e parceiros específicos interfere no perfil de expressão de suas isoformas.

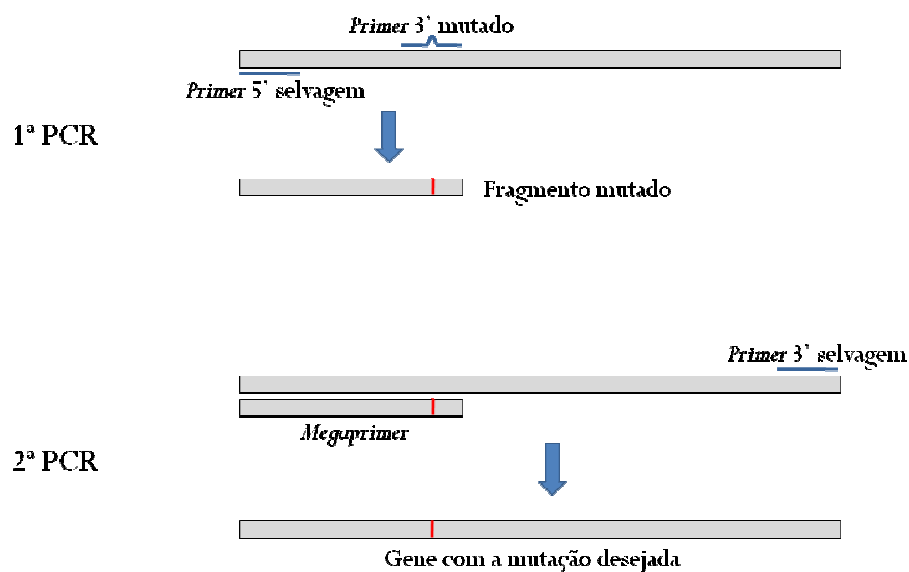
5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 CONSTRUÇÃO DOS GENES MUTANTES DO *EIF4E3*

Construções mutantes do gene *EIF4E3* contendo mutações em alguns dos motivos conservados identificados na sua região N-terminal e em dois dos três prováveis sítios de fosforilação já haviam sido construídas anteriormente a este projeto e encontravam-se disponíveis em laboratório. Neste trabalho foi necessária a construção de mais genes mutantes, alterando os demais motivos na porção N-terminal da proteína e os triptofanos prováveis de ligação ao EIF4G e ao *cap*, além da geração de combinações entre estes mutantes.

Para tal propósito, foi utilizado um esquema de duas reações em cadeia da polimerase (PCR). Na primeira reação, um oligonucleotídeo iniciador (*primer*) contendo a mutação a ser inserida foi usado em conjunto com o *primer* de uma das extremidades do gene. O amplicon resultante desta reação, parte do gene *EIF4E3* contendo a mutação desejada, foi purificado e então utilizado como um *primer* estendido (*megaprimer*) numa segunda PCR em conjunto com outro *primer* correspondente a segunda extremidade do gene (Figura 9) (Quadro 1). O resultado final destas reações é o gene *EIF4E3* completo, contendo a mutação desejada.

Figura 9 - Esquema de PCRs utilizado para a construção dos genes mutantes



Fonte: o autor.

Nota: as construções mutantes utilizadas neste trabalho foram produzidas a partir de duas reações de PCR, com a segunda utilizando o produto da primeira como *megaprimer*.

Quadro 1 - Sequência dos *primers* utilizados na mutagênese do EIF4E3

Primer	Sentido	Sequência (5' - 3')
EIF4E3-HA F	<i>Foward</i>	GGATCC <u>ATGA</u> ACCCGTCTGCCGCAGCATAC
EIF4E3-HA R	<i>Reverse</i>	AAGCTT <u>CTA</u> AGCATAATCTGGCACATCATAAGGATAG AAGGTGTGATCGGGCGAGATCTTC
Mut Y8A	<i>Foward</i>	GGATCC CCGCCACCC <u>ATGA</u> ACCCGTCTGCCGCAGC AG CC CATACCACCGAAAAGCGAT
Mut P45A/F46A	<i>Reverse</i>	TTCGGGCCCGCCAGGCACG GCCG CCTCTGCGGCCGC GCTTAG
Mut S75D	<i>Reverse</i>	GGCCGGGCGCTCCGTCAGCG GTCC CACAGTCGTCTT TCCGTCCTC
Mut D108A/W109A	<i>Reverse</i>	CGGCTGCGCCTCCGGCAGC GCG GCCAGCTGAGAGT CCTCGTT
Mut S165A	<i>Reverse</i>	GGACATGGTGCTGGTGGGGGCG C TATGAGACGCCGT ATT
Mut W187A	<i>Foward</i>	GGCGACGTGGAGAGCTT CG GCGACTGTGGCGGTA CCTG
Mut W216A	<i>Foward</i>	AAGGATATTAAGCCCGAG GCG GAGCACCCGCGC AACAAG

Fonte: o autor.

Legenda: as bases em negrito correspondem aos sítios de restrição para as enzimas *Bam*HI (GGATCC) e *Hind*III (AAGCTT); as sublinhadas sinalizam os códons de iniciação da tradução (ATG) e de parada (CTA); as em vermelho correspondem às bases mutadas; as em azul, correspondem à sequência Kozak; já as verdes, mostram a sequência do epitopo HA.

Além de inserirem mutações na sequência das construções resultantes das PCRs, os *primers* ainda adicionaram a suas extremidades os sítios de restrição das enzimas *Bam*HI e *Hind*III, como também uma sequência codificando para o epítipo sintético HA na sua extremidade 3'.

As amplificações foram obtidas com 0,02 U/ml da enzima *Phusion*[®] *High-Fidelity DNA Polymerase*, com seu tampão *Phusion*[®]GC, 0,5 mM de MgCl₂, 3% de DMSO e 0,2 mM de dNTPs, para uma reação final de 20 µl, de acordo com as quantidades estabelecidas pelo fabricante e usando o DNA genômico total de *L. amazonensis* como molde. As condições usadas para a primeira reação foram: 98°C por 3 minutos (para a desnaturação inicial das fitas de DNA) seguidos por 10 ciclos

com 98°C por 1 minuto (para desnaturação a cada ciclo), 30 segundos por 65°C (para anelamento dos *primers*) e 72°C por 30 segundos (para extensão do fragmento) seguidos de 30 ciclos de 98°C por 1 minuto, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, com extensão final a 72°C por 5 minutos. Nos primeiros 10 ciclos, a temperatura de anelamento decrescia 1°C a cada ciclo, estacionando em 55°C no restante da reação. Este decréscimo de temperatura garante a amplificação mais específica de cópias nos primeiros ciclos que foram amplificadas preferencialmente nos ciclos posteriores. Para a segunda reação de PCR, a única diferença de parâmetros foi a utilização da faixa de temperatura de 60°C a 50°C para o anelamento.

Os amplicons resultantes foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1% corado com *Syber® safe* (Invitrogen) e visualizados em transluminador. As bandas que possuíam aproximadamente o tamanho do gene *EIF4E3* mais a sequência codificante do epítipo HA - 1089 pb - eram excisadas do gel e purificadas através do "GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit" segundo as recomendações do fabricante.

5.2 CLONAGEM E SUBCLONAGEM DOS GENES MUTANTES

Os DNAs resultante das PCRs de mutagênese com *megaprimers* amplificados foram tratados com a enzima Taq polimerase para a adição de uma adenina em suas extremidades (0,1 µL de de Taq polimerase; 0,2 µL de dATP 2 nmol; 0,4 µL de MgSO₄, 1 µL de Tampão 10x da Taq polimerase; 5 µL do DNA purificado; e água Mili-Q em quantidade suficiente para 10 µL) e posteriormente ligadas no *pGEM®-T Easy Vector System* (Promega®), que confere resistência à ampicilina, de acordo com as recomendações do fabricante.

Os plasmídeos contendo as sequências mutadas foram então introduzidos em células quimiocompetentes de *Escherichia coli* da cepa Top10 através do processo de transformação bacteriana por choque térmico. Juntamente com 50 µL destas bactérias, foram incubados 5 µL do plasmídeo por 30 minutos em gelo, seguindo uma incubação em banho-maria (37°C) por 5 minutos. Estas células foram semeadas em meio Luria-Bertani (LB) sólido contendo ampicilina, com a superfície revestida por 10 µL de IPTG 1 M e 20 µL de X-gal 50mg/mL, permanecendo a placa em estufa a 37°C por 16 horas. O IPTG/X-gal permite a distinção das colônias que

assimilaram apenas o plasmídeo fechado (que apresentam cor azul) das que possivelmente possuem o gene de interesse (em cor branca), sendo estas últimas crescidas em meio LB líquido e tendo o DNA plasmidial extraído através do *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (da Sigma®) de acordo com as recomendações do fabricante. Os plasmídeos extraídos foram submetidos à digestão com a enzima de restrição EcoRI para confirmação da clonagem, comparando o tamanho do fragmento liberado com marcador de peso molecular. Posteriormente, os plasmídeos confirmados por digestão foram enviados ao Núcleo de Plataformas Tecnológicas (NPT) do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM/FIOCRUZ - para serem submetidos a sequenciamento.

O sequenciamento foi necessário para checar a inserção correta das mutações intencionadas e sua análise foi realizada através do programa DNASTar (Lasergene), em comparação à sequência do EIF4E3 de *L. amazonensis* disponível no TriTrypDB. Os plasmídeos contendo as sequências corretas foram digeridos com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III e os fragmentos liberados purificados com o *PCR DNA and Band Purification Kit*® (*GE Healthcare Life Sciences*) conforme citado acima. A subclonagem foi realizada através da ligação destes fragmentos ao vetor de expressão eucariótico pSP-BT1-Y-Neo-alfa (previamente tratado com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III também), pela ação de 0,5 µL da enzima T4 DNA Ligase (400,000 U/mL, New England Biolabs), 1 µL do tampão (10x) de ligação da enzima e água para um volume final de 10 µL por ligação. Após incubação por 16h em temperatura ambiente, as ligações foram inseridas em células Top10 de *E. coli* através de transformação bacteriana e posteriormente extraídas com o *GenElute™ Plasmid Miniprep Kit* (da Sigma®) conforme descrito anteriormente. A confirmação da subclonagem foi feita através da digestão com as enzimas específicas citadas acima, sendo os DNAs quantificados em Nanodrop 2000c® (ThermoFisher).

5.3 CULTIVO E TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS DE *LEISHMANIA*

Formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* (MHOM/77/LTB0016) e *L. infantum* (MHOM/MA/67/ITMAP-263) que se encontram estocadas em nitrogênio líquido em laboratório foram descongeladas e mantidas em estufa B.O.D. a 26°C, em meio Schneider pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino, adicionado

de 1% de Penicilina e Estreptomicina (Sigma[®]) e 0,2% de hemina. A manutenção das culturas foi feita através de repiques sucessivos a cada dois dias.

Para cada transfecção foram utilizadas alíquotas de 2×10^8 células/mL de culturas em fase exponencial de crescimento. Estas células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em 1 mL de tampão HEPES-NaCl (21 mM HEPES pH 7,05; 137 mM NaCl; 5 mM KCl; 0,7 mM Na₂HPO₄; 6 mM glicose) e mais uma vez centrifugadas como descrito acima, sendo ressuspensas novamente em 400 µL de tampão HEPES-NaCl e transferidas para cuvetas de 0,2 mm, contendo aproximadamente 2 µg do DNA a ser inserido nas células (plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa + sequência mutante do gene *EIF4E3*). A suspensão repousou nas cuvetas em gelo por 15 minutos. Como controle negativo, utilizou-se uma cuveta sem DNA. Posteriormente, o conjunto foi submetido à eletroporação em aparelho *BioRad Gene Pulser II*, com pulso elétrico de 450 V e capacitância de 500µF (*microfarads*). Tal procedimento promove a entrada da construção descrita no tópico anterior em algumas das células em suspensão. Estas foram então transferidas para uma garrafa de cultura com 5mL de meio Schneider pH 7,2, permanecendo em incubação a 26°C por 24h. Passado este período, foram submetidas à pré-seleção, com a adição de mais 5 mL de meio Schneider pH 7,2 e neomicina numa concentração de 40 µg/mL para início da seleção das células portadoras da construção mutante. Após mais 24h, foi feita a seleção de fato, repassando 1 mL desta cultura para uma nova garrafa contendo mais 9 mL de meio, sendo adicionada neomicina na concentração de 80 µg/mL. Estas culturas foram incubadas novamente a 26°C e monitoradas até 10 a 15 dias, sendo repicadas quando se apresentassem viáveis para um novo repasse.

5.4 CURVAS DE CRESCIMENTO E PREPARAÇÃO DE EXTRATOS TOTAIS

Para a realização de curvas de crescimento, foram utilizadas culturas de linhagens transfectadas como especificado no tópico anterior em meio Schneider com pH 7,2. Ao atingir a fase estacionária, estas foram repassadas para o meio da cultura-teste numa diluição inicial de 10^6 células/mL e adicionadas de neomicina 80 µg/mL. A partir daí, as culturas foram monitoradas e alíquotas de 10^7 células foram retiradas para a avaliação da expressão das proteínas mutadas nos pontos 0h, 6h, 48h e 120h, pontos estes representativos das principais etapas da curva de

crescimento. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer. Em alguns casos, apenas amostras de 48h de cultura foram retiradas, por neste ponto o EIF4E3 apresentar sua duas isoformas principais. As células foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e ressuspensas em tampão fosfato salino (PBS) para lavagem do excesso de meio e centrifugadas novamente nas mesmas condições. Posteriormente, foram ressuspensas em tampão de amostra para gel SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol, 50 µl/mL de 2-mercaptoetanol) para uma concentração final de 2×10^5 cél/µL. As amostras foram fervidas por 5 minutos e guardadas a -80°C .

5.5 PREPARAÇÃO DE LISADOS CELULARES E ENSAIOS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO

Para a obtenção dos lisados celulares, cerca de 2×10^8 células obtidas a partir das linhagens mutantes foram centrifugadas nas mesmas condições do tópico 5.4 e ressuspensas em PBS com 10% de inibidor de protease - cOmplete ULTRA tablets, Mini, EDTA-free, EasyPack[®] (Roche). Após mais uma centrifugação, foram ressuspensas em 500 µL de tampão de lise (20 mM de HEPES-KOH pH 7,4; 75 mM acetato de potássio; 4 mM de acetato de magnésio; 2 mM de DTT; suplementado com 10% de inibidor da protease). A lise foi realizada através de 10 ciclos de congelamento em nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria (37°C) e a verificação da ruptura das células foi feita por microscopia ótica. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 5 minutos para separação de restos celulares, sendo os sobrenadantes guardados a -80°C .

Para a imunoprecipitação, como todas as proteínas de interesse possuíam o epítipo HA, utilizou-se 40 µL da resina *Monoclonal anti HA agarose*[®] (Sigma). Esta foi lavada cinco vezes com PBS suplementado com 10% de inibidor de protease. Em seguida, a resina foi incubada com 200 µL dos lisados celulares por 2h a 4°C . Após a incubação, o sobrenadante foi guardado e a resina, lavada mais quatro vezes com PBS com 10% de inibidor de protease. Alíquotas do lisado celular original, do lisado depletado após a imunoprecipitação e a resina foram ressuspensas em tampão de amostra para SDS-PAGE, fervidos por 5 minutos e armazenados a -80°C até o uso.

5.6 ENSAIOS DE WESTERN-BLOT

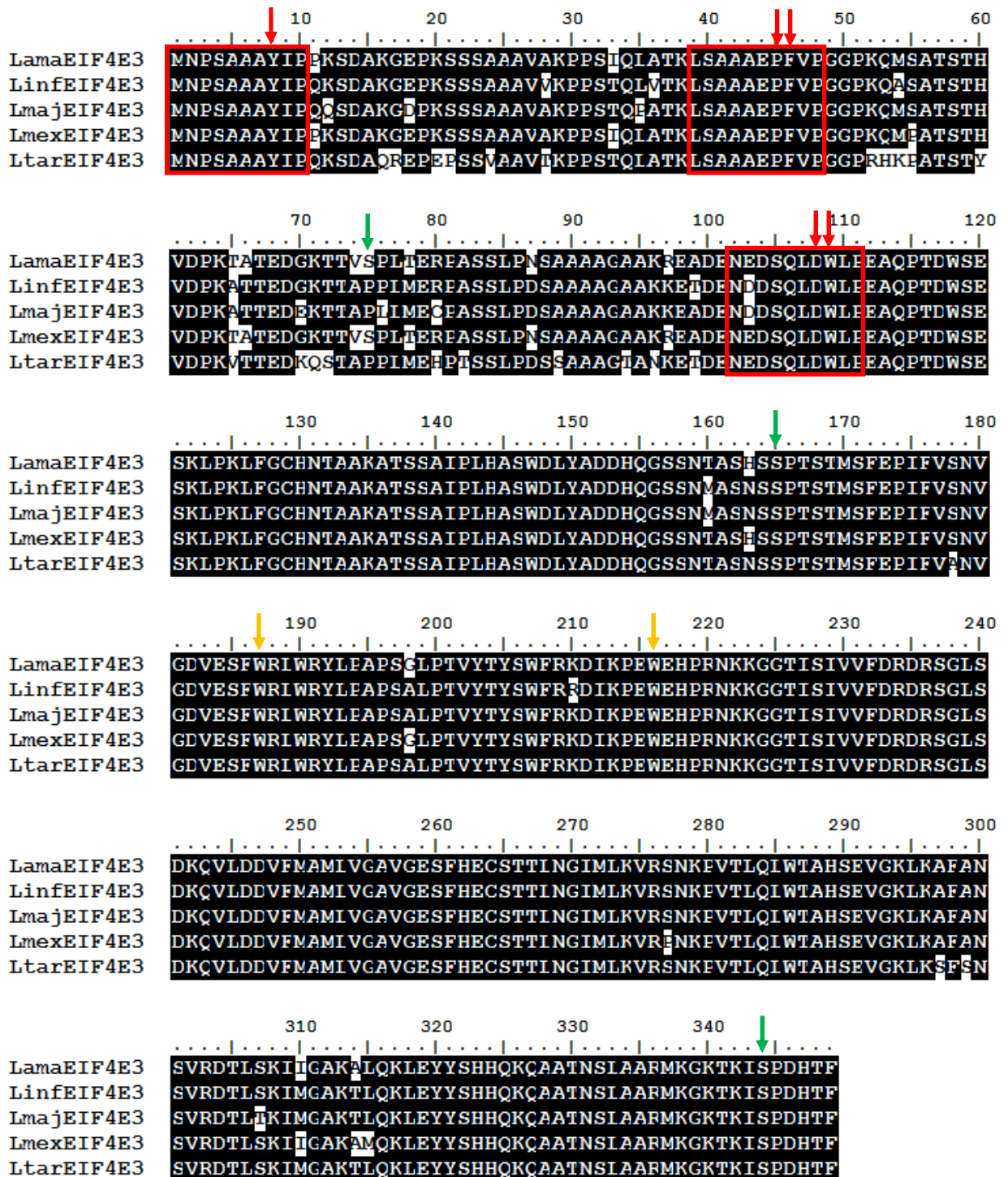
Tanto as amostras provenientes das curvas de crescimento quanto as de imunoprecipitação foram analisadas através de ensaios de *Western-blot* (WB). Estas foram fracionadas em gel SDS-PAGE e transferidas para membrana de PVDF (Immobilon-P – Millipore[®]) que foi bloqueada com solução de TBS (20 mM Tris,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

Para a visualização da presença da PABP3 nas imunoprecipitações e extratos, foram realizados ensaios de WB utilizando soros policlonais produzidos em coelho como primeiro anticorpo na diluição de 1:1000, por 1h de incubação. O segundo anticorpo utilizado nesse caso foi o anti-IgG de coelho ligado à peroxidase, numa diluição de 1:10000, também por 1h. As demais condições do WB foram as mesmas.

6 RESULTADOS

6.1 CONSTRUÇÃO DOS GENES *EIF4E3* MUTANTES

Em trabalhos anteriores a este estudo, comparando a sequência de aminoácidos dos ortólogos de *L. amazonensis*, *L. infantum* e *L. major*, foi possível observar a alta conservação do EIF4E3 em *Leishmania*. Estendendo a comparação a outras espécies deste gênero (Figura 10), esta observação é reforçada, com um pequeno número de aminoácidos diferindo entre os ortólogos das espécies analisadas. Nesta análise foi também possível perceber a presença de motivos conservados na região N-terminal das sequências (denominados de *boxes*), sendo candidatos a prováveis sítios de ligação a homólogos da PABP, uma vez que motivos equivalentes identificados nas sequências de outro homólogo de eIF4E (EIF4E4) se mostraram responsáveis pela ligação a esta proteína (DE MELO NETO *et al.*, manuscrito submetido à publicação). Os resíduos de triptofano 187 (W187) e 216 (W216), prováveis sítios de ligação ao EIF4G e ao *cap*, respectivamente, também foram identificados, conservados inclusive em ortólogos do EIF4E4. Também foram preditos os sítios de fosforilação S75, S165 e S344, que apresentam o consenso para alvo das enzimas MAP-quinases (serinas ou treoninas seguidas de prolina) (LU *et al.*, 2002), sendo o S75A exclusivo de *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Tanto aminoácidos chaves dos prováveis *boxes* de ligação a PABPs, quanto os triptofanos conservados e os sítios de fosforilação supracitados foram mutados de acordo com a metodologia descrita no item 5.1. A mutação consistiu na troca dos aminoácidos por uma alanina, com exceção de uma segunda construção do S75 em que se mutou a serina por um aspartato (D). Também foram produzidas proteínas mutadas em mais de um ponto, como foi o caso das que envolviam mutações nos *boxes* A e B, *boxes* A, B e C (para sua amplificação, foi utilizado como DNA molde a construção já mutada nos *boxes* A e B) e nos três *boxes* juntamente com o W187 (cujo DNA molde já possuía as mutações nos *boxes* A, B e C).

Figura 10 - Alinhamento das seqüências proteicas do EIF4E3 de espécies de *Leishmania*

Fonte: o autor.

Legenda: alinhamento mostrando a alta conservação do EIF4E3 entre espécies de *Leishmania*. Em fundo branco, encontram-se os aminoácidos divergentes entre as espécies analisadas. Os motivos em vermelho representam possíveis motivos de ligação a homólogos da PABP (nomeados de boxes A, B e C), sendo indicados pelas setas vermelhas os aminoácidos mutados. As setas amarelas indicam os triptofanos 187 e 216, possivelmente relacionados à ligação ao EIF4G4 e ao *cap* respectivamente. As setas verdes indicam prováveis sítios de fosforilação. Estão indicadas com um asterisco as mutações já produzidas antes deste estudo. Alinhamento produzido no programa BioEdit. Lama: *L. amazonensis*; Linf: *L. infantum*; Lmaj: *L. major*; Lmex: *L. mexicana*; Ltar: *L. tarentolae*.

A amplificação dos genes completos contendo mutações pontuais e combinações de mutações seguiu o esquema de utilização de *primers* descrito no Quadro 2. Os *megaprimers* oriundos da primeira reação de PCR foram amplificados no tamanho esperado, assim como os genes completos provenientes da segunda reação, que possuem o mesmo tamanho por se tratarem do mesmo gene com mutações pontuais em locais diferentes da sequência (Figura 11).

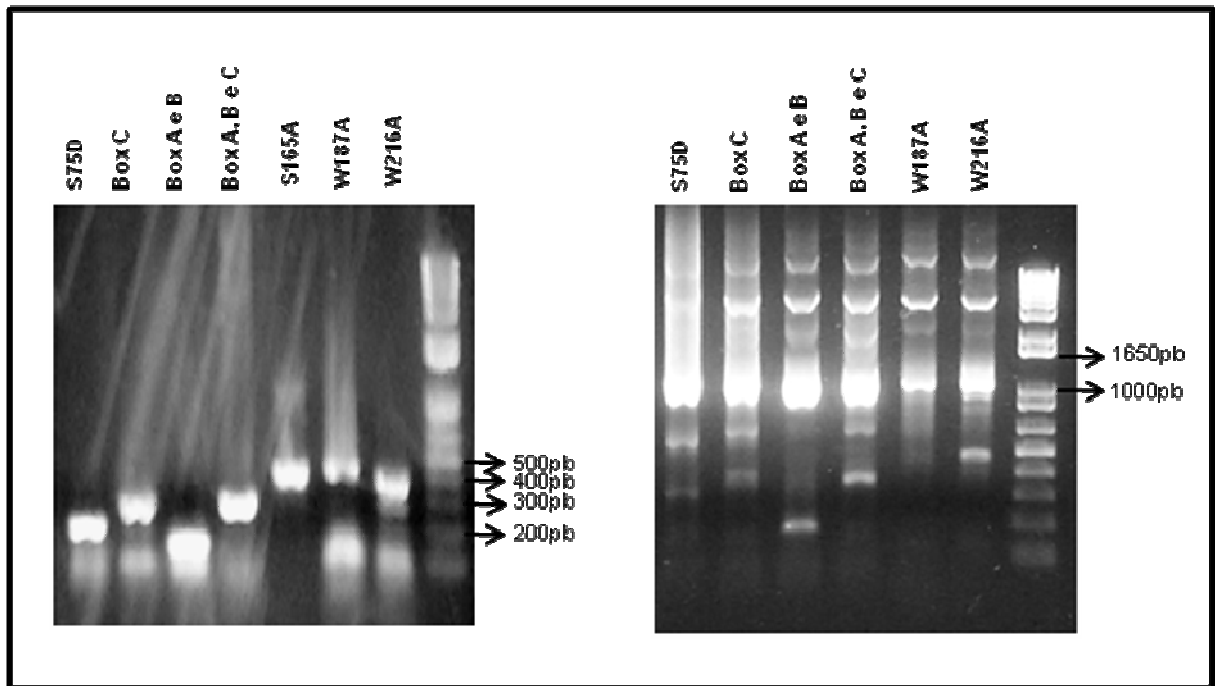
Quadro 2 - Esquema de *primers* utilizado nas construções dos genes mutantes

Mutação	1ª PCR		2ª PCR		Tamanhos dos MPs
	Primer 5'	Primer 3'	Primer 5'	Primer 3'	
Boxes A e B	Mut Y8A	Mut P45A/F46A	MP	EIF4E3-HA R	156 pb
Box C	EIF4E3-HA F	Mut D108A/W109A	MP	EIF4E3-HA R	345 pb
Boxes A, B e C	Mut Y8A	Mut D108A/W109A	MP	EIF4E3-HA R	345 pb
Boxes ABC + W187A	W187A	EIF4E3-HA R	EIF4E3-HA F	MP	504 pb
S75D	EIF4E3-HA F	Mut S75D	MP	EIF4E3-HA R	243 pb
S165A	EIF4E3-HA F	Mut S165A	MP	EIF4E3-HA R	513 pb
W187A	W187A	EIF4E3-HA R	EIF4E3-HA F	MP	504 pb
W216A	W216A	EIF4E3-HA R	EIF4E3-HA F	MP	417 pb

Fonte: o autor.

Legenda: a construção dos genes mutantes envolveu um esquema de duas PCRs na qual o produto resultante da primeira reação serviu como *primer – megaprimer* (MP) – para a segunda. O quadro mostra quais os *primers* utilizados para a produção do gene completo do EIF4E3 contendo as mutações desejadas e o tamanho esperado dos MPs. Para construção do gene mutado nos boxes A, B e C, foi utilizado como DNA molde a construção mutada nos boxes A e B. Já para mutar os boxes A, B e C + W187, a construção mutada nos três boxes foi utilizada com DNA molde.

Figura 11 - Géis representativos das amplificações dos *megaprimers* e dos genes do EIF4E3 mutados



Fonte: o autor.

Legenda: géis representativos mostrando a amplificação em tamanho esperado de *megaprimers* à esquerda e de construções completas do EIF4E3 contendo mutações pontuais à direita. Tamanho completo da construção do EIF4E3 é de 1089 pb.

Foram utilizadas ao todo onze construções do EIF4E3 neste estudo, listadas no Quadro 3, todas fusionadas ao epítipo HA e clonadas e subclonadas como descrito no tópico 5.2. A Figura 12 traz um esquema do EIF4E3 com a posição das mutações produzidas. Como a observação da correta inserção das mutações não é possível através de digestões seguidas de corrida em gel de agarose, por se tratarem todas do mesmo gene, essa análise foi realizada através de dados obtidos a partir de sequenciamento.

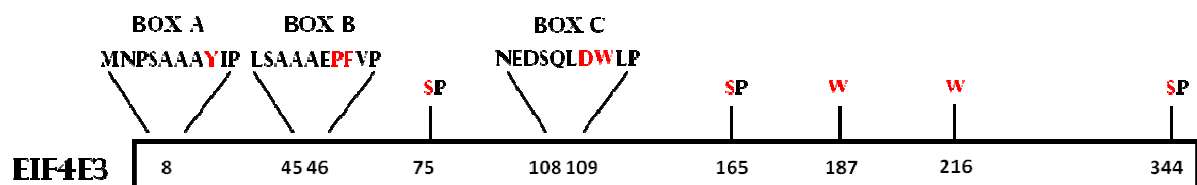
Quadro 3 - Construções do EIF4E3 utilizadas neste estudo

Construção do EIF4E3	Aminoácidos mutados	Característica analisada
4E3-HA*	-	-
4E3ΔS75A-HA*	S75	Sítio de fosforilação
4E3ΔS75D-HA	S75	Sítio de fosforilação
4E3ΔBoxesAB-HA	Y8 (Box A) P45/F46 (Box B)	Interação com PABPs
4E3ΔBoxC-HA	D108/W109 (Box C)	Interação com PABPs
4E3ΔBoxesABC-HA	Y8 (Box A) P45/F46 (Box B) D108/W109 (Box C)	Interação com PABPs
4E3ΔBoxesABC+W187A-HA	Y8 (Box A) P45/F46 (Box B) D108/W109 (Box C) W187	Interação com PABPs Interação com EIF4G4
4E3ΔS165A-HA	S165	Sítio de fosforilação
4E3ΔW187A-HA	W187	Interação com EIF4G4
4E3ΔW216A-HA	W216	Ligação ao cap
4E3ΔS344A-HA*	S344A	Sítio de fosforilação

Fonte: o autor.

Nota: foram utilizadas ao todo onze construções do EIF4E3, algumas delas envolvendo mutações em mais de um ponto da proteína. Estão sinalizadas por um asterisco as construções que já se encontravam disponíveis e não foram produzidas neste estudo.

Figura 12 - Esquema do EIF4E3 e de seus aminoácidos mutados



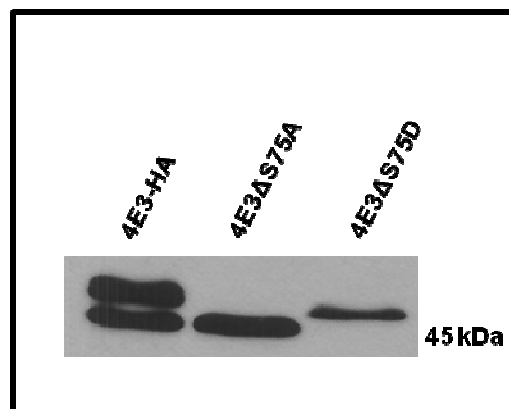
Fonte: o autor.

Legenda: esquema do EIF4E3, mostrando a posição na proteína dos aminoácidos mutados neste estudo (em vermelho).

6.2 PERFIL DE EXPRESSÃO DOS MUTANTES DO EIF4E3 EM SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO

As construções mutantes no plasmídeo pSP-BT1-Y-Neo-alfa foram transfectadas em células de *L. amazonensis*. Estas foram utilizadas para a produção de extratos celulares quando a cultura se apresentasse em fase exponencial de crescimento, fracionados em seguida em gel SDS-PAGE para observação do perfil de expressão das proteínas mutantes, através de imunodeteção por *Western-blot* com anticorpo contra o epítipo HA.

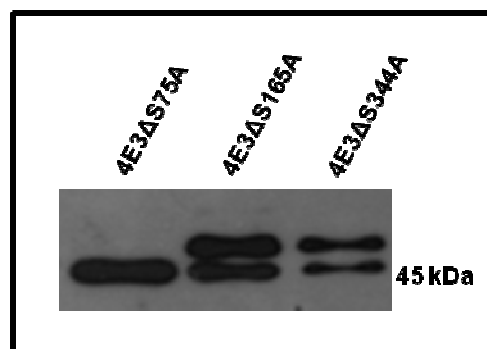
Num primeiro ensaio, comparou-se o perfil de expressão das proteínas mutadas na serina 75 em gel SDS-PAGE 15% (Figura 13). O EIF4E3 selvagem de *L. amazonensis* é uma proteína sabidamente fosforilada que se apresenta como duas bandas em gel unidimensional, sendo cada uma composta por isoformas contendo modificações pós-traducionais. Abolindo o provável sítio de fosforilação S75, modificando o aminoácido serina por alanina (4E3ΔS75A), foi possível observar o desaparecimento da banda de maior tamanho aparente do EIF4E3, levando a crer que este é um importante sítio de modificação pós-traducional para a proteína, sendo o ponto onde ocorre a modificação responsável pela diferença no padrão migratório das duas bandas do EIF4E3. Quando a serina foi trocada por um aspartato (4E3ΔS75D), no entanto, o padrão de migração na eletroforese se alterou ligeiramente. A proteína ainda se apresentou como uma única banda, porém em altura intermediária às da proteína selvagem. O aspartato é um aminoácido de carga total negativa e foi utilizado para simular a carga de um grupamento fosfato. Sua presença foi suficiente para promover uma alteração no padrão de migração da proteína, porém não a ponto desta se apresentar na mesma altura da banda mais alta do EIF4E3 selvagem. Isto poderia se dever ao fato de que o grupamento fosfato possuir três cargas negativas, enquanto que o aspartato possui apenas uma. Este resultado sugere, portanto, a presença de um evento de fosforilação neste ponto, responsável pela modificação de altura que promove o aparecimento da banda superior do EIF4E3.

Figura 13 - Perfis de expressão do EIF4E3 com as mutações S75A e S75D em *L. amazonensis*

Fonte: o autor.

Nota: comparando a expressão das proteínas mutantes S75A e S75D, foi possível observar nesta última um padrão de expressão que tende a se assemelhar à banda de maior peso molecular da proteína selvagem. Pelo aspartato simular uma carga negativa conferida à proteína por um grupamento fosfato, isto sugere que a banda mais alta do EIF4E3 seja fosforilada. Quantidade de células por poço: 10^6 células; tempo de cultura: 48h. Gel SDS-PAGE 15%. Imunodeteção por anticorpos anti-HA.

Continuando a análise de modificações pós-traducionais do EIF4E3, comparou-se as proteínas mutadas nos três sítios de fosforilação preditos (Figura 14) em extratos de 48 horas. A proteína 4E3ΔS75A mais uma vez apresentou o perfil de uma única banda, enquanto que o 4E3ΔS165A e o 4E3ΔS344A apresentaram perfil semelhante ao EIF4E3 selvagem (ver figura 13). As mutações realizadas em sua sequência portanto não impactaram na forma como estas se apresentaram em gel unidimensional.

Figura 14 - Expressão dos mutantes do EIF4E3 nos sítios de fosforilação S75, S165 e S344

Fonte: o autor.

Nota: o 4E3ΔS165A e o 4E3ΔS344A se apresentaram semelhantes ao EIF4E3 selvagem, não sendo observada qualquer alteração em seus perfis de expressão em gel unidimensional com as mutações inseridas. O 4E3ΔS75A mais uma vez se apresentou como uma única banda. Quantidade de células por poço: 10^6 células. Tempo de cultura: 48h. Gel SDS-PAGE 15%. Imunodeteção por anticorpos anti-HA.

6.3 EXPRESSÃO DO EIF4E3 EM *L. AMAZONENSIS* E *L. INFANTUM*

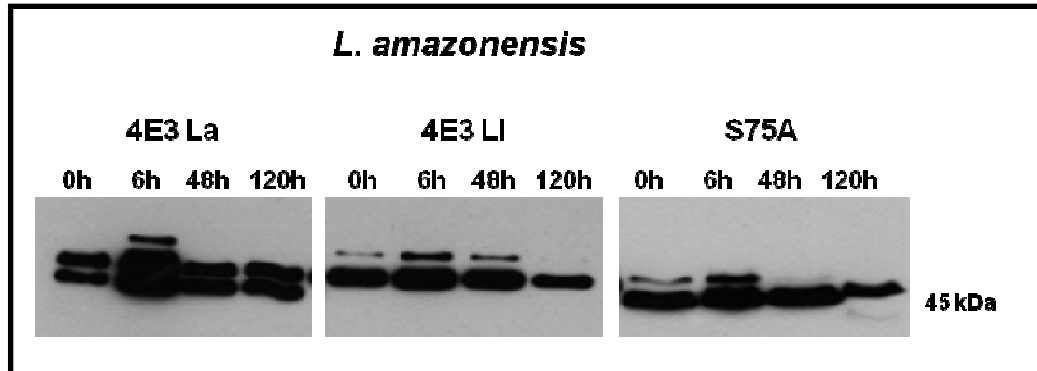
A partir da análise da sequência do EIF4E3 de várias espécies de *Leishmania* (Figura 10), chamou atenção o fato de só haver três sítios de fosforilação preditos para uma proteína que apresenta um perfil de expressão que sugeriria mais fosforilações. Além disso, havia a presença de um sítio de fosforilação (S75) exclusivo para as espécies *L. amazonensis* e *L. mexicana* cuja mutação levou a uma alteração drástica em seu perfil de expressão. No intuito de observar, então, as diferenças quanto à expressão do EIF4E3 de acordo com a espécie, procedeu-se um ensaio em que o EIF4E3 selvagem (4E3 La) e o 4E3 Δ S75A de *L. amazonensis* e o EIF4E3 selvagem de *L. infantum* (4E3 Li) foram expressos tanto nas suas espécies de origem quanto de forma trocada.

Foram utilizadas construções disponíveis em laboratório do EIF4E3 selvagem portadoras do *tag* HA das duas espécies para transfecções, tanto com o 4E3 La quanto o 4E3 Li, assim como o 4E3 Δ S75A, sendo introduzidos em células de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Foram retiradas alíquotas em pontos representativos da curva de crescimento (0h, 6h, 48h e 120h) com a expressão sendo analisada utilizando o dobro da quantidade de células dos extratos utilizados previamente. A concentração do gel SDS-PAGE também foi alterada (para 12,5%), o que propiciaria uma melhor separação das bandas.

Analisando a expressão em *L. amazonensis* (Figura 15), foi observado que o 4E3 La apresentou-se na curva preferencialmente como duas bandas equivalentes em intensidade, chamando atenção uma terceira banda no ponto 6h, ligeiramente mais alta que as demais e de menor intensidade, não observada anteriormente. Já o 4E3 Li apresentou-se preferencialmente numa banda de menor peso molecular, correspondente à banda mais baixa de seu ortólogo em *L. amazonensis*, com uma segunda também ligeiramente mais alta e de menor intensidade, aparecendo do ponto 0h a 48h, com o 4E3 Δ S75A apresentando um perfil bastante semelhante. Este resultado mostra um possível novo evento de fosforilação, indicado pela terceira banda observada para o 4E3 La. A isoforma superior do 4E3 Li corresponde provavelmente à terceira banda observada no 4E3 La, já que o 4E3 Li não possui a serina 75 responsável pelo perfil típico do 4E3 La. O resultado para o 4E3 Δ S75A apoia esta hipótese, uma vez que esta proteína, não possuindo o sítio S75 (como na sequência selvagem do 4E3 Li) apresentou perfil semelhante ao 4E3 Li, também

com uma segunda banda mais alta (não observável nas Figuras 13 e 14 por se tratar de um gel de SDS-PAGE 15% e, portanto, de menor capacidade de separação).

Figura 15 - Expressão das proteínas 4E3 La, 4E3 Li e 4E3ΔS75A em *L. amazonensis*

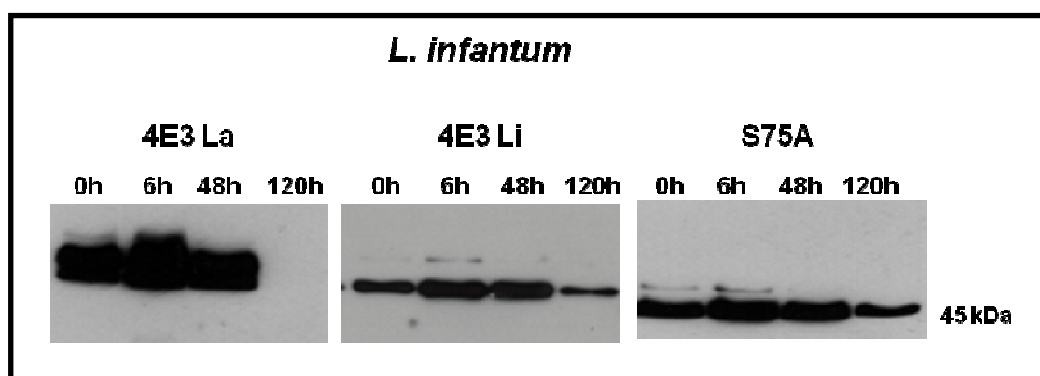


Fonte: o autor.

Nota: ao analisar o perfil de expressão do 4E3La em *L. amazonensis*, foi possível observar o aparecimento de mais uma banda no ponto 48 h. Já o 4E3 Li e o 4E3ΔS75A apresentaram um perfil semelhante entre si, porém diferente do 4E3 La. Quantidade de células por poço: 2×10^6 . Tempo de cultura: 48h. Gel SDS-PAGE 12,5%. Imunodeteção por anticorpos anti-HA.

Posteriormente, foi feita a mesma análise em *L. infantum* (Figura 16) sendo obtidos resultados semelhantes aos de *L. amazonensis* para as três proteínas, com o 4E3 La apresentando novamente três bandas e o 4E3 Li e o 4E3ΔS75A, duas, com as de maior peso molecular tendo menor intensidade. A grande semelhança no perfil de expressão das proteínas, não importando a espécie em que estivessem sendo expressas, sugere que este perfil se deve à sequência proteica em si e não à maquinaria de modificações pós-traducionais das espécies analisadas.

Figura 16 - Expressão de 4E3 La, 4E3 Li e 4E3ΔS75A em *L. infantum*



Nota: o perfil de expressão para o 4E3 La, o 4E3 Li e o 4E3ΔS75A em *L. infantum* foi semelhante ao obtido em *L. amazonensis*, sugerindo que o perfil das proteínas tem mais relação com as suas sequências em si que com as espécies em que são expressas. Quantidade de células por poço: 2×10^6 . Tempo de cultura: 48h. Gel SDS-PAGE 12,5%. Imunodeteção por anticorpos anti-HA. Fonte: o autor.

O ponto 120h do 4E3 La em *L. infantum* não teve expressão detectada porque a cultura já se apresentava em fase de declínio adiantada quando na coleta da alíquota.

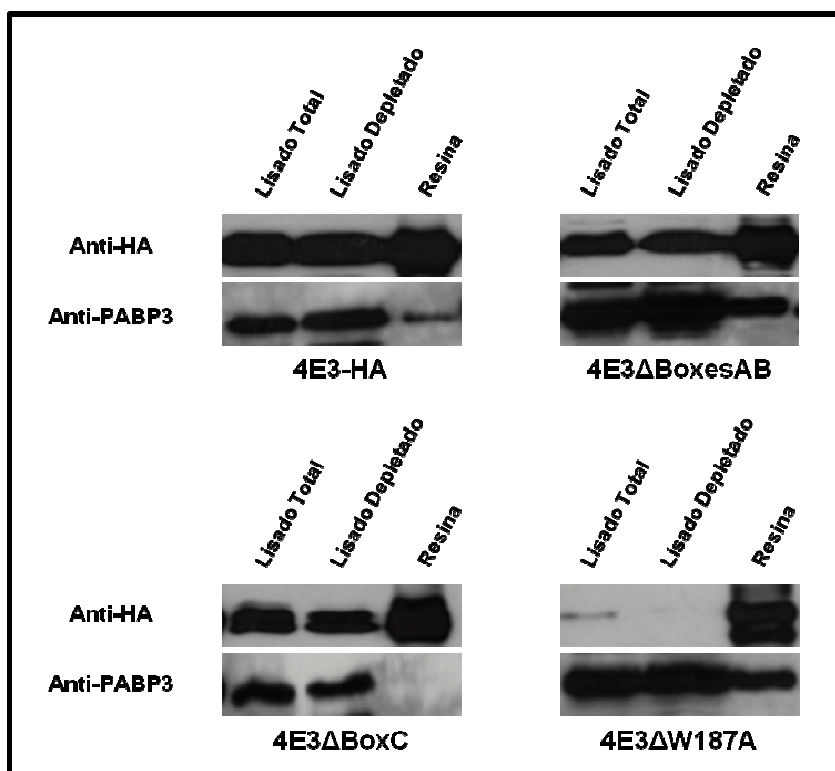
6.4 AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE MUTAÇÕES NO EIF4E3 EM SUA INTERAÇÃO COM A PABP3

Utilizando as linhagens transfectadas com as construções mutantes do EIF4E3, pretendeu-se avaliar que impacto essas mutações causariam na capacidade de ligação do fator a um homólogo da PABP, a PABP3. A partir de culturas em fase exponencial destas linhagens, foram produzidos lisados celulares, posteriormente submetidos a ensaios de imunoprecipitação (IP) com uma resina de agarose ligada a anticorpos monoclonais anti-HA. Foram utilizados neste ensaio culturas expressando as proteínas correspondentes às construções 4E3-HA (EIF4E3 selvagem), 4E3 Δ BoxesAB, 4E3 Δ BoxC e 4E3 Δ W187A, portadoras do epítipo HA. O ensaio de imunoprecipitação permite a purificação de proteínas específicas e de complexos proteicos a que se encontrem ligadas no momento do ensaio, separando-os do restante das proteínas do lisado.

Ao final da imunoprecipitação, foram analisadas em ensaios de *Western-blot* alíquotas das resinas, dos lisados de origem (lisados totais) e dos lisados após o ensaio (lisados depletados) (Figura 17).

Antes da utilização de qualquer outro anticorpo, foi utilizado o anti-HA. Uma vez detectado o epítipo na resina, o que indica a presença da construção do EIF4E3 a ele ligada, foi possível proceder aos ensaios de interesse com o anti-PABP3. Os resultados mostraram a presença da PABP3 na resina da IP do 4E3-HA, indicando a existência de interação entre as duas proteínas. Esta interação, no entanto, não foi afetada pelas mutações inseridas nos boxes A e B e no W187, uma vez que a PABP3 ainda foi detectada na resina, porém foi abolida para o 4E3 Δ BoxC. Estes resultados indicam que os aminoácidos D108 e W109 (mutados no Box C para alaninas) tem participação na ligação do EIF4E3 com a PABP3, sugerindo estes resíduos são essenciais para a ligação entre os fatores. Entretanto, outros ensaios são necessários para determinar se esta ligação ocorre de forma direta ou indireta, através de algum homólogo do EIF4G, por exemplo.

Figura 17 - Imunoprecipitação de construções mutantes do EIF4E3 e sua interação com a PABP3



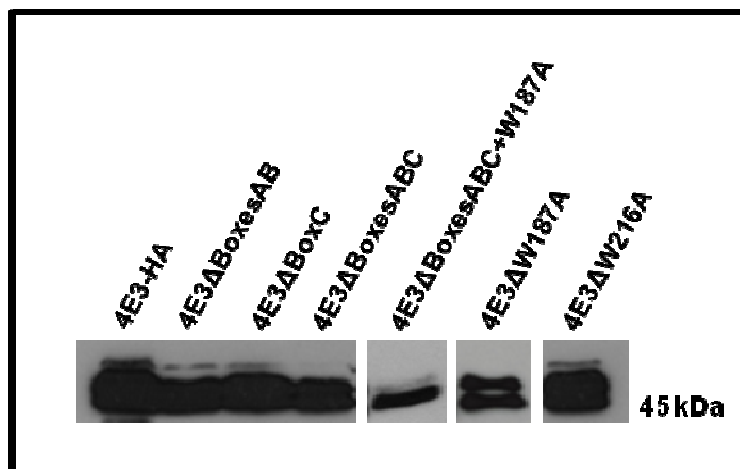
Fonte: o autor.

Nota: foram utilizadas 2×10^8 células das linhagens transfectadas com as construções 4E3-HA (EIF4E3 selvagem ligado ao HA), 4E3ΔBoxesAB, 4E3ΔBoxC e 4E3ΔW187A para a preparação dos lisados utilizados nas imunoprecipitações. A imunodeteção por WB foi realizada com os anticorpos anti-HA e anti-PABP3. As proteínas detectadas na resina indicam sua interação com o EIF4E3. Gel SDS-PAGE 15%. Imunoprecipitação produzida com lisados de 48h. Imunodeteção com anti-HÁ.

6.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS DEMAIS MUTANTES DO EIF4E3

No intuito de avaliar se as mutações não direcionadas a sítios de fosforilação no EIF4E3 causariam alguma alteração na expressão do fator, foi comparado o perfil de expressão de alíquotas correspondendo a 2×10^6 células de uma cultura de 48 horas dos demais mutantes do EIF4E3 (Figura 18). Neste ensaio se utilizou uma maior concentração do anticorpo de detecção anti-HA e a reação de imunodeteção foi mais forte fazendo as duas bandas aparecerem fusionadas no filme para a maioria dos mutantes do EIF4E3.

Figura 18 - Comparação do perfil de expressão de mutantes do EIF4E3



Fonte: o autor.

Nota: a maioria dos mutante do EIF4E3 apresentou-se na forma habitual de duas bandas, com exceção do 4E3ΔBoxesABC+W187A, envolvendo mutação nos possíveis sítios de ligação a homólogos da PABP e de ligação ao EIF4G4, que se expressou principalmente como a banda mais baixa. Isto sugere a participação tanto da PABP quanto do EIF4G4 no processo de fosforilação do EIF4E3. Quantidade de células por poço: 2×10^6 . Tempo de cultura: 48h. Gel SDS-PAGE 12,5%.

As proteínas mutantes 4E3ΔBoxesAB, 4E3ΔBoxC e 4E3ΔW216A apresentaram perfil de expressão semelhante à proteína selvagem, com as habituais duas bandas características do EIF4E3 e a terceira banda mais alta. Esta última não foi observada, no entanto, para o 4E3ΔBoxesABC e 4E3ΔW187A. As mutações nos três *boxes* e no W187 tinham o objetivo de abolir a ligação do EIF4E3 com homólogos da PABP e com o EIF4G4 respectivamente, algo confirmado para os seus equivalentes em EIF4E4 (em fase de elaboração)* sugerindo que estas interações isoladamente sejam necessárias para o aparecimento desta isoforma. Porém, quando se realizou a mutação nos três *boxes* e no W187 numa mesma construção (4E3ΔBoxesABC+W187A), seu perfil de expressão alterou-se drasticamente, com este mutante se apresentando preferencialmente na forma da banda mais baixa. Este resultado mostra a importância dos aminoácidos mutados para a fosforilação do EIF4E3, sugerindo um sinergismo da interação tanto da PABP quanto do EIF4G4 no processo de fosforilação do EIF4E3, uma vez que a eliminação destas interações isoladamente leva ao desaparecimento da isoforma mais alta (contendo mais fosforilações) e, com a eliminação simultânea de ambas, com o EIF4E3 mostrando-se quase totalmente em sua banda menor (com menos ou nenhuma fosforilação). Entretanto, seria necessária a confirmação da abolição destas interações por ensaios de imunoprecipitação para a confirmação desta hipótese.

*Artigo em fase de redação de autoria do Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

7 DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos 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 da estabilidade e degradação dos mRNAs e da iniciação da tradução (FERNANDEZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010). O ciclo de vida destes parasitas é bastante complexo, envolvendo diferentes hospedeiros e condições muito diversas de pH, temperatura e disponibilidade nutricional. 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 (VALÁSEK, 2012). Este controle, então constitui uma ferramenta da qual os tripanossomatídeos podem lançar mão para desencadear as mudanças morfológicas necessárias a sua adaptação aos diferentes hospedeiros.

Neste estudo, pretendeu-se caracterizar o fator de iniciação da tradução EIF4E3 de *Leishmania*, introduzindo em sua sequência mutações em aminoácidos candidatos a sítios de fosforilação, ou de ligação a parceiros funcionais, para observação de seu impacto na expressão deste e em sua capacidade de interação com outras proteínas envolvidas na iniciação da tradução. Em estudos anteriores a este, a expressão do EIF4E3 foi descrita em uma curva de crescimento de *L. amazonensis*, apresentando-se na forma de duas bandas com a mais alta sendo preferencialmente expressa imediatamente após o início e no final da curva, o que corresponde às fases estacionária (de onde as células são retiradas) e de declínio, respectivamente. Este perfil diferiu de seu homólogo EIF4E4 que aparece como várias isoformas, bastante próximas, e de forma inversa ao EIF4E3, com as bandas menores preferencialmente expressas nas fases supracitadas. Chamou atenção que as isoformas dos dois fatores se alteravam rapidamente durante a curva de crescimento, sugerindo que as mudanças fossem ocasionadas por modificações pós-traducionais. Realizando então purificação das proteínas fosforiladas totais nos dois fatores, observou-se que ambos possuíam fosforilações, com as duas bandas do EIF4E3 aparecendo na porção da eluição (que continha as proteínas fosforiladas) (PEREIRA *et al.*, 2013).

Em dois estudos analisando o fosfoproteoma de *L. donovani* (HEM *et al.*, 2010) e *T. brucei* (URBANIÁK *et al.*, 2013), foi possível identificar a presença de sítios de fosforilação no EIF4E4 das duas espécies, sendo a grande maioria desses sítios composta por serinas ou treoninas seguidas de prolinas. Partindo então para a análise da sequência do EIF4E3 de *Leishmania* foi observada a presença de três destes sítios nas posições 75, 165 e 344 das espécies analisadas, sendo o primeiro encontrado apenas em *L. amazonensis* e *L. mexicana*. Estes motivos são conhecidos por serem locais de ação de várias quinases (LU *et al.*, 2002) e foram mutagenizados para observação do perfil de expressão no presente estudo. O 4E3ΔS75A mostrou o perfil mais inusitado das três proteínas mutadas, com o desaparecimento da banda de maior peso molecular. Isto mostra que neste sítio ocorre alguma modificação pós-traducional responsável pela mudança no perfil migratório das duas bandas do EIF4E3. Uma vez que, nas condições utilizadas nos ensaios, nenhuma diferença na expressão do 4E3ΔS165A e 4E3ΔS344A foi detectada, a possível fosforilação que ocorre nestes sítios pode ocasionar mudanças de expressão não passíveis de serem apreciadas em gel unidimensional. Levando isto em consideração, é de se supor que na S75 ocorra alguma outra modificação pós-traducional que não a fosforilação (ou que esta última induza alterações estruturais que levaram a uma alteração maior de seu tamanho aparente em gel desnaturante de SDS-PAGE, gerando a banda de migração mais lenta). A partir desta ideia, em um estudo das modificações pós-traducionais do EIF4E3 de *L. amazonensis* foi realizada a predição de alguns tipos de modificações na sequência do fator. Os resultados mostraram uma alta predição de O-glicosilação entre os aminoácidos 50 e 100, mais especificamente na S75 (PEREIRA, 2013).

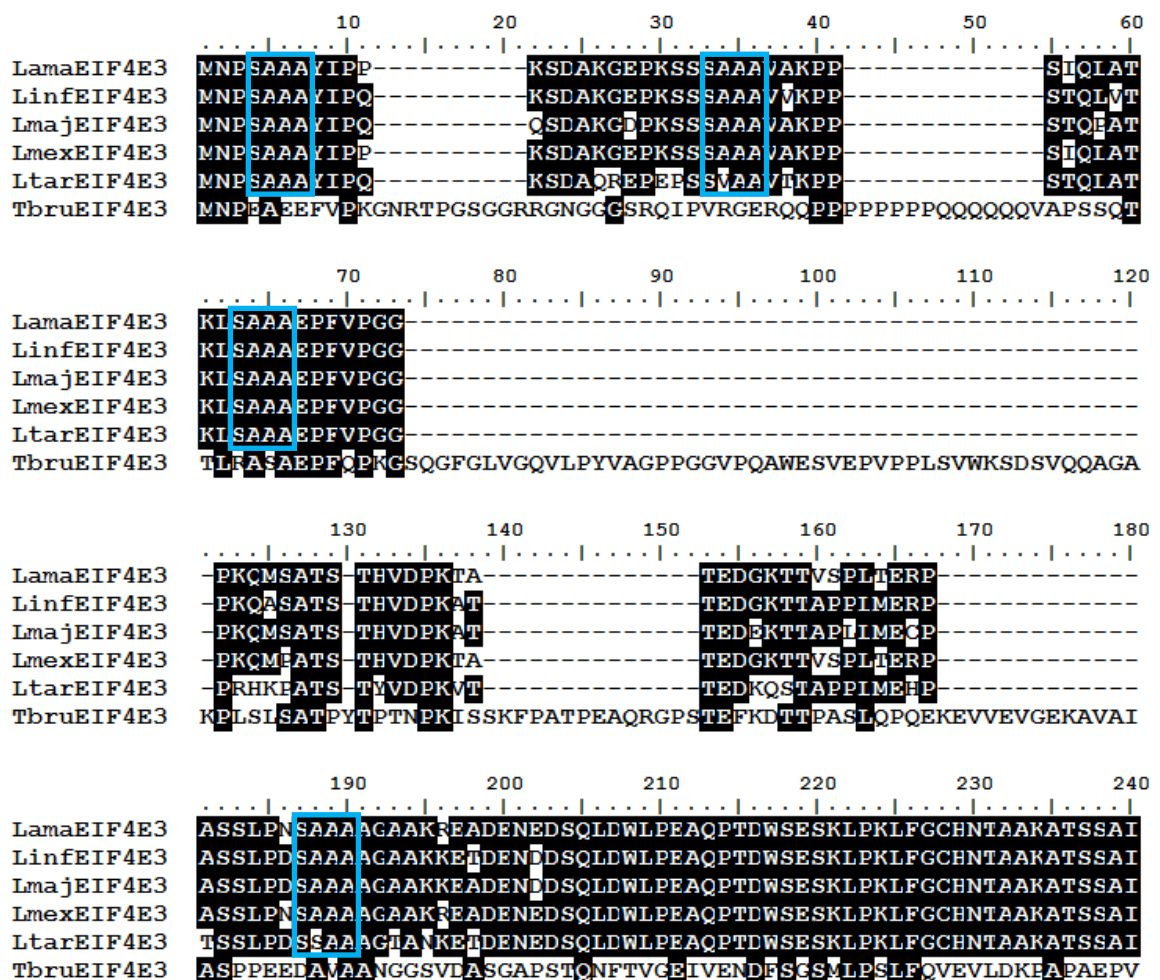
Posteriormente, foi comparado o perfil do EIF4E3 selvagem de duas espécies de *Leishmania* numa curva de crescimento. Neste ensaio foi utilizado um gel SDS-PAGE de menor concentração (12,5%), o que promove uma melhor separação das proteínas presentes nos extratos. Com isto, pretendeu-se avaliar se esta maior separação em gel unidimensional promoveria o aparecimento de mais alguma isoforma do EIF4E3, uma vez que foi observado em géis bidimensionais que o fator se apresentava na forma de quatro *spots*, sendo dois equivalentes para cada banda observada no gel unidimensional (PEREIRA *et al.*, 2013). A partir dos resultados, foi possível perceber diferenças grandes nos perfis de expressão do EIF4E3 das duas espécies analisadas. Enquanto em *L. amazonensis* o EIF4E3 apresentou-se

predominantemente como duas bandas, com uma terceira de maior peso molecular (que corresponderia a uma isoforma hiperfosforilada do fator), o de *L. infantum* apresentou predominantemente uma mais baixa, com uma segunda, mais fraca e compatível com a terceira de *L. amazonensis*, aparecendo em alguns pontos da curva. Esta diferença se deve exclusivamente a própria sequência dos fatores, e não à maquinaria celular, uma vez que o 4E3 La apresentou-se da mesma forma tanto em *L. amazonensis* quanto em *L. infantum*, assim como o 4E3 Li. Estes resultados também foram obtidos por um estudo em que se observou a expressão do EIF4E3 das duas espécies nas mesmas condições, em extratos de 48h (PEREIRA, 2013), porém não foi observada nem a terceira banda para o 4E3 La, nem nenhuma banda adicional para o 4E3 Li, possivelmente devido a maior concentração do gel SDS-PAGE utilizado. A diferença observada entre as espécies é ocasionada pela falta da serina 75 na sequência de *L. infantum*, com a proteína 4E3 Δ S75A apresentando-se no mesmo padrão. A banda adicional observada em ambas as espécies são, então, um relato novo de isoformas para o fator nas duas espécies. Observando um alinhamento entre o EIF4E3 de algumas espécies de *Leishmania* com o de *T. brucei* (Figura 19) pôde-se perceber a presença de motivos conservados e repetidos na região N-terminal apenas nos homólogos de *Leishmania*, que podem ser os sítios destas fosforilações adicionais, porém é necessário um estudo analisando o impacto de mutações nestes pontos na expressão do EIF4E3.

Quanto às interações entre os homólogos de eIF4E de *Leishmania* e outros fatores de iniciação da tradução, já foram relatados vários dados na literatura. Resultados de espectrometria de massas detectaram interação do EIF4E4 de *L. major* com a PABP1, assim como a ausência de ligação entre o EIF4E3 e a PABP1 (ZINOVIEV *et al.*, 2011). Este último resultado foi observado também para o EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum*, porém em ensaios de imunoprecipitação, o EIF4E3 apresentou ligação tanto com a PABP2 quanto com a PABP3 (PEREIRA, 2013). No presente estudo foi investigado o impacto de mutações produzidas no EIF4E3 na sua capacidade de ligação à PABP3. Os resultados confirmaram a interação entre os dois fatores através desta região do Box C do EIF4E3. A proteína mutagenizada nos aminoácidos D108 e W109 perdeu a capacidade de ligação à PABP3, indicando estes como os resíduos responsáveis pela interação entre os fatores. Em ensaios *in vivo* com *L. major*, foi observado que as PABP2 e 3 possuem capacidade de ligação entre si, inclusive depletando uma a outra de lisados usados em imunoprecipitações.

Além disso, em situação de inibição da transcrição através do uso de actinomicina D, ambas migraram juntas do citoplasma para o núcleo (DA COSTA LIMA *et al.*, 2010), sugerindo que os dois homólogos desempenhem funções juntos, podendo apresentar os mesmos perfis de ligação a parceiros funcionais. Porém, em ensaios *in vitro* com a PABP2, esta ainda apresentou interação ao EIF4E3 mutado no Box C, perdendo a capacidade de ligação apenas quando o EIF4E3 foi mutagenizado nos três motivos (XAVIER, 2015), o que torna necessária a observação da conservação destas interações *in vivo*.

Figura 19 - Alinhamento da região N-terminal do EIF4E3 de *Leishmania* com outros possíveis sítios de fosforilação



Fonte: o autor.

Nota: realizando um alinhamento com o EIF4E3 entre as várias espécies de *Leishmania* e *T. brucei*, foram percebidos motivos conservados e repetidos na região N-terminal (delimitados pelos retângulos azuis) do fator apenas em *Leishmania*. Estes podem ser os sítios de fosforilação responsáveis pelas fosforilações adicionais observadas neste trabalho para o EIF4E3. Alinhamento realizado no programa BioEdit.

Em *T. brucei*, o EIF4E3 interage tanto *in vivo* quanto *in vitro* com o EIF4G4 (FREIRE *et al.*, 2010) e estas interações também tendo sido observadas em *L. major* (REIS, 2009; YOFFE *et al.*, 2009). Aqui não foi possível mostrar se a mutação no W187 provocaria a abolição da interação entre essas proteínas, porém quando seu equivalente no EIF4E4 de *L. infantum* foi mutagenizado, houve abolição entre os dois.

Ao realizar a análise da expressão das demais proteínas mutadas do EIF4E3 produzidas neste trabalho, foi observada novamente a presença de mais uma banda para a construção selvagem do EIF4E3, mais acima das demais, com esta isoforma se repetindo em algumas das proteínas mutadas. Porém, o resultado mais surpreendente foi o perfil do 4E3 Δ BoxesABC+W187A, apresentando preferencialmente uma banda de menor peso molecular, que corresponderia à isoforma desfosforilada do fator selvagem. As mutações nos boxes A, B e C e no W187 tinham o intuito de abolir a interação do EIF4E3 com homólogos da PABP e com o EIF4G4, respectivamente, já que seus equivalentes no EIF4E4 são responsáveis por estas interações (DE MELO NETO *et al.*, artigo submetido à publicação), porém estas mutações isoladamente promoveram apenas o desaparecimento da terceira banda do fator. Num estudo com EIF4E4 de *Leishmania infantum*, foram observados resultados semelhantes com uma redução drástica da fosforilação quando introduzidas as mutações equivalentes nesta proteína e uma diminuição da fosforilação quando mutados os três motivos envolvidos na ligação a homólogos de PABP. Porém, quando mutado apenas o triptofano de ligação ao EIF4G3, o fator apresentou um perfil de fosforilação semelhante ao controle (DE MELO NETO *et al.*, artigo submetido). Em humanos, para que ocorra a fosforilação do EIF4E, é necessário o recrutamento da quinase pelo EIF4G (PYRONET *et al.*, 1999), mas levando todos estes dados em consideração, parece que a interação com homólogos de PABP é mais crucial para a fosforilação dos EIF4E3 e EIF4E4 em *Leishmania* que a sua interação com homólogos de EIF4G, embora ainda seja necessária a interação com os dois fatores para que ela aconteça.

Os resultados deste trabalho ajudam na caracterização do EIF4E3 de *Leishmania*, contribuindo para um maior entendimento do processo de iniciação da tradução em tripanossomatídeos. Através do estudo da expressão dos mutantes do EIF4E3, pôde-se observar que este fator apresenta um perfil de modificações

bastante complexo, possivelmente responsável pela sua regulação. É bem conhecido que em eucariotos em geral, várias proteínas sofrem modificações pós-traducionais para regulação de suas funções, com este processo já tendo sido descrito inclusive em fatores de iniciação da tradução, com fosforilação em resíduos específicos de fatores selecionados (DENNIS *et al.*, 2009). Além disso, os dados da literatura mostram uma grande complexidade também de interações do EIF4E3 com outras proteínas atuantes na tradução. Sendo assim, é necessário o mapeamento de outros sítios deste fator, tanto os envolvidos com modificações pós-traducionais, quanto os envolvidos com interações deste com outras proteínas. Isto contribuiria muito para o entendimento da regulação da expressão gênica nestes organismos, que pode ser mediada em grande parte por modificações pós-traducionais com impacto em suas interações.

8 CONCLUSÕES

- a) A serina 75 é o sítio onde ocorre a modificação pós-traducional responsável pelo aparecimento da banda de maior peso molecular apresentada pelo EIF4E3 de *L. amazonensis* (e ausente em *L. infantum*), não sendo esta modificação outra que não uma fosforilação ou alguma que ocorra em conjunto com esta;
- b) Existem elementos comuns de modificação pós-traducional, fosforilação, nos homólogos de EIF4E3 de *L. amazonensis* e *L. infantum* e possíveis motivos alvos destas fosforilações foram identificados;
- c) O EIF4E3 é capaz de interagir com a PABP3, sendo o D108 e W109A (Box C) aminoácidos importantes para esta interação;
- d) A nos boxes A, B e C e no W187 promove uma redução drástica da fosforilação do EIF4E3, sugerindo que estes aminoácidos estejam envolvidos no processo de fosforilação.

REFERÊNCIAS

- AITKEN, C. E.; LORSCH, J. R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nature Structural & Molecular Biology**, New York, v. 19, n. 6, p. 568-576, 2012.
- ALEXANDER, B. E.; MAROLI, M. Control of Phlebotomine Sandflies. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 17, p. 1-18, 2003.
- BERRIMAN, M. *et al.* The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, Washington, v. 309, n. 5733, p. 416-422, 2005.
- BESTERO, S. *et al.* Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 37, p. 1063–1107, 2007.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de Vigilância Epidemiológica**. 7. ed. Brasília, 2009. (Série A – Normas e Manuais Técnicos; caderno, n. 11).
- CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N.R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**, Paris, v. 5, p. 1231–1240, 2003.
- CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to men and back again. **EMBO Journal**, Oxford, v. 21, p. 1881-1888, 2002.
- CUERVO, P.; DOMONT, G.B.; DE JESUS, J.B. Proteomics of trypanosomatids of human medical importance. **Proteomics**, Weinheim, v. 73, n. 5, p. 845-867, 2010.
- DA COSTA LIMA, T. D. C. *et al.* Functional Characterization of Three *Leishmania* Poly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 9, p. 1484–1494, 2010.
- DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**, Copenhagen, v. 22, p. 491–502, 2009.
- DENNIS, M. D.; PERSON, M. D.; BROWNING, K. S. Phosphorylation of plant translation initiation factors by CK2 enhances the in vitro interaction of multifactor complex components. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 31, p. 20615-20628, 2009.
- DHALIA, R. *et al.* The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic acids research**, London, v. 34, p. 2495–2507, 2006.
- DHALIA, R. *et al.* Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 140, p. 23–41, 2005.
- EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, Washington, v. 309, n. 5733, p. 409-415, 2005.

FERNANDEZ-MOYA, S. M.; ESTÉVEZ, A. M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **Wiley Interdisciplinary Reviews RNA**, Hoboken, v. 1, n. 1, p. 34-46, 2010.

FISCHER, P. M. Cap in Hand: Targeting eIF4E. **Cell Cycle**, Georgetown, v. 8, n. 16, p. 1-7, 2009.

FRANCO, L. H.; BEVERLEY, S. M.; ZAMBONI, D. S. Innate Immune Activation and Subversion of Mammalian Functions by Leishmania Lipophosphoglycan. **Journal of Parasitology Research**, Berlin, v.2012, p.1-11, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/jpr/2012/165126/>>. Acessado em: março 2015.

FREIRE, E. R. *et al.* The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Molecular and biochemical parasitology**, Amsterdam, v. 176, p. 25-36, 2011.

FREIRE, E. R. *et al.* eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. **RNA**, New York, v. 20, n. 8, p. 1272-1286, 2014.

FREIRE, E.R. *et al.* *Trypanosoma brucei* Translation Initiation Factor Homolog EIF4E6 Forms a Tripartite Cytosolic Complex with EIF4G5 and a Capping Enzyme Homolog. **Eukaryotic Cell**, Washington, v. 13, n. 7, p.896-908, 2014.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and Trypanosomatids: Targets and Drugs. **Pharmaceutical Research**, New York, v. 28, p. 2758–2770, 2011.

GEBAUER, F. E.; HENTZE, M.W. Molecular mechanisms of translational control. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 5, p. 827-835, 2004.

GINGRAS, A. C.; RAUGHT, B. E.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v. 68, p. 913-63, 1999.

GOMEZ, C. *et al.* Regulation of gene expression in protozoa parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2010, p. 1-24, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/726045/>>. Acessado em: abril de 2015.

GOODFELLOW, I.; ROBERTS, L. Eukaryotic initiation factor 4E. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, Oxford, v. 40, p. 2675-2680, 2008.

GRIENSVEN, J. V.; DIRO, E. Visceral leishmaniases. **Infectious Disease Clinics of North America**, Philadelphia, v. 26, n. 2, p. 309-322, 2012.

GUNZL, A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? **Eukaryotic cell**, Washington, v. 8, p. 1159-1170, 2010.

-
- HAILE, S., PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, New York, v. 20, p. 560-577, 2007.
- HELLEN, C. U.; SARNOW, P. Internal Ribosome-Entry Sites in Eucaryotic mRNAs Molecules. **Genes Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, p. 1593-1612, 2001.
- HEM, S. *et al.* Identification of Leishmania-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. **Proteomics**, Weinheim, v. 10, n. 21, p. 3868-3883, 2010.
- HINNEBUSCH, A. G. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 83, p. 779–812, 2014.
- HSIEH, A. C.; RUGGERO, D. Targeting eIF4E in cancer. **Clinical Cancer Research**, Philadelphia, v. 16, n. 20, p. 4914–20, 2010.
- HOLCIK, M. E., SONENBERG, N. Translational control in stress and apoptosis. **Nature reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 4, p. 318-27, 2005.
- IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science**, Washington, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.
- JACKSON, R. J.; HELLEN, C.U.T.; PESTOVA, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 11, n. 2, p. 113-127, 2010.
- JAGUS, R. *et al.* Diversity of eukaryotic translational initiation factor eIF4E in protists. **Comparative and Functional Genomics**, [S. l.] , v. 2012, p. 1-21, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijg/2012/134839/>>. Acessado em: 12 abr. 2015.
- JOSHI, B. *et al.* Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. **BMC Evolutionary Biology**, London, v. 5, n. 48, p. 1-20, 2005. Disponível em: <<http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1471-2148-5-48.pdf>>. Acesadoo em: 10 abr. 2015.
- KRAMER, S., CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 27, n. 1, p. 23-30, 2011.
- LACHANCE, P. E. *et al.* Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4E is critical for growth. **Molecular and Cellular Biology**. Washington, v. 22, n. 6, p. 1656-1663, 2002.
- LEANDRO, C. E.; CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux pumps and chemoresistance. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 22, p. 352-357, 2003.

LINDER, P. E.; JANKOWSKY, E. From unwinding to clamping – The DEAD box RNA helicase family. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 12, n. 8, p. 505-516, 2011.

LOPES, A. H. *et al.* Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. **The Open Parasitology Journal**, [S. l.], v. 4, p. 30-59, 2010.

LOPEZ-LASTRA, M.; RIVAIS, A.; BARRÍA, M. I. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation. **Biological Research**, Santiago, v. 38, p. 121-146, 2005.

LU, K. P.; LIOU, Y. C.; ZHOU, X. Z. Pinning down proline-directed phosphorylation signaling. **Trends in Cell Biology**, Cambridge, v. 12, p. 164-172, 2002.

MARINTCHEV, A. E.; WAGNER, G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. **Quarterly reviews of biophysics**, London, v. 37, n. 3-4, p. 197-284, 2004.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v.2010, p.1-15, 2010. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/525241/>>. Acessado em: 15 mar. 2015.

MAYER, M. G.; FLOETER-WINTER, L. M. Pre-mRNA trans-splicing: from kinetoplastids to mammals, an easy language for life diversity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, n. 5, p. 501-513, 2005.

MCKENDRICK, L.; PAIN, V. M., MARLEY, S. J. Translation Initiation Factor 4E. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Ottawa, v. 31, p. 31–35, 1999.

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

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

NEVES, D. **Parasitologia Humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**: the disease and its epidemiology. Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/disease_epidemiology/en/>. Acessado em: 10 abr. 2015.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Leishmaniasis**: access to essential antileishmanial medicines and treatment. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/research/en/>>. Acessado em: 10 abr. 2015.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 146, p. 135–141, 2006.

PARSYAN, A. *et al.* mRNA helicases: the tacticians of translational control. **Nature Reviews - Molecular Cell Biology**, London, v. 12, n. 4, p. 235-245, 2011.

PEREIRA, M. M. C. **Identificação e caracterização de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em *Leishmania sp.*** Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

PEREIRA, M. M. C. *et al.* The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. **Molecular e Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 2, p. 82-86, 2013.

PESTOVA, T. V.; HELLEN, C.U.T. Translation, interrupted. **Nature structural & molecular biology**, New York, v. 13, n. 2, p. 98-99, 2006.

PREUßER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, Stuttgart, v. 302, n. 4-5, p. 221-224, 2012.

PREVOT, D.; DARLIX, J. L.; OHLMANN, T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. **Biology of the Cell**, Paris, v. 95, p. 141-156, 2003.

PYRONNET, S. *et al.* Human eukaryotic initiation translation factor 4G (eIF4G) recruits Mnk1 to phosphorylate eIF4E. **EMBO Journal**. Oxford, v. 1, p. 270–279, 1999.

RAMOS-E-SILVA, M.; JACQUES, C. M. C. Leishmaniasis and other Dermatozoonoses in Brazil. **Clinics in Dermatology**, Philadelphia, v. 20, p. 122–134, 2002.

REIS, C. R. S. **Identificação e mapeamento de domínios de ligação de homólogos do fator eIF4G de iniciação da tradução de *Leishmania major*.** 2009. Tese (Doutorado em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2009.

RHOADS, R. E. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 25, p. 16711-16715, 2009.

SHELTEMA, R. A *et al.* The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomic era. **Parasitology**. v. 137, n. 9, p. 1291-1302, 2010.

SCHEPER, G. C.; PROUD, C. G. Does phosphorylation of the cap-binding protein eIF4E play a role in translation initiation? **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, p. 5350-5359, 2002.

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

SONENBERG, N.; DEVER, T.E. Eucaryotic Translation Initiation Factors and Regulators. **Current Opinion In Structural Biology**, London, v. 13, p. 56-63, 2003.

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

STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, New York, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

SCHMIDT, G. D.; ROBERTS, L. S. **Foundations of Parasitology**. 8. ed. Iowa: Times Mirror High Education Group, 2009.

TOMOO, K. *et al.* Structural Features of Human Initiation Factor 4E, Studied by X-ray Crystal Analyses and Molecular Dynamics Simulations. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 328, p. 365–383, 2003.

TOPSIROVIC, I. *et al.* Cap and cap-binding proteins in the control of gene expression. **Wiley Interdisciplinary Reviews RNA**, Hoboken , v. 2, p. 277–298, 2011.

UEDA, T. *et al.* Mnk2 and Mnk1 are essential for constitutive and inducible phosphorylation of eukaryotic initiation fator 4E but not for cell growth or development. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, v. 24, n. 15, p. 6539-6549, 2004.

URBANIYAK, M. D.; MARTIN, D. M.; FERGUSON M.A. Global quantitative SILAC phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 12, n. 5, p. 2233-2244, 2013.

VALÁSEK, L. S. ‘Ribozoomin’ – Translational initiation from the perspective of the ribosome-bound eukaryotic initiation factors (eIFs). **Current Protein and Peptide Science**, Gainesville, v. 13, n. 4, p. 305-30, 2012.

WATSON, J. D.; *et al.* **Biologia Molecular do Gene**. 5 ed. San Francisco: Benjamin Cummings, 2006.

WILSON, R. **Female *Lutzomyia longipalpis* biting a human arm**. Disponível em: <http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html>. Acessado em: 10 abr. 2015.

WILSON, R. **Female *Phlebotomus papatasi* feeding on a human arm**. Disponível em: <http://www.raywilsonbirdphotography.co.uk/Galleries/Invertebrates/vectors/sand_fly.html>. Acessado em: 10 abr. 2015.

XAVIER, C. C. **Identificação e caracterização de interações entre proteínas do complexo de iniciação da tradução EIF4F e PABP em *Leishmania sp.*** 2015. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Recife, 2015.

YOFFE, Y.; ZUBEREK, J.; LEWDOROWICZ, M. Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. **RNA**, New York, v. 10, p. 1764–1775, 2004.

YOFFE, Y. *et al.* Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. **Eukaryotic cell**, Washington, v. 5. p. 1969–1979, 2006.

YOFFE, Y. *et al.* Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E–eIF4G interactions. **Nucleic Acids Research**, London, v. 37, p. 3243–3253, 2009.

ZINOVIEV, A. *et al.* A novel 4E interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. **Nucleic Acids Research**, London, v. 39, n. 19, p. 8404-8415, 2011.

ZINOVIEV, A.; MANOR, S.; SHAPIRA, M. Nutritional stress affects an atypical cap-binding protein in *Leishmania*. **RNA Biology**, New York, v. 9, n. 12, p. 1450-1460, 2012.

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. **Comparative and Functional Genomics**, New York, v.2012, p.1-10, 2012. Disponível em: <<http://www.hindawi.com/journals/ijg/2012/813718/>>. Acessado em: 18 abr. 2015.