

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA**

LARISSA MÉLO DO NASCIMENTO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE HOMÓLOGOS
DO FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4G AO LONGO
DO CICLO DE VIDA DE *Leishmania amazonensis***

RECIFE - PE

2012

LARISSA MÉLO DO NASCIMENTO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE HOMÓLOGOS
DO FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4G AO LONGO
DO CICLO DE VIDA DE *Leishmania amazonensis***

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

Orientador: Drº Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Co-orientador: Drº Christian Robson de Souza Reis

Recife, PE

2012

Nascimento, Larissa Mélo do

Análise comparativa da expressão de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*/ Larissa Mélo do Nascimento. – Recife: O Autor, 2012.

95 folhas : il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientador: Christian Robson de Souza Reis

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências Biológicas. Genética e Biologia Molecular, 2011.

Inclui bibliografia

- 1. Genética de microrganismos 2. Tripanossomatídeos 3. *Leishmania* I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de II. Reis, Christian Robson de Souza III. Título.**

LARISSA MÉLO DO NASCIMENTO

**ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DE HOMÓLOGOS DO
FATOR DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO eIF4G AO LONGO DO CICLO DE
VIDA DE *Leishmania amazonensis***

APROVADO EM 13/03/2012

BANCA EXAMINADORA:

Presidente: Dr. Christian Robson de Souza Reis, FIOCRUZ-PE

1º Examinador: Dr. Antônio Carlos de Freitas, UFPE

2º Examinador: Dr^a. Constância Flávia Junqueira Ayres, FIOCRUZ-PE

3º Examinador: Dr. Bartolomeu Acioli dos Santos, FIOCRUZ-PE

1º Suplente: Dr^a. Tereza Cristina Leal Balbino, FIOCRUZ-PE

2º Suplente: Dr^a Cássia Docena, FIOCRUZ-PE

Recife, PE

2012

À minha avó Arlinda *in memoriam*

AGRADECIMENTOS

Agradeço inicialmente ao meu orientador Osvaldo Pompílio de Melo Neto por acreditar em mim quando muitos não o faziam, e por todo apoio profissional para o desenvolvimento desse trabalho, mesmo estando fisicamente distante, conseguiu com sabedoria e muito esforço está constantemente presente.

Também agradeço a meu co-orientador, Christian Reis, e a todos os amigos do BioMolTryp por me ensinarem lições científicas e muito mais que isso de amizade e companheirismo.

Ao corpo técnico do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães pelo apoio diário no andamento desse e de todos os trabalhos executados nesse departamento.

À infra-estrutura e organização do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães.

Ao fomento do projeto concedido pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco -FACEPE e a bolsa de estudos concedida pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq.

Agradeço a Filipe Mariz pelo amor, amizade, companheirismo... por tudo sempre.

Agradeço ao grande amor de minha Haydée.

Agradeço à minha mãe pelo amor, apoio e dedicação sem tamanho, por quem minha admiração e respeito só crescem a cada dia.

Agradeço a meu pai por seu amor e por toda confiança na vitória que ele me deposita.

Agradeço ao contínuo apoio técnico-científico, e principalmente carinho e amor sem tamanho, que minha tia Eliane sempre me dedicou, fazendo parte de todas as minhas conquistas.

Agradeço ao meu irmão, sobrinhos, cunhados, sogra, tios, avós, primos e aqueles amigos que se tornaram irmãos, que embora na maioria das vezes nem saibam do que se trata o objeto de meu de estudo, são peças indispensáveis para a realização deste.

E por último, porém de maior importância, agradeço ao Meu Deus que jamais desistiu de mim, sempre me amou e nas horas mais difíceis me amou ainda mais. Agradeço-te Senhor quando Tua palavra me diz “Quero trazer a memória tudo aquilo que me traz esperança” Jó cap. 3;21.

“...O meu interior é uma atenção voltada para fora
O meu viver escuta
A frase que de coisa em coisa silabada
Grava no espaço e no tempo a sua escrita

Não tenho explicações
Olho e confronto
E, por método, é nu meu pensamento

De tudo quanto vejo me acrescento...”
(Sophia Mello Breyner)

RESUMO

O gênero *Leishmania* compreende 30 espécies de protozoários flagelados pertencentes a família Trypanosomatidae, donde 20 são patogênicas ao homem. Esses organismos apresentam ciclos de vida complexos e peculiaridades moleculares frente à maioria dos eucariontes, como a ausência de regulação transcricional. Desse modo, a regulação da expressão gênica nesses parasitas é efetuada em etapas pós-transcricionais, dentre essas a mais importante é o processo de iniciação da tradução dos mRNAs, onde diferentes fatores denominados eIFs (*eukariotic initiation factors*) estão envolvidos. Dentre esses fatores se destaca o complexo eIF4F com função de promover o reconhecimento e ligação de RNAs maduros aos ribossomos. Tal complexo é composto de três sub-unidades: eIF4A (RNA helicase); eIF4E (proteína de ligação ao *cap*); e eIF4G (proteína multidomínio estruturadora do complexo eIF4F). Em tripanossomatídeos se sabe da existência de cinco homólogos da sub-unidade eIF4G distintos (EIF4G1 ao G5), contudo, pouco se sabe sobre a ocorrência e funções celulares desses homólogos. Portanto o objetivo do presente trabalho foi avaliar a expressão dos diferentes homólogos do eIF4G durante o ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*, caracterizando as possíveis modificações pós-traducionais por fosforilação que possam estar agindo sobre tais fatores, uma vez que em eucariotos superiores mecanismos de regulação global da tradução por fosforilação dos eIFs via MAP quinases já são conhecidos. Para tal, foram realizadas culturas de *L. amazonensis* nas formas promastigota e amastigota-axênicas, e os extratos protéicos provenientes de diferentes fases do crescimento foram analisados através de *Western blot*. Foi observado que os homólogos de eIF4G estão presentes durante todo o ciclo de vida de *L. amazonensis*. Podendo ser observado que os EIF4G1, G4 e G5 apresentaram mais de uma isoforma proteica sugestiva de possíveis modificações pós-traducionais desses homólogos. Em consequente, a expressão de EIF4G3 e EIF4G4 foi analisada em condições especiais de cultivo na presença de seis inibidores diferentes, contudo nenhuma dessas condições alterou a expressão desses fatores, revelando que essas proteínas são bastante estáveis e possuem tempo de meia-vida prolongado. Posteriormente, o mapeamento *in silico* de sítios de fosforilação por MAP quinases nos EIF4Gs de *Leishmania* spp. demonstra a existência de sítios de fosforilação específicos em todos os homólogos E a purificação de fosfoproteínas confirma a existência de mecanismos de fosforilação agindo nos EIF4G3 e EIF4G4. Esses resultados auxiliam no esclarecimento dos mecanismos moleculares, até então obscuros, envolvidos na regulação da expressão gênica pós-transcricional característica desses organismos.

Palavras-chave: tripanossomatídeos; fatores de iniciação da tradução; eIF4G, regulação da tradução; fosforilação por MAP quinases.

ABSTRACT

The genus *Leishmania* comprises 30 species of flagellated protozoa from the family Trypanosomatidae, of which 20 are pathogenic to humans. These organisms have complex life cycles and molecular particularities not observed in most eukaryotes, like absence of transcriptional regulation. Thus, the regulation of gene expression occurs in post-transcriptional steps, with the initiation of mRNA translation representing the most important event. Different factors called eIFs (eukariotic initiation factors) are involved, with emphasis in eIF4F complex, which promotes mRNA recognition and its ribosome interaction. This eIF4F complex consists of three subunits: eIF4A (RNA helicase), eIF4E (cap binding protein) and eIF4G (scaffold protein, for eIF4F complex maintenance). In trypanosomatids, five eIF4G homologous (EIF4G1 to G5) was described, however, little is known about the specific cellular functions of these homologous. In this manner, we evaluated the expression and characterized post-translational modifications of the eIF4G homologous during the *Leishmania amazonensis* life cycle, especially phosphorylation, considering the translational regulation by phosphorylation of eIF's via MAP kinases observed in higher eukaryote. For this reason, cultures were performed with the *L. amazonensis* promastigote and amastigote axenic forms, and the protein extract, collected from different growth phases, were analyzed by Western blotting. These results demonstrated the detection of all eIF4G homologues during the life cycle of *L. amazonensis*, while more than one protein isoform were observed for the EIF4G1, G4 and G5 homologues, suggesting possible post-translational modifications. Posteriorly, the EIF4G3 and EIF4G4 gene expression were investigated under differential growth conditions using six distinct inhibitors, however no change was observed in the expression pattern, which suggests that these proteins are quite stable and have long half-life extending. Finally, *In silico* analysis shows specific MAP kinase-dependent phosphorylation sites presents in all eIFG homologues and further analysis with EIF4G3 and EIF4G4 confirmed the existence of phosphorylation mechanisms acting on these factors. These present data help to clarify the molecular mechanisms involved in post-transcriptional regulation of gene expression characteristic of these organisms.

Keywords: trypanosomatids; translation initiation factors, eIF4G, translational regulation, phosphorylation by MAP kinases.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Árvore filogenética estimada dos Kinetoplastídeos.	18
Figura 2. Ciclo de vida de <i>T. brucei</i>	20
Figura 3. Ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	21
Figura 4. Taxonomia de <i>Leishmania</i>	23
Figura 5. Distribuição geográfica das leishmanioses.	24
Figura 6. Mudanças morfológicas de <i>Leishmania</i> spp. durante o ciclo de vida.	25
Figura 7. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp.	26
Figura 8. Formas clínicas das Leishmanioses.	28
Figura 9. Transcrição Policistrônica em Tripanossomatídeos.	32
Figura 10. Etapas do processamento em <i>trans-splicing</i> do pré-RNA.	33
Figura 11. Processamento em <i>trans-splicing</i> e poliadenilação do pré-mRNA.	34
Figura 12. Transcrição e processamento de mRNAs.....	37
Figura 13. Modelo genérico de regulação da tradução através da interação mRNA/RBP.....	40
Figura 14. Modelo da iniciação da tradução <i>cap</i> -dependente.....	42
Figura 15. Ilustração do complexo eIF4F e PABP ligados ao mRNA maduro.....	43
Figura 16. O eIF4G humano, domínios de interação e respectivos ligantes.....	47

Figura 17. Homólogos de eIF4G em tripanossomatídeos.....	49
Figura 18. Representação de rastreamento <i>in silico</i> de sítios de fosforilação.....	62
Figura 19. Completa separação de proteínas não-fosforiladas e fosforiladas.....	63
Figura 20. Padrão de crescimento de <i>L. amazonensis</i>	65
Figura 21. Perfil do crescimento de <i>L. amazonensis</i> durante diferenciação.....	66
Figura 22. Super-expressão dos homólogos EIF4G1 a EIF4G5 fusionados a GST e teste de eficiência de purificação e reconhecimento dos anticorpos específicos.....	67
Figura 23. Expressão dos homólogos eIF4G ao longo do crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	69
Figura 24. Expressão dos cinco homólogos de eIF4G (EIF4G1 a EIF4G5) durante diferenciação <i>in vitro</i> de <i>L. amazonensis</i>	71
Figura 25. Análise da expressão dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 durante cultivo na presença de diferentes inibidores celulares.....	72
Figura 26. Análise da expressão dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 durante cultivo na presença de sinefungina.....	73
Figura 27. Análise da expressão dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 durante cultivo na presença de inibidores de vias específicas.....	73
Figura 28. Representação esquemática dos sítios de fosforilação nos homólogos de eIF4G de <i>Leishmania</i> spp.....	75
Figura 29. Purificação de fosfoproteínas e análise da fosforilação ocorrida nos homólogos eIF4G3 e eIF4G4 de <i>L. amazonensis</i>	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição de <i>Leishmania</i> spp. por região geográfica e tropismo tecidual.	27
Tabela 2. Características dos homólogos de eIF4G preditos em <i>L. major</i>	49
Tabela 3. Construções plasmidiais utilizadas para super-expressão dos homólogos de eIF4G fusionados à cauda de GST.	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Definição

4E-BP	elf4E Binding Protein /Proteína de ligação ao eIF4E
BSA	Bovine Serum Albumin /Albumina Bovina Sérica
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool / Ferramenta de busca e alinhamento local básico
eIF	Eukaryotic Initiation Factors / Fatores de Iniciação Eucariótico
HAT	Human African Trypanosomiasis /Tripanossomatíases Africana Humana
HEAT	Huntingtina , Fator de Elongação 3 , subunidade A da fosfatase 2A e proteína alvo da rapamicina 1/TOR1)
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HSP	Heat Shock Protein / Proteína de Choque Térmico
IRES	Internal Ribosome Entry Sites /Seqüência de entrada interna ribossomal
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LM	Leishmaniose Muco-cutânea
LV	Leishmaniose Visceral
miRNA	Micro RNA
PABP	Poli(A) tail Binding Protein / Proteína de ligação à cauda Poli(A)
P-bodies	Processing Bodies / Grânulos de Processamento
PKDL	Post Kalazar Dermal Leishmaniasis /Leishmaniose Dérmica Pós-kalazar
RBP	RNA Binding Protein /Proteína de ligação ao RNA
RNA	Ácido Ribonucléico
RNApol	RNA polimerase
rRNA	RNA ribossômico
SIDER	Short Interspeded Degenerates Retroposons
SL	Spliced Leader
sRNA	Small RNA /Pequenos RNA
SSR	Switch Strand Region / Região de troca de fita
TriTryps	<i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Trypanosoma cruzi</i> e <i>Leishmania major</i>
tRNA	RNA transportador
URE	Uridine Rich Elements / Elementos Ricos em Uridina
UTR	Untranslated Region / Região não-traduzida

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 KINETOPLASTÍDEOS	17
2.2 TRIPANOSSOMATÍDEOS E DOENÇAS RELACIONADAS	17
2.2.1 <i>T. Brucei</i> e a Tripanossomíase Africana Humana	18
2.2.2 <i>T. Cruzi</i> e a doença de Chagas	20
2.2.3 <i>Leishmania</i> spp. e as leishmanioses	22
2.3 Biologia Molecular de Tripanossomatídeos	30
2.3.1 Características e organização genômica	30
2.3.2 Transcrição Gênica	31
2.3.3 Processamento dos RNAs policistrônicos	32
2.4 REGULAÇÃO GÊNICA	34
2.4.1 Processamento diferencial de pré-RNAs	35
2.4.2 Controle da exportação nuclear	35
2.4.3 Controle da estabilidade, degradação e tráfego intracelular de mRNAs	36
2.4.4 Regulação da Tradução proteica	39
2.5 TRADUÇÃO PROTEICA	40
2.5.1 Iniciação da Tradução	41
2.5.2 Complexo de Iniciação da Tradução- eIF4F	43
2.5.2.1 eIF4E- Proteína de ligação ao <i>cap</i>	43
2.5.2.2 eIF4A- RNA helicase	45
2.5.2.3 eIF4G-Proteína multidomínio de modulação do complexo eIF4F	46
2.5.3 Regulação Global da Tradução	50
3. OBJETIVOS	56
3.1 OBJETIVO GERAL	56
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 CULTIVO DE PARASITAS	57
4.2 CURVAS DE CRESCIMENTO DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	57

4.3 CURVAS DE DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	58
4.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM <i>Escherichia coli</i>	58
4.5 PURIFICAÇÃO DE ANTI-CORPOS POR IMUNOADSORÇÃO	59
4.6 ENSAIOS DE <i>WESTERN-BLOT</i>	60
4.7 CULTIVO DOS PARASITAS NA PRESENÇA DE INIBIDORES DE PROCESSOS CELULARES ESPECÍFICOS	60
4.8 RASTREAMENTO DE POSSÍVEIS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO POR MAP QUINASES NOS HOMÓLOGOS DE eIF4G	62
4.9 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DE FOSFOPROTEÍNAS	62
5. RESULTADOS	64
5.1 CURVAS DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	64
5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS HOMÓLOGOS DE eIF4G DURANTE O CICLO DE VIDA DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	66
5.2.1 Análise da expressão dos homólogos de eIF4G em curvas de crescimento de promastigotas	68
5.2.2 Análise da expressão dos homólogos de eIF4G em cultura de diferenciação de amastigotas-axênicas	69
5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS HOMÓLOGOS DE eIF4G3 e eIF4G4 DE <i>L. AMAZONENSIS</i> SOB CONDIÇÕES DIFERENCIAIS DE CULTIVO	71
5.4 IDENTIFICAÇÃO <i>IN SILICO</i> DE POSSÍVEIS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO NOS HOMÓLOGOS eIF4G DE <i>LEISHMANIA</i>	74
5.5 IDENTIFICAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO NOS HOMÓLOGOS eIF4G3 e eIF4G4 DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	75
6. DISCUSSÃO	77
7. CONCLUSÕES	83
8. REFERÊNCIAS	84
9. MEMORIAL	95

1. INTRODUÇÃO

Leishmania spp. são protozoários parasitas intracelulares, pertencentes à família Tripanosomatidae, causadores de doença de sintomatologia espectral denominada leishmaniose. A Organização Mundial de Saúde estima a existência de 12 milhões de infectados em todo mundo com prevalência de dois milhões de novos casos anuais sendo que 500 mil são do tipo leishmaniose visceral e 1,5 milhões de casos cutâneos.

O homem é o hospedeiro acidental da leishmaniose devido à expansão das áreas urbanas sobre as regiões de mata, já que os hospedeiros selvagens são canídeos, roedores e lagomorfos. Esses hospedeiros vertebrados são contaminados durante o repasto sanguíneo de insetos vetores dípteros do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo, os hospedeiros invertebrados. Desse modo, ocorre a inoculação em vias periféricas de formas infectivas do parasita, promastigotas metacíclicas. Essas formas são fagocitadas por células polimorfonucleares e passam a existir na forma amastigota, aflagelada e reprodutiva, no interior de fagolisossomos. Uma vez que o hospedeiro infectado é novamente picado as amastigotas são ingeridas e, no vetor invertebrado, se diferenciam em formas infectivas completando o ciclo de vida do patógeno.

Uma área de especial interesse no que concerne a biologia de *Leishmania*, se trata do estudo de como a expressão de genes é regulada, permitindo a esse microrganismo se adaptar rapidamente às mudanças ambientais. Contudo como os tripanossomatídeos são organismos que divergiram precocemente durante a evolução, os mecanismos moleculares que regem a regulação gênica não são bem compreendidos. Diferentemente dos eucariotos superiores, ocorre ausência de regulação da transcrição, sendo os genes transcritos constitutivamente em RNAs policistrônicos que irão ser processados por *trans-splicing* e poliadenilação.

Acredita-se que o controle da expressão gênica nos tripanossomatídeos ocorra em níveis pós-transcricionais. Ocorrendo através do controle do processamento, transporte, estocagem e estabilidade dos RNAs, bem como, o controle da biossíntese das proteínas e modificações pós-traducionais das mesmas. Dentre os processos citados, o controle da tradução de mRNAs é o mecanismo mais complexo para a regulação da expressão gênica. A iniciação da tradução, assim, é uma etapa chave, sujeita a diferentes mecanismos de regulação, definindo quando, quais e com que intensidade os mRNAs

serão traduzidos. Nesta etapa, um número variável de fatores de iniciação da tradução ou eIFs (do inglês, *eukaryotic Initiation Factors*) estão envolvidos, destacando-se o complexo eIF4F, um heterotrímero composto pelas subunidades eIF4E, ou subunidade de reconhecimento do *cap*, do eIF4A, uma RNA helicase, e do eIF4G, uma proteína estruturadora do complexo responsável pelo recrutamento ribossomal.

Diferentemente dos demais eucariotos os tripanossomatídeos apresentam múltiplos homólogos das subunidades do eIF4F, sendo identificados seis homólogos para eIF4E, cinco para eIF4G além de dois homólogos de eIF4A. Também já é conhecido que alguns desses homólogos co-existem formando ao menos dois complexos eIF4F distintos com funções diferenciadas na síntese protéica. Pouco se sabe, entretanto, sobre o modo de ação dos complexos identificados e também qual seria a função dos demais homólogos de eIF4E e eIF4G no processo de síntese protéica. Dados recentes sugerem fortemente que, ao menos no caso dos homólogos de eIF4E, o controle de sua função está associado a mudanças pós-traducionais do tipo fosforilação. O presente trabalho visa então avaliar o perfil de expressão dos diferentes homólogos de eIF4G e a possível modificação pós-traducional por fosforilação que estaria ocorrendo nestes fatores ao longo do ciclo de vida de *Leishmania* spp., utilizando-se o modelo experimental da *Leishmania amazonensis*, cujo ciclo de vida pode ser mimetizado *in vitro*.

No Brasil, as políticas de saúde empregadas no controle da leishmaniose vêm sendo consideradas fracassadas, ocasionando o aumento da incidência e a expansão das áreas de transmissão. Como exemplo, a leishmaniose visceral, a forma mais letal da doença, está distribuída em 17 dos 27 estados, com maior incidência no Nordeste, com 92% do total de casos. Considerando à ausência de ferramentas eficientes de tratamento e prevenção das leishmanioses, o desenvolvimento de novos quimioterápicos menos tóxicos e mais eficazes depende de um conhecimento maior sobre os processos biológicos desses agentes etiológicos. A tradução protéica é um alvo amplamente utilizado por quimioterápicos que agem sobre diferentes grupos de organismos e, devido às diferenças biológicas no processo de tradução entre eucariotos superiores e os tripanossomatídeos, o desenvolvimento de inibidores da síntese proteica nesses organismos é considerada uma estratégia em potencial.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 KINETOPLASTÍDEOS

Os kinetoplastídeos constituem um grupo de protozoários flagelados caracterizado pela presença do kinetoplasto, uma região rica em DNA contida em sua única e grande mitocôndria (STUART, *et al.*, 2008). Eles são representados por uma variedade de espécies de vida livre e alguns patógenos, parasitas de invertebrados, vertebrados e até mesmo plantas (SIMPSON *et al.*, 2006). A biologia celular desses organismos é em sua maioria similar, sendo que todos os representantes possuem formas móveis devido a presença de um flagelo único originado a partir de uma bolsa flagelar na membrana celular localizada próximo a mitocôndria. Outras características em comum são seus peroxissomos modificados para realizar glicólise chamados de glicossomos, suas membranas celulares que apresentam diversas moléculas espécie-específicas e são estruturadas por um citoesqueleto de microtúbulos. Em sua maioria os kinetoplastídeos crescem assexuadamente por fissão binária durante a qual não ocorrem a dissolução da membrana nuclear e a condensação cromossômica (STUART, *et al.*, 2008).

A Ordem Kinetoplastida foi criada a mais de quarenta anos para unir duas famílias: Trypanosomatidae e Bodonidae. O grupo mais proximamente relacionado a esse táxon são os Diplonemídeos que são protozoários de vida livre que podem ser facultativamente parasitas de invertebrados. Os Diplonemídeos por sua vez são relacionados aos Euglenídeos e juntos representam um ramo ancestral aos Kinetoplastídeos (SIMPSON *et al.*, 2006) (Figura 1).

2.2 TRIPANOSSOMATÍDEOS E DOENÇAS RELACIONADAS

Dentre os kinetoplastídeos se destacam os tripanossomatídeos, organismos da família Trypanosomatidae, por apresentarem dois gêneros de importância médica, *Trypanosoma* e *Leishmania*. No gênero *Trypanosoma* se destacam duas espécies causadoras de doenças em humanos, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi* responsáveis pelo desenvolvimento da doença do sono e doença de Chagas,

respectivamente e no gênero *Leishmania* aproximadamente 20 espécies causam as diversas manifestações clínicas das Leishmanioses (STUART, *et al.*, 2008).

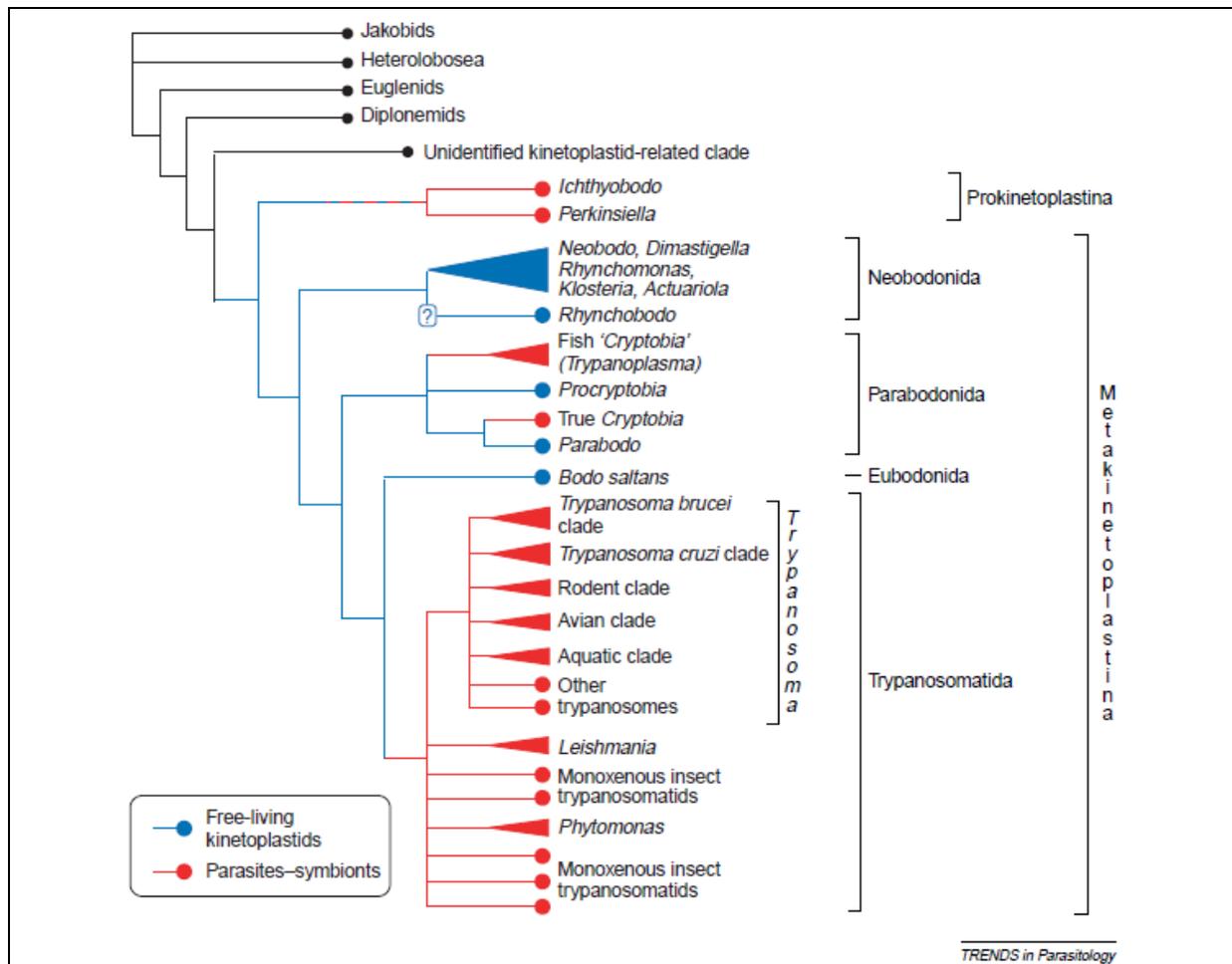


Figura 1. Árvore filogenética estimada dos Kinetoplastídeos. Linhas pretas são ramos fora do grupo de Kinetoplastídeos. Linha tracejada vermelha-azul indica ramificação desconhecida. Círculos representam um ou poucos representantes. Triângulos denotam diversos representantes conhecidos. Interrogação representa posição em clado instável (Fonte: SIMPSON *et al.*, 2006).

2.2.1 *T. brucei* e a Tripanossomíase Africana Humana

A doença do sono ou Tripanossomíase Africana Humana é causada por parasitas do gênero *Trypanosoma*, possuindo duas variantes de acordo com a espécie envolvida na infecção; A Tripanossomíase do leste africano causada pelo *T. brucei rhodesiense* e a do oeste africano onde o agente etiológico é *T. brucei gambiense* (KENNEDY, 2008). A HAT (do inglês, *human African Trypanosomiasis*) é endêmica em 36 países da África Sub-Saariana, sendo epidêmica em Angola, Uganda, Sudão e República Democrática do Congo. As taxas de mortalidade são imprecisas, mas OMS estima a prevalência de

300.000 a 500.000 novos casos anuais. Desse montante, somente 50 casos são relatados fora da África (KENNEDY, 2008; STUART, *et al.*, 2008).

O ciclo de transmissão da HAT se inicia quando moscas Tsé-Tsé (dípteros do gênero *Glossina*) ao se alimentarem do sangue de animal ou homem previamente infectado, ingerem formas tripomastigotas sanguíneas dos *Trypanossoma* spp. Essas vão sofrer uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas no trato digestivo das moscas, transformando-se na forma tripomastigota procíclica replicativa e intestinal e em seguida na forma epimastigota replicativa que migra para glândulas salivares. Por fim ocorre a transformação para a forma tripomastigota metacíclica infectiva, que é inoculada em novo hospedeiro vertebrado durante novo repasto sanguíneo do inseto vetor (KENNEDY, 2008; STUART, KEN *et al.*, 2008) (Figura 2).

De uma a três semanas após a picada do vetor contaminado, os parasitas se espalham pela corrente sanguínea do hospedeiro e invadem o sistema linfático e outros órgãos como fígado, baço, coração e olhos. Esse é o estágio primário da doença ou hemolinfático, onde uma série de sintomas não específicos são relatados como dor de cabeça, perda de peso, artralgia, mal-estar, fadiga, febre, vômito e linfadenopatia, com o aumento dos gânglios linfáticos cervicais posteriores típico da infecção causado por *T. brucei gambiense*. Em algumas semanas, no caso de infecção por *T. brucei rhodiense*, ou alguns meses, se *T. brucei gambiense*, os parasitas cruzam a barreira hemato-encefálica e invadem o sistema nervoso central, iniciando a fase secundária da doença ou estágio encefálico. Nesse estágio a sintomatologia também é multiforme e incluem distúrbios psiquiátricos e mentais (ex: irritabilidade, alucinações, impulsos sexuais descontrolados, ansiedade, agressividade), distúrbios do sono (ex: alteração do ciclo circadiano, sonolência profunda), distúrbios motores (ex: tremores, movimentos desordenados, mielopatia, reflexos diminuídos e involuntários) e ainda distúrbios sensoriais e visuais. Se não tratado, ou não for obtido sucesso no tratamento, o curso natural da doença é o aumento progressivo dos danos cerebrais e finalmente a morte (KENNEDY, 2008; STUART, *et al.*, 2008).

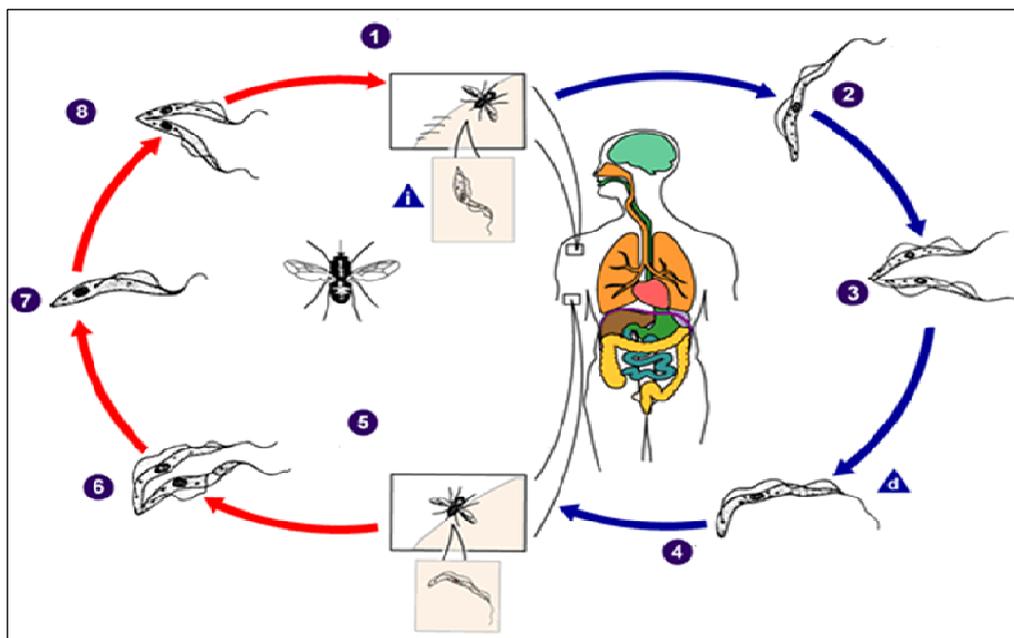


Figura. 2 Ciclo de vida de *T. brucei*. Durante o repasto sanguíneo, uma mosca Tsé-tsé infectada injeta tripomastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro mamífero; **1**- Os parasitas entram no sistema linfático e passam para a corrente sanguínea; **2**- No hospedeiro se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas; **3** – Os parasitas atingem outros fluidos biológicos (ex: linfa e líquido espinhal) e se replicam por fissão binária; **4**- Tripomastigotas sanguíneas passíveis de ingestão pela mosca; **5**- Moscas tsé-tsé fazem o repasto sanguíneo ingerindo tripomastigotas sanguíneas; **6**- No intestino da mosca os parasitas se transformam em tripomastigotas procíclicos e se multiplicam por fissão binária; **7**- Deixam o intestino e se transformam em epimastigotas; **8**- Epimastigotas se multiplicam nas glândulas salivares e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas. Triângulo azul contendo “d”- fase de diagnóstico; triângulo azul contendo “i”- fase infectiva. (Fonte: <<http://dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em: 10 nov. 2011).

2.2.2 *T. cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, descrita por Carlos Chagas em 1909 é uma zoonose causada pela infecção por *T. cruzi* prevalente em 19 países do continente Americano e ocorrendo do Sudeste dos Estados Unidos até o Sudeste da Argentina. É estimada a existência de oito a 12 milhões de infectados e a taxa de mortalidade é de 12. 500 óbitos anuais com a incidência de 40. 000 novos casos a cada ano (MONCAYO; SILVEIRA, 2009). Esta é uma enfermidade transmitida ao homem, principalmente, por insetos vetores infectados *Triatomineae* (popularmente denominados de barbeiros). Estes insetos depositam formas tripomastigotas metacíclicas próximo ao ferimento causado pela picada durante a alimentação. Essas invadem o ferimento e infectam células vizinhas se diferenciando em amastigotas, formas aflagelares reprodutivas e intracelulares. As formas amastigotas podem novamente se diferenciar em tripomastigotas sanguíneas infectando novas células em diferentes tecidos. O ciclo de

vida do parasita se reinicia quando o vetor se infecta ingerindo o sangue do hospedeiro infectado (STUART, *et al.*, 2008) (Figura 3). Paralelamente o *T. cruzi* pode ser transmitido por transfusão sanguínea, transplante de órgãos sólidos ou medula óssea, transmissão congênita, infecção oral através da ingestão de alimentos contaminados e ainda através da inoculação sanguínea direta por compartilhamento de seringas entre usuários de drogas portadores de HIV (LESCURE *et al.*, 2010; MONCAYO; SILVEIRA, 2009).

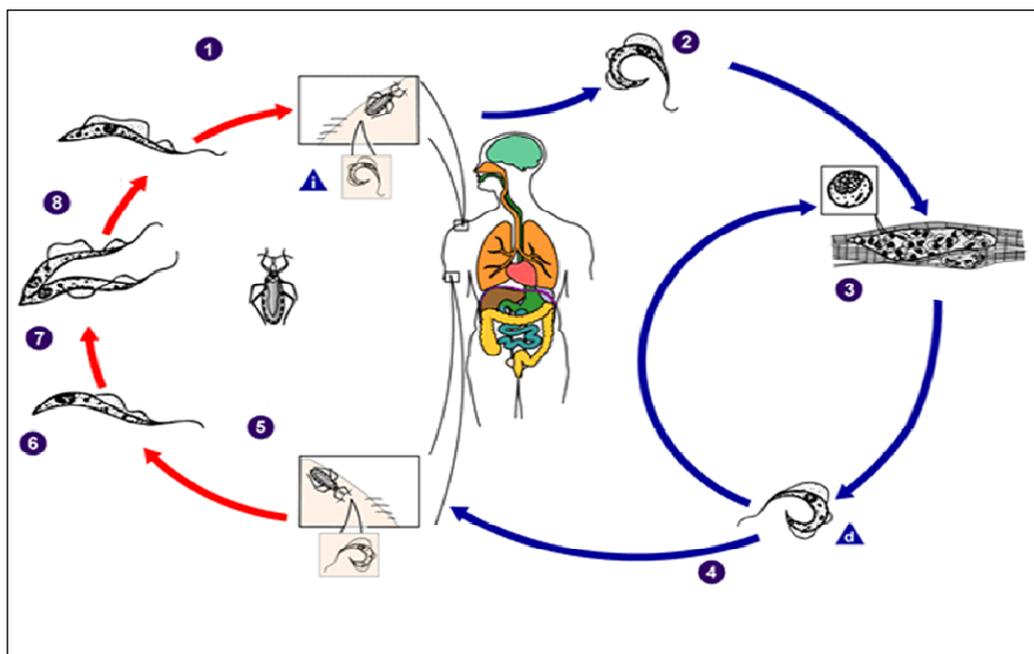


Figura 3. Ciclo de vida do *T. cruzi*. O barbeiro infectado ao se alimentar libera formas tripomastigotas nas fezes. 1- Tripomastigotas entram através da derme ferida ou mucosa intacta. 2- Invadem as células próximas se diferenciando em amastigotas. 3- Amastigotas se multiplicam por fissão binária. 4- Amastigotas se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas e podem infectar novas células 5- O barbeiro se infecta ao se alimentar de sangue do hospedeiro. 6- Os tripomastigotas ingeridos se transformam em epimastigotas no intestino do inseto vetor. 7- Os parasitas se multiplicam e se diferenciam 8- E se tornam tripomastigotas metacíclicos infectivos no intestino posterior. Triângulo azul contendo “d”- fase de diagnóstico; triângulo azul contendo “i”- fase infectiva. (Fonte: <<http://dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em: 10 nov. 2011).

A patogênese da infecção pelo *T. cruzi* ocorre inicialmente de forma aguda, com inflamações focais, como edema bipalpebral unilateral ou bilateral (sinal de Romana) e conjuntivite, ou ainda, inflamações difusas, como linfadenopatia e meningoencefalites (LESCURE *et al.*, 2010). Posteriormente, na ausência de deficiências imunológicas, ocorre diminuição da parasitemia e remissão da sintomatologia. Aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem a forma crônica da doença ou doença de Chagas propriamente dita (STUART, *et al.*, 2008), caracterizada por reação inflamatória fibrótica que pode danificar o miocárdio e o sistema de condução nervosa cardíaco) e ainda o intestino e o sistema nervoso entérico (LESCURE *et al.*, 2010).

2.2.3 *Leishmania* spp. e as leishmanioses

No final do século XVIII Cunningham, Borovsky, Leishman, Donovan, Wright, Lindenberg e Vianna identificaram independentemente o parasita causador da leishmaniose, o qual Ronald Ross deu o nome genérico de *Leishmania* (WHO, 2010). Atualmente o gênero *Leishmania* é dividido em dois sub-gêneros, o *Leishmania* presente no Velho e no Novo Mundo e o sub-gênero *Viannia* restrito ao Novo Mundo. Essa divisão baseia-se no desenvolvimento do parasita nos flebotomíneos, já que o desenvolvimento dos representantes do sub-genero *Leishmania* é supra-pilórico, restrito a partes anteriores à junção do intestino médio com o intestino posterior. Já nas espécies do sub-gênero *Viannia* o desenvolvimento é peri-pilórico ocorrendo tanto no intestino médio quanto no posterior (BATES, 2007).

As relações filogenéticas entre diferentes espécies de *Leishmania* foram subseqüentemente estabelecidas através de métodos moleculares como a técnica de zimodemos e esquizodemos (análise do DNA kinetoplastidial digerido por enzimas de restrição). Esses métodos puderam confirmar a divisão em dois sub-gêneros, classificar diferentes espécies e ainda agrupar os parasitas hierarquicamente sugerindo as relações evolutivas entre eles, embora a classificação de algumas espécies ainda esteja em estudo (BATES, 2007). O gênero *Leishmania* é então composto de cerca de 30 espécies conhecidas, dentre as quais aproximadamente 20 são patogênicas ao homem (DANTAS-TORRES, 2007) e causam a doença de sintomatologia espectral denominada leishmaniose (REQUENA, 2011) (Figura 4).

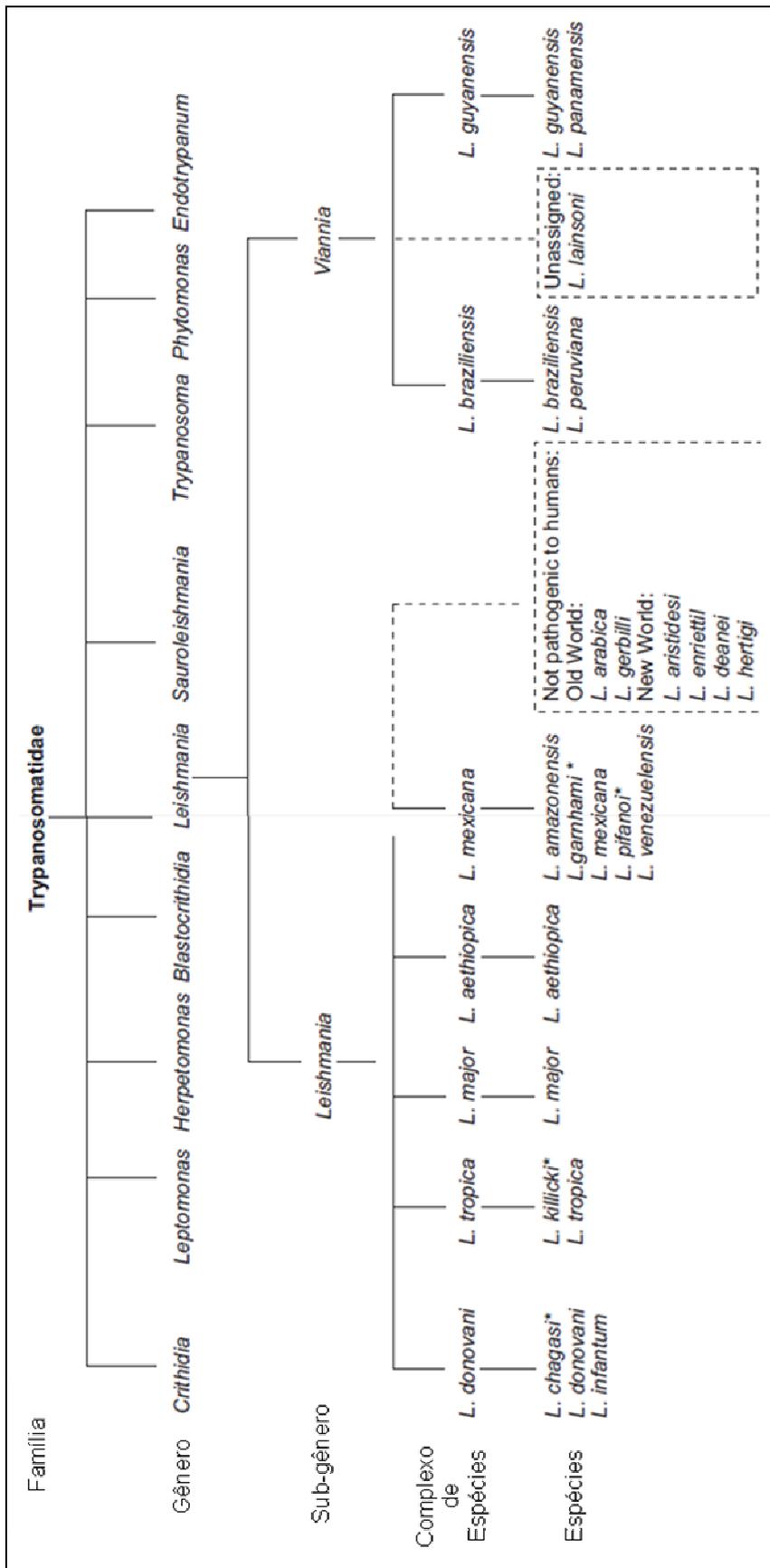


Figura 4. Taxonomia do gênero *Leishmania*. *Espécies indefinidas. FONTE:(WHO, 2010)

As leishmanioses são distribuídas mundialmente em 88 países de maneira heterogênea, variando a espécie do parasita encontrado, as características ecológicas regionais e o comportamento humano frente à exposição ao parasita (DUJARDIN *et al.*, 2008) (Figura 5). A OMS estima a existência de 12 milhões de indivíduos infectados, com incidência de dois milhões de novos casos anuais, sendo desses 1,5 milhões de leishmaniose cutânea e 500 mil de visceral, com altas taxas de morbidade e mortalidade. Adicionalmente, 350 milhões de pessoas vivem sob o risco de infecção (WHO, 2010)

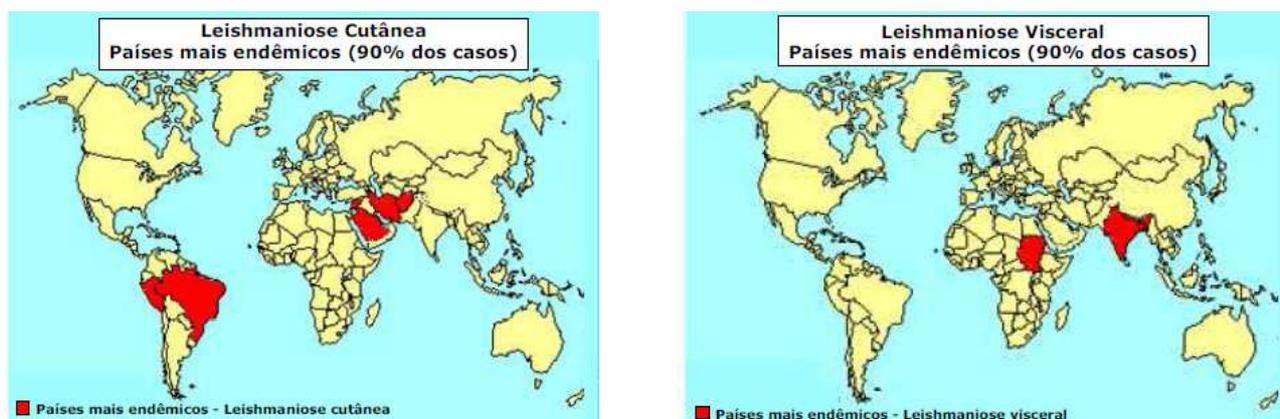


Figura 5. Distribuição geográfica das leishmanioses. Painel à esquerda ilustra a distribuição da leishmaniose cutânea nos países com maior incidência. Painel à direita ilustra a distribuição da leishmaniose visceral nos países mais endêmicos. Fonte: (WHO, 2010)

Os parasitas do gênero *Leishmania* são protozoários com complexo ciclo de vida envolvendo diversas formas de desenvolvimento. Essa diversidade representa a necessidade de adaptação às diferentes condições ambientais encontradas nos dois hospedeiros que habita. No hospedeiro invertebrado são encontradas formas celulares extracelulares, alongadas, flagelares e móveis denominadas promastigotas. A partir dessas podem ser descritas duas sub-formas principais, (embora inúmeras formas intermediárias já tenham sido descritas) uma, a promastigota procíclica, é replicativa e não infectiva. A outra é a promastigota metacíclica, forma não-multiplicativa porém infectiva. Já no hospedeiro vertebrado o parasita apresenta-se sob a forma intracelular, arredondada, replicativa, aflagelar e de tamanho diminuído, forma esta chamada amastigota (BESTEIRO *et al.*, 2007) (Figura 6)

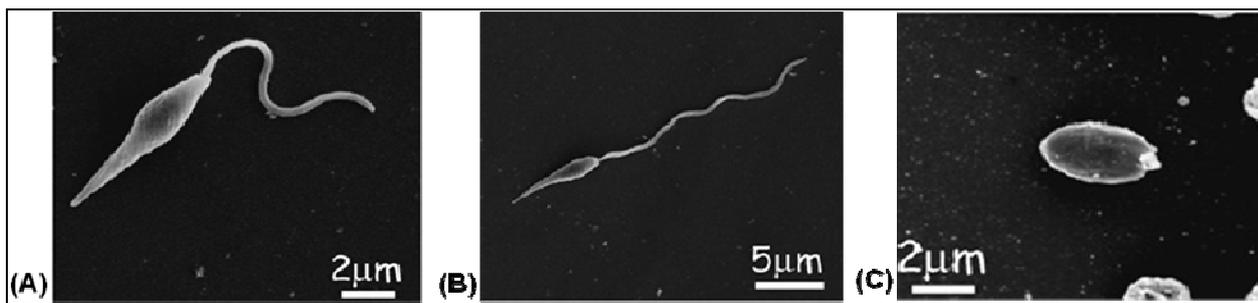


Figura 6. Mudanças morfológicas de *Leishmania* spp. durante o ciclo de vida. (A) promastigota procíclica; (B) promastigota metacíclica; (C) Amastigota. Imagens de células de *Leishmania major* em microscopia eletrônica de varredura. Fonte: (Modificado de, BESTEIRO *et al.*, 2007).

A transmissão dos protozoários entre hospedeiros vertebrados ocorre através da picada durante o repasto sanguíneo das fêmeas infectadas de flebotomídeos, sendo esses do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomia* no Novo Mundo. Deste modo, inicia-se o ciclo de vida do parasita com a inoculação de formas infectivas (promastigotas metacíclicas) principalmente em canídeos, lagomorfos e roedores, mas acidentalmente em humanos (DANTAS-TORRES, 2007). Uma vez na corrente sanguínea, o parasita é fagocitado por macrófagos através de endocitose mediada por receptores (ex: receptores do sistema complemento), gerando fagossomos aos quais se fundem as vesículas lisossomais, formando os fagolisossomos. Ocorre então a diferenciação dos parasitas em amastigotas que é estimulada pela mudança nas condições de vida entre o hospedeiro invertebrado e o vertebrado, como o aumento da temperatura, microambiente rico em aminoácidos, disponibilidade de oxigênio e diminuição do pH (BESTEIRO *et al.*, 2007; MCCONVILLE *et al.*, 2007). As amastigotas se multiplicam por fissão binária no interior dos macrófagos que eventualmente se rompem liberando amastigotas que se disseminam na corrente sanguínea e infectam novos macrófagos e tecidos (STUART, *et al.*, 2008).

Na segunda etapa do ciclo, fêmeas dos flebotomídeos picam o hospedeiro infectado, durante a alimentação sanguínea, e ingerem as amastigotas. Essas, ao contrário do esperado, não estão normalmente presentes na microcirculação periférica e sim na derme propriamente dita, sendo liberadas através da formação da ferida ocasionada pela introdução do aparelho bucal semelhante a “serra” do vetor. Os parasitas presentes em órgãos internos não são então acessíveis aos flebotomídeos (BATES, 2007). Mudanças nos ambientes entre o mamífero e o hospedeiro invertebrado (diminuição da temperatura e aumento do pH) desencadeiam uma série de mudanças bioquímicas e morfológicas capazes de satisfazer as exigências para o desenvolvimento do parasita no

vetor. Desta forma as amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas, durante a primeira fase de evolução. Após alguns dias os parasitas começam a se replicar mais lentamente e se especializam nas formas infectivas, processo denominado metaciclogênese, completando o ciclo de vida. Apesar do conhecimento até então obtido, pouco é conhecido sobre os mecanismos moleculares que medeiam esse remodelamento celular (BATES, 2007; BESTEIRO *et al.*, 2007) (Figura 7).

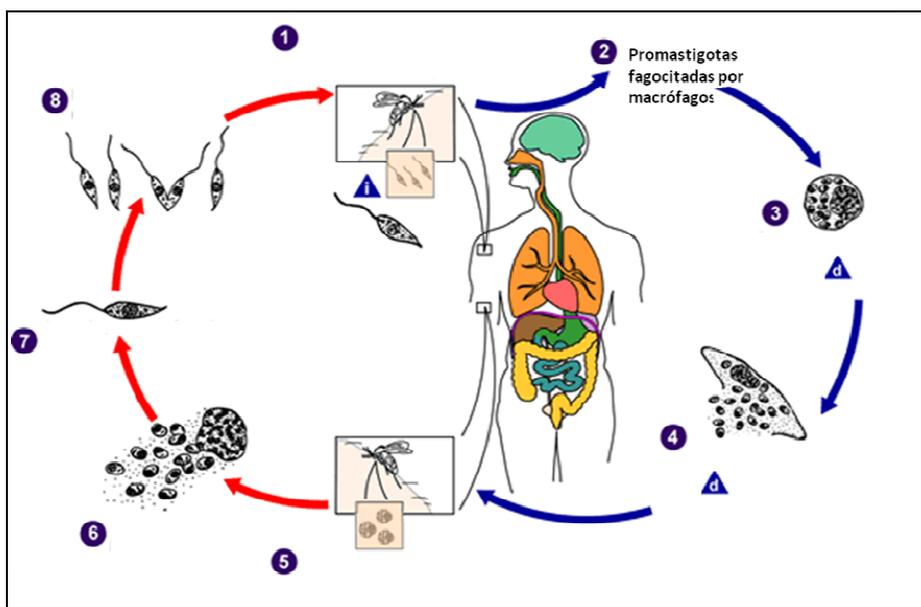


Figura 7. Ciclo de vida de *Leishmania* spp. Leishmania é transmitida através da picada da fêmea infectada do inseto vetor durante a alimentação sanguínea. 1- O flebotomódeo injeta promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro. 2- As promastigotas injetadas através do ferimento são fagocitadas por macrófagos. 3- As promastigotas se diferenciam em amastigotas no interior dos fagolisossomos. 4- amastigotas se multiplicam, lisam os macrófagos e infectam novas células. 5- Novo vetor se torna infectado ao ingerir amastigotas. 6- Células infectadas que foram ingeridas são lisadas liberando amastigotas no intestino do vetor. 7- Amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicas. 8- Promastigotas procíclicas se multiplicam e se especializam em promastigotas metacíclicas. Triângulos azuis contendo “d”- fase de diagnóstico; triângulo azul contendo “i”- fase infectiva. (Fonte: <<http://dpd.cdc.gov/dpdx>>. Acesso em: 10 nov. 2011).

Do ponto de vista de sua patologia, várias doenças são induzidas pelas diferentes espécies de *Leishmania*, sendo aceito que o desenvolvimento das leishmanioses é de caráter multifatorial dependente da espécie da *Leishmania* envolvida na infecção, da região geográfica de ocorrência e de determinantes genéticos e imunológicos do indivíduo infectado (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de *Leishmania* spp. por região geográfica e tropismo tecidual.

Sub-gênero	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. (Viannia)</i>	<i>L. (Viannia)</i>
Velho Mundo	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i> <i>L. killicki</i> [®] <i>L. aethiopica</i> <i>L. infantum</i>		
Novo Mundo	<i>L. infantum</i>	<i>L. infantum</i> <i>L. mexicana</i> <i>L. pifano</i> [®] <i>L. venezuelensis</i> <i>L. garnhami</i> [®] <i>L. amazonensis</i>	<i>L. braziliensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamensis</i> <i>L. shawi</i> <i>L. naiffi</i> <i>L. lainsoni</i> <i>L. lindenbergi</i> <i>L. peruviana</i> <i>L. colombiensis</i> [®]	<i>L. braziliensis</i> <i>L. panamensis</i>
Tropismo	Visceral	Dérmico	Dérmico	Mucoso

O fator sócio-econômico da desnutrição aumenta a susceptibilidade ao desenvolvimento da doença, principalmente em crianças. A imunossupressão relacionada à infecção por HIV ou à quimioterapia e/ou corticoterapia prolongada são, de mesmo modo, fatores que colaboram para a susceptibilidade à doença (WHO, 2010).

As leishmanioses se apresentam divididas em quatro formas clínicas principais: **1-** Leishmaniose cutânea (LC), que pode ser localizada (LCL) ou difusa (LCD); **2-** Leishmaniose muco-cutânea (LM); **3-** Leishmaniose Visceral (LV); **5-** Leishmaniose dérmica pós-calazar (PKLD) (do inglês, *Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis*) (Figura 8).

1- A Leishmaniose cutânea é a forma mais comum da leishmaniose e se caracteriza por lesões papulares ou nodulares iniciadas nos locais de inoculação. Após aproximadamente uma semana uma crosta se desenvolve sobre uma úlcera central, e os bordos se tornam salientes e endurecidos. Geralmente a lesão tem encaminhamento para a cura espontânea, porém pode eventualmente se tornar crônica (REITHINGER *et al.*, 2007). Todavia a OMS recomenda que seja realizado o protocolo de tratamento com Antimoniais pentavalentes (ex: Estibogluconato de sódio e Antimoniato de meglumina) na dosagem de 20 mg/Kg por dia durante 20 dias, a fim de diminuir o tempo de persistência da lesão reduzindo por tanto o tempo de transmissão do parasita e a existência de

recidivas (MINODIER; PAROLA, 2007). A forma difusa da leishmaniose cutânea é apresentada por máculas, pápulas, nódulos ou placas amplamente distribuídos principalmente nos membros e face, onde nesta o espessamento das sobrancelhas e lobos das orelhas assemelha-se a lesões hansênicas, porém não há ulceração. Não há cura espontânea e freqüentemente após o tratamento podem ocorrer recidivas (REITHINGER *et al.*, 2007).



Figura 8. Formas clínicas das Leishmanioses. (a) Lesão característica de Leishmaniose cutânea, do tipo localizada; (b) Acometimento da mucosa oral na Leishmaniose muco-cutânea; (c) Baço-esplenomegalia desenvolvida na leishmaniose visceral; (d) Lesões nodulares disseminadas da leishmaniose dérmica pós-Kalazar. FONTE: (CHAPPUIS *et al.*, 2007)

2- A manifestação muco-cutânea pode ser descrita como metástase da lesão cutânea para o tecido mucoso da boca e do trato respiratório superior por disseminação linfática ou hematogênica. Outros tecidos podem estar envolvidos com freqüência como o palato, faringe e traquéia e uma vez alcançado o estágio mais avançado da doença ocorre severa mutilação facial. Nunca progride para a cura espontânea e infecções bacterianas secundárias e pneumonias recorrentes são as principais causas de morte. O protocolo básico para tratamento recomendado pela OMS é semelhante ao empregado para Leishmaniose cutânea, contudo o período de duração estende-se até o 28º dia (MINODIER; PAROLA, 2007).

3- A leishmaniose visceral, também chamada de Kalazar, é a forma mais agressiva da doença com sintomatologia de febre, perda de peso, desconforto abdominal, anorexia, hepatomegalia, esplenomegalia, ulceração de mucosa do intestino delgado e linfadenopatia. O tempo de vida de leucócitos e eritrócitos é reduzido causando granulocitopenia e anemia e também poderá ocorrer trombocitopenia e diminuição da produção de protrombina pelo fígado resultando em hemorragias severas. Em estágios avançados infecções secundárias são freqüentes, especialmente pneumonia, disenteria e tuberculose. Não existe cura espontânea e se não tratada é fatal (CHAPPUIS *et al.*, 2007). As drogas de primeira escolha para o tratamento também são os Antimoniais pentavalentes administrados intramuscularmente na dosagem de 20mg/kg de peso durante 28-30 dias. Anfotericina B e pentamidinas são usados como segunda linha de medicamentos (CHAPPUIS *et al.*, 2007).

4- A leishmaniose dérmica pós kalazar é prevalente principalmente no Velho Mundo, podendo acometer entre 10% e 50% dos pacientes curados da leishmaniose visceral. Se caracteriza por manchas hipopigmentadas ou eritematosas em qualquer parte do corpo que se tornam pápulas e nódulos com presença de infiltrado celular especialmente na face, mas também pode afetar a mucosa bucal, conjutival e genital. Em raros casos ocorre cura espontânea, requerendo na maioria das vezes o tratamento específico com Antimoniais pentavalentes e anfotericina B (GANGULY *et al.*, 2010).

Os principais problemas para o controle das leishmanioses são: dificuldade de diagnóstico preciso na ausência de condições básica para tal; alta toxicidade e sérios efeitos colaterais das drogas empregadas (ex: cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, mialgia, pancreatite aguda); ineficácia dos protocolos de tratamento; alto custo dos medicamentos e da atenção à saúde necessária para o emprego dos medicamentos; e dificuldade de acesso a populações rurais. Nesse sentido, na tentativa de reduzir os efeitos colaterais, os custos econômicos e a taxa de evasão ao tratamento, é que pesquisas em todo mundo vem sendo desenvolvidas buscando novas estratégias de tratamento (MINODIER; PAROLA, 2007; REITHINGER *et al.*, 2007).

2.3 BIOLOGIA MOLECULAR DE TRIPANOSSOMATÍDEOS

2.3.1 Características e organização genômica

Com o advento do seqüenciamento e publicação de genomas representativos dos três principais tripanossomatídeos de interesse médico (Trityps), *T. brucei* (BERRIMAN *et al.*, 2005), *T. cruzi* (EL-SAYED; MYLER; BARTHOLOMEU; *et al.*, 2005a) e *L. major* (IVENS *et al.*, 2005), somado à análise proteômica subsequente pode-se realizar grandes avanços científicos nas pesquisas voltadas à prospecção de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de novas drogas e vacinas (KISSINGER, 2006).

O genoma haplóide dos Trityps contém entre 25 e 55 Megabases distribuídos em um número variável de cromossomos (onze a 36) (EL-SAYED; MYLER; BLANDIN; *et al.*, 2005). Evidências apontam para a diploidia dos genomas dos Trityps contudo não há confirmação da existência de mecanismos de reprodução sexual que expliquem essa diploidia (REQUENA, 2011). *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major* possuem aproximadamente 9.086, 12.000 e 8.311 genes, respectivamente. Nos Trityps, 6.158 genes são ortólogos e dos 1.617 domínios protéicos identificados, menos que 4% pertencem a somente uma espécie (EL-SAYED; MYLER; BLANDIN; *et al.*, 2005b).

Até 80% dos genes de *T. brucei* e 93% dos genes de *L. major* se encontram distribuídos em grandes blocos gênicos colineares presente em fita única podendo conter de 10 até centenas de genes codantes (EL-SAYED; MYLER; BLANDIN; *et al.*, 2005). De todos os genes identificados, 94% dos ortólogos estão em sintenia, ou seja, esses blocos gênicos se encontram dispostos na mesma organização no contexto genômico entre organismos distintos (EL-SAYED; MYLER; BLANDIN; *et al.*, 2005). Desse modo, embora os tripanossomatídeos tenham divergido entre 200 a 500 milhões de anos e apresentem características biológicas, de infecção, de transmissão e de evasão do sistema imune diferenciadas, seus genomas possuem notável grau de conservação da sintenia (KISSINGER, 2006). Os grandes blocos gênicos dos tripanosomatídeos são em geral separados por pequenas seqüências de poucos Kilobases (Kb) onde a sintenia é “quebrada” (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2003). Uma análise aprofundada revelou que em 40 % das vezes, esses pontos de quebra da sintenia são associados à regiões de expansão de famílias multigênicas, de inserção de elementos genéticos móveis e codificação de RNAs estruturais.

2.3.2 Transcrição Gênica

Os arranjos gênicos em tripanossomatídeos são semelhantes às unidades poliestrônicas procarióticas (*operons*) especialmente porque as regiões codificantes de proteínas, majoritariamente, não são separadas por introns. A diferença se dá porque esses arranjos gênicos, contraditoriamente ao ocorrido nas bactérias, não codificam proteínas com funções biológicas relacionadas. (CLAYTON, 2002). Essas características peculiares de organização do genoma são refletidas no modo diferenciado de transcrição nos tripanossomatídeos (REQUENA, 2011).

Os tripanossomatídeos possuem homólogos de todas as RNA polimerases descritas em eucariotos superiores, RNA polimerases I, II e III (RNAPol I, RNAPol II, e RNAPol III). Os promotores da RNA polimerase I foram inicialmente descritos em *T. brucei* e estão relacionados, em sua maioria, à transcrição de genes de RNA ribossomais (rRNA), mas também são responsáveis pela transcrição de genes relacionados a antígenos de superfície encontrados nas diferentes formas celulares de *T. brucei*. Os promotores da RNA polimerase III, são encontrados dentro de regiões não sintênicas e foram caracterizados como relacionados à transcrição de pequenos RNA funcionais (*small RNAs*) e à transcrição de RNAs transportadores (tRNAs). Apesar do conhecimento sobre promotores para RNAs funcionais, promotores clássicos para genes codantes de proteínas são raros ou ausentes (CLAYTON, 2002).

Uma característica dos tripanossomatídeos é que a transcrição de genes codantes para proteínas pela RNAPol II ocorre na ausência de promotores clássicos (CLAYTON, 2002) e foi postulada como sendo bidirecional, de forma contínua, na ausência de fatores de iniciação de transcrição. A transcrição se inicia a partir de regiões pré-determinadas em cada cromossomo (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2003) denominadas regiões de troca de fita ou SSR (do inglês, *Strand Switch Regions*). Interessantemente, em 43% dos genomas dos *Trypanosoma* as SSR ocorrem dentro ou bem próximo dos pontos de quebra da sintenia gênica (EL-SAYED; MYLER; BLANDIN; *et al.*, 2005). Desta forma a RNA polimerase II inicia a transcrição de forma totalmente randômica a partir das SSR, progredindo através dos blocos gênicos gerando pré-mRNAs transcritos de forma poliestrônica (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2003).

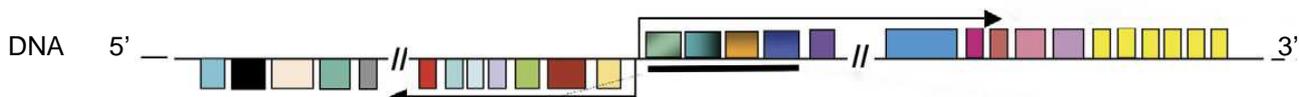


Figura 9. Transcrição Policistrônica em Tripanossomatídeos. Genes não relacionados funcionalmente são dispostos agrupados em blocos que serão transcritos constitutivamente pela RNA pol II em RNAs policistrônicos, a partir da região de troca de fita codificante SSR (switch-strand region) na ausência de promotores. Fonte: (Adaptado de, HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

2.3.3 Processamento dos RNAs policistrônicos

Nos tripanossomatídeos o processamento e a maturação dos pré-mRNAs em mRNAs maduros se dá de maneira diferenciada dos eucariotos superiores, principalmente devido à transcrição policistrônica, e requer o envolvimento de dois mecanismos acoplados: processamento em *trans-splicing* e poliadenilação (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007; LIANG *et al.*, 2003). O processamento do pré-mRNA através de *trans-splicing* se caracteriza pela adição à extremidade 5' do pré-mRNA de uma seqüência de 39-41 nucleotídeos derivada da clivagem de um pequeno RNA nuclear (snRNA) rico em resíduos de uridina denominado RNA *Splice-Leader* (SL), ou mini-éxon (LIANG *et al.*, 2003). O gene do RNA SL contém o único promotor da RNA polimerase II conhecido (CAMPBELL *et al.*, 2003).

O mecanismo de *trans-splicing* se-dá por duas reações de *trans-esterificação* em seqüência. Na primeira reação o RNA SL precursor se liga através do sítio GU doador, ao sítio acceptor no pré-mRNA, constituído do ponto de ramificação, sinalizado por uma adenina e de uma seqüência de polipirimidinas, formando uma estrutura intermediária em “Y” característica do *trans-splicing*. Na segunda reação de *trans-esterificação* essa estrutura em “Y” previamente formada é reconhecida pelas proteínas e RNAs funcionais do complexo de processamento, ou spliceossomo, e ocorre a clivagem das estruturas intermediárias e fusão do RNA SL à extremidade 5' do mRNA imediatamente após o dinucleotídeo AG, que sinaliza o local de junção do SL ao mRNA precursor (LIANG *et al.*, 2003). O RNA SL carrega na sua porção 5' terminal um *cap* de 7-metilguanosina modificado quando comparado com o *cap* de eucariotos superiores, devido a metilação dos seus quatro primeiros resíduos nucleotídicos da sequência, formando uma estrutura denominada de *cap4* que só ocorre nos tripanossomatídeos. Uma consequência inerente ao *trans-splicing* é a adição pós-transcricional do *cap*, uma etapa essencial para a

formação de mRNAs maduros funcionais monocistrônicos (GUNZL, 2010; LIANG *et al.*, 2003).

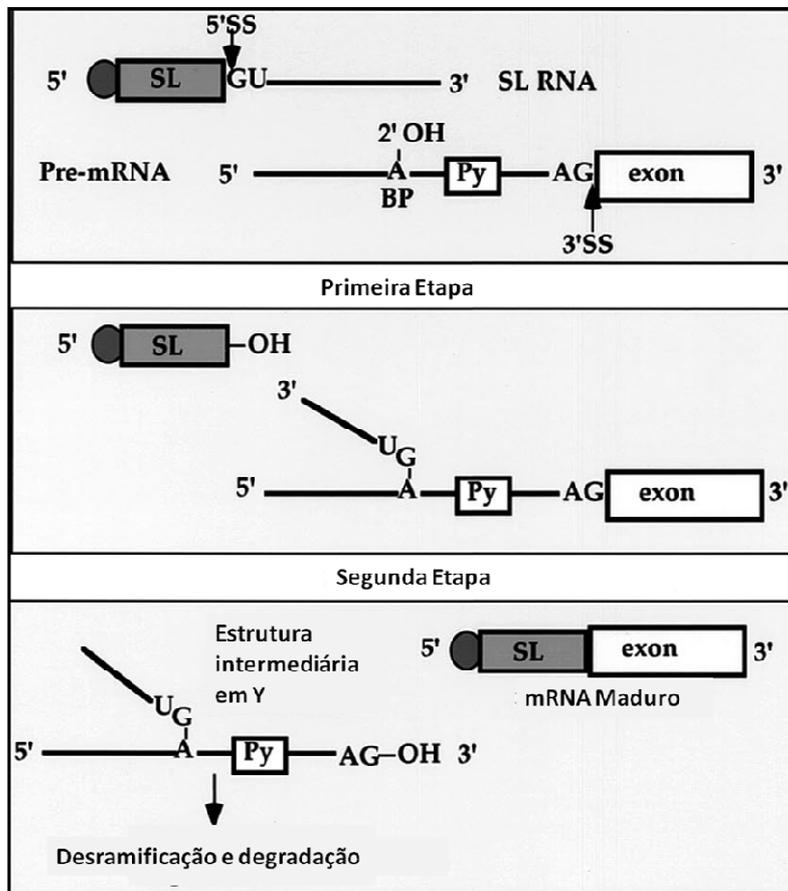


Figura 10. Etapas do processamento por *trans-splicing* dos pré-mRNAs de tripanosomatídeos. Quadro superior - Representação esquemática do RNA SL precursor (acima), com o *cap4* (círculo cinza), sequência SL (retângulo cinza claro) e sítio 5' de *splicing* (5'SS). No pré-mRNA está indicado o sítio aceptor, ou ponto de ramificação (BP), a sequência de polipirimidinas, e o sítio 3' de *splicing* (3'SS). Quadro intermediário - Após a primeira reação de *trans*-esterificação, há a fusão do RNA SL ao pré-mRNA e a formação da estrutura intermediária em "Y". Quadro inferior - Mostra a finalização do *trans-splicing*, ocorrendo com a clivagem e degradação da estrutura intermediária e fusão da sequência SL na porção 5' do mRNA monocistrônico. FONTE: (Adaptado de, LIANG *et al.*, 2003).

Concomitantemente ao *trans-splicing* ocorre a poliadenilação. Não se conhece nenhuma seqüência específica para os tripanossomatídeos semelhante ao sinal para poliadenilação de eucariotos superiores AAUAAA. Sendo assim a seleção do sítio de poliadenilação é determinada principalmente pela presença da sequência de polipirimidinas nas regiões intergênicas e ainda pela presença de um sítio aceptor de *splicing* ativo entre 200 e 500 nucleotídeos a jusante desta sequência de polipirimidinas (LIANG *et al.*, 2003; REQUENA, 2011). Um fato marcante a ser observado durante o processamento dos policistrons é que o *trans-splicing* ocorre acoplado a poliadenilação. Deste modo, a poliadenilação da porção 3' de um gene está ocorrendo ao mesmo tempo

que o processamento por *trans-splicing* da porção 5' de um gene seguinte (REQUENA, 2011).

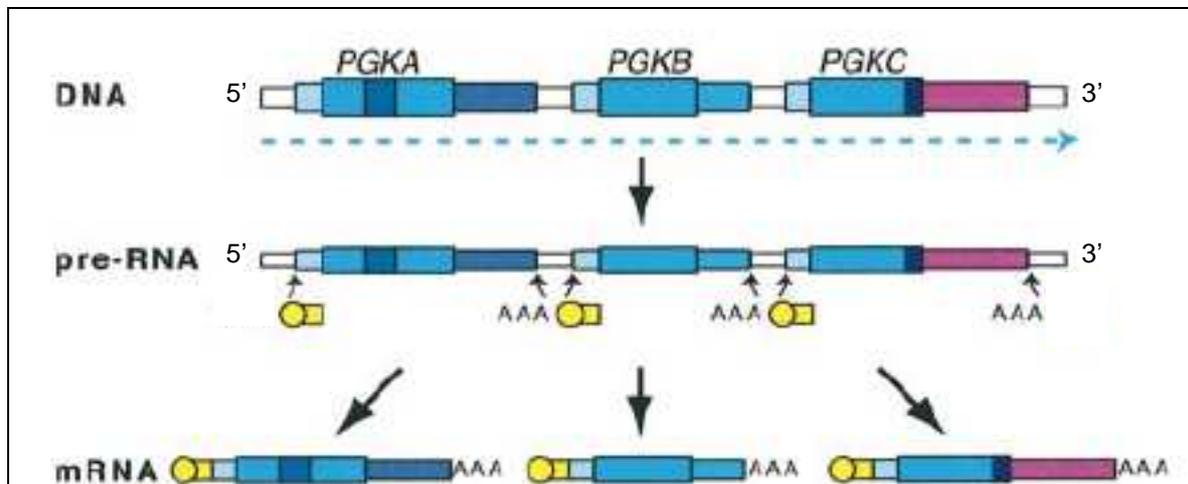


Figura 11. Processamento em *trans-splicing* e poliadenilação do pré-mRNA. O DNA é transcrito constitutivamente em blocos gênicos gerando transcritos polycistônicos que são processados por *trans-splicing* e poliadenilação. Assim é adicionado ao mRNA a sequência SL (retângulo amarelo) contendo o *cap4* (círculo amarelo) na extremidade 5' do mRNA e a cauda de poli-adeninas (AAA) na extremidade 3'. FONTE: (Modificado de CLAYTON, 2002).

2.4 REGULAÇÃO GÊNICA

A maioria dos organismos se adapta a mudanças no ambiente que estão inseridos através de ajustes na expressão gênica, sendo a iniciação da transcrição o ponto mais importante da regulação. Contudo, os tripanossomatídeos perderam completamente a capacidade de exercer a regulação de sua transcrição pela RNA pol II (CLAYTON, 2002). Diante deste panorama é coerente afirmar que não há evidências de mecanismos de regulação gênica a nível transcricional que permitam a expressão diferencial de genes ou blocos gênicos nesses organismos (REQUENA, 2011). A única exceção a essa regra são os genes codificantes dos antígenos de superfície estágio específicos de *T. brucei* e os genes contidos nos mesmos *loci* gênicos. Esses genes são transcritos pela RNA pol I e suas taxas de transcrição são controladas ao longo do desenvolvimento por regulação mediada, muito provavelmente, pela cromatina (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Desta forma a regulação de expressão gênica nos tripanossomatídeos é, em sua maioria, pós-transcricional (CLAYTON, 2002), através do processamento diferencial dos pré-mRNAs, regulação da estabilidade, transporte e degradação dos mRNAs, controle da tradução dos

mRNAs maduros e ainda via modificações pós-traducionais de proteínas que regulam sua função e tempo de meia vida (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

2.4.1 Processamento diferencial de pré-RNAs

Como já descrito acima, os sítios de poliadenilação são localizados de 200-500 nucleotídeos a montante do sítio de *trans-splicing* e o evento de poliadenilação de um dado cistron é diretamente dependente do *splicing* a jusante do cistron seguinte. Esse arranjo impede o processo de regulação independente para genes adjacentes. Assim um erro em um ponto de *splicing* de um mRNA causaria defeito na poliadenilação do gene adjacente (BENZ *et al.*, 2005). Contudo o arranjo em *tandem* poderia gerar uma regulação diferenciada, como ocorre em *Leishmania* nos genes de cisteína protease arranjados dessa forma, onde a regulação diferenciada ocorre através da adição de sítios aceptores de *splicing* mesmo na ausência de genes a jusante, permitindo dessa forma que a poliadenilação ocorra (BENZ *et al.*, 2005). Outro exemplo ocorre no caso dos gene de Hsp83, onde a última cópia de 17 repetições não possui o sítio de *splicing* a jusante. Desta forma a perda ou adição de sítios aceptores de *splicing* dentro da seqüência intergênica gera mRNAs não traduzíveis. Também é sugerido que um longo mRNA de *T. brucei* poderia ser processado diferencialmente depois de ser exportado do núcleo, porém as evidências não são determinantes (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

2.4.2 Controle da exportação nuclear

Uma vez processados os mRNAs necessitam ser exportados para o citoplasma afim de serem traduzidos. Em eucariotos superiores o *cap* do mRNA é ligado a um complexo nuclear de ligação ao *cap*, CBP80/20 antes de ser exportado. Em *T. brucei* já foi demonstrado que o mRNA processado é reconhecido por um complexo de ligação ao *cap* constituído de cinco proteínas, sendo uma delas homóloga à CBP20 (LI; TSCHUDI, 2005). Contudo ainda existe pouco conhecimento sobre o transporte de RNAs através de poros nucleares e para o citoplasma nos tripanossomatídeos, porém a regulação a esse nível é claramente possível (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

2.4.3 Controle da estabilidade, degradação e tráfego intracelular de mRNAs

Os transcritos maduros possuem em suas regiões 5' e 3' não traduzidas (UTR, do inglês, *Untranslated region*) seqüências ou motivos específicos, denominados de elementos *cis*, para reconhecimento e interação com proteínas de ligação ao mRNA, que são as RBPs (do inglês, *RNA Binding Protein*). Essa interação entre mRNAs e RBPs está relacionada ao controle da estabilidade, degradação, tráfego intracelular e eficiência de tradução (KEENE, 2007; MATA *et al.*, 2005) (Fig. 12). Nesse sentido, os tripanossomatídeos possuem em seus mRNAs regiões UTRs mais longas que os demais eucariotos, principalmente na porção 3' UTR, e um número crescente de elementos *cis* tem sido relatados associados ao controle da estabilidade dos transcritos quanto a sua expressão gênica estágio-específica (BOUCHER *et al.*, 2002; MURRAY *et al.*, 2007; WU *et al.*, 2000; ZILKA *et al.*, 2001).

Elementos ricos em resíduos de uridina, URE (do inglês, *Uridine Rich Elements*), caracterizando o elemento *cis*, têm sido encontrados na região 3' UTR em vários dos transcritos regulados durante o desenvolvimento de tripanossomatídeos. Em *T. brucei* esses mRNAs contendo o UREs são estáveis na forma procíclica e instáveis na forma sanguínea (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Regulação semelhante ocorre para diversos mRNAs de *T. cruzi* (D'ORSO *et al.*, 2003), e para o mRNA de amastina (transcrito específico de amastigota) de *L. infantum* (HAILE *et al.*, 2008). Somando-se as UREs em *L. major*, foram descritas duas classes de *retroposons* SIDER 1 e SIDER 2 (do inglês, *Short Interspersed Degenerates Retroposons*) contidos nas regiões 3' UTR de mRNAs, envolvidos com a regulação estágio-específica. A maioria dos mRNAs contendo SIDER 1 é, em torno de duas vezes, mais expressos em amastigotas que em promastigotas. Já o SIDER 2 tem um papel na taxa de degradação global de mRNAs (BRINGAUD, *et al.*, 2007). Foi demonstrado que esses elementos por si só facilitam a degradação dos mRNAs aos quais estão associados (BRINGAUD, *et al.*, 2007).

A degradação dos mRNAs eucarióticos é tipicamente iniciada via deadenilação e posteriormente pode prosseguir por duas vias diferenciadas. Em uma via a deadenilação estimula o decapeamento (retirada do *cap* do mRNAs) e a subsequente degradação do mRNA por uma 5' exonuclease. E na segunda via, a deadenilação estimula a degradação via 3' exonuclease, em sua maioria ocorrendo no exossomo (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). O modo de degradação dos mRNAs de tripanossomatídeos envolve as duas vias,

assim como nos mamíferos. A maioria das enzimas do complexo protéico do exossomo já foi identificada, porém ainda não foram encontrados homólogos para as enzimas de decapeamento nesses organismos (CLAYTON; SHAPIRA, 2007; HAILE *et al.*, 2008). A degradação constitutiva de mRNAs é dependente de deadenilação, ocorrendo em baixas taxas durante a degradação de mRNAs estáveis e provavelmente, sub-populações de mRNAs instáveis. Já a degradação regulada é rápida e independente de deadenilação. Essa, é provavelmente responsável pela degradação de mRNAs instáveis durante um estágio específico do desenvolvimento, e assim como em mamíferos é afetada pela depleção do exossomo ou da 5' exonuclease (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007).

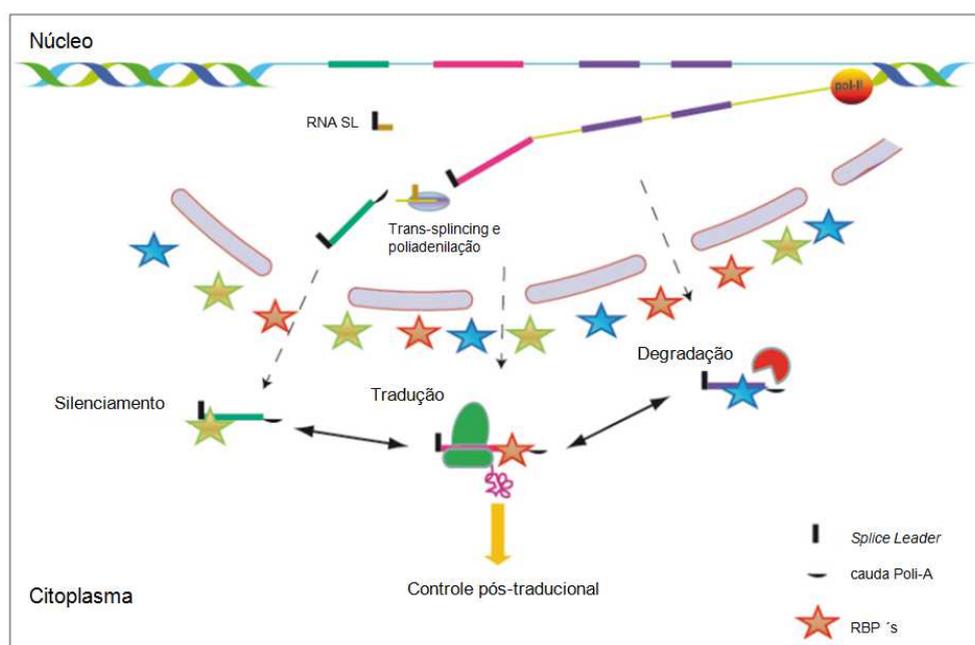


Figura 12. Etapas da regulação da expressão gênica em tripanossomatídeos . A transcrição poliestocada gera pré-mRNAs que são processados por *trans-splicing* e poliadenilação. Os transcritos maduros poderão então, a partir dessa etapa, se acoplarem a várias proteínas ligadoras de RNAs (RBPs) específicas encaminhando-os para o transporte citoplasmático (localização específica), tradução ou degradação. FONTE: (REQUENA, 2011).

Durante o complexo ciclo de vida dos tripanossomatídeos, as mudanças rápidas no ambiente nos quais estão inseridos solicitam uma adaptação fisiológica desses organismos e a rápida regulação dos mRNAs pode provavelmente auxiliar para que isso ocorra. Nesse âmbito, a diferença de temperatura foi demonstrada como fator regulador da estabilidade de mRNAs durante a diferenciação de kinetoplastídeos (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Ou seja, o tempo de meia vida dos mRNAs pode ser afetado pela temperatura de crescimento dos parasitas, simplesmente por que a taxa de

renovação das enzimas de degradação é influenciada por isso. Em *Trypanossoma*, o choque térmico por diminuição da temperatura aumenta a estabilidade dos mRNAs de prociclina EP nas formas sanguíneas do parasita, e o aumento da temperatura aumenta a estabilidade de transcritos específicos de amastigota e diminui o tempo de meia vida dos transcritos de promastigota. A temperatura do ambiente também influencia na conformação tridimensional dos mRNAs, então os elementos *cis* podem ser reconhecidos pela maquinaria regulatória em uma determinada faixa de temperatura específica (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Adicionalmente o *stress* causado por diferenças no pH, também tem sido associado com o silenciamento do SL-RNA de *T.brucei* (LUSTIG *et al.*, 2007) ou acumulação dos mRNAs de Amastina e A2, transcritos específicos de amastigota (MCNICOLL *et al.*, 2005).

Em mamíferos os mRNAs que não são traduzidos ou degradados são compartimentalizados em microregiões dentro do citoplasma, chamadas grânulos de processamento, *P-bodies* (do inglês, *Processing bodies*) ou grânulos de *stress* (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Os *P-bodies* são envolvidos na degradação de mRNAs, neles se co-localizam enzimas envolvidas no decapeamento e processamento/degradação de mRNAs. Esses grânulos são dinâmicos e os mRNAs contidos neles poderão continuar estocados/silenciados, serem encaminhados para a degradação ou então para a tradução (BALAGOPAL; PARKER, 2009). Já os grânulos de *stress* são associados à situações onde a iniciação da tradução é inibida, neles estão contidos mRNAs não traduzidos complexados com fatores de iniciação da tradução e com a subunidade menor ribossomal 40S (BALAGOPAL; PARKER, 2009). Estruturas semelhantes a *P-bodies* estão presentes em tripanossomatídeos, contudo apresentam diferenças dos demais eucariotos e precisam ser melhor estudadas (HOLETZ *et al.*, 2007).

A despeito da existência dos diferentes tipos de regulação citados atuando sobre os níveis de mRNAs, estudos de expressão gênica demonstram que somente 0,2 a 5% dos genes têm seus mRNAs diferencialmente expressos entre as fases promastigota e amastigota de *Leishmania*. Já a análise proteômica revela que mais de 18% das suas proteínas são diferencialmente expressas entre os diferentes estágios do ciclo de vida. Portanto sugere-se que em *Leishmania* a regulação da expressão gênica em nível de mRNA não é tão relevante quanto a regulação da sua tradução em proteínas (COHEN-FREUE *et al.*, 2007; LEIFSO *et al.*, 2007; ROSENZWEIG *et al.*, 2008).

2.4.4 Regulação da tradução proteica

A síntese proteica ou tradução é a etapa final do fluxo da informação genética e a regulação a esse nível gera mudanças nas condições fisiológicas de forma imediata e rápida (GEBAUER; HENTZE, 2004; HOLCIK; SONENBERG, 2005). A regulação da expressão gênica através da tradução é um mecanismo de controle importante, porém não totalmente compreendido (HOLCIK; SONENBERG, 2005). Sabe-se que essa etapa chave da regulação gênica é dependente de dois mecanismos diferentes. O primeiro é o controle da tradução de mRNAs estágio-específicos; e outro é o controle global da síntese das proteínas (JACKSON *et al.*, 2010). O primeiro mecanismo é o controle da tradução de mRNAs específicos que em eucariotos superiores ocorre através do reconhecimento das seqüências *cis* nas regiões 5' e 3' UTR dos mRNAs por RBPs ou miRNAs (microRNAs) (JACKSON; STANDART, 2007; KEENE, 2007; MATA *et al.*, 2005). A interação dos sítios específicos dos mRNAs com as RBPs é em sua maioria inibitória, com exceção da interação entre mRNAs e a proteína de ligação a cauda de poli-adeninas, PABP (do inglês, *Poli-A Binding Protein*) na região 3' UTR. (JACKSON *et al.*, 2010). Essa inibição específica ocorre pela ligação da RBP na região 3' UTR, resultando na formação de um *loop* fechado envolvendo uma proteína intermediária que fará a ligação da RBP com a proteína de reconhecimento do *cap* (na maioria dos casos é a própria proteína de reconhecimento do *cap* participante da tradução, eIF4E ou seus homólogos). Sendo assim, a ativação da tradução dos mRNAs necessita do “seqüestro” ou degradação da RBP ligante (Figura 13) (SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Em tripanossomatídeos várias RBPs que regulam a tradução de mRNAs específicos vêm sendo identificadas e tem sido demonstrado que muitas interagem e regulam um conjunto de mRNAs funcionalmente relacionados, provando que nesses organismos existe co-regulação de grupos de mRNAs. A presença de grupos de mRNAs co-regulados é corroborada pelos estudos de transcriptomas de *T. brucei* e *L. donovani* que mostram a existência de enriquecimento de mRNAs codificantes para a mesma via metabólica durante o processo de diferenciação (CARRINGTON; KRAMER, 2011). Até o momento não existem evidências da existência de miRNAs regulando a tradução de mRNAs em tripanossomatídeos (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007)

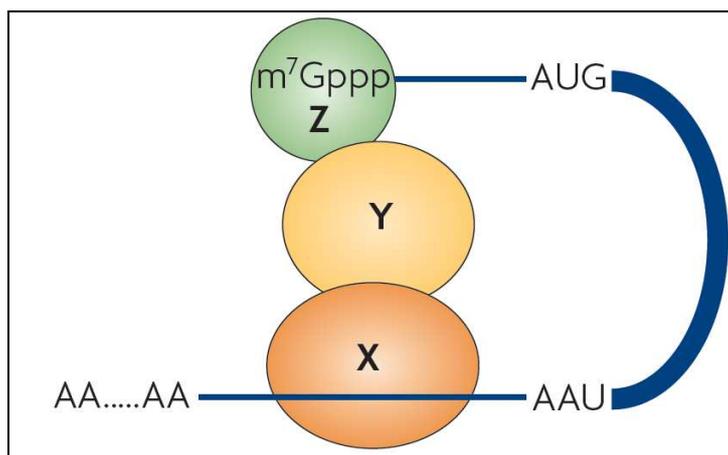


Figura 13. Modelo genérico de regulação da tradução através da interação mRNA/RBPs. A proteína “X” de ligação ao mRNA (RBP) se liga a resíduo específico na região 3’UTR do mRNA e interage com uma proteína intermediária, proteína “Y”, que por sua vez interage com a proteína Z de ligação ao cap, ocasionando a formação de estrutura em *loop* fechado no mRNA impedindo o acesso da maquinaria de tradução. Fonte: (JACKSON *et al.*, 2010)

O segundo mecanismo de controle da tradução envolve a regulação da biossíntese das proteínas propriamente dita, e é baseado principalmente no controle da atividade dos fatores de iniciação da tradução, eIFs (do inglês, *eukaryotic Initiation Factor*). Portanto para o melhor entendimento do mecanismo de controle da expressão gênica via tradução, foco de estudo desse trabalho, a síntese de proteínas e a regulação da tradução serão abordados detalhadamente nos tópicos subseqüentes.

2.5 TRADUÇÃO PROTEICA

A tradução é um processo inerente a todos os seres vivos, pelo qual a informação genética proveniente da transcrição do DNA será traduzida em proteínas. Esse processo requer uma complexa maquinaria, composta de ribossomo, tRNAs (RNA transportador) e fatores de tradução e compreende quatro etapas distintas: Iniciação da tradução, alongamento do peptídeo nascente, terminação e reciclagem dos ribossomos (MARINTCHEV, 2004). Esse processo biológico pode ser regulado nas etapas de iniciação, alongamento e terminação, contudo é principalmente na iniciação que a regulação acontece, pois é nessa etapa que ocorre a montagem do ribossomo, reconhecimento do mRNA e rastreamento do códon de iniciação (JACKSON *et al.*, 2010). Para que isso ocorra é necessário a participação de ao menos doze fatores de iniciação da tradução (eIFs), sendo portanto a etapa mais sujeita a regulação, complexa e divergente entre os organismos (ACKER; LORSCH, 2008).

2.5.1 Iniciação da Tradução

Iniciação da tradução é o processo de montagem dos ribossomos 80S competente junto ao códon de iniciação da tradução do mRNA. Nesse momento, o códon de iniciação é pareado com a alça (*loop*) do tRNA iniciador (met-tRNA) contendo o anti-códon, dentro do sítio peptidil (sítio-P) do ribossomo (JACKSON *et al.*, 2010). Ela pode ser dividida didaticamente em oito etapas (Figura 14):

- 1- A primeira etapa é a formação do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met}, resultante da ligação do tRNA_i ao GTP e ao eIF2;
- 2- Em seguida ocorre a ligação do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} à subunidade menor ribossomal 40S facilitada pela atividade dos fatores eIF1, eIF1A, eIF3 levando a formação do complexo 43S de iniciação da tradução;
- 3- Paralelamente ocorre a circularização e ativação do mRNA, que advém do reconhecimento da estrutura do *cap* e ligação do complexo eIF4F (eIF4A1, eIF4E, eIF4G) e eIF4B na porção 5' do mRNA e da ligação da PABP na cauda poli-A;
- 4- Em seguida ocorre o recrutamento e ligação do complexo 43S à extremidade 5' UTR do mRNA através de interações entre o eIF4F, PABP e o eIF3;
- 5- Início da atividade de varredura do mRNA no sentido 5'-3' pelo complexo 48S para o reconhecimento do códon de iniciação;
- 6- Formação do complexo 48S pelo reconhecimento do códon de iniciação da tradução quando o eIF5 estimula a hidrólise do GTP ligado a eIF2;
- 7- Associação da subunidade 60S do ribossomo ao complexo 48S, com concomitante liberação dos eIF2-GDP, eIF1, eIF3, eIF4B, eIF4F e eIF5 mediada pelo eIF5B;
- 8- Finalmente ocorre a formação do ribossomo 80S competente para o alongamento da tradução pela hidrólise do GTP ligado ao eIF5B e liberação do eIF5B-GDP e eIF1 (ACKER; LORSCH, 2008; JACKSON *et al.*, 2010; PESTOVA; HELLEN, 2006).

A maioria dos mRNAs eucarióticos utilizam o mecanismo de iniciação da tradução descrito acima, no qual há o reconhecimento do *cap*, a ligação dos eIFs e o recrutamento do ribossomo para a varredura do códon de iniciação da tradução, sendo esse processo denominado *cap*-dependente. Contudo alguns mRNAs virais e alguns mRNAs de *stress* celular utilizam uma iniciação da tradução alternativa, onde há ausência da estrutura do *cap* e inutilização de muitos eIFs, nesse processo o ribossomo liga-se diretamente a uma região interna do mRNA, IRES (do inglês, *Internal Ribosome Entry Sites*) iniciando a

tradução (JACKSON *et al.*, 2010; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). No presente trabalho enfatizam-se os mecanismos de iniciação da tradução *cap*-dependente, já que, em sua grande maioria, os mRNAs são traduzidos a partir desse tipo de iniciação.

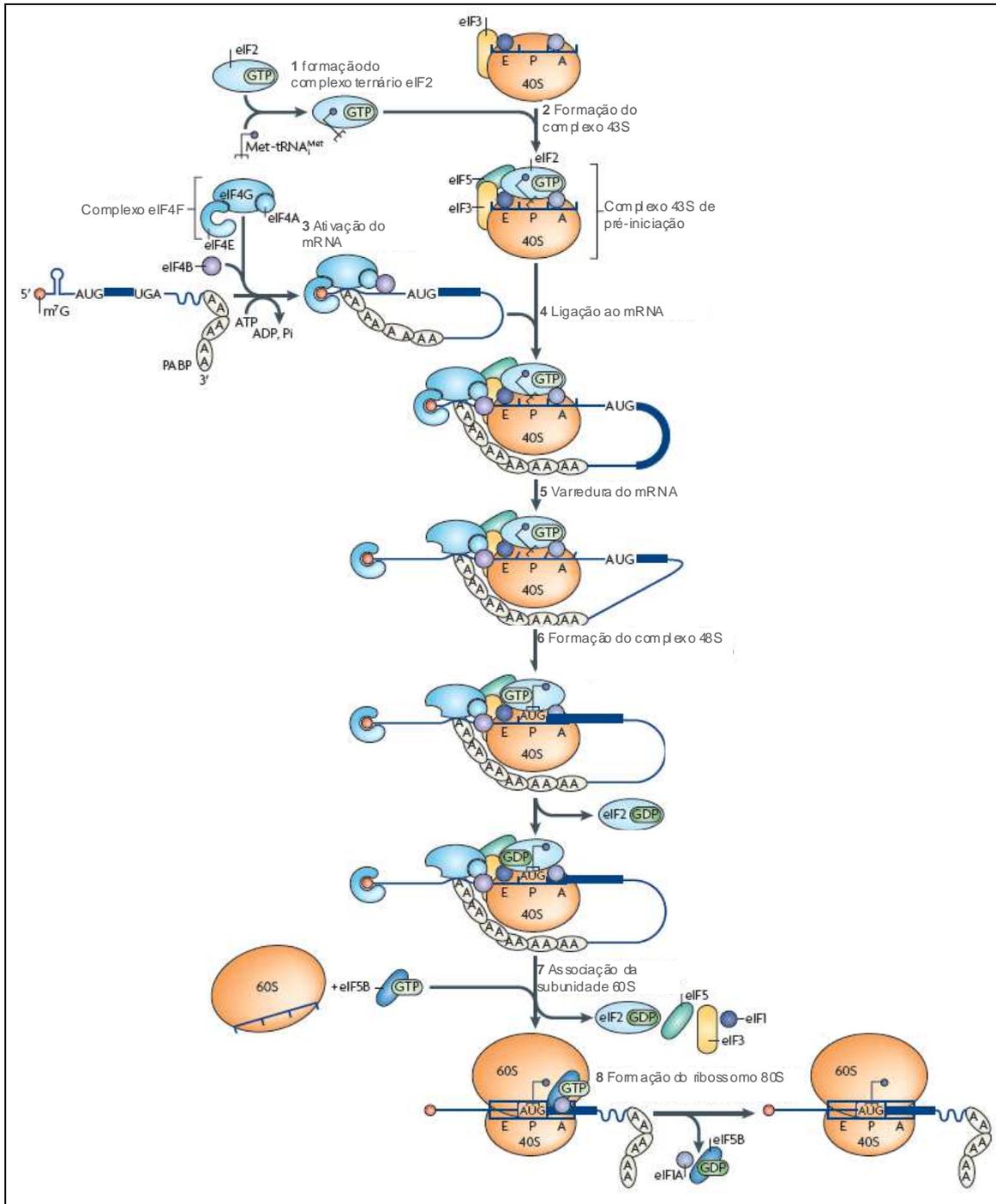


Figura 14. Modelo da iniciação da tradução *cap*-dependente. A via canônica de iniciação da tradução pode ser esquematizada em oito etapas: 1- Formação do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA^{Met}; 2- Formação do complexo 43S; 3- Ativação do mRNA; 4- Ligação do mRNA ao complexo 43S; 5- Varredura pelo códon de iniciação da tradução; 6- Formação do complexo 48S; 7- Associação da subunidade maior ribossomal (60S) ao complexo 48S; 8- Formação do ribossomo 80S competente a alongamento. Fonte: Adaptado de (JACKSON *et al.*, 2010).

2.5.2 Complexo de Iniciação da Tradução- eIF4F

Um ponto central da iniciação da tradução é a formação do complexo eIF4F que atua no reconhecimento do mRNA maduro, na capacitação desse mRNA através da resolução das estruturas terciárias. Este é ainda o principal responsável pelo recrutamento do ribossomo através de sua interação com eIF3, além de auxiliar na migração da subunidade menor ribossomal pelo mRNA e seu correto posicionamento no códon de iniciação (JACKSON *et al.*, 2010). O complexo eIF4F é composto de três subunidades: eIF4E, que atua no reconhecimento do *cap*; o eIF4A, uma RNA helicase capaz de desfazer conformações secundárias no mRNA facilitando a tradução; e o eIF4G, uma proteína estruturadora do complexo que medeia as interações com os outros componentes do eIF4F e com a PABP, além de ser responsável pelas interações necessárias para o recrutamento do ribossomo (GINGRAS, *et al.*, 1999) (Figura 15).

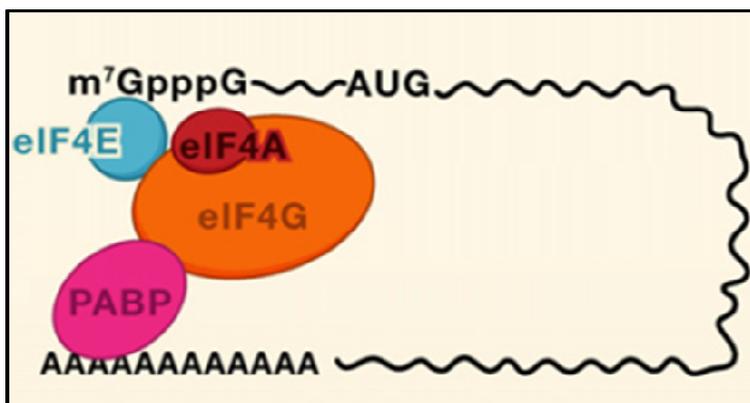


Figura 15. Ilustração do complexo eIF4F e PABP ligados ao mRNA maduro. m^7GpppG , estrutura do *cap*; em azul, eIF4E; em vermelho, eIF4A; em laranja, eIF4G; e em magenta, PABP ligada a cauda poli(A). Fonte: (Adaptado de, SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009).

2.5.2.1 eIF4E- Proteína de ligação ao *cap*

O eIF4E é uma proteína de 25kDa de ligação específica ao *cap* e que atua estimulando a tradução *cap*-dependente participando do recrutamento do mRNA através de sua ligação específica e de alta afinidade com o eIF4G (RHOADS, 2009). O eIF4E tem estrutura tridimensional na forma de uma mão em concha onde o eIF4G se liga na superfície dorsal em oposição à ligação do *cap* que se liga ao lado côncavo. Através de cristalografia de raio-X, comparação de seqüências aminoacídicas e estudos mutacionais foi demonstrado que a interação entre eIF4G envolve um motivo YXXXXL ϕ , onde X é

qualquer aminoácido e ϕ é uma Leucina, Metionina ou Fenilalanina (GINGRAS, *et al.*, 1999).

É comum a existência de famílias protéicas com múltiplos membros, e isso também ocorre para os múltiplos membros da família eIF4E de eucariotos e para outros fatores da iniciação da tradução como o eIF4A e eIF4G (RHOADS, 2009). Até então se sabe que em mamíferos o eIF4E-1 se liga ao *cap*, ao eIF4G e a proteína de ligação a eIF4E, 4E-BP (do inglês, *4E-Binding Protein*) enquanto o eIF4E-2 se liga ao *cap* e a 4E-BP, e o eIF4E-3 se liga ao *cap* e ao eIF4G (JOSHI *et al.*, 2004). Sendo sugerido que para cada organismo exista um membro da família eIF4E expresso constitutivamente e ubíquo responsável pela tradução, e outros membros envolvidos em funções especializadas durante o desenvolvimento (HERNÁNDEZ; VAZQUEZ-PIANZOLA, 2005).

A presença do eIF4E é um fator limitante para a iniciação da tradução e tem um papel chave na regulação desta, uma vez que a abundância do complexo eIF4F é normalmente limitada pelos níveis de eIF4E. A super-expressão de eIF4E está envolvida em numerosos casos de tumores humanos e também está relacionada com a progressão da doença para a metástase. Portanto, o eIF4E vem sendo alvo de numerosos estudos que incluem a sua utilização como marcador de estágio e prognóstico da doença e como potencial alvo no desenvolvimento de novas terapias anti-neoplásicas (MOERKE *et al.*, 2007).

Em tripanossomatídeos, quatro homólogos do eIF4E foram descritos originalmente em *Leishmania* e vem sendo foco de diferentes estudos, sendo denominados EIF4E1 a EIF4E4 (DHALIA *et al.*, 2005; YOFFE *et al.*, 2006, 2004). Contudo, nenhum dos homólogos é capaz de complementar a função do eIF4E de levedura (YOFFE *et al.*, 2006). Esses homólogos diferem quanto à capacidade de ligação ao *cap* e aos parceiros funcionais. Foi confirmado que os homólogos EIF4E1 e EIF4E4 interagem fortemente com o *cap4* peculiar dos tripanossomatídeos (DHALIA *et al.*, 2005; YOFFE *et al.*, 2004), enquanto o EIF4E3 interage mais fracamente e o EIF4E2 não interage com o *cap4* (YOFFE *et al.*, 2006). Ainda foi confirmada a participação dos homólogos EIF4E3 e EIF4E4 na formação de dois complexos eIF4F distintos e necessários para a viabilidade celular em tripanossomatídeos (FREIRE *et al.*, 2011). Mais recentemente dois homólogos adicionais de eIF4E foram identificados e estão sendo estudados, EIF4E5 e EIF4E6. Dados preliminares apontam para a existência de ainda dois outros complexos eIF4F onde esses homólogos participariam (EDEN FREIRE, comunicação pessoal).

2.5.2.2 eIF4A- RNA helicase

O eIF4A é uma RNA Helicase com atividade dependente de ATP, protótipo da família das DEAD-box RNA helicase, que são RNA helicases que contêm o domínio DEAD (Ácido Aspártico- Ácido Glutâmico-Glutamina-Alanina- Ácido Aspártico) ou DExD/H (Ácido Aspártico- Ácido Glutâmico- Qualquer aminoácido- Ácido Aspártico/ Histidina) conservados (JACKSON *et al.*, 2010). Essa proteína de 46-KDa atua no complexo eIF4F desenrolando possíveis estruturas secundárias formadas na região 5' UTR próxima ao *cap* do mRNA a ser traduzido (GINGRAS *et al.*, 1999). Sua atividade facilita o recrutamento da subunidade menor ribossomal 40S ao mRNA e permitindo o prosseguimento do complexo de pré-iniciação durante a varredura até o códon de iniciação da tradução (MARINTCHEV; WAGNER, 2004; SONENBERG; DEVER, 2003). A estrutura do eIF4A é constituída de dois domínios, ambos envolvidos na ligação ao RNA e ao ATP. Na conformação funcional ativa, esses dois domínios formam uma superfície de ligação ao RNA contígua, e o sítio de ligação ao ATP se localiza na interface desses dois domínios (ANDERSEN *et al.*, 2006). A atividade de helicase desse fator por si só é fraca, porém é substancialmente estimulada quando o eIF4A está participando na formação do complexo eIF4F (MARINTCHEV *et al.*, 2009).

Em mamíferos existem três homólogos de eIF4A, denominados eIF4AI, eIF4AII e eIF4AIII. Sabe-se que o eIF4AI e o eIF4AII são funcionalmente ativos durante a tradução e indistinguíveis (GINGRAS *et al.*, 1999). Já o eIF4AIII é funcionalmente diferenciado (LI *et al.*, 1999), e atua durante o *splicing* dos mRNAs no complexo protéico de junção de éxons (LE HIR *et al.*, 2000). Em tripanossomatídeos dois homólogos de eIF4A são conhecidos EIF4AI e EIF4AIII sendo denominados assim pela similaridade funcional com os homólogos de mamíferos (DHALLIA *et al.*, 2006, 2005). O EIF4AI de *L. major* é predominantemente citoplasmático e abundante nas formas promastigota do parasita, sendo capaz de interagir com o domínio central do fator EIF4G3 (DHALLIA *et al.*, 2006). Em outro trabalho, a proteína *LmEIF4AI* mostrou ter função RNA helicase dependente de ATP *in vitro* porém esta proteína não pôde complementar a função do eIF4A de levedura *in vivo* e de mamífero *in vitro* (BARHOUMI *et al.*, 2006). Já o *LmEIF4AIII* é pouco expresso e não interage com o eIFG3 (DHALLIA *et al.*, 2006). Esses homólogos quando estudados em *T. brucei* demonstraram que o *TbEIF4AI* é muito abundante e predominantemente citoplasmático e está envolvido com a formação do complexo eIF4F

de iniciação da tradução. Já o *TbEIF4AIII* é moderadamente expresso com localização exclusivamente nuclear. Esses achados indicam que o EIF4AI atua na síntese protéica enquanto o EIF4AIII participa da formação do equivalente ao complexo de junção de éxons durante o *trans-splicing* (DHALIA *et al.*, 2006) .

Embora a PABP não faça parte dos eIFs canônicos a sua atuação é imprescindível para a iniciação da tradução, através da circularização do mRNA proporcionada pela interação com a cauda poli-A e concomitantemente com o eIF4G (KAHVEJIAN *et al.*, 2005). Desta forma a sua ação aumenta a taxa de tradução devido a facilitação do processo de reciclagem dos ribossomos (JACKSON *et al.*, 2010).

2.5.2.3 eIF4G- Proteína multidomínio de manutenção do complexo eIF4F

O eIF4G é uma proteína de alto peso molecular responsável pela montagem do complexo eIF4F durante a ativação do mRNA pois possui sítios que medeiam sua interação com o eIF4E, eIF4A, PABP e mRNA. Esse fator ainda tem um papel crucial durante o recrutamento do complexo de pré-iniciação 43S para a interação com o mRNA através da interação deste com o eIF3, no caso de humano, ou os sítios de interação com eIF1 e eIF5 em levedura (MARINTCHEV; WAGNER, 2004; SONENBERG; DEVER, 2003). O eIF4G de humano pode ser dividido em três regiões de acordo com o padrão da clivagem por enzimas de *picornavírus*: N-terminal, Central e C-terminal. A região N-terminal é composta de aproximadamente 600 aminoácidos e contém os sítios de ligação ao eIF4E e à PABP. A região central contém o domínio de ligação ao eIF4A, RNA e eIF3. E por fim, a região C-terminal que possui um segundo sítio de ligação ao eIF4A e sítio de ligação à quinase MNK.

O sítio na porção Central de ligação ao eIF4A é um típico domínio encontrado em proteínas formadoras de complexos, denominado HEAT (de acordo com as proteínas onde foi inicialmente identificado, **H**untingtina, Fator de **E**longação 3, subunidade **A** da fosfatase 2A e proteína alvo da rapamicina 1/TOR1) (PREVOT *et al.*, 2003), sendo constituído de cinco pares de alfa hélices antiparalelas separadas por uma curta seqüência ligante flexível (MARCOTRIGIANO *et al.*, 2001). Em humanos, adicionalmente ao domínio HEAT central, denominado de MIF4G, são encontrados mais outros dois HEATs consecutivos na porção C-terminal, o HEAT-2 ou MA3 um segundo sítio que modula a interação com o eIF4A e o HEAT-3 ou W2 que interage com a quinase MNK.

Tanto o domínio HEAT-2 como o HEAT-3 são considerados atípicos quando comparados ao HEAT padrão, pois são mais compactos e têm os ângulos entre as α -hélices diferenciados (BELLSOLELL *et al.*, 2006) (Figura 16).

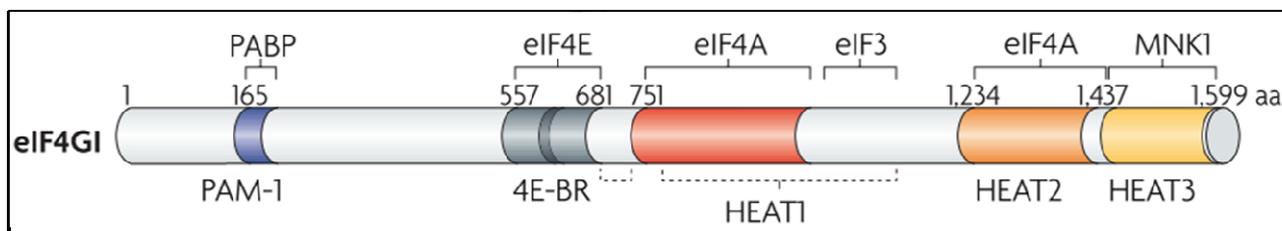


Figura 16. eIF4G humano, domínios de interação e respectivos ligantes. Representação esquemática do eIF4G humano mostrando na parte superior os parceiros funcionais e na parte inferior os domínios de ligação. PAM-1, domínio de ligação da PABP; 4E-BR, domínio de ligação do eIF4E; HEAT1, domínio de ligação ao eIF4A e eIF3; HEAT2, domínio de ligação modular ao eIF4A1 e HEAT3, domínio de ligação à quinase MNK. Fonte: Adaptado de (JACKSON *et al.*, 2010).

Em leveduras o eIF4G interage com o eIF4E através de um segmento de aproximadamente 100 aminoácidos contendo cinco hélices que se doblam numa conformação semelhante a um bracelete. Esse modelo de interação proposto é provavelmente conservado em eucariotos superiores (GROSS *et al.*, 2003) e o mesmo possivelmente ocorre para a ligação a PABP (GROFT; BURLEY, STEPHEN K, 2002). Por sua vez, o domínio MIF4G central do eIF4G é responsável pela interação com a RNA helicase eIF4A, embora o eIF4G humano apresente um segundo HEAT, o MA3 para esse tipo de interação. Sabe-se que o MIF4G é suficiente para a interação com o eIF4A (MARCOTRIGIANO *et al.*, 2001) mas, acredita-se que esses domínios de ligação adjacentes estejam relacionados à modulação da ligação com o eIF4A (MORINO *et al.*, 2000). Já o sítio de ligação ao eIF3 é imediatamente C-terminal ao MIF4G, e a ligação do eIF3 e do eIF4A ocorrem cooperativamente (KORNEEVA *et al.*, 2000). É importante salientar que não foram encontradas seqüências homólogas ao domínio de ligação entre eIF4G e eIF3 em levedura, e provavelmente estas também não são conservadas em eucariotos filogeneticamente distantes. É possível que o eIF4G de levedura se ligue fracamente ou não se ligue ao eIF3, já que em levedura é relatado uma interação alternativa entre eIF4G e eIF1 e eIF5 (HE *et al.*, 2003). Também não foi encontrada seqüência em homologia do sítio de ligação a PABP de humano e levedura, contudo a interação do eIF4G com a PABP ocorre em ambos os casos (MARINTCHEV; WAGNER, 2004).

A região N-terminal do eIF4G, que inclui os sítios de ligação ao eIF4E e PABP pode se aproximar ou interagir fracamente com os domínios HEAT. Essa afirmação é consistente com a atividade da quinase MNK, que fosforila o eIF4E e se liga no HEAT-3/W2 na porção C-terminal da proteína (MARINTCHEV; WAGNER, 2004). A maioria das interações ocorridas entre os eIF4G e os parceiros funcionais são cooperativas, entretanto, não existe nenhuma razão óbvia para isso já que não há sobreposição entre os sítios de ligação. Isso indica que o eIF4G não é somente uma proteína com múltiplos sítios de ligação, mas sim que diferentes partes desse peptídeo se relacionam e interagem de forma dinâmica (MARINTCHEV *et al.*, 2004; PREVOT *et al.*, 2003).

Os homólogos de eIF4G vêm sendo caracterizados em diversos organismos: dois homólogos para humanos, eIF4GI e eIF4GII; um único homólogo para coelhos eIFG1; dois para trigo eIF4G e isoEIF4G, com ortólogos em outras plantas; dois para *Saccharomyces cerevisiae*, TIF4631 and TIF4632; um para *Schizosaccharomyces pombe* e um para *Drosophila melanogaster*, DmEIF4G (HERNÁNDEZ; VAZQUEZ-PIANZOLA, 2005). Em tripanossomatídeos, cinco homólogos de eIF4G foram preditos para *L. major* por análise *in silico* de seqüências nucleotídicas contendo domínios equivalentes ao HEAT-1/MIF4G, sendo assim denominados *LmEIF4G1* a *LmEIF4G5*. Outros domínios característicos da ligação com os demais parceiros funcionais, como o 4E-BR, HEAT-2 ou HEAT-3, não foram encontrados. Esses cinco homólogos variam consideravelmente quanto à homologia com eIF4GI humano, cromossomo de origem, tamanho e peso molecular, como detalhado na tabela 2. Esses homólogos também divergem entre si quanto a localização do MIF4G, tamanho do N-terminal e C-terminal. A exceção são os *LmEIF4G3* e *G4*, que possuem uma região N-terminal curta e uma região conservada de 120 aminoácidos na região C-terminal que poderia ser um segundo domínio de ligação a parceiros funcionais (DHALIA *et al.*, 2005) (Figura 17).

Tabela 2. Características dos homólogos de eIF4G preditos em *L. major*.

Homólogo	Gene DB ID	Similaridade com eIF4GI*	Localização cromossômica	Tamanho em aminoácidos	Peso Molecular
<i>LmEIF4G1</i>	LmjF15.0060	43%	15	1016	114 KDa
<i>LmEIF4G2</i>	LmjF15.1320	37%	15	1425	145,9 KDa
<i>LmEIF4G3</i>	LmjF16.1600	39%	16	635	71,2 KDa
<i>LmEIF4G4</i>	LmjF36.6060	38%	36	765	84,6 KDa
<i>LmEIF4G5</i>	LmjF10.1080	37%	10	782	88,8 KDa

Resultados obtidos por análises *in silico* através da ferramenta disponível *on line* BLAST (do inglês, *Basic Local Alignment Search Tool*). * Similaridade com a seqüência do HEAT-1/MIF4G humano; KDa, KiloDaltons. Fonte: Adaptado de (DHALIA *et al.*, 2005).



Figura 17. Homólogos de eIF4G em tripanossomatídeos. Representação esquemática dos homólogos de eIF4G de *L. major*. Retângulos vermelhos, seqüência com similaridade com o HEAT-1/MIF4G humano; retângulos azuis, seqüência em C-terminal conservada entre o *LmEIF4G3* e *LmEIF4G4*.

Quanto a funcionalidade dos homólogos de eIF4G é descrito que alguns desses co-existem participando da formação de dois complexos eIF4F distintos em tripanossomatídeos possivelmente envolvidos diretamente na tradução e necessários para a viabilidade celular. O primeiro destes seria composto pelas subunidades EIF4G3/EIF4E4/EIF4AI e um segundo pelos fatores EIF4G4/EIF4E3/EIF4AI (FREIRE *et al.*, 2011). Dados mais recentes apontam para a existência de ainda dois outros complexos eIF4F formados pelos demais homólogos de eIF4E (EIF4E5 e 6) e eIF4G (EIF4G1, 2 e 5) (EDEN FREIRE, comunicação pessoal).

2.5.3 Regulação Global da Tradução

Como citado anteriormente a regulação da expressão gênica é dependente de dois mecanismos, o primeiro, já abordado, é o controle da tradução de mRNAs estágio-específicos, e o outro, a ser explorado aqui, é o controle global da síntese das proteínas. O controle global da tradução é um mecanismo que determina quais mRNAs serão traduzidos em proteínas dentro de uma determinada situação fisiológica particular. Esse controle permite o ajuste fino dos níveis de proteínas e proporciona uma funcionalidade homeostática normal, responsiva a estímulos de crescimento e proliferação (DOBRIKOV *et al.*, 2011; LIVINGSTONE *et al.*, 2010). Como resultado, vias chaves de transdução de sinais mitogênicos convergem nos fatores de iniciação da tradução (DOBRIKOV *et al.*, 2011). Em mamíferos, exemplos desse tipo de regulação são os controles das disponibilidades de moléculas ativas de eIF2 e de constituintes do eIF4F, via fosforilação reversível dessas proteínas (JACKSON *et al.*, 2010).

A ligação do complexo ternário eIF2-GTP-Met-tRNA_i^{Met} à subunidade ribossomal 40S para a formação do complexo de pré-iniciação 43S durante a iniciação da tradução é dependente da ligação do GTP ao eIF2. Em situações de *stress* a tradução é reduzida mediante fosforilação da subunidade α do eIF2 na Serina 51, impedindo a troca de GDP por GTP, inibindo a formação do complexo ternário. A fosforilação de eIF2 é mediada por quatro diferentes quinases, HRI (do inglês, *haem-regulated inhibitor*), PKR quinase (do inglês, *Protein kinase RNA-activated*), PERK quinase (do inglês, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*) e a GCN2, (do inglês, *General control non-derepressible-2*). Essas quinases têm homologia em seus sítios catalíticos e convergem diferentes tipos de *stress* celular em uma mesma via de sinalização. A fosforilação de eIF2 reduz a tradução de forma global, contudo, paradoxalmente, a tradução de alguns poucos mRNAs específicos para a adaptação ao *stress* é aumentada (HOLCIK; SONENBERG, NAHUM, 2005).

A regulação por fosforilação também pode controlar a concentração intracelular de constituintes ativos do complexo eIF4F. Essa regulação pode ocorrer de forma indireta através do controle pelas proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BP) ou de forma direta pela regulação da atividade dos constituintes do complexo eIF4F propriamente ditos. A regulação indireta é promovida pelo controle da disponibilidade do fator eIF4E através da atividade da 4E-BP. Essa é uma proteína inibitória que quando hipofosforilada se liga competitivamente ao eIF4E prevenindo sua interação com eIF4G e inibindo a formação do

complexo eIF4F (JACKSON *et al.*, 2010). Contudo a sinalização através da via quinase PI3K (do inglês, *phosphoinositide-3 kinase*) ativa a quinase mTOR (do inglês, *mammalian target of rapamycin*) que fosforila a 4E-BP (PAUSE *et al.*, 1994). Tal fosforilação ocorre em um número crítico de resíduos de serinas e treoninas específicos e modula a afinidade da 4E-BP pelo eIF4E, liberando esse para a formação do complexo eIF4F, e conseqüentemente promovendo a tradução *cap*-dependente (AVEROUS; PROUD, 2006; GINGRAS, *et al.*, 1999; JACKSON *et al.*, 2010).

Outra via de regulação da atividade de eIF4E é através da fosforilação direta desse fator, e para tal, a via de sinalização extracelular regulada pela quinase ERK1 e ERK2 (do inglês, *extracellular signal-regulated kinase*) e a via responsiva a mitógenos da p-38 MAPK (do inglês, *p38 mitogen-activated protein kinases*). Ambas convergem os estímulos para as serina/treonina quinases de integração de sinal denominadas MNK1 e 2 (do inglês, *MAPK signal integrating kinase*) (FUKUNAGA; HUNTER, 1997; WASKIEWICZ *et al.*, 1997), as quais fosforilam o eIF4E no resíduo de serina da posição 209 (JOSHI *et al.*, 1995; PYRONNET, 2000). Embora a fosforilação do eIF4E esteja associada ao aumento da afinidade deste pelo *cap* e por conseqüência aumento da eficiência de tradução, camundongos com deleção dupla de MNK1 e MNK2 não apresentam fosforilação de eIF4E, mas também de modo contraditório, não apresentam déficit de crescimento e proliferação (UEDA *et al.*, 2004). Adicionalmente, sabe-se que a fosforilação da serina 209 é requerida para o potencial oncogênico celular (FURIC *et al.*, 2010). A fosforilação de eIF4E é dependente da ligação do MNK ao eIF4G (PYRONNET *et al.*, 1999), ou seja, a quinase MNK só está apta a fosforilar o eIF4E quando em interação com o domínio HEAT3/MA2 na porção C-terminal do eIF4G, de forma que o eIF4E e a MNK tem que estar interagindo com a mesma molécula de eIF4G (JACKSON *et al.*, 2010). Nesse âmbito, a interação entre MNK e eIF4G é extremamente responsiva a ativação pela MAPK, ocorrendo desta forma a modulação da fosforilação de eIF4E através do controle da interação entre Mnk1-eIF4G (SHVEYGERT *et al.*, 2010).

De modo semelhante ao eIF4E, o eIF3 interage fisicamente com as quinases responsivas a estímulos mitogênicos, no caso, as mTOR e S6K1. Quando inativa, a quinase S6K1 se liga a eIF3 mas, após estimulação celular a quinase mTOR também pode se ligar ao eIF3 e fosforilar a S6K1. Esta última, por sua vez, se dissocia então do eIF3 e se torna apta a fosforilar seus alvos, promovendo a tradução. O eIF3 atua dessa forma como ancoradouro a fim de coordenar uma seqüência dinâmica de eventos em

resposta a estímulos celulares que promovem a síntese proteica (HOLZ *et al.*, 2005). A ligação de eIF3 ao eIF4G também é controlada pela via mTOR, aumentando sensivelmente os níveis de associação entre os fatores quando essa via de sinalização é estimulada. O modo como mTOR controla essa associação, contudo, permanece desconhecido (HARRIS *et al.*, 2006).

Sabe-se que o eIF4G desempenha um papel crítico durante o recrutamento da maquinaria de tradução e ainda que a maioria das vias de regulação global da tradução envolvem associações reguladas com o fator eIF4G, porém pouco é conhecido como se dá a regulação desse fator. Estudos iniciais começaram com a descrição de eIF4G como fosfoproteína e posteriormente abordaram quais possíveis vias de sinalização estariam envolvidas com a regulação da fosforilação e em que sítios elas ocorreriam. Foi possível demonstrar, através de separação proteica bi-dimensional que, no caso do eIF4GI de mamíferos, a adição de resíduos de fosforilação em sítios específicos na região C-terminal é responsiva à presença de soro e mitógenos. Mais especificamente, foi observado que a inibição das quinases PI3K (do inglês, *Phosphoinositide-3-kinase*) e mTOR impediam indiretamente a fosforilação de eIF4G. Também foi demonstrado, por espectrometria e estudos mutacionais que os sítios de fosforilação ocorrem nas serinas 1108, 1148 e 1192 (RAUGHT *et al.*, 2000). Mais recentemente, foi demonstrado que a indução seletiva da família da proteína quinase C por ésteres de forbol estimula a fosforilação de eIF4G na posição da serina 1186 proporcionando a interação ao MNK1 necessária para a fosforilação de eIF4E (DOBRIKOV *et al.*, 2011). Já o eIF4GII têm sua regulação por fosforilação sincronizada com o ciclo celular, de forma que durante a mitose a hiperfosforilação de eIF4GII interrompe a interação com eIF4E (PYRONNET; SONENBERG, 2001). Essa fosforilação ocorre no resíduo da serina 1156 e é decorrente de quinase dependente de Ca⁺/calmodulina I (QIN *et al.*, 2003). Contudo a identidade das quinases envolvidas na fosforilação do eIF4G, os sítios de atuação dessas quinases e os respectivos efeitos biológicos dessa modificação pós-traducional precisam ser melhor estudados.

Semelhantemente ao ocorrido em mamíferos, a regulação global da tradução através de mecanismos de modificações dos fatores de iniciação da tradução também vem sendo estudada em tripanossomatídeos, com a identificação de alguns desses fatores durante a caracterização de fosfoproteínas nesses organismos (NETT *et al.*, 2009), contudo nenhum estudo sobre a ocorrência dessas fosforilações durante o ciclo de

vida, os possíveis sítios de fosforilação, as quinases efetoras, e os respectivos efeitos biológicos durante o ciclo celular foi publicado até então. Nesse sentido, os estudos focados pelo grupo BiolMolTryp tem sido pioneiros ao demonstrar a existência de modificações pós-traducionais ocorrendo em homólogos de EIF4E-3 e E4 e PABP-1 (que embora não faça parte dos eIFs clássicos é imprescindível na formação do eIF4F) de *L. amazonensis* e *T. brucei*. Essas modificações variam durante o ciclo de vida desses organismos, onde os mesmos são representados por duas até cinco isoformas modificadas. A ocorrência dessas modificações não altera a localização citoplasmática dos fatores, contudo, condições de *stress* celular alteram o padrão dessas modificações pós-traducionais. Foi ainda possível confirmar que as modificações corridas nesses fatores são decorrentes de fosforilações, em especial para PABP-1, onde sabe-se que a isoforma de maior peso molecular é fosforilada (BATES *et al.*, 2000). Dessa forma tanto EIF4E4 quanto a PABP-1 são predominantemente fosforilados durante a fase de crescimento exponencial e desfosforilados na fase estacionária do cultivo enquanto, em contraste o padrão de fosforilação obtido para o eIF4E3 é exatamente o oposto. Adicionalmente foi demonstrado que as isoformas fosforilados de PABP-1 e EIF4E4 se ligam preferencialmente ao polissomos (DACOSTALIMA; dados não publicados MALVEZZI, 2010; PEREIRA, 2008).

De acordo com esses resultados e uma vez que as modificações pós-traducionais representam o mecanismo mais comum para alteração da função das proteínas (YANG, 2005), pode-se especular que, assim como em mamíferos, as fosforilações ocorridas nos fatores de iniciação da tradução em tripanossomatídeos estejam relacionadas às mudanças funcionais associadas à alterações metabólicas durante o ciclo de vida dos tripanossomatídeos. Análises nos genomas dos Trityps revelaram que *L. major*, *T. brucei* e *T. cruzi* possuem uma grande quantidade de quinases com 179, 156 e 171 enzimas desse tipo, respectivamente (BRENCHLEY *et al.*, 2007). Dentre as quinases, os membros da subfamília das MAP quinases controlam vários eventos celulares complexos como embriogêneses, proliferação, diferenciação e morte celular. Embora cada MAP quinase tenha características únicas, algumas características são compartilhadas, como por exemplo o fato das MAP quinases serem ativadas por cascatas enzimáticas envolvendo ao menos duas outras quinases. Além disso, MAP quinases fosforilam resíduos de serina ou treonina seguidos do aminoácido prolina na posição +1, sendo a presença dessa prolina na posição +1 um fator determinante para a identificação dos

sítios de fosforilação destas quinases. Isso ocorre devido às características estruturais da maioria das MAP quinases, que possuem um “bolso” para encaixe de um grande resíduo hidrofóbico localizado imediatamente antes do sítio catalítico. A prolina é preferida entre os aminoácidos hidrofóbicos porque a conformação desta mantém a cadeia lateral distante do sítio catalítico na superfície enzimática (CHEN *et al.*, 2001). Porém em alguns substratos a prolina é substituída por glicina, uma vez que a glicina não possui cadeia lateral e pode se acomodar no “bolso” de ligação ao resíduo hidrofóbico, como o ocorrido para a seqüência de fosforilação do eIF4E humano onde a Serina 209 precede uma glicina.

Em *T. cruzi*, sítios de fosforilação em resíduos serina/treonina de EIF4E3 foram localizados na região N-terminal da proteína (NAKAYASU *et al.*, 2009). Em *Leishmania* foram descritos dois sítios de fosforilação no EIF4E4 do tipo serina localizados próximos a resíduos de prolina (HEM *et al.*, 2010). Mapeando a PABP-1 foram encontrados múltiplos motivos S/TP, sete ao todo, conservados entre as diferentes espécies de *Leishmania* analisadas, e localizados dentro da região de conexão entre o N- e o C-terminal da proteína. Três desses sítios de fosforilação também são encontrados na PABP-1 de *T. brucei*. Estudos mutacionais comprovam que a abolição concomitante de seis desses possíveis sítios gera a expressão de uma única isoforma proteica de menor peso molecular, confirmando que a modificação pós-traducional que gera o aumento do peso molecular dessa proteína é de fato por adição de fosforilações. Ainda pode-se afirmar diante desse resultado que a predição dos sítios para MAP quinases foi confirmada (DE MELO NETO, dados não publicados).

Existe, portanto uma forte possibilidade de que, assim como em mamíferos, a regulação global da tradução em tripanossomatídeos seja um mecanismo imprescindível de regulação da expressão gênica associada ao ciclo de proliferação e diferenciação do parasita. Estudos nesse âmbito devem se seguir a fim de confirmar a existência desse mecanismo em tripanossomatídeos, ressaltando que como toda a regulação da sua expressão gênica ocorre de modo pós-transcricional, as modificações pós-traducionais dos fatores de iniciação da tradução de forma responsiva a estímulos mitogênicos e de *stress* celular, pode constituir uma etapa de suma importância na regulação da expressão gênica através da regulação global da tradução.

Esse trabalho, portanto teve como objetivo analisar a expressão de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G durante o ciclo de vida de *Leishmania* de forma

focada na ocorrência das possíveis modificações pós-traducionais relacionadas com a fase do ciclo de vida do parasita. Buscou-se ainda, associar essas modificações pós-traducionais com a presença de sítios de fosforilação por MAP quinases, e finalmente, comprovar a ocorrência de mecanismos de fosforilação agindo sobre tais fatores. Os resultados obtidos constituem uma etapa crucial para a formação do conhecimento necessário ao esclarecimento e compreensão dos mecanismos moleculares de regulação global da tradução que possivelmente existem nos tripanossomatídeos mas ainda são obscuros.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão dos cinco diferentes homólogos do fator de iniciação da tradução eucariótico eIF4G (EIF4G1 a EIF4G5) durante o ciclo de vida de *L. amazonensis* analisando as possíveis modificações pós-traducionais que possam estar correndo sobre tais homólogos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analisar comparativamente a expressão proteica dos homólogos EIF4G1 a EIF4G5 durante o ciclo de vida de *L. amazonensis*;
2. Avaliar os padrões de expressão proteica e possíveis modificações pós-traducionais dos homólogos EIF4G3 e EIF4G4 em culturas de *L. amazonensis* submetidas a condições especiais de cultivo;
3. Rastrear *in silico* possíveis sítios de modificação pós-traducional por fosforilação através de quinases responsivas a ciclo celular;
4. Comprovar a existência de modificações pós-traducionais por fosforilação nos homólogos EIF4G3 e EIF4G4.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CULTIVO DE PARASITAS

Formas promastigotas infectivas de *L. amazonensis* (MHOM/77/LTB0016) que se encontravam previamente estocadas em nitrogênio líquido foram descongeladas e mantidas em fase exponencial de crescimento através de repiques sucessivos a cada 3 dias em meio complexo Schneider, pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino, adicionado de 0,1% v/v de Penicilina e Estreptomicina (Sigma-Aldrich Co.), cultivadas em estufa B.O.D. a 26°C (CAMPOS *et al.*, 2008).

4.2 CURVAS DE CRESCIMENTO DE *L. AMAZONENSIS*

Células de promastigotas infectivas mantidas em fase exponencial de crescimento foram contadas em câmara de Neubauer e diluídas para uma concentração inicial de 10^6 células/mL em meio Schneider pH 7,2 a 26°C. Estas células foram cultivadas até a fase estacionária do crescimento, sendo repassadas ao mesmo meio, na mesma condição de cultivo e concentração celular, para dar início a curva de crescimento de formas promastigotas propriamente dita. Essa cultura foi monitorada por microscopia de luz direta e invertida quanto a morfologia, motilidade e concentração celular durante toda a curva. Alíquotas representativas foram então retiradas nos pontos zero hora, duas horas, seis horas e a cada 24 horas até a morte das células. As amostras obtidas foram centrifugadas a 10 000 G por cinco minutos a 4°C, o *pellet* de células foi lavado com tampão PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e novamente centrifugado sob as mesmas condições. O *pellet* obtido foi ressuspendido em tampão de amostra para SDS-PAGE (duas vezes concentrado) para uma concentração final de 2×10^5 células/ μ L e fervido por cinco minutos. Os extratos obtidos foram analisados posteriormente em ensaios de *Western-blot* (CAMPOS *et al.*, 2008).

4.3 CURVAS DE DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE *L. AMAZONENSIS*

Com o objetivo de realizar a diferenciação das *L. amazonensis* para forma amastigota, foram adaptadas as condições de cultivo para que se assemelhassem ao

ocorrido *in vivo* no interior dos fagolisossomos dos hospedeiros vertebrados infectados. Alíquotas de células obtidas de culturas de *L. amazonensis* em fase estacionária, ricas em formas promastigota metacíclica do parasita, foram contadas e repassadas, numa concentração final de 10^6 células/mL, para meio Schneider acidificado (pH ajustado em 5,5) suplementado de 20% de soro fetal bovino e os mesmos antibióticos supracitados a 32°C. Sabe-se que a temperatura interna dos vertebrados infectados por *L. amazonensis* (canídeos, lagomorfos, roedores e humanos) é de 37°C, contudo esse parasita é causador da forma muco-cutânea da leishmaniose, justificando assim o uso da temperatura em 32°C. A diferenciação morfológica em amastigotas foi analisada através de microscopia de luz em campo invertido, nos tempos zero, duas e seis horas e a cada 24 horas. Nesse tipo de diferenciação as células obtidas são chamadas de amastigotas-axênicas. Alíquotas do cultivo foram retiradas nos mesmos tempos, processadas e analisadas por *Western-blot* como já descrito para as formas promastigotas do parasito.

4.4 EXPRESSÃO HETERÓLOGA DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES EM *Escherichia coli*

A expressão das proteínas recombinantes correspondentes aos EIF4G1 a EIF4G5 foi realizada através de transformação em células quimiocompetentes de *Escherichia coli*, cepa BL21, das construções contendo os genes alvos clonados no vetor comercial de expressão pGEX4T3 (GE Healthcare Life Sciences), onde a expressão da proteína alvo ocorre fusionada a enzima Glutathione S-transferase (GST) na sua extremidade amino-terminal (Tabela 3).

Tabela 3. Construções plasmidiais utilizadas para super-expressão dos homólogos de eIF4G fusionados à cauda de GST.

Gene DB ID*	Construção	Proteína induzida	Peso molecular	Fonte
LmjF15.0060	pGEX4T3/LmEIF4G1	LmelF4G1+ GST	≈140 KDa	(DHALIA <i>et al.</i> , 2005)
LmjF15.1320	pGEX4T3/LmEIF4G2	LmelF4G2(N-T)+ GST	≈101,7 KDa	(DHALIA <i>et al.</i> , 2005)
LmjF16.1600	pGEX4T3/LmEIF4G3	LmelF4G3+ GST	≈97,8 KDa	(DHALIA <i>et al.</i> , 2005)
LmjF36.6060	pGEX4T3/LmEIF4G4	LmelF4G4+ GST	≈111,2 KDa	(MOURA, 2007)
LmjF10.1080	pGEX4T3/LmEIF4G5	LmelF4G5+ GST	≈115,4 KDa	(MOURA, dados não publicados)

Lm, *L. major*; **GST**, Glutathione S-Transferase, **kDa**, Kilo Daltons

As células foram transformadas e selecionadas segundo Sambrook *et al* (1989). Os clones obtidos foram crescidos em 250 mL de meio LB (Luria Bertani) sob agitação a 37°C, até a densidade ótica de 0,5 (OD de 600 nm), quando foi induzida a expressão das proteínas recombinantes de interesse pela adição de 0,1 mM de IPTG (Isopropil β -D-tiogalactosídeo), ainda sob agitação, porém agora a 30°C. Após a etapa de indução todo o cultivo foi centrifugado a 10.000g durante 10 minutos a 4° C e o sedimento de células ressuspenso em 20 mL de PBS. A lise celular foi realizada por ultra-sonicação, através de quatro pulsos de 30 segundos cada. Para análise da eficiência de indução o lisado foi então fracionado em gel de SDS-PAGE e posteriormente corado com Azul de Coomassie R250. No gel de SDS-PAGE corado com Azul de Coomassie 250-R também pôde ser mensurada a quantificação das proteínas induzidas através de comparação densitométrica com uma curva de BSA (*Bovine Serum Albumin*) com concentrações previamente conhecidas.

4.5 PURIFICAÇÃO DE ANTI-CORPOS POR IMUNOADSORÇÃO

Soros policlonais produzidos em coelhos contra os homólogos de eIF4G de *L. major* já haviam sido produzidos em estudos prévios do grupo, contudo foi necessário purificá-los para o desenvolvimento deste trabalho. Deste modo, cada uma das proteínas induzidas, purificadas e quantificadas foram fracionadas em gel de SDS-PAGE 15% e em seguida transferidas para membrana de PVDF (do inglês, *Polyvinylidene fluoride*) (imobilon-P, Milipore®). As proteínas uma vez transferidas foram coradas com Rouge Ponceau a 0,4%, e os fragmentos de membranas onde se encontravam excisados e picotados. Os pequenos fragmentos obtidos foram colocados em microtubos de 1,6 mL onde foram descorados por sucessivas lavagens em água destilada e posteriormente bloqueados por 30 minutos em solução de leite a 1% em PBS adicionado de Tween-20 a 0,05%. Posteriormente a retirada da solução bloqueadora, foi adicionado o anti-soro numa diluição de 1:2 em PBS e deixado sob agitação durante a noite a 4°C para que ocorresse a ligação do anti-corpo específico à proteína em questão. Após o período de incubação, o anti-soro depletado foi retirado e o anti-corpo específico foi eluído com 200 μ L de solução de Glicina ácida 0,1M (pH 2,5) sob vigorosa agitação por 5 minutos, seguido da neutralização do pH com 20 μ L de TRIS- HCl pH 8,0. A eficiência da purificação dos anti-

corpos foi testada quanto a sua especificidade e sensibilidade por ensaios de *Western-Blot*.

4.6 ENSAIOS DE WESTERN-BLOT

Inicialmente foram fracionadas em gel de SDS-PAGE 12,5%, quantidades dos extratos equivalentes à proteína total de 2×10^6 células do parasita, obtidas durante as curvas realizadas. Em seguida ao fracionamento foi realizada a transferência das proteínas para membrana de PVDF. A membrana foi então bloqueada com solução de leite desnatado (Molico A e D, Nestlé®) a 5% em TBS (*TRIS Buffered Saline*) adicionado de 0,05% de Tween-20 por uma hora, sob agitação a temperatura ambiente. Passado esse período a solução de bloqueio foi retirada e a membrana incubada com concentração pré-definida do anticorpo primário previamente purificado por imunoabsorção e diluído em solução igual de leite a 5% em TBS/Tween 20, durante a noite a 4°C, sob agitação. Posteriormente foram procedidas três lavagens com TBS e foi adicionado o anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado a enzima peroxidase (Jackson Immuno Research Laboratories), diluído 1:10.000 na mesma solução do primário, ficando sob agitação por 1 hora a temperatura ambiente, igualmente sob agitação. O ensaio foi finalizado após mais uma etapa de três lavagens com TBS e a visualização do resultado final, através de reação de quimioluminescência, realizada em filme fotográfico (Biomax Light, Kodak). Essa reação se deu pela incubação da membrana, por um minuto em 25 mL da solução quimioluminescente (25 mL de luminol 1,2 mM diluído em solução de Tris-HCl 0,1 M de pH 8,5, adicionado de iodofenol para uma concentração final de 0,4 mM e de peróxido de hidrogênio para 0,03%).

4.7 CULTIVO DOS PARASITAS NA PRESENÇA DE INIBIDORES DE PROCESSOS CELULARES ESPECÍFICOS

Para a realização das curvas de crescimento em condições diferenciadas na presença de inibidores, as células foram cultivadas partindo do mesmo protocolo descrito no item 4.2 para a curva de crescimento, contudo de acordo com o objetivo desejado foi adicionado um inibidor diferenciado a cada cultura de célula.

Objetivando a inibição da transcrição foi adicionado ao cultivo a Actinomicina D, para uma concentração final de 10 µg/mL. A Actinomicina D atua ligando-se fortemente ao DNA, através de intercalação entre pares de bases adjacentes de guanina-citosina, inibindo todas as formas de síntese de RNA. Portanto a síntese de proteínas é bloqueada pela ausência de rRNAs e mRNAs (<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/6/a1410dat.Par.0001.File.tmp/a1410dat.pdf>) Acessado em: 12 de jan 2012).

Já para a inibição da tradução proteica foram procedidas duas culturas, a primeira na presença de 50 µg/mL de Cicloheximida e uma segunda na presença de 50 µg/mL de Puromicina. A Cicloheximida é atuante no bloqueio da tradução impedindo a atividade peptil-transferase que ocorre no sítio peptidil do ribossomo, esta etapa é necessária para a adição dos resíduos de aminoácidos ao peptídeo nascente e continuação da tradução. Enquanto que a Puromicina inibe a tradução por ser um composto que possui estrutura semelhante a um tRNA carregado, desta forma irá interagir com o sítio acceptor do ribossomo se ligando nesse porém não sendo incorporado à cadeia nascente, impedindo o deslocamento do ribossomo através do mRNA e o alongamento da síntese protéica, finalmente causando desligamento precoce das subunidades ribossomais, inibindo a tradução (<http://www.sigmaaldrich.com/etc/medialib/docs/Sigma/Datasheet/2/p8833dat.Par.0001.File.tmp/p8833dat.pdf>), Acessado em: 12 de jan 2012). Para inibir o processamento dos mRNAs a droga empregada foi a Sinefungina numa concentração final de 2,6 µM, droga inibidora da metilação de bases de DNA e RNA alterando desta forma a expressão gênica. Também é atribuída a sinefungina a capacidade de inibir o processamento dos mRNAs (<http://www.scbt.com/datasheet-203263-sinefungin.html>) Acessado em: 12 de jan). Também foi usado Lactacistina [10 µM], um inibidor específico do proteossomo 26S, que em eucariotos superiores está relacionado a degradação de proteínas ubiquitinas diretamente associadas a ciclo celular e apoptose. Finalmente, o Ácido Okadáico [1µM], um potente inibidor não-seletivo de serina e treonina fosfatases (YI *et al.*, 2009).

Todos os cultivos foram realizados tendo como controle uma curva de crescimento seguindo mesmo protocolo de cultivo, contudo sem adição de nenhum inibidor. As alíquotas de todas as curvas foram retiradas nos mesmo pontos, que foram em zero, duas, seis e 24 horas.

4.8 RASTREAMENTO DE POSSÍVEIS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO POR MAP QUINASES NOS HOMÓLOGOS DE eIF4G

Dentre as aproximadamente 30 espécies que constituem o gênero *Leishmania* somente quatro (*L. major*, *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. braziliensis*) possuem seu genoma seqüenciado e disponível nas plataformas *on line*. Portanto, baseado nas quatro seqüências disponíveis foram realizados alinhamentos globais através do software CLUSTAL W para cada um dos homólogos proteicos. Os alinhamentos obtidos para cada proteína foram posteriormente rastreados, com auxílio do software BioEdit, para a presença dos sítios de MAP quinases que constituem um aminoácido serina ou treonina seguida pela presença de uma prolina. Foram considerados possíveis sítios aqueles com posição e composição conservados entre as quatro diferente espécies de *Leishmania* analisadas, como representado na figura 18.

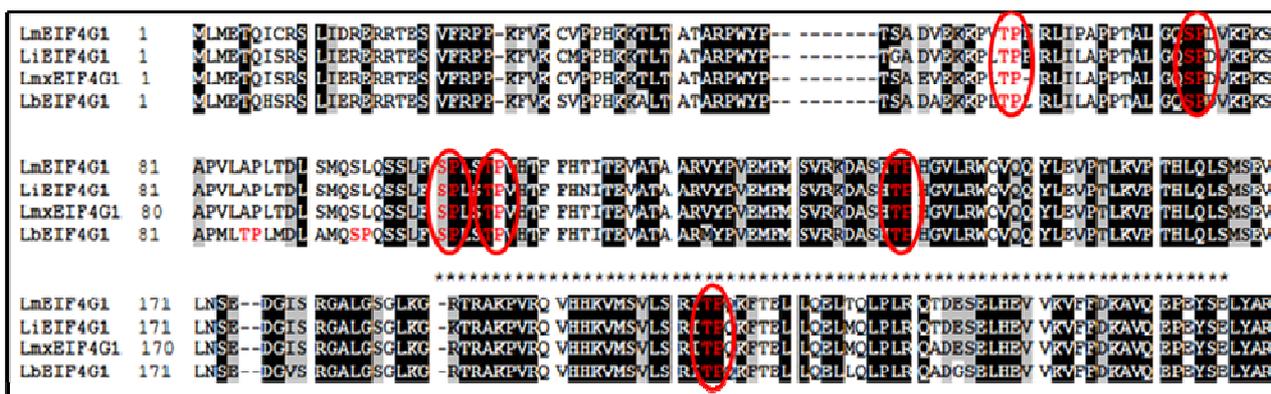


Figura 18. Representação de rastreamento *in silico* de sítios de fosforilação. Alinhamento global de seqüências aminoacídicas de homólogo protéico de eIF4G de *Leishmania spp.* e análise da presença de possíveis sítios de fosforilação (S/TP) conservados entre as espécies por MAP quinases (circulados em vermelho).

4.9 PURIFICAÇÃO E ANÁLISE DE FOSFOPROTEÍNAS

Para a purificação das fosfoproteínas totais de *L. amazonensis* utilizou-se o sistema comercial *PhosphoProtein Purification Kit* (Qiagen) que permite, através de coluna de afinidade por íons metais, a separação das proteínas fosforiladas das demais proteínas do organismo. Todas as etapas da purificação foram seguidas conforme protocolo descrito pelo fabricante e ilustrado na Figura 19 e são resumidas como se segue: 1- Lise de 10^7 células de *L. amazonensis* com tampão de lise contendo nuclease

Benzonase e inibidor de protease; 2- Incubação por 30 minutos a 4° C, agitando vigorosamente a cada 10 minutos; 3- Centrifugação do lisado a 10.000G por 30 minutos a 4°C. 4- Recuperação do sobrenadante e determinação da concentração proteica total; 5- Ajuste da concentração proteica do lisado para 0,1mg/ml; 6-Passagem de 25mL do lisado pela coluna de afinidade; 7- Coleta da fração não-ligante contendo as proteínas não-fosforiladas (porém as proteínas fosforiladas que excederam o limite de saturação da coluna podem estar presentes nessa fração); 8- Lavagem da coluna com 6 ml do tampão de lise; 9- Eluição da fração fosforilada com 500µl de tampão de eluição; 10- Coleta das fosfoproteínas; 11-repetição do passo 9 e 10 cinco vezes, coletando as proteínas em tubos distintos; 12- Determinação da concentração de cada eluição.

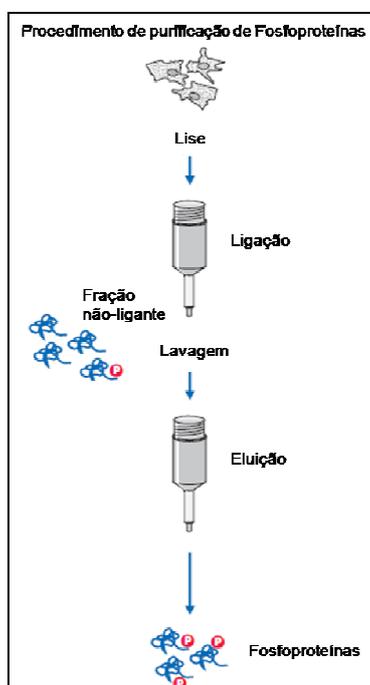


Figura 19. Completa separação de proteínas não-fosforiladas e fosforiladas. Representação esquemática da separação de fosfoproteínas provenientes de cultura de células eucarióticas através de ligação à coluna de afinidade por íons metálicos baseada no *Phosphoprotein Purification Kit*, Quiagen Fonte: (Quiagen, 2011).

5. RESULTADOS

5.1 CURVAS DE CRESCIMENTO E DIFERENCIAÇÃO *IN VITRO* DE *L. AMAZONENSIS*

A mimetização *in vitro* do ciclo de vida de *L. amazonensis* iniciou-se com a observação da morfologia e concentração celular nos pontos zero, duas e seis horas da curva de crescimento. A cultura foi iniciada com células derivadas de outra cultura pré-existente já em fase estacionária de crescimento, de forma que todas as células contidas nessa estariam com seu crescimento interrompido em fase G1 do ciclo celular. Nesses momentos iniciais, não foi observado divisão celular representando assim a fase *lag*, ou de adaptação, da curva de crescimento. Também não foram observadas alterações morfológicas significativas. Em sequência a fase *lag*, foi observada a fase exponencial, ou *logarítmica*, do crescimento celular, nos pontos 24 horas, 48 horas, 72 horas. Nesse período pôde-se visualizar um número elevado de células em divisão, bastante móveis e com morfologia uniforme, agora na forma de promastigota procíclica. A fase estacionária foi representada pelos pontos de monitoramento em 96 horas e 120 horas de crescimento onde as células estavam sob um ritmo diminuído de proliferação. Sendo que no ponto em 96 horas a cultura se apresentava de forma heterogênea com a presença de células com modificações morfológicas como aumento do flagelo, alongamento celular e diminuição da motilidade, indicando o início do aparecimento de formas promastigotas metacíclicas na cultura. Já no ponto 120 horas, foi possível inferir a contagem máxima de células e observar uma população, agora predominante, de formas promastigotas metacíclicas. Ainda na fase estacionária também pôde ser observada a presença de pequenas rosetas, que são estruturas formadas por um conglomerado de células que se unem pelos pólos anteriores durante o início do processo de morte celular. A fase de declínio da curva, ou morte celular, foi representada pelo ponto de 144 horas, onde foi visualizada a presença de várias estruturas de rosetas bem aumentadas com bastante células mortas e em fragmentação, sendo este considerado o ponto final da curva de crescimento (Figura 20).

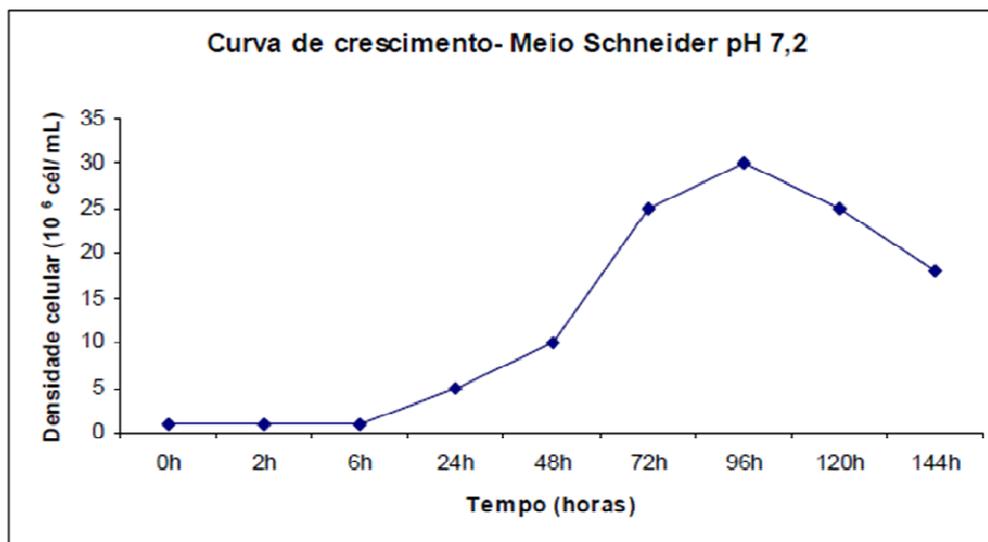


Figura 20. Padrão de crescimento de *L. amazonensis*. Curva de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* cultivadas em meio de cultura Schneider em pH 7,2 a 26°C.

Subseqüentemente foi realizado o cultivo objetivando a diferenciação de *L. amazonensis* para a forma amastigota. Ao iniciar a curva também foram coletadas amostras nos pontos zero, duas e seis horas e do mesmo modo, nesse período de adaptação, não foi visualizado crescimento da cultura, nem alterações nas morfologias das células. Contudo, a partir de 24 horas de incubação nessas condições pôde-se observar crescimento exponencial da cultura com drástica mudança morfológica com a alteração das formas alongadas e flagelares para a forma amastigota-axênica, arredondadas e aflagelar. Do ponto 24 horas até 96 horas continuou-se observando crescimento exponencial da cultura e a morfologia das amastigotas-axênicas continuou constante. Posteriormente, a cultura entrou na fase de declínio, sendo observada a presença de muitas células mortas e em processo de fragmentação (Figura 21).

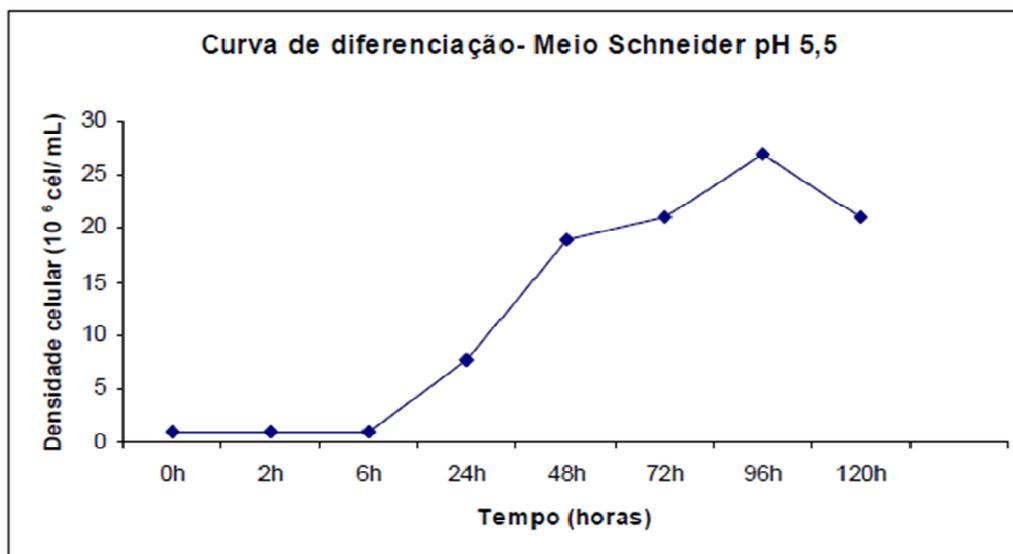


Figura 21. Perfil do crescimento de *L. amazonensis* durante diferenciação. Comportamento do crescimento de *L. amazonensis* cultivadas *in vitro*, durante curva de diferenciação de promastigotas em amastigotas-axênicas em meio de cultura Schneider pH 5,5 a 32°C.

5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS HOMÓLOGOS DE eIF4G DURANTE O CICLO DE VIDA DE *L. AMAZONENSIS*

Para dar início a análise da expressão dos homólogos eIF4G propriamente dita foi crucial a obtenção dos anticorpos purificados específicos para cada homólogo do fator de iniciação da tradução em estudo. Para tal, os anti-soros obtidos em trabalhos previamente realizados pelo grupo necessitaram de purificação, sendo realizada por imunoabsorção às proteínas recombinantes correspondentes. Desta forma, a etapa inicial da purificação dos anti-corpos é a indução à super-expressão das proteínas recombinantes de *L. major* fusionadas a cauda de GST em células de *E. coli*. Essa etapa foi realizada com sucesso uma vez que todos os homólogos foram induzidos de acordo com o peso molecular desejado e em quantidades abundantes necessárias para a sua utilização nos ensaios de purificação. Em sequência à obtenção das proteínas recombinantes, as mesmas foram utilizadas no ensaio de purificação dos anticorpos específicos. O resultado da purificação foi satisfatório, pois os anticorpos purificados específicos para cada homólogo de *L. major* (EIF4G1 a EIF4G5) reconheceram com especificidade as proteínas nativas correspondentes em extratos totais de *L. amazonensis* (Figura 22).

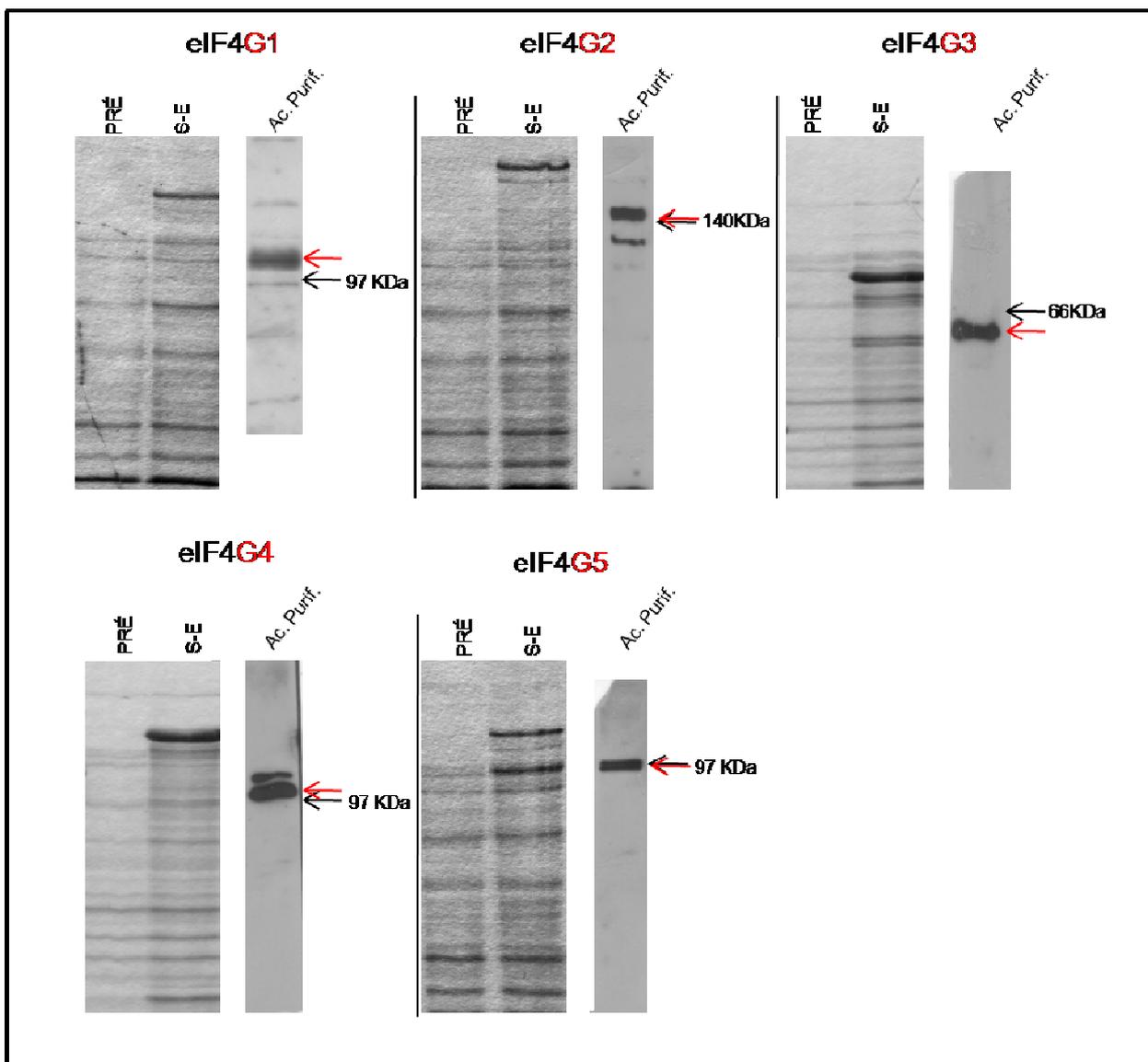


Figura 22. Super-expressão dos homólogos EIF4G1 a EIF4G5 fusionados a GST e teste de eficiência de purificação e reconhecimento dos anticorpos específicos. PRÉ, Pré-indução de extratos de *E. coli* transformadas com as devidas construções corados com Azul de Comassie; S-E, Extratos de *E. coli* induzidos à super-expressão das diferentes proteínas recombinantes; Ac.Purif, *Western-Blot* do teste de eficiência de purificação e reconhecimento de extratos de 2×10^6 células de *L. amazonensis*; Seta vermelha, proteína de interesse; Seta preta, marcação de peso molecular; KDa, peso molecular em KiloDaltons.

Confirmado o reconhecimento os extratos celulares contendo as proteínas totais provenientes de todos os pontos de monitoramento das curvas de crescimento e diferenciação foram processados e analisados para a avaliação da expressão proteica dos homólogos de eIF4G (eIF4G1 a G5) encontrados em *L. amazonensis*.

5.2.1 Análise da expressão dos homólogos de eIF4G em curvas de crescimento de promastigotas.

Inicialmente procedeu-se a análise semi-quantitativa da expressão do fator EIF4G1. Esse homólogo apresentou padrão diferenciado de expressão durante o crescimento da forma promastigota. Quando no início do crescimento, fase *lag*, o EIF4G1 foi observado com várias bandas (isoformas) no *Western-Blot* de pesos moleculares um pouco aumentados, bem aproximadas e conglomeradas assemelhando-se a uma única banda bastante espessa. Já na fase de crescimento exponencial ocorreu a diminuição gradativa da expressão das isoformas de peso aumentado, ao passo que no ponto 72 horas a expressão de eIF4G1 é reduzida à única banda central bem delimitada. Durante a saída da fase exponencial as isoformas maiores voltam a ser detectadas e o padrão de bandas dispersas é reconstituído na fase estacionária.

O homólogo EIF4G2 é o de maior peso molecular entre os homólogos eIF4Gs de *Leishmania* e de difícil visualização. Entretanto, foi possível observar que o mesmo encontra-se presente durante todo o desenvolvimento das células promastigotas do parasita como uma única forma de peso molecular e intensidade conservados, não sofrendo nenhuma alteração relacionada ao ciclo de vida do parasita, portanto, expresso de maneira constitutiva. Semelhantemente ao EIF4G2 o homólogo EIF4G3, foi reconhecido pelo anticorpo específico no peso molecular esperado, assim como o visto no teste de purificação e reconhecimento. Esse fator foi expresso em todo o crescimento, independentemente da fase do ciclo celular da cultura, sendo essa expressão inalterada quanto à intensidade ou presença de isoformas.

Em seguida, foi realizada a análise da expressão do homólogo EIF4G4, demonstrando que esse fator apresentou um padrão diferenciado de expressão ao longo do crescimento. Já que nas primeiras horas do cultivo, onde se dá a fase de adaptação da cultura, a intensidade da proteína é diminuída denotando uma menor expressão nesses pontos. Em contrapartida, apesar de ter ocorrido o reconhecimento da proteína no tamanho esperado, adicionalmente foi observado à presença de ao menos duas isoformas adicionais. Essas isoformas de peso molecular aumentado e menor intensidade indicam a presença de possíveis modificações pós-traducionais ocorrendo também nesse fator. Finalmente analisou-se o homólogo EIF4G5, que similarmente a todos os homólogos eIF4G, está presente durante todo o ciclo de crescimento de formas

promastigotas do parasita. Entretanto, embora a proteína seja reconhecida no tamanho esperado foi possível visualizar a presença de uma segunda isoforma constante e de intensidade igual no *Western-Blot*, que assim como os resultados do EIF4G1 e EIF4G4 pode ser atribuída a modificações ocorridas na proteína posteriormente à tradução (Figura 23).

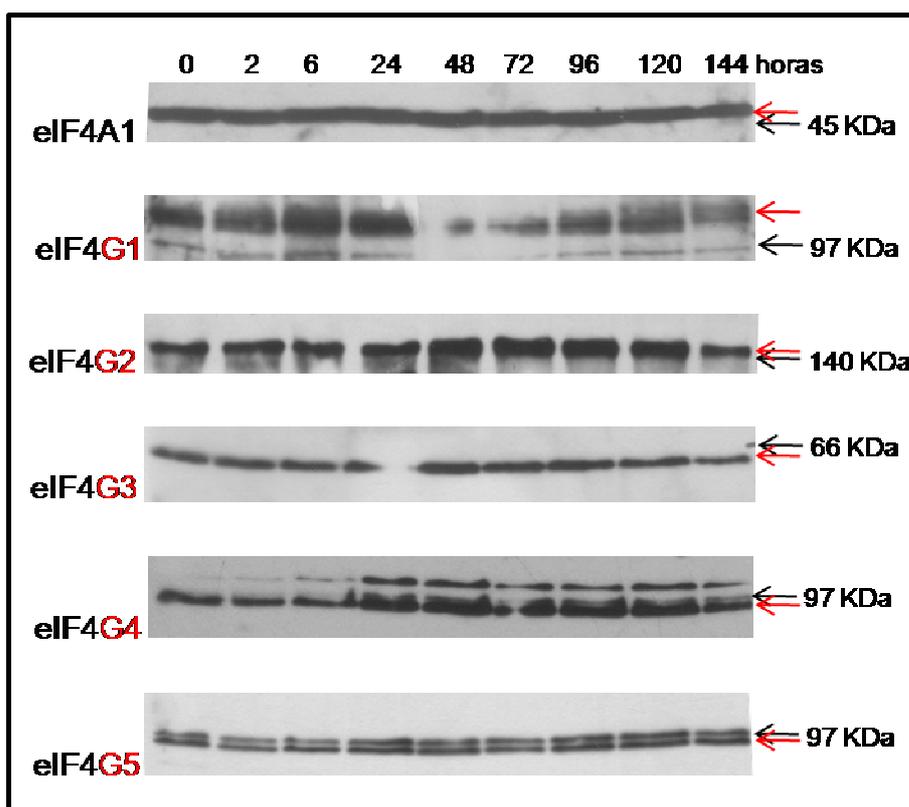


Figura 23. Expressão dos homólogos eIF4G ao longo do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*. A proteína EIF4A1 é de expressão constitutiva, e utilizada como controle da quantidade de proteína total por alíquota analisada; Seta vermelha, proteína de interesse; Seta preta, marcação de peso molecular; KDa, peso molecular em QuiloDaltons.

5.2.2 Análise da expressão dos homólogos de eIF4G em cultura de diferenciação de amastigotas-axênicas.

Para a análise semi-qualitativa da expressão dos homólogos de eIF4G ao longo da diferenciação das células promastigotas de *L. amazonensis* em amastigotas-axênicas, iniciou-se pela análise do EIF4G1, contudo, até o presente momento, a detecção do EIF4G1 na fase amastigota do crescimento não foi satisfatória. Já a proteína EIF4G2, da mesma forma como o ocorrido em promastigotas, é de difícil visualização por possuir alto peso molecular. Contudo, em amastigotas essa isoforma foi passível de mecanismos de

degradação, o que provavelmente explica o padrão de bandas “em escada” ocorrido nos pontos 24, 72 e 96 horas da curva de diferenciação, que mesmo após exaustivas repetições continuou ocorrendo. Mesmo sofrendo degradação nesses pontos supracitados foi possível observar nos demais pontos analisados que o fator foi expresso com o tamanho esperado e de peso e intensidade invariável. Embora o resultado indique que a expressão desse fator em amastigotas ocorra de maneira constitutiva, assim como em promastigota, como a análise não foi totalmente satisfatória não há possibilidade de confirmar que não ocorram modificações na expressão desse fator nas células diferenciadas.

Dando continuidade as análises de expressão, o fator EIF4G3 foi observado com o peso molecular esperado, com intensidade de expressão invariável e sem alterações quanto a presença de possíveis modificações ocorridas ao longo da diferenciação, semelhante a promastigotas. Já o homólogo EIF4G4 foi visualizado com semelhanças com o ocorrido para as células em fase promastigota. Embora a proteína seja reconhecida durante todo o cultivo da diferenciação com o peso molecular adequado é possível visualizar a presença de isoformas protéicas ocorrendo em todos os pontos analisados do cultivo até a morte da cultura. Corroborando com a hipótese de possíveis modificações pós-traducionais ocorridas nesse fator. Curiosamente, a intensidade de expressão dessa fator ocorre de forma inversa do visto para promastigota, já que as maiores quantidades protéicas foram vistas na fase de adaptação do crescimento, diminuindo durante o crescimento exponencial. Por fim, o homólogo EIF4G5 foi observado com o padrão de expressão igual ao de promastigota durante todo o cultivo de amastigota, apresentando duas isoformas de tamanhos aproximados. Interessantemente foi possível observar que nas células em fase de amastigotas-axênicas houve aumento da intensidade de expressão das isoformas de maior peso molecular, sobressaindo-se à isoforma de tamanho inferior, portanto a isoforma possivelmente modificada pós-traducionalmente é predominante nessa forma celular (Figura 24).

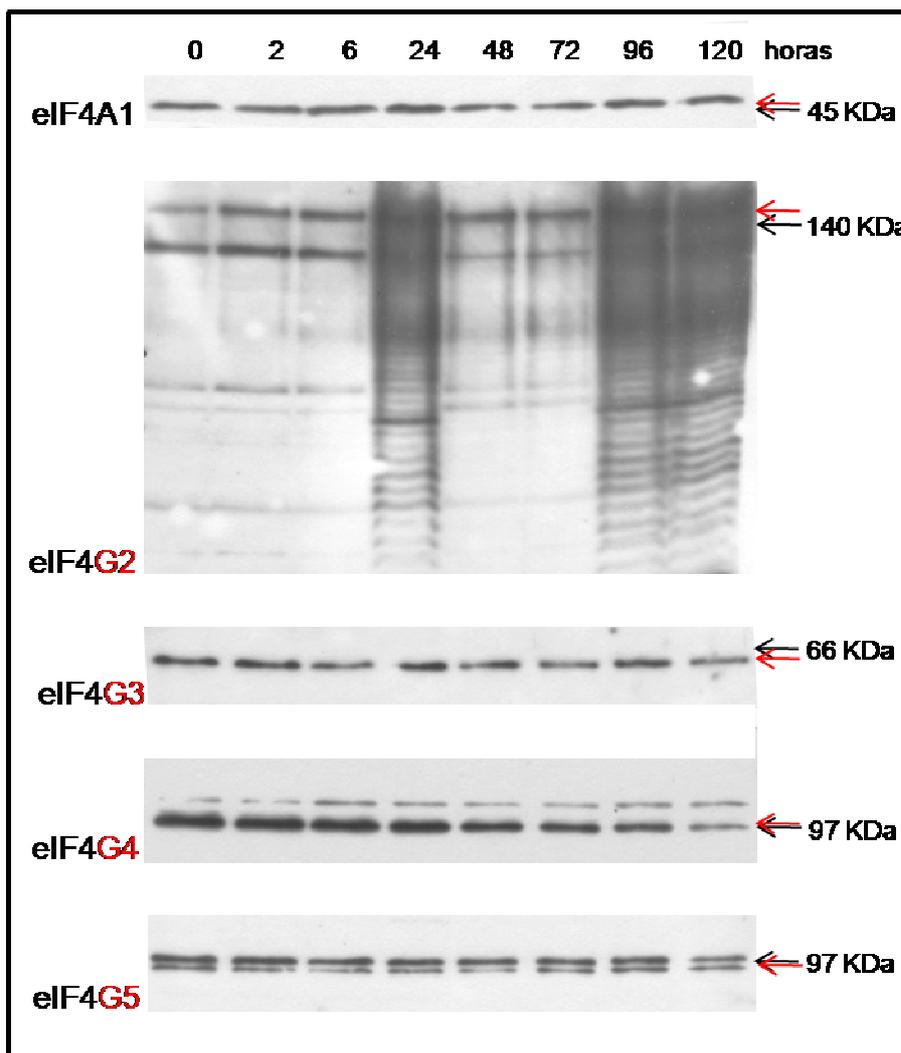


Figura 24. Expressão dos cinco homólogos de eIF4G (EIF4G1 a EIF4G5) durante diferenciação *in vitro* de *L. amazonensis*. Expressão dos homólogos eIF4G durante o cultivo de amastigotas de diferenciação; EIF4AI, controle da quantidade de proteína total por alíquota analisada; Seta vermelha, proteína de interesse; Seta preta, marcação de peso molecular; KDa, peso molecular em KiloDaltons.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS HOMÓLOGOS EIF4G3 E EIF4G4 DE *L. AMAZONENSIS* SOB CONDIÇÕES DIFERENCIAIS DE CULTIVO

Com o objetivo de melhor caracterizar o comportamento de expressão de EIF4G3 e EIF4G4 em *L. amazonensis*, foram realizados vários testes fazendo uso de diversos inibidores de processos biológicos diferentes. Os resultados obtidos nestes experimentos poderiam nos conduzir a indícios sobre como esses fatores estariam sendo regulados, como estariam envolvidos ativamente na iniciação da tradução, e também, poderíamos avaliar a morfologia celular e o padrão de expressão dos fatores durante diferentes induções de estresse, visto que estes processos biológicos são essenciais para a

viabilidade celular. Deste modo as possíveis alterações no comportamento dos homólogos foram analisadas frente ao uso dos diferentes inibidores a fim inferir a relação entre o processo biológico inibido e o padrão de expressão proteica obtido.

Os compostos inibidores de transcrição e tradução (Actinomicina D, Cicloheximida, Puromicina) foram os de maior toxicidade, alterando a fisiologia celular, causando distorções na morfologia, parada no crescimento e morte precoce da cultura em 24 horas. Todavia os homólogos EIF4G3 e EIF4G4 não demonstraram alterações no padrão de expressão e modificações pós-traducionais comparando-se com o controle na ausência de drogas inibidoras, estando expressos até o momento da morte celular nos três experimentos independentes. Com exceção do momento de morte da cultura onde houve pequena diminuição da detecção dos fatores possivelmente associado à proteólise (Figura 25).

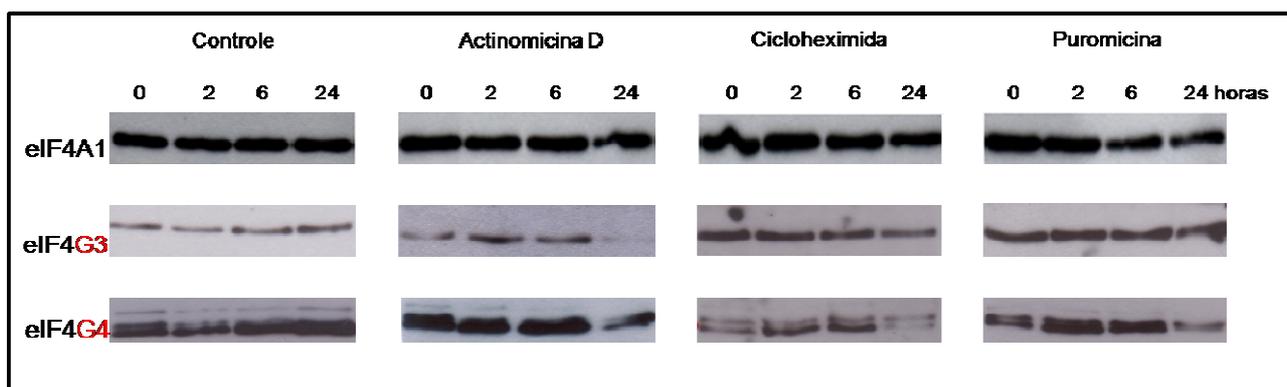


Figura 25. Análise da expressão dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 durante cultivo na presença de diferentes inibidores celulares. Actinomicina D, inibidor de transcrição; Cicloheximida e Puromicina, inibidores de síntese protéica. EIF4A1, proteína de expressão constitutiva utilizada como controle de quantidade de amostra analisada.

Quanto ao uso de inibidor do processamento de RNAs (Sinefungina) as células embora demonstrassem inibição e parada de crescimento, não apresentavam morfologia alterada e nem se encontravam em processo de morte celular. Os fatores EIF4G3 e EIF4G4 foram expressos de maneira semelhante à curva controle, não podendo, assim, ser feita associação entre a expressão dos níveis e isoformas de EIF4G3 e EIF4G4 com a parada do processamento de mRNAs (Figura 26).

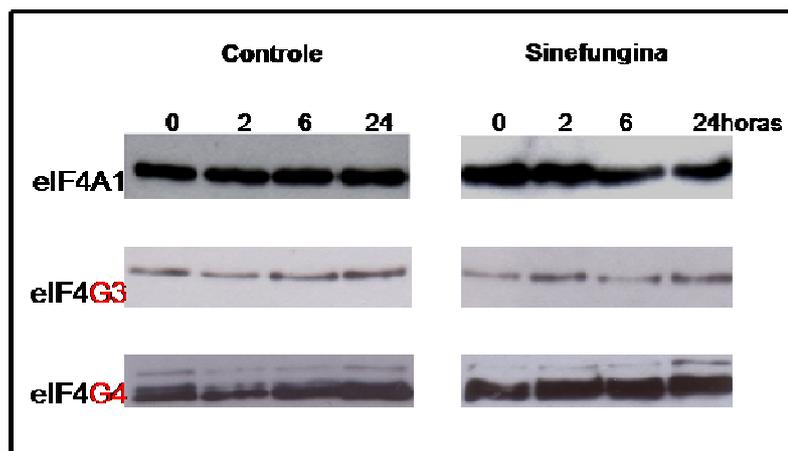


Figura 26. Análise da expressão dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 durante cultivo na presença de **Sinefungina**. Sinefungina, inibidor do processamento de mRNAs. eIF4A1, proteína de expressão constitutiva utilizada como controle de quantidade de amostra analisada.

Quando aplicado o inibidor de atividade do proteossomo (Lactacistina) e o inibidor de serina/treonina fosfatase (Ácido Okadáico) as células não apresentaram a capacidade de desenvolvimento diminuída ou retardada como observado nos inibidores utilizados anteriormente, visto que apresentaram taxa de crescimento semelhante à cultura controle. Também não foram observadas alterações morfológicas, nem de motilidade das células. De mesmo modo, não houve alterações quanto ao padrão de expressão proteica e modificações pós-traducionais dos homólogos EIF4G3 e EIF4G4 (Figura 27).

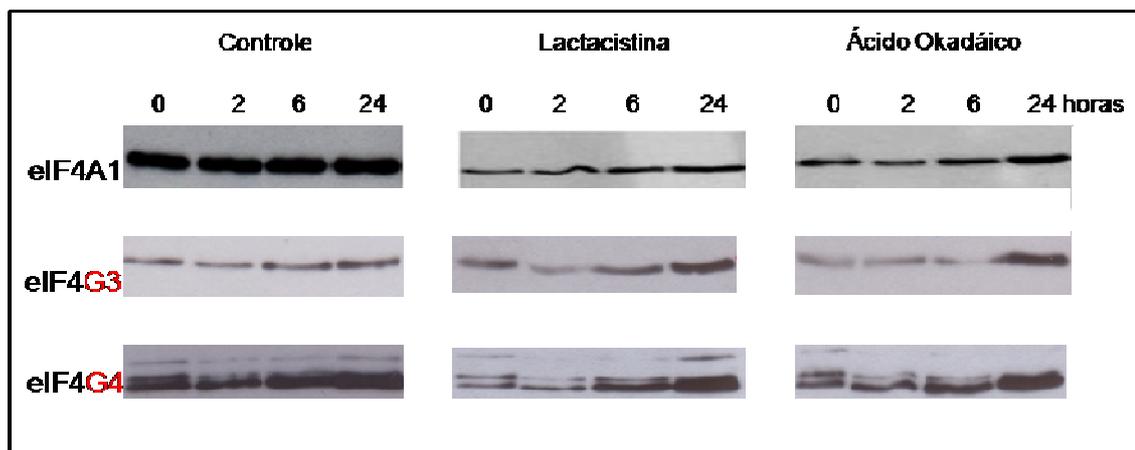


Figura 27. Análise da expressão dos fatores EIF4G3 e EIF4G4 durante cultivo na presença de **inibidores de vias específicas**. Lactacistina, inibidor da atividade do proteossomo 26S; Ácido Okadáico, inibidor da atividade de Serina e Treonina fosfatases. eIF4A1, proteína de expressão constitutiva utilizada como controle de quantidade de amostra analisada.

5.4 IDENTIFICAÇÃO *IN SILICO* DE POSSÍVEIS SÍTIOS DE FOSFORILAÇÃO POR MAP QUINASES NOS HOMÓLOGOS eIF4G DE *LEISHMANIA*

De acordo com os resultados da análise da expressão dos homólogos de eIF4G durante o ciclo de vida de *L. amazonensis* que indicam fortemente a presença de possíveis modificações pós-traducionais em alguns dos fatores analisados, tornou-se necessária a identificação *in silico* dos possíveis sítios de modificação pós-traducional. O resultado da análise *in silico* de possíveis sítios de fosforilação por MAP quinases encontrados na seqüência do EIF4G1 mostrou que esse homólogo possui 14 possíveis resíduos passíveis de fosforilação conservados entre as seqüências das espécies de *Leishmania* analisadas, sendo sete sítios do tipo serina e sete treonina. Estes sítios seguem a seguinte distribuição: cinco se encontram na região amino-terminal, um no interior do HEAT1/MIF4G, e oito distribuídos na porção carboxi-terminal. O homólogo de EIF4G2, semelhantemente, possui múltiplos possíveis sítios de atuação de MAP quinases conservados ente as espécies de *Leishmania* analisadas, sendo dez no total, distribuídos como se segue: um na porção N-terminal, três sobrepostos ao HEAT1/MIF4G e seis no C-terminal da proteína. Já os homólogos EIF4G3, EIF4G4 e EIF4G5 de mesma forma possuem respectivamente dois, quatro e três resíduos passíveis de regulação por fosforilação pelas MAP quinases sendo todos do tipo serina/prolina (Figura 28).

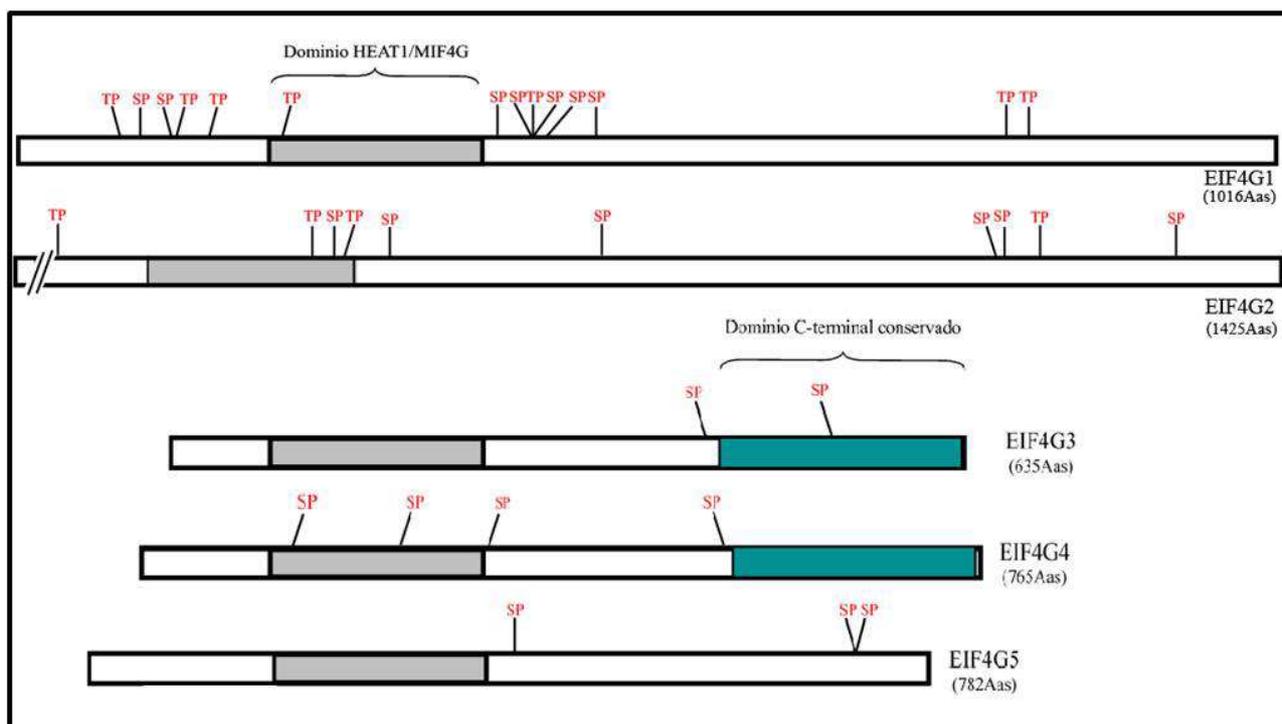


Figura 28. Representação esquemática dos sítios de fosforilação nos homólogos de eIF4G de *Leishmania* spp. Representação da distribuição dos sítios de fosforilação nas seqüências aminoacídicas das proteínas EIFG1, EIFG3, EIFG4 e EIFG5. SP, sítio de fosforilação no resíduo de Serina; TP, sítio de fosforilação no resíduo de Treonina; Barras cinzas, domínio HEAT1/MIF4G; Barras verdes, domínio Carboxi-terminal consevado do EIFG3 e EIFG4; Aas, aminoácidos

5.5 IDENTIFICAÇÃO DA FOSFORILAÇÃO NOS HOMÓLOGOS DE EIF4G3 e EIF4G4 DE *L. AMAZONENSIS*

Nesse e no tópico subsequente enfatizou-se o foco do trabalho nos homólogos EIF4G3 e EIF4G4, tendo em vista que estes homólogos já estarem descritos em trabalhos anteriores como funcionalmente ativos na síntese proteica, pois são participantes da formação de complexos eIF4F distintos em tripanossomatídeos (FREIRE *et al.*, 2011). Sendo assim, para a confirmação da ocorrência das modificações pós-traducionais por fosforilação nesses fatores, procedeu-se a purificação das proteínas fosforiladas encontradas dentre o conjunto completo de proteínas de *L. amazonensis* seguida da análise da presença dos EIF4G3 e EIF4G4 entre essas proteínas fosforiladas.

Como observado na Figura 29, os homólogos EIF4G3 e EIF4G4 foram encontrados presentes no lisado total do parasita como esperado, demonstrando que não houve degradação dos fatores após o método de lise. Também estavam presentes na fração não-ligante, essa fração corresponde majoritariamente às proteínas não fosforiladas, mas também se encontra nela as proteínas fosforiladas que excederam o

limite de saturação da coluna de afinidade. Adicionalmente ambas estavam presentes na fração de eluição das proteínas ligadas a coluna, ou seja, ambos os fatores podem ser considerados como proteínas fosforiladas.

O EIF4A1 foi utilizado como controle da reação de purificação de fosfoproteínas, uma vez que é uma proteína sabidamente não fosforilada. Desta forma, o EIF4A1 foi encontrado nas frações contendo o extrato total, as proteínas não-ligantes e no controle do *Western Blot* contendo o extrato total, e não esteve presente na fração correspondente às proteínas fosforiladas, confirmando-se assim a eficiência da reação de purificação.

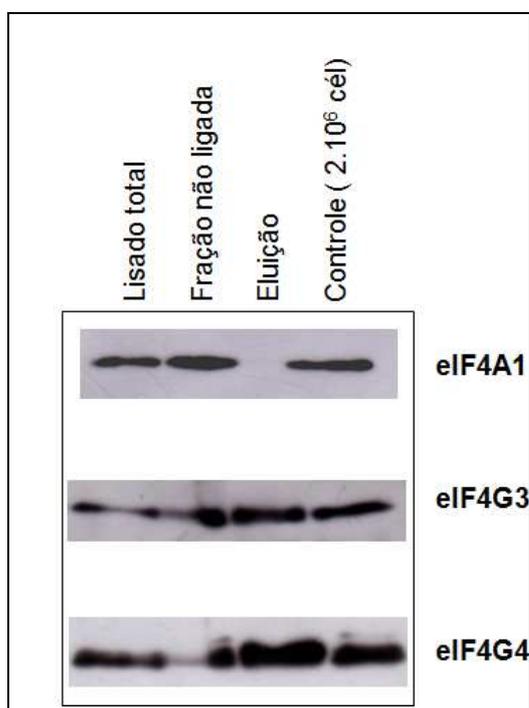


Figura 29. Purificação de fosfoproteínas e análise da fosforilação ocorrida nos homólogos eIF4G3 e eIF4G4 de *L. amazonensis*. (A) Representação esquemática da purificação e frações de proteínas obtidas mediante uso de Kit comercial. (B) Análise da fosforilação dos fatores EIF4G3 e EIF4G4. EIF4A1 é utilizado como controle negativo por ser sabidamente uma proteína não fosforilada. O controle da reação é o extrato de 2×10^6 células do parasita não submetido ao protocolo de lise e purificação.

6. DISCUSSÃO

Os fatores de iniciação da tradução dos tripanossomatídeos, em especial o complexo eIF4F, vêm sendo estudados como possíveis alvos no desenvolvimento de fármacos, já que a regulação da expressão gênica nos tripanossomatídeos ocorre de forma pós-transcricional e a iniciação da tradução é um dos principais pontos dessa regulação. Adicionalmente, as diferenças moleculares entre esses fatores e os de mamíferos constituem um atrativo a mais para o desenvolvimento de drogas mais eficazes e menos tóxicas. Como fruto desse estudo diferentes trabalhos foram e estão sendo desenvolvidos objetivando a caracterização desses fatores e as interações moleculares entre eles (DACOSTALIMA *et al.*, 2010; DHALIA *et al.*, 2006, 2005; FREIRE *et al.*, 2011). Com a continuidade destes estudos, tornou-se necessário estudar a amplitude de ocorrência dos diversos homólogos dos fatores de iniciação da tradução dos tripanossomatídeos focando na possível regulação dos mesmos de acordo com a fase do ciclo de vida do parasita. Portanto, nesse contexto se enquadra o objetivo desse trabalho, que foi a análise da ocorrência e perfil de expressão dos homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G durante o ciclo de vida de *Leishmania* spp., tendo como modelo experimental *L. amazonensis*, cujo ciclo de vida heteroxênico pode ser mimetizado *in vitro*.

Mediante a realização das curvas de crescimento, tanto de promastigotas quanto de amastigotas, foi possível realizar uma aproximação *in vitro* do ocorrido naturalmente *in vivo* durante o ciclo celular do parasita. As culturas de crescimento de formas promastigotas e diferenciação em amastigotas de *L. amazonensis* já haviam sido estabelecidas em trabalho prévio realizado pelo grupo (CAMPOS *et al.*, 2008) e o presente trabalho obteve êxito ao realizar a técnica de cultivo anteriormente estabelecida, confirmando a eficiência e reprodutibilidade do sistema de crescimento e diferenciação de *L. amazonensis in vitro*.

A análise da expressão dos homólogos eIF4G de *L. amazonensis* revelou que apesar desses homólogos terem sido preditos utilizando-se de seqüências do genoma já publicado de *L. major*, todos os fatores estão presentes no organismo modelo empregado e a expressão de todos os fatores analisados ocorre simultaneamente e com os padrões de expressão diferenciados entre si, podendo sugerir que cada fator desempenhe uma função única na célula, contudo estudos posteriores são necessários para confirmar essa

hipótese. A partir da comparação da expressão proteica durante o ciclo de vida do parasita, foi possível observar que a mesma ocorre independente da forma celular no qual *L. amazonensis* se encontra. Deste modo a expressão dos homólogos de eIF4G em *L. amazonensis* pode ser dita como constitutiva, já que todos os cinco homólogos foram expressos tanto na curva de crescimento de promastigota quanto na de diferenciação de amastigotas-axênicas. Esses dados vão de encontro ao trabalho anteriormente publicado que afirma que ocorre a diminuição da expressão dos fatores de iniciação da tradução em geral durante a diferenciação em amastigotas-axênicas de *L. donovani* (ROSENZWEIG *et al.*, 2008). Mais especificamente Zinoviev e colaboradores (2011) afirmam que em *L. amazonensis* ocorre a diminuição da expressão do homólogo EIF4G3 e de seu parceiro funcional EIF4E4 durante diferenciação, oposto ao observado nesse trabalho e em estudo prévio dos homólogos de eIF4E em *L. amazonensis* (PEREIRA, 2008).

Embora a expressão dos homólogos de eIF4G ocorra durante todo o ciclo de vida do parasita é importante salientar que foi observado diferenças no perfil protéico dos homólogos EIF4G1, EIF4G4 e EIF4G5, pois nesses fatores além da expressão da proteína no tamanho desejado, os anticorpos específicos reconheceram mais de uma banda no ensaio, demonstrando a expressão de isoformas diferenciadas. A expressão dessas isoformas diferenciadas de eIF4G aponta para a existência de possíveis mecanismos de modificações pós-traducionais ocorrendo nesses fatores proteicos. Em eucariotos superiores são descritos mecanismos moleculares de regulação da expressão gênica por modificações pós-traducionais nos fatores de iniciação da tradução, principalmente por fosforilação em resíduos específicos (DENNIS *et al.*, 2009). Detalhando as observações, podemos associar a ocorrência das modificações pós-traducionais do EIF4G1 com estágios de crescimento onde há menor atividade de proliferação celular, ou seja, onde há menor requerimento da maquinaria de tradução ativa. Já para o EIF4G4, pode-se especular que a utilização prioritária desse homólogo do fator de iniciação da tradução ocorre na forma promastigota, devido ao aumento de sua expressão, principalmente durante o crescimento exponencial dessas formas, ao passo que ocorre a diminuição deste requerimento quando a cultura é diferenciada em amastigotas. Observando o EIF4G5, a modificação ocorrida nesse fator é presente durante todo o ciclo de vida, todavia a isoforma modificada é predominantemente expressa durante a fase amastigota de cultivo, sendo clara a inversão do padrão da modificação já nos pontos iniciais de cultivo com temperatura e pH alterados. Essas

diferentes isoformas sugestivas de modificações protéicas não foram observadas para EIFG2 e EIFG3, apesar da expressão de isoformas modificadas pós-traducionalmente já ser descrita para o EIFG3 e para o seu parceiro EIF4E4 (ZINOVIEV *et al.*, 2011). No EIF4E4 por sua vez a modificação pós-traducional por fosforilação foi confirmada e ocorre predominantemente na fase exponencial de crescimento estando, portanto associada ao ciclo celular (PEREIRA, 2008).

Outros resultados que puderam auxiliar na caracterização dos homólogos de eIF4G foram as análises do comportamento dos homólogos EIF4G3 e EIF4G4 frente ao uso de inibidores de processos biológicos diferentes. Os inibidores da transcrição, processamento de mRNAs e tradução impedem que novos polipeptídeos sejam sintetizados, por diminuição/ausência de transcritos ou por bloqueio da tradução dos transcritos maduros. Conseqüentemente as proteínas encontradas nos parasitas são exclusivamente provenientes de mRNAs traduzidos previamente ao emprego da droga em questão. Como os homólogos em questão puderam ser detectados durante todo o processo inibitório até o momento de morte celular (24h), pode-se afirmar que essas proteínas são estáveis e possuem tempos de meia-vida prolongados. Nesse caso, a regulação de sua meia-vida, está possivelmente sendo uma das formas de regulação pós-traducional da expressão gênica (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007). Foram utilizados ainda a Lactacistina e o Ácido Okadaico. A Lactacistina é um inibidor específico do proteossomo 26S importante no mecanismo de regulação do ciclo celular, diferenciação e transcrição gênica em eucariotos superiores. E o Ácido Okadaico é um potente inibidor não-seletivo de serina e treonina fosfatase (YI *et al.*, 2009) e inibe a atividade da fosfatase 2A que regula negativamente a atividade do eIF4E humano ao desforilá-lo, “desligando” sua atividade (LI, *et al.*, 2010). Contudo em *L. amazonensis* não foi possível associar a regulação da expressão de EIF4G3 e EIF4G4 com a utilização desses inibidores, podendo-se afirmar que não há relação direta entre a regulação desses fatores com as atividades do proteossomo 26S e da fosfatase 2A.

Notado os resultados de análise da expressão dos homólogos eIF4G e adicionalmente os resultados da expressão de eIF4G3 e eIF4G4 em condições diferenciais de cultivo, é inevitável levantar a hipótese de que possíveis modificações pós-traducionais estejam relacionadas a mecanismos de fosforilação. Já que em mamíferos o eIF4G pode ter sua função modulada por modificações pós-traducionais do tipo fosforilação (DOBRIKOV *et al.*, 2011; RAUGHT *et al.*, 2000) efetuadas por MAP quinases

específicas responsivas a estímulos celulares, de crescimento e diferenciação, a fim de coordenar a funcionalidade dos eIFs culminando na regulação global da tradução (JACKSON *et al.*, 2010). Sabe-se que as MAP quinases efetuam a fosforilação em sítios específicos constituídos de uma serina ou treonina seguida a uma prolina na posição +1 (CHEN, Z. *et al.*, 2001), Corroborando com essa hipótese estudos mutacionais em *L. infantum* comprovam a existência de sítios de fosforilação por MAP quinases ocorrendo em PABP1 e EIF4E4, ambas proteínas parceiras de eIF4G na formação do complexo de iniciação da tradução (DE MELO NETO, dados não publicados). Nesse intuito os sítios S/P ou T/P conservados entre os homólogos de eIF4G foram rastreados entre as seqüências de *Leishmania* spp. disponíveis, sendo possível notar que para EIF4G1 os 14 prováveis sítios de fosforilação por MAP quinases condizem com o padrão de múltiplas isoformas vistas por *Western-Blot*. Além deste, outros fatores que se mostraram modificados no *Western-Blot* e que apresentam vários sítios de fosforilação são o EIF4G4 e o EIF4G5, que apresentam quatro e três prováveis sítios de fosforilação respectivamente. Interessantemente o homólogo EIF4G2 apresenta resultado contrastante, pois o mapeamento demonstra a existência de dez possíveis sítios de fosforilação por MAP quinases, entretanto nenhum mecanismo de modificação da proteína foi visualizado, esse resultado precisa ser melhor estudado porém já adianta a hipótese de que os sítios de fosforilação para EIF4G2 podem não ser verdadeiros e tal regulação seja inexistente. Finalmente para o homólogo eIF4G3, onde não foram identificadas isoformas modificadas, existem dois prováveis sítios de fosforilação conservados na análise *in silico* da seqüência proteica. Como um resíduo de fosforilação adiciona a proteína aproximadamente 0,94 KDa a adição de somente dois resíduos fosfato pode não ser facilmente distinguível em eletroforese unidimensional, porém como essa modificação confere um diferente ponto isoelétrico a proteína, consegue-se distinguir as formas fosforiladas da não-fosforilada através de tratamento com fosfatases e separação em gel bi-dimensional (YAMAGATA *et al.*, 2002). Metodologia semelhante já foi empregada para outros fatores de iniciação da tradução em tripanossomatídeos como EIF4E3, EIF4E4 e PABP-1 confirmando a presença de diferentes isoformas fosforiladas para esses fatores (DACOSTALIMA, dados não publicados; MALVEZZI, 2010; PEREIRA, 2009), e também poderá ser empregada para a compreensão da expressão de EIFG3.

Após a realização da análise *in silico* dos possíveis sítios de fosforilação por MAP Quinases, nos dirigimos para a comprovação experimental da ocorrência de modificações

desse tipo nos homólogos de eIF4G de *L. amazonensis*, focando os esforços nos homólogos participantes na formação de complexos eIF4F durante a tradução, EIF4G3 e EIF4G4 (FREIRE *et al.*, 2011). Através da purificação de fosfoproteínas pudemos confirmar que esses fatores são modificados pós-traducionalmente por mecanismo de fosforilação. Curiosamente o EIF4G3, que não apresentou isoformas diferenciadas no *Western-Blot*, mas possui possíveis sítios de modificação por MAP quinases, é fosforilado. Este resultado indica que, embora não possamos diferenciar em eletroforese uni-dimensional a adição de um ou dois resíduos fosfato, essa modificação está ocorrendo nesse fator. Outra hipótese é que essa proteína pode ser expressa constitutivamente de forma fosforilada. Quanto ao EIF4G4 podemos comprovar que até mesmo a isoforma de menor peso molecular, que teoricamente seria a proteína sem modificações, também é fosforilada, especulando-se que as isoformas maiores têm na realidade uma adição maior de resíduos fosfatos que as demais. A adição de múltiplos fosfatos é vista para o eIF4GI humano, onde existe fosforilação em diferentes resíduos relacionada à alterações conformacionais na proteína resultando em modificações nas interações moleculares entre os parceiros funcionais (DOBRIKOV *et al.*, 2011), e o mesmo pode certamente existir nos homólogos de tripanossomatídeos. Estudos que comprovem esse tipo de mecanismo devem ser desenvolvidos. Outros fatores de iniciação da tradução de tripanossomatídeos também apresentam a ocorrência de modificações pós-traducionais durante o ciclo de vida e foram semelhantemente confirmados como fosforilados, como é o caso do EIF4E3 e EIF4E4 de *T. brucei* e *L. amazonensis* (PEREIRA, 2008; MALVEZZI, 2010) que são parceiros funcionais de EIF4G4 e EIF4G3, respectivamente. Esse conjunto de resultados indica, de forma inédita, a existência de possíveis mecanismos de regulação global da tradução através de modificações pós-traducionais por fosforilação dos homólogos de eIF4G de *Leishmania* spp., assim como vem sendo estudado e descrito para eucariotos superiores (JACKSON *et al.*, 2010; SONENBERG, NAHUM; HINNEBUSCH, 2009).

Os resultados desse trabalho forneceram informações até então desconhecidas sobre a expressão dos homólogos de eIF4G ao longo do ciclo de vida de *L. amazonensis* onde foi evidenciada a expressão diferencial de vários desses homólogos possivelmente regulada por mecanismos de fosforilação em resíduos específicos via MAP quinases. Dessa forma, colabora com a elucidação da regulação global da tradução, mecanismo esse crucial para a regulação da expressão gênica pós-transcricional característica

desses organismos. Futuros estudos baseados nessas informações poderão ser desenvolvidos para a confirmação dos sítios de fosforilação, análise do impacto dessas fosforilações na funcionalidade dos homólogos de eIF4G e na regulação global da tradução nos tripanossomatídeos.

7. CONCLUSÕES

- Todos os homólogos de eIF4G estão presentes durante o crescimento e diferenciação de *L. amazonensis* e cada homólogo possui um padrão de expressão distinto dos demais, indicando que podem estar atuando de maneira diferenciada na célula.
- Os homólogos EIF4G1, EIF4G4 e EIF4G5 de *L. amazonensis* apresentam mais de uma isoforma protéica durante o desenvolvimento do parasita, associado a possíveis modificações pós-traducionais nesses fatores.
- Os homólogos de eIF4G apresentam *in silico* múltiplos sítios de fosforilação por MAP quinases compatíveis com as análises de *Western-Blots*, exceto para EIFG2 onde o padrão de expressão proteica não possui relação direta com a predição *in silico*.
- O EIF4G3 e EIF4G4 de *L. amazonensis*, participantes na formação de complexos eIF4F em tripanossomatídeos, são modificados pós-traducionalmente por adição de resíduos de fosforilação.
- A inibição da transcrição de mRNAs e biossíntese proteica demonstram o controle da estabilidade dos fatores EIF4G3 e EIF4G4, que possuem tempo de meia-vida prolongados.

8. REFERÊNCIAS

ACKER, M. G.; LORSCH, J. R. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. **Biochemical Society transactions**, v. 36, p. 653-657, mar 2008.

ANDERSEN, C. B.; BALLUT, L.; JOHANSEN, J. S. *et al.* Structure of the exon junction core complex with a trapped DEAD-box ATPase bound to RNA. **Science**, v. 313, p. 1968-1972, set 2006.

AVEROUS, J.; PROUD, C. G. When translation meets transformation: the mTOR story. **Oncogene**, v. 25, n. 48, p. 6423-35, out 2006.

BALAGOPAL, V.; PARKER, R. Polysomes, P bodies and Stress granules: States and Fates of Eukaryotic mRNAs. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 3, p. 403-408, jun 2009.

BARHOUMI, M.; TANNER, N. K.; BANROQUES, J.; LINDER, P.; GUIZANI, I. Leishmania infantum LelF protein is an ATP-dependent RNA helicase and an eIF4A-like factor that inhibits translation in yeast. **The FEBS journal**, v. 273, n. 22, p. 5086-100, nov 2006.

BATES, E. J.; KNUEPFER, E.; SMITH, D. F. Poly(A)-binding protein I of Leishmania: functional analysis and localisation in trypanosomatid parasites. **Nucleic acids research**, v. 28, n. 5, p. 1211-20, mar 2000.

BATES, P. A. Transmission of Leishmania metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097-106, ago 2007.

BELLSOLELL, L.; CHO-PARK, P. F.; POULIN, F.; SONENBERG, NAHUM; BURLEY, STEPHEN K. Two structurally atypical HEAT domains in the C-terminal portion of human eIF4G support binding to eIF4A and Mnk1. **Structure**, v. 14, n. 5, p. 913-23, maio 2006.

BENZ, C.; NILSSON, D.; ANDERSSON, B.; CLAYTON, C.; GUILBRIDE, D. L. Messenger RNA processing sites in Trypanosoma brucei. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 143, n. 2, p. 125-34, out 2005.

BERRIMAN, M.; GHEDIN, E.; HERTZ-FOWLER, C. *et al.* The genome of the African trypanosome Trypanosoma brucei. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-22, jul 2005.

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A. M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1063-75, ago 2007.

BOUCHER, N.; WU, Y.; DUMAS, C. *et al.* A Common Mechanism of Stage-regulated Gene Expression in *Leishmania* Mediated by a Conserved 3' -Untranslated Region Element. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 22, p. 19511-19520, maio 2002.

BRENCHLEY, R.; TARIQ, H.; MCELHINNEY, H. *et al.* The TriTryp phosphatome: analysis of the protein phosphatase catalytic domains. **BMC genomics**, v. 8, p. 434, jan 2007.

BRINGAUD, FRÉDÉRIC; MÜLLER, M.; CERQUEIRA, GUSTAVO COUTINHO; *et al.* Members of a large retroposon family are determinants of post-transcriptional gene expression in *Leishmania*. **PLoS pathogens**, v. 3, n. 9, p. 1291-307, set 2007.

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

CAMPOS, R. M.; NASCIMENTO, M.; FERRAZ, J. C. *et al.* Distinct mitochondrial HSP70 homologues conserved in various *Leishmania* species suggest novel biological functions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 160, n. 2, p. 157-62, ago 2008.

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

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature reviews. Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873-82, nov 2007.

CHEN, Z.; GIBSON, T. B.; ROBINSON, F. *et al.* MAP Kinases. **Chemical Reviews**, v. 101, n. 8, p. 2449-2476, jul 2001.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO journal**, v. 21, n. 8, p. 1881-1888, 2002.

CLAYTON, C.; SHAPIRA, MICHAL. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 156, n. 2, p. 93-101, dez 2007.

COHEN-FREUE, G.; HOLZER, T. R.; FORNEY, J. D.; MCMASTER, W. R. Global gene expression in Leishmania. **International journal for parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1077-86, ago 2007.

DACOSTALIMA, T. D. C.; MOURA, D. M. N.; REIS, C. R. S. *et al.* Functional characterization of three leishmania poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 10, p. 1484-94, out 2010.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of Leishmania parasites, with emphasis on Leishmania (Leishmania) infantum and Leishmania (Viannia) braziliensis. **Veterinary parasitology**, v. 149, n. 3-4, p. 139-46, nov 2007.

DENNIS, M. D.; PERSON, M. D.; BROWNING, K. S. Phosphorylation of Plant Translation Initiation Factors by CK2 Enhances the in Vitro Interaction of Multifactor Complex Components. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 20615–20628, jul 2009.

DHALIA, R.; MARINSEK, N.; REIS, C. R. S. *et al.* The two eIF4A helicases in Trypanosoma brucei are functionally distinct. **Nucleic acids research**, v. 34, n. 9, p. 2495-2507, abr 2006.

DHALIA, R.; REIS, C. R. S.; FREIRE, E. R. *et al.* Translation initiation in Leishmania major: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 140, p. 23-41, dez 2005.

DOBRIKOV, M.; DOBRIKOVA, E.; SHVEYGERT, M.; GROMEIER, M. Phosphorylation of eukaryotic translation initiation factor 4G1 (eIF4G1) by protein kinase C α regulates eIF4G1 binding to Mnk1. **Molecular and cellular biology**, v. 31, n. 14, p. 2947-2959, jul 2011.

DUJARDIN, J.-C.; CAMPINO, L.; CAÑAVATE, C. *et al.* Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, n. 7, p. 1013-1018, jul 2008.

D'ORSO, I.; GAUDENZI, J. G. DE; FRASCH, A. C. C. RNA-binding proteins and mRNA turnover in trypanosomes. **Trends in parasitology**, v. 19, n. 4, p. 151-155, abr 2003.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* The genome sequence of Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-15, jul 2005.

EL-SAYED, N. M.; MYLER, P. J.; BLANDIN, G. *et al.* Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-9, jul 2005.

FREIRE, E. R.; DHALIA, R.; MOURA, D. M. N. *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, mar 2011.

FUKUNAGA, RIKIRO; HUNTER, TONY. MNK1, a new MAP kinase-activated protein kinase, isolated by a novel expression screening method for identifying protein kinase substrates. **The EMBO journal**, v. 16, n. 8, p. 1921-33, abr 1997.

FURIC, L.; RONG, L.; LARSSON, O. *et al.* eIF4E phosphorylation promotes tumorigenesis and is associated with prostate cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, p. 14134–14139, 2010.

GANGULY, S.; DAS, N. K.; BARBHUIYA, J. N.; CHATTERJEE, M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis – an overview. **International Journal of Dermatology**, v. 49, p. 921-931, 2010.

GEBAUER, F.; HENTZE, M. W. Molecular mechanisms of translational control. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 5, n. 10, p. 827-35, out 2004.

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

GROFT, C. M.; BURLEY, STEPHEN K. Recognition of eIF4G by rotavirus NSP3 reveals a basis for mRNA circularization. **Molecular cell**, v. 9, n. 6, p. 1273-83, jun 2002.

GROSS, J. D.; MOERKE, N. J.; HAAR, T. V. D. *et al.* Ribosome Loading onto the mRNA Cap Is Driven by Conformational Coupling between eIF4G and eIF4E. **cell**, v. 115, p. 739-750, 2003.

GUNZL, A. The Pre-mRNA Splicing Machinery of Trypanosomes: Complex or Simplified? **Eukaryotic cell**, v. 9, n. 8, p. 1159-1170, ago 2010.

HAILE, S.; DUPÉ, A.; PAPADOPOULOU, B. Deadenylation-independent stage-specific mRNA degradation in Leishmania. **Nucleic acids research**, v. 36, n. 5, p. 1634-44, mar 2008.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current opinion in microbiology**, v. 10, n. 6, p. 569-77, dez 2007.

HARRIS, T. E.; CHI, A.; SHABANOWITZ, J. *et al.* mTOR-dependent stimulation of the association of eIF4G and eIF3 by insulin. **The EMBO journal**, v. 25, n. 8, p. 1659-68, 19 abr 2006.

HE, H.; HAAR, T. V. D.; SINGH, C. R. *et al.* The Yeast Eukaryotic Initiation Factor 4G (eIF4G) HEAT Domain Interacts with eIF1 and eIF5 and Is Involved in Stringent AUG Selection. **Molecular and cellular biology**, v. 23, n. 15, p. 5431-5445, ago 2003.

HEM, S.; GHERARDINI, P. F.; OSORIO Y FORTÉA, J. *et al.* Identification of Leishmania-specific protein phosphorylation sites by LC-ESI-MS/MS and comparative genomics analyses. **Proteomics**, v. 10, n. 21, p. 3868-83, nov 2010.

HERNÁNDEZ, G.; VAZQUEZ-PIANZOLA, P. Functional diversity of the eukaryotic translation initiation factors belonging to eIF4 families. **Mechanisms of development**, v. 122, n. 7-8, p. 865-76, jul 2005.

HOLCIK, M.; SONENBERG, NAHUM. Translational control in stress and apoptosis. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 6, n. 4, p. 318-27, abr 2005.

HOLETZ, F. B.; CORREA, A.; AVILA, A. R. *et al.* Evidence of P-body-like structures in Trypanosoma cruzi. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 356, n. 4, p. 1062-7, maio 2007.

HOLZ, M. K.; BALLIF, B. A.; GYGI, S. P.; BLENIS, J. mTOR and S6K1 mediate assembly of the translation preinitiation complex through dynamic protein interchange and ordered phosphorylation events. **Cell**, v. 123, n. 4, p. 569-80, nov 2005.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A. *et al.* The Genome of the Kinetoplastid Parasite, Leishmania major. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436-442, jul 2005.

JACKSON, R. J.; HELLEN, CHRISTOPHER U T; PESTOVA, TATYANA V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature reviews. Molecular cell biology**, v. 11, n. 2, p. 113-27, fev 2010.

JACKSON, R. J.; STANDART, N. How do microRNAs regulate gene expression? **Science's signal transduction knowledge environment**, v. 367, p. 1-13, jan 2007.

JOSHI, B.; CAI, A.; KEIPER, B. *et al.* Phosphorylation of Eukaryotic Protein Synthesis Initiation Factor 4E at Ser-209. **The journal of biological chemistry**, v. 270, n. 24, p. 14597-14603, jun 1995.

JOSHI, B.; CAMERON, A.; JAGUS, R. Characterization of mammalian eIF4E-family members. **European journal of biochemistry**, v. 271, n. 11, p. 2189-203, jun 2004.

KAHVEJIAN, A.; SVITKIN, YURI V; SUKARIEH, R.; BOUTCHOU, M.-NOËL M.; SONENBERG, NAHUM. Mammalian poly (A) -binding protein is a eukaryotic translation initiation factor , which acts via multiple mechanisms. **Genes & Development**, v. 19, p. 104-113, nov 2005.

KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nature reviews. Genetics**, v. 8, n. 7, p. 533-43, jul 2007.

KENNEDY, P. G. E. The continuing problem of human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Annals of neurology**, v. 64, n. 2, p. 116-26, ago 2008.

KISSINGER, J. C. A tale of three genomes: the kinetoplastids have arrived. **Trends in parasitology**, v. 22, n. 6, p. 240-3, jun 2006.

KORNEEVA, N. L.; LAMPHEAR, B. J.; HENNIGAN, F. L.; RHOADS, R E. Mutually cooperative binding of eukaryotic translation initiation factor (eIF) 3 and eIF4A to human eIF4G-1. **The Journal of biological chemistry**, v. 275, n. 52, p. 41369-76, dez 2000.

LEHIR, H.; MOORE, M. J.; MAQUAT, L. E. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. **Genes & development**, v. 14, n. 9, p. 1098-108, maio 2000.

LEIFSO, K.; COHEN-FREUE, G.; DOGRA, N.; MURRAY, A.; MCMASTER, W. R. Genomic and proteomic expression analysis of Leishmania promastigote and amastigote life stages: the Leishmania genome is constitutively expressed. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 152, n. 1, p. 35-46, mar 2007.

LESCURE, F.-X.; LOUP, G. LE; FREILIJ, H. *et al.* Chagas disease: changes in knowledge and management. **The Lancet infectious diseases**, v. 10, n. 8, p. 556-70, ago 2010.

LI, H.; TSCHUDI, C. Novel and Essential Subunits in the 300-Kilodalton Nuclear Cap Binding Complex of Trypanosoma brucei. **Molecular and cellular biology**, v. 25, n. 6, p. 2216-2226, mar 2005.

LI, Q.; IMATAKA, HIROAKI; MORINO, SHIGENOBU; *et al.* Eukaryotic Translation Initiation Factor 4AIII (eIF4AIII) Is Functionally Distinct from eIF4AI and eIF4AII Eukaryotic Translation Initiation Factor 4AIII (eIF4AIII) Is Functionally Distinct from eIF4AI and eIF4AII. **Molecular and cellular biology**, v. 19, n. 11, p. 7336-7346, nov 1999.

LI, Y.; YUE, P.; DENG, X. *et al.* Protein Phosphatase 2A Negatively Regulates Eukaryotic Initiation Factor 4E Phosphorylation and eIF4F Assembly through Direct Dephosphorylation. **Neoplasia**, v. 12, n. 10, p. 848-855, out 2010.

LIANG, X.-HAI; HARITAN, A.; ULIEL, S. trans and cis Splicing in Trypanosomatids : Mechanism , Factors , and Regulation. **Eukaryotic cell**, v. 2, n. 5, p. 830-840, out 2003.

LIVINGSTONE, M.; ATAS, E.; MELLER, A.; SONENBERG, NAHUM. Mechanisms governing the control of mRNA translation. **Physical biology**, v. 7, n. 2, p. 021001, jan 2010.

LUSTIG, Y.; SHEINER, L.; VAGIMA, Y. *et al.* Spliced-leader RNA silencing: a novel stress-induced mechanism in Trypanosoma brucei. **EMBO reports**, v. 8, n. 4, p. 408-13, abr 2007.

MALVEZZI, A. M. **Identificação de modificações pós-traducionais em homólogos de fatores de iniciação da tradução em Trypanosoma brucei.** [S.l.]: Universidade Federal de Pernambuco, 2010.

MARCOTRIGIANO, J.; LOMAKIN, I. B.; SONENBERG, N; *et al.* A conserved HEAT domain within eIF4G directs assembly of the translation initiation machinery. **Molecular cell**, v. 7, n. 1, p. 193-203, jan 2001.

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

MARINTCHEV, A.; EDMONDS, K. A; MARINTCHEVA, B. *et al.* Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 447-60, fev 2009.

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

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; YAN, S.; NGUYEN, D. *et al.* Transcription of Leishmania major Friedlin chromosome 1 initiates in both directions within a single region. **Molecular cell**, v. 11, n. 5, p. 1291-9, maio 2003.

MATA, J.; MARGUERAT, S.; BÄHLER, J. Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. **Trends in biochemical sciences**, v. 30, n. 9, p. 506-514, set 2005.

MCCONVILLE, M. J.; SOUZA, D. DE; SAUNDERS, E.; LIKIC, V. A; NADERER, T. Living in a phagolysosome; metabolism of *Leishmania* amastigotes. **Trends in parasitology**, v. 23, n. 8, p. 368-75, ago 2007.

MCNICOLL, F.; MÜLLER, M.; CLOUTIER, S. *et al.* Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. **The Journal of biological chemistry**, v. 280, n. 42, p. 35238-46, out 2005.

MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel medicine and infectious disease**, v. 5, n. 3, p. 150-8, maio 2007.

MOERKE, N. J.; AKTAS, H.; CHEN, H. *et al.* Small-molecule inhibition of the interaction between the translation initiation factors eIF4E and eIF4G. **Cell**, v. 128, n. 2, p. 257-67, jan 2007.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl , n. May, p. 17-30, jul 2009.

MORINO, S; IMATAKA, H; SVITKIN, Y V; PESTOVA, T V; SONENBERG, N. Eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E) binding site and the middle one-third of eIF4GI constitute the core domain for cap-dependent translation, and the C-terminal one-third functions as a modulatory region. **Molecular and cellular biology**, v. 20, n. 2, p. 468-477, jan 2000.

MURRAY, A.; FU, C.; HABIBI, G.; MCMASTER, W. R. Regions in the 3' untranslated region confer stage-specific expression to the *Leishmania mexicana* a600-4 gene. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 153, n. 2, p. 125-32, jun 2007.

NAKAYASU, E. S.; GAYNOR, M. R.; SOBREIRA, T. J. P.; ROSS, J. A; ALMEIDA, I. C. Phosphoproteomic analysis of the human pathogen *Trypanosoma cruzi* at the epimastigote stage. **Proteomics**, v. 9, n. 13, p. 3489-506, jul 2009.

NETT, I. R. E.; MARTIN, D. M. A.; MIRANDA-SAAVEDRA, D. *et al.* The Phosphoproteome of Bloodstream Form *Trypanosoma brucei* , Causative Agent of African Sleeping Sickness. **Molecular & Cellular Proteomics**, p. 1527-1538, abr 2009.

PAUSE, A.; BELSHAM, G. J.; GINGRAS, ANNE-CLAUDE DONZÉ, O. *et al.* Insulin-dependent stimulation of protein synthesis by phosphorylation of a regulator of 5'-cap function. **Nature**, v. 371, p. 762-767, out 1994.

PEREIRA, MARIANA MARQUES COUTELO. Análise da expressão e investigação de mecanismos envolvidos com o controle da atividade de homólogos do fator de

iniciação da tradução eIF4E ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*. **Dissertação de Mestrado, Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco**, p. 1-119, 2008.

PESTOVA, T V; HELLEN, C U T. Translation, interrupted. **Nature structural & molecular biology**, v. 13, n. 2, p. 98-9, fev 2006.

PREVOT, D.; DARLIX, J.-L.; OHLMANN, T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. **Biology of the Cell**, v. 95, n. 3-4, p. 141-156, maio 2003.

PYRONNET, STÉPHANE. Phosphorylation of the Cap-Binding Protein eIF4E by the MAPK-activated protein kinase Mnk1. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, p. 1237-1243, jun 2000.

PYRONNET, S; IMATAKA, H; GINGRAS, A C. *et al.* Human eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) recruits mnk1 to phosphorylate eIF4E. **The EMBO journal**, v. 18, n. 1, p. 270-9, jan 1999.

PYRONNET, STÉPHANE; SONENBERG, NAHUM. Cell-cycle-dependent translational control. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 11, p. 13-18, jan 2001.

QIN, H.; RAUGHT, B.; SONENBERG, NAHUM; GOLDSTEIN, E. G.; EDELMAN, A. M. Phosphorylation screening identifies translational initiation factor 4GII as an intracellular target of Ca(2+)/calmodulin-dependent protein kinase I. **The Journal of biological chemistry**, v. 278, n. 49, p. 48570-9, dez 2003.

QUIAGEN, S. AND A. T. Phosphoprotein Purification Kit. **Phosphoprotein Handbook**, v. 2, n. July, p. 1-24, 2011.

RAUGHT, B.; GINGRAS, A.-CLAUDE; GYGI, S. P. *et al.* Serum-stimulated, rapamycin-sensitive phosphorylation sites in the eukaryotic translation initiation factor 4GI. **The EMBO journal**, v. 19, n. 3, p. 434-444, fev 2000.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, p. 581-596, set 2007.

REQUENA, J. M. Lights and shadows on gene organization and regulation of gene expression in *Leishmania*. **Frontiers in Bioscience**, v. 16, n. 2, p. 2069-2085, jun 2011.

RHOADS, R E. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 25, p. 16711-5, jun 2009.

ROSENZWEIG, D.; SMITH, D.; OPPERDOES, F. *et al.* Retooling Leishmania metabolism: from sand fly gut to human macrophage. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 22, p. 590-602, fev 2008.

SATHEESHA, S.; COOKSON, V. J.; COLEMAN, L. J. *et al.* Response to mTOR inhibition: activity of eIF4E predicts sensitivity in cell lines and acquired changes in eIF4E regulation in breast cancer. **Molecular cancer**, v. 10, n. 1, p. 19, jan 2011.

SHVEYGERT, M.; KAISER, C.; BRADRICK, S. S.; GROMEIER, M. Regulation of eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) phosphorylation by mitogen-activated protein kinase occurs through modulation of Mnk1-eIF4G interaction. **Molecular and cellular biology**, v. 30, n. 21, p. 5160-7, nov 2010.

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

SONENBERG, NAHUM; DEVER, T. T. E. Eukaryotic translation initiation factors and regulators. **Current opinion in structural biology**, v. 13, n. 1, p. 56-63, fev 2003.

SONENBERG, NAHUM; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes: mechanisms and biological targets. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 731-45, fev 2009.

STUART, KEN; BRUN, R.; CROFT, S. *et al.* Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **the journal of clinical investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301-1310, abr 2008.

UEDA, T.; WATANABE-FUKUNAGA, R.; FUKUYAMA, H.; NAGATA, S.; FUKUNAGA, RIKIRO. Mnk2 and Mnk1 Are Essential for Constitutive and Inducible Phosphorylation of Eukaryotic Initiation Factor 4E but Not for Cell Growth or Development. **Molecular and cellular biology**, v. 24, n. 15, p. 6539-6549, ago 2004.

WASKIEWICZ, A J.; FLYNN, A.; PROUD, C. G.; COOPER, J. A. Mitogen-activated protein kinases activate the serine/threonine kinases Mnk1 and Mnk2. **The EMBO journal**, v. 16, n. 8, p. 1909-20, abr 1997.

WHO, E. C. F. T. C. O. L. Control of the leishmaniases. **World Health Organization technical report series**, v. 949, p. 1-186, jan 2010.

WU, Y.; FAKHRY, Y. E.; SERENO, D.; TAMAR, S.; PAPADOPOULOU, B. A new developmentally regulated gene family in Leishmania amastigotes encoding a homolog of amastin surface proteins. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 110, p. 345-357, out 2000.

YAMAGATA, A.; KRISTENSEN, D. B.; TAKEDA, Y. *et al.* Mapping of phosphorylated proteins on two-dimensional polyacrylamide gels using protein phosphatase. **Proteomics**, v. 2, n. 9, p. 1267-76, set 2002.

YANG, X.-J. Multisite protein modification and intramolecular signaling. **Oncogene**, v. 24, n. 10, p. 1653-62, mar 2005.

YI, K. D.; COVEY, D. F.; SIMPKINS, J. W. Mechanism of Okadaic Acid Induced Neuronal Death and the Effect of Estrogens. **Journal of Neurochemistry**, v. 108, n. 3, p. 732-740, fev 2009.

YOFFE, Y.; ZUBEREK, J.; LERER, A. *et al.* Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in Leishmania. **Eukaryotic cell**, v. 5, n. 12, p. 1969-79, dez 2006.

YOFFE, Y.; ZUBEREK, J.; LEWDOROWICZ, M. *et al.* Cap-binding activity of an eIF4E homolog from Leishmania. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 10, n. 11, p. 1764-75, dez 2004.

ZILKA, A.; GARLAPATI, S.; DAHAN, E.; YAOLSKY, V.; SHAPIRA, M. Developmental regulation of heat shock protein 83 in Leishmania. 3' processing and mRNA stability control transcript abundance, and translation is directed by a determinant in the 3'-untranslated region. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 51, p. 47922-9, dez 2001.

ZINOVIEV, A.; LÉGER, M.; WAGNER, G.; SHAPIRA, MICHAL. A novel 4E-interacting protein in Leishmania is involved in stage-specific translation pathways. **Nucleic acids research**, v. 39, n. 19, p. 8404-15, out 2011.

9. MEMORIAL

Nascida em Recife, Pernambuco em 1987, é Biomédica formada na Universidade Federal de Pernambuco em 2009. Atualmente, é mestranda em Genética pela Pós-Graduação em Genética e Biologia molecular da mesma instituição. Desenvolve a dissertação de mestrado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ sob orientação de Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, essa intitulada "Análise comparativa da expressão de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4G ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*" projeto focado na análise da expressão e das possíveis modificações pós-traducionais por fosforilação de homólogos de fatores de iniciação de tradução de eucariotos.