

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

Amanda Louyze Soares

ANÁLISE DA FUNÇÃO DA RNA HELICASE EIF4AI NA BIOSÍNTESE
PROTEICA DE *Trypanosoma brucei*

Recife
2021

Amanda Louyze Soares

**ANÁLISE DA FUNÇÃO DA RNA HELICASE EIF4AI NA BIOSÍNTESE
PROTEICA DE *Trypanosoma brucei***

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadora: Dra. Danielle Maria Nascimento Moura

Recife

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- S676a Soares, Amanda Louyze.
Análise da função da RNA helicase EIF4AI na biossíntese proteica de *Trypanosoma brucei* / Amanda Louyze — Recife: [s.n.], 2021.
86 p. : il., graf. tab. ; 30 cm.
- Dissertação (Mestrado) — Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz.,
Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia.
1. Biossíntese de Proteínas. 2. Fator de Iniciação 4A em Eucariotos. 3. RNA Helicase. 4. Trypanosomatina. 5. *Trypanosoma brucei brucei* - enzymologia. 6. *Trypanosoma brucei brucei* - genética. 7. *Trypanosoma brucei brucei* - crescimento & desenvolvimento. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. II. Moura, Danielle Maria Nascimento. III. Título.

CDU 595.771

Amanda Louyze Soares

**ANÁLISE DA FUNÇÃO DA RNA HELICASE EIF4AI NA BIOSÍNTESE
PROTEICA DE *Trypanosoma brucei***

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção
do título de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 16/09/2021 (Dezesseis de Setembro de Dois mil e Vinte e um)

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Orientador)

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha (Titular – Interno)

Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Larissa Melo do Nascimento (Titular – Externo)

Universitat Heidelberg/ ZMBH

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por sempre guiar os meus passos, e pela oportunidade de concluir mais uma etapa grandiosa em minha vida.

A toda minha família pelo apoio dado ao longo desses anos. Em especial, para meus pais, Alberto e Silmária, que nunca mediram esforços para me proporcionar as melhores condições de estudo, sempre estiveram ao meu lado, me apoiando em todas as decisões da minha vida, e incentivando a nunca desistir dos meus sonhos.

Ao meu filho, que esteve forte comigo nos momentos mais decisivos para a concretização dessa fase.

A Matheus pela paciência, compreensão e por estar sempre ao meu lado me apoiando e dando forças.

A minha querida co-orientadora Dra. Danielle Moura que foi essencial em minha formação acadêmica, estando sempre presente, ajudando e passando todo seu conhecimento com muita sabedoria e paciência.

Ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, por todo incentivo e conhecimento dado, e pela confiança em mim depositada para assumir esse projeto.

A todo o grupo de pesquisa e aos colegas da Microbiologia pelo acolhimento, apoio, ensinamentos e momentos de descontração. Em especial para Guilherme B., Gabriella, Renata, Rafaella, Moezio e Hemilly.

Ao órgão de fomento FACEPE pelo apoio financeiro, ao Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ/PE) pelo suporte acadêmico, infraestrutura e equipamentos necessários para o desenvolvimento deste trabalho.

Por fim, meu muito obrigada a todos que contribuíram direta ou indiretamente para minha formação profissional.

“Seja forte e corajoso! Não se apavore nem
desanime, pois o Senhor, o seu Deus, estará
com você por onde você andar.”
- Josué 1:9

RESUMO

SOARES, Amanda Louyze. **Análise da função da RNA helicase EIF4AI na biossíntese proteica de *Trypanosoma brucei***. 2021. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

Pertencente ao complexo heterotrimérico eIF4F, a subunidade eIF4A é uma RNA helicase dependente de ATP, que tem a capacidade de remover estruturas secundárias da região 5'UTR dos mRNAs. Dois homólogos de eIF4A foram identificados em *Trypanosoma brucei*, EIF4AI e EIF4AIII, sendo o EIF4AI considerado o homólogo funcional na síntese proteica do fator de tradução eIF4A. Apesar do EIF4AI fazer parte de um complexo homólogo de eIF4F em *T. brucei*, observações mais recentes mostraram que os mRNAs associados a este complexo possuem regiões 5' UTR curtas, cujas estruturas secundárias talvez não necessitem da atuação de uma RNA helicase. Esse estudo teve por objetivo investigar com mais detalhes as propriedades do EIF4AI de *T. brucei*, buscando identificar possíveis diferenças funcionais em relação a outros eucariotos. Cinco regiões foram selecionadas para mutagênese sítio-dirigida as quais estão possivelmente relacionadas com a função de helicase, ATPase, e com interações com homólogos de eIF4G ou com o complexo eIF3 (subunidade eIF3i), contudo, ensaios complementares ainda precisam ser feitos para confirmar a real função relacionada a esses motivos. Linhagens transgênicas de *T. brucei* que expressão o EIF4AI, em sua forma nativa (WT) e mutante (DQAD), foram avaliadas através de ensaios de *western blot*, levando a detecção de isoformas únicas para cada proteína. Complexos co-precipitados *in vivo* foram identificados através de espectrometria de massas para ambas as proteínas. Os dados obtidos mostram que o EIF4AI nativo co-precipita com seus parceiros EIF4E4 e EIF4G3, como já descrito. Já o mutante DQAD demonstrou não co-precipitar com estes parceiros, mas sim com os EIF4E3 e EIF4G4, bem como com os complexos eIF3 e eIF2. Ensaios de ancoramento em um mRNA repórter, demonstrou que a proteína nativa levou a um aumento da expressão de GFP quando induzida, diferentemente do observado na proteína mutante. Foi observado que o crescimento celular de células procíclicas de *T. brucei* foi afetado quando se encontrava na presença de um inibidor de eIF4A (Rocaglamide A) e que este inibia o efeito do EIF4AI nativo no ensaio de ancoramento.

Palavras chave: biossíntese de proteínas; fator de iniciação 4F em Eucariotos; RNA helicases; Trypanosomatina.

ABSTRACT

SOARES, Amanda Louyze. **Analysis of the role of the RNA helicase EIF4AI in the *Trypanosoma brucei* protein biosynthesis.** 2021. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife.

Belonging to the eIF4F heterotrimeric complex, the eIF4A subunit is an ATP-dependent RNA helicase, which has the ability to remove secondary structures from the 5'UTR region of mRNAs. Two eIF4A homologues were identified in *Trypanosoma brucei*, EIF4AI and EIF4AIII, with EIF4AI being considered the functional homologue in the protein synthesis of the eIF4A translation factor. Although EIF4AI is part of a homologous complex of eIF4F in *T. brucei*, more recent observations have shown that the mRNAs associated with this complex have short 5' UTR regions, whose secondary structures may not require the action of an RNA helicase. This study aimed to investigate in more detail the properties of EIF4AI from *T. brucei*, seeking to identify possible functional differences in relation to other eukaryotes. Five regions were selected for site-directed mutagenesis which are possibly related to the function of helicase, ATPase, and to interactions with eIF4G homologs or with the eIF3 complex (eIF3i subunit), however, further assays still need to be done to confirm the real function related to these reasons. Transgenic strains of *T. brucei* that express EIF4AI, in its native (WT) and mutant (DQAD) forms, were evaluated by western blot assays, leading to the detection of unique isoforms for each protein. In vivo co-precipitated complexes were identified by mass spectrometry for both proteins. The data obtained show that native EIF4AI co-precipitates with its partners EIF4E4 and EIF4G3, as already described. The DQAD mutant did not co-precipitate with these partners, but with EIF4E3 and EIF4G4, as well as with the eIF3 and eIF2 complexes. Anchoring assays in a reporter mRNA showed that the native protein led to an increase in GFP expression when induced, differently from what was observed in the mutant protein. It was observed that cell growth of procyclic *T. brucei* cells was affected when in the presence of an eIF4A inhibitor (Rocaglamide A) and that this inhibited the effect of native EIF4AI in the docking assay.

Keywords: protein biosynthesis; initiation factor 4F in Eukaryotes; RNA helicases; Trypanosomatin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Principais classes de morfotipos dos tripanossomatídeos.	20
Figura 2 – <i>Trypanosoma brucei</i> em sua forma sanguínea e mosca Tsé-tsé.	20
Figura 3 – Mapa representativo da distribuição da doença do sono no território africano.	23
Figura 4 – Representação do ciclo biológico do <i>Trypanosoma brucei</i> .	25
Figura 5 – Formação dos mRNAs maduros nos tripanossomatídeos.	29
Figura 6 – Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos.	31
Figura 7 – Representação proteica e estrutural das superfamílias de RNAs helicases.	33
Figura 8 – Esquema representativo dos dois domínios RecA do eIF4A e seus motivos conservados.	34
Figura 9 – Desenho estrutural do fator de iniciação eucariótico eIF4A	35
Figura 10 – Etapas dos procedimentos metodológicos.	42
Quadro 1 - Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para a construção dos mutantes.	43
Quadro 2 – Lista de antibióticos e suas respectivas concentrações para a manutenção e seleção das células procíclicas de <i>T. brucei</i> .	45
Figura 11 – Esquema representativo do plasmídeo pD.	49
Figura 12 – Alinhamento das proteínas homólogas de eIF4AI com destaques para os motivos conservados.	52
Figura 13 – Esquema da construção dos genes mutantes pelo método de PCR.	54
Figura 14 – Amplificação dos fragmentos de mutagênese sítio-dirigida.	55
Figura 15 – Padrão de digestão do gene EIF4AI clonado no <i>pGEM-T Easy</i> com a enzima <i>EcoRI</i> .	56
Figura 16 – Padrão de digestão parcial com as enzimas <i>BamHI</i> e <i>HindIII</i> dos genes mutados clonados no vetor <i>pGEM-T Easy</i> , e confirmação da subclonagem do gene EIF4AI mutado no plasmídeo p2477.	57
Figura 17 – Esquema representativo do vetor p2477.	58
Figura 18 – Teste de expressão das linhagens transgênicas <i>TbEIF4AI_{WT}-HA</i> e <i>TbEIF4AI_{DQAD}-HA</i> .	59
Figura 19 – Obtenção dos lisados expressando o EIF4AI de <i>T. brucei</i> , em sua forma selvagem e mutante, e ensaio de imunoprecipitação desses genes	60

fusionados ao epítipo HA.

- Quadro 1** - Análise das proteínas identificadas por espectrometria de massas que co-precipitaram com o fator EIF4AI nativo de *T. brucei*. 61
- Quadro 2** - Análise das proteínas identificadas por espectrometria de massas que co-precipitaram com o fator EIF4AI contendo uma mutação em seu sítio de helicase de *T. brucei*. 63
- Quadro 3** - Análise das proteínas identificadas por espectrometria de massas que co-precipitaram com o fator EIF4AI contendo uma mutação em seu sítio de helicase, referente a proteína nativa de *T. brucei*. 65
- Figura 20** - Desenho experimental da curva de crescimento com inibidor RocA em placa de 48 poços. 67
- Figura 21** - Análise dos níveis de crescimento da linhagem selvagem 427 de *T. brucei* na presença de um inibidor de 4A. 68
- Figura 22** - Esquema representativo do mRNA repórter monocistrônico. 69
- Figura 23** - Teste de expressão das linhagens transgênicas TbEIF4AI_{WT}-TY e TbEIF4AI_{DQAD}-TY 70
- Figura 24** - Avaliação por citometria de fluxo das linhagens TbEIF4AI_{WT} e TbEIF4AI_{DQAD} em 24 e 48 horas após indução das proteínas de interesse. 71
- Figura 25** - Avaliação por citometria de fluxo das linhagens TbEIF4AI_{WT} e TbEIF4AI_{DQAD}, na presença do inibidor RocA, 48 horas após indução das proteínas de interesse. 72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAT - *African Animal Trypanosomiasis*

ADP – Adenosina difosfato

AUG – Códon de início da tradução

AMP - Ampicilina

ATP – Adenosina trifosfato

CMF – *Multi Factor Complex*

CN – Controle negativo

dATP - Desoxiadenosina trifosfato

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

dNTP's - Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNDi – *Drugs for Neglected Disease initiative*

DTNs – *Neglected Tropical Diseases*

DTT - Ditioneitol

eIFs – *Eukariotic Initiation Factors*

EJC – *Exon junction complex*

GFP – *Green fluorescent protein*

HA – Peptídeo YPYDVPDYA, correspondente aos aminoácidos 98-106 da hemaglutinina do vírus Influenza A

HAT – *Human African Trypanosomiasis*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

IP – Imunoprecipitação

IPTG - Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo

KDa – Kilodaltons

kDNA – DNA do cinetoplasto

KCL - Cloreto de potássio

KOH - Hidróxido de potássio

KH₂PO₄ - Fosfato de potássio monobásico

LB – Meio Luria Bertani

LD – Lisado depletado

Mb – Megabase

MgCl₂ – Cloreto de magnésio

mRNA – RNA mensageiro
m⁷GTP– *7-Methylguanosine triphosphate*
NaOH – Hidróxido de sódio
NaCl – Cloreto de sódio
Na₂HPO₄ - Fosfato de sodio dibasico anidro
Npep - Peptídeo lambda N
OMS – Organização mundial de saúde
PCR – *Polimerase Chain Reaction*
Pb – Pares de base
PIC - *Preinitiation Complex*
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
PVDF – *Polyvinylidene fluoride*
PGCs - *Polycistronic Gene Clusters*
PABP – *Poly-A Binding Protein*
RBPs – *RNA Binding Protein*
RNA – Ácido Ribonucleico
RNAi – RNA de interferência
RNApol – RNA polimerase
RNP – *Ribonucleoprotein complex*
RRMs – *RNA recognition motif*
RecA – Proteína Recombinase A
RocA – Rocaglamide A
SBMT – Sociedade Brasileira de Medicina Tropical
SDM – 79 – Meio de cultura de tripanossomas
SDS-PAGE – *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Eletrophoresis*
SF – Superfamília
SIF - fator de indução *Stumpy*
SL – *Spliced leader*
sRNA – Pequeno RNA
TBS – *Tris buffered saline*
Tbr – *Trypanosoma brucei rhodesiense*
Tbg – *Trypanosoma brucei gambiense*
Tbb – *Trypanosoma brucei brucei*

TC – *Complexo ternário*

TetR – Repressor tetraciclina

Tet – Tetraciclina

T7 RNAPol – T7 RNA Polimerase

tRNA – RNA transportador

TriTryps – Designação dada ao grupo de espécies *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*

UTR – *Untranslated region*

VSGs - *Variant surface glycoproteins*

WB – *Western-blot*

WT – *Wild type*

WHO – *World Health Organization*

X-GAL - 5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 Aspectos gerais dos tripanossomatídeos	19
2.2 <i>Trypanosoma brucei</i> e tripanossomíase africana humana (HAT)	20
2.2.1 Distribuição geográfica e evolução do tratamento	22
2.2.2 Ciclo biológico	24
2.2.3 <i>Trypanosoma brucei</i> como organismo modelo de estudo	25
2.3 Biologia molecular dos tripanossomatídeos	26
2.3.1 Organização genômica e transcrição policistrônica	27
2.3.2 Processamento de mRNAs	27
2.4 Síntese proteica em eucariotos e o complexo heteritrimérico EIF4F	29
2.4.1 Iniciação da tradução e complexo eIF4F	30
2.5 eIF4A: uma RNA helicase da família DEAD-box	32
2.5.1 Família DEAD-box	33
2.5.2 Fator EIF4A	35
2.5.3 EIF4A e seus parceiros funcionais na síntese proteica: eIF4G, eIF4B e eIF4H	36
2.5.4 Inibidor de eIF4A: Rocaglamide A (RocA)	37
2.6 Homólogos de eIF4A em tripanossomatídeos	37
3 JUSTIFICATIVA	40
4 OBJETIVOS	41
4.1 Objetivo geral	41
4.2 Objetivos específicos	41
5 MATERIAL E MÉTODOS	42
5.1 Obtenção dos genes mutantes do EIF4AI de <i>Trypanosoma brucei</i>	42

5.2 Clonagem, extração plasmidial e digestão enzimática dos genes mutados do EIF4AI de <i>Trypanosoma brucei</i>	43
5.3 Sequenciamento dos DNAs mutados	44
5.4 Cultivo de células procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i>	45
5.5 Transfecção das linhagens procíclicas	45
5.5.1 Obtenção do extrato proteico total de <i>Trypanosoma brucei</i>	47
5.6 Obtenção dos lisados celulares	46
5.7 Imunoprecipitação e Espectrometria de massas	47
5.7.1 Análise dos resultados de espectrometria de massas	48
5.8 Teste com inibidor de eIF4A (Rocaglamide A - RocA)	48
5.9 <i>Tethering</i>: Ensaio de ancoramento	48
5.9.1 Citometria de fluxo	49
5.9.2 Citometria de fluxo com inibidor RocA	49
5.10 <i>Western-blot</i>	50
6 RESULTADOS	51
6.1 Identificação de motivos importantes e mutagênese em alvos para melhor avaliar a função do EIF4AI em <i>Trypanosoma brucei</i>	51
6.1.1 Identificação e descrição das sequências para mutagênese	51
6.1.2 Amplificação das sequências de interesse	53
6.1.3 Clonagem em vetores de expressão	55
6.2 Identificação de proteínas que interagem com o fator EIF4AI de <i>Trypanosoma brucei</i>, contendo ou não mutação, em seu sítio de helicase	57
6.2.1 Teste de expressão das linhagens transgênicas	58
6.2.2 Obtenção dos lisados celulares e imunoprecipitação	59
6.2.3 Proteínas associadas ao homólogo EIF4AI de <i>Trypanosoma brucei</i>	60
6.2.4 Proteínas associadas ao mutante do homólogo EIF4AI de <i>Trypanosoma brucei</i>	62

6.3 Análise do perfil de crescimento de células procíclicas de <i>T. brucei</i> sob o efeito de um inibidor de eIF4A	66
6.4 Ensaio de ancoramento e análise de expressão por citometria de fluxo	68
7 DISCUSSÃO	73
8 CONCLUSÃO	78
REFERÊNCIAS	79

1 INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos são protozoários parasitas pertencentes à família Trypanosomatidae, a qual inclui os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*. Estes ganham destaque na saúde pública por serem agentes causadores de doenças infectoparasitárias que se encontram dentre as principais “Doenças Tropicais Negligenciadas” (DTNs). São elas, a doença de Chagas (Tripanosomíase Americana), a doença do sono (Tripanosomíase Africana) e as diversas formas de leishmaniose. Essas doenças afetam milhares de pessoas no mundo a cada ano, principalmente em regiões com baixo desenvolvimento econômico, causando um grande impacto não só na saúde pública e no desenvolvimento socioeconômico, mas também na qualidade de vida das pessoas afetadas.

Dados atualizados da *DNDi* (do inglês *Drugs for Neglected Disease initiative*) relatam que 65 milhões de pessoas encontram-se em risco de contrair doenças provocadas por tripanosomatídeos, e estima-se que 8,5 milhões dessas localizam-se em áreas de risco classificadas como moderado a muito alto (DNDi, 2019). Contudo, ainda não existem vacinas eficazes e os tratamentos atuais são prolongados e, em sua maioria, tóxicos para os pacientes, sendo ainda relatada a existência de resistência aos quimioterápicos primários usados na terapêutica, em alguns casos. Devido a isto, faz-se necessário um maior estudo sobre os processos biológicos que ocorrem nos seus agentes etiológicos, a fim de se entender melhor sua biologia e identificar alvos em potencial que possam ser explorados no desenvolvimento de novos fármacos.

Os tripanosomatídeos apresentam ciclos de vida complexos, e características celulares e genéticas únicas que incluem formas morfológicas distintas, divisão celular, transporte de proteínas, formação dos mRNAs maduros e a quase total ausência dos promotores clássicos da RNA polimerase II. Devido a esta última característica, o controle da sua expressão gênica acontece basicamente no nível pós-transcricional, pelo controle da estabilidade e/ou da tradução dos mRNAs e modificações pós-traducionais, tornando-os pontos cruciais para o desenvolvimento adequado e manutenção da viabilidade dos parasitas.

Nos eucariotos em geral, a tradução pode ser dividida em quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. A iniciação é considerada uma etapa essencial por ser o principal alvo dos mecanismos regulatórios, sendo nesta etapa em que os fatores de iniciação da tradução (*eIFs* – *eukaryotic initiation factors*) atuam. Dentre estes, destaca-se o complexo heterotrimérico eIF4F, um dos principais mediadores do início da tradução, que tem como papel principal reconhecer a extremidade 5' do mRNA e mediar a

associação da mesma com a subunidade 40S ribossomal e os outros fatores. O complexo eIF4F é composto por três subunidades denominadas eIF4E, eIF4A e eIF4G. Neste contexto, a subunidade eIF4A é uma RNA helicase com ação na porção 5' não traduzível (5'UTR) do mRNA, desfazendo as estruturas secundárias presentes, a fim de facilitar o recrutamento do aparato de tradução e reconhecimento do códon AUG de início da tradução.

Existem três homólogos do eIF4A em mamíferos, eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII, onde o eIF4AI e o eIF4AII são funcionalmente ativos durante o processo de tradução, enquanto o eIF4AIII apresenta uma atividade diferenciada, participando no *splicing* do mRNA, no núcleo. Em tripanossomatídeos, dois homólogos do eIF4A foram descritos, sendo similares em tamanho e propriedades, mas com algumas características diferentes. O primeiro homólogo, denominado EIF4AI, apresentou-se mais abundante, localização citoplasmática e com características mais condizentes com a participação na tradução dos mRNAs e por isto foi considerado o homólogo funcional do eIF4A como fator de iniciação da tradução. Já o segundo homólogo demonstrou ser pouco expresso e exclusivamente nuclear e por essas características foi considerado mais similar ao eIF4AIII, sendo denominado EIF4AIII.

Observações mais recentes da equipe ligada a este trabalho mostraram uma associação preferencial do EIF4AI de *T. brucei* nas subunidades EIF4E4 e EIF4G3. Este mesmo complexo, entretanto, se liga a mRNAs que possuem regiões 5' UTR curtas e que provavelmente não geram estruturas secundárias complexas. Questionou-se então se o homólogo EIF4AI de tripanosomatídeos com sua função de RNA helicase, atuaria sobre essas regiões 5'UTRs curtas da mesma forma que o eIF4A atua nos demais eucariotos, cujo alvo são mRNAs com 5'UTRs maiores e mais estruturadas, ou se haveria uma ação diferenciada do EIF4AI na tradução dos tripanosomatídeos. Para estudar o papel dessa proteína na tradução, este projeto visou então analisar a expressão do EIF4AI de *T. brucei* nativo e com uma mutação no sítio de helicase, identificado em estudos anteriores. Foram realizados ensaio de interação *in vivo* para identificação de possíveis parceiros por meio das técnicas de imunoprecipitação e espectrometria de massas. Também foi avaliado o efeito de um inibidor de eIF4A sob o crescimento celular de *T. brucei* e a ação do EIF4AI nativo e mutante, na tradução de um mRNA-repórter por meio de ensaios de ancoramento. Novos mutantes foram ainda gerados para uma continuidade da caracterização da função do EIF4AI na tradução desse patógeno.

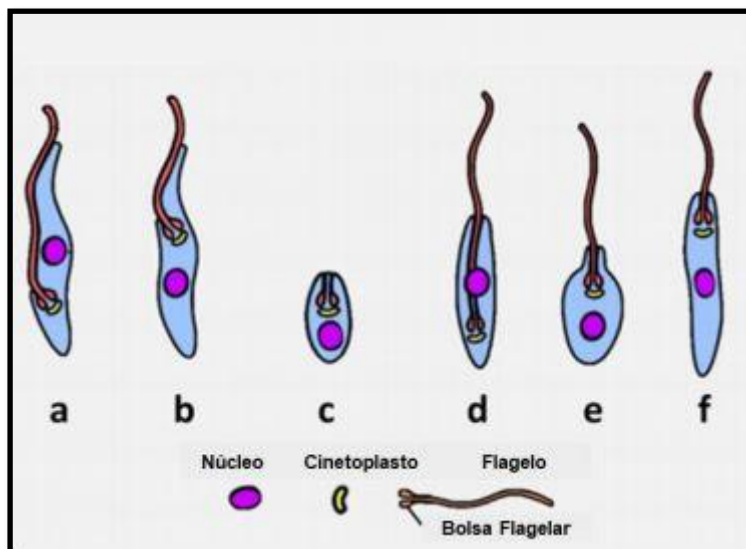
2 REFERENCIAL TEÓRICO

Pertencentes à classe Kinetoplastida, os tripanossomatídeos são protozoários flagelados que possuem como característica principal a presença de uma estrutura composta por moléculas circulares de DNA (kDNA), denominada de cinetoplasto (MARANDE et al., 2005). Seus membros incluem protistas de vida livre e parasitas, incluindo patógenos animais e humanos, como por exemplo, *Trypanosoma* e *Leishmania* que ocasionam danos gravíssimos a saúde e economia das mais pobres e desfavorecidas regiões tropicais e subtropicais do planeta. (LOPES et al., 2010; SIMPSON et al., 2006; TIKHONENKOV et al., 2021).

2.1 Aspectos gerais dos tripanossomatídeos

Os tripanossomatídeos possuem nove gêneros (*Leishmania*, *Trypanosoma*, *Endotrypanum*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Crithidia*, *Blastocrithidia*, *Wallaceina*, e *Phytomonas*) classificados principalmente quanto as suas características morfológicas, filogenéticas e especificidade do hospedeiro (LOPES et al., 2010; LUKES et al., 2014). Neste último caso, os parasitas podem ser divididos em monoxenos, aqueles que desenvolvem todo o seu ciclo de vida em um único hospedeiro, ou heteroxenos, quando o seu desenvolvimento ocorre em hospedeiros diferentes, por exemplo, alternando entre vertebrado e invertebrado (SIMPSON et al., 2006). Alguns gêneros da família Trypanosomatidae são exclusivamente de protozoários heteroxenos, por exemplo os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* que ganham destaque por serem agentes patogênicos de doenças humanas, como a doença do sono (*Trypanosoma brucei*), a doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*) e as diversas formas de leishmaniose (*Leishmania sp.*) (BUSCHER et al., 2017; KAUFER et al., 2017).

Os gêneros de tripanossomatídeos possuem ampla distribuição geográfica e compartilham características comuns entre si quanto a sua biologia celular e molecular, como por exemplo, a presença de um único flagelo que, dependendo da morfologia que o protozoário assume, pode ou não se exteriorizar. O tamanho e posição do flagelo, forma do corpo celular e a distância entre o cinetoplasto e o núcleo também exercem influência sobre a morfologia desses organismos (KAUFER et al., 2017; STUART et al., 2008). Diferentes processos biológicos e alterações morfológicas sofridas, durante o ciclo de vida desses organismos, decorrente do ambiente, formas de cultivo e adição de drogas, podem culminar na geração de diferentes morfotipos celulares. São eles: amastigota, tripomastigota, epimastigota, promastigota, coanomastigota e opimastigota (Figura 1) (LOPES et al., 2010; KAUFER et al., 2017).

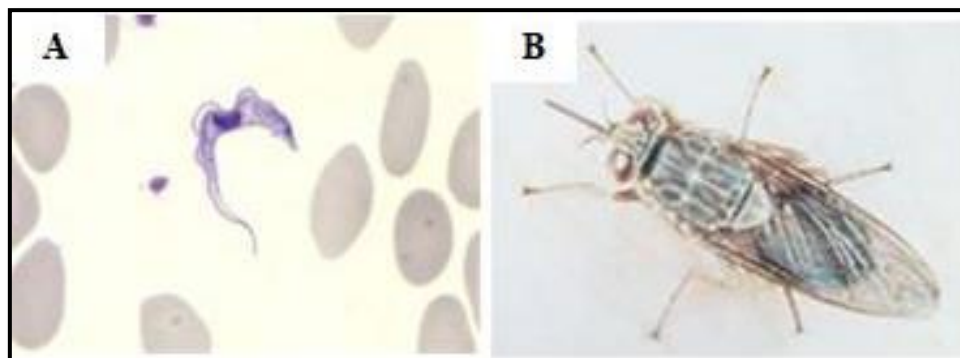
Figura 1- Principais classes de morfotipos dos tripanossomatídeos.

Fonte: Modificado de Kaufer (2017).

Legenda: a. tripomastigota, b. epimastigota, c. amastigota, d. opimastigota, e. coanomastigota, f. promastigota.

2.2 *Trypanosoma brucei* e tripanossomíase africana humana (HAT)

A tripanossomíase africana humana (HAT) (*Human African Trypanosomiasis*), também conhecida como doença do sono, é uma infecção parasitária que está presente em 36 países da África Subsaariana e encontra-se dentre as principais “Doenças Tropicais Negligenciadas”. Esta doença é provocada por protozoários da espécie *Trypanosoma brucei* (Figura 2A), a qual é transmitida aos seres humanos ou animais através do repasto sanguíneo do inseto vetor infectado, díptero do gênero *Glossina spp.*, popularmente conhecida como tsé-tsé (Figura 2B) (KENNEDY, 2019; CECCHI *et al.*, 2015; LEJON *et al.*, 2013).

Figura 2 - *Trypanosoma brucei* em sua forma sanguínea e mosca Tsé-tsé.

Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention (2019).

Legenda: Parasita *Trypanosoma brucei* em sua forma sanguínea corado com Giemsa (A) e inseto vetor da HAT

mosca Tsé-tsé (gênero *Glossina spp.*) (B).

A espécie *T. brucei* encontra-se subdividida em três subespécies: *Trypanosoma brucei brucei* (*Tbb*), *Trypanosoma brucei gambiense* (*Tbg*) e *Trypanosoma brucei rhodesiense* (*Tbr*), e tem como base de classificação o tipo de doença que provocam, a distribuição geográfica e a especificidade do hospedeiro, uma vez que são morfologicamente indistinguíveis (ECHODU *et al.*, 2015). Apenas duas subespécies são responsáveis por transmitir essa doença aos seres humanos: o *T. brucei gambiense* (*Tbg*), encontrado em 24 países da África Ocidental, e atualmente responsável por 98% dos casos relatados da doença em sua forma crônica; e o *T. brucei rhodesiense* (*Tbr*), responsável pela forma mais aguda e severa, em 13 países da África Oriental, representando menos de 2% dos casos notificados. Estas duas variáveis da HAT podem durar semanas ou até meses (KENNEDY, 2019; SIMARRO, 2012; WHO, 2020).

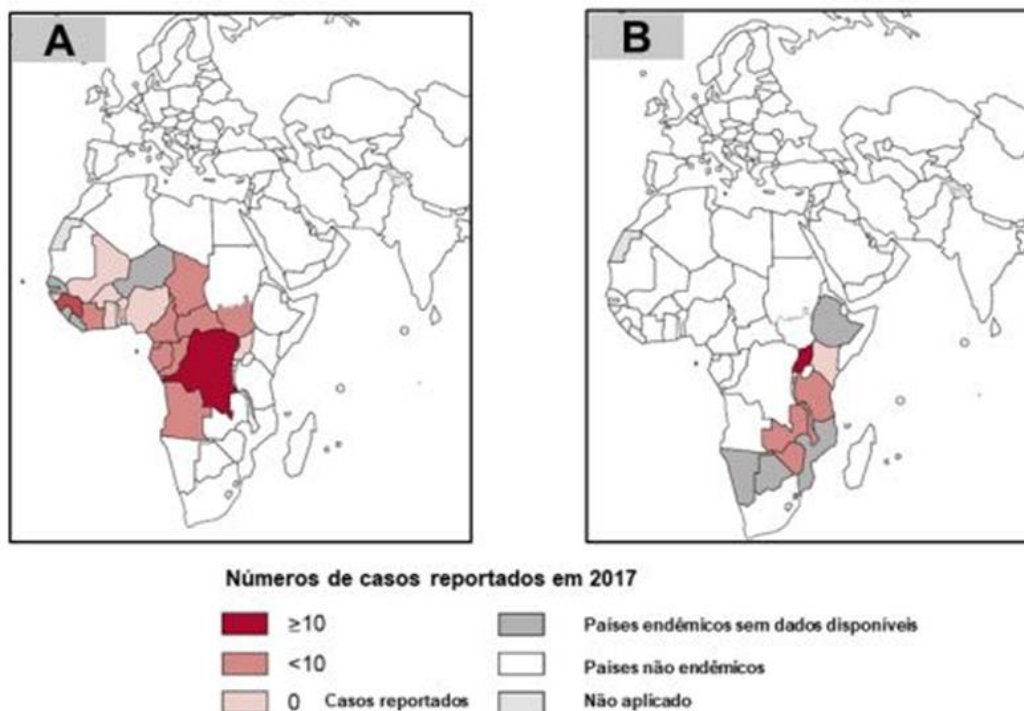
O *T. brucei brucei* (*Tbb*) não infecta humano, devido a presença de complexos de lipoproteínas presentes no soro que contêm a proteína tripanolítica formadora de poros, Apolipoproteína L1 (APOL1) que faz com que os humanos apresentem resistência a essa subespécie (COOPER *et al.*, 2016). Estando relacionada à infecção de animais selvagens e domésticos, causando a AAT (*African Animal Trypanosomiasis*), assim como outras espécies relacionadas: *Trypanosoma congolense*, *T. vivax*, *T. evansi*. Estas últimas são agentes etiológicos da tripanossomíase animal africana (*Animal African Trypanosomiasis - AAT*) ou “*Nagana*” no gado, que limita a produção e causa grandes impactos econômicos (AKSOY *et al.*, 2017; BARRETT *et al.*, 2003).

Em suas duas formas (aguda e crônica), a HAT pode apresentar dois estágios (KENNEDY, 2019). O primeiro é a fase hemolinfática, onde os parasitas se multiplicam no sistema linfático e na corrente sanguínea, e é caracterizada por não possuir sintomas clínicos específicos, variando entre os indivíduos. É comum nesse estágio o aparecimento de sintomas como: dor de cabeça, febre intermitente, problemas dermatológicos, prurido com várias erupções cutâneas, conhecidas como “*trypanides*”, linfadenopatias, astenia, anemia, distúrbios cardíacos, distúrbios endócrinos, dores musculoesqueléticas e hepatoesplenomegalia. Após um período variável, que é muito menor na HAT aguda do que na crônica, há o início do segundo estágio, quando os parasitas ultrapassam a barreira hemato-encefálica e atingem o sistema nervoso central (fase meningoencefálica). Este é acompanhado por danos neurológicos progressivos, distúrbios sensoriais, motores e psiquiátricos, incluindo distúrbios do sono (padrão de sonolência diurna e insônia noturna), desmielinização e atrofia do sistema nervoso central, distúrbios de consciência, além de demência e convulsões. Quando não tratados, pacientes com HAT progridem gradualmente para o coma, insuficiência grave dos órgãos,

colapso fisiológico e, eventualmente, morte (CNOPS *et al.*, 2015; FRANCO *et al.*, 2014; KENNEDY, 2013).

2.2.1 Distribuição geográfica e evolução do tratamento

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), no último século houveram várias epidemias de HAT no território da Africano. Uma entre 1896 - 1906, afetando principalmente a Uganda e o Congo (WHO, 2020). Outra em 1920, acometendo diversos países africanos, sendo controlada graças à realização de triagem de milhões de pessoas em risco, e então, em meadas década de 60 a doença estava sob controle, com menos de 5.000 casos relatados em todo o continente africano. Após essa fase de controle, a vigilância não manteve os cuidados e a doença ressurgiu em proporções epidêmicas em diversas regiões na década de 70, perdurando até o final dos anos 90 (WHO, 2020). Em várias aldeias da Angola, República Democrática do Congo e Sudão do Sul, durante a última epidemia, a prevalência chegou a atingir 50%, fazendo com que a doença do sono fosse à primeira ou a segunda maior causa de mortalidade nessas comunidades, mesmo à frente do HIV / AIDS nesta época (WHO, 2020). Após inúmeras medidas de controle, em 2009 o número de casos relatados caiu abaixo de 10.000 (9.878) pela primeira vez em 50 anos, continuando com 997 novos casos relatados em 2018, sendo este resultado o mais baixo desde o início da coleta sistemática de dados globais há 80 anos (WHO, 2020). A figura 3 demonstra a distribuição da HAT com suas respectivas áreas envolvidas.

Figura 3 – Mapa representativo da distribuição da doença do sono no território africano.

Fonte: Adaptado de World Health Organization (2018).

Legenda: (A) Distribuição da doença do sono causada pelo *T. b. gambiense* (*Tbg*). (B) Distribuição da doença ocasionada pelo *T.b. rhodesiense* (*Tbr*).

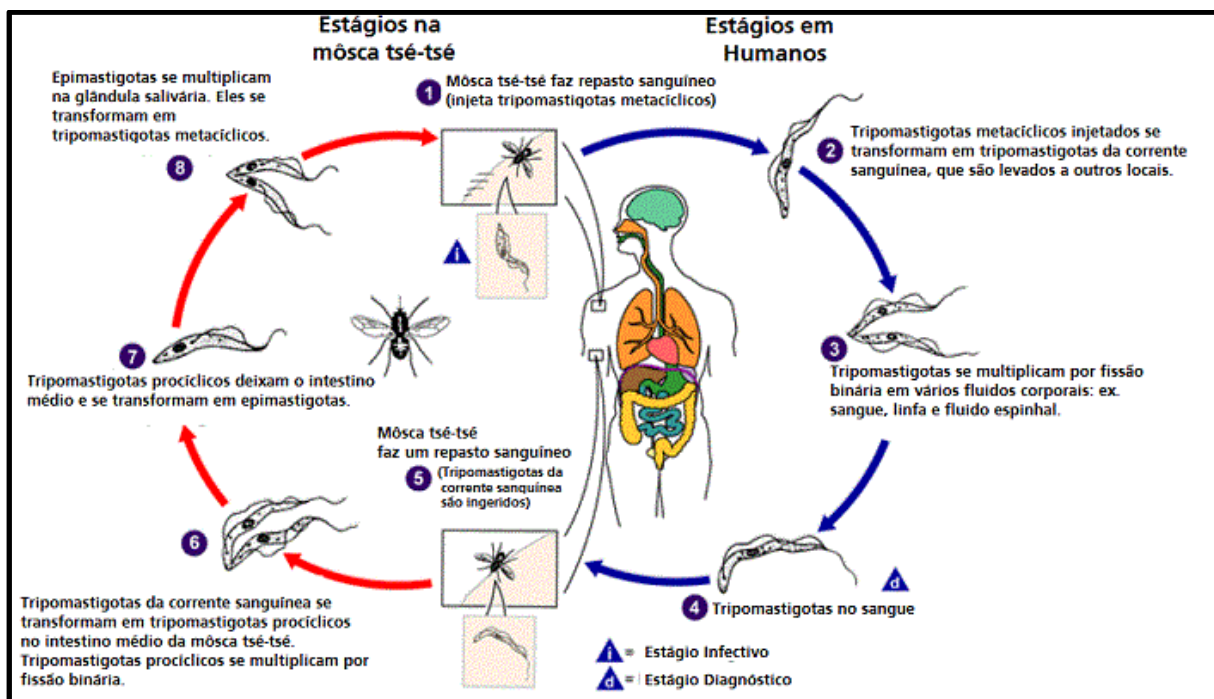
Atualmente, a incidência da HAT difere não só entre os países, mas também em diferentes partes de um único país. Em 2018, Angola, República Centro-Africana, Chade, Congo, Gabão, Guiné, Malawi e Sudão do Sul apresentaram entre 10 e 100 novos casos. Na mesma época, Camarões, Costa do Marfim, Guiné Equatorial, Quênia, Uganda, República Unida da Tanzânia, Zâmbia e Zimbábue declararam entre 1 e 10 novos casos. Já países como Burkina Faso, Gana e Nigéria relataram casos esporádicos nos últimos 10 anos. Contudo, a República Democrática do Congo nos últimos 10 anos, apresentou maior incidência com mais de 70% dos casos relatados (WHO, 2020). Países como Benin, Botsuana, Burundi, Etiópia, Gâmbia, Guiné Bissau, Libéria, Mali, Moçambique, Namíbia, Níger, Ruanda, Senegal, Serra Leoa, Suazilândia e Togo não registraram novos casos há mais de uma década (WHO, 2020), indicando que a transmissão da doença parece ter sido controlada ao menos em alguns desses países. Entretanto existem áreas de difícil avaliação devido a circunstâncias sociais instáveis e / ou a difícil acessibilidade, dificultando as atividades de vigilância e diagnóstico.

O maior obstáculo para a erradicação da HAT é o tratamento, pois ainda não há vacina eficaz contra as subespécies patogênicas do *T.brucei*. A dificuldade de criação de vacinas se dá por conta de constantes mudanças das glicoproteínas variantes de superfícies (*VSGs- do inglês variant glycoproteins*) presentes no exterior deste parasita, que permitem que evite as principais

defesas imunológicas do hospedeiro (MUGNIER *et al.*, 2016; WORTHEN *et al.*, 2010). Por isso, as únicas medidas anti-tripanosomíase disponíveis até o momento são as quimioterápicas, usando drogas com potencial limitado e que podem causar reações adversas graves. Quatro drogas encontram-se disponíveis para o tratamento a depender do estágio da doença e do patógeno causador: pentamidina, suramina, melarsoprol e eflornitina. Já a fexinidazol, é eficaz tanto no primeiro quanto no segundo estágio da doença (BABOKHOV *et al.*, 2013; SBMT, 2018; SIMARRO *et al.*, 2010).

2.2.2 Ciclo biológico

O *T. brucei* possui um ciclo de vida heteroxeno, alternando entre um hospedeiro vertebrado e um invertebrado, onde o parasita passa por diversas modificações que facilitam sua sobrevivência em cada fase do seu ciclo (MATTHEWS, 2005). No hospedeiro vertebrado, a infecção tem início quando as formas tripomastigotas metacíclicas são inoculadas pelo repasto (picada) da mosca tsé-tsé (*Glossina spp.*) infectada. Ao chegar na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, os parasitas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas, com formas alongadas e proliferativas (*slender forms*), que se multiplicarão na corrente sanguínea e estabelecerão a infecção, sendo responsáveis pelo aumento da parasitemia. Com o aumento do número de parasitas no sangue, ocorre outro processo de diferenciação pelo fator de indução *Stumpy* (*SIF*), que promove a geração de uma forma sanguínea não proliferativa, e morfológicamente mais curta e espessa (*stumpy forms*). Após um novo repasto sanguíneo, essas células são ingeridas pelas moscas tsé-tsé e migram para o intestino do inseto, onde se transformam em formas tripomastigotas procíclicas (BUSCHER *et al.*, 2017; FENN e MATTHEWS, 2007; KENNEDY, 2004; PFISTER *et al.*, 2006). Estes irão migrar para o proventrículo do inseto, onde ocorrerá uma divisão celular assimétrica, que originarão as formas epimastigotas longas e curtas, capazes de migrar para as glândulas salivares, onde se ligam a células epiteliais e se transformam em epimastigotas proliferativas. Essas células epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, e são liberadas para o lúmen da glândula salivar, em preparação para a inoculação em um novo hospedeiro mamífero (Figura 4) (FRANCO *et al.*, 2014).

Figura 4 – Representação do ciclo biológico de *Trypanosoma brucei*.

Fonte: Adaptado de *Centers of Disease Control and Prevention* (2019).

Legenda: Após o repasto sanguíneo, a mosca tsé-tsé injeta tripomastigotas metacíclicos na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado (1). No hospedeiro, esses parasitas se transformam em tripomastigotas sanguíneos e migram para outros locais do corpo e atingem outros fluidos corporais (por exemplo, linfa, fluido espinhal) (2) e continuam a se multiplicar por fissão binária (3). Em um novo repasto, as moscas tsé-tsé se infectam com as formas tripomastigotas sanguíneas (4/5). No intestino médio do inseto vetor, os parasitas se transformam em tripomastigotas procíclicos (6). E quando deixam o intestino médio, estas se transformam em epimastigotas (7) e migram para as glândulas salivares, ficando até o novo repasto (8).

2.2.3 *Trypanosoma brucei* como organismo modelo de estudo

Além de ser reconhecido por causar enfermidade de grande impacto na saúde pública, o *T. brucei* ganha destaque por ser um excelente modelo experimental para a família Trypanosomatidae, que por sua vez se destaca devido a muitos aspectos relacionados a sua biologia molecular e celular que distinguem estes protozoários de outros eucariotos (BARRET *et al.*, 2003). Uma das principais peculiaridades presentes no *T. brucei*, são as glicoproteínas variantes de superfície (VSG - *variant surface glycoprotein*). Estas proteínas permitem que o parasita evite a imunidade adaptativa do hospedeiro por meio da variação antigênica, que de outra forma teria a capacidade de destruí-lo (MUGNIER *et al.*, 2016; POON *et al.*, 2012). Além disso, durante o seu ciclo de vida, tanto em sua forma procíclica quanto em sua forma sanguínea, o *T. brucei* passa por processos de diferenciação, havendo remodelamento celular acompanhado por mudanças morfológicas, como o posicionamento de organelas, que mudam durante a

transição entre os estágios específicos. É possível assim uma melhor caracterização dos seus mecanismos de diferenciação celular e o estabelecimento de métodos para realizar essa diferenciação em cultura (FENN E MATTHEWS, 2007; GADELHA *et al.*, 2011; MATTHEWS, 2005).

Um ponto de destaque para o *T. brucei*, e que permite o seu uso como organismo modelo para os tripanosomatídeos, é a disponibilidade de linhagens transgênicas que expressam o repressor tetraciclina (TetR), facilitando a expressão regulada dos transgenes, assim como, linhagens que expressam tanto o TetR quando a T7 RNA polimerase (T7 RNAPol), proporcionando a transcrição e expressão desses transgenes em níveis elevados (WIRTZ *et al.*, 1999; POON *et al.* 2012). A utilização da maquinaria de interferência de RNA (RNAi), que encontra-se presente nesse organismo, também é uma ferramenta importante para o estudo da função gênica, bem como as ferramentas de análises de genética reversa, que possibilitaram a expressão de genes que codificam proteínas modificadas contendo diversos tipos de marcadores (*tags*) (KELLY *et al.*, 2007; SUBRAMANIAM *et al.*, 2006). Juntamente a estes, ensaios com genes repórteres também são bastante utilizados para o estudo da expressão gênica, pois podem ser facilmente identificados e quantificados (ALLARD E KOPISH, 2008).

2.3 Biologia molecular dos tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos possuem algumas peculiaridades referentes a seus aspectos moleculares devido ao fato desses organismos pertencerem a um grupo de protistas que divergiram muito cedo na linhagem evolutiva eucariótica. Essa evolução culminou no desenvolvimento de uma ampla gama de características celulares e moleculares, havendo um destaque quanto a sua organização genômica e mecanismos de expressão gênica (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Dentre essas características, podem ser citadas: os genes codificadores de proteínas, organizados em longos agrupamentos unidirecionais; o *trans-splicing*, o processamento diferenciado dos mRNAs citoplasmáticos; e a ausência de promotores clássicos para a RNA polimerase II. Essas divergências acarretam em uma complexa regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos, que dependem quase que exclusivamente de mecanismos pós-transcricionais, em que o controle da iniciação da tradução dos mRNAs em proteínas possivelmente apresenta um papel essencial (CLAYTON, 2019; KRAMER *et al.*, 2013).

2.3.1 Organização genômica e transcrição policistrônica

Após o genoma de *T. brucei* ser sequenciado foi possível observar que esta espécie possui um genoma com 26 Mb e 11 cromossomos, com cerca de 8.100 genes codificantes de proteína. Compartilha com outros tripanosomatídeos 6.158 ortólogos de genes codificantes e diversos domínios funcionais de proteínas, estando a maior parte desses genes localizados em largos blocos sintênicos (EL SAYED *et al.*, 2005).

Uma análise comparativa do genoma dos “TriTryps”, *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania major*, revelou que esses protozoários apresentam proteomas com elevado grau de conservação, mesmo com grande distância de filogenia. Também apresentam elevada sintonia gênica, o que significa que os blocos gênicos se encontram em uma mesma organização genômica entre os organismos distintos. Estes blocos estão organizados em grupamentos gênicos policistrônicos (PGCs - *Polycistronic Gene Clusters*), onde todos os genes codificadores de proteínas são arranjados em sequência, na mesma fita de DNA, e separados por uma ou mais regiões intergenicas, ricas em pirimidinas e que em sua maioria não apresentam íntrons (EL SAYED *et al.*, 2005; KISSINGER, 2006; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

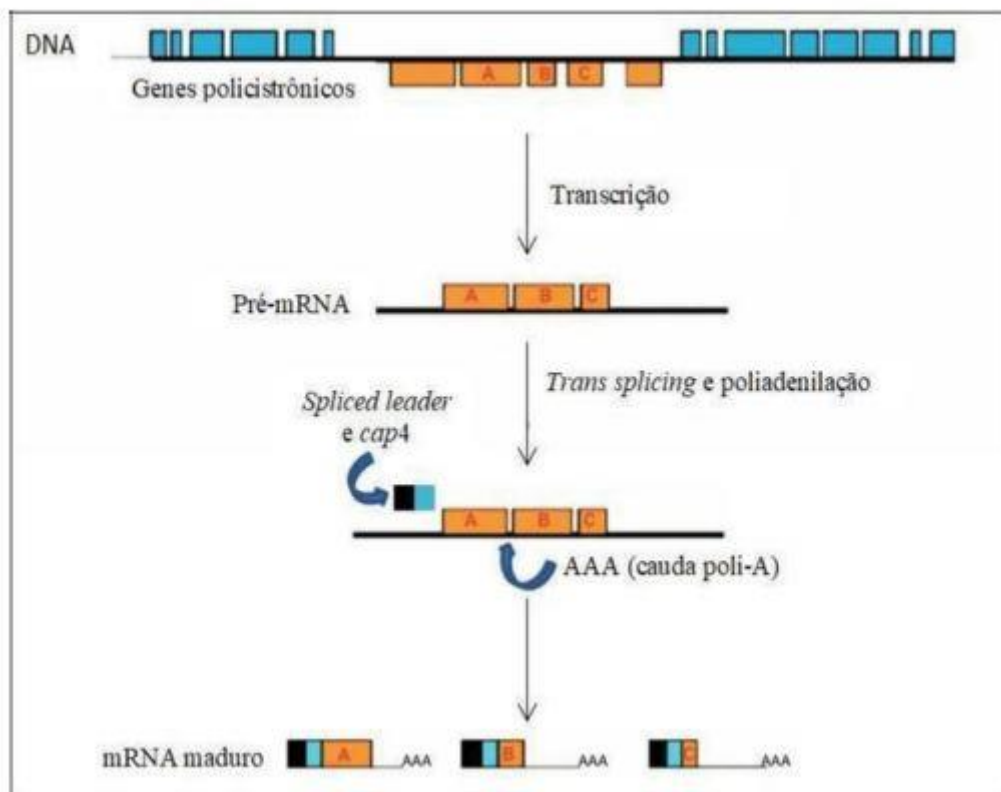
A transcrição dos RNAs nos tripanosomatídeos é policistrônica, ou seja, todos os genes que fazem parte de um PGC são transcritos em níveis equivalentes. Essa particularidade é devida a escassez de promotores clássicos para RNA polimerase II (RNA pol II), responsáveis por fazer com que essa regulação não ocorra no nível da iniciação da transcrição (BAYELE, 2009). Apenas agrupamentos de genes de rRNA, glicoproteínas variantes de superfície (VSGs) e as prociclinas são reguladas no nível transcricional, com seus genes são transcritos pela RNA pol I (DE GAUDENZI *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2008). Apesar disso, os mRNAs maduros de genes adjacentes podem se apresentar em diferentes concentrações, bem como as proteínas codificadas por eles. Isso ocorre devido a expressão gênica nos tripanosomatídeos ser regulada quase que exclusivamente no nível pós-transcricional, no controle do processamento, estabilidade e/ou tradução dos mRNAs, atuando sobre esses mRNAs e respectivas proteínas (HAILE E PAPADOPOULOU, 2007; IVENS *et al.*, 2005; SIMPSON *et al.*, 2006).

2.3.2 Processamento de mRNAs

Após a transcrição gênica, ocorre a maturação dos mRNAs eucarióticos pelo processamento denominado *cis-splicing*, indispensável para a retirada dos *introns* e união dos *exons* no mRNA maduro. Nos tripanosomatídeos, quase não há a presença de *introns*, mas os

mRNAs precursores policistrônicos (pré-mRNAs) são processados em mRNAs monocistrônicos por reações de clivagem acopladas através do processo de *trans-splicing*. Em uma primeira reação há a formação da extremidade 5' do mRNA final, e um *mini-exon* transcrito independentemente contendo uma sequência de 39 nucleotídeos, denominada *Spliced Leader (SL)*, que ocorre no mRNAs de todos os tripanosomatídeos. Esta é uma reação com duas etapas de trans-esterificação, quando um sítio GU doador no RNA precursor com a *SL* se funde a uma região próxima ao sítio AG receptor do mRNA policistrônico, chamado de ponto de ramificação. A segunda clivagem ocorre na extremidade 3' do mRNA, que consiste na poliadenilação, pela adição de uma sequência de adeninas com cerca de 100 a 300 nucleotídeos a montante do sinal de *trans-splicing* subsequente (Figura 5) (CLAYTON E SHAPIRA, 2007; DE GAUDENZI *et al.*, 2011; GÜNZL, 2010; KRAMER E CARRINGTON, 2011; LIANG *et al.*, 2003).

Nos eucariotos, a maioria dos mRNAs apresentam em sua extremidade 5' uma estrutura denominada de *cap* (7-metil-GTP), responsável pelo eficiente reconhecimento do mRNA pela maquinaria da tradução. Alguns estudos relatam a sua importância ainda no recrutamento de proteínas celulares para o mRNA e participação de outras funções além da síntese proteica, como por exemplo, o processamento do pré-mRNA e exportação nuclear (AITKEN E LORSCH, 2012; RAMANATHAN *et al.*, 2016).). Nos tripanosomatídeos, a adição da sequência *SL* que ocorre nos mRNAs tem por finalidade posicionar o *cap* na extremidade 5' dos mRNAs. Essa estrutura, além de possivelmente possuir um papel relevante no controle da tradução, deve então ajudar a proteger os mRNAs da degradação e possibilitar o seu transporte do núcleo para o citoplasma, com um papel fundamental na montagem do complexo de iniciação da tradução (FREIRE *et al.*, 2017).

Figura 5 – Formação dos mRNAs maduros nos tripanossomatídeos

Fonte Modificado de Silva e Cano (2017).

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

2.4 Síntese proteica em eucariotos e o complexo heterotimérico eIF4F

A síntese proteica ou tradução é um processo complexo e altamente conservado entre os seres vivos onde a informação genética advinda da transcrição do DNA é traduzida em proteínas, e por isso, possui um importante papel no controle da expressão gênica. Para acontecer, faz-se necessário uma complexa maquinaria, composta de mRNA, ribossomos, tRNAs (RNA transportador) e fatores de tradução (MARINTCHEV E WAGNER, 2004).

A tradução pode ser dividida em quatro etapas distintas denominadas de iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos, onde a iniciação da tradução é a etapa de maior complexidade, mais divergente entre os organismos e mais sujeita à regulação. Apesar desse processo também ser regulado nas etapas de alongamento e terminação, é principalmente na iniciação da tradução que a regulação acontece. É nessa fase que ocorre o recrutamento das subunidades ribossomais para o mRNA e a montagem do ribossomo, além da identificação do

códon AUG de iniciação da tradução (JACKSON *et al.* 2010; SONENBERG E HINNEBUSCH, 2009; ZINOVIEV E SHAPIRA, 2012). Para que a iniciação da tradução ocorra nos eucariotos, faz-se necessário a participação de vários fatores de iniciação da tradução (*eIFs* – *eukaryotic initiation factors*) que irão auxiliar no recrutamento das subunidades ribossomais e no posicionamento correto dos ribossomos no códon AUG para dar início a síntese proteica (ALI *et al.*, 2017; JACKSON *et al.*, 2010).

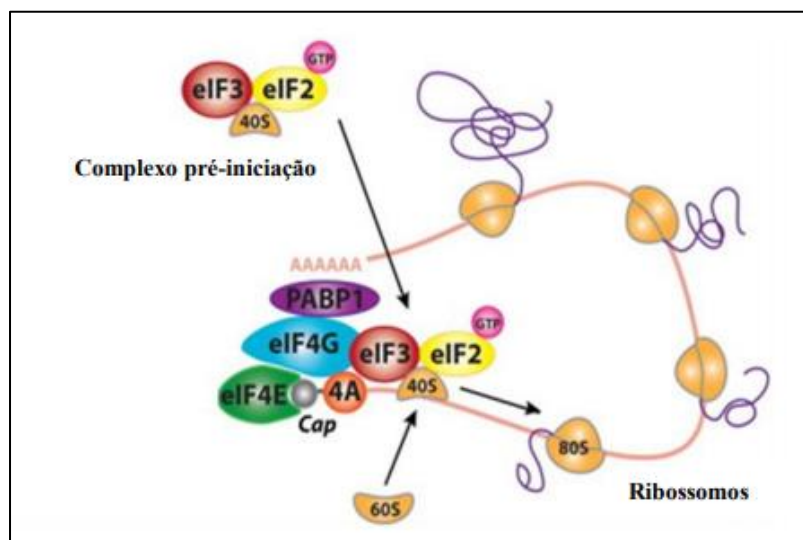
Após a iniciação, a fase de alongamento se inicia, sendo caracterizada pelo deslocamento do ribossomo ao longo do mRNA, juntamente com a adição de aminoácidos a cadeia polipeptídica nascente. Os aminoácidos que são acrescidos na cadeia polipeptídica são trazidos para dentro do ribossomo pelos tRNAs, que através dos seus anticódons reconhecem por pareamento de bases os códons dos mRNAs, a medida que o ribossomo vai se deslocando sobre o mesmo. A etapa de terminação ocorre quando o ribossomo encontra um códon de parada, liberando a proteína. E por fim, ocorre a reciclagem dos ribossomos, que é caracterizada pela dissociação de suas subunidades funcionais, que quando liberadas, estarão prontas para dar início a um novo ciclo de tradução (BROWNING; BAILEY-SERRES, 2015; JACKSON *et al.*, 2010).

2.4.1 Iniciação da tradução e o complexo eIF4F

A iniciação da tradução em eucariotos tem início com a formação do complexo de pré-iniciação 43S (PIC 43S). Para isso, há a formação do complexo ternário (TC), constituído pelos eIF2, GTP e Met-tRNA_i (tRNA com o primeiro aminoácido da cadeia polipeptídica a ser sintetizada). Ao mesmo tempo ocorre, o recrutamento da subunidade ribossomal menor (40S), mediado pelo fator de iniciação da tradução eIF3 junto a outros fatores, os eIF1, eIF1A e eIF5, denominados de Complexo Multifatorial (do inglês *Multi Factor Complex*). Este complexo irá se unir ao complexo ternário, para a formação do complexo de pré-iniciação 43S. Em paralelo, há o recrutamento do mRNA pelo complexo eIF4F por meio do *cap* presente na extremidade 5' deste mRNA. O complexo heterotrimérico eIF4F é formado pelas seguintes subunidades: eIF4E, também conhecida como proteína de ligação ao *cap*; eIF4A, com funções de RNA helicase e ATPase; e eIF4G, que reconhece a extremidade 5' dos mRNAs, e controla as interações entre subunidades do eIF4F, e deste com outros fatores como o eIF3. A associação do mRNA e eIF4F com o complexo 43S dá origem ao complexo 48S (Figura 6). Em seguida, a subunidade ribossomal 40S se desloca ao longo da região 5' UTR do mRNA a procura do primeiro códon AUG que irá sinalizar o início da sequência codificante. Para isso conta com a

ajuda da subunidade eIF4A do eIF4F que, com ajuda do eIF4B e de forma dependente de ATP, exerce um papel fundamental devido a sua atividade de helicase que desfaz as estruturas secundárias do mRNA. Com o reconhecimento do AUG, ocorre então o seu pareamento com as bases do anticódon do tRNA_i (JACKSON *et al.*, 2010). Através da ação do fator eIF5, que desencadeia a hidrólise do GTP-eIF2, ocorre então a dissociação da maior parte dos fatores associados ao complexo 48S, fazendo com que a subunidade ribossomal maior 60S seja recrutada para formação do ribossomo 80S. Uma outra característica importante do complexo eIF4F é que, através de suas subunidades, também interage com a proteína de ligação a cauda poli-A (PABP), culminando na circularização do mRNA e aumentando a eficiência da tradução (AITKEN E LORSCH, 2012; ALI *et al.*, 2017; BROWNING; BAILEY-SERRES, 2015; HINNEBUSCH E LORSCH, 2012; HINNEBUSCH, 2014; JACKSON *et al.*, 2010; VOIGTS-HOFFMANN *et al.*, 2012).

Figura 6 – Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos.



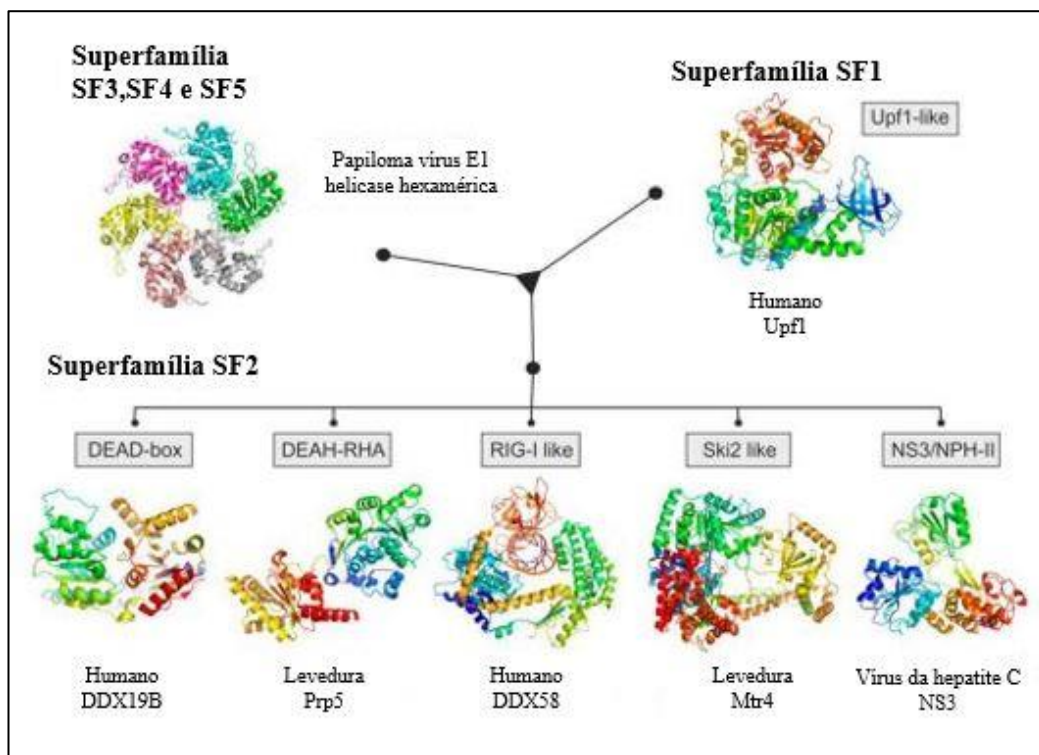
Fonte Modificado de Yáñez e Nieto (2011).

Legenda: Esquema representativo do reconhecimento do *cap* e ligação das subunidades pertencentes ao complexo eIF4F a um mRNA maduro.

2.5 eIF4A: uma RNA helicase da família DEAD-box

RNA helicases são enzimas dependentes de ATP que interagem com ácidos ribonucleicos e tem como principal função desfazer estruturas secundárias e unir ou remodelar RNAs e complexos RNA-proteínas (complexos ribonucleoproteicos) através do gasto de ATP (STUDER *et al.*, 2020). Estas helicases encontram-se associadas a diversos processos vitais envolvendo RNAs, desde a transcrição até a sua degradação, biogênese ribossomal e processamento do mRNA, além de atuarem em processos especializados que envolvem o metabolismo de pequenos RNAs (sRNA) (LINDER; OWTTRIM, 2009; OWTTRIM 2006). Encontram-se classificadas em cinco superfamílias (SF1 A SF5) de acordo com as suas sequências conservadas e elementos estruturais. As RNAs helicases pertencentes ao grupo das superfamílias SF3, SF4 e SF5 são proteínas hexaméricas que contém apenas um domínio *RecA-like*, sendo particularmente codificadas em genomas virais (Figura 7). As superfamílias SF1 e SF2, são proteínas não oligoméricas que apresentam uma região central com atividade helicase e dois domínios de helicase repetidos *in tandem*, os domínios *RecA-like*, estruturalmente similares a proteína recombinase A bacteriana (FAIRMAN-WILLIAMS *et al.*, 2010; JANKOWSKY; FAIRMAN, 2007; OWTTRIM, 2013).

A superfamília SF2 é considerada a maior e mais diversa dentre as superfamílias das helicases de RNA, sendo subdividida em 5 famílias: DEAD-box, DEAH-RHA, RIG-I like, SKI2 like e NS3/NPH II (Figura 7). É importante ressaltar que a maioria das RNAs helicases apresentam extensões Amino (N)-terminal e/ou Carboxi (C)-terminal que podem determinar uma especificidade a RNA ou proteína (LINDER; JANKOWSKY, 2011; OWTTRIM, 2013), e em sua grande maioria, essas regiões formam domínios específicos que definem as suas funções. Apesar de todas elas serem classificadas como helicase, cada uma apresenta uma funcionalidade distinta, não estando limitada apenas a alterar a estrutura de RNAs, podendo estar envolvidas na nucleação das interações proteína-proteína e na manutenção de complexo ribonucleoproteicos (RNP) (LINDER; JANKOWSKY, 2011; OWTTRIM, 2013; ROCAK; LINDER, 2004).

Figura 7 – Representação proteica e estrutural das superfamílias de RNAs helicases.

Fonte: Adaptado de LEITÃO *et al* (2015).

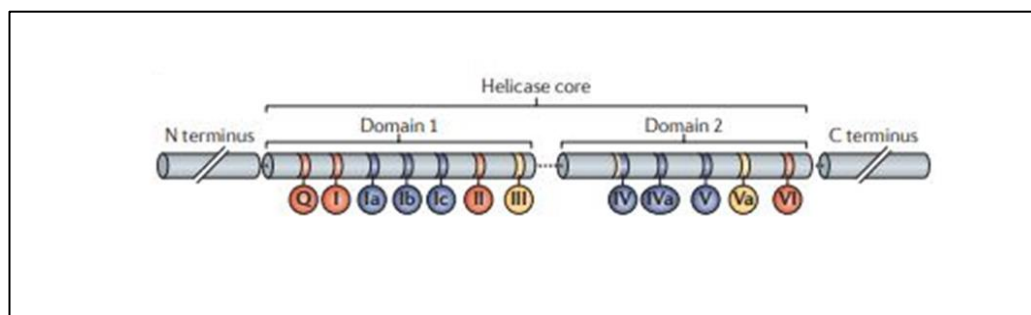
Legenda: As superfamílias SF3, SF4 e SF5 são helicases hexaméricas de origem viral. Já as SF1 e SF2 compreendem proteínas monoméricas, encontradas em todos os organismos. As RNAs helicases que fazem parte da superfamília 2 (SF2) são extremamente diversas e se subdividem em cinco famílias diferentes.

2.5.1 Família DEAD-box

As helicases DEAD-box (DDXs) são a maior família dentre as RNAs helicases pertencentes a superfamília SF2 e se caracterizam pelo motivo DEAD: Ácido Aspártico (D), Ácido Glutâmico (E), Alanina (A), Ácido aspártico (D). Estas helicases desenrolam pequenos trechos de RNA dupla fita e remodelam complexos RNA-proteína a partir do gasto de ATP. Podem também funcionar como grampos de RNA dependentes de ATP para fornecer centros de nucleação que estabelecem complexos RNA-proteína maiores (FAIRMAN-WILLIAMS *et al.*, 2010; LINDER; JANKOWSKY, 2011; ROCAK; LINDER, 2004). Estas helicases são proteínas com um núcleo altamente conservado e com sítios de ligação tanto de RNA quanto de ATP (LINDER *et al.*, 1989; ROCAK; LINDER, 2004; SENGOKU *et al.*, 2006;). Este núcleo é constituído por dois domínios do tipo RecA (Proteína Recombinase A), compostos por nove motivos conservados envolvidos na ligação do ATP e RNA, hidrólise do ATP e desenrolamento de RNAs dupla fita (Figura 8). Os motivos Q, I, Ia, Ib, Ic, II (DEAD) e III estão localizados no domínio 1, enquanto os motivos IV, IVa, V, Va, e VI se localizam no domínio 2 do núcleo da

RNA helicase (Figura 8) (FAIRMAN-WILLIAMS *et al.*, 2010; ROCAK; LINDER, 2004). Alguns desses motivos são conservados em toda a super família SF2, embora outros sejam encontrados apenas na família DEAD-box (FAIRMAN-WILLIAMS *et al.*, 2010). Estas helicases podem ainda apresentar em suas regiões C e N terminais, outros elementos consistindo de até centenas de aminoácidos, o que lhes permite a interação com outras proteínas ou RNAs (KUKHANOVA *et al.*, 2020).

Figura 8 – Esquema representativo dos dois domínios RecA do eIF4A e seus motivos conservados.



Fonte: Adaptado de LINDER; JANKOWSKY (2011).

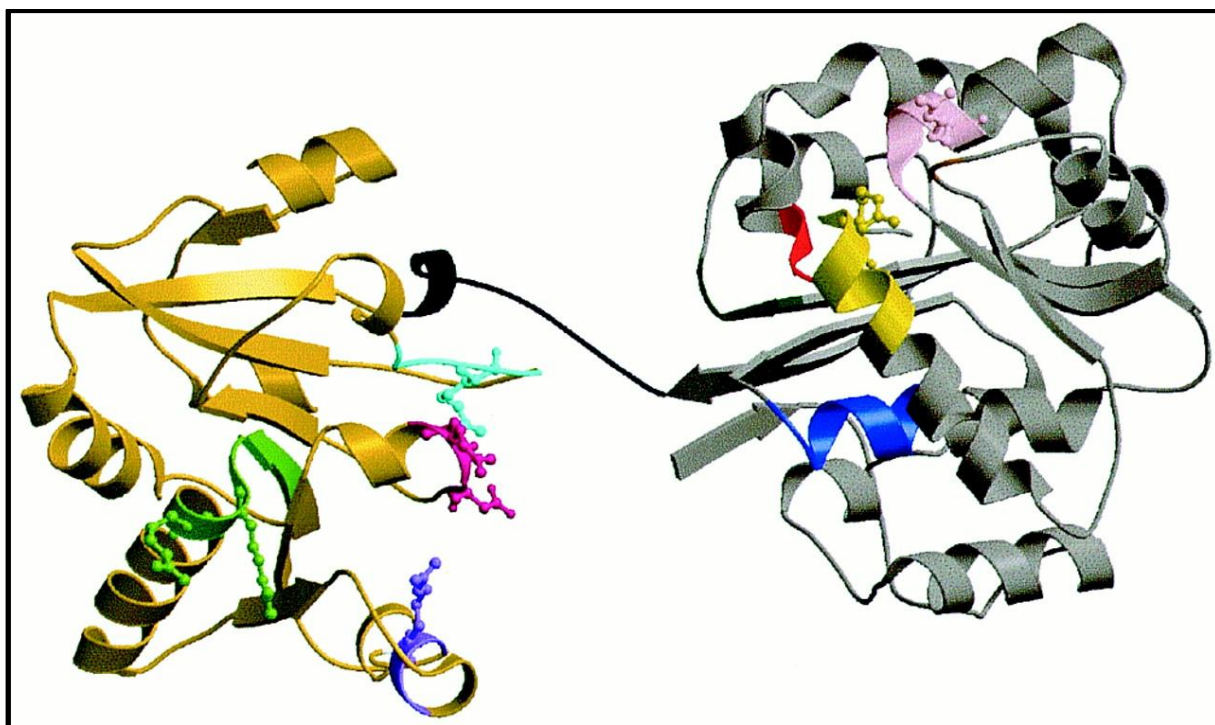
As RNAs helicases pertencentes a esta família atuam exclusivamente em RNAs, de fita simples, dupla ou estruturados, de forma dependente de ATP. Elas realizam um mecanismo de abrir e desenrolar o RNA, de forma diferenciada das demais helicases, uma vez que neste grupo de helicase a separação da hélice implica em pouca ou nenhuma translocação de proteínas (JARMOSKAITE; RUSSEL, 2011). Além disso, possuem um importante papel em todos os aspectos relacionados ao metabolismo do RNA e estão envolvidas em diferentes processos celulares nos eucariotos. No núcleo celular, podem participar da biogênese ribossomal, transcrição e processamento do pré-RNA mensageiro. No citoplasma, por sua vez, podem estar envolvidas no processo de tradução. Já entre o núcleo e o citoplasma, estas enzimas tem um papel muito relevante no transporte direto de mRNAs do núcleo para o citoplasma (CORDIN, 2006; HILBERT, 2009; ROGERS *et al.*, 2001; JACKSON *et al.*, 2010).

Dentre as funções conhecidas das helicases DEAD-box, uma das mais relevantes é a sua participação no processo de iniciação da tradução em eucariotos. Um exemplo é o fator de iniciação da tradução eIF4A, que juntamente com outros fatores de iniciação eucarióticos, auxiliam no recrutamento da subunidade menor do ribossomo ao *cap* 5', permitindo o reconhecimento do códon de iniciação da tradução (ANDREOU E KLOSTERMEIER, 2014; PELLETIER E SONENBERG, 2019).

2.5.2 Fator eIF4A

Considerado um protótipo da família de proteínas DEAD-box, o fator eIF4A (DDX2) é uma RNA helicase de aproximadamente 46 KDa, que possui a capacidade de remover estruturas secundárias da região 5'UTR dos mRNAs a serem traduzidos, de forma dependente de ATP (MARINTCHEV, 2013; ANDREOU E KLOSTERMEIER, 2014; PELLETIER E SONENBERG, 2019; JACKSON *et al.*, 2010). Na presença de ATP, seus dois domínios RecA se unem, dando origem à conformação ativa da proteína. Esta é capaz de desfazer estruturas de RNA dupla fita através da flexibilização dos seus domínios N- e C-terminais (ELISEEVA; LYABIN; OVCHINNIKOV, 2013). Sua estrutura pode ser sobreposta à de várias helicases, indicando uma conservação geral da sua conformação em dois domínios e compreendendo o local de ligação do RNA pelo eIF4A (ROGERS *et al.*, 2001).

Figura 9 – Desenho estrutural do fator de iniciação eucariótico eIF4A.



Fonte: Caruthers *et al.*, 2000.

Legenda: Os domínios N- e C- terminais encontram-se coloridos de prata e ouro, respectivamente; o *linker* de 11 resíduos que os conecta é de cor preta. Os motivos conservados do domínio N-terminal são coloridos da seguinte forma: motivo I - azul; motivo Ia - amarelo; motivo II (Walker B DEAD) - vermelho; motivo III (SAT) - verde. Já os motivos do domínio C-terminal conservados são: motivo IV - verde; motivo V - magenta; motivo VI - ciano.

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

aminoácidos. O eIF4AI e o eIF4AII encontram-se altamente relacionados, apresentando uma faixa de percentual de 90% à 95% de identidade a nível de seus aminoácidos. Já o eIF4AIII apresenta apenas 65% de semelhança referente às outras isoformas. O eIF4AI (DDX2A) é mais abundante e melhor estudado do que o eIF4AII, e embora apresentem atividades bioquímicas semelhantes *in vitro*, *in vivo* seus papéis podem não ser equivalentes (CHAN *et al.*, 2004; NIELSEN E TRACHSEL, 1988; ROGERS *et al.*, 2001). Algumas diferenças entre eles podem ser citadas, como por exemplo, a predominância da síntese do eIF4AI durante o crescimento celular ativo, enquanto que no eIF4AII é produzido durante a parada do crescimento. A supressão de eIF4AI leva a níveis aumentados de eIF4AII, mas essa alteração é insuficiente para compensar a morte celular resultante da perda de eIF4AI; eIF4AI é essencial para a sobrevivência celular, diferentemente do eIF4AII (PELLETIER E SONENBERG, 2019). Já o eIF4AIII possui localização nuclear, e tem uma atividade diferenciada, participando durante o *splicing* do mRNA no complexo de junção dos éxons (EJC) (MERRICK, 2015).

2.5.3 eIF4A e seus parceiros funcionais na síntese proteica: eIF4G, eIF4B e eIF4H

O eIF4A livre apresenta uma baixa atividade de RNA helicase e ATPase e, para executar sua função, se liga a um complexo multiproteico composto pelos fatores eIF4G, eIF4B e eIF4H. Estes vão lhe auxiliar na ligação do complexo de pré-iniciação 43S, bem como na remoção de estruturas secundárias do mRNA, ou de proteínas ligadas a este, durante o reconhecimento pelo complexo 43S (ANDREOU; KLOSTERMEIER, 2014; MARINTCHEV, 2013; GRIFO *et al.*, 1984; PAUSE *et al.*, 1994). Como citado anteriormente, o eIF4G desempenha o papel de estruturador do complexo eIF4F, ligando vários fatores de iniciação (MARINTCHEV *et al.*, 2009). O eIF4G possui três domínios de repetição HEAT, em que os dois primeiros (HEAT-1 / HEAT-2) se ligam ao eIF4A. O domínio HEAT-1 estimula a atividade de helicase do eIF4A enquanto que o domínio HEAT-2 apresenta um papel modulador em mamíferos (IMATAKA E SONENBERG, 1997; LAMPHEAR *et al.*, 1995; MARINTCHEV E WAGNER, 2004).

Foi observado que o eIF4H, eIF4A e eIF4G formam um complexo de estrutura dinâmica, que alterna entre três estados distintos: ligado a ATP, ligado a ADP e livre de nucleotídeos, de forma dependente de ATP, uma vez que quando o ATP encontra-se ligado ao eIF4A, há a formação de um complexo restrito com eIF4H. Contudo, quando há hidrólise de ATP, e o deslocamento concomitante deste nucleotídeo, ocorre um enfraquecimento nessa interação. Deste mesmo modo, a afinidade de eIF4A por RNA e eIF4G HEAT-1 é diminuída quando há hidrólise de ATP e a liberação de ADP, mas a afinidade por HEAT-2 é aumentada.

Portanto, a hidrólise do ATP seria responsável por converter o eIF4A em seu estado aberto, enquanto a ligação de uma nova molécula ATP acarretaria novamente na conversão para a conformação fechada dessa proteína (MARINTCHEV *et al.*, 2009; ROZOVSKY *et al.*, 2008; SCHUTZ *et al.* 2008).

2.5.4 Inibidor de eIF4A: Rocaglamide A (RocA)

Originalmente identificado a partir da planta do gênero *Aglaia* pertencente à família Meliaceae, o rocaglamide A (RocA) é conhecido como um inseticida natural que tipificam um grupo distinto de compostos de mRNA que bloqueiam a tradução de um subconjunto de transcrições (IWASAKI *et al.*, 2016; LI-WEBER, 2015). De forma exclusiva, o RocA captura o fator de iniciação eucariótico eIF4A no RNA polipurina, ignorando o requisito de ATP para ligação ao RNA, formando um complexo estável (eIF4A·RocA) que bloqueia a varredura dos ribossomos, e conseqüentemente reprime a tradução dos mRNAs direcionados. Além disso, a dissociação da subunidade eIF4A do complexo eIF4F também é sugerida como um mecanismo de repressão de tradução mediada por RocA (CENCIC *et al.*, 2009; IWASAKI *et al.*, 2016).

Além deste, existem outros inibidores do eIF4A que possuem a mesma finalidade, mas diferem quanto ao seu modo de ação, são eles: o hipuristanol, pateamine A e outros compostos da família dos rocaglates. Enquanto a pateamina A e os rocaglates parecem atuar como indutores químicos da dimerização, estimulando a ligação do eIF4A ao RNA, o hipuristanol impede que o eIF4A livre e o eIF4A ligado ao eIF4F interajam com o RNA, sem inibir a ligação do ATP (CRAMER *et al.*, 2018).

2.6 Homólogos de eIF4A em tripanosomatídeos

Nos tripanosomatídeos, dois homólogos do eIF4A de *L. major*, denominados *LmEIF4A1* e *LmEIF4A2* foram inicialmente identificados e caracterizados (DHALIA *et al.*, 2005). Foi visto então que o *LmEIF4A1* era mais abundante quando comparado ao *LmEIF4A2*, que se encontrava ausente ou em níveis muito baixos. Em análises realizadas em *T. brucei*, também foram identificados dois homólogos do eIF4A. O primeiro homólogo apresentou localização citoplasmática, demonstrou-se abundante e essencial para a viabilidade celular, uma vez que sua ausência culminou na diminuição da taxa de tradução. Já o segundo, possui localização nuclear, é pouco expresso, e não demonstrou ser essencial para a viabilidade celular

do parasita. Foi então proposto que o primeiro homólogo (denominado de *TbEIF4AI* e o ortólogo do *LmEIF4A1*) seja o verdadeiro homólogo do eIF4A estando provavelmente envolvido na iniciação da tradução, enquanto o segundo seria equivalente ao eIF4AIII (*TbEIF4AIII*, ortólogo do *LmEIF4A2*) e estaria provavelmente relacionado a mecanismos de processamento dos mRNAs, contudo ainda sem evidências experimentais que confirmem essa hipótese. Com base nessas análises dos homólogos de eIF4A de *T. brucei* também foram identificados elementos conservados que distinguem os parálogos de eIF4AI e eIF4AIII nos eucariotos, de uma forma geral. Além disso, a conservação ao longo de organismos tão divergentes aponta para uma função crítica, porém ainda desconhecida do eIF4AIII (DHALLIA *et al.*, 2006; ALEXANDROV *et al.* 2011).

Sabe-se que a atividade helicase de eIF4A é essencial para a síntese e viabilidade de proteínas e que algumas mutações que abolem a sua atividade podem gerar mutantes dominante negativos. Estes mutantes não-funcionais, quando superexpressos, podem inibir de forma competitiva a atividade da proteína nativa (DHALLIA *et al.*, 2006; HERSKOWITZ, 1987). Uma destas mutações, que substitui o resíduo de ácido glutâmico no motivo DEAD (II) por uma glutamina (DEAD → DQAD), e afetando a função de helicase, foi avaliada em *T. brucei*, em seus dois homólogos de eIF4A. Ambos foram expressos, nativo e mutante, através de um promotor induzível por tetraciclina, e houve uma inibição do crescimento apenas no mutante do *TbEIF4AI*. Como este efeito é o esperado para um fenótipo dominante negativo, por anulação da função da proteína DEAD-box nativa, o resultado reforça a indicação de que o *TbEIF4AI* estaria envolvido na síntese de proteínas (DHALLIA *et al.*, 2006).

Em tripanossomatídeos existem cinco homólogos de eIF4G, com o EIF4G3 mais claramente implicado na síntese proteica e especificamente associado a um dos seis homólogos de eIF4E, o EIF4E4. Através de análises realizadas utilizando um mutante do EIF4G3, com uma mutação no sítio de ligação ao EIF4A (LNK68-70AAA), foi possível observar uma diminuição na taxa de crescimento. Este resultado confirma que o EIF4G3 tem sua atividade prejudicada quando não se encontra ligado ao seu parceiro eIF4A, tendo um efeito semelhante ao observado na indução da variante DQAD do *TbEIF4AI* (MOURA *et al.*, 2015). Dados recentes, entretanto, mostraram que o complexo formado pelos EIF4E4, EIF4G3 e EIF4AI tem sua atividade associada à tradução de mRNAs que possuem 5' UTRs muito curtas. Esses dados levantam dúvidas sobre o modo de ação da helicase EIF4AI nessa condição (BEZERRA, resultados não publicados).

Dados publicados por YOURIK e colaboradores (2017) mostraram que o homólogo do eIF4A em leveduras interage funcionalmente com o PIC (complexo de pré-iniciação), de forma

independente de eIF4G, mas dependente das subunidades eIF3i e eIF3g do complexo multimérico eIF3. Assim além de desenrolar estruturas secundárias presentes na 5'-UTR, o eIF4A modularia a conformação da subunidade ribossômica 40S para promover o recrutamento de mRNA. Além disso, recentemente foi descrita uma interação do homólogo do eIF4A de *Giardia lamblia* (GleIF4A) com a subunidade eIF3i do seu complexo eIF3 (GleIF3), indicando que o GleIF4A também pode interagir diretamente com os componentes do PIC. Chama a atenção que *G. lamblia* não possui homólogos de eIF4G e apresenta seus mRNAs com 5' UTRs extremamente curtas. Especula-se então que o GleIF3i pode servir como um estimulador da atividade do GleIF4A e este atuaria no recrutamento direto da subunidade ribossomal na ausência de eIF4G (ADEDJOJA et al., 2020). Estas observações, juntamente com as lacunas ainda existentes na caracterização do processo de iniciação da tradução nos tripanosomatídeos, mostram a necessidade de uma maior investigação quanto as particularidades funcionais do EIF4AI nestes organismos em relação aos demais eucariotos.

3 JUSTIFICATIVA

Os tripanossomatídeos são responsáveis por causar doenças consideradas negligenciadas, que afetam milhares de pessoas no mundo, incluindo o Brasil. Estas doenças tem como agentes etiológicos espécies dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* e se caracterizam por não apresentarem vacinas eficazes para seu controle, com os tratamentos atuais prolongados, e em sua maioria, tóxicos para os pacientes. Faz-se necessário então um maior estudo sobre os processos biológicos que ocorrem nesses organismos patogênicos, a fim de se entender melhor sua biologia e identificar alvos em potencial que possam ser explorados no desenvolvimento de novos fármacos. Diante disso, este projeto visa avançar na caracterização funcional de um homólogo de eIF4A em *T. brucei*, o EIF4AI, investigando sua função sobre os mRNAs dentro do contexto da iniciação da biossíntese de proteínas. Nos eucariotos superiores, o eIF4A atua na tradução desfazendo estruturas secundárias dos mRNAs, contudo, a sua função nos tripanossomatídeos ainda não é totalmente esclarecida. A identificação de que o EIF4AI possui uma ação diferenciada nos tripanossomatídeos, devido a diferenças apresentadas nas estruturas dos seus mRNAs-alvo, seria uma divergência importante em relação aos demais eucariotos. Contribuiria assim para um maior entendimento dos mecanismos associados ao processo de iniciação da tradução e controle da expressão genica nestes e em outros organismos, além de auxiliar na identificação de um alvo molecular em potencial para o desenvolvimento de novos quimioterápicos mais específicos.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Avaliar a função do fator EIF4AI na tradução de mRNAs de *Trypanosoma brucei*.

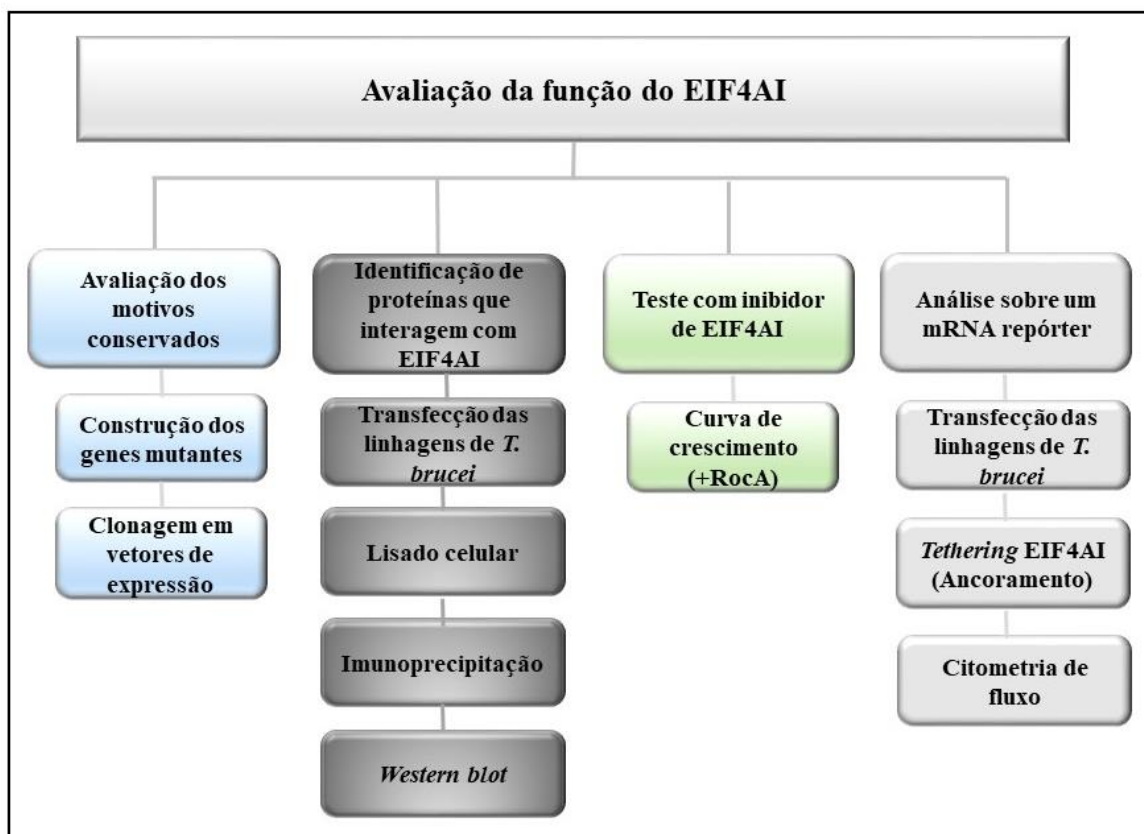
4.1 Objetivos específicos

- I. Identificar e mapear motivos funcionais conservados da proteína EIF4AI;
- II. Identificar proteínas que interagem com o fator EIF4AI contendo ou não mutação em seu sítio funcional helicase/ATPase;
- III. Avaliar a ação de um inibidor de eIF4A sobre o crescimento celular de *T. brucei*;
- IV. Avaliar a ação do eIF4AI, contendo ou não mutação em seu sítio funcional, na tradução de um mRNA-repórter;

5 MATERIAL E MÉTODOS

A figura 10 apresenta uma síntese das abordagens metodológicas realizadas neste trabalho para avaliação da função do EIF4AI de *Trypanosoma brucei* na tradução.

Figura 10 – Etapas dos procedimentos metodológicos.



Fonte: Autora (2021).

Legenda: Figura representativa dos procedimentos metodológicos. RocA – Rocaglamide A (Inibidor do 4A).

5.1 Obtenção dos genes mutantes do EIF4AI de *Trypanosoma brucei*

As construções plasmidiais para a expressão em células procíclicas de *T. brucei* do homólogo EIF4AI em fusão ao epítipo HA (derivado do plasmídeo p2477), nativo e com a mutação no motivo típico de helicase (mutante DQAD), já se encontravam disponíveis no laboratório a partir de trabalho prévio (DHÁLIA *et al*, 2006). Outras cinco regiões foram selecionadas para serem modificadas e obtidas por mutagênese sítio-dirigida, são elas: D183H ou DEAD/DEAH, S210A/T212A ou SAT/AAA, D263A/E266A ou DLYE/ALYA, T295A ou NHTV/NHAV e R321A ou GSSRVL/GSSAVL.

Para as reações de mutagênese, a sequência codificadora foi amplificada a partir do gene EIF4AI nativo, como molde, e da combinação dos *primers* contendo as mutações (Quadro 1) com os *primers* originais descritos no trabalho de Dhalia e colaboradores, *primer* 5'AAG CTT CCG CCA CCA TGG CCC AAC AAG GAA AG3'; e *primer* 5'GGA TCC AGA ACC CTC ACC AAG GTA GGC AGC3' (DHALIA *et al.*, 2006).

Quadro 1 – Oligonucleotídeos utilizados nas reações de PCR para a construção dos mutantes.

MUTAÇÃO	SEQUENCIA (5'-3')	MOTIVO	FUNÇÃO	MEGAPRIMER (pb)
D183H	GAGCATCTCATGGGCTCGTCAAG	II	Ligação e hidrólise do ATP	530pb
S210A/T212A	GTAGCCCTGTTCGCTGCTGCCATGCCCCGATGAC	III	Helicase e ATPase	560pb
D263A/E266A	GATACTCTTATGGCTTTGTACGCAACCGTGAGC ATTG	IV	Ligação ao RNA e ao 4G	410pb
T295A	CAGCAACCACGGGTCAGCTG	IV	Ligação ao RNA e ao 4G	320pb
R321A	GCAACGGAAGCTCCGCCGTGTTAGTGACGAC	V	Ligação ao RNA e ao 3i	240pb
E181Q	Descrito em Dhalia <i>et al.</i> , 2006.	II	Helicase e ATPase	Descrito em Dhalia <i>et al.</i> , 2006.

Fonte: Autora (2021).

A amplificação foi obtida por PCR com 0,2 µl da enzima *Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*, 4 µl do tampão *Phusion® GC*, 0,2 µl MgCl₂ 50 mM, 0,6 µl DMSO, 0,4 µl dNTPs e 1 µl do molde, para uma reação final de 20 µl. As condições de reação foram: 35 ciclos de: 98 °C por 4 minutos, 40 segundos por 72 °C (anelamento) e 72 °C por 1 minuto e 30 segundos.

5.2 Clonagem, extração plasmidial e digestão enzimática dos genes mutados do EIF4AI de *Trypanosoma brucei*

Para realização da clonagem dos genes amplificados, os fragmentos de PCR obtidos foram purificados através do *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (da *GE Healthcare*), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, foram tratados com a enzima Taq DNA Polimerase e dATP (2 mM) e submetidos à reação de ligação utilizando o *pGEM®-*

T Easy Vector Systems (Promega®), a enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs*®), seu respectivo tampão e água ultrapura para um volume final de reação de 10 µl, e em seguida, incubado a 16 °C, por 16 horas. 50 µl de células competentes de *Escherichia coli* Top 10 foram transformadas com 10 µl da ligação, submetendo a amostra a 30 minutos no gelo seguido de choque térmico por 5 minutos a 37 °C. As células foram semeadas em meio LB/AMP sólido contendo 20 µl de X-GAL (50ng/ µl) e 10 µl IPTG 1M diluídos em 20 µl de água ultrapura. A placa foi incubada a 37 °C por 16 horas.

As colônias recombinantes obtidas foram inoculadas em 2 ml de meio LB/AMP líquido a 37°C por 16 horas. Os inóculos crescidos foram submetidos à extração de DNA plasmidial através do *ZR Plasmid Miniprep - Classic* (*Zymo Research*) segundo recomendações do fabricante. Para a confirmação da clonagem, os DNAs extraídos foram submetidos à digestão enzimática a 37 °C com a enzima *EcoRI*, por 1 hora. Então, as amostras foram enviadas ao sequenciamento para a confirmação das mutações.

Após o sequenciamento, as amostras obtidas foram submetidas a uma nova etapa de digestão, agora com as enzimas *HindIII* e *BamHI* específicas para a subclonagem no vetor de expressão p2477. Inicialmente, a construção pGEM/*TbEIF4AI* foi digerida com a enzima *BamHI*, e após a confirmação da linearização, os fragmentos foram submetidos a uma digestão parcial com a enzima *HindIII*, por apenas 5 min, e a banda correspondente ao gene foi excisada do gel de agarose, e posteriormente purificada. Em seguida, os fragmentos mutados purificados foram ligados ao plasmídeo p2477 através da enzima T4 DNA ligase (*New England Biolabs*), em um volume de reação de 10 µl, e posteriormente incubados à 16 °C durante 16 horas. As ligações foram realizadas na proporção inserto: vetor de 5:1. Posteriormente, as construções foram transformadas em cepas de Top10 de *E. coli*, e as minipreparações obtidas foram confirmadas através de digestões com as enzimas de restrição *BamHI* e *HindIII*.

5.3 Sequenciamento dos DNAs mutados

As amostras de DNAs obtidas, contendo as mutações selecionadas, nas etapas anteriores a partir das extrações plasmidiais foram enviadas para o sequenciamento, e analisadas através do sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (*Applied Biosystems*®) disponível no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM/FIOCRUZ-PE. A integridade das sequências foi comparada com o gene selvagem *Tb927.11.8770* através dos programas Seqman e SeqBuilder (*DNASTAR*®).

5.4 Cultivo de células procílicas de *Trypanosoma brucei*

Foram utilizadas duas linhagens celulares modificadas de *T. brucei*, em sua fase procílica, ambas derivadas da cepa selvagem 427: a linhagem transgênica 29-13, responsável pela manutenção da expressão da T7 RNA polimerase e do repressor da tetraciclina (WIRTZ *et al.*, 1999); e a linhagem transgênica 4213, derivada da pSMOx (POON *et al.*, 2012) e modificada para expressar constitutivamente um mRNA-repórter codificador da proteína fluorescente GFP em *T. brucei* (SILVA, 2016). Ambas foram cultivadas e mantidas em meio SDM-79, suplementado com soro fetal bovino a 10%, hemina e solução de antibióticos, em uma estufa BOD a 27 °C. Quando necessário foram utilizados antibióticos para a manutenção das linhagens transgênicas (Quadro 2). O crescimento dos parasitas foi monitorado por contagem em câmara Neubauer, e as culturas obtidas foram utilizadas para transfecção com vetores de expressão e serão utilizadas nas demais etapas do trabalho.

Quadro 2 – Lista de antibióticos e suas respectivas concentrações para a manutenção e seleção das células procílicas de *T. brucei*.

LINHAGENS	ANTIBIÓTICOS	CONCENTRAÇÃO
29-13	Higromicina	25µg/mL
	Neomicina (G418)	15µg/mL
	<u>Fleomicina</u>	2,5µg/mL
4213	Puromicina	1µg/mL
	Neomicina (G418)	15µg /mL
	<u>Blasticidina</u>	10µg/mL

Fonte: Autora (2021).

Legenda: Os antibióticos utilizados para a seleção das linhagens durante as transfecções deste trabalho encontram-se sublinhadas.

5.5 Transfecção das linhagens procílicas

Para as transfecções, alíquotas de 2×10^7 células/ ml de *T. brucei*, em sua forma procílica, foram centrifugadas a 3000 rpm por 10 minutos. O sedimento foi ressuspenso em 5 mL de tampão ZPFM [NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Mg(CH₂COO)₂ 0,5 mM e Ca(CH₂COO)₂ 0,09 mM], centrifugados nas mesmas condições citadas anteriormente, e o sobrenadante desprezado. As células foram então ressuspenso em 450 µl de tampão ZPFM, incubadas com 10 µg de DNA plasmidial, previamente linearizado com a enzima *Not I*, e o conjunto submetido à eletroporação utilizando o aparelho *BioRad Gene*

Pulser II, com cuveta de 4 mm, pulso de 1,5 kV e 25 μ F de capacitância. Posteriormente, os parasitas foram transferidos para uma garrafa contendo 10 ml de meio SDM-79, e mantidos a uma temperatura de 27 °C por 24 horas para recuperação. Após o período de recuperação, foi acrescentado o antibiótico específico para a seleção, a depender da linhagem: fleomicina (2,5 μ g/ mL) para os plasmídeos de fusão ao epítipo HA, p2477; e blasticidina (10 μ g/ mL) para os plasmídeos da série pD. Em seguida, as células foram diluídas (10 e 100 vezes) e submetidas à seleção em placas de 24 poços. O período de seleção ocorreu de 12-14 dias. A linhagem selvagem 29-13 foi utilizada para a transfecção dos transgenes no vetor p2477, e a linhagem 4213 para a transfecção dos transgenes nos plasmídeos da série pD.

5.5.1 Obtenção do extrato proteico total de *Trypanosoma brucei*

Foram obtidos extratos proteicos totais de aproximadamente $5,5 \times 10^5$ células/ μ l a partir de culturas induzidas com tetraciclina (1 μ g/ mL), por um período de 24 horas. Em seguida, foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, e o sedimento foi ressuspenso em tampão de amostra para gel *SDS-PAGE* (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol e 50 μ l/ mL de 2-mercaptoetanol). As alíquotas foram submetidas à fervura por 5 minutos, e posteriormente fracionadas em gel *SDS-PAGE* para análise por *western-blot*, a fim de avaliar a expressão proteica das linhagens transgênicas obtidas a partir da transfecção.

5.6 Obtenção dos lisados celulares

Para esta etapa do trabalho, foram usadas as linhagens recombinantes que expressam a proteína de interesse em fusão ao marcador HA, provenientes da expressão a partir do plasmídeo p2477. Para a obtenção da fração citoplasmática das linhagens procíclica *TbEIF4AI_{WT}-HA* e *TbEIF4AI_{DQAD}-HA* de *T. brucei*, foram feitos inóculos em triplicatas, de cada cultura, a uma concentração inicial de 2×10^6 células/ mL, para um volume final de 40 mL. As culturas foram previamente induzidas com tetraciclina por um período de 24 h, para uma concentração final de cerca de $6-8 \times 10^6$ células/ ml (crescimento exponencial). Posteriormente, o sedimento foi lavado com PBS gelado (4°C), transferidos para um tubo de microcentrífuga, e em seguida ressuspenso em 800 μ l de tampão de lise (20 mM de HEPES-KOH pH: 7,4; 75 mM de acetato de potássio; 4 mM de acetato de magnésio e 2 mM de DTT) com inibidor de protease *EasyPack®* (Roche). As células foram submetidas ao processo de cavitação utilizando o

cilindro de alta pressão de nitrogênio, a uma pressão atmosférica de 70 Bar, permanecendo nessas condições, sob refrigeração, por um período de 35 minutos. Após aumento brusco da pressão, há uma ruptura da membrana da célula e liberação de seus componentes, provocando a lise sem a necessidade de detergentes. As amostras foram então centrifugadas a 4 °C por 10 min a 13000 rpm, para a remoção dos debris celulares. O sobrenadante correspondente à fração citoplasmática solúvel foi armazenado a -80 °C e posteriormente utilizado na produção dos imunoprecipitados.

5.7 Imunoprecipitação e Espectrometria de massas

Para os ensaios de imunoprecipitação (IP), foram utilizados extratos citoplasmáticos, em triplicata, da linhagem selvagem de *T. brucei* (29-13) e das linhagens recombinantes (*TbEIF4AI_{WT}* e *TbEIF4AI_{DQAD}*). Para o ensaio, seguindo as instruções do fabricante, foram utilizadas microesferas magnéticas contendo anticorpo anti-HA (Pierce™[®]). Em média 0,2 mg das microesferas magnéticas anti-HA foram lavadas três vezes com PBS, e incubadas com os lisados citoplasmáticos por 1 hora e 30 minutos a 4 °C. Posteriormente, o sobrenadante, ou lisado depletado (LD), é retirado e as microesferas são submetidas a novas lavagens com PBS. Os complexos formados por antígeno-anticorpo imunoprecipitados foram eluídos em tampão de amostra para SDS-PAGE, separados por eletroforese em gel 15%, e testados inicialmente através da técnica de *western-blot*, utilizando o anticorpo monoclonal anti-HA.

Para a espectrometria de massas, após a confirmação da eficiência das IPs através de ensaios de *western blot*, o conteúdo do imunoprecipitado do EIF4AI (nativo e mutante – DQAD) marcados com HA foram aplicados em gel SDS-PAGE 12% (V: 300, mA: 35) e a migração foi interrompida antes que houvesse fracionamento das proteínas em estudo, após a entrada no gel de resolução. Em seguida, o gel foi corado com azul de Coomassie Blue 250-R (*staining*) e descorado durante 2h com a solução descorante (*destain*). As bandas contendo o produto das imunoprecipitações foram excisadas do gel e conservadas em água ultrapura para envio à Rede de Plataformas Tecnológicas/ Fiocruz – PR, no Instituto Carlos Chagas (ICC-Fiocruz/PR) para a análise por espectrometria de massas, utilizando o aparelho LTQ Orbitrap XL ETD (Thermo Scientific) e os peptídeos referente às proteínas co-precipitadas foram identificados por meio dos números de acesso presente no banco de dados de tripanosomatídeos, TriTrypDB database (<https://tritypdb.org>).

5.7.1 Análise dos resultados de espectrometria de massas

A análise dos resultados obtidos pela espectrometria de massas foi feita em três partes: a primeira, referente à proteína nativa (EIF4AI_{WT}) em relação ao controle negativo (linhagem selvagem 29-13), a segunda, relativa à proteína mutante (EIF4AI_{DQAD}) em relação ao controle negativo e a terceira, referente a proteína nativa em comparação com a proteína mutada. Para ambas as análises, foi feita uma normalização das replicatas, usando como base a amostra de maior intensidade. A partir desta normalização, foi calculada a razão entre as médias das intensidades normalizadas da proteína marcada com HA pelo controle negativo (EIF4AI_{WT}/CN e EIF4AI_{DQAD}/CN), em seguida, foram excluídas da análise as proteínas co-precipitadas cuja razão em relação ao controle eram inferiores a 1,5. Para a terceira análise, a qual compara as proteínas nativa e mutante, foi utilizada a razão (EIF4AI_{WT}/EIF4AI_{DQAD}) após uma segunda normalização das replicatas com base nas intensidades observadas nas amostras para a proteína EIF4AI, nativa ou mutante.

5.8 Teste com inibidor de eIF4A (Rocaglamide A - RocA)

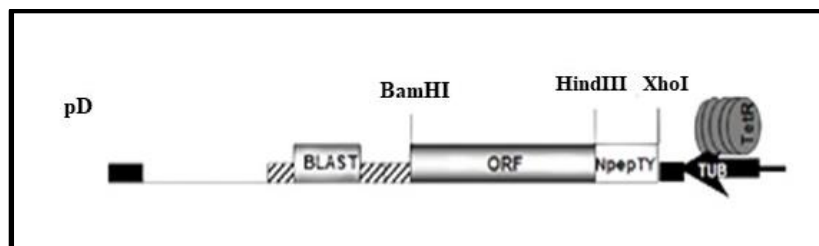
O efeito do inibidor RocA foi avaliado através de curvas de crescimento, em placa de 48 poços. Para isso, a linhagem selvagem 427 de *T. brucei*, em sua forma procíclica, foi diluída em meio SDM-79 para obtenção de uma cultura contendo 1×10^6 células/mL para início da curva. Em seguida, três concentrações foram estabelecidas para a avaliação do inibidor RocA (*Sigma*): 1 μ M, 5 μ M e 10 μ M, dissolvidos em dimetilsulfoxido (DMSO). Como controle, foi utilizada uma cultura sem inibidor, mas com o diluente (DMSO 1%). O perfil de crescimento das culturas foi avaliado em triplicatas, por contagem em câmara de Neubauer, em intervalos de tempo pré-determinados (0h, 24h, 48h, 72h e 96h).

5.9 Tethering: Ensaio de ancoramento

Para esta técnica, a linhagem 4213, que expressa constitutivamente o mRNA codificador da proteína fluorescente GFP em *T. brucei* foi utilizada para a transfecção dos transgenes, com o plasmídeo pD (Figura 11) que possui marca de resistência à blasticidina e permite a fusão do epítipo TY e do peptídeo lambda N (Npep) capaz de reconhecer especificamente uma sequência de RNA em forma de grampo, denominada boxB (Figura 11) (MOURA, 2011). Após

essa etapa, os clones foram induzidos com tetraciclina (1 µg/mL), por um período de 24h, para avaliar a expressão da proteína de fusão e de GFP, com e sem mutação, através da técnica de *western blot*, utilizando os anticorpos primários anti-AI (1:5000) e anti-GFP (1:3000).

Figura 11 – Esquema representativo do plasmídeo pD.



Fonte: Modificado de Moura 2011.

Legenda: Esquema da estrutura do vetor pD que permite a fusão do epítipo TY e da sequência lambda do antiterminado. BamHI, HindIII, XhoI – Enzimas de restrição; BLAST – Blastidicina; TUB - Tubulina.

5.9.1 Citometria de fluxo

Após a análise por *western blot*, três clones de cada linhagem, selvagem (*TbEIF4AI_{WT}-TY*) e mutante (*TbEIF4AI_{DQAD}-TY*), foram analisados quanto à expressão da proteína GFP em citômetro de fluxo FACSCalibur (BD *Biosciences*). As amostras das linhagens foram testadas na presença (+TET) e ausência (-TET) de tetraciclina, sendo avaliadas em média 2×10^4 células por experimento, nos tempos de 24h e 48h. As linhagens 427 e 4213 foram utilizadas como controle do experimento, e as células viáveis foram identificadas com base nas propriedades físicas de dispersão da luz, utilizando os parâmetros FSC (*forward scatter* - relativo ao tamanho da célula) e SSC (*side scatter* - referente à granulosidade da célula) e a intensidade de fluorescência através do canal FL1. Os resultados foram analisados através do *software FlowJo* versão 10.0.6. Os gráficos e análises estatísticas foram feitos no *GraphPad Prism 5.0*, utilizando o teste t ou ANOVA, e considerando diferença estatística quando $p < 0,05$.

5.9.2 Citometria de fluxo com inibidor RocA

A fim de avaliar o efeito do inibidor de eIF4A sobre o mRNA repórter, um ensaio semelhante ao descrito no item 5.9.1 foi realizado, porém as amostras das linhagens foram testadas em quatro condições, a depender da presença ou não de tetraciclina (1 µg/mL) e do

inibidor RocA (1 μ M), são elas: -TET/-RocA e -TET/+RocA (controles); +TET/-RocA e +TET/+RocA. As culturas foram induzidas inicialmente com tetraciclina por 24h, seguida da adição do inibidor RocA. As análises foram realizadas 24h após a adição do inibidor, quando foram avaliadas em média 2x10⁴ células por experimento, e as linhagens 427 e 4213 utilizadas como controle do experimento.

5.10 *Western-blot*

As amostras provenientes das culturas de parasitas transfectados foram submetidas a ensaio de *western-blot* (WB). As amostras foram fracionadas em gel de *SDS-PAGE* 15% e transferidas para membrana de *PVDF* (*Immobilon-P*, *Millipore*®). Após a transferência, a mesma foi bloqueada em solução de leite 5% em *TBS-Tween 20* (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,5) por uma hora sob agitação, a temperatura ambiente. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário em solução de composição igual à usada para o bloqueio. Quando incubada com o anticorpo primário monoclonal anti-HA (*Sigma*®) utilizou-se uma diluição de 1:5000, para o anti-TY BB2 uma diluição de 1:100, já com o anticorpo primário policlonal anti-EIF4AI foi utilizado uma diluição de 1:3000, durante 1 hora a temperatura ambiente, sob agitação. Após três lavagens de 10 minutos com *TBS-Tween 20*, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo na diluição de 1:5000 (anti-IgG de camundongo ou coelho, conjugado com peroxidase), sob agitação por uma hora, em temperatura ambiente. Após novas três lavagens de 10 minutos com *TBS-Tween 20*, a revelação da reação final foi feita através de reação de quimioluminescência, utilizando o reagente *Immobilon Forte Western HRP Substrate* (*Millipore*), seguida de exposição para aquisição de imagens no equipamento *iBright Image System* (*Invitrogen*). O mesmo procedimento foi utilizado para análise dos produtos das imunoprecipitações e nos ensaios de ancoramento.

6 RESULTADOS

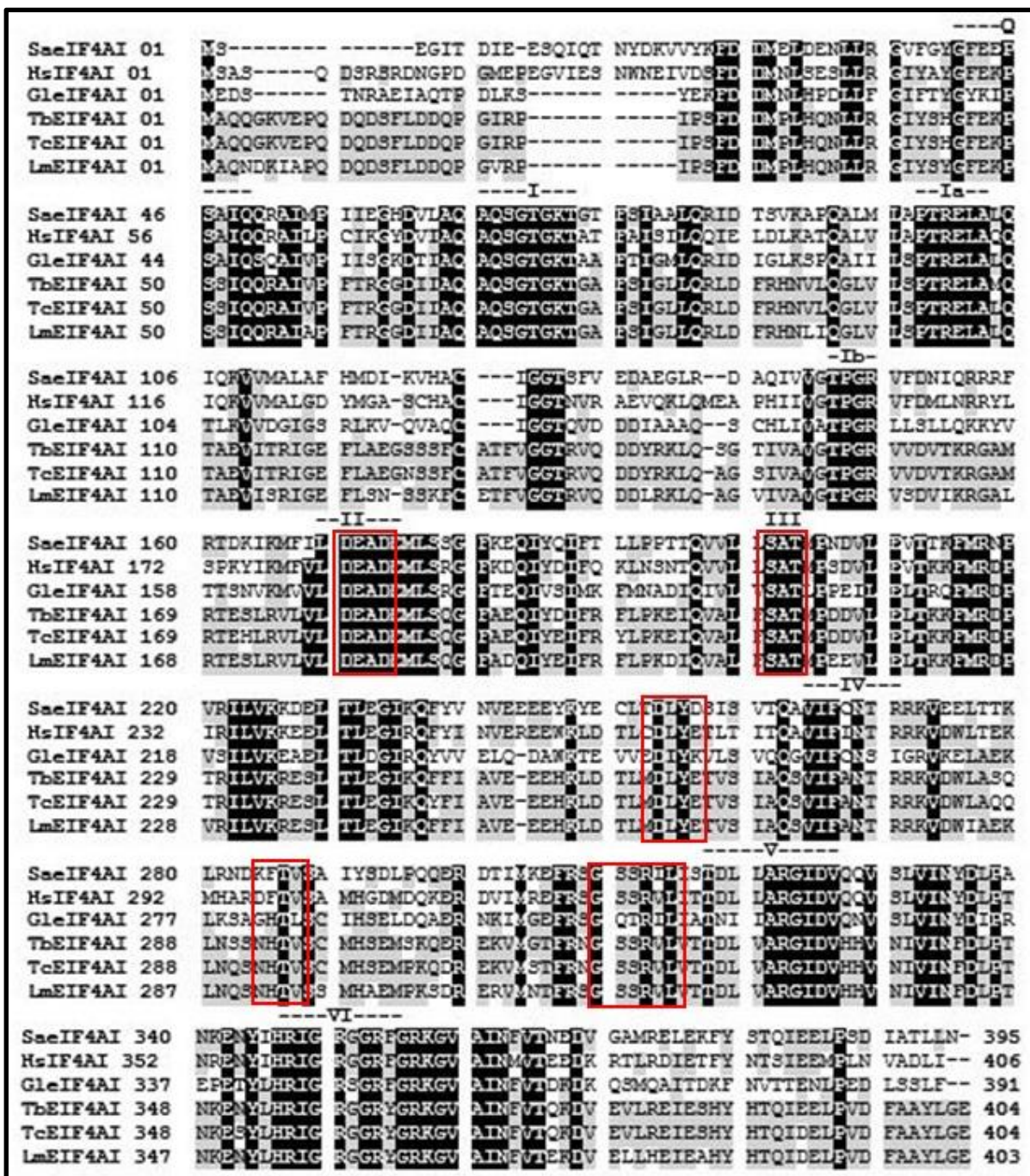
Como estratégia para se melhor compreender o mecanismo de ação da proteína EIF4AI na tradução em *Trypanosoma brucei* e organismos relacionados, este trabalho buscou fazer uma análise funcional comparativa, investigando não só a proteína EIF4AI nativa como também uma versão mutante previamente descrita, na qual o motivo DEAD foi alterado para DQAD, ambos disponíveis a partir de trabalho anterior (Dhalia *et al.*, 2006). Além disso, o mapeamento de outros motivos que possivelmente impactam outros aspectos funcionais da proteína e a obtenção de novos mutantes para avaliação experimental desses motivos em estudos futuros também serão descritos a seguir.

6.1 Identificação de motivos importantes e mutagênese em alvos para se melhor avaliar a função do EIF4AI em *Trypanosoma brucei*

6.1.1 Identificação e descrição das sequências para mutagênese

Após análise comparativa de sequências de outros organismos, foram identificados regiões dos motivos II, III, IV e V, que estão diretamente atrelados a funções importantes da proteína, passíveis de impactar diferentes aspectos da função do EIF4AI quando mutagenizadas. Essa etapa teve como base alinhamentos realizados com sequências existentes do eIF4A de outras espécies: humano, levedura, *Giardia lamblia* (GleIF4A) (ADEDJOJA *et al.*, 2020; GULAY *et al.*, 2020; OBERER *et al.*, 2005; YOURIK *et al.*, 2017) e de espécies de tripanosomatídeos (*T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*) (Figura 12)

Figura 12 – Alinhamento das proteínas homólogas de eIF4AI com destaques para os motivos conservados.



Fonte: Autora (2021).

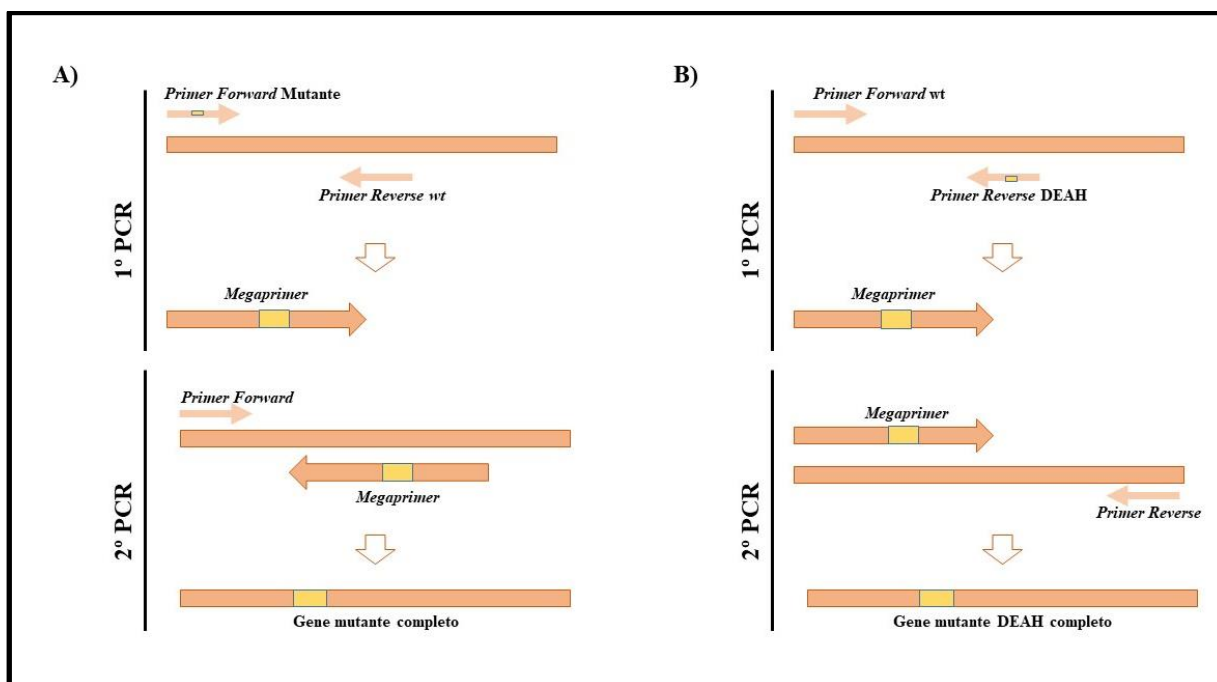
Legenda: Alinhamento das proteínas homólogas de EIF4AI de *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania major* com seus ortólogos de *Saccharomyces cerevisiae*, *Giardia lamblia* e *Homo sapiens*; Motivos conservados da proteína EIF4AI (Q,I,Ia,Ib,II,III,IV,V e VI) destacados. Número de acessos relevantes do UniProt: TbEIF4AI (Q38F76), TcEIF4AI (Q4E162), LmEIF4AI (O62591), SaeIF4AI (P10081), GleIF4AI(A8B6X3) e HuEIF4AI (P60842).

Cinco regiões foram selecionadas para serem modificadas por mutagênese sítio-dirigida (D183H ou DEAD/DEAH, S210A/T212A ou SAT/AAA, D263A/E266A ou DLYE/ALYA, T295A ou NHTV/NHAV e R321A ou GSSRVL/GSSAVL), as quais estão possivelmente

relacionadas com a função de helicase, ATPase, e com interação aos homólogo de eIF4G e eIF3 (subunidade i – EIF3i). Os mutantes DQAD e DEAH modificam a região equivalente aos resíduos DEAD do eIF4A de humanos, que também dá nome à família dessas helicases (DEAD box) e que estão relacionados à ligação e hidrólise do ATP. O mutante DQAD já havia sido gerado (Dhalia et al., 2006), e neste trabalho optou-se por gerar um novo mutante, o DEAH. Outro motivo selecionado para mutagênese é o SAT, conservado em várias espécies, que está posicionado próximo ao DEAD e está envolvido com a função de helicase da proteína. Já o resíduo DLYE do eIF4A de humanos foi implicado na ligação da molécula de RNA, além da provável interação do eIF4A com o eIF4G, enquanto o motivo NHTV de *T. brucei*, corresponde à região DFTV da sequência de humanos, que está envolvida com as mesmas funções de ligação da molécula de RNA, e de provável interação do EIF4AI com o EIF4G. Por fim, o resíduo GSSRVL do EIF4AI equivale a uma região conservada em humanos, e também em *Giardia lamblia*. A arginina presente neste motivo foi indicada como possivelmente envolvida na interação do eIF4A com o eIF3i nesta espécie.

6.1.2 Amplificação das sequências de interesse

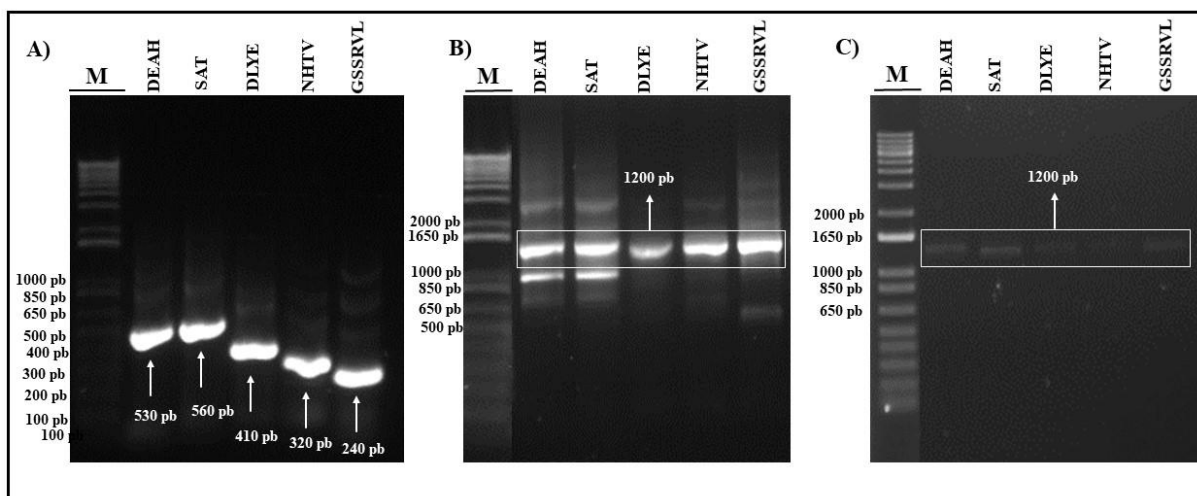
Com base nas regiões identificadas para mutagênese, foram amplificados genes contendo estas modificações em regiões dos motivos II, III, IV e V. Para a obtenção dos genes mutados, duas reações de PCRs foram realizadas, a primeira necessária para a obtenção do *megaprimer* e a segunda, para a amplificação do gene completo, a partir do produto da primeira PCR (*megaprimer*) (Figura 13).

Figura 13 – Esquema da construção dos genes mutantes pelo método de PCR.

Fonte: Autora (2021).

Legenda: A) Esquema representativo da primeira e segunda reação dos mutantes SAT/AAA, DLYE/ALYA, NHTV/NHAV e GSSRVL/GSSAVL, onde há a formação do *megaprimer* (1º reação) e geração do gene completo com a mutação inserida (2º reação). B) Esquema representativo da primeira e segunda reação do mutante DQAD/DEAH, onde há a formação do *megaprimer* (1º reação) e geração do gene completo com a mutação inserida (2º reação).

Na primeira PCR, uma parte do gene é amplificado até onde a mutação será inserida, modificando o *primer reverse* ou *forward* com a mutação desejada, gerando os fragmentos denominados de *megaprimers* com tamanhos de aproximadamente: 530 pb, para o *megaprimer* com a mutação DEAD/DEAH; 560 pb, com a mutação SAT/AAA; 410 pb, com a mutação DLYE/ALYA; 320 pb, com a mutação NHTV/DFTV; e 240 pb, com a mutação GSSRVL/GSSAVL (Figura 14A). Na segunda PCR, houve a amplificação do gene completo, utilizando o produto da primeira PCR como um *megaprimer* iniciador combinado com o *primer forward*. A exceção foi o mutante DEAH, no qual foi utilizado o *primer reverse*. A partir dessas reações, foi possível obter o gene completo do EIF4AI, que possui um tamanho de aproximadamente 1200 pb, com as mutações desejadas, como observado na Figura 14B.

Figura 14 – Amplificação dos fragmentos de mutagênese sítio-dirigida.

Fonte: Autora (2021).

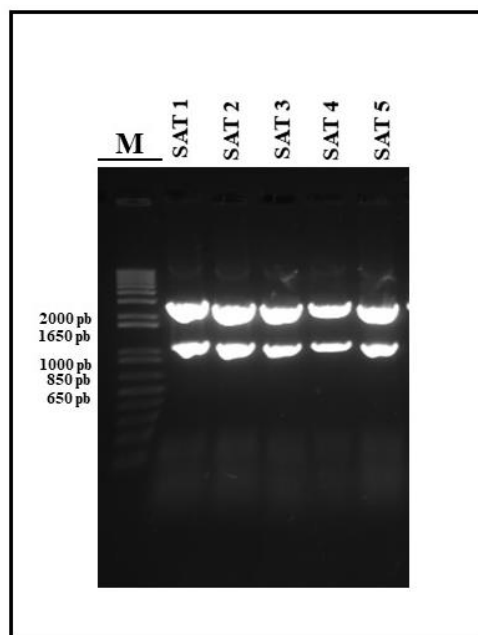
Legenda: A. O gel mostra o resultado dos produtos da 1ª PCR dos *megaprimers* amplificados para gerar as mutações selecionadas. B. Resultado da segunda PCR a qual foi realizada a partir dos fragmentos obtidos da 1ª PCR, obtendo os genes completos com as respectivas mutações. C. Fragmentos purificados da 2ª PCR, obtidos através do *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (da GE Healthcare), seguindo as instruções do fabricante. O marcador de peso molecular (1kb ladder) foi utilizado para comparação com os fragmentos. M – Marcador.

Todos os fragmentos obtidos, tanto na primeira quanto na segunda PCR foram purificados, a fim de remover possíveis contaminantes, e como uma forma de conseguir obter fragmentos mais específicos dos produtos de mutagênese. A Figura 14C mostra as bandas dos genes completos purificados.

6.1.3 Clonagem em vetores de expressão

Os produtos purificados obtido da 2ª reação, referente aos genes completos contendo as mutações DEAH, AAA, ALYA, NHAV e GSSAVL, foram clonados no vetor *pGEM®-T Easy Vector Systems* (Promega), seguido de extração plasmidial. As minipreparações de extração plasmidial foram submetidas à digestão enzimática utilizando a enzima de restrição *EcoRI*, para confirmação do fragmento, uma vez que este plasmídeo contém sítios de *EcoRI* que flanqueiam a região em que o gene foi inserido, liberando fragmentos dos genes no tamanho esperado (aprox. 1200 pb), independente da mutação, como pode ser observado na Figura 15. Outra confirmação foi realizada através do sequenciamento dos genes, a fim de comprovar a integridade das sequências e confirmar as mutações nos sítios desejados.

Figura 15 – Padrão de digestão do gene EIF4AI clonado no pGEM-T Easy com a enzima *EcoRI*.

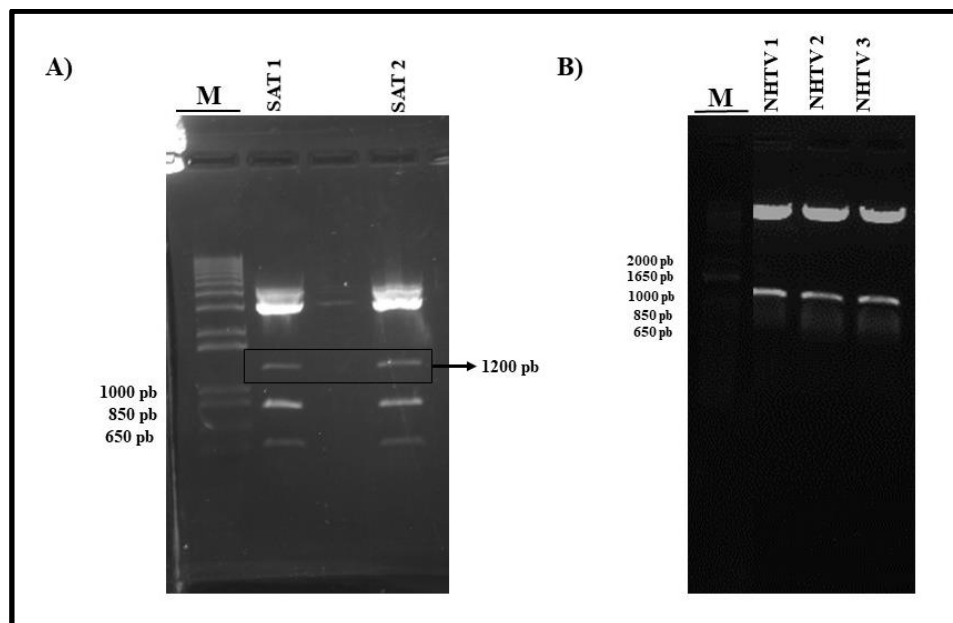


Fonte: Autora (2021).

Legenda: Imagem representativa do perfil de digestão com a enzima *EcoRI* dos DNAs mutados. Como exemplo, está mostrado o resultado da digestão de cinco amostras resultantes da clonagem do gene EIF4AI_{SAT} no pGEMTeasy. O marcador de peso molecular (1kb ladder) foi utilizado para comparação com os fragmentos. M – Marcador.

Após a confirmação das mutações nos sítios desejados, foi realizado inicialmente uma digestão parcial, dos DNAs obtidos anteriormente, com a enzima *Hind III*, devido a presença de um sítio interno de *Hind III* na sequência gênica do EIF4AI. Em seguida, a banda correspondente ao gene foi excisada do gel de agarose, e posteriormente purificada. Os fragmentos mutados DEAH, AAA e NHAV purificados foram submetidos à ligação com o plasmídeo p2477, e em seguida, as minipreparações obtidas foram submetidas à digestão com as enzimas *BamHI* e *HindIII* para confirmação (Figura 16), e as amostras enviadas para o sequenciamento.

Figura 16 – Padrão de digestão parcial com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III dos genes mutados clonados no vetor pGEM-T Easy, e confirmação da subclonagem do gene EIF4AI mutado no plasmídeo p2477.



Fonte: Autora (2021).

Legenda: A. Resultado da digestão parcial com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, dos DNAs mutados clonados no pGEMT easy. Como exemplo, está mostrado o resultado da digestão de duas amostras resultantes da clonagem do gene EIF4AI_{SAT} no pGEMTeasy. B. Perfil de digestão com as enzimas *Bam*HI e *Hind*III, do DNA mutado no plasmídeo p2477. Como exemplo, está mostrado o resultado da digestão de três amostras resultantes da subclonagem do gene EIF4AI_{NHTV} no p2477. O marcador de peso molecular (1kb ladder) foi utilizado para comparação com os fragmentos. M – Marcador.

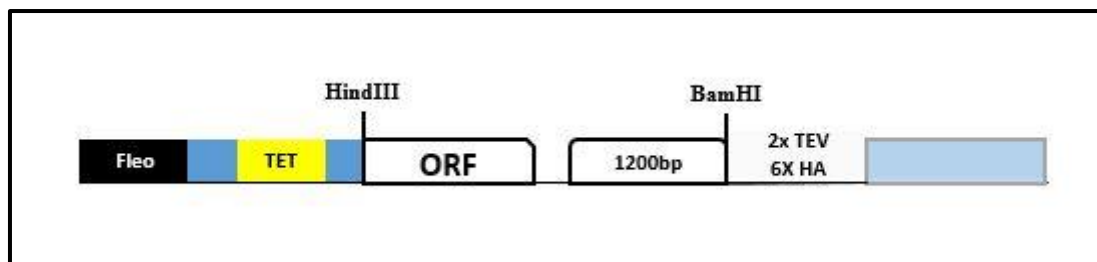
Com base nesses resultados foram então geradas ferramentas importantes para a continuidade dos estudos com o EIF4AI utilizando esses novos mutantes, os quais serão avaliados em trabalhos futuros com as mesmas abordagens descritas nos itens a seguir já realizadas com o EIF4AI nativo e com o mutante DQAD.

6.2 Identificação de proteínas que interagem com o fator EIF4AI de *Trypanosoma brucei*, contendo ou não mutação, em seu sítio de helicase.

Estudos prévios focando no EIF4AI de *T. brucei* foram realizados em um momento no qual ferramentas como análise de proteínas parceiras por espectrometria de massa não estavam disponíveis. Neste trabalho, então, uma questão importante a ser investigada era a de se definir o perfil de proteínas parceiras capazes de serem identificadas após co-precipitação com o EIF4AI, bem como seu mutante DQAD. Para isso, fez-se uso do plasmídeo resultante da clonagem do gene EIF4AI nativo (WT), e com a mutação DQAD, no vetor p2477. Este vetor permite a expressão de proteínas fusionadas a seis cópias do tag de HA (6xPYDVPDYA),

epítopo da hemaglutinina do vírus *Influenza*, (Figura 17). Este plasmídeo já se encontrava disponível no laboratório, e foram utilizados para a transfecção dos transgenes na linhagem 29-13, primeira etapa desta abordagem.

Figura 17 – Esquema representativo do vetor p2477.



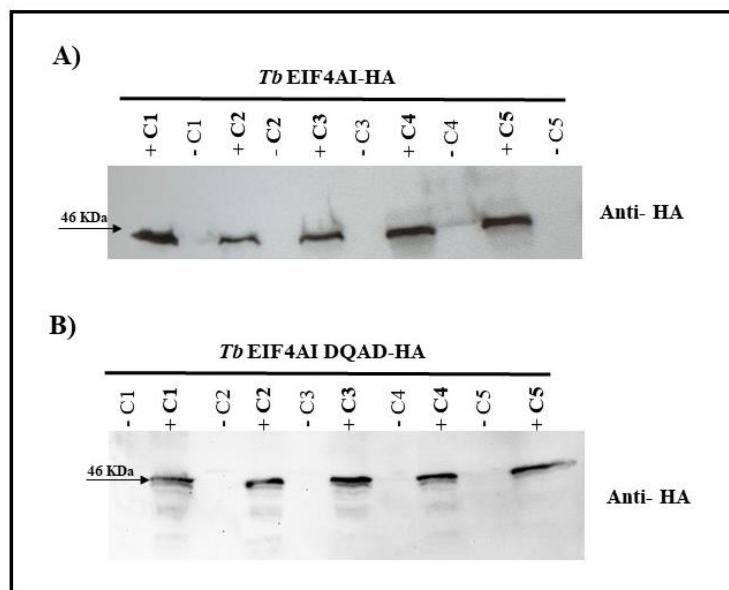
Fonte: Modificado de Dhalia (2006).

Legenda: Esquema da estrutura do vetor p2477 que permite a expressão de proteínas fusionadas a seis epítops de HA (6xPYDVPDYA). Fleo – Fleomicina; TET – Tetraciclina; HA – Hemaglutinina.

6.2.1 Teste de expressão das linhagens transgênicas

Após o período de seleção, alguns clones das linhagens com a proteína nativa (WT) e com a mutante DQAD foram selecionados para avaliar a expressão das proteínas de fusão ao HA. Para isso, foram coletados extratos proteicos das linhagens *TbEIF4AI_{WT}-HA* e *TbEIF4AI_{DQAD}-HA*, induzidas (+) e não induzidas (-) com tetraciclina, por um período de 24h. Em seguida, alíquotas induzidas (+TET) e controle (-TET) foram submetidas à imunodeteção por *western blot*, com anticorpo anti-HA.

Através das análises verificou-se que em todos os cinco clones testados foi possível detectar a presença das proteínas de fusão ao HA, sendo possível observar a expressão como única isoforma de peso molecular de aproximadamente 46 kDa, como esperado (Figura 18).

Figura 18 – Teste de expressão das linhagens transgênicas *TbEIF4AI_{WT}-HA* e *TbEIF4AI_{DQAD}-HA*.

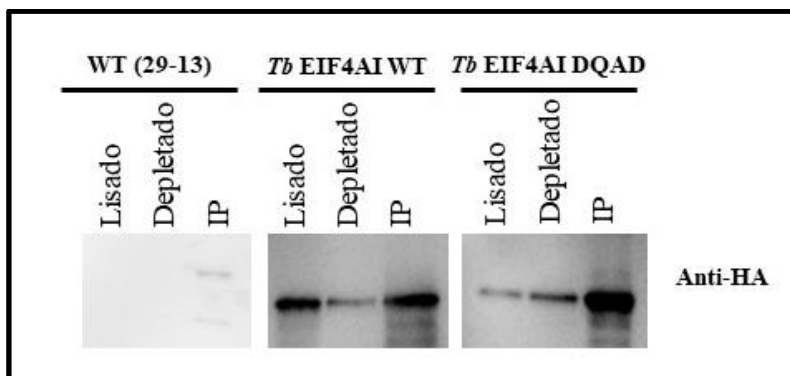
Fonte: Autora (2021).

Legenda: *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-HA. Gel SDS page 15%. Setas pretas apontam a proteína de interesse ; (+) representa os clones que foram induzidos com tetraciclina; (-) clones não induzidos; C - Clone.

6.2.2 Obtenção dos lisados celulares e imunoprecipitação

Após a confirmação da expressão da proteína EIF4AI em sua forma nativa e mutante, as culturas celulares foram expandidas e utilizadas para a obtenção de lisados celulares por cavitação. Através de ensaios de *western blot*, utilizando o anticorpo monoclonal anti-HA, demonstrou-se que os lisados citoplasmáticos apresentavam proteínas EIF4AI_{WT}-HA e EIF4AI_{DQAD}-HA em quantidades adequadas para etapa de imunoprecipitação (Figura 19). Por fim, as amostras imunoprecipitadas, em triplicata, foram fracionadas em SDS-PAGE e enviadas para análise através de espectrometria de massas, com o intuito de avaliar os diferentes complexos formados.

Figura 19 – Obtenção dos lisados expressando o EIF4AI de *T. brucei*, em sua forma selvagem e mutante, e ensaio de imunoprecipitação desses genes fusionados ao epítipo HA.



Fonte: Autora (2021).

Legenda: A ordem das amostras utilizadas para o ensaio por *Western blot* são: Lisado, Lisado depletado e IP, do controle negativo (Linhagem selvagem 29-13 de *T. brucei*), da linhagem nativa (*TbEIF4AI_{WT}*-HA, expressa o gene do EIF4AI sem mutação) e do mutante (*TbEIF4AI_{DQAD}*-HA), respectivamente. WT – *Wild type*; IP – Imunoprecipitação.

6.2.3 Proteínas associadas ao homólogo EIF4AI de *Trypanosoma brucei*

Os dados da análise das amostras previamente precipitadas ligadas às esferas magnéticas com anti-HA foram processados e analisados de forma comparativa, sendo considerado apenas as proteínas com a razão entre as médias das intensidades das amostras em relação ao controle negativo superior a 1,5. Os dados apresentados no Quadro 1 destacam as proteínas mais relevantes que coprecipitaram com o EIF4AI_{WT} (nativo) e se apresentaram enriquecidas em relação ao controle negativo.

Quadro 1 – Análise das proteínas identificadas por espectrometria de massas que co-precipitaram com o fator EIF4AI nativo de *T. brucei*.

EIF4AI Selvagem			
ID	Descrição da proteína	Razão EIF4AI WT/CN	Média nº de Peptídeos
SUBUNIDADES DO COMPLEXO EIF4F			
Tb927.9.4680	EIF4AI – Fator de iniciação da tradução eucariótico 4 ^a	8,3	15
Tb927.6.1870	EIF4E4 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 4E	31,7	3,6
Tb927.8.4820	EIF4G3 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 4 gama	7,4	2,3
ENZIMAS METABÓLICAS			
Tb927.8.6060	AKCT - 2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligase	44,6	6
Tb927.11.1450	Componente E1 2-oxoglutarato desidrogenase	4,2	7,3
Tb927.8.6110	HMGS - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase	7,4	6,3
Tb927.8.3530	G3PDH - Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD +]	2,7	2
OUTRAS PROTEÍNAS			
Tb927.6.1090	RPT3 - Subunidade 3 ATPase reguladora de proteassoma	5,1	5,3
Tb927.7.2550	RPT5 - subunidade 5 ATPase reguladora de proteassoma	2,9	3,6
Tb927.2.100	RHS1 - Proteína hotspot retrotransposon 1	3,0	6,3
Tb927.2.5240	PRP19 - Fator de splicing 19 do pré-mRNA	1,9	2
Tb927.10.13360	EF-Tu – Fator de alongamento Tu	1,7	6,3
Tb927.10.5840	Fator de alongamento de tradução 1-beta	1,6	3
PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS			
Tb927.11.1840	Proteína hipotética conservada	11,5	4
Tb927.6.5070	Proteína hipotética conservada	5,3	5,3
Tb927.11.6440	Proteína hipotética conservada	1,6	3,6
Tb927.10.15760	Proteína hipotética conservada	1,5	9

Fonte: A autora, 2021.

Legenda: As proteínas apresentadas na tabela estão divididas de acordo com sua classificação funcional.

Como esperado, o EIF4AI foi uma das proteínas mais abundantes dentre os peptídeos identificados, sendo possível observar que o mesmo co-precipita mais especificamente com as proteínas do complexo eIF4F previamente identificados em *T. brucei* e *L. major*, EIF4E4 e EIF4G3, não sendo observado enriquecimento com nenhuma das subunidades EIF4G4 e EIF4E3, que fazem parte do segundo complexo do tipo eIF4F melhor caracterizado em tripanosomatídeos. Também foram identificadas enzimas metabólicas com alto valor de enriquecimento e algumas proteínas hipotéticas. Destaca-se também a co-precipitação do fator de alongamento 1 (Tb927.10.5840).

Referente a proteínas ribossomais e outras proteínas envolvidas na tradução, estas não foram enriquecidas a partir dessas amostras imunoprecipitadas. Também não foram identificadas outras RNAs helicases.

6.2.4 Proteínas associadas ao mutante do homólogo EIF4AI de *Trypanosoma brucei*

Referente às análises *in vivo* do homólogo do EIF4AI contendo a mutação DQAD, após o processamento dos dados, as proteínas identificadas no imunoprecipitado foram resumidas e estão representadas no Quadro 2. A partir das análises realizadas foi observado que a presença dos homólogos EIF4E4 e EIF4G3 sofreu alterações nos valores de enriquecimento, quando comparado ao EIF4AI nativo, ficando abaixo do ponto de corte escolhido (razão 1,5). Contudo, a presença da mutação DQAD faz com que a proteína mutada se ligue mais fortemente ao segundo complexo EIF4F (EIF4E3/EIF4G4) possivelmente envolvido no processo de tradução, sugerindo que a mutação no sítio de helicase/ATPase pode interferir no padrão de ligação dos seus parceiros funcionais.

A interação com RNAs helicases sofreram interferência, visto que elas não coprecipitaram de forma similar ao EIF4AI_{WT}. Enquanto que na proteína nativa as RNAs helicases DEAD-box (Tb927.11.8870), HEL67 (Tb927.10.14550) e SUB2 (Tb927.10.540) se encontravam com baixo valor de enriquecimento, na proteína mutada todas se encontram com alto valor de enriquecimento.

É interessante notar que boa parte das proteínas que interagiram de forma exclusiva com a proteína em sua versão mutada são classificadas como repressoras da tradução, são elas: as proteínas zinc finger ZC3H46 (Tb927.11.16550) e ZC3H41(Tb927.11.1980), o regulador de ESAG9-1 (Tb927.11.14220), e a subunidade 5 do regulador negativo geral de transcrição (Tb927.3.1920), reforçando a interferência dessa mutação no processo de tradução. Além destas, podem ser citadas proteínas hipotéticas e proteínas de ligação ao RNA (RBPs), que são importantes no processo de tradução uma vez que são capazes de se ligar a outras proteínas, formando complexos ribonucleoproteicos (mRNPs), e também interagir com mRNAs durante todas as etapas de controle. Dentre elas, podemos citar a DRBD3 (Tb927.9.8740), a RBP42 (Tb927.6.4440), gBP21 (Tb927.11.1710), gBP25 (Tb927.11.13280), a UBP2 (Tb927.11.510) e a RBP29 (Tb927.10.13720) que foram identificadas com alto valor de enriquecimento na proteína mutada.

Quanto as enzimas metabólicas, apenas a Componente E1 2-oxoglutarato desidrogenase (Tb927.11.1450) e a G3PDH - Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD +] (Tb927.8.3530) identificadas na proteína nativa foram identificadas no produto da imunoprecipitação do mutante EIF4AI_{DQAD}. Além disso, em relação ao fator de iniciação da tradução eIF3, apenas a subunidade eIF3k (Tb927.11.15420) foi identificada com o mutante.

Quadro 2 – Análise das proteínas identificadas por espectrometria de massas que co-precipitaram com o fator EIF4AI contendo uma mutação em seu sítio de helicase de *T. brucei*.

EIF4AI_{DQAD}			
ID	Descrição da proteína	Razão EIF4AI DQAD/CN	Média nº de Peptídeos
SUBUNIDADES DO COMPLEXO EIF4F			
Tb927.9.4680	EIF4AI – Fator de iniciação da tradução eucariótico 4 ^a	3,0	14
Tb927.11.10560	EIF4G4 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 4 gama	2,6	7,6
Tb927.11.11770	EIF4E3 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 4E	1,5	3,3
OUTROS FATORES ENVOLVIDOS NA TRADUÇÃO			
Tb927.11.15420	EIF3K - Fator de iniciação da tradução eucariótico 3, subunidade k	1,7	2,3
RNA HELICASE			
Tb927.11.8870	RNA helicase DEAD-box ATP-dependente	5,1	2,6
Tb927.10.14550	HEL67 - RNA helicase dependente de ATP	3,9	9
Tb927.10.540	SUB2 - RNA helicase dependente de ATP	2,0	5
PROTEÍNAS REPRESSORAS			
Tb927.11.16550	ZC3H46 – Proteína Zinc finger	∞	2,6
Tb927.11.14220	REG9.1 - Regulador de ESAG9-1	∞	1,6
Tb927.11.1980	ZC3H41 – Proteína Zinc finger	2,6	2,6
Tb927.3.1920	NOT5 - Regulador negativo geral de transcrição, subunidade 5	2,2	2
PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO RNA			
Tb927.4.2040	Proteína de ligação a DNA / RNA Alba 3	34,2	3,3
Tb927.9.8740	DRBD3 - Proteína 3 de domínio de ligação de RNA duplo	11,7	3,3
Tb927.6.4440	RBP42 - Proteína de ligação ao RNA 42	10,3	1,3
Tb927.11.1710	gBP21 - Proteína de ligação ao RNA guia	6,6	3
Tb927.11.13280	gBP25 - Proteína de ligação ao RNA guia	6,5	4,6
Tb927.11.510	UBP2 – Proteína de ligação ao RNA	6,4	2
Tb927.10.13720	RBP29 - Proteína de ligação ao RNA 29	2,4	2,6
ENZIMAS METABÓLICAS			
Tb927.11.1450	Componente E1 2-oxoglutarato desidrogenase	3,7	7,3
Tb927.8.3530	G3PDH - Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD +]	3,9	3,6
OUTRAS PROTEÍNAS			
Tb927.5.4380	KPP1 - Proteína Fosfatase 1 específica de cinetoplastídeo	∞	2
Tb927.11.2300	ERF1 - Subunidade 1 do fator de liberação de cadeia de peptídeo eucariótico	4,5	1,6
Tb927.10.14780	CBPK1 - Proteína quinase 1 de ligação a canertinibe	24,9	3,3
Tb927.11.4450	ALBA2 – Proteína de domínio ALBA	3,5	2
Tb927.10.5840	Fator de alongamento de tradução 1-beta	1,7	3,3
PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS			
Tb927.2.3180	Proteína hipotética	∞	2,6
Tb927.6.1470	Proteína hipotética	2,9	2,6
Tb927.11.6440	Proteína hipotética	2,3	3,3
Tb927.6.2390	Proteína hipotética	2,1	2
Tb927.8.1500	Proteína hipotética	2,0	2,6
Tb927.6.5070	Proteína hipotética	2,0	3,6

Fonte: A autora, 2021.

Legenda: As proteínas apresentadas na tabela estão divididas de acordo com sua classificação funcional.

Em uma terceira análise, a qual comparou as proteínas mais relevantes que co-precipitaram com o EIF4AI_{WT} (nativo) e se apresentaram enriquecidas em relação a proteína mutada, foi realizada a normalização das amostras de forma que a razão entre as médias das intensidades de EIF4AI_{WT} e EIF4AI_{DQAD} fosse igual a 1. O resultado da análise encontra-se representado no Quadro 3, mostrando de forma resumida o perfil de interação das proteínas avaliadas.

Quadro 3 – Análise das proteínas identificadas por espectrometria de massas que co-precipitaram com o fator EIF4AI contendo uma mutação em seu sítio de helicase, referente a proteína nativa de *T. brucei*.

EIF4AI_{WT} / EIF4AI_{DQAD}			
ID	Descrição da proteína	Razão EIF4AI WT/ DQAD	Média nº de Peptídeos
SUBUNIDADES DO COMPLEXO EIF4F			
Tb927.6.1870	EIF4E4 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 4E	2,2	3,6
Tb927.8.4820	EIF4G3 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 4 gama 3	0,8	2,3
Tb927.9.9290	PABP1 – Proteína 1 de ligação a poli (A)	0,7	7,3
Tb927.9.10770	PABP2 – Proteína 2 de ligação a poli (A)	0,2	16,6
Tb927.11.11770	EIF4E3 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 4E	0,1	1,3
Tb927.11.10560	EIF4G4 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 4 gama 4	0,1	4,6
OUTROS FATORES ENVOLVIDOS NA TRADUÇÃO			
Tb927.6.4370	EIF3D - Fator de iniciação da tradução eucariótico 3, subunidade d	1,1	1,6
Tb927.10.8270	EIF3C-2 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 3, subunidade c	0,6	3,6
Tb927.7.6090	EIF3A - Fator de iniciação da tradução eucariótico 3, subunidade A	0,6	4,6
Tb927.3.1680	EIF3F - Fator de iniciação da tradução eucariótico 3, subunidade F	0,4	2,3
Tb927.10.2770	EIF-5 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 5	0,3	3,3
Tb927.8.1170	EIF3H-2 - Fator de iniciação da tradução eucariótico 3, subunidade h	0,3	1,6
Tb927.3.2900	EIF2A - Fator de iniciação da tradução eucariótico 2, subunidade alfa	0,2	3
Tb927.11.13250	eIF-2-gama - Fator de iniciação da tradução eucariótico 2 gama	0,1	2
Tb927.11.15420	EIF3K - Fator de iniciação da tradução eucariótico 3, subunidade k	0,1	1,6
RNA HELICASE			
Tb927.10.3990	DHH1	0,1	10
Tb927.10.540	SUB2 - RNA helicase dependente de ATP	0,1	3
Tb927.9.12510	DED1 - RNA helicase DEAD / H dependente de ATP	0,09	1,6
Tb927.10.14550	HEL67 - RNA helicase dependente de ATP	0,07	2,6
PROTEÍNA DE LIGAÇÃO AO RNA			
Tb927.2.4710	RRM1 - Proteína de ligação ao RNA	0,2	2
Tb927.11.13280	gBP25 - Proteína de ligação ao RNA guia	0,1	4,3

ENZIMAS METABÓLICAS			
Tb927.8.6060	AKCT - 2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligase	20,0	6
Tb927.8.6110	HMGS - 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA sintase	1,0	6,3
Tb927.11.1450	Componente E1 2-oxoglutarato desidrogenase	0,4	7,3
Tb927.8.3530	G3PDH - Glicerol-3-fosfato desidrogenase [NAD +]	0,2	2
OUTRAS PROTEÍNAS			
Tb927.10.13360	EF-Tu - Fator de alongamento Tu	2,3	6,3
Tb927.10.4570	Fator de alongamento 2	0,3	17,3
Tb927.10.5840	Fator de alongamento de tradução 1-beta	0,3	3
Tb927.11.13190	Fator de alongamento 1-gama	0,3	6,6
Tb927.4.3590	Fator de alongamento de tradução 1-beta	0,2	7
Tb927.10.2110	EEF1A - Fator de alongamento 1-alfa	0,2	16
Tb927.10.15720	RPN9 - Subunidade 9 não ATP-ase regulatória de proteassoma	0,2	5,6
Tb927.9.11270	TCP-1-eta - Proteína 1 do complexo T, subunidade eta	0,2	6
Tb927.11.16030	RPN7 - Subunidade 7 não ATP-ase regulatória de proteassoma	0,1	3,6
Tb927.2.2440	RPN6 – Subunidade 6 não ATP-ase regulatória de proteassoma	0,1	10,6
Tb927.11.16760	TCP-1-alfa - Proteína 1 do complexo T, subunidade alfa	0,1	5
Tb927.7.2550	RPT5 - ATPase reguladora de proteassoma, subunidade 5	0,1	3,6
Tb927.11.3740	RPT6 - ATPase reguladora de proteassoma, subunidade 6	0,1	7,6
PROTEÍNAS HIPOTÉTICAS			
Tb927.6.5070	Proteína hipotética	0,9	5,3
Tb927.11.1840	Proteína hipotética	0,9	4
Tb10.v4.0053	Proteína hipotética	0,5	5,6
Tb927.10.15760	Proteína hipotética	0,4	9
Tb927.11.2610	Proteína hipotética	0,3	6
Tb927.7.2160	Proteína hipotética	0,2	2,6
Tb927.11.6440	Proteína hipotética	0,2	3,6

Fonte: A autora, 2021.

Legenda: As proteínas apresentadas na tabela estão divididas de acordo com sua classificação funcional.

Os resultados obtidos confirmam o enriquecimento na interação do EIF4AI nativo com o seu parceiro EIF4E4 e a interação da proteína mutada com os parceiros EIF4E3/EIF4G4, do segundo complexo EIF4F, juntamente a PABP2. Sugerindo que o domínio DQAD seja importante para o estabelecimento das interações intra eIF4F, mas estudos de interação direta precisam ser conduzidos para confirmar que as interações com os parceiros E4/G3 foram abolidas.

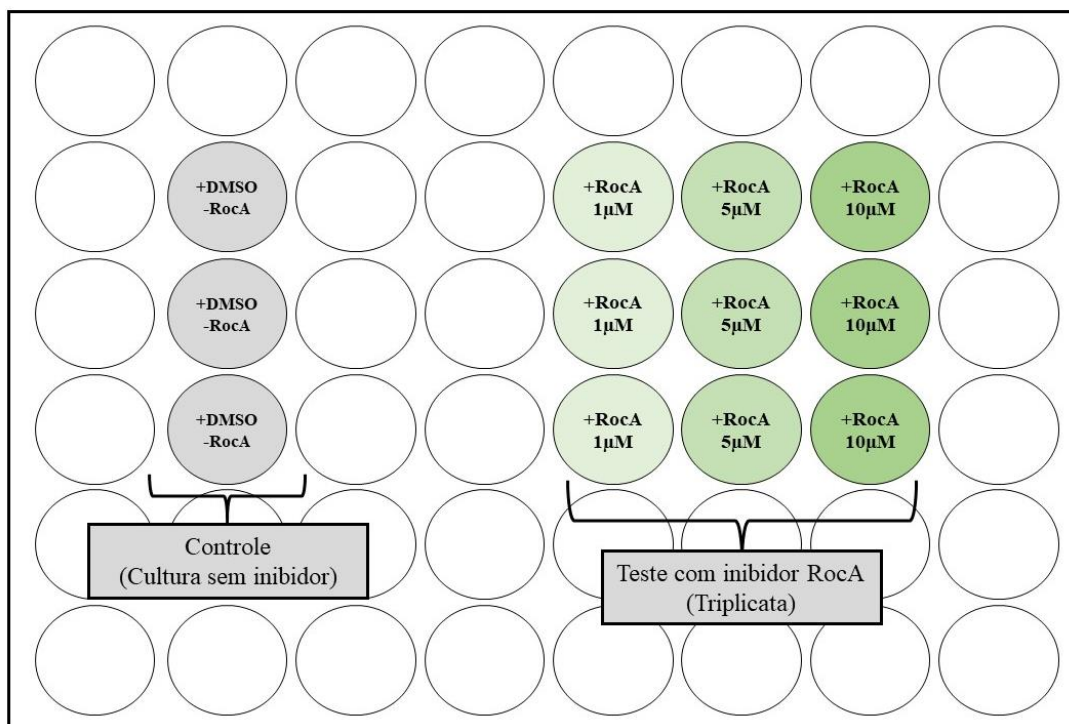
Destaca-se também a diferença na interação com outros fatores envolvidos na formação do complexo de pré-iniciação da tradução, como as subunidades do complexo EIF3, o EIF3D (Tb927.6.4370), EIF3C-2 (Tb927.10.8270), EIF3A (Tb927.7.6090), EIF3F (Tb927.3.1680), EIF3H-2 (Tb927.8.1170), e EIF3K (Tb927.11.15420), duas subunidades do complexo EIF2, o EIF2A (Tb927.3.2900) e o eIF-2-gama (Tb927.11.13250), bem como o EIF5 (Tb927.10.2770).

É importante ressaltar o enriquecimento das RNAs helicases, como a DHH1 (Tb927.10.3990) e a DEAD1 (Tb927.9.12510), e a ausência da RNA helicase DEAD-box ATP-dependente (Tb927.11.8870), descrita anteriormente. A presença dessas helicases que foram imunoprecipitadas com o EIF4AI_{DQAD} confirmam a importância da função de helicase dessa proteína, entretanto outras funções não estão descartadas.

Outras proteínas que foram identificadas no produto imunoprecipitado, e merecerem destaque, estão algumas enzimas metabólicas, fatores de alongamento, algumas subunidades do proteossoma e proteínas hipotéticas, principalmente as com código de acesso: Tb927.6.5070 e Tb927.11.6440 que co-precipitaram em todas as análises realizadas.

6.3 Análise do perfil de crescimento de células procíclicas de *T. brucei* sob o efeito de um inibidor de 4A

O composto Rocaglamide A (RocA) tem a capacidade de inibir a iniciação da tradução, ligando-se de forma específica ao eIF4A de diferentes espécies e convertendo-o em um repressor da tradução (CHU et al., 2016; IWASAKI et al., 2016). Neste trabalho, optamos por investigar o efeito do RocA em *T. brucei* como uma forma de melhor avaliar a conservação ou não da função do EIF4AI neste parasita. Diante disso, a linhagem nativa 427 de *T. brucei*, em sua forma procíclica, teve sua taxa de crescimento analisada através de curvas de crescimento, na presença e ausência do inibidor RocA (Figura 20). Três concentrações foram estabelecidas de acordo com as concentrações já descritas utilizadas em humano e levedura, são elas: 1µM, 5µM e 10µM.

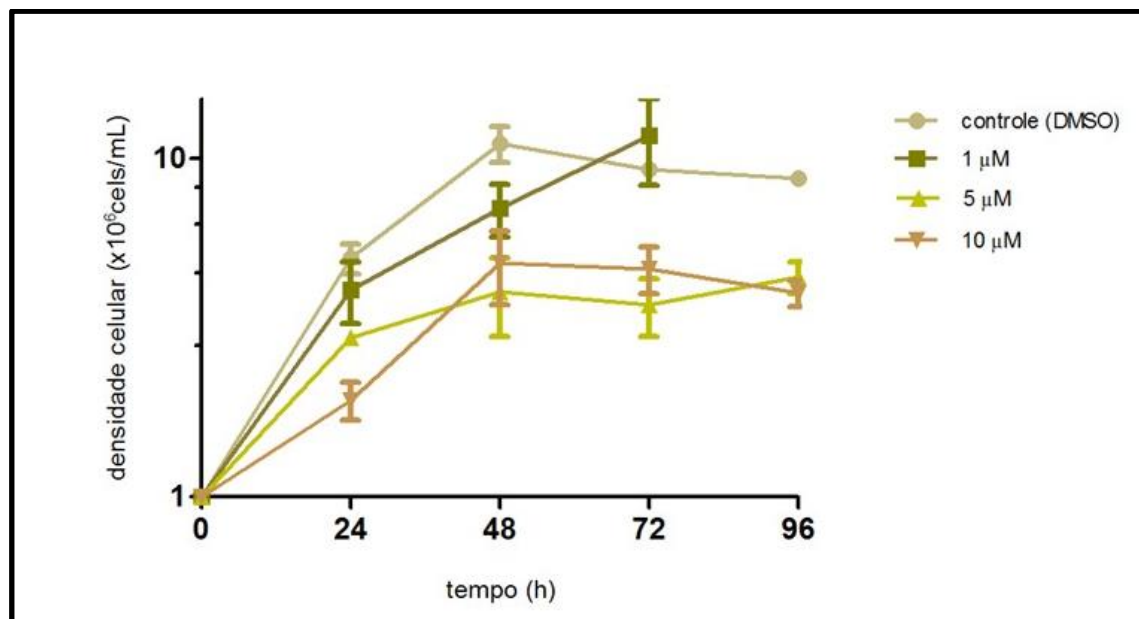
Figura 20 – Desenho experimental da curva de crescimento com inibidor RocA em placa de 48 poços.

Fonte: A autora, 2021.

Legenda: Esquema representativo do experimento da curva de crescimento na presença do inibidor de eIF4A (RocA). A curva foi realizada em triplicata, em três concentrações diferentes (1µM, 5µM e 10µM). O controle utilizado não havia o inibidor, apenas 1% de DMSO (Diluyente do inibidor). DMSO – Dimetilsulfóxido; RocA – Rocaglamide A; (+) – Presença; (-) – Ausência.

A partir das análises, foi possível observar que todas as concentrações testadas causaram diminuição do crescimento do parasita a partir de 24h, quando comparada a cultura sem inibidor (controle - DMSO) (Figura 21). Contudo, as concentrações de 5µM e 10µM causaram maior inibição no crescimento das culturas, porém não foi possível observar um efeito dose-dependente nas condições testadas. A sensibilidade do *T. brucei* ao RocA reforça uma conservação da função do EIF4AI neste organismo.

Figura 21 – Análise dos níveis de crescimento da linhagem selvagem 427 de *T. brucei* na presença de um inibidor de 4A.



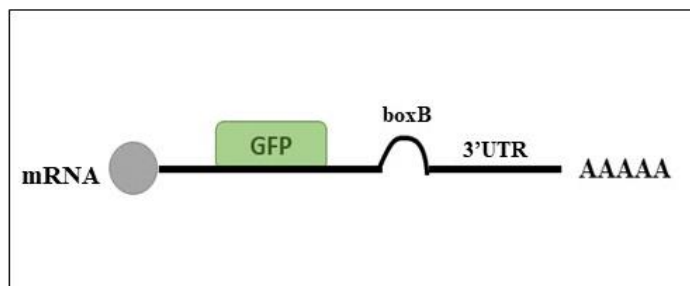
Fonte: A autora, 2021.

Legenda: Gráfico representativo dos níveis de proliferação celular a partir de curvas de crescimento na ausência e na presença do inibidor RocA. Como controle, foi utilizado a cultura sem o inibidor (Bege), e para a avaliação do crescimento, três concentrações foram estabelecidas, 1μM (Verde escuro – Avaliada apenas até 72 h), 5μM (Verde claro) e 10μM (Laranja).

6.4 Ensaio de ancoramento e análise de expressão por citometria de fluxo

Para uma análise funcional mais direta do EIF4AI, foi utilizado a técnica de *tethering* (ancoramento) que é baseada no ancoramento de uma proteína ligadora de RNA, de função desconhecida, sobre o metabolismo de um RNA repórter, através da interação proteína-RNA, conhecida como âncora, a fim de acessar os efeitos dessa proteína sobre o RNA repórter (MINSHALL *et al.*, 2010). Para esta técnica, foi utilizada a linhagem 4213, que expressa constitutivamente o mRNA codificador da proteína fluorescente GFP em *T. brucei*, onde esse mRNA apresenta uma estrutura em grampo (boxB) na sua porção 3'-UTR do mRNA (Figura 22) (SILVA, 2016). O sistema é baseado na interação λ N-(1-22)/boxB, onde, os genes são fusionados ao peptídeo λ N-(1-22), que pode ser recrutada artificialmente a um mRNA-alvo contendo um ou mais grampos boxB (MINSHALL *et al.*, 2010).

Figura 22 – Esquema representativo do mRNA repórter monocistrônico.

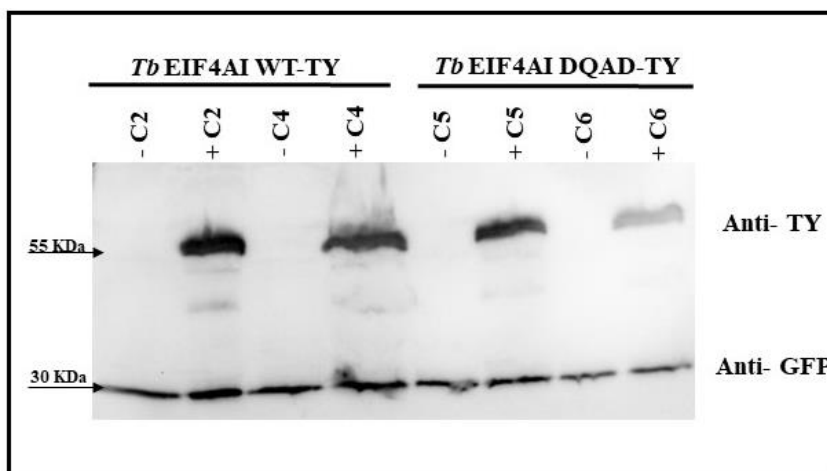


Fonte: Modificado de Silva 2016.

Legenda: Esquema do mRNA monocistrônico presente na linhagem 4213 codificante para proteína GFP contendo o grampo boxB na região 3' UTR do mRNA.

Para este ensaio, as linhagens transgênicas derivadas da linhagem 4213, expressando *TbEIF4AI_{WT}-TY* e *TbEIF4AI_{DQAD}-TY* foram inicialmente testadas por *western blot*. Para isso, foram coletados extratos proteicos de dois clones de cada linhagem, da proteína nativa e mutante, induzidos (+) e não induzidos (-) com tetraciclina, por um período de 24h. Foi possível observar a presença das proteínas de fusão ao TY, com e sem a mutação DQAD, nos clones testados, com peso molecular de aproximadamente 55 KDa (Figura 23).

A expressão do mRNA repórter de GFP foi avaliada na presença e ausência do EIF4AI nativo e mutante pela técnica de *western-blot*. Para tal, foi utilizado o anticorpo anti-GFP para detecção do nível de expressão do repórter nas linhagens testadas, sendo possível observar a expressão de GFP de peso molecular de aproximadamente 30 KDa em todas as amostras analisadas (Figura 23). Contudo, por *western blot* não foi possível detectar diferenças no nível de expressão de GFP entre as linhagens com a proteína nativa e mutante.

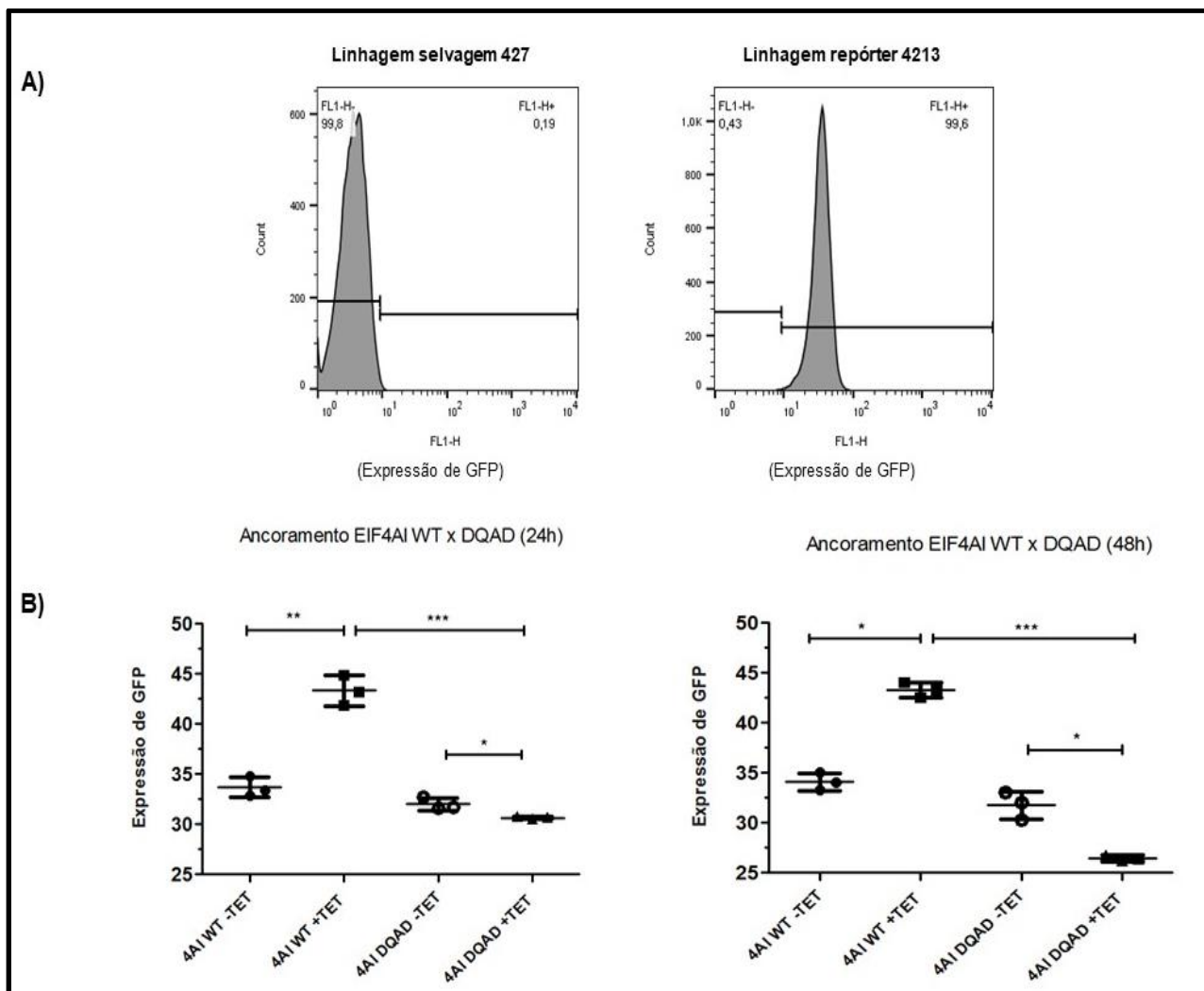
Figura 23 – Teste de expressão das linhagens transgênicas *TbEIF4AI_{WT}-TY* e *TbEIF4AI_{DQAD}-TY*.

Fonte: A autora (2021).

Legenda: *Western blot* com soro monoclonal anti-TY e anti-GFP. Gel SDS page 15%. Setas pretas apontam a proteína de interesse em kDa; (+) representa os clones que foram induzidos com tetraciclina; (-) clones que não foram induzidos com o indutor tetraciclina; C – Clone.

Após o teste de expressão, três clones de cada cultura foram submetidos à análise em citômetro de fluxo, que por ser mais sensível que o *western blot*, foi utilizada com o intuito de quantificar a expressão de GFP em cada linhagem, a partir da emissão de fluorescência nas populações de células de *T. brucei* analisadas. As linhagens 427 (nativa) e 4213 (que expressa o mRNA repórter GFP) foram utilizadas como controles (Figura 24A), permitindo a determinação da porcentagem de parasitos fluorescentes nas amostras analisadas. Após a indução do ensaio com tetraciclina, foi possível observar um aumento da porcentagem de células fluorescentes na linhagem expressando EIF4AI_{WT}-TY (aprox. 30%), enquanto que na linhagem contendo a mutação DQAD foi visto uma diminuição da expressão de GFP (4% e 18%, nos tempos de 24 e 48 horas, respectivamente), quando comparado às respectivas linhagens não induzidas (Figura 24B). O resultado mostra que o EIF4AI_{WT} causa um aumento na expressão do mRNA-repórter, e que esse efeito é afetado negativamente quando há uma mutação no sítio de helicase.

Figura 24 – Avaliação por citometria de fluxo das linhagens *TbEIF4AI_{WT}* e *TbEIF4AI_{DQAD}* em 24 e 48 horas após indução das proteínas de interesse.

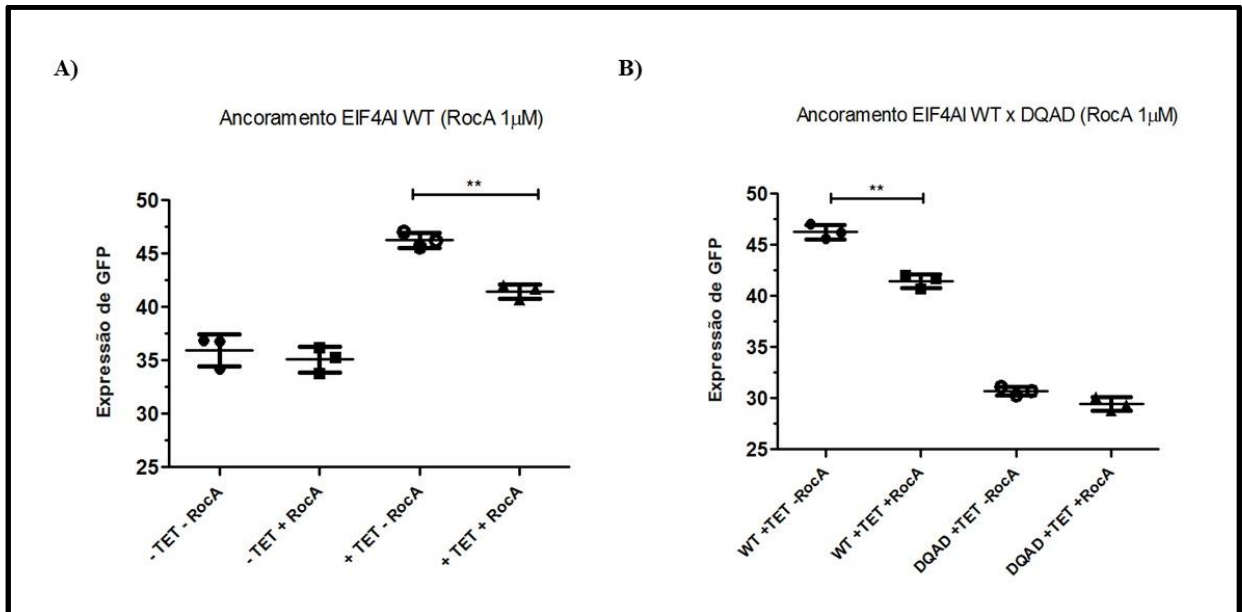


Fonte: A autora, 2021.

Legenda: A) Histograma representativo da expressão de GFP nas linhagens controle 427 e 4213. B) Análise da expressão de GFP após 24 e 48 horas de indução das proteínas de fusão EIF4I_{WT}-TY e EIF4AI_{DQAD}-TY, utilizando o laser 488 nm (FL1). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Devido o bom andamento do trabalho, decidiu-se avaliar o comportamento da expressão de GFP em cada linhagem, nativa e mutante, na presença do inibidor RocA (Figura 25). Novamente foi observado um aumento da expressão da proteína selvagem quando induzida com tetraciclina (+TET/-RocA), mas quando adicionado o inibidor RocA (+TET/+RocA), este perfil foi alterado, apresentando uma diminuição da expressão de GFP de cerca de 10% (Figura 25A). Já a linhagem mutante, na presença do inibidor (+TET/+RocA), não apresentou alteração da expressão de GFP quando comparado à amostra apenas induzida com tetraciclina (+TET/-RocA) (Figura 25B).

Figura 25 – Avaliação por citometria de fluxo das linhagens *TbEIF4AI_{WT}* e *TbEIF4AI_{DQAD}*, na presença do inibidor RocA, 48 horas após indução das proteínas de interesse.



Fonte: A autora, 2021.

Legenda: A) Análise da expressão de GFP da linhagem selvagem após 48 horas de indução, com e sem a adição do inibidor RocA. B) Comparação da expressão de GFP das linhagens selvagem e mutante, na presença e ausência do inibidor RocA, após 48 horas de indução. Confirmação da presença da proteína fluorescente nas linhagens expressando o plasmídeo pD (GFP), utilizando o laser 488 nm (FL1).

7 DISCUSSÃO

A síntese de proteínas é um evento complexo e altamente conservado em todos os seres vivos, sendo a iniciação da tradução considerada a etapa mais complexa e sujeita a mecanismos de controle, com a atuação fundamental dos chamados fatores de iniciação eucarióticos (eIFs – *Eukariotic Initiation Factors*). Nos eucariotos, um dos eventos importantes para o início do processo de tradução, é a remoção das estruturas secundárias da região 5'UTR dos mRNAs a serem traduzidos, pelo fator eIF4A, pertencente ao complexo eIF4F (formando ainda pelas subunidades eIF4G e eIF4E) (SONENBERG E HINNEBUSCH, 2009). Nos tripanosomatídeos, foi observado que os mRNAs codificantes de proteínas ribossomais, associados ao complexo EIF4E4/EIF4G3, um dos dois principais complexos homólogo de eIF4F identificados em *T. brucei*, possuem regiões 5' UTR curtas, e que provavelmente não geram estruturas secundárias complexas. Justamente esse complexo parece se ligar melhor ao EIF4AI, de modo que a atuação desse homólogo sobre essas regiões precise ser melhor definida (Bezerra, dados não publicados).

Sabendo que a atividade helicase de EIF4A é essencial para a síntese de proteínas e viabilidade celular, e que algumas mutações que abolem sua atividade podem agir como mutantes dominantes negativos, foram identificadas cinco regiões, a partir de análises comparativa de sequências de outros organismos, que estão possivelmente atreladas a funções importantes da proteína. Estudos anteriores apontam que as mutações DQAD e DEAH, as quais tiveram o resíduo de ácido glutâmico no motivo II (DEAD) substituído por uma glutamina (DEAD → DQAD) e o resíduo de ácido aspártico modificado por uma histidina (DEAD → DEAH), respectivamente, encontram-se relacionadas a funções de ligação e hidrólise do ATP, e que mutações dentro deste motivo II (DEAD) diminuem ou abolem as atividades de ATPase e helicase, sem alterar a ligação de RNA (CORDIN et al., 2006). O estudo realizado por DHALIA e colaboradores (2006) corroborou esta informação quando descreveu que o mutante DQAD induz um fenótipo negativo dominante em eIF4AI de *T. brucei*, resultando em uma inibição potente da síntese de proteínas no parasita. O motivo III (SAT), altamente conservado entre os organismos, encontra-se relacionado às atividades de ATPase e helicase. Mutações nesse motivo, como por exemplo, a mutação dupla AAA a qual os resíduos de serina e treonina são modificados por alanina (SAT → AAA), causam uma perda considerável da atividade da helicase, e possuem efeitos menores na ligação de ATP, hidrólise de ATP e ligação de RNA (CORDIN et al., 2006), fortalecendo o estudo realizado por ROCAK e colaboradores (2005) o qual observou que as substituições de alanina da serina e da treonina do motivo III em Has1p

(proteína DEAD-box de levedura) reduzem cerca de duas vezes a ligação e a hidrólise do ATP, além de reduzir ligeiramente a ligação ao RNA, e por isso, a atividade da helicase é severamente reduzida.

Trabalhos anteriores apontam que o eIF4A além de sua função de helicase, exerce outras funções quando associada a subunidades que atuam possivelmente como um estimulador de sua atividade (YOURIK et al., 2017; ADEDOJA et al., 2020). Diante disso, os resíduos DLYE e DFTV do eIF4A de humano (o último correspondendo ao motivo NHTV em *T. brucei*) foram implicados possivelmente na ligação da molécula de RNA, e de provável interação do eIF4A com o eIF4G. Estudos apontam que o domínio central do eIF4G humano possui dois motivos de ligação ao eIF4A, e que este tem sua atividade intensificada quando interage com a proteína eIF4G através do seu domínio C-terminal. Os motivos no domínio C-terminal do eIF4A implicados na interação com o eIF4G foram melhor mapeados em um estudo em que dois conjuntos de mutações duplas foram realizados, cada um substituindo dois resíduos conservados no EIF4A de eucariotos por resíduos encontrados em arqueias, onde não existem homólogos de eIF4G. De fato, cada conjunto de mutantes, direcionados justamente aos motivos DLYE e DFTV, aboliu a ligação ao eIF4G, atestando que há uma interrupção ou enfraquecimento da interação entre esses fatores (OBERER et al., 2005).

O quinto resíduo modificado na sequência de EIF4A de *T. brucei*, o qual substituiu uma arginina por uma alanina (GSSRVL → GSSAVL) no motivo IV, é conservado em humanos e *Giardia lamblia*, e foi indicado como possivelmente envolvido na interação do eIF4A com a subunidade eIF3i de *Giardia*. Um estudo anterior identificou, através de ensaios de duplo híbrido, uma interação do eIF4A de *Giardia* (GleIF4A) com a subunidade i do fator de iniciação GleIF3 (GleIF3i), componente do complexo de pré-iniciação (PIC), indicando que o GleIF4A também pode interagir diretamente com os componentes do PIC, e que o GleIF3i poderia servir como um estimulador da atividade do GleIF4A (ADEJOTA et al., 2020). Espera-se que a avaliação desse mutante em *T. brucei* possa reforçar ou não a possibilidade do eIF4A estar agindo via outras interações ainda não evidenciadas como a observada com o eIF3i em *Giardia*.

As linhagens que expressam a proteína contendo a mutação DQAD, a qual possui um sítio que afeta a atividade helicase e ATPase do EIF4A, apresentam um perfil de expressão representado por uma única isoforma, de forma similar ao EIF4A nativo. Contudo, embora não tenha sido possível observar alterações no parasita provocadas pela expressão da proteína nativa, foi observado uma leve redução em relação a taxa de proliferação celular do mutante DQAD. Este resultado vem de acordo com dados prévios, onde a mesma mutação levou a uma maior diminuição da taxa de crescimento celular em *T. brucei*, compatível com um efeito

dominante negativo (DHALLIA et al., 2006), e por isso todos os experimentos deste trabalho foram realizados nos períodos de tempo de no máximo 48h de indução das proteínas de fusão.

A partir dos dados da espectrometria de massas de proteínas co-precipitadas com o EIF4AI_{WT} de *T. brucei*, foi possível confirmar a interação desse fator com o complexo EIF4E4/EIF4G3, já descrito anteriormente através de ensaios *in vitro* de pull-downs e imunoprecipitação, tanto em *T. brucei* quanto em *L. major*, como o primeiro complexo implicado em um papel crítico na iniciação da tradução (DE MELO NETO OP et al., 2015; MOURA et al., 2015), reforçando ainda mais a prerrogativa da atuação deste homólogo no processo de tradução desses protozoários. A presença de outras proteínas com alto valor de enriquecimento e diversas enzimas metabólicas reforçam o papel de ligação ao mRNA desse homólogo na tradução, corroborando com estudo descrito anteriormente (DHALLIA et al., 2006).

Investigando o efeito da mutação EIF4AI_{DQAD} sobre as interações do EIF4AI, foi observado que o mutante por algum motivo, deixa de interagir com o complexo EIF4E4/EIF4G3 e passa a co-precipitar com mais intensidade com o complexo EIF4E3/EIF4G4/PABP2, já descrito em trabalhos anteriores, e também implicado possivelmente no processo de tradução, porém com características diferentes (FREIRE et al., 2011). Além disso, o mutante sofre uma redução significativa nas interações com enzimas metabólicas, e passa a ter um aumento considerável na interação com repressores, reforçando a interferência dessa mutação no processo de tradução, e algumas subunidades do fator eIF3 (REZENDE et al., 2014), reforçando o papel do sítio funcional no processo de tradução.

Outro objetivo desse estudo foi avaliar a resposta de *T. brucei* à ação de um inibidor da síntese de proteínas (Rocaglamide A), uma vez que o RocA reprime a tradução de mRNAs específicos, tendo como alvo o fator de iniciação eucariótico eIF4A (IWASAKI et al., 2016). Dados referentes a esse teste mostraram uma diminuição na taxa de proliferação celular nas culturas de *T. brucei* que foram submetidas ao RocA, porém com concentrações mais altas daquelas descritas anteriormente em algumas espécies, como em humanos, por exemplo (IWASAKI et al., 2019; TARONCHER-OLDENBURG et al., 2021). Isso porque esse inibidor exerce uma seletividade aos mRNAs relacionados as regiões 5'UTRs altamente estruturadas que dependem fortemente do desenrolamento mediado por eIF4A (IWASAKI et al., 2016). O efeito do RocA em *T. brucei*, necessitando de concentrações mais altas, pode ser explicado como reflexo do que foi observado nos dados de RNA seq (Bezerra, resultados não publicados), que mostram que o complexo do tipo eIF4F de *T. brucei* (EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI) tem sua atividade associada à tradução de mRNAs que possuem 5' UTRs muito curtas, o que

possivelmente não geram estruturas secundárias tão estruturadas. Além disso, duas mutações, F163L e I199M, tornam o eIF4A de *Aglaia* e levedura resistentes ao RocA (IWASAKI et al., 2019). Ao analisar a sequência do EIF4A de *T. brucei*, observamos que apenas o resíduo correspondente à isoleucina 199 é conservado, enquanto que o correspondente a fenilalanina 163 é substituído por uma valina, sugerindo, portanto, que devido a essa mudança, o RocA pode ter sua atividade diminuída no EIF4A de *T. brucei*.

Para uma análise funcional, foi utilizado um ensaio de *tethering* (ancoramento) onde a expressão de um mRNA repórter foi avaliada na presença e ausência de expressão ectópica do EIF4AI nativo e mutante. Para tal, foi utilizado o anticorpo anti-GFP para detecção do nível de expressão do repórter nas linhagens testadas, porém não foi possível detectar diferenças significativas no nível de expressão entre as proteínas nativa e mutante. Contudo, em ensaios utilizando o citômetro de fluxo, as diferenças puderam ser quantificadas, e foi observado um aumento de cerca de 30% na expressão de GFP na linhagem expressando o fator EIF4AI_{wt}-TY quando comparado com a cultura não induzida. Diferentemente do que foi observado na linhagem expressando a mutação DQAD que levou a uma diminuição da expressão de GFP. O resultado desse ensaio reforça o papel desse homólogo como um fator com função estimuladora sobre a expressão de mRNAs, semelhante ao que foi descrito por ERBEN *et al.*, 2014 o qual avaliou diferentes fragmentos das subunidades EIF4E4/3, EIF4G2/4/5 e a PABP1/2 de *T. brucei* através do ensaio de ancoramento, porém com outro mRNA repórter, e identificou que essas subunidades aumentavam a expressão do repórter. O ensaio de ancoramento realizado neste trabalho veio destacar a impotência da função de helicase do EIF4AI, pois sua função é afetada quando há uma mutação em seu sítio ativo, corroborando mais uma vez com o trabalho de Dhalia et al., 2006, que ao analisar o efeito da expressão do transgene *TbEIF4AI*_{DQAD} observou um fenótipo dominante negativo, afetando a síntese proteica e o crescimento celular, demonstrando que a atividade de RNA helicase de *TbEIF4AI* é necessária para a viabilidade do parasita.

Dados referente ao *tethering* na presença do inibidor de 4A mostraram que o RocA altera a resposta à ação do EIF4AI nativo no mRNA de GFP, impedindo a estimulação de sua expressão. De forma semelhante, a ação do RocA sobre um mRNA repórter foi descrita em estudo anterior no qual foram selecionadas 5'UTRs de mRNAs, e estes conferiram sensibilidade ao RocA em um repórter de luciferase (*Renilla*) (IWASAKI et al., 2016). Além disso foi observado através da técnica de *ribosome profiling* que a repressão de mRNAs suscetíveis a RocA é uniformemente mais fraca em células expressando um eIF4A com dupla mutação. Também foi visto através de um ensaio utilizando um repórter sintético com motivos

de polipurina em seu 5'UTR que as células com o duplo mutante reduziram a sensibilidade ao RocA desse repórter (IWASAKI et al., 2016).

Diante disso, este trabalho auxiliou na caracterização funcional do fator EIF4AI, identificando novas características e funções essenciais para o processo de síntese protéica nos tripanossomatídeos, que possam ser utilizadas como alvos para o desenvolvimento de agentes inibidores desse processos. Também foram geradas novas ferramentas, como os novos mutantes, que podem ser utilizados em experimentos futuros voltados a melhor definir o modo de ação do EIF4AI, delimitando qual o grau de conservação de sua função em diferentes organismos.

8 CONCLUSÕES

- I. As proteínas de fusão aos epítomos HA e TY, em sua forma nativa (*TbEIF4AI_{WT}*) e mutante (*TbEIF4A_{DQAD}*), são expressas como única isoforma.
- II. O homólogo EIF4AI nativo interage com parceiros funcionais, subunidades do complexo do eIF4F, evidenciando o papel desta proteína no processo de síntese proteica.
- III. Ensaios *in vivo* confirmam que o EIF4AI com uma mutação em seu sítio de helicase (DQAD) se liga a parceiros distintos dos observados com a proteína nativa.
- IV. A proteína EIF4AI_{WT}-TY aumentou a expressão de GFP, por meio do ensaio de ancoramento, reforçando o papel do EIF4AI nativo como uma proteína com função estimuladora sobre a expressão de mRNAs.
- V. No mesmo tipo de ensaio, o mutante EIF4AI_{DQAD}-TY diminuiu a expressão de GFP, destacando a importância da função de helicase do EIF4AI, pois sua função é afetada quando há uma mutação em seu sítio ativo.
- VI. O inibidor Rocaglamide A (RocA) exerce efeito inibitório quanto a expressão de GFP, em ensaio de ancoramento, reforçando mais uma vez o papel desse homólogo do eIF4A como uma proteína com função estimuladora sobre a expressão de mRNAs.
- VII. O inibidor RocA altera o crescimento celular de células procíclicas de *T. brucei*.

REFERÊNCIAS

- ADEDOJA A N., et al. Translation initiation factors GleIF4E2 and GleIF4A can interact directly with the components of the pre-initiation complex to facilitate translation initiation in *Giardia lamblia*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 236, p. 111258, 2020.
- AITKEN, C. E.; LORSCH, J. R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. *Nature structural & molecular biology*, v. 19, n. 6, p. 568-576, 2012.
- ALEXANDROV A. et al. Human eIF4AIII interacts with an eIF4G-like partner, NOM1, revealing an evolutionarily conserved function outside the exon junction complex. *Genes & development*, v. 25, n. 10, p. 1078-1090, 2011.
- ALLARD S; KOPIK K. Luciferase reporter assays: powerful, adaptable tools for cell biology research. *Cell Notes*. V. 21, p. 23-26, 2008.
- ALI, M. U. et al. Eukaryotic translation initiation factors and cancer. *Tumor Biology*, v. 39, n. 6, p. 1010428317709805, 2017.
- ANDREOU, A. et al. eIF4B and eIF4G Jointly Stimulate eIF4A ATPase and Unwinding Activities by Modulation of the eIF4A Conformational Cycle. *Journal of Molecular Biology*, Germany, v. 426, n. 1, p. 51–61, 2014.
- AKSOY, S. et al. Human African trypanosomiasis control: achievements and challenges. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 11, n. 4, p. e0005454, 2017.
- ARAÚJO, Patricia R.; TEIXEIRA, Santuza M. Regulatory elements involved in the post-transcriptional control of stage-specific gene expression in *Trypanosoma cruzi*: a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 3, p. 257-266, 2011.
- BABOKHOV P, et al. A current analysis of chemotherapy strategies for the treatment of human African trypanosomiasis. *Pathogens and global health*, v. 107, n. 5, p. 242-252, 2013.
- BARRETT, M. P., et al. The trypanosomiasis. *The Lancet*, v. 362, n. 9394, p. 1469–1480, 2003.
- BAYELE, H. K. *Trypanosoma brucei*: A putative RNA Polymerase II Promoter. *Experimental Parasitology*, v. 123, n. 4, p. 313–318, 2009.
- BUSCHER, P., et al. Human African trypanosomiasis. *The Lancet*, v. 390, n.10110, p. 2397–2409, 2017.
- BROWNING, K. S., & BAILEY-SERRES, J. Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. *The Arabidopsis Book*, v. 13, n. 0176, 2015.
- CARUTHERS JM. et al. Crystal structure of yeast initiation factor 4A, a DEAD-box RNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 97, n. 24, p. 13080-13085, 2000.
- CECCHI, G. et al. Developing a continental atlas of the distribution and trypanosomal infection of tsetse flies (*Glossina* species). *Parasites & vectors*, v. 8, n. 244, 2015.

- CHAN *et al.* eIF4A3 is a novel component of the exon junction complex. *RNA*, v. 10, n. 2, p. 200–209, 2004.
- CHU, J. *et al.* Rocaglates Induce Gain-of-Function Alterations to eIF4A and eIF4F. *Cell Reports*, v. 30, n. 8, p. 2481–2488, 2020.
- CHU, J. *et al.* CRISPR-Mediated Drug-Target Validation Reveals Selective Pharmacological Inhibition of the RNA Helicase, eIF4A. *Cell Reports*, v.15, n. 11, p. 2340–2347, 2016.
- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in *trypanosomes* and *leishmanias*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 156, n. 2, p. 93–101, 2007.
- CLAYTON, C. E. Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 195, n. 2, p. 96–106, 2014.
- CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. *Open Biology*, v. 9, n. 6, p. 190072, 2019.
- CNOPS, J. *et al.* Escape mechanisms of African trypanosomes: why trypanosomosis is keeping us awake. *Parasitology*, v. 142, n. 3, p. 417–427, 2015.
- COOPER, A., *et al.* A primate APOL1 variant that kills *Trypanosoma brucei gambiense*. *Plos Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 8, p. e0004903, 2016.
- CORDIN, O. *et al.* The DEAD-box protein family of RNA helicases. *Gene*, v. 367, p. 17–37, 2006.
- DAS, A. *et al.* RNA polymerase transcription machinery in Trypanosomes. *Eukaryotic cell*, v. 7, p. 429–434, 2008.
- DE GAUDENZI, J. G. *et al.* Gene Expression Regulation in Trypanosomatids. *Essays in Biochemistry*, v. 51, p. 31–46, 2011.
- MELO NETO. *et al.* The unique Leishmania EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. *RNA biology*, v. 12, n. 11, p. 1209–1221, 2015.
- MELO NETO. *et al.* Unique and conserved features of the protein synthesis apparatus in parasitic trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania*) species. In: *Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation*. Springer, Cham, 2016. p. 435–475.
- DHALIA, R. *et al.* Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. *Mol Biochem Parasitol.* v. 140, n. 1, p. 23–41, mar, 2005.
- DHALIA, R. *et al.* The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. *Nucleic acids research*, v. 34, n. 9, p. 2495–2507, 2006.
- ECHODU R. *et al.* Genetic Diversity and Population Structure of *Trypanosoma brucei* in Uganda: Implications for the Epidemiology of Sleeping Sickness and Nagana. *PLoS Negl Trop Dis.* V. 9, n. 2, p. e0003353, 2015.

- EL-SAYED, N. M. *et al.* Comparative Genomics of Trypanosomatid Parasitic Protozoa. *Science*. v. 309, p. 404-409, 2005.
- ECKHARDT, S. *et al.* Artificial tethering of Argonaute proteins for studying their role in translational repression of target mRNAs. In: *Argonaute Proteins*. Humana Press, 2011. p. 191-2006.
- ERBEN ED. *et al.* A genome-wide tethering screen reveals novel potential post-transcriptional regulators in *Trypanosoma brucei*. *PLoS pathogens*, v. 10, n. 6, p. e1004178, 2014.
- FAIRMAN-WILLIAMS, M. E., *et al.* SF1 and SF2 helicases: family matters. *Current Opinion in Structural Biology*, v. 20, n. 3, p. 313–324, 2010.
- FENN, K., E MATTHEWS, K. R. The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. *Current Opinion in Microbiology*, v. 10, n. 6, p. 539–546, 2007.
- FRANCO, J R. *et al.* Epidemiology of human African trypanosomiasis. *Clinical epidemiology*, v. 6, p. 257, 2014.
- FREIRE, E. *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*, v. 176, n. 1, p. 25-36, 2011.
- FREIRE, Eden *et al.* The role of cytoplasmic mRNA cap-binding protein complexes in *Trypanosoma brucei* and other trypanosomatids. *Pathogens*, v. 6, n. 4, p. 55, 2017.
- GADELHA, C., *et al.* Specializations in a successful parasite: What makes the bloodstream-form African trypanosome so deadly? *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 179, n.2, p. 51–58, 2011.
- GÜNZL, A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? *Eukaryotic Cell*, v. 9, n. 8, p. 1159–1170, 2010.
- GULAY S., *et al.* Distinct interactions of eIF4A and eIF4E with RNA helicase Ded1 stimulate translation in vivo. *Elife*, v. 9, p. e58243, 2020.
- GRIFO, J *et al.* RNA-stimulated ATPase activity of eukaryotic initiation factors. *J Biol Chem*. V.259, n.13, p.8648-54, 1984.
- IWASAKI, S *et al.* Rocaglates convert DEAD-box protein eIF4A into a sequence-selective translational repressor. *Nature*, v. 534, n. 7608, p. 558-561, 2016.
- IWASAKI, S *et al.* The translation inhibitor rocaglamide targets a bimolecular cavity between eIF4A and polypurine RNA. *Molecular cell*, v. 73, n. 4, p. 738-748. e9, 2019.
- LEITÃO, A., *et al.* Unzippers, Resolvers and Sensors: A Structural and Functional Biochemistry Tale of RNA Helicases. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 16, n.2, p. 2269–2293, 2015.
- LINDER P. *et al.* Birth of the DEAD box. *Nature*, v. 337, n. 6203, p. 121-122, 1989.

- HAILE, S; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. *Current opinion in microbiology*, v. 10, n. 6, p. 569-577, 2007.
- HILBERT, M., *et al.* The mechanism of ATP-dependent RNA unwinding by DEAD box proteins. *Biological Chemistry*, v. 390, n.12, 2009.
- HINNEBUSCH A; LORSCH JR. The mechanism of eukaryotic translation initiation: new insights and challenges. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, v. 4, n.10, p. a011544, 2012.
- HINNEBUSCH AG. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. *Annual review of biochemistry*, v.83, p.779-812, 2014.
- HERSKOWITZ, I. Functional inactivation of genes by dominant negative mutations. *Nature* v.329, p.219–222, 1987.
- IMATAKA, H.; SONENBERG, N. Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) possesses two separate and independent binding sites for eIF4A. *Mol. Cell Biol.*, Washington, v. 17, p. 6940-6947, 1997
- IVENS, A C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite *Leishmania major*. *Science*, v. 309, n. 5733, p. 436-442, 2005.
- JACKSON, R., *et al.* The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 11, n. 2, p. 113-127, 2010.
- JANKOWSKY, E.; FAIRMAN, ME. RNA helicases – one fold for many functions. *Curret Opinion in Structural Biology.*,v.17, p.316-324, 2007.
- JARMOSKAITE, I.; RUSSELL, R. DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA*, v.2, n.1, p.135–152, 2011.
- KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasites & vectors*, v.10, n.1, p. 287, 2017.
- KELLY, S. *et al.* Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: a collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 154, n. 1-4, p. 103, 2007.
- KENNEDY, Peter GE *et al.* Human African trypanosomiasis of the CNS: current issues and challenges. *The Journal of clinical investigation*, v. 113, n. 4, p. 496-504, 2004.
- KENNEDY, Peter GE. Clinical features, diagnosis, and treatment of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *The Lancet Neurology*, v. 12, n. 2, p. 186-194, 2013.
- KENNEDY, Peter GE. Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). *Journal of neurology*, v. 266, n. 9, p. 2334-2337, 2019.
- KISSINGER, J. C. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. *Trends in Parasitology*, v.22, n.6, p.240–243, 2006.
- KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and

translation in trypanosomatids. *TRENDS in Parasitology*, v. 27, n. 1, p. 23-30, 2011.

KRAMER S., *et al.* Differential localization of the two *T. brucei* poly (A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. *PloS one*, v. 8, n. 1, p. e54004, 2013.

KUKHANOVA, M. K., *et al.* DEAD-box RNA Helicase DDX3: Functional Properties and Development of DDX3 Inhibitors as Antiviral and Anticancer Drugs. *Molecules*, v.25, n.4, p. 1015, 2020.

LAMPHEAR, B. *et al.* Mapping of Functional Domains in Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4G (eIF4G) with Picornaviral Proteases: IMPLICATIONS FOR CAP-DEPENDENT AND CAP-INDEPENDENT TRANSLATIONAL INITIATION (*). *Journal of Biological Chemistry*, v. 270, n. 37, p. 21975-21983, 1995.

MITASHI, P *et al.* Diagnostic accuracy of loopamp *Trypanosoma brucei* detection kit for diagnosis of human African trypanosomiasis in clinical samples. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 10, p. e2504, 2013.

LIANG, Xue-hai *et al.* trans and cis Splicing in Trypanosomatids: Mechanism, Factors, and Regulation. *Eukaryotic cell*, v. 2, n. 5, p. 830-840, 2003.

LINDER, P; OWTTRIM, G W. Plant RNA helicases: linking aberrant and silencing RNA. *Trends in plant science*, v. 14, n. 6, p. 344-352, 2009.

LINDER, P; JANKOWSKY, E. From unwinding to clamping—the DEAD box RNA helicase family. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 12, n. 8, p. 505-516, 2011.

LOPES, A *et al.* Trypanosomatids: odd organisms, devastating diseases. *The Open Parasitology Journal*, v. 4, n. 1, 2010.

LUKES, J. *et al.* Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 195, n. 2, p. 115-122, 2014.

MARANDE, W. *et al.* Unique mitochondrial genome structure in diplomonads, the sister group of kinetoplastids. *Eukaryotic cell*, v. 4, n. 6, p. 1137-1146, 2005.

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

MARINTCHEV, A. *et al.* Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. *Cell, Cambridge*, v. 136, p. 447-460, 2009.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S *et al.* Gene expression in trypanosomatid parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v. 2010, 2010.

MINSHALL, N. *et al.* Translation control assessed using the tethered function assay in *Xenopus* oocytes. *Methods*. V. 51, n. 1, p. 165-169, 2010.

MARINTCHEV, A. Roles of helicases in translation initiation: A mechanistic view. *Biochimica et*

- Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms, v.1829, n.8, p.799–809, 2013.
- MATTHEWS, K R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. Journal of cell science, v. 118, n. 2, p. 283-290, 2005.
- MERRICK, W C. eIF4F: a retrospective. Journal of Biological Chemistry, v. 290, n. 40, p. 24091-24099, 2015.
- MOURA, D. M. Análise da participação de dois homólogos do fator eIF4G na iniciação da síntese protéica de *Trypanosoma brucei* . 2011. Tese (doutorado), 2011.
- MOURA, D. M. *et al.* Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. RNA biology, v. 12, n. 3, p. 305-319, 2015.
- MUGNIER, M R.; STEBBINS, C. Erec; PAPAVALIIOU, F. Nina. Masters of disguise: antigenic variation and the VSG coat in *Trypanosoma brucei*. PLoS Pathogens, v. 12, n. 9, p. e1005784, 2016.
- NIELSEN, P J.; TRACHSEL, H. The mouse protein synthesis initiation factor 4A gene family includes two related functional genes which are differentially expressed. The EMBO journal, v. 7, n. 7, p. 2097-2105, 1988.
- OWTTRIM, G W. RNA helicases and abiotic stress. Nucleic acids research, v. 34, n. 11, p. 3220-3230, 2006.
- OWTTRIM, G W. RNA helicases: diverse roles in prokaryotic response to abiotic stress. RNA biology, v. 10, n. 1, p. 96-110, 2013.
- OBERER, M; MARINTCHEV, A; WAGNER, G. Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G. Genes & development, v. 19, n. 18, p. 2212-2223, 2005.
- PAUSE, A. *et al.* Dominant negative mutants of mammalian translation initiation factor eIF-4A define a critical role for eIF-4F in cap-dependent and cap-independent initiation of translation. The EMBO journal, v. 13, n. 5, p. 1205-1215, 1994.
- PELLETIER, J.; SONENBERG, N. The Organizing Principles of Eukaryotic Ribosome Recruitment. Annual Review of Biochemistry, v.88, n.1, p.307–335, 2019.
- DOMENICALI PFISTER, D *et al.* A mitogen-activated protein kinase controls differentiation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. Eukaryotic cell, v. 5, n. 7, p. 1126-1135, 2006.
- POON, S. K. *et al.* A modular and optimized single marker system for generating *Trypanosoma brucei* cell lines expressing T7 RNA polymerase and the tetracycline repressor. Open biology, v. 2, n. 2, p. 110037, 2012.
- RAMANATHAN, A; ROBB, Gt; CHAN, Siu-Hong. mRNA capping: biological functions and applications. Nucleic acids research, v. 44, n. 16, p. 7511-7526, 2016.
- REZENDE, A M. *et al.* The translation initiation complex eIF3 in trypanosomatids and other

pathogenic excavates—identification of conserved and divergent features based on orthologue analysis. *BMC genomics*, v. 15, n. 1, p. 1-19, 2014.

ROCAK, S; LINDER, P. DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature reviews Molecular cell biology*, v. 5, n. 3, p. 232-241, 2004.

ROCAK, S et al. Characterization of the ATPase and unwinding activities of the yeast DEAD-box protein Has1p and the analysis of the roles of the conserved motifs. *Nucleic acids research*, v. 33, n. 3, p. 999-1009, 2005.

ROGERS, G W. et al. Modulation of the helicase activity of eIF4A by eIF4B, eIF4H, and eIF4F. *Journal of Biological Chemistry*, v. 276, n. 33, p. 30914-30922, 2001.

ROZOVSKY, N; BUTTERWORTH, A C.; MOORE, Melissa J. Interactions between eIF4AI and its accessory factors eIF4B and eIF4H. *Rna*, v. 14, n. 10, p. 2136-2148, 2008.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL. Aprovado primeiro tratamento exclusivamente oral para doença do sono. Disponível em: <https://www.sbmt.org.br/portal/first-exclusively-oral-treatment-for-sleeping-sickness-is-approved/>. Acesso em: 20 abr. 2021.

SENGOKU, T et al. Structural basis for RNA unwinding by the DEAD-box protein *Drosophila* Vasa. *Cell*, v. 125, n. 2, p. 287-300, 2006.

SILVA, Adalúcia Da. Utilização de um repórter fluorescente para a avaliação funcional de fatores envolvidos na iniciação da tradução de tripanossomatídeos. Universidade Federal de Pernambuco, 2016.

SIMARRO, P P. et al. The Atlas of human African trypanosomiasis: a contribution to global mapping of neglected tropical diseases. *International journal of health geographics*, v. 9, n. 1, p. 1-18, 2010.

SIMARRO, P P. et al. Human African Trypanosomiasis in Non-Endemic Countries (2000–2010). *Journal of Travel Medicine*, v. 19, n. 1, p. 44-53, 2012.

SIMPSON, A GB; STEVENS, J R.; LUKEŠ, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. *Trends in parasitology*, v. 22, n. 4, p. 168-174, 2006.

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

STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation*, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, 2008.

STUDER, M K. et al. Structural basis for DEAH-helicase activation by G-patch proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 117, n. 13, p. 7159-7170, 2020.

SOKABE, M.; FRASER, C. S. A helicase-independent activity of eIF4A in promoting mRNA recruitment to the human ribosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 114, n. 24, p. 6304–6309, 2017.

- SCHUTZ, P., *et al.* Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein-protein interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.105, n.28, p. 9564–9569, 2008.
- SUBRAMANIAM, C *et al.* Chromosome-wide analysis of gene function by RNA interference in the African trypanosome. *Eukaryotic Cell*, v. 5, n. 9, p. 1539-1549, 2006.
- TARONCHER-OLDENBURG, G *et al.* Targeting the DEAD-box RNA helicase eIF4A with rocaglates—a pan-antiviral strategy for minimizing the impact of future RNA virus pandemics. *Microorganisms*, v. 9, n. 3, p. 540, 2021.
- TIKHONENKOV, D V. *et al.* First finding of free-living representatives of Prokinetoplastina and their nuclear and mitochondrial genomes. *Scientific reports*, v. 11, n. 1, p. 1-21, 2021.
- VOIGTS-HOFFMANN F, *et al.* Structural insights into eukaryotic ribosomes and the initiation of translation. *Current opinion in structural biology*, v. 22, n.6, p. 768-777, 2012.
- YOURIK, P *et al.* Yeast eIF4A enhances recruitment of mRNAs regardless of their structural complexity. *Elife*, v. 6, p. e31476, 2017.
- YÁNGÜEZ, E.; NIETO, A. So similar, yet so different: Selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus Research*, v.156, n. 1-2, p. 1–12, 2011.
- ZINOVIEV, A; SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. *Comparative and functional genomics*, v. 2012, 2012.
- WIRTZ, E *et al.* A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*, v. 99, n. 1, p. 89-101, 1999.
- WORTHEN, C; JENSEN, B C.; PARSONS, M. Diverse effects on mitochondrial and nuclear functions elicited by drugs and genetic knockdowns in bloodstream stage *Trypanosoma brucei*. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 4, n. 5, p. e678, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). Disponível em: [http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-\(sleeping-sickness\)en/](http://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/trypanosomiasis-human-african-(sleeping-sickness)en/). Acesso: 19 maio 2021.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Human African trypanosomiasis. Disponível em: http://www.who.int/gho/neglected_diseases/human_african_trypanosomiasis/ Acesso: 19 maio 2021.