

**Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Genética**

GUSTAVO BARBOSA DE LIMA

**Avaliação da importância para a viabilidade celular de três
homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E de
*Leishmania sp.***

Recife

2016

GUSTAVO BARBOSA DE LIMA

**Avaliação da importância para a viabilidade celular de
três homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E
de *Leishmania sp.***

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

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Recife

2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Lima, Gustavo Barbosa de

Avaliação da importância para a viabilidade celular de três homólogos do fator de iniciação da tradução EIF4E de *Leishmania sp.* / Gustavo Barbosa de Lima – Recife: O Autor, 2016.

82 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Genética, 2016.

Inclui referências

1. Tradução genética 2. Regulação de expressão gênica 3. *Leishmania* 4. Genética microbiana I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de (orientador) II. Título

572.645

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-288

GUSTAVO BARBOSA DE LIMA

**Avaliação da importância para a viabilidade celular de três
homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E de
Leishmania sp.**

Aprovado em 09 / 03 / 2016

Banca Examinadora:

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Tercílio Calsa Junior
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr. Luydson Richardson Silva Vasconcelos
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Dr. Eden Ribeiro Freire
Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães/FIOCRUZ

Recife
2016

Agradecimentos

Antes de tudo e todos agradecer a Deus por me fazer forte para nunca desistir dos meus sonhos.

Ao Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, que realmente me orientou e me dá a oportunidade de trabalhar ao seu lado, pela sua paciência e compreensão para me guiar nesta etapa da minha vida.

A Ms^a Larissa Melo, que me co-orientou, pelo cuidado que teve comigo e todos os ensinamentos que obtive com ela durante este trabalho, compartilhando seu conhecimento sempre.

A Adalúcia, minha amiga e companheira, parceira de bancada, que sempre esteve comigo durante este projeto me auxiliando e aprendendo junto comigo.

Agradeço a Christian, Danielle, Eden, Amaranta e Filipe, pela amizade e por tirar as minhas dúvidas e me ajudar sempre que possível, a todos os membros do grupo BioMolTryp por estarem sempre preocupados e atenciosos comigo e o meu trabalho.

Agradeço o apoio aos órgãos fomentadores de pesquisa CAPES, FACEPE e CNPq pelo financiamento e suporte na execução das pesquisas científicas, e ao Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães - CPqAM pela infraestrutura.

*“Elimine o impossível. O que sobrar,
não importa quão improvável seja,
deve ser a verdade.”*

Sir Arthur Conan Doyle

RESUMO

A família de protozoários tripanosomatídeos apresenta características moleculares diferenciadas dos demais eucariotos, onde a regulação da expressão gênica é feita principalmente em nível pós-transcricional. Como em outros eucariotos, acredita-se que a iniciação da tradução seja uma etapa crítica de controle pós-transcricional, onde atuam diferentes fatores de iniciação da tradução (eIFs). Nesta etapa os pontos centrais são o reconhecimento do mRNA maduro e o recrutamento do ribossomo para dar início ao processo, atividades realizadas pelo complexo eIF4F, formado por três subunidades: eIF4E, eIF4A e eIF4G. Nos tripanosomatídeos foram descritos seis homólogos de eIF4E, a proteína de ligação ao *cap*. Dois destes, EIF4E3 e EIF4E4, participam da formação de complexos envolvidos no processo de tradução e outros dois, EIF4E5 e EIF4E6, participam de novos complexos de função desconhecida. Destes quatro homólogos, o EIF4E4 já foi caracterizado, de forma que o presente trabalho visa contribuir para o entendimento da importância dos demais (EIF4E3, EIF4E5 e EIF4E6) na viabilidade e taxa de crescimento celular de *Leishmania sp.* Construções gênicas foram geradas de forma a permitir a deleção das duas cópias gênicas de cada proteína por meio da transfecção de *Leishmania* e seleção com antibióticos. As três proteínas, e mutantes do EIF4E3, foram ainda expressas em parasitas transgênicos para a realização de experimentos de complementação. Os resultados mostram que os baixos níveis de expressão de EIF4E5 e EIF4E6 indicam que as três proteínas parecem ser importantes para a viabilidade celular com funções não sobrepostas. Sítios específicos no EIF4E3 foram também identificados de forma isolada como essenciais para a função da proteína e críticos para a sobrevivência do organismo. Os resultados obtidos neste trabalho mostram a importância do estudo do papel destes homólogos de eIF4E na síntese protéica, assim com seu papel na biologia celular de tripanosomatídeos.

Palavras chaves: eIF4F, EIF4E, Expressão gênica, tripanosomatídeos.

ABSTRACT

The Trypanosomatid of protozoans display distinct molecular features not seen in other eukaryotes, where the regulation of gene expression is mainly performed at the post-transcriptional level. As in other eukaryotes, it is believed that the initiation of translation is a critical stage of post-transcriptional control, where different initiation factors (eIFs) are active. At this stage, critical steps are the recognition of the mature mRNA and the ribosome recruitment to start the process, activities of the eIF4F complex, consisting of three subunits: eIF4E, eIF4A and eIF4G. In trypanosomatids, six homologues of eIF4E, the *cap* binding protein, have been described. Two of these, EIF4E3 and EIF4E4, participate in the formation of complexes involved in the translation process and two others, EIF4E5 and EIF4E6, participate in new complexes of unknown function. Among these four homologues, EIF4E4 has been better characterized, so that the present work aims to contribute to the understanding of the remaining homologues (EIF4E3, EIF4E5 and EIF4E6) and study their importance for cell viability and growth rate of *Leishmania* species. Gene constructs were generated to allow deletion of the two gene copies of each protein by transfection of *Leishmania* cells and selection with antibiotics. The three proteins and EIF4E3 mutants were also expressed in transgenic parasites in order to carry out complementation experiments. The results show low levels of expression of EIF4E5 and EIF4E6 and indicate that the three proteins appear to be important for cell viability with non-overlapping functions. EIF4E3 specific residues were also identified which are essential for the protein to the function and critical for the survival of the organism. The results of this study highlight the importance of the study on the role of eIF4E homologues in protein synthesis, as well as their role for the trypanosomatids cell biology.

Keywords: eIF4F, Regulation of gene expression, Trypanosomatids

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura do kinetoplasto.....	16
Figura 2. Flebotomíneos transmissores da <i>Leishmania spp</i>	19
Figura 3. Ciclo de vida do <i>Leishmania spp</i>	20
Figura 4. Mudanças morfológicas em <i>Leishmania sp.</i> durante o ciclo de vida.....	20
Figura 5. Mapas de distribuição geográfica da Leishmaniose no mundo.....	22
Figura 6. Manifestações da Leishmaniose Cutânea.....	23
Figura 7. Manifestações da Leishmaniose Mucocutânea e Visceral.....	24
Figura 8. Arquitetura dos mapas dos cromossomos 1, 9 e 26 de <i>L. infantum</i>	27
Figura 9. Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos.....	29
Figura 10. Estrutura tridimensional do fator eIF4E3 em humano.....	31
Figura 11. Estratégia de construção de genes mutantes por PCR.....	42
Figura 12. Estratégia de construção de cassete de deleção gênica por PCR.....	43
Figura 13. <i>Western blot</i> de curva de crescimento de <i>Leishmania infantum wt</i> contra o anti-eIF4E5.....	46
Figura 14. <i>Western blot</i> de curva de crescimento de <i>Leishmania infantum wt</i> contra o anti-eIF4E6.....	46
Figura 15. Confirmação de superexpressão do eIF4E5-HA.....	47
Figura 16. Amplificação dos fragmentos gênicos para construção dos cassetes de deleção gênica.....	48
Figura 17. Amplificação do cassete de deleção gênica.....	49
Figura 18: Digestão de confirmação dos cassetes de deleção genica.....	50
Figura 19: Alinhamento da sequencia de aminoácidos do eIF4E3 em 3 espécies de <i>Leishmania</i>	58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Homólogos do fator eIF4E em diferentes espécies.....	30
Tabela 2. Estratégia de transfecção para analisar a viabilidade celular frente a deleção gênica de <i>LaEIF4E3</i> , <i>LiEIF4E3</i> , <i>LiEIF4E5</i> , <i>LiEIF4E6</i>	52
Tabela 3. Fenótipo da complementação dos mutantes EIF4E3 em <i>L. amazonensis</i>	64

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com proteína selvagem.....	54
Gráfico 2. Curva de crescimento de <i>L. infantum</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com proteína selvagem.....	55
Gráfico 3. Curva de crescimento de <i>L. infantum</i> com deleção gênica do EIF4E5 e com a complementação com proteína selvagem.....	56
Gráfico 4. Curva de crescimento de <i>L. infantum</i> com deleção gênica do EIF4E6 e com a complementação com proteína selvagem.....	56
Gráfico 5. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante S75A.....	59
Gráfico 6. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante S165A.....	60
Gráfico 7. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante W187A.....	61
Gráfico 8. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante W216A.....	61
Gráfico 9. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante BoxABC.....	62
Gráfico 10. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante BoxAB.....	63
Gráfico 11. Curva de crescimento de <i>L. amazonensis</i> com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante BoxC.....	63

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (*Acquired Immuno-Deficiency Syndrome*).

BLAST – Ferramenta de comparação de sequências por alinhamento local (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA – Albumina de soro bovino (*Bovine Serum Albumin*)

CaCl₂ – Cloreto de Cálcio

Cap – Estrutura de cobertura da extremidade 5' do mRNA

DNA – Ácido desoxiribonucléico (*Desoxiribonucleic acid*)

ECL – *Enhanced Chemiluminescence*

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético

eIF – Fator de iniciação eucariótico (*eukaryotic Initiation Factor*)

GTP – Guanosina Trifosfato (*Guanosine Triphosphate*)

GST – Glutathione S Transferase

HA – Epítipo HA (*Human influenza Hemagglutinin*)

IPTG – *Isopropil- β -D-galactopiranoside*

kDA – kiloDaltons

LB – Luria bertani

LC – Leishmaniose Cutânea

LCD – Leishmaniose Cutânea-Difusa

LE – Tampão de amostra *Laemmli*

LMC – Leishmaniose Mucocutânea

LV – Leishmaniose Visceral

Met – Metionina

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

Mnk – Proteína quinase de integração de sinal das MAP quinases (*MAP-kinase signal integrating kinases*)

NCBI - Centro Nacional de Informações sobre Biotecnologia (*National Center for Biotechnology Information*)

mRNA – RNA Mensageiro (*messenger RNA*)

NaOH – Hidróxido de Sódio

O.D. –Densidade Ótica (*Optical Density*)

PABP – Proteína de Ligação a Cauda Poli-A (*Poly-A Binding Protein*)
pb – Pares de Base
PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)
PCR – Reação em cadeia da polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)
pET16a – Vetor de clonagem e expressão com tag de histidina
pGEM-T-Easy – Vetor de clonagem
pGEX - Vetor de clonagem e expressão com tag de GST (*Glutathione S-Transferase*).
pSP-BT1-YneoαIR. – Vetor de Subclonagem e expressão.
PVDF – Fluoreto de Polivinilideno (*Polyvinylidene difluoride*)
RNase – Enzima de degradação de RNA.
SDS-PAGE – Gel de poliacrilamida dodecil sulfato de sódio (*Sodium Dodecyl Sulfate –Polyacrilamide Gel Eletrophoresis*)
SL – Sequência Líder (*Spliced-Leader*)
TBS – Solução salina tamponada com Tris (*Tris Buffered Saline*)
tRNA – RNA Transportador (*transfer RNA*)
X-Gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopyranoside

SUMÁRIO

Resumo.....	V
Abstract.....	Vi
Lista de ilustrações.....	Vii
Lista de Tabelas.....	Viii
Lista de Gráficos.....	Iv
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos.....	X
1. Introdução.....	14
2. Revisão da Literatura.....	16
2.1 Características gerais da família Tripanosomatidae	16
2.1.1 Ordem Kinetoplastida.....	16
2.1.2 Família Tripanosomatidae.....	17
2.2 <i>Leishmania spp.</i>	17
2.2.1 Leishmaniose.....	18
2.2.2 Ciclo de vida do gênero <i>Leishmania</i>	19
2.3 Epidemiologia da Leishmaniose.....	21
2.4 Manifestações clínicas das Leishmanioses.....	23
2.4.1 Diagnóstico e tratamento das Leishmanioses.....	24
2.5 Mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos..	25
2.6 Iniciação da tradução em eucariotos e o complexo eIF4F.....	27
2.6.1 eIF4E.....	29
2.6.2 eIF4A.....	31
2.6.3 eIF4G.....	32
2.7 Complexos eIF4F em tripanosomatídeos e PABP.....	32
2.7.1 Homólogos de eIF4E.....	33
2.7.1.1 EIF4E1 e EIF4E2.....	34
2.7.1.2 EIF4E3 e EIF4E4.....	34
2.7.1.3 EIF4E5 e EIF4E6.....	35
3. Objetivos.....	37
3.1 Objetivo geral.....	37
3.2 Objetivos específicos.....	37
4. Materiais e Métodos.....	38
4.1 Cultivo e avaliação de crescimento celular.....	38

4.2 Transfecção dos parasitas.....	38
4.3 Superexpressão dos fatores EIF4E.....	39
4.4 Ensaios de <i>Western-Blot</i>	40
4.5 Construções dos genes mutantes do EIF4E3.....	41
4.6 Deleção gênica dos fatores EIF4E.....	42
4.7 Sequenciamento de DNA.....	44
5. Resultados.....	45
5.1 Análise da expressão nativa e superexpressão dos fatores EIF4E5 e EIF4E6.....	45
5.1.1 Superexpressão dos genes EIF4E5-HA e EIF4E6-HA.....	47
5.2 Construções dos cassetes de deleção gênica.....	48
5.3 Análise da viabilidade celular de <i>Leishmania</i> na ausência dos fatores EIF4E3, EIF4E5 e EIF4E6.....	51
5.4 Ensaios de complementação com as proteínas nativas em <i>L. infantum</i> e <i>L. amazonensis</i>	51
5.4.1 Complementação com o fator EIF4E3 de <i>L. infantum</i> e <i>L.</i> <i>amazonensis</i>	53
5.4.2 Complementação com os fatores EIF4E5 e EIF4E6 de <i>L.</i> <i>infantum</i>	55
5.5 Ensaios de complementação com as proteínas mutantes do fator EIF4E3 de <i>L. amazonensis</i>	57
5.5.1 Complementação com mutantes em possíveis sítios de fosforilação.....	58
5.5.2 Complementação com mutantes em sítios de ligação a eIF4G ou ao <i>cap</i>	60
5.5.3 Complementação com mutantes em sítios de interação com PABP.....	62
6. Discussão.....	65
7. Conclusão.....	71
8. Referências Bibliográficas.....	72
9. Currículo Lattes atualizado.....	80

1. Introdução

Protozoários parasitas do gênero *Leishmania* spp., pertencentes a família Tripanosomatidae, são causadores das Leishmanioses, doenças que podem ser apresentadas por lesões desfigurativas cutâneas ou muco-cutâneas ou sob a forma visceral, que se não tratada é fatal.

Estes patógenos são transmitidos para o hospedeiro humano, e outros vertebrados, através da picada durante o repasto sanguíneo de insetos dípteros flebotomíneos. Deste modo, inicia-se seu ciclo evolutivo com a inoculação de formas infectivas na corrente sanguínea, quando o parasita é fagocitado por macrófagos e se diferencia em formas arredondadas (amastigotas) que se multiplicam no interior de fagolisossomos. Quando um hospedeiro infectado é picado, os parasitas ingeridos se diferenciam nos flebotomíneos em formas replicativas, e posteriormente nas formas infectivas, completando o ciclo.

Os tripanosomatídeos são organismos que possuem características biológicas singulares que os diferenciam dos demais eucariotos, como a sua complexa regulação da expressão gênica. Nesses organismos ocorre ausência de regulação da transcrição, onde os genes são transcritos constitutivamente a partir de escassas regiões cromossômicas na ausência de promotores clássicos de RNA Polimerase II. O resultado são mRNAs policistrônicos que são processados por *trans-splicing* e poliadenilação. Acredita-se, a partir dessas características apresentadas, que o controle da expressão gênica ocorra em níveis pós-transcricionais, através do controle no processamento,

estabilidade e tradução de mRNAs e no processamento e modificações pós-traducionais das proteínas.

Dentre os processos sujeitos a mecanismos de regulação pós-transcricionais, a tradução é um dos alvos mais determinantes na expressão gênica em eucariotos, pois define quando, quais e com que intensidade os mRNAs serão traduzidos. Dentre as etapas da tradução, a iniciação é a etapa mais sujeita a regulação, dada a existência de vários fatores acessórios denominados eIFs (do inglês, *eukariotic Initiation Factors*) sujeitos a mecanismos de controle. Um ponto central da iniciação da tradução é a formação do complexo eIF4F, composto de três proteínas que cooperam para o reconhecimento do mRNA e recrutamento do ribossomo para a tradução. Essas proteínas são: o eIF4E, que reconhece o mRNA; o eIF4A, uma RNA helicase; e o eIF4G, que estrutura o complexo.

Um aspecto peculiar dos tripanosomatídeos é o elevado número de homólogos de subunidades do complexo eIF4F, como os seis homólogos de eIF4E (EIF4E1 a 6). Destes, dois já foram descritos, coexistindo nos tripanosomatídeos como parte de complexos do tipo eIF4F e envolvidos diretamente na tradução (EIF4E3 e 4). Dados mais recentes apontam para a participação de dois outros homólogos de eIF4E e complexos do tipo eIF4F com função ainda não definida (EIF4E5 e 6).

Dos quatro homólogos de eIF4E citados, o EIF4E4 já foi melhor caracterizado. O presente trabalho busca contribuir para o esclarecimento das propriedades diferenciais e funcionais dos EIF4E3, EIF4E5 e EIF4E6, avaliando a necessidade destes para a viabilidade de *Leishmania spp.* e investigando elementos necessários para a sua atividade funcional.

2. Revisão da Literatura

2.1 Características gerais da família Tripanosomatidae

2.1.1 Ordem Kinetoplastida

A ordem Kinetoplastida constitui um grande grupo de protozoários de vida livre ou parasitas de invertebrados, vertebrados e plantas que são caracterizados por possuírem uma estrutura intracelular exclusiva, uma única e grande mitocôndria (LUKES *et al.*, 2002). Essa estrutura possui forma de disco e é denominada de Kinetoplasto (Figura 1A), contendo um grande número de moléculas de DNA circular (~20.000 minicírculos, 20-50 maxicírculos) entrelaçadas, o kDNA (Figura 1B e 1C) (GUNN e PITT, 2012). Todos os protozoários que fazem parte desta ordem possuem um flagelo, que pode ser longo e livre, incorporado na superfície celular (formando uma membrana ondulatória), ou ainda ser pequeno e fechado na bolsa flagelar (BASTIN *et al.*, 2000).

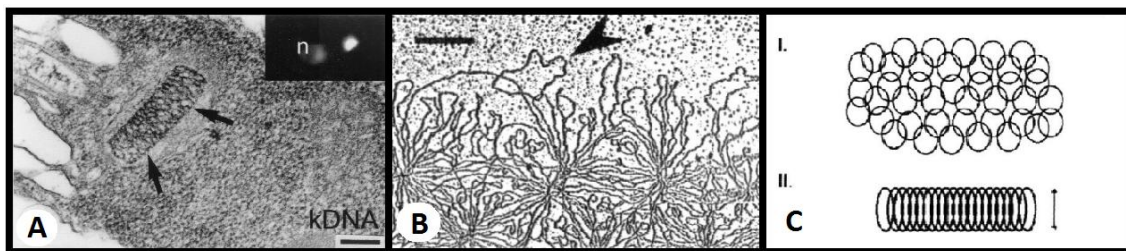


Figura 1: Estrutura do kinetoplasto. (A) Eletromicrografia da região do kinetoplasto evidenciando o kDNA de *Trypanosoma avium*. (B) Eletromicrografia evidenciando a rede de DNA e sua organização no kinetoplasto, na seta um minicírculo claramente visível. (C) Diagrama esquemático da organização do kDNA, as duas formas de organização são evidenciadas através do estudo de cortes transversais no kinetoplasto. Adaptado de Lukes *et al.*, 2002.

2.1.2 Família Trypanosomatidae

Dentro da ordem kinetoplastida encontra-se a família Trypanosomatidae. Essa família possui atualmente 13 gêneros confirmados, eles são: *Leptomonas*, *Chritidia*, *Herpetomonas*, *Blastocrithidia*, *Strigomonas*, *Angomonas*, *Wallaceina*, *Sergeia*, *Blechomonas*, *Phytomonas*, *Endotrypanum*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (LUKES et al., 2014). Dentre os membros da família Trypanosomatidae, os gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania* são os de maior importância médica e veterinária por serem parasitas do homem e/ou animais domésticos. Eles causam várias enfermidades, dentre elas a Doença de Chagas, Doença do Sono e as várias manifestações clínicas das Leishmanioses. Em sua maioria estes parasitas possuem ciclo de vida heteroxênico ou digenético, ou seja, são parasitas que possuem mais de um hospedeiro em seu ciclo biológico (SCHIMIDT e ROBERTS, 2009).

2. 2 *Leishmania* spp.

O gênero *Leishmania* compreende alguns dos principais parasitas representantes dos tripanosomatídeos. Esses são protozoários com um ciclo de vida complexo, envolvendo formas de desenvolvimento distintas (BESTEIRO, 2007). A doença causada por estes parasitas, a Leishmaniose, é prevalente em muitos países ao redor do mundo, mas há poucos medicamentos disponíveis para tratá-la, já que as maiores das drogas disponíveis são altamente tóxicas, têm problemas de resistência ou necessitam de hospitalização para a sua utilização. Durante a última década, a conclusão dos genomas de muitos patógenos humanos, incluindo o de *Leishmania* spp.,

abriu novas portas para o estudo da biologia molecular funcional e estrutural, na busca de conhecer melhor este parasita e de poder identificar alvos terapêuticos e validá-los (RAJASEKARAN e CHEN, 2015).

2.2.1 Leishmaniose

O termo Leishmaniose compreende um conjunto heterogêneo de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, como por exemplo: *L. guyanensis*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. major* e *L. infantum*. A espécie envolvida vai depender de fatores como a sua distribuição geográfica, transmissão, condições socioeconômicas. Essas doenças possuem um largo espectro de manifestações clínicas, e essas diferenças estão relacionadas à espécie de *Leishmania* envolvida, à resposta clínica do paciente ao fármaco empregado e ao sistema imunológico do hospedeiro. Existem mais de 20 espécies de *Leishmania* capazes de infectar o ser humano, mas essa infecção sempre ocorre através da picada de fêmeas infectadas de insetos dípteros flebotomíneos, pertencentes aos gêneros *Phlebotomus* sp., no Velho Mundo (Figura 2A), e *Lutzomyia* sp., no Novo Mundo (Figura 2B). Mais de 90 espécies de flebotomíneos são conhecidas por transmitir parasitas do gênero *Leishmania* (WHO, 2015).

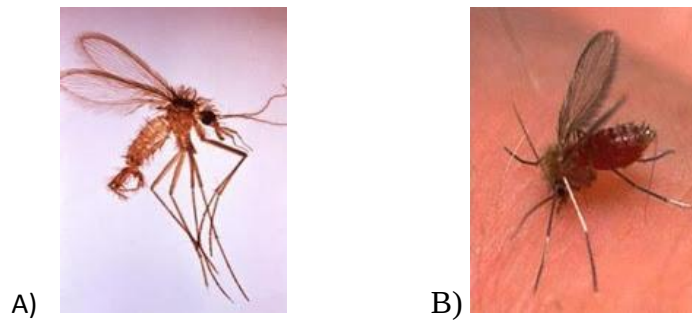


Figura 2: Flebotomíneos transmissores da *Leishmania* spp. (A) *Phlebotomus* (vetor da leishmaniose no Velho Mundo). (B) *Lutzomya* (vetor da leishmaniose no Novo Mundo).

2.2.2 Ciclo de vida do gênero *Leishmania*

A infecção pelos protozoários do gênero *Leishmania* caracteriza-se pelo parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear (SFM) da derme e das mucosas do hospedeiro vertebrado (monócitos, histiócitos e macrófagos) (Figura 3). Estes protozoários apresentam duas formas principais, a promastigota, forma proliferativa alongada que apresenta flagelo anterior, encontrada no trato digestivo do flebotomíneo infectado (Figura 4A), com sua variante não proliferativa mas infectiva, a promastigota metacíclica (Figura 4B); e a amastigota, forma proliferativa arredondada e desprovida de flagelo, encontrada no interior dos macrófagos infectados (Figura 4C) e (BRASIL, 2006). Através da picada do inseto flebotomíneo infectado o protozoário na forma promastigota metacíclica é injetado na corrente sanguínea e em seguida é fagocitado por macrófagos onde sofre diferenciação celular para a forma amastigota, se multiplicando e infectando outros macrófagos. Ao se alimentar de sangue com macrófagos parasitados, os insetos flebotomíneos ingerem o parasita que se diferencia em sua forma promastigota, se multiplica e em seguida se diferencia mais uma vez na forma metacíclica, reiniciando o ciclo.

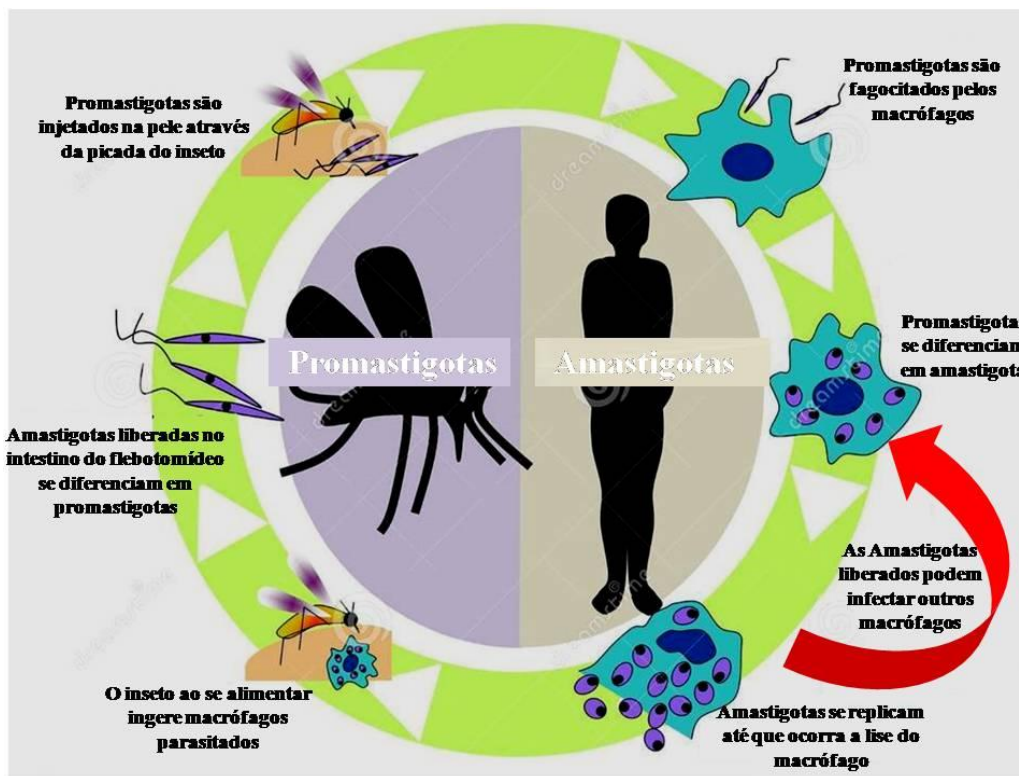


Figura 3: Ciclo de vida de *Leishmania* spp.

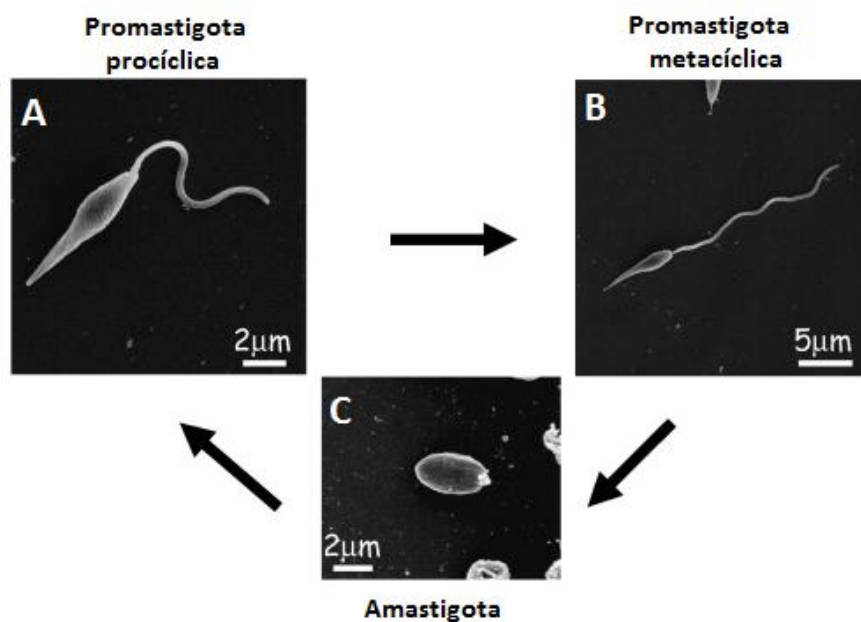


Figura 4: Mudanças morfológicas das células de *Leishmania* sp. durante o ciclo de vida. (A) Promastigota procíclica. (B) Promastigota metacíclica, apresentando uma célula mais afilada e de flagelo maior. (C) Amastigota. Imagens de célula de *L. major*, através de microscopia eletrônica de varredura. Adaptada de BESTEIRO, 2007.

2.3 Epidemiologia da Leishmaniose

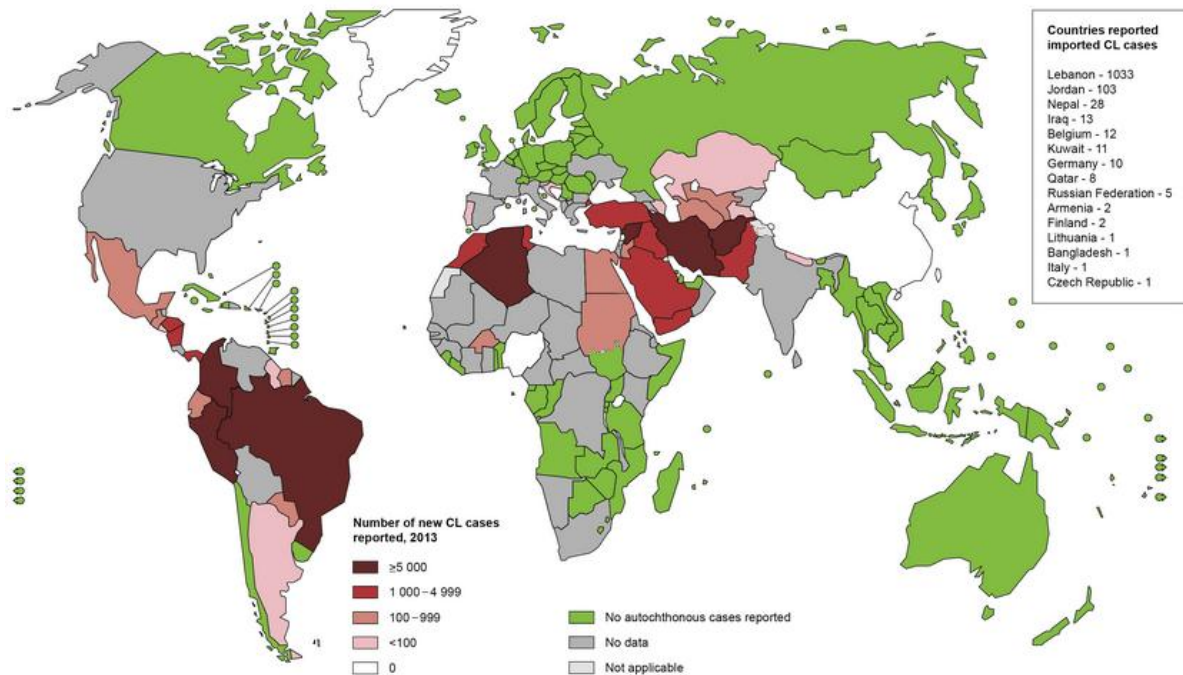
A Leishmaniose continua a constituir um grave problema de saúde pública mundial, com as novas epidemias que ocorrem em áreas endêmicas e a propagação da doença para áreas anteriormente livres devido à migração, turismo e atividades militares, A Leishmaniose é uma doença dos pobres, ocorrendo principalmente em aldeias rurais remotas com condições precárias de habitação e pouco ou nenhum acesso a instalações de cuidados de saúde qualificados (OKWOR e UZONNA, 2016).

Aproximadamente 310 milhões de pessoas vivem em área de risco para a Leishmaniose, sendo esta doença endêmica no norte da África, Oriente Médio, regiões da Europa, América Central e do Sul (WHO, 2015). Na América Latina, a doença já foi descrita em pelo menos 12 países, mas 90% dos casos ocorrem no Brasil, especialmente na Região Nordeste. O registro do primeiro caso da doença no Brasil ocorreu em 1913, quando Migone, no Paraguai, descreveu o caso em material de necropsia de paciente oriundo de Boa Esperança, Mato Grosso (ALENCAR *et al.*, 1991; BRASIL, 2014).

Segundo o Ministério da Saúde (2014), em 19 anos de notificação (1984-2002), os casos de Leishmaniose Visceral (LV) somaram 48.455 casos, sendo que aproximadamente 66% deles ocorreram nos estados da Bahia, Ceará, Maranhão e Piauí. Nos últimos dez anos, a média anual de casos no País foi de 3.156 novos casos, e a incidência de dois casos/100.000 hab. Com relação a Leishmaniose Cutânea (LC), no período de 1991 a 2010, a região

Norte contribuiu com o maior número de casos (cerca de 36,4 casos por 100.000 habitantes) seguida das regiões Centro-oeste (36,5 casos por 100.000 habitantes) e Nordeste (19,9 casos por 100.000 habitantes) (Figura 5).

Leishmaniose Cutânea.



Leishmaniose Visceral.

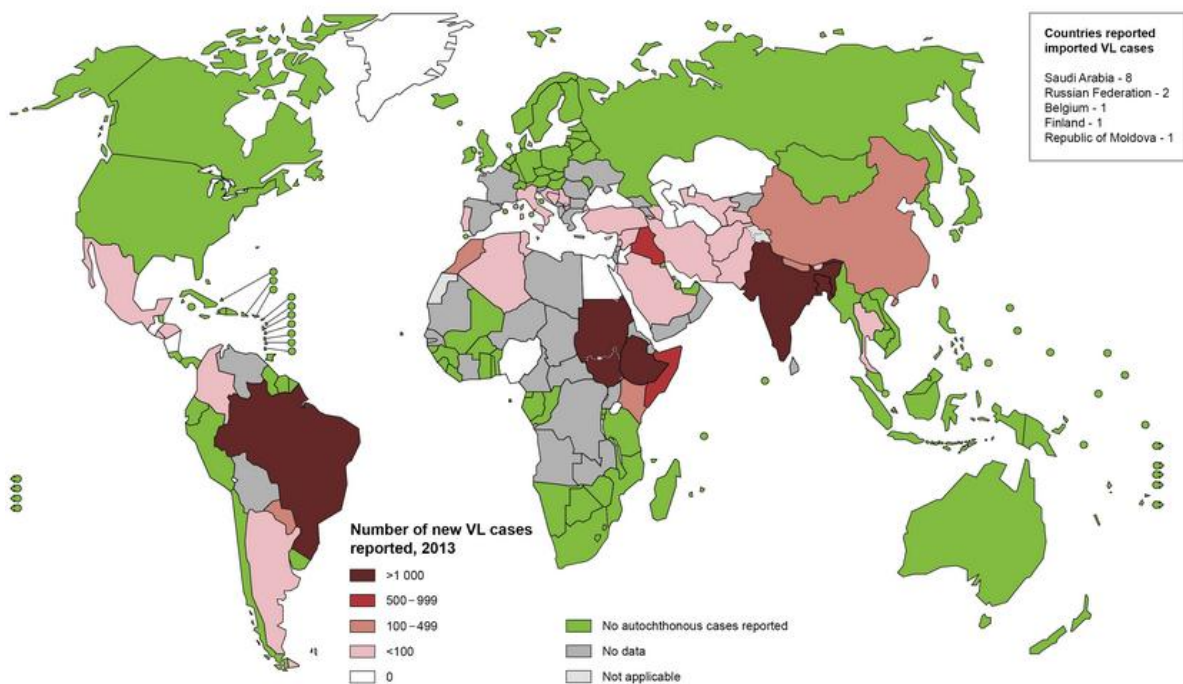


Figura 5: Mapas de distribuição geográfica da Leishmaniose no mundo. Figura superior: Leishmaniose Cutânea. Figura inferior: Leishmaniose Visceral. Figura adaptada de www.who.int.

2.4 Manifestações clínicas da Leishmaniose

A Leishmaniose pode ser classificada em duas principais manifestações clínicas: Leishmaniose Cutânea ou Tegumentar (LC/LT) e Leishmaniose Visceral (LV) ou Calazar. A LC pode ainda apresentar as variações clínicas Mucocutânea (LMC) e Cutânea-Difusa (LCD) (SOARES-BEZERRA *et al.*,2004).

No Brasil, as três principais espécies de *Leishmania* responsáveis pela LC, dos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*, são: *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis*. Esta é caracterizada por lesões ulcerativas em áreas expostas (braços, pernas, entre outras) podendo ser localizada (Figura 6A) ou ainda se apresentar na forma mais rara e grave, a cutânea difusa, caracterizada pela cronicidade e ineficácia do tratamento (Figura 6B) (BRASIL,2006). A LC não é uma ameaça à vida, porém quando ocorre tratamento inadequado de uma lesão primária, em alguns casos o indivíduo pode desenvolver a LMC (DAVID & CRAFT, 2009).

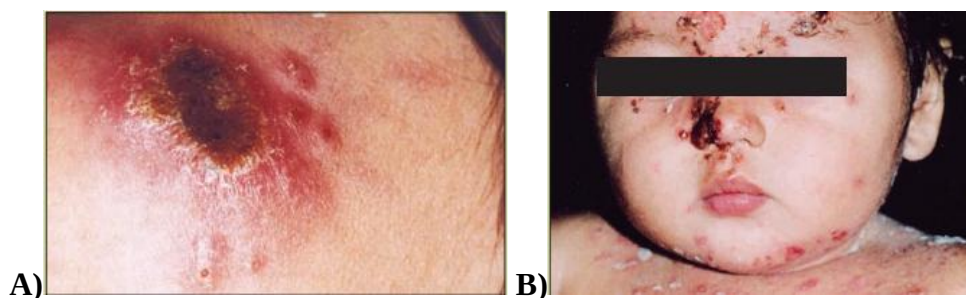


Figura 6: Manifestações da Leishmaniose Cutânea. (A) Lesão ulcerada localizada típica, com bordas elevadas, parcialmente recobertas por crostas e com presença de exsudato purulento na porção central. (B) Lesão disseminada caracterizando a evolução crônica e a refratariedade a diversos esquemas terapêuticos.

A LMC é causada unicamente por espécies de *Leishmania* do subgênero *Viannia*, tipicamente encontrado nas Américas (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) amazonensis*, *L. (V.) panamensis*, e *L. (V.) guyanensis*). É caracterizada por lesões que duram por um longo período de tempo e frequentemente se disseminam para as membranas mucosas, principalmente nas áreas nasal, oral ou faríngea. Em contraste com a LC padrão, a LMC é potencialmente fatal e requer tratamento. (DAVID, & CRAFT, 2009) (Figura 7A).

A Leishmaniose Visceral é causada principalmente por *L. donovani*, mas também pode ser causada por *L. infantum* (sinônimo de *L. chagasi*) e é caracterizada por febre irregular, perda de peso, hepatoesplenomegalia e anemia, com aproximadamente 100% de taxa de mortalidade em indivíduos não tratados (Figura 7B) (DIRO *et al.*, 2015)

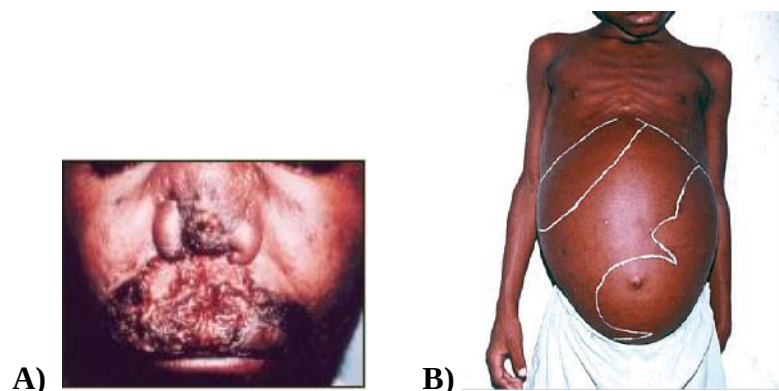


Figura 7: Manifestações da Leishmaniose Mucocutânea e Visceral. (A) Leishmaniose Mucocutânea. Forma mucosa com ulcerações nas fossas nasais e destruição dos tecidos cartilagosos. (B) Criança com Leishmaniose Visceral com aumento do tamanho do fígado e do baço (hepatoesplenomegalia)

2.4.1 Diagnóstico e tratamento da Leishmaniose

O diagnóstico da Leishmaniose é feito pelo método clínico baseado nos sinais e sintomas, em parâmetros epidemiológicos, métodos parasitológicos,

pela visualização do parasito em material de biópsia e também por métodos sorológicos como a Imunofluorescência Indireta e o ELISA. Para a biópsia é necessária a punção aspirativa do baço, fígado, medula óssea ou linfonodos, sendo preferência da maioria dos autores a punção esternal em adultos ou a punção da crista ilíaca em crianças (DE SOUZA *et al.*,2012).

Desde os anos 40 do século passado, para o tratamento da Leishmaniose, é utilizado como primeira escolha o antimônio metilglucamina, mesmo sendo tóxico e não apresentando total certeza de cura para o paciente. No Brasil a Anfotericina B e suas formulações lipossomais (anfotericina B – lipossomal e anfotericina B – dispersão coloidal), as pentamidinas e os imunomoduladores vêm sendo usadas como tratamento alternativo. Mesmo utilizando esses tratamentos, ainda é um desafio a produção de novos fármacos leishmanicidas eficientes. Também é necessário formas de diagnóstico mais rápidos e de medicamentos que sejam de rápida ação e que não sejam tóxicos ao paciente. (ROZENDO *et al.*,2014).

2.5 Mecanismos de regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos são um grupo notável de protistas que se separaram muito cedo da linhagem evolutiva eucariótica. São organismos diplóides, unicelulares simples, que possuem peculiaridades biológicas, como sua arquitetura de DNA mitocondrial única, a edição dos seus mRNAs mitocondriais e um processamento diferenciado dos mRNAs citoplasmáticos, conhecido como *trans-splicing*. Este último é direcionado a todos os RNAs

codificantes de proteínas que, ao serem processados, recebem uma sequência de nucleotídeos chamada de sequência *Spliced Leader* (SL). Estes mRNAs tem como precursores RNAs policistrônicos gigantes que são transcritos simultaneamente por conta da ausência de promotores para transcrição individual de cada gene (Figura 8) (SIMPSON, 2006; CAMPBELL et al. 2003).

Mesmo tendo divergido entre si há cerca de 200 a 500 milhões de anos, os tripanosomatídeos de uma forma geral apresentam uma notável conservação tanto no número como na organização de seus genes (GHEDIN et al. 2004; KISSINGER, 2006). Todos têm seu genoma organizado em grandes blocos policistrônicos (Figura 8), ou seja, dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas arranjadas na mesma fita de DNA e separados por uma ou mais regiões de troca de fita em cada cromossomo (SIMPSON et al., 2006; MARTINÉZ-CALVILLO et al., 2009).

Por possuírem esta organização genômica peculiar e também por não possuírem promotores típicos para RNA polimerase II, a regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos é dependente quase que exclusivamente de eventos pós-transcricionais, onde um papel crucial parece ser o do controle da iniciação da tradução dos mRNAs em proteínas (KRAMER e CARRINGTON, 2011).

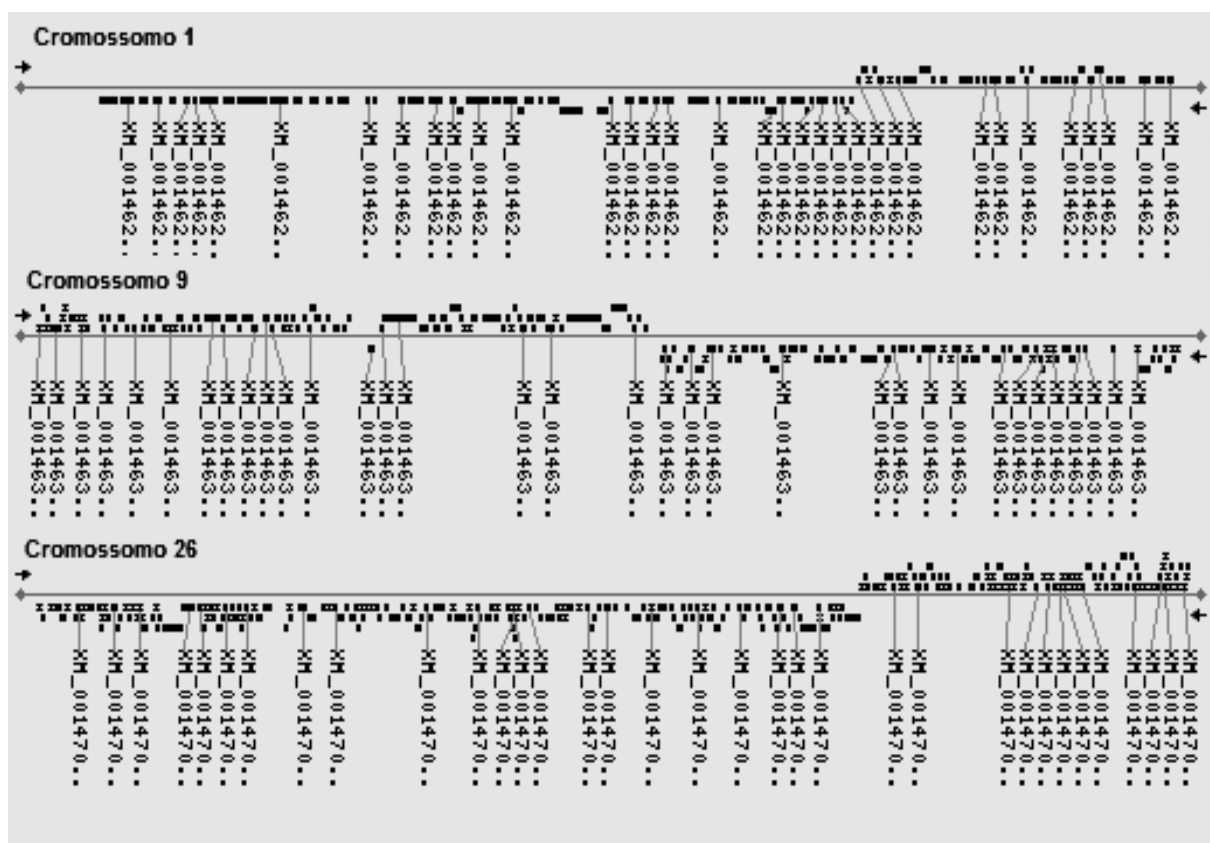


Figura 8: Arquitetura dos mapas dos cromossomos 1, 9 e 26 de *Leishmania infantum*. Os genes estão representados por faixas ou pontos posicionados na fita positiva e negativa. Uma região de inversão da transcrição (troca de fita) está presente nos três fragmentos de genoma. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>)

2.6 Iniciação da tradução em eucariotos e o complexo eIF4F

Embora o mecanismo e a regulação da iniciação da tradução, em diferentes grupos de seres vivos, sejam estudados há décadas, muitos aspectos desse processo permanecem obscuros (FRASER, 2015). A iniciação da tradução em eucariotos é composta por várias etapas: o reconhecimento do mRNA maduro; montagem do complexo 43S de pré-iniciação; recrutamento e a migração da subunidade 40S ao longo da extremidade 5' não traduzível do mRNA (5' UTR) para localizar o códon de iniciação da tradução; e o

recrutamento da subunidade 60S para formar o complexo de tradução propriamente dito.

O processo de iniciação da tradução se dá pela atuação de no mínimo 11 fatores de iniciação, os eIFs (do inglês, *eukaryotic Initiation Factors*). Destes, o complexo eIF4F tem como principal objetivo facilitar o reconhecimento dos mRNAs e mediar a sua associação com a subunidade ribossômica para formação do complexo 48S (Figura 9). Este complexo é formado por três subunidades: o fator eIF4E, a proteína de ligação ao *cap* dos mRNAs; uma proteína do tipo RNA helicase, denominada eIF4A, capaz de remover conformações secundárias no mRNA, permitindo que esse possa ser traduzido de forma correta; e o fator eIF4G, uma proteína estruturadora do complexo que interage de forma independente com as outras duas subunidades (eIF4E e eIF4A) (PELLETIER e SONENBERG, 2015). A subunidade eIF4G ainda participa de interações críticas com outras proteínas, como o complexo eIF3, que faz a conexão entre a subunidade menor ribossomal e o mRNA, e a PABP (proteína de ligação a cauda poli-A), que promove a circularização do mRNA (JACKSON et al., 2010).

Tabela 1: Homólogos do fator eIF4E em diferentes espécies.

Organismo modelo	Nome científico	Homólogos do eIF4E	Referências
Camundongo	<i>Mus musculus</i>	eIF4E-1, 4EHP e eIF4E-3	JOSHI et al., 2004
Homem	<i>Homo sapiens</i>	eIF4E1, eIF4E2 e 4EHP	ROM et al., 1998; GAO et al., 1998
Arabeta	<i>Arabidopsis thaliana</i>	eIF4E, eIFiso4E e nCBP	RUUD et al., 1998
Levedura	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	eIF4E-1 e eIF4E-2	PTUSHKINA et al., 2001
Nematódeo	<i>Caenorhabditis elegans</i>	IFE-1, IFE-2, IFE-3, IFE-4 E IFE-5	KEIPER et al., 2000

Já se sabe os principais motivos de interação encontrados em homólogos do eIF4E estudados até hoje, envolvidos na iniciação da tradução, e que são responsáveis pela sua ligação ao *cap* e a parceiros funcionais. Para ligação ao eIF4G dois resíduos de triptofano conservados são encontrados, o W43 e o W73 (eIF4E-1 de mamíferos). Quando ocorre a substituição do triptofano W73 por um aminoácido não aromático, ocorre a perda da interação com o eIF4G ou com as 4E-BP, proteínas de ligação ao eIF4E que competem por seu sítio de ligação ao eIF4G (Figura 10) (RHOADS et al., 2007). As proteínas 4E-BPs têm sido identificadas como as principais reguladoras da atividade do eIF4E em mamíferos. A ligação das 4E-BPs ao eIF4E é regulada pelo seu estado de fosforilação: quando estão hipofosforiladas elas se ligam ao eIF4E e previnem a interação eIF4E-eIF4G, dificultando a tradução *cap*-dependente; já as formas hiperfosforiladas liberam o eIF4E possibilitando a interação deste com o eIF4G (GINGRAS et al., 1999).

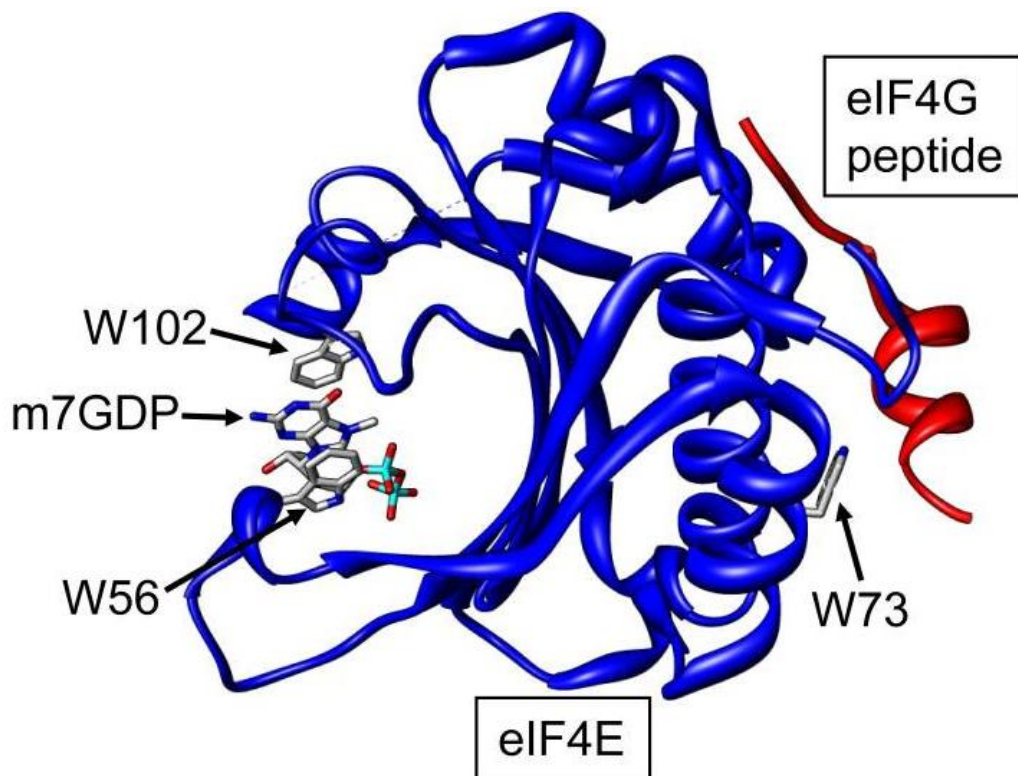


Figura 10: Estrutura tridimensional do fator eIF4E3 em humano. As setas identificam os principais aminoácidos responsáveis pela ligação ao eIF4E (GOODFELLOW e ROBERTS., 2008).

2.6.2 eIF4A

O fator eIF4A está envolvido no processamento do mRNA, atuando como uma RNA helicase retirando estruturas secundárias que podem ter se formado nos mRNA, sendo assim este fator tem um papel essencial para o processo de tradução (OBERER *et al.* 2005). Este fator pertence à família das proteínas denominadas de *DEAD*-box, que são proteínas que possuem um motivo de oito aminoácidos altamente conservados em diversas espécies, mesmo entre bactérias e humanos. Possuem atividades dependente de ATP e possuem sequências similares aos encontrados em DNA helicases (ROGERS *et al.*, 1999).

2.6.3 eIF4G

O eIF4G é o fator responsável por estruturar o complexo eIF4F. O eIF4G contém um motivo de reconhecimento ao eIF4E (Y-X4-L-Φ, onde X pode ser qualquer aminoácido e Φ é um aminoácido hidrofóbico), além do motivo de ligação a PABP (proteína de ligação a Cauda Poli-A). Existem ainda segmentos conservados de ligação ao eIF4A e ao eIF3. (Marcotrigiano et al., 2001)O eIF4G interage com o eIF4A através de dois sítios independentes: um na sua região central e outra na C-terminal. Apesar da presença de dois sítios de ligação no eIF4G, somente uma molécula de eIF4A participa do complexo. (SCHUTZ *et al.* 2008).

2.7 Complexos eIF4F em tripanosomatídeos e PABP

Já foram feitos alguns avanços para compreender o processo de iniciação da tradução em tripanosomatídeos, além dos já descritos nos eucariotos em geral. Com a publicação dos genomas das três primeiras espécies de tripanosomatídeos, os TriTryps, foram descritos cinco homólogos de eIF4G (EIF4G1 a 5) (Dhalia et al., 2005) e dois de eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII) (Dhalia et al., 2006). Além destes foram identificados dois homólogos para PABP em *T. brucei* e três em *Leishmania sp* (da Costa Lima et al., 2010). No que concerne aos homólogos de eIF4E, um total de seis homólogos foram identificados no total, sendo quatro deles descritos inicialmente, EIF4E1 a 4 (DHALLIA et al., 2005), e outros dois mais recentemente, EIF4E5 e EIF4E6 (FREIRE et al. 2014a, FREIRE et al., 2014b). Até o momento foi confirmada a

formação de dois complexos principais eIF4F, um entre os fatores EIF4E4/EIF4G3/EIF4A1 e o outro envolvendo os fatores EIF4E3/EIF4G4 e provavelmente o EIF4A1 (DHALLIA *et al.*, 2005), além destes foi observado a formação de mais três complexos, mas que ainda não se sabe seu papel, na síntese proteica, que são entre o EIF4E5/EIF4G1, EIF4E5/EIF4G2 (FREIRE *et al.*, 2014a) e o EIF4E6/EIF4G5 (FREIRE *et al.*, 2014b).

Em trabalhos realizados em *T. brucei* foi visto uma diminuição do crescimento celular quando depletado o fator EIF4G3 através de ensaios de RNAi, este mesmo resultado não foi observado realizando ensaios de RNAi no fator EIF4G4. Como estes fatores possuem sequências e estruturas similares, acredita-se que o complexo EIF4E4/EIF4G3 tem a função principal na síntese protéica, enquanto o complexo EIF4E3/EIF4G4 também atue na tradução, mas de forma mais restrita, traduzindo apenas um grupo específico de mRNAs (MOURA *et al.*, 2015).

Além dos fatores que compõem o eIF4F existe um grupo de proteínas de ligação a cauda poli-A (PABP), no genoma de *L. major* foram encontrados três sequencias homólogas da PABP (PABP1, PABP2 e PABP3), porém ortólogos de apenas as duas primeiras foram observadas em *T. cruzi* e *T. brucei*. Estudos destas proteínas em *Leishmania* indicam que apenas a PABP1 participa do complexo formado pelos EIF4G3/EIF4E4/EIF4A1, desempenhando funções na tradução. As PABPs 2 e 3 se ligam aos mesmos mRNAs, porém a mRNAs distintos daqueles onde a PABP1 se liga, o que sugere que estas proteínas possuem funções diferenciadas (da Costa Lima *et al.*, 2010).

2.7.1 Homólogos de eIF4E

A análise dos homólogos de eIF4E de *Leishmania* mostraram que estes diferem na sua afinidade pelo nucleotídeo *cap*, na sua associação a polissomas e na sua capacidade de se ligar a homólogos de eIF4G (Dhalia et al., 2005; Yoffe et al., 2006; Yoffe et al., 2009).

Estudos de homologia por modelagem molecular sugeriram que a estrutura básica de ligação ao *cap* observada em leveduras e mamíferos está conservada nos diferentes homólogos de eIF4E (ZINOVIEV, E SHAPIRA, 2012). A partir de dados obtidos em *L. major* e *T. brucei*, sabe-se que os EIF4E3 e EIF4E4 interagem com homólogos de eIF4G implicados de alguma forma na tradução, os EIF4G4 e EIF4G3, respectivamente. Ao menos dois complexos de iniciação da tradução do tipo eIF4F estão presentes nestes patógenos com funções distintas na tradução (YOFFE ET AL., 2010; ZINOVIEV ET AL., 2012; FREIRE et al., 2011; MOURA et al., 2015).

2.7.1.1 EIF4E1 e EIF4E2

Em *Leishmania*, o primeiro homólogo da proteína de ligação ao *cap* identificado e caracterizado foi o *LeishEIF4E1* (EIF4E1), que possui localização citoplasmática e demonstrou ser capaz de se ligar a análogos da estrutura *cap* (YOFFE et al., 2004). Em *Trypanosoma* os fatores EIF4E1 e EIF4E2 demonstraram que são proteínas menos abundantes, encontradas tanto no núcleo como no citoplasma e que não são capazes de se ligar a homólogos do eIF4G (FREIRE et al., 2011). Em *Leishmania* foi descrita uma proteína identificada como parceira do EIF4E1, que acredita-se que atua na regulação

de forma indireta da maquinaria de tradução (Zinoviev *et al.* 2011). Resultados não publicados demonstraram que o EIF4E2 se liga especificamente com uma proteína hipotética e que esta possui homologia com a proteína de ligação a mRNA de histonas (HBP).

2.7.1.2 EIF4E3 e EIF4E4

Os fatores EIF4E3 e EIF4E4 são os fatores que participam dos complexos mais bem caracterizados em tripanossomatídeos, com principal função a na síntese protéica. Os fatores EIF4E3 e o EIF4E4 interagem com os homólogos do EIF4G (EIF4G4 e EIF4G3 respectivamente), tanto o EIF4E3 quanto o EIF4E4 são proteínas abundantes e estão localizadas no citoplasma (Freire *et al.*, 2011). O complexo EIF4E4/EIF4G3 se associa ao EIF4A1 e PABP1 e tem como principal papel a síntese protéica. No que diz respeito ao complexo EIF4E3/EIF4G4, ainda não está claro qual a sua real importância para o processo de síntese protéica como um todo, embora acredita-se que este complexo esteja responsável num papel seletivo a grupos específicos de mRNAs para síntese protéica (Freire *et al.*, 2011; Moura *et al.*, 2015). Resultados em *Leishmania* para o EIF4E3 indicariam uma função dissociada da síntese protéica (Zinoviev *et al.*, 2012).

2.7.1.3 EIF4E5 e EIF4E6

Os fatores EIF4E5 e EIF4E6 são proteínas citoplasmáticas que são capazes de se ligar tanto ao *cap* comum como ao *cap4*. Em trabalhos com *T. brucei* foi visto que estes fatores não são essenciais para sobrevivência da

célula. Foi observado ainda que o EIF4E5 interage com o EIF4G1 e EIF4G2 (Freire et al., 2014a) e o EIF4E6 interage com EIF4G5 (Freire et al., 2014b).

Foi observado que os complexos formados por EIF4E5/EIF4G1 e EIF4E5/EIF4G2 se ligam a proteínas regulatórias que possuem domínios Guaniltransferase e Metiltransferase, indicando um possível papel regulador na formação da estrutura ao *cap*. A depleção do fator EIF4E5 em *T. brucei* apresentou um fenótipo de diminuição da movimentação celular, causando um efeito de sedimentação na cultura depletada (Freire et al., 2014a).

Em relação ao complexo EIF4E6/EIF4G5 foi também observado a interação com proteínas com domínios relacionados a formação do *cap*, hidrolase trifosfatase e guaniltransferase. A depleção do EIF4E6 demonstrou alterações na morfologia celular e também a perda de movimentação celular em cultura (Freire et al., 2014b).

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a viabilidade e desenvolvimento celular de *Leishmania sp.* mediante deleção gênica e ensaios de complementação de três homólogos da proteína de ligação ao *cap* dos mRNA, EIF4E3, EIF4E5 e EIF4E6.

3.2 Objetivos específicos

- Definir, por meio de experimentos de deleção gênica (“knock-out”), a necessidade dos fatores EIF4E3, EIF4E5 e EIF4E6 para a viabilidade e desenvolvimento celular em *Leishmania sp.*
- Avaliar o efeito da superexpressão das proteínas de interesse de acordo com as diferentes condições de crescimento;
- Avaliar o papel de mutações em resíduos críticos do fator EIF4E3 na sua capacidade de substituir a proteína selvagem em experimentos de complementação gênica em *L. amazonensis*.

4. Material e Métodos

4.1 Cultivo e avaliação de crescimento celular

Células de *Leishmania sp.* foram mantidas na fase exponencial de crescimento através de repiques sucessivos em meio Schneider pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% v/v de Penicilina e Estreptomicina (Sigma-Aldrich Co.) em estufa BOD a 26°C. Para a diferenciação celular em amastigota axênica, alíquotas de células obtidas de culturas de *Leishmania sp.* em fase estacionária, ricas em formas promastigotas metacíclicas 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 SBF e os mesmos antibióticos supracitados, cultivados em estufa de CO₂ a 37°C. Essas culturas foram utilizadas durante todos os experimentos de modificação genética através da técnica de transfecção dos parasitas com as construções obtidas e conseguinte análise do crescimento e diferenciação das diversas linhagens obtidas.

Para a avaliação e crescimento das linhagens selvagens e mutantes, células em fase estacionária de cultivo foram repassadas numa concentração inicial de 10^6 células/mL em meio Schneider durante todo ciclo de vida (cinco a sete dias) e observadas quanto ao número de células, morfologia e motilidade.

4.2 Transfecção dos parasitas

Apenas formas promastigotas de *Leishmania sp.* foram utilizadas nos experimentos de transfecção. Alíquotas de $2,5 \times 10^8$ célula/mL de *Leishmania sp.* foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos, lavadas com 5 ml de

tampão Hepes-NaCl pH 7,05 (Hepes 20 mM, NaCl 85 mM, KCl 5 mM, Na₂PO₄ 0,7 mM e Glicose 20 mM) e ressuspendidas em 400 µl do mesmo tampão. As células foram então repassadas para cuvetas de 2 mm (Biolabs), já contendo de 5 a 10 µg do DNA plasmídial ou 2 a 5 µg do DNA linear a ser transfectado. Após 15 minutos no gelo, as células foram eletroporadas com 1 pulso de 450 Volts e capacitância de 450µF, utilizando o eletroporador *Gene Pulser Xcell™ system* (BIO-RAD). Imediatamente depois da eletroporação, foi adicionado 1 ml de meio Schneider pH 7,2 na cuveta e o conteúdo repassado para um frasco de cultura, com 5 ml do mesmo meio.

A pré-seleção foi realizada no dia seguinte, adicionando mais 5 ml de meio Schneider pH 7,2 e a adição de 50% da quantidade adequada do antibiótico utilizado. Após 24 horas da pré-seleção foi realizada a seleção, onde 1 ml da célula pré-selecionada foi diluída em 9 ml de meio novo adicionando a concentração adequada do antibiótico utilizado. Os transfectantes foram recuperados entre 7 e 14 dias após o início da etapa de seleção.

4.3 Superexpressão dos fatores EIF4E

Para realização da metodologia de superexpressão, foi-se necessário o desenho de oligonucleotídeos que possuem sítios para as enzimas de restrição *Bam*HI/*Hind*III nas extremidades 5' e 3' dos fragmentos gerados, respectivamente. Os amplicons gerados foram clonados no vetor pGEM-T-Easy utilizando-se o sistema comercial disponível (Promega) seguido de transformação de células de *Escherichia coli* quimiocompetentes. Desta transformação foram retiradas colônias selecionadas, o DNA plasmídial foi

extraído e feita a confirmação da clonagem por digestão com a Enzima *EcoRI*. Em seguida esse DNA foi sequenciado para confirmação da correta clonagem dos genes em estudo.

Após confirmação da integridade das sequencias, estes foram digeridos e subclonados em vetor de expressão episomal e integrativo, pSP-BT1-Yneo α IR-HA de forma que as respectivas proteínas seriam geradas fusionados ao epítipo HA (do inglês, *Human influenza hemagglutinin*) em sua região C-terminal. Neste vetor, os genes clonados ficam posicionados após o gene de resistência a Neomicina, usado como marca de seleção, e flanqueados por sítios de processamento e poliadenilação. A confirmação da expressão das proteínas foi realizada por *Western Blot* com anticorpo comercial anti-HA(Sigma).

4.4 Ensaios de *Western-Blot*

Os extratos protéicos obtidos a partir de alíquotas retiradas de cultivo de *Leishmania sp.* foram fracionados em gel SDS-PAGE 20% e transferidos para membrana de PVDF (100 mA por 1h). A membrana foi então bloqueada com solução de TBS (20 mM Tris-HCl, 500 mM NaCl, pH 7,5), leite desnatado 5% e Tween-20 a 0,05% em temperatura ambiente por uma hora. Após o bloqueio, a membrana foi incubada com anticorpo primário em solução de composição igual a usada para o bloqueio com diluições que dependem dos anticorpos utilizados. Após três lavagens de 10 minutos em solução de TBS/Tween-20 a 0,05%, houve uma segunda incubação, desta vez com o segundo anticorpo secundário conjugado a peroxidase numa diluição de acordo com o anticorpo

utilizado na mesma solução que a incubação anterior, por uma hora. Esta incubação foi seguida de três lavagens de 10 minutos cada.

A visualização final foi feita através de uma reação de quimioluminescência (ECL, do inglês *Enhanced chemiluminescence*) e exposição a filme *Biomax Light* (da Kodak). Tal reação utilizou 25 mL de solução quimioluminescente: 25 mL de luminol a 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%. O tempo de exposição ao filme sofreu variações de acordo com cada anticorpo utilizado.

4.5 Construções dos genes mutantes do EIF4E3

As construções do gene do EIF4E3 utilizadas neste trabalho em sua maioria já estavam prontas, visto que já foram desenhados em trabalho anterior. Neste, foram feitas mutações pontuais para motivos conservados em homólogos de EIF4E e para sítios de fosforilação. Para construção de outros genes mutantes como estes, foi realizada a técnica de PCR em duas etapas. Na primeira etapa é amplificado o início do gene até onde será inserido a mutação, modificando o *primer* reverso com a mutação desejada. Numa segunda PCR é realizada a amplificação do gene completo utilizando o produto da primeira PCR como um *megaprimer* iniciador com o *primer* reverso comum do fim do gene. É gerado assim o gene completo com uma mutação pontual no local desejado (Figura 11).

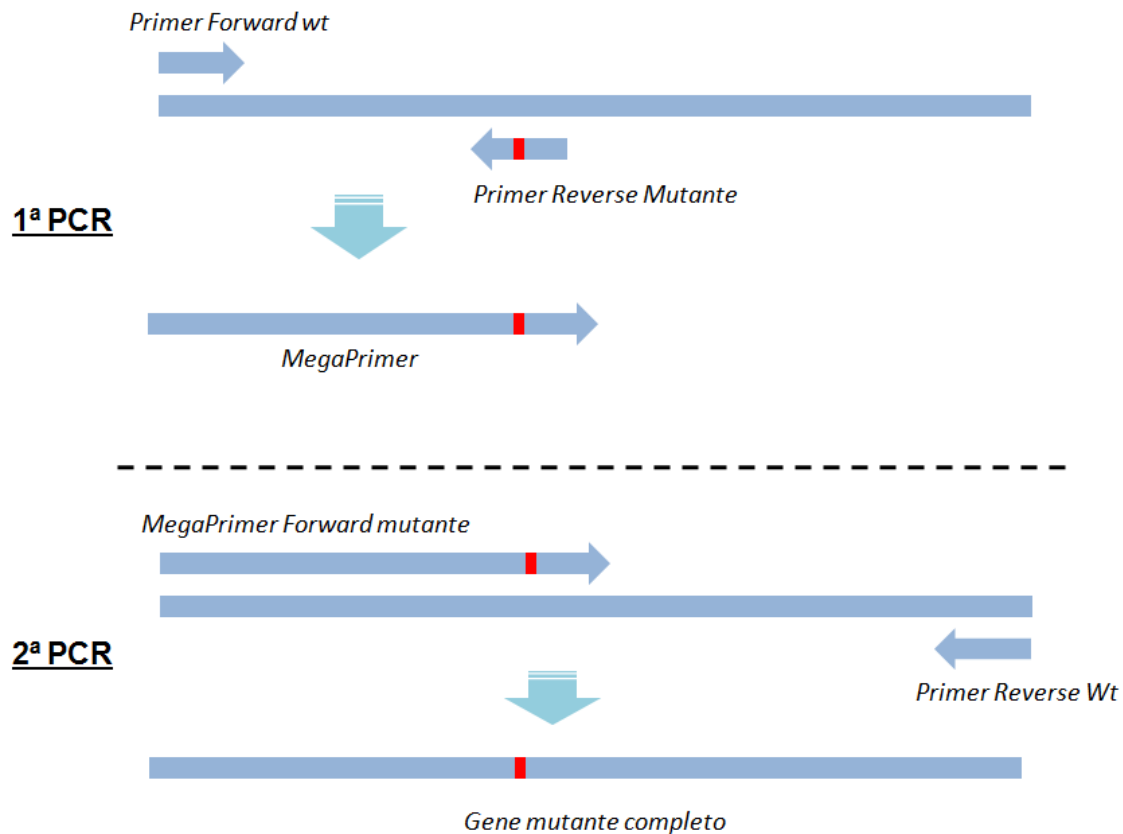


Figura 11: Estratégia de construção de genes mutantes por PCR. Na primeira etapa é realizada a amplificação do *Megaprimer* contando a mutação, e na segunda etapa é realizado a PCR de amplificação do gene completo com a mutação inserida.

4.6 Deleção gênica dos fatores eIF4E

Já para geração de linhagens desprovidas com deleção única (*Single Knock-Out*) ou da deleção dupla (*Double Knock-Out*) dos genes EIF4E3, EIF4E5 e EIF4E6, foi seguido o protocolo rápido e simplificado descrito por Derbise et AL. (2003). Este protocolo utiliza pares de primers específicos para amplificar cerca de 500pb das regiões 5' e 3' UTR que flanqueiam os genes alvo a serem silenciados. Foram amplificados também genes de resistência aos antibióticos higromicina e puromicina. Posteriormente, foram realizadas reações de PCR de fusão com as regiões flanqueadoras e o gene de

resistência ao antibiótico a fim de obter o cassete de silenciamento contendo as duas regiões flanqueadoras do gene alvo fusionadas a um dos dois genes de resistência a antibiótico. As amplificações foram realizadas com enzima *Phusion* DNA Polimerase (New England Biolabs) juntamente com seu tampão específico (Figura 12).

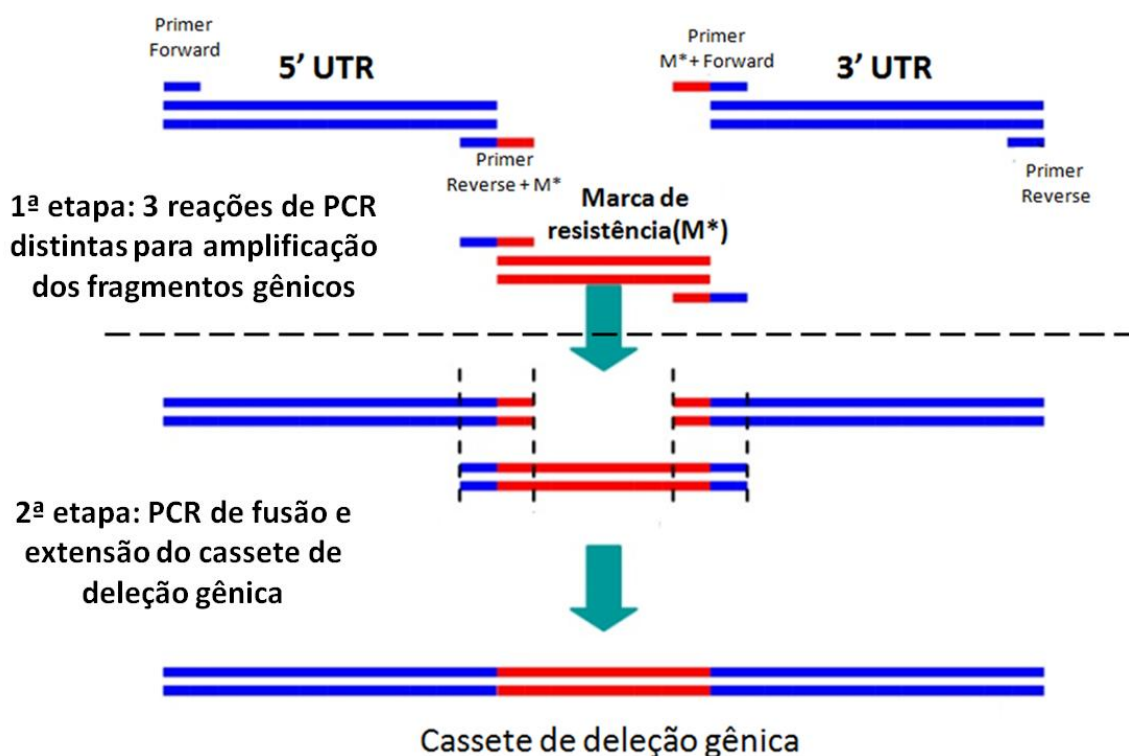


Figura 12: Estratégia de construção de cassete de deleção gênica por PCR. Na primeira etapa é realizada a amplificação dos fragmentos necessários para a construção do cassete de deleção, e na segunda etapa é realizado a PCR de sobreposição dos fragmentos e amplificação para que os fragmentos se unam para formar o cassete de deleção gênica.

As condições da reação foram otimizadas e o produto final da PCR foi clonado no plasmídeo vetor pGEM-T-Easy, como descrito acima. Os plasmídeos gerados foram então usados para transfectar as células e analisar o fenótipo do parasita mediante o silenciamento gênico. Para isso, células da forma promastigota de *Leishmania sp* mantidas em cultura foram então

transfectadas com o produto de PCR liberado do plasmídeo por digestão com *NotI* (cassete com higromicina) ou *EcoRI* (cassete com puromicina). Após a conclusão da fase de seleção, alíquotas de curvas de crescimento da cultura transfectada foram retiradas diariamente para avaliação por *Western-Blot*. As células foram também observadas e contadas para verificação de alterações morfológicas ou de viabilidade celular.

4.7 Sequenciamento de DNA

Após confirmação dos tamanhos dos insertos por digestão, todas as construções selecionadas, tanto em vetor pGEM-T-Easy dos genes para superexpressão e dos cassetes de deleção gênica como as construções em vetor pSP-BT1-YneodIR-HA foram submetidas ao sequenciamento de DNA, que foi realizado utilizando o *kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems®) e os produtos purificados com Etanol/EDTA (*Applied Biosystems*®), ambos os métodos seguindo as instruções do fabricante. Todos os clones foram analisados através do seqüenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (*Applied Biosystems*®) disponível para utilização no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do CPqAM / FIOCRUZ. Após o seqüenciamento, as sequencias obtidas foram submetidas a uma busca em bancos de dados públicos como NCBI através da ferramenta BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para verificar a integridade das seqüências.

5. Resultados

5.1 Análise da expressão nativa e superexpressão dos fatores EIF4E5 e EIF4E6

Em trabalhos anteriores realizados pelo grupo proponente foi verificada a expressão dos homólogos EIF4E3 e EIF4E4, sendo necessário realizar curvas de crescimento de células promastigotas e amastigotas de *L. infantum* selvagem para verificar os níveis e as diferenças de expressão dos homólogos EIF4E5 e EIF4E6.

Anticorpos produzidos em coelhos contra os fatores *LmEIF4E5* e *LmEIF4E6* foram gerados em trabalhos prévios. Os ensaios de *Western-Blot* mostrou a alta especificidade de cada anticorpo perante a proteína recombinante contra a qual foi produzido, não obtendo reações cruzadas.

Com estes anticorpos devidamente testados em trabalho anterior, foram feitas curvas de crescimento em *L. infantum* em sua fase promastigota e em sua fase amastigota, a fim de identificar os níveis de expressão dos fatores endógenos eIF4E5 e EIF4E6 durante o seu crescimento celular. Por comparação dos sinais obtido para a proteínas recombinantes de EIF4E5 e EIF4E6, foi possível estimar de que a concentração do EIF4E5 está entre 10^4 a 10^5 moléculas/ célula e a concentração intracelular de EIF4E6 menor que 10^5 moléculas/ célula.

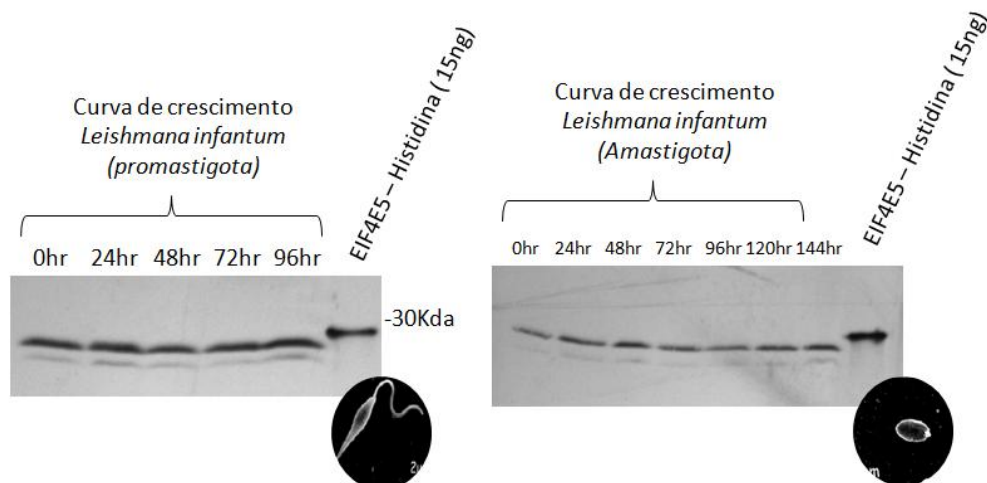


Figura 13: Western blot de curva de crescimento de *Leishmania infantum* wt contra o anti-EIF4E5. Ensaio de Western-blot representativo da curva de crescimento de *L. infantum* onde se vê que não há alteração no nível de expressão do fator EIF4E5 em ambas as fases do ciclo de vida do parasita *in vitro*.

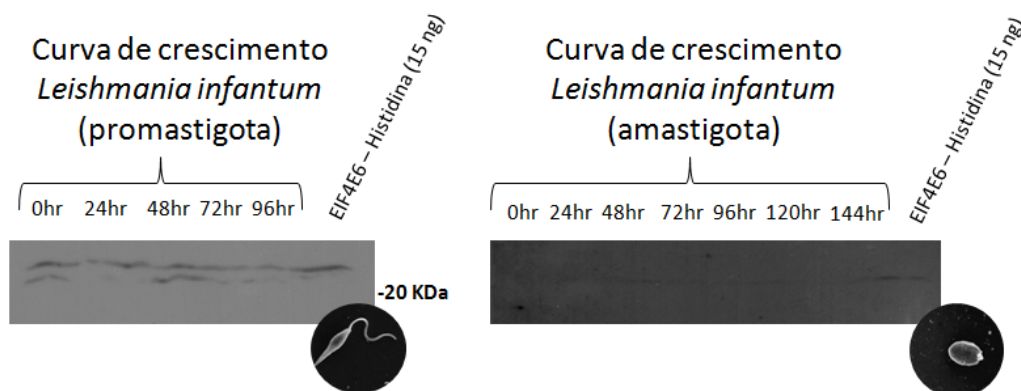


Figura 14: Western blot de curva de crescimento de *Leishmania infantum* wt contra o anti-EIF4E6. Ensaio de Western-blot representativo da curva de crescimento de *L. infantum* onde se vê que não há alteração no nível de expressão do fator EIF4E6 em ambas as fases do ciclo de vida do parasita *in vitro*.

Devido ao fato de serem expressos de forma constante em todo o ciclo celular, análise baseada na diferença de intensidade das bandas no *Western blot*, acredita-se no papel essencial que estes fatores podem estar desenvolvendo, apartir disto foram feitos ensaios de superexpressão e avaliado se há um efeito após a mudança nos níveis protéicos destes fatores.

5.1.1 Superexpressão dos genes EIF4E5-HA e EIF4E6-HA

Em trabalho anterior a este os genes EIF4E5 e EIF4E6 foram amplificados, clonados e subclonados em vetor de superexpressão pSP-BT1-Yneo α IR-HA, foi confirmada por seqüenciamento a integridades destas seqüências para que pudesse ser utilizada como ferramenta neste trabalho.

Para confirmação da superexpressão proteica, após seleção das células transfectadas com a construção de expressão pSP-BT1- Yneo α IR- EIF4E5-HA, foram realizados ensaios de *Western-Blot* utilizando anticorpos anti-HA e anti-EIF4E5 contra os extratos totais de *L. infantum* selvagem (WT) e da linhagem recombinante. Dessa forma foi possível observar a expressão ectópica da proteína EIF4E5 recombinante fusionadas ao tag de HA. (Figura 15). Foi observado preliminarmente ainda nas células superexpressando EIF4E5-HA, através da observação em microscopia de luz (aumento total de 200x), um possível fenótipo onde as células em geral se apresentavam com o comprimento diminuído.

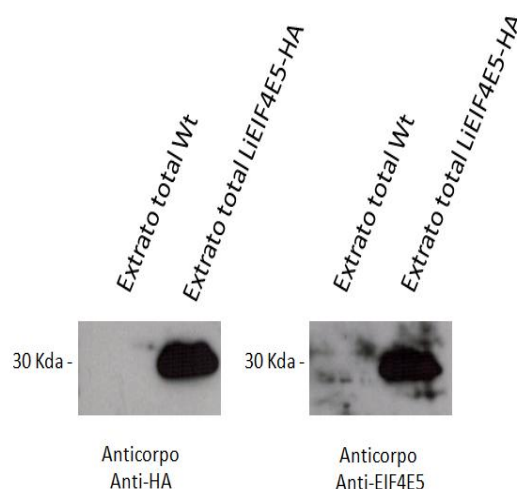


Figura 15: Confirmação de superexpressão do eIF4E5-HA. Ensaios de *Western-blot* representativos da confirmação da superexpressão da proteína EIF4E5-HA,

utilizando anticorpo monoclonal específico contra o epítipo HA e anticorpo policlonal contra a proteína EIF4E5.

Em relação ao EIF4E6 não foi possível observar se houve a superexpressão deste fator pois através dos ensaios de *Western-Blot* utilizando anticorpos anti-HA e anti-EIF4E6, contra os extratos totais de *L. infantum* selvagem e da linhagem recombinante, não foi possível a visualização da proteína nativa ou da proteína superexpressa, no caso utilizando anticorpos monoclonais anti-HA.

5.2 Construções dos cassetes de deleção gênica

Para a construção dos cassetes de deleção gênica foram amplificados as regiões 5'UTR e 3'UTR dos genes EIF4E5, EIF4E6 e EIF4E3 de *L. infantum* e EIF4E3 de *L. amazonenses* e as marcas de resistência a higromicina e puromicina (figura 16), conforme a estratégia exemplificada na metodologia.

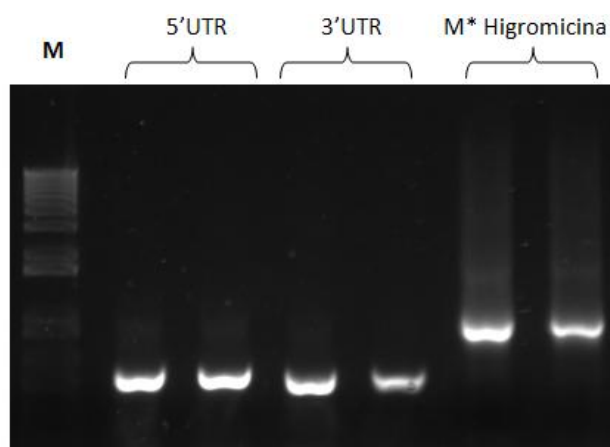


Figura 16: Amplificação dos fragmentos gênicos para construção dos cassetes de deleção gênica. Eletroforese em gel de agarose 1%, amplificação representativa, utilizando como exemplo a amplificação das UTRs do gene EIF4E5 e da marca de resistência a Higromicina.

Após a purificação destes fragmentos foi realizado a PCR de fusão para formação do cassete de deleção gênica para cada um dos genes trabalhados nesse estudo. Um total de oito construções gênicas foram geradas, sendo dois cassetes para cada gene, um com a marca de resistência a higromicina(2000pb) e outro a puromicina(1500pb) (Figura 17).

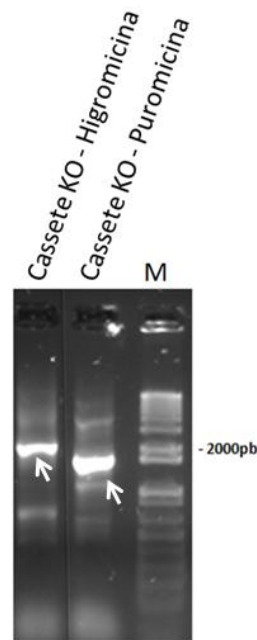


Figura 17: Amplificação do cassete de deleção gênica. Eletroforese em gel de agarose 1%, amplificação por PCR de fusão representativa, evidenciando a união dos fragmentos e formação de um cassete de deleção gênica (setas brancas) do gene EIF4E5 com as marcas de resistência a higromicina e puromicina.

Os cassetes amplificados foram purificados e clonados em vetor pGEM-T-Easy anteriormente citado, e confirmados por digestão utilizando a enzima *EcoRI* que possui sítio duplo de restrição imediatamente antes e após o sítio múltiplo de clonagem, sendo possível realizar a liberação do cassete para confirmação prévia da correta clonagem gênica. Vale salientar que o gene de resistência a higromicina também possui sítio interno de restrição para *EcoRI*

ocasionando digestão interna ao cassete de deleção que possui essa marca (Figura 18).

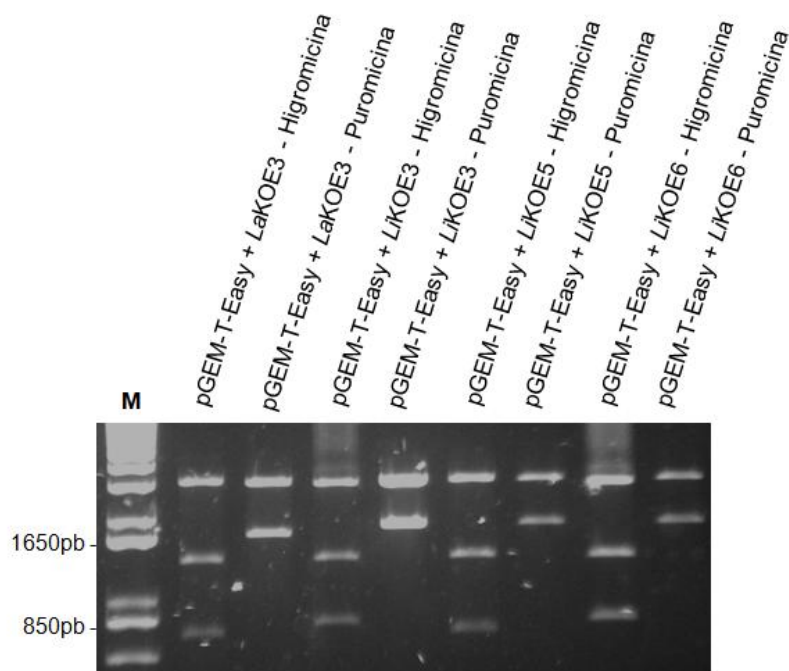


Figura 18: Digestão de confirmação dos cassetes de deleção genica. Eletroforese em gel de agarose 1%, Digestão dos plasmídeos pGEM-T-Easy com os cassetes de deleção gênica para as marcas de resistência a higromicina e a puromicina. A digestão foi realizada utilizando a enzima *EcoRI*.

Todos os cassetes gênicos também foram confirmados por sequenciamento de DNA. Após confirmação os cassetes com higromicina foram digeridos com a enzima *Not I* que libera todo o cassete de deleção gênica do plasmídeo. Da mesma forma, os cassetes de deleção com a marca de resistência a puromicina foram liberados dos respectivos plasmídeos por digestão com *EcoRI*. Os fragmentos gerados foram então purificados e transfectados em células de *Leishmania* das suas respectivas espécies (*L. infantum* e *L. amazonenses*) como descrito a seguir.

5.3 Análise da viabilidade celular de *Leishmania* na ausência dos fatores EIF4E3, EIF4E5 e EIF4E6

Todas as transfecções foram feitas sempre utilizando as mesmas concentrações de DNA, tanto o DNA linear dos cassetes de deleção gênica, quanto os DNAs plasmidiais utilizados para os ensaios de complementação. Em um primeiro momento foram selecionados transfectantes da deleção simples com a marca de resistência a higromicina. Os quatro cassetes foram eficientemente transfectados em *L. infantum* (LiEIF4E3) e *L. amazonenses* (LaEIF4E3, LaEIF4E5 e LaEIF4E6), e após a seleção pelo antibiótico, as células transfectantes selecionadas foram plaqueadas em meio Ágar-Schneider contendo o antibiótico a fim de realizar uma seleção clonal destas células.

Clones individuais foram então isolados para a realização da segunda transfeccão para se obter a deleção da segunda cópia gênica utilizando os cassetes de deleção gerados com o gene de resistência a puromicina. Durante a segunda seleção foi observado se houve a sobrevivência celular após a dupla deleção gênica. Entretanto em nenhuma das quatro condições foi possível a obtenção de transfectantes na segunda etapa de seleção, indicando que as três proteínas estudadas são essenciais para a viabilidade celular de *Leishmania*.

5.4 Ensaios de complementação com as proteínas nativas em *L. infantum* e *L. amazonensis*

Com base nos resultados obtidos inicialmente, e para se confirmar a viabilidade ou não das células de *Leishmania* na ausência dos genes em

estudo, foi necessário se utilizar a estratégia descrita abaixo na Tabela 2. Neste ensaio, após a retirada de uma cópia gênica (deleção única), as células foram então transfectadas com o plasmídeo de superexpressão com tag de HA. Após confirmada a expressão da proteína recombinante na célula foi feita uma terceira transfecção, onde colocamos o segundo cassete de deleção gênica para retirada da segunda cópia endógena do fator estudado. Em paralelo foi feito também a transfecção do segundo cassete na célula de deleção única sem o plasmídeo de expressão, onde foi esperado que se a proteína for essencial para a sobrevivência da célula a retirada da segunda cópia gênica seja letal para o protozoário, mas que sobreviverá se estiver de forma complementar o plasmídeo de superexpressão.

Tabela 2: Estratégia de transfecção para analisar a viabilidade celular frente a deleção gênica de *LaEIF4E3*, *LiEIF4E3*, *LiEIF4E5*, *LiEIF4E6*.

	Controle negativo	Controle positivo	Teste de deleção dupla	Ensaio de complementação
Célula Transfectada	<i>Leishmania</i> sp. selvagem	<i>Leishmania</i> sp. selvagem	<i>Leishmania</i> sp. SKO	<i>Leishmania</i> sp. SKO + plasmídeo de superexpressão do gene em estudo
DNA adicionado	Nenhum	Cassete de deleção com marca de resistência a Puomicina	Cassete de deleção com marca de resistência a Puomicina	Cassete de deleção com marca de resistência a Puomicina
Antibiótico de seleção	Puomicina	Puomicina	Higromicina + Puomicina	Higromicina + Neomicina + Puomicina
Fenótipo esperado	Morte celular	Sobrevivência	Morte celular se o gene for essencial	Sobrevivência, se o gene recombinante inserido estiver funcional

Além de se avaliar o fenótipo de viabilidade, foi avaliado ainda o desenvolvimento celular dos transfectantes que sobreviveram através de contagem celular em curva de crescimento em fase promastigota. Através da utilização de controles positivos e negativos é possível assegurar a confiabilidade aos ensaios. Todas as transfecções para análise de deleção gênica foram feitas em triplicata.

5.4.1 Complementação com o fator EIF4E3 de *L. infantum* e *L. amazonensis*

O fator EIF4E3 em *L. amazonensis* demonstrou ser essencial para a viabilidade celular, uma vez que na ausência desse homólogo, não houve a recuperação de transfectantes com a deleção dupla enquanto que nas células com a dupla deleção mais o plasmídeo de superexpressão houve seleção de transfectantes. De forma a avaliar se houve alteração de crescimento nas células após a recuperação dos diferentes eventos de transfecção, curvas de crescimento foram realizadas para cada uma das células geradas (Gráfico 1). Através do gráfico é comparado o crescimento da célula selvagem original utilizada nos experimentos de transfecção, a célula com a deleção única e a célula com a deleção dupla complementada com o gene em plasmídeo de expressão de forma episomal. A célula com a deleção única não apresentou nenhuma variação no seu crescimento, indicando que apenas uma cópia gênica é suficiente para suprir a ausência de uma das cópias gênicas. Da mesma forma as células complementadas com as construções plasmidiais,

seja após deleção de uma ou duas cópias do gene original, não apresentaram variação de crescimento em relação a célula selvagem.

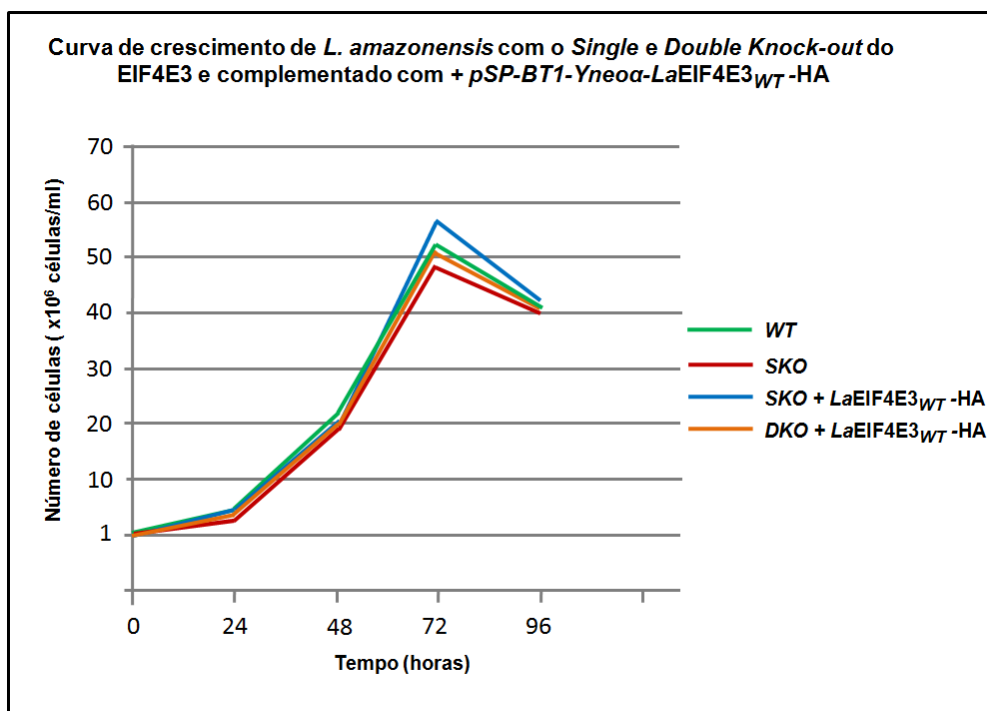


Gráfico 1: Curva de crescimento de *L. amazonensis* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com proteína selvagem. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única e/ou dupla (DKO) complementada com o gene em plasmídeo de expressão de forma epissomal (LaEIF4E3_{WT}-HA).

Em *L. infantum* também foi observado um fenótipo semelhante ao da *L. amazonensis* em relação a morte celular da célula com a deleção dupla do fator EIF4E3, e é observado que nas células com complementação na presença de deleção única ou dupla não há alteração no crescimento celular como visto em *L. amazonensis* (gráfico 2). O resultado consistente para ambas as espécies de *Leishmania* é que o EIF4E3 é essencial para a viabilidade celular do parasita.

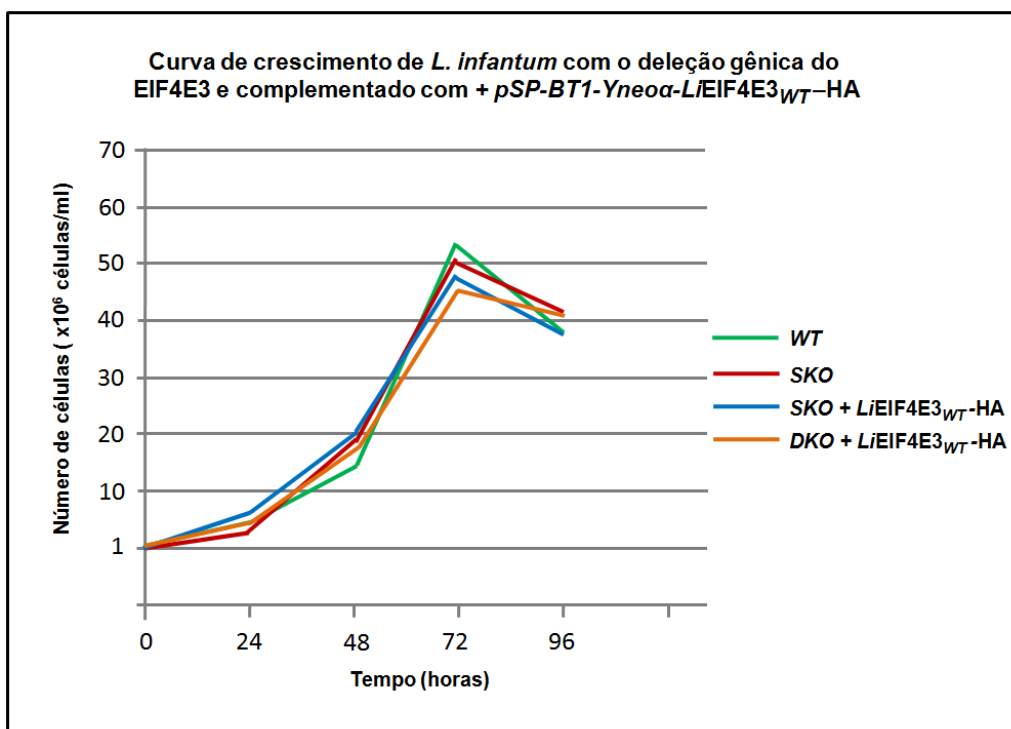


Gráfico 2: Curva de crescimento de *L. infantum* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com proteína selvagem. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única e/ou dupla (DKO) complementada com o gene em plasmídeo de expressão de forma episomal (*LiEIF4E3_{WT}-HA*).

5.4.2 Complementação com os fatores EIF4E5 e EIF4E6 de *L. infantum*

As células de *L. infantum* analisadas quanto a viabilidade celular na ausência dos fatores EIF4E5 e EIF4E6 não sobrevivem, e as células complementadas com os genes em plasmídeos de expressão, também não sobreviveram, sendo necessário mais repetições de ensaios de complementação a fim de confirmar se esses fatores são essenciais para sobrevivência da célula (Gráfico 3 e 4).

Como não foi possível detectar a presença do fator EIF4E6 com epítipo HA por *Western-Blot*, os resultados obtidos com o EIF4E6 sugerem que este

possa ser realmente essencial para a célula, mas é necessária uma confirmação da complementação da proteína nativa recombinante.

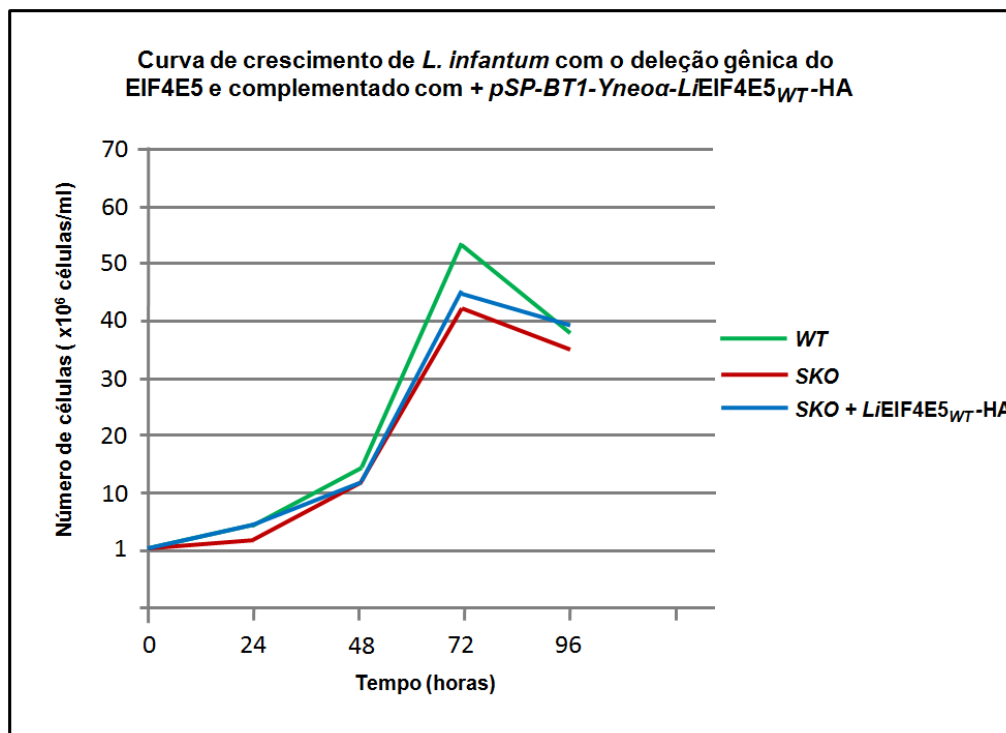


Gráfico 3: Curva de crescimento de *L. infantum* com deleção gênica do EIF4E5 e com a complementação com proteína selvagem. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única complementada com o gene em plasmídeo de expressão de forma epissomal (DKO + LiEIF4E5_{WT}-HA).

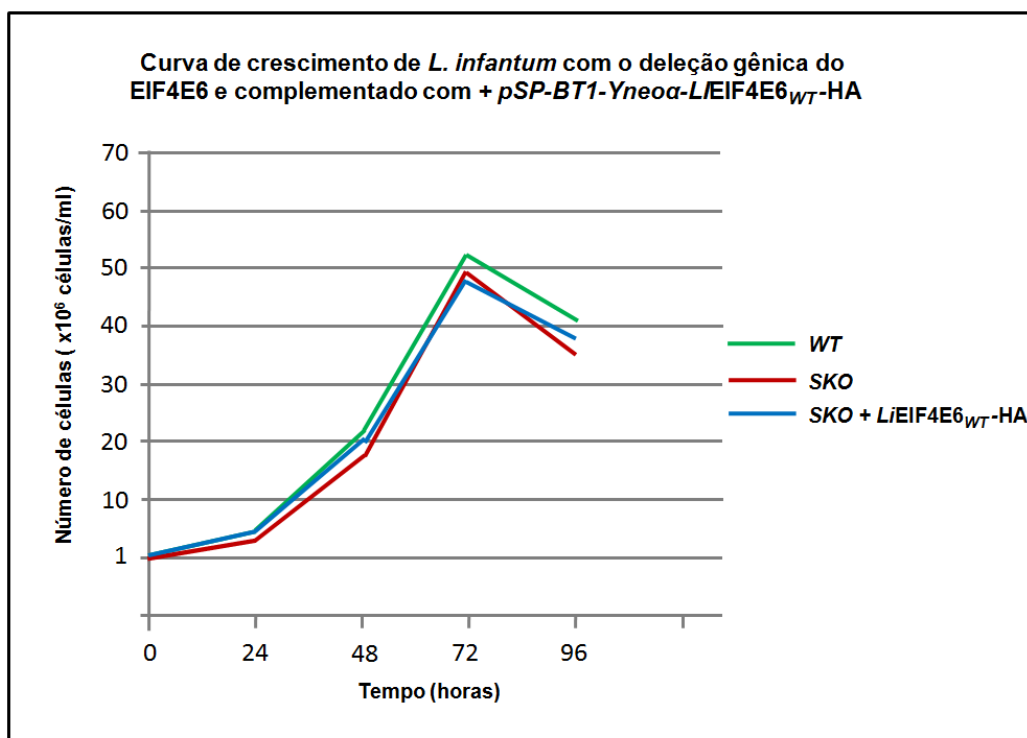


Gráfico 4: Curva de crescimento de *L. infantum* com deleção gênica do EIF4E6 e com a complementação com proteína selvagem. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única complementada com o gene em plasmídeo de expressão de forma episomal (DKO + LiEIF4E6_{WT}-HA).

5.5 Ensaios de complementação com as proteínas mutantes do fator EIF4E3 de *L. amazonensis*

Com as construções de todos os mutantes do EIF4E3 disponíveis, obtidos em trabalho anterior (MORAES, 2015), foram feitos ensaios de complementação, a fim de avaliar o efeito fenotípico que pode ser gerado por cada um dos mutantes estudados, sem a presença da proteína selvagem, e identificar quais mutações são críticas para a sobrevivência ou alteração celular. Todos os mutantes utilizados foram construídos com base em alinhamento de sequências, buscando motivos conservado e prováveis sítios de fosforilação (Figura 19). As construções dos fatores EIF4E3 mutados são: EIF4E3_{S75A} (possível sítio de fosforilação), EIF4E3_{S165A} (possível sítio de fosforilação), EIF4E3_{W187A} (sítio de ligação ao eIF4G), EIF4E3_{W216A} (sítio de ligação ao cap), EIF4E3_{BoxABC} (possíveis motivos de ligação a PABP), EIF4E3_{BoxAB}, EIF4E3_{BoxC}.



Figura 19: Alinhamento da sequência de aminoácidos do eIF4E3 em 3 espécies de *Leishmania*. Em Verde estão os motivos (Box) A, B e C. As setas em lilás indicam os triptofanos W187 e W216. Nas setas vermelhas estão indicados os sítios de fosforilação S75 e S165.

5.5.1 Complementação com mutantes em possíveis sítios de fosforilação

Os motivos S75 e S165 foram identificados na sequência do EIF4E3 de *Leishmania* por apresentarem o consenso para alvo das enzimas MAP-quinases (serinas ou treoninas seguidas de prolina), sendo o S75A exclusivo de *L. amazonensis*. A primeira complementação realizada se deu então com o mutante de fosforilação LaEIF4E3_{S75A}. A célula com deleção dupla do gene EIF4E3 e complementada com esse mutante não sobreviveu, ou seja, a proteína incapaz de ser fosforilada não pode substituir a função essencial do

EIF4E3 selvagem (Gráfico 5). Mesmo no caso da célula com deleção única do gene EIF4E3, a presença da proteína mutante pareceu induzir uma inibição do crescimento celular em comparação com a proteína selvagem ou contendo apenas uma cópia única do gene EIF4E3. Em conjunto esses resultados indicam um papel crítico para o resíduo S75 para a função do EIF4E3 de *L. amazonensis*.

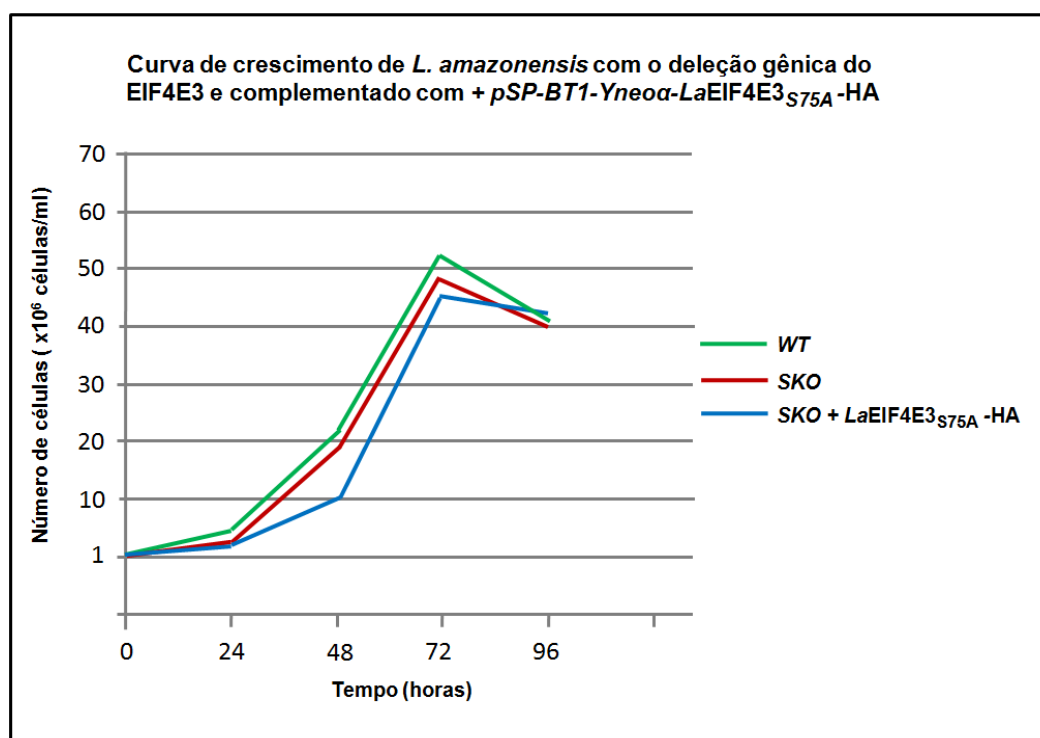


Gráfico 5: Curva de crescimento de *L. amazonensis* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante S75A. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única complementada com o gene mutante em plasmídeo de expressão de forma episssomal (LaEIF4E3_{S75A}-HA).

O mutante LaEIF4E3_{S165A}, também relacionado a fosforilação obteve um resultado diferente do anteriormente citado, a célula submetida a complementação sobrevive, desse modo a mutação no sítio de fosforilação na posição 165 não inibializa a função protéica. Entretanto, embora a célula

permaneça viva, foi possível observar que essa possui crescimento diminuído se comparado com a célula selvagem (Gráfico 6) e indicando uma função crítica, porém não essencial do resíduo S165.

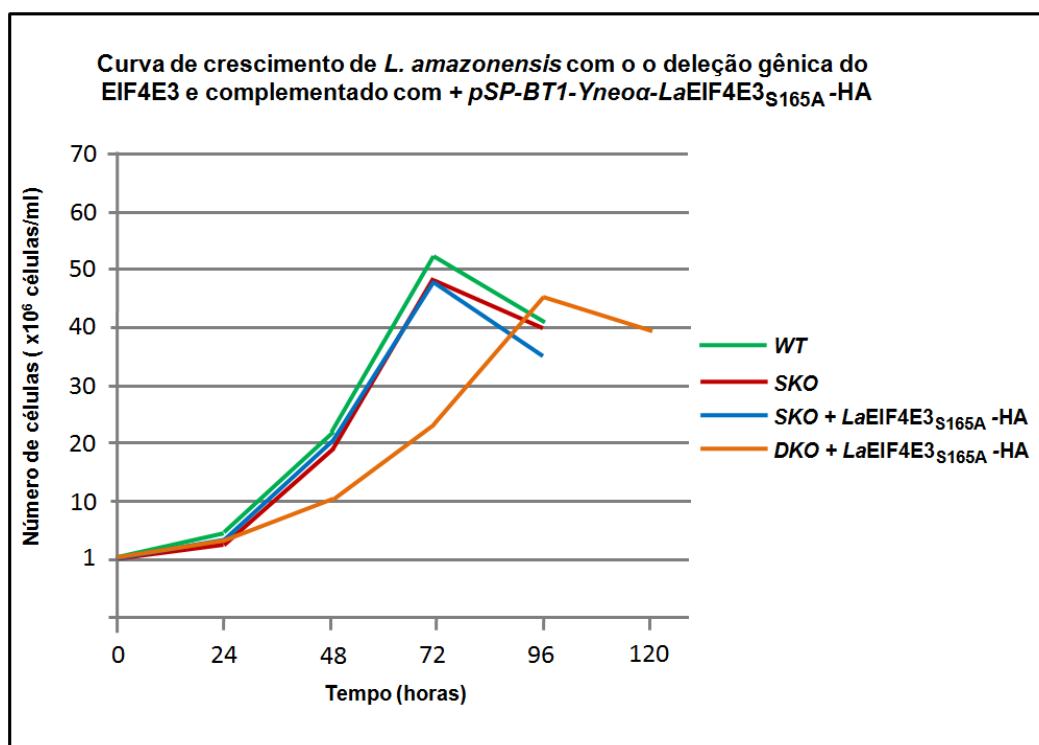


Gráfico 6: Curva de crescimento de *L. amazonensis* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante S165A. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única e/ou dupla (DKO) complementada com o gene em plasmídeo de expressão de forma episomal (*LaEIF4E3_{S165A}-HA*).

5.5.2 Complementação com mutantes em sítios de ligação e eIF4G ou ao *cap*

Os mutantes de sítios de interação com outros fatores, como o *LaEIF4E3_{W187A}*, (ligação ao EIF4G4) e o *LaEIF4E3_{W216A}* (ligação ao *cap*), mostraram ser sítios importantes para viabilidade celular pois as células complementadas com estes fatores e que sofreram a segunda deleção do gene endógeno, não sobreviveram (Gráficos 7 e 8).

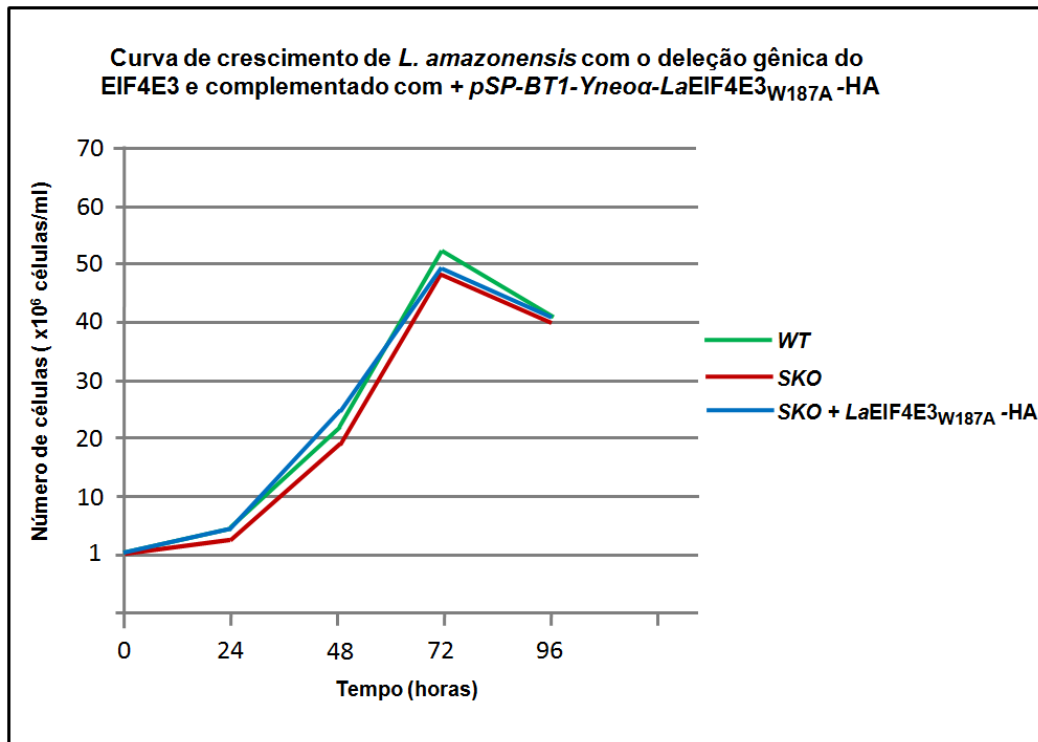


Gráfico 7: Curva de crescimento de *L. amazonensis* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante W187A. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única complementada com o gene mutante em plasmídeo de expressão de forma episomal (LaEIF4E3_{W187A}-HA).

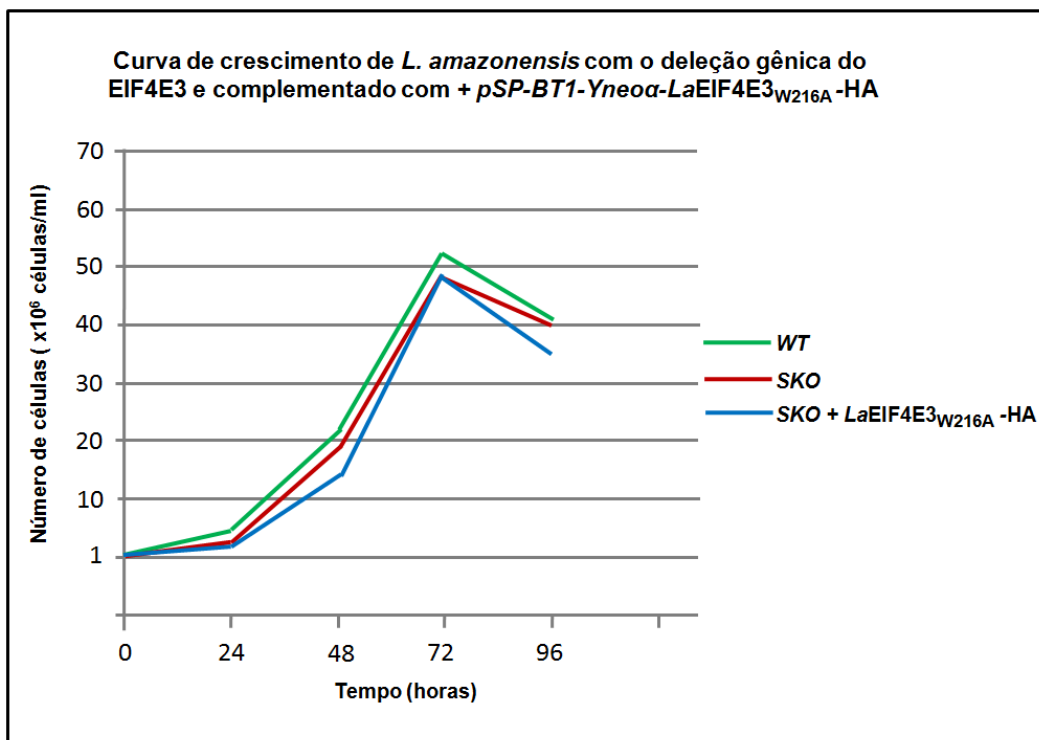


Gráfico 8: Curva de crescimento de *L. amazonensis* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante W216A. São mostradas curvas de

crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única complementada com o gene mutante em plasmídeo de expressão de forma episomal (*LaEIF4E3_{W216A}*-HA).

5.5.3 Complementação com mutantes em sítios de interação com PABP

Os mutantes que estão relacionados a ligação a PABP são, o *LaEIF4E3_{BoxABC}*, o *LaEIF4E3_{BoxAB}* e o *LaEIF4E3_{BoxC}*. Apresentaram um fenótipo interessante, devido ao fato de que os mutantes que possuem a alteração no BoxC não sobreviveram, e o mutante que possui as mutações em ambos os BoxA e BoxB sobreviveu. Estes resultados confirmam assim um papel importante do BoxC na interação com a PABP e sua necessidade para a função do EIF4E3 e manutenção da viabilidade celular de *L. amazonensis* (Gráficos 9, 10 e 11).

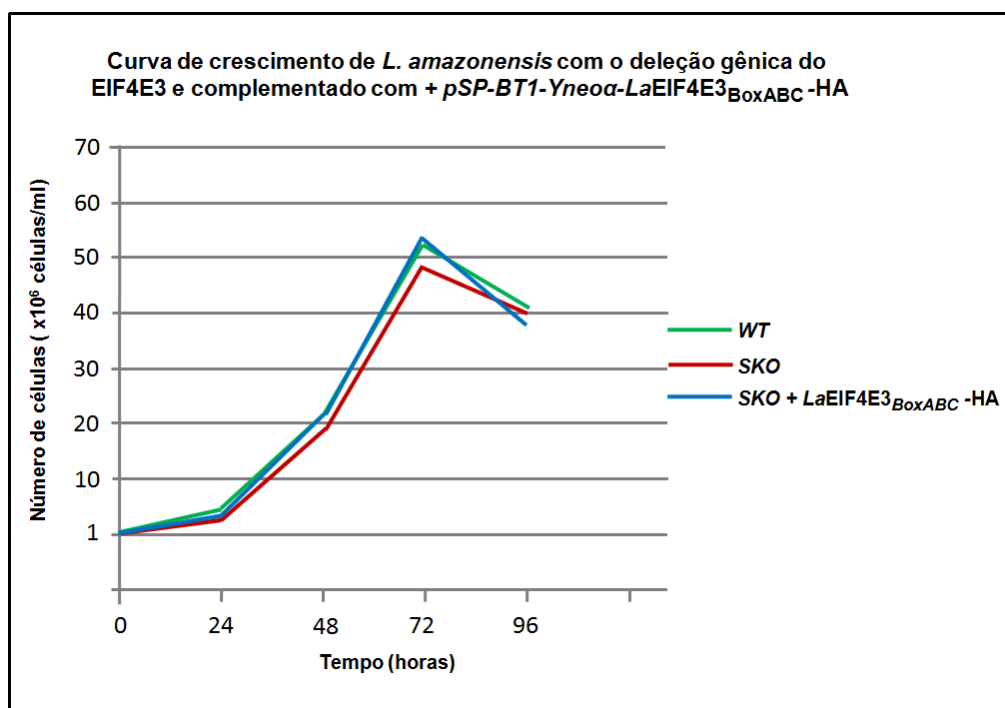


Gráfico 9: Curva de crescimento de *L. amazonensis* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante BoxABC. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única

(SKO), e após a deleção única complementada com o gene mutante em plasmídeo de expressão de forma epissomal ($LaEIF4E3_{BoxABC-HA}$).

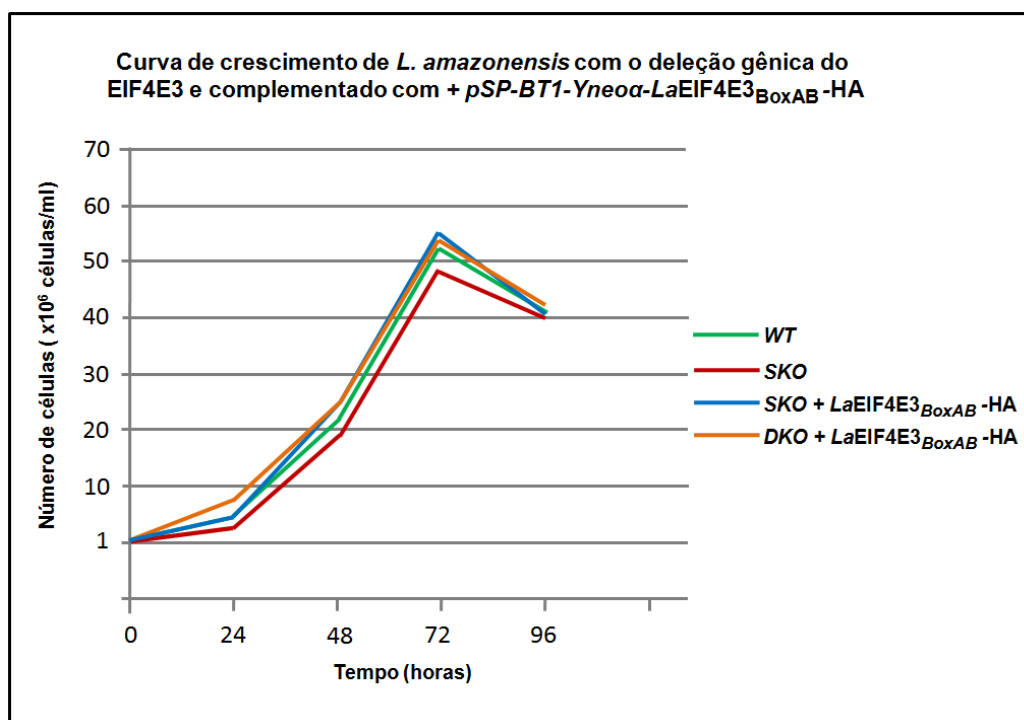


Gráfico 10: Curva de crescimento de *L. amazonensis* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante BoxAB. São mostradas curvas de crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única e/ou dupla (DKO) complementada com o gene em plasmídeo de expressão de forma epissomal ($LaEIF4E3_{BoxAB-HA}$).

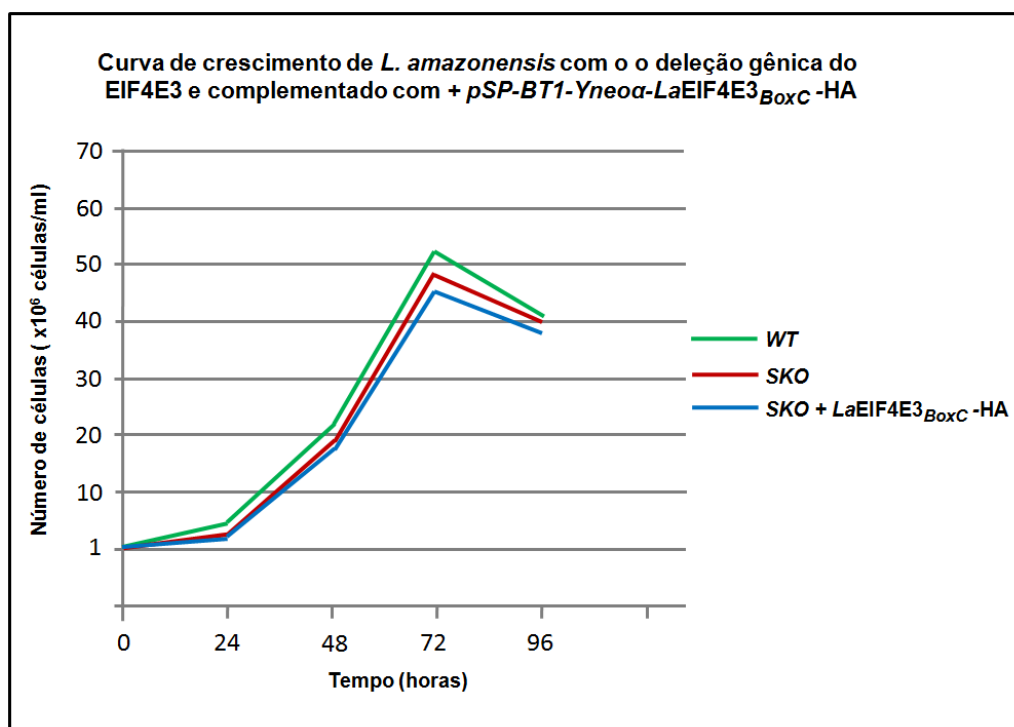


Gráfico 11: Curva de crescimento de *L. amazonensis* com deleção gênica do EIF4E3 e com a complementação com mutante BoxC. São mostradas curvas de

crescimento da forma promastigota da célula selvagem (WT), após deleção única (SKO), e após a deleção única complementada com o gene mutante em plasmídeo de expressão de forma epissomal (LaEIF4E3_{BoxC}-HA).

Portanto, com os diferentes fenótipos apresentados pelos mutantes do fator EIF4E3 (Tabela 3) podemos obter uma maior caracterização dos seus sítios de interação e fosforilação que são importantes para a função e assim a viabilidade celular.

Tabela 3: Fenótipo da complementação dos mutantes EIF4E3 em *L. amazonensis*

EIF4E3 Mutantes	Crescimento celular após deleção dupla das células complementadas
Mut S75A	Não
Mut S165A	Sim
Mut W187A	Não
Mut W216A	Não
Mut A, B e C	Não
Mut A, B	Sim
Mut C	Não

6. Discussão

Devido as características únicas apresentadas pelos tripanosomatídeos em sua biologia molecular, diferentemente dos demais eucariotos, torna-se cada vez mais importante e interessante entender como funciona a sua regulação na síntese protéica. Esta é ainda mais relevante uma vez que estes patógenos não possuem controle transcricional da sua expressão gênica e todo seu mecanismo de regulação se baseia no controle da expressão gênica ao nível pós-transcricional, na estabilidade e degradação dos mRNAs e na iniciação da tradução (JENSEN et. al.; 2009). Como o ciclo de vida destes parasitas necessita de adaptações para sua sobrevivência, os mecanismos de controle da regulação da expressão gênica se tornam ferramentas importantes para sua sobrevivência e evolução.

Portanto, com esta pesquisa, procuramos conhecer melhor o funcionamento de um fator da iniciação da tradução em tripanossomatídeos que tem um papel crucial para síntese protéica. O fator EIF4E de maneira geral tem o importante papel de se ligar a estrutura *cap* dos mRNAs lhe conferindo uma maior estabilidade e o recrutando para ser traduzido na maquinaria da síntese protéica. Neste trabalho avaliamos especificamente três de um total de seis homólogos de eIF4E que os tripanosomatídeos possuem, confirmando a importância dos três para a sobrevivência destes patógenos.

Através dos ensaios de *western blot* foi detectada uma quantidade relativamente baixa dos fatores EIF4E5 e o EIF4E6 em extrato total de células selvagens. Estes resultados indicam que estas proteínas, e em especial no caso do EIF4E6, são moléculas de baixa expressão celular, assim como foi

encontrado em trabalhos com *T. brucei* (FREIRE et. al. 2014a) e ao contrário do que foi observado para os EIF4E3 e EIF4E4, em *Leishmania* ou *T. brucei* (DHALLIA et. al., 2005; FREIRE et. al. 2014a), indicando que podem se tratar de moléculas que não necessitam estar presentes em grande quantidade para exercer sua função.

Nos ensaios de deleção gênica, ao deletar uma única cópia do gene EIF4E5, não foi possível observar nenhuma alteração no crescimento de formas promastigota em meio de cultura ou qualquer alteração morfológica. Entretanto, ao complementar esta mesma célula com um plasmídeo de expressão contendo o gene EIF4E5 selvagem, e apesar de não ter se detectado variação significativa no seu crescimento, observou-se uma modificação morfológica nas formas promastigotas. Estas continuaram fusiforme, mas o seu comprimento foi diminuído, adquirindo mais uma forma de ovalar com comprimento de 3,5 a 9 µm, flagelo de comprimento variável e maior velocidade de sedimentação, assim como visto em *T. brucei* (FREIRE et. al. 2014a). De acordo com a classificação morfológica usada para classificar estas formas (LAWYER et. al. 1990) estas células assumiriam uma forma semelhante às formas paramastigotas. Sendo assim, é importante e necessário a realização de ensaios de sedimentação e de imagens de microscopia eletrônica de varredura e de transmissão para confirmar se o fenótipo observado é realmente caracterizado pelo aumento da expressão do EIF4E5 na célula. Diferentemente do observado com o EIF4E5, não se observou alterações de crescimento ou modificações morfológicas em células que foram deletadas de uma das cópias do gene EIF4E6 e complementadas com o respectivo plasmídeo de expressão. Neste caso, entretanto nós não

conseguimos detectar a presença da proteína recombinante com tag de HA, que deveria ser produzido pela presença do plasmídeo de expressão.

Quando realizado a deleção da segunda cópia do gene EIF4E5 em células com a deleção única, as células não sobrevivem, podendo indicar que este fator seja essencial para sobrevivência da célula. Em trabalho realizado com *T. brucei*, não foi possível observar a deleção das duas cópias gênicas do EIF4E5, pois o mesmo apresentou uma terceira cópia endógena em ensaios de *Southern-Blot* (FREIRE et. al. 2014a). Mas ao utilizar a célula com a deleção única e complementada com o plasmídeo de expressão com o gene EIF4E5 para realizar a segunda deleção gênica, a célula também não sobrevive. A dupla deleção do fator EIF4E6 teve o mesmo fenótipo do fator EIF4E5, as células não sobreviveram, nem as células complementadas com o plasmídeo de expressão com o gene EIF4E6, este mesmo resultado realizado com *T. brucei* mostrou uma resistência para deleção gênica deste fator, acreditando-se que este fator também seja essencial para viabilidade celular (FREIRE et. al. 2014b).

O fato de que a segunda deleção gênica, no caso dos fatores EIF4E5 e EIF4E6, não ter funcionado mesmo em condições de complementação gênica indica uma possível interferência das regiões flangeadoras destes genes sobre o gene de resistência a antibiótico utilizado, como um dos controles dos ensaios, foi feito a transfecção do cassete de deleção gênica do EIF4E5 e EIF4E6 como marca de resistência puromicina em células selvagens, tendo estas não sobrevivido após seleção.. Ao se utilizar um antibiótico de alto impacto na seleção, o caso da puromicina, e em alta concentração, a célula não consegue se adaptar expressando o gene de resistência em quantidades

necessárias para neutralizar o efeito do antibiótico na célula. Essa possibilidade surge pelo fato do cassete de deleção gênica ser formado pelas regiões anterior e posterior dos genes de EIF4E5 ou EIF4E6 e foi comprovada a baixa expressão destas proteínas ao nível celular. É possível que seja necessário utilizar um antibiótico diferente ou diminuir a concentração do antibiótico a fim de que as células que foram transfectadas possam gerar resistência ao antibiótico.

Os ensaios de complementação e de deleção gênica do fator EIF4E3 demonstram que este fator é essencial para a sobrevivência da célula. Em relação a este homólogo, foram utilizados duas espécies de *Leishmania* para as análises de complementação e deleção gênica, a *L. amazonensis* e *L. infantum*. As células que possuem tanto só a deleção única como a célula com a deleção única complementada com o plasmídeo de expressão com o gene EIF4E3 apresentaram crescimento normal comparado as células selvagem, isto demonstra que com apenas uma cópia gênica do fator EIF4E3 não altere seu fenótipo. Nas duas espécies os resultados foram os mesmos e a essencialidade do fator EIF4E3 para a viabilidade celular foi comprovada.

Comprovada a essencialidade do fator EIF4E3, foi realizado uma análise de domínios de interação protéica e de sítios de fosforilação, a fim de identificar quais os domínios e sítios que são essenciais para a funcionalidade do fator EIF4E3, apenas nas células de *L. amazonensis*. Os sítios de interação ao fator EIF4G (W187) e o de ligação ao *cap* (W216) se mostraram essenciais para a função celular, a perda de interação com qualquer um destes através de mutações específicas fez com que as células complementadas com estes mutantes não sobrevivessem. Este resultado corrobora com o observado em *T.*

brucei, quando a depleção deste homólogos diminuiu o crescimento em meios de cultivo (FREIRE et al., 2011). É, entretanto, contrário ao observado com o EIF4E4 de *L. infantum* onde mutações equivalentes não impediriam a proteína de ser funcional (de MELO NETO et. al., 2015).

Os sítios de fosforilação nas serinas S75, S165 que foram observados em trabalho anterior (MORAES, 2015) mostraram resultados diferentes, no ensaio de complementação. O resultado com o mutante S75A tem importância, pelo fato da serina 75 ser um sítio de fosforilação comprovado que parece influenciar de forma direta na funcionalidade do fator EIF4E3 e que apenas *L. amazonensis* possui este resíduo se comparado a *L. infantum* e *L. major*. Esse sítio de fosforilação chamou a atenção pelo fato de apresentar um perfil distinto em ensaios de *Western-Blot* diferente de outras espécies (PEREIRA et. al., 2013). Os dados evidenciados neste trabalho indicam que o sítio de fosforilação no resíduo S75 de *L. amazonensis* é de vital importância na função do EIF4E3. A mutação no resíduo S165, ao contrário, mostrou que a célula sobrevive com esta mutação, mas embora a mutação neste sítio de fosforilação não inviabilize a célula, esta afeta de forma direta o seu crescimento celular.

Os Boxes A, B e C, motivos equivalentes aos observados e estudados inicialmente no homólogo EIF4E4, fazem parte de um domínio de interação a proteína PABP. No caso do EIF4E4, uma construção com mutação nos três boxes não permitiu a complementação pela proteína mutante. Já as construções com dupla mutação (A, B) ou com mutação apenas no Box C, foram eficientes no ensaio de complementação (de MELO NETO et. al., 2015). No caso do EIF4E3 avaliado aqui, o Box C se mostrou crítico para a função da proteína, e com isso podemos afirmar que a região onde está localizado o Box

C é crítica para a interação com homólogos de PABP ou outros parceiros funcionais do EIF4E3 ainda não identificado.

Os fenótipos observados nos resultados gerados neste trabalho deixam claro uma resposta gerada a deleção dos fatores estudados e a eficácia dos experimentos de complementação como experimentos de identificação e caracterização de domínios e sítios específicos importantes para a funcionalidade destas proteínas. Experimentos complementares ainda são necessários para validar vários dos resultados alcançados, como ensaios de *Southern blot* para uma maior confirmação das deleções gênicas, e outros experimentos necessitam ser repetidos para uma maior confiabilidade. As conclusões alcançadas contudo são válidas e constituem uma contribuição relevante para o conhecimento de fatores aparentemente tão críticos para o processo de tradução nos tripanosomatídeos.

7. Conclusão

- Células de *Leishmania infantum* quando submetidos a uma superexpressão do fator de iniciação da tradução EIF4E5 apresentam uma diminuição da sua motilidade celular.
- Os fatores de iniciação da tradução EIF4E5 e EIF4E6 em ensaios preliminares demonstraram ser essenciais para viabilidade celular, sendo necessário realizar novos experimentos para confirmação destes achados.
- O fator EIF4E3, bem como a interação deste com o fator EIF4G4 e a estrutura do *cap* são essenciais para viabilidade celular.
- Os resíduos de serina 75 e 165 são sítios críticos para a funcionalidade do fator EIF4E3, sendo a serina 75 essencial em *L. amazonensis*.
- O Box C, entre os motivos ABC é crítico para a viabilidade celular e função do EIF4E3, possivelmente mediado sua ligação a homólogos da proteína PABP.

8. Referências Bibliográficas

- Alencar, JE.; Dietze, R. Leishmaniose Visceral (Calazar). In: Veronesi, R. (1991) Doenças infecciosas e parasitárias. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 706-17.
- Bastin P, Pullen TJ, Moreira-Leite FF, and Gull K (2000) Inside and outside of the trypanosome flagellum: a multifunctional organelle. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 2: 1865–1874.
- Bestero, S.; William, R. A. M.; Combs, G. H.; Mottran, J. C. (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *International Journal for Parasitology*, v. 37, p. 1063–107.
- Brasil. (2006) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. Brasília: Editora do Ministério da Saúde.
- BRASIL. (2014) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral 1.ed., 5. reimpr. – Brasília.
- Campbell, DA., Thomas, S., and Sturm, N. R. (2003) Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect.* n. 5, p. 1231-1240.
- da Costa Lima, TD., Moura, DMN., Reis, CRS., Vasconcelos, JRC., Ellis, L., Carrington, M., Figueiredo, RCBQ., de Melo Neto, OP. (2010) Functional Characterization of Three *Leishmania* PABP Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. *Eukaryotic Cell* 9: 1484-1494.
- David CV and Craft N. (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatologic Therapy*, Vol. 22, 491–502.

- De Souza Ma, De França Nunes Rf, Da Costa Viana T, De Medeiros Marinho Mj, De Queiroz Moreira Pvs, Pereira Wo. (2012) Leishmaniose visceral humana: do diagnóstico ao tratamento. Rev. Cien. Saúde Nov. Esp. 2012; 10(2):61-69.
- Dhalia, R., Marinsek, N., Reis, C. R., Katz R., Muniz, J. R., Standart, N., Carrington, M., De Melo Neto, O. P. (2006) The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. Nucleic Acids Res. n. 34, p. 2495-2507.
- Dhalia, R.; Reis, C. R. S.; Freire, E. R.; Rocha, P. O.; Katz, R. ; Muniz, J. R.C. ; Standart, N.; de Melo Neto, O. P. (2005) Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 140, p. 23-41.
- Derbise, A.; Lesic, b.; Dacheux, D.; Ghigo, J. M.; Carniel, E. (2003) A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. FEMS Immunology and Medical Microbiology 38, 113-116.
- Diro, E, Lynen L, Gebregziabiher B, Assefa A, Lakew W, Belew Z, Griensven J. (2015) Clinical aspects of paediatric visceral leishmaniasis in North-west Ethiopia. Tropical Medicine & International Health, n. 1, p. 8-16.
- Fraser, C. S. (2015) Quantitative studies of mRNA recruitment to the eukaryotic ribosome. Biochimie, Jul: 114:58-71
- Freire ER, Vashisht AA, Malvezzi AM, Zuberek J, Langousis G, Saada EA, Nascimento Jde F, Stepinski J, Darzynkiewicz E, Hill K, De Melo Neto OP5, Wohlschlegel JA, Sturm NR, Campbell DA. (2014) eIF4F-like complexes formed by capbinding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. RNA. Aug;20:1272-86.
- Freire, E. R., Malvezzi, A. M., Vashisht A. A., Zuberek, J., Saada, E. A., Langousis, G., Nascimento, J. D., Moura, D., Darzynkiewicz, E., Hill, K., de Melo Neto, O. P., Wohlschlegel, J. A., Sturm, N. R., Campbell, D.

- A.. (2014) Trypanosoma brucei translation initiation factor homolog EIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. Eukaryot Cell. Jul;13(7):896-908.
- Freire, E. R.; Dhalia, R.; Moura, D. M. N.; Da Costa Lima, T. D.; Lima, R. P. ; Reis, C. R. S. ; Hughes, K. ; Figueiredo, R. C. B. Q.; Standart, N.; Carrington, M.; De Melo Neto, O. P. (2011) 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, p. 25-36.
- Gao, M., Rychlik, W. and Rhoads, R. E. (1998) Cloning and characterization of human eIF4E genes. The Journal of biological chemistry 273: 4622–4628.
- Ghedin, E.; Bringaud, F.; Peterson, J.; Myler, P.; Berriman, M.; Ivens, A.; Andersson, B.; Bontempi, E.; Eisen, J.; Angiuoli, S.; Wanless, D.; Von, A. A.; Clayton, C. And Shapira, M. (2007) Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. Mol. Biochem. Parasitol. 156: 93-101.
- Gingras, C., Raught, B. and Sonenberg, N. (1999) eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. Annual review of biochemistry 68: 913–963.
- Goodfellow IG and Roberts LO (2008) Molecules in Focus Eukaryotic initiation factor 4E Int J Biochem Cell Biol. 2008; 40(12): 2675–2680.
- Gunn A and Pitt SJ (2012) Parasitology: An Integrated Approach 1st ed. West Sussex: John Wiley & Sons.
- <http://atlasgeneticsoncology.org/Genes/EIF4EID40431ch4q23.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview>

- Jackson, R.; Hellen, C. and Pestova, T. (2010) The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 113-127.
- Jensen BC, Sivam D, Kifer CT, Myler PJ, Parsons M. (2009) Widespread variation in transcript abundance within and across developmental stages of *Trypanosoma brucei*. *BMC Genomics* 2009, **10**: 482.
- Joshi, B., Cameron, A. and Jagus, R. (2004) Characterization of mammalian eIF4E-family members. *European journal of biochemistry / FEBS* 271: 2189–2203.
- Lawyer PG, Ngumbi PM, Anjili CO, Odongo SO, Mebrahtu YB, Githure JI, Koech DK, Roberts CR. (1990) Development of *Leishmania major* in *Phlebotomus duboscqi* and *Sergentomyia schwetzi* (Diptera: Psychodidae). *Am J Trop Med Hyg* 1990; 43(1): 31-43.
- Lukes, J., Guilbride, D.L., Votypka, J., Benne, R., and Englund, P. T. (2002) Kinetoplast DNA Network: Evolution of an Improbable Structure. *Eukaryot Cell*,1(4): 495-502.
- Lukeš J, Skalický T, Týč J, Votypka J, Yurchenko V (2014). Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. *Molecular and biochemical parasitology*, 195(2), 115-122.
- Keiper, B. D., Lamphear, B. J., Deshpande, M., Jankowska-Anyszka, M., Aamodt, E. J., Blumenthal, T. and Rhoads, R. E. (2000) Functional characterization of five eIF4E isoforms in *Caenorhabditis elegans*. *The Journal of biological chemistry* 275: 10590–10596.
- Kissinger, J. C. (2006) A Tale of Three Genomes: The Kinetoplastids Have Arrived. *Trends Parasitol* 22:240-243.
- Kramer, S. and Carrington, M. (2011) Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. *TRENDS in Parasitology*, v. 27, n. 1, p. 23-30, jan.

- Marcotrigiano, J, Gingras, AC, Sonenberg, N and Burley SK (1999) Cap-dependent translation initiation in eukaryotes is regulated by a molecular mimic of eIF4G. *Molecular cell* 3: 707–716.
- Martínez -Calvillo S. *et al.* (2009) Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. ; v. 2010, p. 1-15.
- de Melo Neto, OP., da Costa Lima, TDC., Xavier, CC., Nascimento, LM., Romão, TP., Assis, LA., Pereira, MMC., Reis, CRS., Papadopoulou, B. The unique Leishmania EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required Q1 for translation initiation (2015) *RNA Biology* 12:10, 1—13.
- Moraes, RMN., (2015) Identificação de motivos relevantes para a função do fator de iniciação da tradução EIF4E3 de *Leishmania Sp.* Dissertação apresentada pelo programa de pós graduação em biociências e biotecnologia aplicadas a saúde. Centro de pesquisa aggeu magalhães, FIOCRUZ-PE
- Moura DM1, Reis CR, Xavier CC, da Costa Lima TD, Lima RP, Carrington M, de Melo Neto OP. (2015) Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol.* 2015;12(3):305-19.
- Oberer, M., Marintchev, A., Wagner G. (2005) Structural basis for the enhancement of eIF4A helicase activity by eIF4G. *GENES & DEVELOPMENT* 19:2212–2223
- Okwor I, Uzonna J. (2016) Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 15: 0408.
- Pereira, MMC., Malvezzi, AM., Nascimento, LM., da Costa Lima, TDC., Alves, VS, Palma, ML, Freire, ER., Moura, DMN, Reis, CRS, de Melo Neto, OP. (2013) The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications

associated to distinct growth phases in culture. *Molecular & Biochemical Parasitology* 190 (2013) 82– 86

Pelletier, J., Graff, J., Ruggero, D., Sonenberg, N. (2015) Targeting the eIF4F translation initiation complex: a critical nexus for cancer development. *Cancer Res.* Jan 15;75(2):250-63.

Ptushkina, M., Berthelot, K., Von Der Haar, T., Geffers, L., Warwicker, J. and McCarthy, J. E. (2001) A second eIF4E protein in *Schizosaccharomyces pombe* has distinct eIF4G-binding properties. *Nucleic acids research* 29: 4561–4569.

Rajasekaran, R., Chen, Y. P. (2015) Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. *Drug Discov Today*. 2015 Apr 29.

Rhoads, R. E., Dinkova, T. D. and Jagus, R. (2007) Approaches for analyzing the differential activities and functions of eIF4E members. *Methods in Enzymology* 429, 261–297.

Rogers GW, Richter NJ and Merrick WC (1999) Biochemical and kinetic characterization of the RNA helicase activity of eukaryotic initiation factor 4A. *The Journal of biological chemistry* 274: 12236–12244.

Rom, E., Kim, H. C., Gingras, A. C., Marcotrigiano, J., Favre, D., Olsen, H., Burley, S. K. and Sonenberg, N. (1998) Cloning and characterization of 4EHP, a novel mammalian eIF4E-related cap-binding protein. *The Journal of biological chemistry* 273: 13104–13109.

Rozendo As, Braz Lcc, Da Costa Oliveira Fj, Da Silva Almeida É, De Sousa Júnior Fc, Guimarães Jr, De Farias Nóbrega Ff. (2014) Estratégias de indução na produção de antígenos recombinantes de *Leishmania chagasi*. *Revista Saude & Ciencia online*,3(3), 174-188

- Ruud, K., Kuhlman, C., Goss, D. J. and Browning, K. S. (1998) Identification and characterization of a novel cap-binding protein from *Arabidopsis thaliana*. The Journal of biological chemistry 273: 10325–10330.
- Schmidt, G. D.; Roberts, L. S. (2009) Foundations of Parasitology. 8^a Ed. Times Mirror High Education Group, Iowa, USA, p. 659.
- Schütz. P., Mario Bumann. M., Anselm Erich Oberholzer. AE., Christoph Bieniossek. C., Hans Trachsel. H., Michael Altmann.M., Ulrich Baumann. U. (2008) Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein–protein interactions. PNAS July 15, 2008 vol. 105 no. 289564 –9569
- Simpson, A. G. ; Stevens, J. R. And Lukes, J. (2006) The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol. 22, 168-174.
- Soares-Bezerra RJ, Leon I, Genestra M.(2004) Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences vol. 40, n. 2, abr./jun.
- Sonenberg, N. and Gingras, A. C. (1998) The mRNA 5' cap-binding protein eIF4E and control of cell growth. Current opinion in cell biology 10: 268–275.
- Strudwick, S. and Borden, K. L. B. (2002) The emerging roles of translation factor eIF4E in the nucleus. Differentiation; research in biological diversity 70: 10–22.
- World Health Organization. (2015) Leishmaniasis. Fact sheet N°375. Updated February. [Acessado em maio 2015]. Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>
- www.who.int.
- www.ncbi.nlm.nih.gov

- Yanguéz, E. and Nieto, A. (2011) So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. *Virus Res.* 156(1-2): 1-12.
- Yoffe, Y., Zuberek, J. and Lewdorowicz, M. (2004) Cap-binding activity of an eIF4E homolog from *Leishmania*. *RNA*, 1764–1775.
- Zinoviev, A., Léger, M., Wagner, G. and Shapira M. (2011) A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. *Nucleic Acids Res.* 39(19):8404-15
- Zinoviev, A. and Shapira, M. (2012) Evolutionary conservation and diversification of the Translation Initiation Apparatus in Trypanosomatids. *Comparative and Functional Genomics*. ID. 813718, p. 10.

9. Currículo Lattes (os últimos 2 anos)

Gustavo Barbosa de Lima

Curriculum Vitae

Identificação

GUSTAVO BARBOSA DE LIMA

LIMA, G. B.

Formação acadêmica, Histórico escolar do Mestrado

Histórico escolar do mestrado: Conceito A

Graduação em Biomedicina pela Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Brasil.

Título: Clonagem em vetor de transfecção e análise da expressão de novos homólogos da proteína de ligação ao CAP, eIF4E (EIF4E5 E EIF4E6), de *Leishmania* sp..

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, CNPq, Brasil.

Resumo publicados em Anais de Congresso

LIMA, G. B.; MORAES, R. M. N. ; PEREIRA, M. M. C. ; NASCIMENTO, L. M. ; REIS, C. R. S. ; MELO NETO, O. P. . Multiple phosphorylation events are implicated In the regulation of the activity of a *Leishmania* homologue of the translation initiation factor EIF4E. 2015 . **23rd Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB)**

LIMA, G. B.. Super-expressão e depleção de homólogos de sub-unidades do complexo EIF4F (EIF4E5 e EIF4G1) de *Leishmania* sp.. 2014. **18ª Jornada de Iniciação Científica da Facepe.**

LIMA, G. B., **SILVA, A.**, SILVA, A. J. D., SEVERO GOMES, B . Avaliação do conhecimento básico de genética de alunos concluintes ou em conclusão do ensino médio da rede pública do estado de pernambuco. 2014. **XX Encontro de Genética do Nordeste**

LIMA, G. B., NASCIMENTO, L. M., MALVEZZI, A. M., MOURA, D. M. N., **SILVA, A.**, DE MELO NETO, O. P. Análise de expressão do fator EIF4E5 durante o ciclo de vida de *Leishmania infantum*. 2014. **XX Encontro de Genética do Nordeste**

SILVA, A., MOURA, D. M. N., LIMA, G. B., DE MELO NETO, O. P. Desenvolvimento de um repórter fluorescente para identificação de proteínas envolvidas na iniciação da síntese proteica de tripanossomatídeos. 2014. **XX Encontro de Genética do Nordeste**

Atividades didáticas

Monitoria na disciplina Engenharia Genética Experimental: do DNA a Proteína no 2º semestre/2015, oferecida pelo do Programa de Biociências e Biotecnologia em Saúde, do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, sob a coordenação do Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto. Carga horária: 16 horas

Eventos

- **23rd International Congress of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (IUBMB).** Multiple phosphorylation events are implicated In the regulation of the activity of a *Leishmania* homologue of the translation initiation factor EIF4E. 2015 . (congresso)
- **XX Encontro de Genética do Nordeste.** Desenvolvimento de um repórter fluorescente para identificação de proteínas envolvidas na iniciação da síntese proteica de tripanossomatídeos. 2014. (Encontro).