

Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

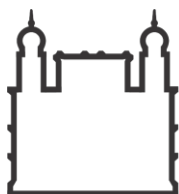
**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SEIS HOMÓLOGOS DO  
FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO eIF4E DE *Trypanosoma cruzi***

**CAMILA SAYURI TOMINAGA DA CUNHA**

**CURITIBA - PR**

**2018**



Ministério da Saúde

**FIOCRUZ**

**Fundação Oswaldo Cruz**

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS**

**Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia**

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DOS SEIS HOMÓLOGOS DO  
FATOR DE INÍCIO DE TRADUÇÃO eIF4E DE *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientadores: Dr. Bruno Dallagiovanna  
Dra. Fabíola Barbieri Holetz

**CURITIBA**

**2018**

Cunha, Camila Sayuri Tominaga da.

Caracterização molecular dos seis homólogos do fator de início de tradução eIF4E de Trypanosoma cruzi / Camila Sayuri Tominaga da Cunha. - Curitiba, 2018.

66 f.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2018.

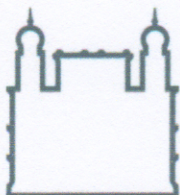
Orientador: Bruno Dallagiovanna.

Co-orientadora: Fabíola Barbieri Holetz.

Bibliografia: f. 59-66

1. Trypanosoma cruzi. 2. Tradução. 3. eIF4E. 4. Regulação gênica. I. Título.





Ministério da Saúde

**FIOCRUZ - PARANÁ**  
**Instituto Carlos Chagas**

Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de Mestre em  
Biociências e Biotecnologia.

Aos 09 dias do mês de abril de dois mil e dezoito, às 14 horas, nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos Professores: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto, Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin e Dr. Alexandre Haruo Inoue, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **Camila Sayuri Tominaga da Cunha**, intitulada: "**Caracterização molecular dos seis homólogos do fator de início de tradução eIF4E de *Trypanosoma cruzi***", sob a orientação de Bruno Dallagiovanna e co-orientação de Fabíola B.Holetz, para obtenção do grau de **Mestre** em Biociências e Biotecnologia. A candidata teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do(a) candidato(a) ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente **Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin**. Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros da banca examinadora deliberaram pela:

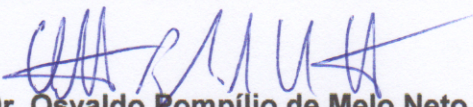
Aprovação da dissertação por unanimidade

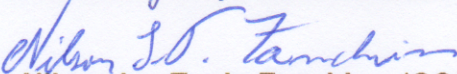
Aprovação somente após satisfazer as exigências de modificações no prazo fixado pela banca (não superior a noventa dias).

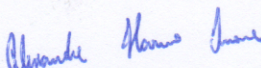
Reprovação da dissertação

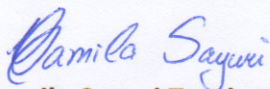
Na forma regulamentar foi lavrada a presente ata que é abaixo assinada pelos membros da banca, na ordem acima determinada, e pela candidata.

Curitiba, 09 de abril de 2018

  
Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto - CPQAM

  
Dr. Nilson Ivo Tonin Zanchin - ICC/FIOCRUZ

  
Dr. Alexandre Haruo Inoue - ICC/Fiocruz-Pr

  
Candidato(a): **Camila Sayuri Tominaga da Cunha**



*Aos meus pais, Carlos e Susana,  
por todo o apoio e amor incondicional.*

## Agradecimentos

*“We must find time to stop and thank the people who make a difference in our lives.”*

*John F. Kennedy*

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho:

A minha orientadora Dra. Fabíola B. Holetz pelo voto de confiança que me deu lá em 2012, quando me aceitou como sua aluna de iniciação científica. Por me deixar voar quando decidi fazer o “Ciências sem Fronteiras” e por me aceitar, de novo, quando voltei! Pela orientação no TCC, pelos esqueminhas que sempre me ajudaram, pela sua disponibilidade, pela animação com meus resultados quando estavam óóótimos e, principalmente, pela sua compreensão durante os momentos difíceis que passei no segundo ano de mestrado. Você foi essencial, para a minha formação, pessoal e profissional.

Ao meu orientador Dr. Bruno Dallagiovanna por toda paciência, palavras de apoio e conhecimentos por você transmitidos. Obrigada por fazer parte da minha formação e contribuir para a pessoa que sou hoje (mesmo quando você era irritante).

Aos avaliadores Dr. Helisson Faoro e Dr. Stenio Fragoso pelas críticas sempre construtivas e contribuições em todas as jornadas acadêmicas.

Aos amigos, que fiz ao longo desses anos no ICC Bruno, Sharon, Paulo, Rosiane, Willian, Janyne, Lari, Kayo, Ize, Mari, Carol, Vanessa, Rodrigo, Luis, Pati, Ju, Haruo, Pri, Jaque, Manu, Bia e Tabata pelos ensinamentos, companherismo e momentos de diversão que fizeram dos meus dias mais alegres.

Aos pesquisadores do Laboratório de Regulação da Expressão Gênica, Dr Samuel, Dra. Andrea, Dra. Sheila, Dra. Letusa, Dra. Lysangela pela disponibilidade, pelas discussões científicas e colaboração nos LabMeetings.

À Dra. Eloise por me auxiliar nos experimentos de gradiente de sacarose, sem você tudo seria muito mais complicado!

Um agradecimento especial a Ji por me abraçar nesse projeto e me ensinar as peculiaridades do dia a dia deste parasito. Obrigada por compartilhar comigo suas frustrações, mas principalmente, toda a sua alegria. Você é uma pessoa incrível!

Ao Dr. Nilson Zanchin e à Dra. Beatriz, pelas discussões de resultados e reuniões sempre enriquecedoras, espero que a colaboração entre os nossos grupos de pesquisa gere sempre muitos artigos.

Ao pessoal da plataforma de microscopia, em especial a Bia, por sempre me ajudar com as imagens de microscopia de fluorescência.

Ao pessoal do biotério por realizar toda a manipulação dos camundongos e por tratar os animais com tanto cuidado.

Ao pessoal do preparo, por facilitar sempre a nossa vida no laboratório, pela organização com os materiais e por sempre me ajudarem com as dúvidas nos preparos de soluções.

As secretárias do ICC e da pós, Cris e Raquel, por estarem sempre a nossa disposição e imprimirem meus documentos quando estava com preguiça de subir escada.

Ao meu namorado, Henrique, por todo carinho, compreensão, palavras de apoio e por acreditar no meu potencial.

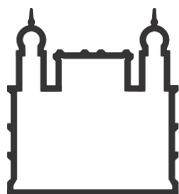
Por fim, gostaria de agradecer ao meus pais, por sempre se esforçarem ao máximo pela minha educação. Por serem os alicerces e grandes exemplos da minha vida.

**A todos,  
Muito obrigada!**



*A experiência nunca falha, apenas as nossas opiniões falham,  
ao esperar da experiência aquilo que ela não é capaz de oferecer.*

*(Leonardo da Vinci)*



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

### Caracterização molecular dos seis homólogos do fator de início de tradução

#### eIF4E de *Trypanosoma cruzi*

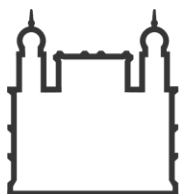
#### RESUMO

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Sayuri Tominaga Da Cunha

Nos tripanosomatídeos diferentes linhas de evidências indicam que a regulação da expressão gênica ocorre majoritariamente por mecanismos pós-transcricionais, sendo a biossíntese de proteínas, ou tradução, considerada uma etapa crítica para esta regulação. A etapa de iniciação da tradução é, sem dúvida, a mais complexa dentre todo o processo e a mais sujeita a mecanismos de regulação. Dentre as proteínas envolvidas no início da tradução, destaca-se o complexo eIF4F, formado pelas proteínas eIF4A, eIF4E e eIF4G. eIF4E parece ser o fator de início limitante e alvo de regulação na maioria dos eucariotos estudados e desta forma, presume-se que a formação de eIF4F é, em grande parte, regulada pela disponibilidade de eIF4E. Em tripanosomatídeos foi observada a ocorrência de múltiplos homólogos para as subunidades eIF4E e eIF4G, entretanto, esta multiplicidade de homólogos não é observada em outros eucariotos unicelulares, como por exemplo em leveduras. Embora existam estudos a cerca destes múltiplos homólogos em *T. brucei* e *Leishmania*, até o momento nenhuma função específica para cada homólogo foi caracterizada em *T. cruzi*, nem tampouco, foi descrito se há redundância em suas funções. Sendo assim, o objetivo desse trabalho é iniciar a caracterização molecular dos seis homólogos do fator de início de tradução eIF4E (eIF4E1-6) de *T. cruzi*. Para isto, foram produzidos anticorpos policlonais específicos para cada um dos homólogos de TcelF4E. Por ensaios de *Western blotting* foi visto que a expressão de todos os homólogos é regulada durante a metaciclo gênese. Ensaios de imunofluorescência indireta mostraram que TcelF4E1-6 possuem localização citoplasmática no parasito. Além disso, a associação de TcelF4E1-6 com polissomos foi verificada através do fracionamento de extratos de parasitos tratados com cicloheximida e puomicina em gradientes de sacarose, e sugerem funções distintas destes homólogos no processo de tradução. Os resultados obtidos poderão definir se estes fatores estão associados a mecanismos de regulação gênica únicos dos tripanosomatídeos, não encontrados nos demais eucariotos, que possam no futuro contribuir para a produção de quimioterápicos, capazes de inibir especificamente a síntese proteica destes parasitos.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, tradução, eIF4E, regulação gênica.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

## INSTITUTO CARLOS CHAGAS

### Molecular characterization of six eukaryotic translation initiation factor eIF4E

#### homologs in *Trypanosoma cruzi*

#### ABSTRACT

#### DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Camila Sayuri Tominaga Da Cunha

In trypanosomatids different lines of evidence indicate that the regulation of gene expression occurs mainly by post-transcriptional mechanisms and protein biosynthesis, or translation, is considered a critical step for this regulation. Translation initiation is a key step for the gene expression control and involves several translation initiation factors (eIFs). Among those factors is eIF4E, a subunit of the eIF4F complex that also includes eIF4G and eIF4A. The eIF4E factor appears to be the limiting start and a target factor in most eukaryotes. In this way, formation of eIF4F is presumed to be largely regulated by the availability of eIF4E. In trypanosomatids 6 eIF4E and 5 eIF4G homologues were identified, and multiple homologues have not been described in others unicellular eukaryotes, such as yeasts. Despite many studies of these multiple homologues have been described in *T. brucei* and *Leishmania*, little is known about these factors in *T. cruzi* and no specific function for each homologue has been characterized or have been described if there is redundancy in its functions. Thus, the aim of our study is to start the molecular characterization of the eIF4E factors in *T. cruzi*. Specific polyclonal antibodies against the six TcelF4E homologues were produced and the analysis by *Western blotting* of TcelF4E1-6 expression levels have shown that all homologs are regulated during metacyclogenesis. Immunofluorescence assays of wild type parasites indicated that all eIF4E homologues have a cytoplasmic localization in replicative forms of *T. cruzi*. In addition, the association of TcelF4E1-6 with polysomes was verified by the fractionation of extracts of mutant parasites treated with cycloheximide and puromycin in sucrose gradients, and the results obtained suggest different functions of these homologues in the translation process. Altogether, these approaches will provide new insights into the role of each TcelF4E protein in the translational control of gene expression in *T. cruzi* and define if these factors are associated to unique mechanisms of gene regulation of trypanosomatids, not found in other eukaryotes, which may in the future contribute to the production of chemotherapeutic agents, capable of specifically inhibiting the protein synthesis of these parasites.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*, translation, eIF4E, gene regulation.



## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....	2
FIGURA 2 – Modelo do início da tradução em eucariotos.....	6
FIGURA 3 – Complexo eIF4F.....	7
FIGURA 4 – Mapa do vetor de expressão pDEST <sup>TM</sup> 17.....	17
FIGURA 5 – Alinhamento das sequencias dos seis homólogos de eIF4E de <i>T. cruzi</i> .....	26
FIGURA 6 – Análise da expressão de TcelF4E1-6.....	28
FIGURA 7 – Perfil eletroforético da purificação das proteínas recombinantes TcelF4E1-6.....	29
FIGURA 8 – Proteínas recombinantes TcelF4E1-6 purificadas.....	30
FIGURA 9 – Ensaio de <i>Western blotting</i> para análise da especificidade dos anti-soros produzidos contra as proteínas TcelF4E1-6.....	31
FIGURA 10 – Ensaio de <i>Western blotting</i> para análise da especificidade dos anti-soros produzidos contra a proteína TcelF4E3.....	32
FIGURA 11 – Análise da expressão dos fatores de início de TcelF4E1-6 na metacicloênese.....	34
FIGURA 12 – Localização subcelular de TcelF4E1-6 nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	36
FIGURA 13 – Localização subcelular de TcelF4E1 ao longo da metacicloênese in vitro de <i>T. cruzi</i> .....	38
FIGURA 14 – Localização subcelular de TcelF4E4 ao longo da metacicloênese in vitro de <i>T. cruzi</i> .....	39
FIGURA 15 – Análise da associação do homólogo TcelF4E1 a polissomos.....	41
FIGURA 16 – Análise da associação do homólogo TcelF4E2 a polissomos.....	42
FIGURA 17 - Análise da associação do homólogo TcelF4E3 a polissomos.....	43
FIGURA 19 – Análise da associação do homólogo TcelF4E5 a polissomos.....	44
FIGURA 20 – Análise da associação do homólogo TcelF4E6 a polissomos.....	45
FIGURA 21 – Co-localização de TcelF4E5 e TcelF4E6 com a proteína de grânulos TcDHH1 em parasitos tratados com puromicina.....	46
FIGURA 22 – Análise da associação do homólogo TcelF4E5 a polissomos em parasitos sob estresse nutricional.....	47

FIGURA 23 – Análise da associação do homólogo TcelF4E6 a polissomos em parasitos sob estresse nutricional .....	48
FIGURA 24 – Análise da associação de TcelF4E4 a polissomos.....	49
FIGURA 25 – Co-localização dos parasitos transfectantes expressando os homólogos TcelF4E1-4 com a etiqueta GFP e DHH1 .....	50

## LISTA DE ABREVIATURAS

BALB/c – Bagg-Albino C

BCIP – 5-Bromo 4-cloro 3-indolil fosfato

BLAST – Ferramenta de comparação de sequências em bancos de dados (*Basic Local Alignment Search Tool*)

BSA – Albumina sérica bovina

CEUA – Comissão de ética no uso de animais

COBALT – Ferramenta de alinhamento múltiplo com restrição (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*)

DAPI – 4'-6-Diamidino-2-fenilindol

DEAE – Dietilaminoetil celulose

DNA – Ácido desoxirribonucleico

eIF – Fator de iniciação em eucarioto (*Eukaryotic initiation factor*)

FIOCRUZ – Fundação Instituto Oswaldo Cruz

GAPDH – Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GFP – Proteína verde fluorescente (*Green fluorescent protein*)

GTP – Guanosina 5'-trifosfato

ICC – Instituto Carlos Clagas

IgG – Imunoglobulina G

IPTG – Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosídeo

IRES – Sítio de entrada ribossomal interno (*Internal ribosome entry site*)

kDNA – DNA do cinetoplasto

LB – Meio Luria-Bertani

LIT – Meio de infusão de fígado e triptose (*Liver infusion tryptose*)

m<sup>7</sup>G cap – Cap 7-metilguanosina

mTOR – Alvo de rapamicina em mamíferos (*Mammalian target of rapamycin*),

mRNA – RNA mensageiro

NBT – Nitroblue tetrazolium

NCBI – *National Center for Biotechnology Information*

nt – Nucleotídeos

PABP – Proteína de ligação a poli-A

PBS – Solução salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)

PIC – Complexo de pré-iniciação 43S

PMSF – Fluoreto de fenilmetilsulfonil



RNA – Ácido ribonucleico  
RNAi – interferência de RNA  
RNPs – Ribonucleoproteínas  
SDS – Dodecil sulfato de sódio  
SDS-PAGE – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS  
SFB – Soro fetal bovino  
SL – Sequência líder (*Spliced leader*)  
TAU – Meio urina artificial de triatomíneo (*Triatomine artificial urine*)  
TRIS – Tris-hidroximetil aminometano  
tRNA – RNA transportador  
Tween 20 – Monolaurato de polioxietileno (20) sorbitana  
UTR – Região não traduzida (*Untranslated region*)

## LISTA DE SÍMBOLOS

% – Porcentagem  
°C – Grau Celsius  
 $g$  – Aceleração da gravidade  
g – Gramas  
kDa – KiloDalton  
L – Litros  
 $\mu$  – Micro  
 $\mu\text{g}$  – Micrograma  
 $\mu\text{L}$  – Microlitro  
 $\mu\text{m}$  – Micrômetro  
M - Molar  
mA – Mili Ampere  
mg - Miligrama  
mL – Mililitro  
mM – Milimolar  
ng – Nanograma  
nm – Nanômetro  
pb – Pares de bases  
pH – Potencial hidrogeniônico  
RPM – Rotações por minuto  
U – Unidade  
V – Volt

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1	EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	2
1.1.1	Organização genômica	2
1.1.2	Transcrição policistrônica	3
1.1.3	Regulação da expressão gênica	3
1.2	TRADUÇÃO EM EUCARIOTOS	4
1.2.1	Complexo eIF4F	5
1.2.2	Regulação da tradução	7
1.2.3	Complexo eIF4F de tripanosomatídeos	8
1.2.3.1	<i>Trypanosma brucei</i>	9
1.2.3.2	<i>Leishmania</i>	10
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b>	<b>12</b>
2.1	OBJETIVO GERAL	12
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>13</b>
3.1	LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO	13
3.2	SOLUÇÕES E TAMPÕES	13
3.3	MEIOS DE CULTURA	14
3.3.1	Meio LB ( <i>Lysogeny Broth</i> )	14
3.3.2	Meio LIT ( <i>Liver Infusion Tryptose</i> )	14
3.3.3	Meio TAU ( <i>Triatomine Artificial Urine</i> )	14
3.3.4	Meio TAU3AAG	14
3.4	MICROORGANISMOS	15
3.4.1	<i>Escherichia coli</i>	15
3.4.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> clone Dm28c	15
3.4.2.1	Epimastigotas	15
3.4.2.2	Epimastigotas sob estresse nutricional	15
3.4.2.3	Tripomastigotas metacíclicos	16
3.5	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES	16
3.5.1	Identificação dos seis homólogos de eIF4E de <i>T. cruzi</i>	16
3.5.2	Clonagem dos genes em vetores do sistema <i>Gateway</i>	17
3.5.3	Expressão e purificação das proteínas recombinantes	17

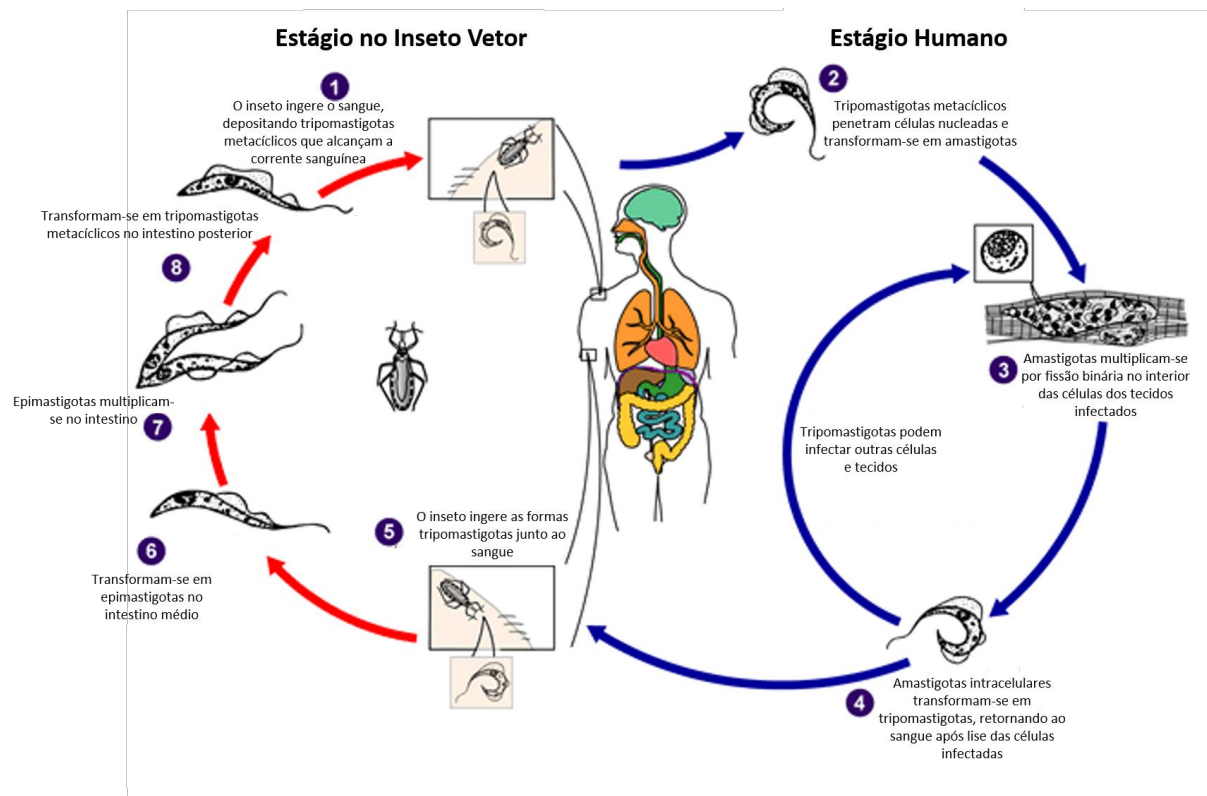
3.6	PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS .....	19
3.6.1	Obtenção dos anticorpos policlonais anti-TcelF4E1-6 .....	19
3.6.2	Purificação dos anticorpos policlonais .....	20
3.7	ANÁLISE DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DOS SEIS HOMÓLOGOS DE eIF4E DURANTE A METACICLOGÊNESE <i>IN VITRO</i> .....	21
3.7.1	Obtenção do extrato proteico de <i>T. cruzi</i> e análise por <i>Western blotting</i> .....	21
3.7.2	Ensaio de localização celular por imunofluorescência indireta .....	22
3.8	ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES TcelF4E1-6 NAS FRAÇÕES POLISSOMAS E/OU NÃO POLISSOMAS EM GRADIENTE DE SACAROSE ...	23
3.8.1	Quantificação dos homólogos de eIF4E de <i>T. cruzi</i> nas frações do gradiente de sacarose .....	24
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>25</b>
4.1	IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE .....	25
4.2	INDUÇÃO, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES .....	27
4.2.1	Indução e expressão das proteínas TcelF4E1-6 .....	27
4.3	OBTENÇÃO DOS SOROS POLICLONAIS .....	30
4.4	ANÁLISE DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DOS FATORES DE INÍCIO DE TRADUÇÃO TcelF4E1-6 AO LONGO DA METACICLOGÊNESE .....	33
4.4.1	Os fatores de início de tradução TcelF4E1-6 são regulados ao longo da metaciclogênese <i>in vitro</i> .....	33
4.4.2	Os fatores de início de tradução TcelF4E1-6 estão localizados no citoplasma do parasito .....	34
4.4.3	Localização celular da proteína TcelF4E1 ao longo da metaciclogênese 37	
4.4.4	Localização celular da proteína TcelF4E4 ao longo da metaciclogênese 38	
4.5	ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS HOMÓLOGOS DE TcelF4E COM POLISSOMOS .....	40
4.5.1	O fator de início de tradução TcelF4E4 migra com os polissomos e o monômero ribossomal 80S em parasitos selvagens. ....	49
4.5.2	Os fatores de início de tradução TcelF4E1-4 possuem co-localização parcial com a proteína DHH1 em parasitos transfectantes .....	50
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>51</b>

<b>6 CONCLUSÕES .....</b>	<b>57</b>
<b>7 PERSPECTIVAS .....</b>	<b>58</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* é o protozoário causador da Doença de Chagas (Chagas, 1909), uma doença grave, que afeta aproximadamente 8 milhões de pessoas e que causa cerca de 10.000 mortes por ano, principalmente na América Latina (WHO, 2018). Atualmente, 70 milhões de pessoas encontram-se em risco e menos de 1% das pessoas infectadas possuem acesso ao diagnóstico e tratamento da Doença de Chagas (DNDi, 2018). Em 1907 o médico sanitário Carlos Justiniano Ribeiro Chagas, identificou o *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e em 1909 publicou o trabalho intitulado “Nova tripanozomíase humana” em que descreveu a infecção do homem, a morfologia do parasito no sangue periférico, o seu ciclo no tubo digestivo do vetor e a transmissão ao vertebrado por flagelados do tubo digestivo de triatomíneos infectados. Eucarioto unicelular e uniflagelado, o *T. cruzi* está inserido no reino **Protozoa**, na ordem **Kinetoplastida** e família **Trypanosomatidae** (Adl et al., 2012). Este parasito apresenta um ciclo de vida complexo na natureza e possui quatro estágios principais ao longo do ciclo de vida, alternando-se entre um hospedeiro intermediário, o barbeiro, um inseto hematófago, e um hospedeiro definitivo mamífero (Figura 1). As formas replicativas epimastigotas e amastigotas são encontradas nos hospedeiros invertebrados e mamíferos, respectivamente, alternando-se com as formas infectivas não proliferativas tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas (De Souza, 1984). A alternância de morfologia e funcionalidade distintas entre as formas de vida do *T. cruzi* implica que o parasito seja capaz de expressar diferentes genes ao longo do ciclo de vida indicando a importância da regulação de sua expressão gênica. A falta de vacinas efetivas e a utilização de drogas altamente tóxicas para o tratamento da Doença de Chagas leva a comunidade científica a estudar mais profundamente este parasito.





**FIGURA 1 – Ciclo de vida do *T. cruzi*.** (Fonte: Adaptado de [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx)).

## 1.1 EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

### 1.1.1 Organização genômica

O genoma de *T. cruzi*, assim como nos demais organismos eucariotos, apresenta-se no núcleo e na mitocôndria. Nos tripanosomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, uma vez que o DNA mitocondrial é constituído de uma complexa rede de moléculas circulares, em que mini e maxicírculos concatenados formam o cinetoplasto (kDNA), contribuindo com até 30% do genoma do parasito (Brenner, 1997; Franco da Silveira, 2000). Quanto ao genoma nuclear, os genes codificadores de proteínas são organizados em unidades policistrônicas, dispostos consecutivamente na mesma fita de DNA (Martínez-Calvillo et al., 2009). Dentre as diferentes cepas de *T. cruzi*, pode-se variar a quantidade de cromossomos e o conteúdo do DNA (Henriksson et al., 1996).

### 1.1.2 Transcrição policistrônica

Os tripanosomatídeos apresentam características biológicas peculiares que os tornam importantes modelos de estudo para questões biológicas básicas. Por exemplo, com raras exceções, os genes não possuem íntrons e são separados por espaçadores intergênicos curtos. Até o momento, não são conhecidos promotores definidos para a RNA polimerase II, e os genes codificadores de proteínas de diferentes vias metabólicas são transcritos em uma molécula de RNA policistrônico. O início da transcrição pela RNA polimerase II pode ser bidirecional e ocorre nas regiões marcadas pela presença de modificações ou variantes de histonas específicas (Vanhamme & Pays, 1995; Belli, 2000). As moléculas de pré-mRNAs sofrem processamento via *trans-splicing* e poliadenilação no núcleo, gerando unidades monocistrônicas estáveis e traduzíveis (Clayton, 2016; Vanhamme & Pays, 1995). Portanto acredita-se que grande parte da regulação da expressão gênica ocorra em nível pós-transcricional, envolvendo a estabilidade e tradução de mRNAs (Ouellete & Papadopoulou, 2009; Clayton & Shapira, 2007; Holetz et al., 2010; Kramer, 2012).

No processamento por *trans-splicing* o precursor policistrônico é quebrado, e uma sequência conservada, espécie-específica, de 39 nucleotídeos (nt) denominada sequência líder (SL) ou mini-éxon é adicionada a extremidade 5'-UTR de cada unidade monocistrônica clivada. Nos tripanosomatídeos, a sequência líder possui uma estrutura modificada do *cap*, que consiste no *cap* clássico m<sup>7</sup>GTP adicionado de modificações nos primeiros quatro nucleotídeos transcritos, sendo assim chamado de *cap4* (Bangs et al., 1992; Michaeli, 2011).

### 1.1.3 Regulação da expressão gênica

Os tripanosomatídeos possuem características em nível de regulação da expressão gênica peculiares quando comparados com outros organismos eucariotos. A transcrição policistrônica, o processamento do pré-mRNA via *trans-splicing* e a ausência de promotores canônicos para a RNA polimerase II, indicam que a expressão gênica é regulada majoritariamente por mecanismos pós-transcricionais. Sendo assim, acredita-se que os tripanosomatídeos compensem a falta de mecanismos de controle transcricional utilizando outras formas de controle essenciais para a expressão diferencial dos genes ao longo do ciclo de vida. Dentre esses mecanismos podemos destacar, o controle de processamento e estabilidade do

mRNA, bem como o controle da tradução de mRNAs (Ouellete & Papadopoulou, 2009; Clayton & Shapira, 2007; Holetz et al., 2010; Kramer, 2012; Zinoviev & Shapira, 2012).

## 1.2 TRADUÇÃO EM EUCARIOTOS

A regulação da expressão gênica em organismos eucariotos pode ocorrer em diferentes níveis, incluindo a tradução de mRNAs em proteínas. Quando comparada com a regulação transcricional, o controle da tradução de mRNAs permite mudanças mais rápidas em relação a concentração de proteínas nas células e também pode ser utilizada para manter a homeostase, modulando mudanças mais permanentes na fisiologia celular (Sonenberg & Hinnebusch, 2009).

A tradução em eucariotos pode ocorrer por duas vias, a via *cap*-independente – que ocorre principalmente quando a célula é submetida a diferentes tipos de estresse por mecanismos ainda pouco conhecidos – e a *cap*-dependente, responsável pela tradução global da célula. O processo de tradução nos eucariotos é complexo, sendo controlado com o auxílio de inúmeras proteínas e permitindo que as células tenham uma resposta rápida a sinais intra e extracelulares. Dentre as quatro etapas principais que envolve o processo de tradução *cap*-dependente, o início, alongação da proteína, a terminação da tradução e a reciclagem dos fatores, o primeiro é o mais complexo e envolve o maior número de proteínas (revisado por Freire et al., 2017a).

A etapa de iniciação da tradução abrange todos os processos que precedem a formação da primeira ligação peptídica, sendo assim, a etapa mais sujeita a mecanismos de regulação, além de ser aquela que mais varia entre diferentes grupos taxonômicos (Marintchev & Wagner, 2004; Jackson et al., 2010). Grande parte da iniciação da tradução depende da ação de proteínas denominadas de Fatores de Iniciação (eIFs – eukaryotic initiation factors – em eucariotos) que auxiliam as subunidades ribossomais, em especial a subunidade menor 40S, em várias atividades desde o recrutamento do tRNA iniciador até a montagem do ribossomo completo junto ao códon AUG para iniciar a tradução (Figura 2). Pertencente aos fatores de início da tradução, três principais complexos podem ser destacados, o complexo eIF4F, o complexo eIF2 e o complexo eIF3. O complexo eIF4F (Figura 3), o qual é formado pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G, é um dos principais responsáveis pelo reconhecimento do mRNA pelo ribossomo, principalmente pela interação direta do

eIF4E com a estrutura *cap* presente nos mRNAs maduros (Gingras, Raught, Sonenberg, 1999).

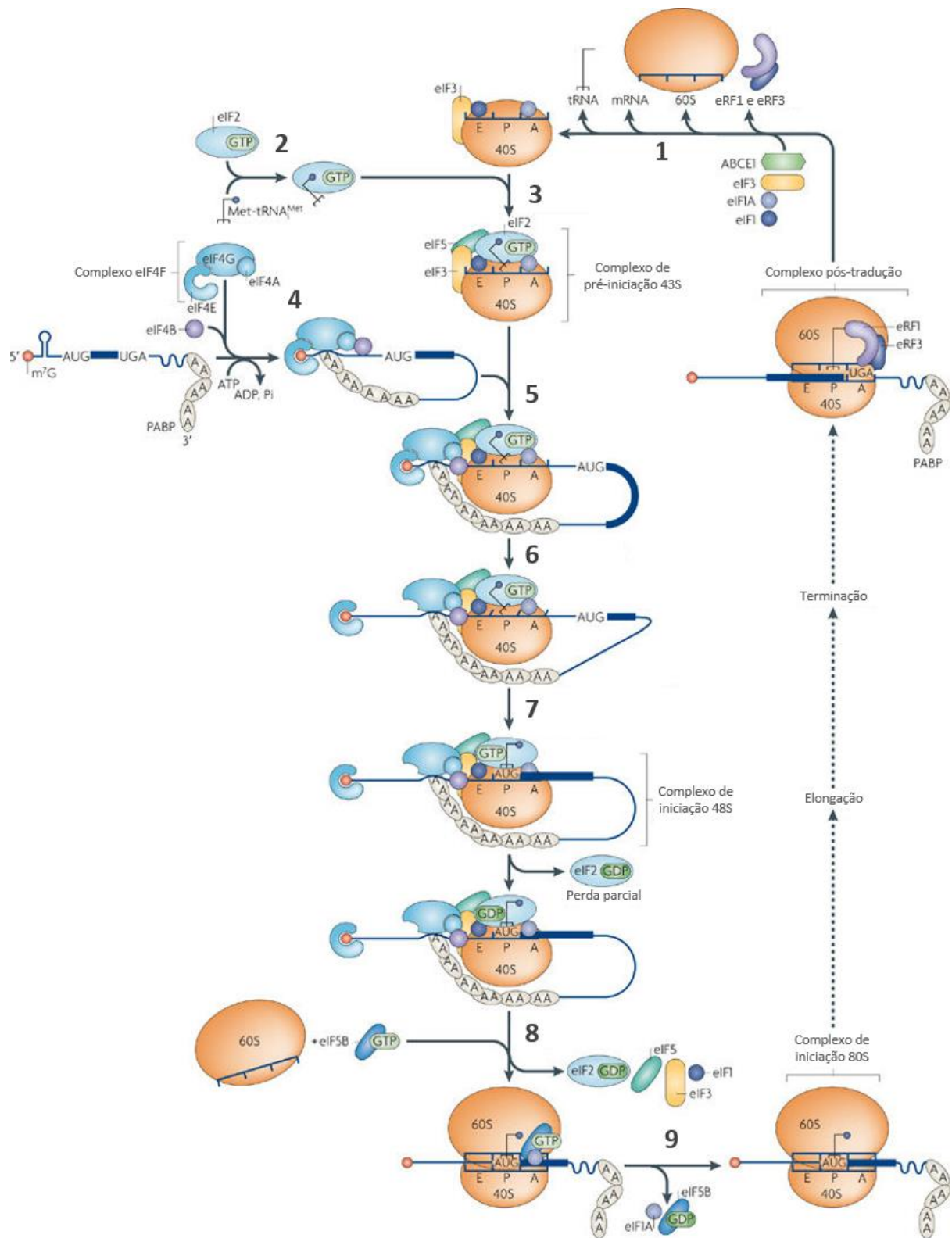
Já no complexo de pré-iniciação 43S, estão presentes os fatores eIF1, eIF1A, o complexo ternário eIF2 – formado pelo fator eIF2, o tRNA iniciador carregando o aminoácido metionina e uma molécula de GTP – e o complexo eIF3 responsável por recrutar a subunidade ribossomal 40S. Esses dois complexos interagem via ligação à proteína eIF4G e iniciam o escaneamento da região 5'-UTR até localizar o códon de início de tradução, recrutando a subunidade ribossomal 60S e formando o complexo de iniciação 80S. Nesta etapa, ocorre a participação dos fatores eIF5B e eIF6, que liberam grande parte dos fatores de tradução do ribossomo maduro. A próxima etapa consiste na síntese proteica seguida da terminação e liberação da proteína recém-sintetizada. Por fim, ocorre a dissociação das subunidades ribossomais e a reciclagem dos fatores (revisado por Freire et al., 2017a).

### 1.2.1 Complexo eIF4F

Como mostrado na Figura 3, o complexo eIF4F, foco deste trabalho, é formado pelas subunidades eIF4E – proteína de interação ao *cap*, eIF4A – RNA helicase e a proteína “suporte” eIF4G, interagindo primeiramente com o mRNA via ligação direta do fator eIF4E ao *cap*. Sendo assim, acredita-se que a formação do complexo eIF4F é regulada principalmente pela disponibilidade de eIF4E (Gingras et al., 1999; Jackson et al., 2010).

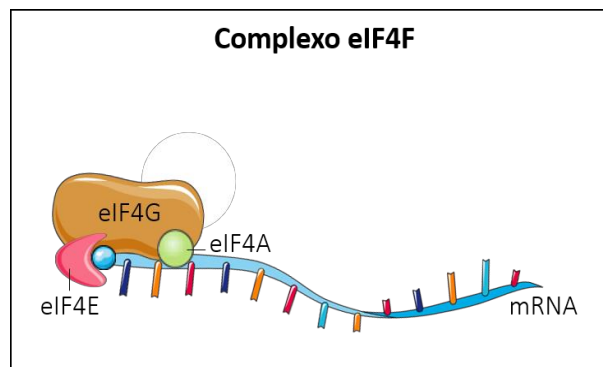
A subunidade eIF4A auxilia no escaneamento do mRNA devido sua função de RNA helicase, no entanto sua atividade também depende de um segundo fator de início de tradução, eIF4B (Methot et al., 1994).

A subunidade eIF4G, além de permitir a interação entre as subunidades do complexo eIF4F e com o PIC 43S, também é responsável pela circularização do mRNA via interação com a proteína de ligação à cauda poli-A (PABP), aproximando as regiões 3'-UTR e 5'-UTR, promovendo ao processo de tradução a estabilidade do transcrito (Mazumder et al., 2003; Thompson & Gilbert, 2017).



**FIGURA 2 – Modelo do início da tradução em eucariotos.** A tradução nos organismos eucariotos divide-se em 9 estágios (1-9). Após a reciclagem dos complexos pós-tradução (1), inicia-se a formação do complexo ternário eIF2 (2) e do complexo 43S (3). O mRNA é ativado após a ligação do complexo eIF4F (4), seguida da ligação do complexo de pré-iniciação 43S (5) e o escaneamento do mRNA no sentido 5'-3' (6) até o reconhecimento do códon de iniciação AUG, hidrólise da GTP ligada a eIF2 e liberação de fosfato (7). Após a montagem do complexo de iniciação 48S, ocorre a ligação da subunidade ribossomal 60S e dissociação dos fatores (8), seguida da hidrólise de eIF5B ligada a GTP e liberação de eIF5B e eIF1A (9). O resultado é a formação do complexo de iniciação da tradução 80S, permitindo a elongação da proteína e, por fim, terminação da tradução (Adaptado de Jackson et al., 2010).

Diversos organismos eucariotos possuem mais de um homólogo de eIF4E, mas nem todos estão envolvidos no processo de tradução. Uma análise filogenética realizada com os homólogos de eIF4E presente em diversos organismos permitiu a classificação dessas proteínas em três grupos. A classe I é representada pelos homólogos capazes de se ligar a estrutura do *cap* e ao fator eIF4G. Na classe II, estão as proteínas 4E-HP. E a classe III é representada por homólogos que não possuem função definida (Joshi et al., 2005).



**FIGURA 3 – Complexo eIF4F.** Destacado estão as proteínas que compõem o complexo eIF4F, são elas: eIF4E, eIF4G e eIF4A, assim como o mRNA (Fonte: Autora, 2018).

Das funções previamente descritas, sabe-se que eIF4E1 é a proteína envolvida na iniciação da tradução global dos mamíferos, enquanto eIF4E2 e eIF4E3 atuavam como repressores da tradução. No entanto, dados da literatura indicam que sob determinadas condições celulares, eIF4E2 e eIF4E3 são capazes de formar complexos eIF4F alternativos e atuar na iniciação da tradução de determinado grupo de mRNAs (Uniacke et al., 2012; Landon et al., 2014; Ho & Lee, 2016).

### 1.2.2 Regulação da tradução

O controle traducional em células eucarióticas é crítico para a regulação de genes durante períodos de estresse nutricional, desenvolvimento, diferenciação, entre outros. Sendo assim, os principais pontos de regulação ocorrem ao início da tradução, via fosforilação de eIF2a e interação de eIF4E com 4E-BPs. Durante períodos de estresse celular, a tradução global da célula pode ser reduzida via fosforilação de eIF2a, responsável por formar o complexo ternário de eIF2 Met-tRNA<sup>i</sup>-GTP. Essa fosforilação ocorre na Ser51 da subunidade alpha, convertendo eIF2-GDP em um inibidor competitivo da quinta subunidade do fator de troca do nucleotídeo guanina,



eIF2B, diminuindo a formação do complexo ternário. As cinases capazes de realizar essa fosforilação são: PKR, PERK, HRI e GCN2. Apesar da inibição geral da tradução após fosforilação de eIF2a, alguns mRNAs que codificam fatores de transcrição específicos, tem a tradução aumentada sob condições de estresse (Sonenberg & Hinnebusch, 2009).

Outro mecanismo para controlar a taxa de tradução envolve o reconhecimento do *cap* via complexo eIF4F. Em mamíferos, a ligação de eIF4E a estrutura do *cap* pode ser impedida pelo homólogo de eIF4E, a proteína 4E-HP. Já a interação de eIF4G e eIF4E é inibida por proteínas, chamadas 4E-BPs. Essas proteínas competem com eIF4G por um sítio de ligação compartilhado no fator eIF4E. A ligação de 4E-BP a eIF4E é controlada via fosforilação, em que quando hipofosforilada, liga-se fortemente a eIF4E e quando eIF4E é fosforilada essa interação é enfraquecida. As 4E-BPs são capazes de inibirem a tradução *cap*-dependente, mas não a via IRES (Ho & Lee, 2016; Sonenberg & Hinnebusch, 2009). A fosforilação de 4E-BP é mediada por complexos da via mTOR (*mammalian target of rapamycin*), envolvendo o metabolismo celular, a síntese proteica e o ciclo celular, sendo assim controlado por diferentes sinalizações celulares (Laplanche & Sabatini, 2009).

### 1.2.3 Complexo eIF4F de tripanosomatídeos

Em tripanosomatídeos foi observada a ocorrência de múltiplos homólogos para as subunidades eIF4E (eIF4E1-6), eIF4G (eIF4G1-5) e eIF4A (eIF4E1-2), conservados em diferentes espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma*, variando em tamanho e propriedades (Dhalia et al., 2005; Yoffe et al., 2006; Yoffe et al., 2009; Freire et al., 2011; Reis, 2009; Freire et al., 2014a; Freire et al., 2014b). Esta multiplicidade de homólogos de eIF4E e eIF4G não se reflete no que é observado em outros organismos unicelulares. Acredita-se que ao longo da evolução dos tripanosomatídeos, um único gene eIF4E sofreu uma série de duplicações gênicas e modificações gerando famílias de proteínas relacionadas em organismos eucariotos diferentes, indicando que nem todos os homólogos de eIF4E atuam necessariamente como fatores de início de tradução (Freire et al., 2017a).

Além disso, múltiplas isoformas foram identificadas para vários dos homólogos de eIF4E e eIF4G de *Leishmania* e *Trypanosoma*, indicativas de modificações pós-traducionais mediadas por fosforilação, e estas modificações

parecem estar associadas a fases específicas de crescimento do parasito (Pereira et al., 2013).

Os seis homólogos do fator eIF4E de *T. brucei* e *L. major* foram divididos em três classes de acordo com as suas propriedades moleculares (De Melo Neto et al., 2016; Freire et al., 2017a). Essa classificação difere da classificação descrita previamente no item 1.2.1 correspondente a outros organismos eucariotos. Na classe I estão inseridos os homólogos eIF4E1 e eIF4E2, que são pouco expressos e localizam-se tanto no núcleo quanto no citoplasma desses parasitos. Dentre os seis homólogos, eIF4E1 e eIF4E2 são os que apresentam maior similaridade quando comparado com eIF4E de mamíferos, leveduras e plantas. Entretanto, são os únicos homólogos de eIF4E que não interagem com eIF4G (Zinoviev et al., 2011; Freire et al., 2011; Erben et al., 2014). Na classe II estão eIF4E3 e eIF4E4, que são expressos em maior quantidade ao longo do citoplasma e possuem uma extensão N-terminal única de tripanosomatídeos, envolvida na interação com homólogos da PABP (Freire et al., 2011; Zinoviev et al., 2011; De Melo Neto et al., 2015; Moura et al., 2015). Por fim, na classe III estão inseridos os homólogos eIF4E5 e eIF4E6, que são proteínas citoplasmáticas de menor peso molecular, capazes de interagir com homólogos de eIF4G (Freire et al., 2014a; Freire et al., 2014b). Embora os homólogos do fator eIF4E sejam alvos de estudo em *Trypanosoma brucei* e *Leishmania*, até o momento, pouco pode-se afirmar sobre a função específica para cada homólogo de eIF4E (revisado por Freire et al., 2017a).

#### 1.2.3.1 *Trypanosoma brucei*

Em *T. brucei*, dentre os seis homólogos estudados (TbEIF4E1-6), as proteínas TbEIF4E3 e TbEIF4E4 demonstraram fortes indícios de atuarem na tradução pertencendo a dois complexos de iniciação distintos, de acordo com suas interações com os fatores TbEIF4G4 e TbEIF4G3, respectivamente e possuem localização citoplasmática nas formas procíclicas. Ambos os complexos TbEIF4E3:TbEIF4G4 e TbEIF4E4:TbEIF4G3 estão presentes nos polissomos das formas sanguíneas, sendo a proteína TbEIF4E4 presente em maior quantidade (Klein et al., 2015). Análise de RNAi e marcação metabólica também mostraram que a proteína TbEIF4E3 é estritamente necessária para sobrevivência dos parasitos e sua depleção levou ao decréscimo na taxa de tradução em poucos dias (Freire et al., 2011).

Quanto aos homólogos TbelF4E1 e TbelF4E2, já foi visto que estes possuem localização citoplasmática e nuclear nas formas procíclicas desse parasito, sendo que TbelF4E1 sob condições normais de cultivo, pode ser visualizada localizando-se parcialmente com grânulos citoplasmáticos (Freire et al., 2011; Kramer et al., 2013). O *knockdown* por RNAi de TbelF4E1 e TbelF4E2 não prejudicou o crescimento nas formas procíclicas, porém o duplo *knockdown* de ambos TbelF4E1 e TbelF4E2 foi letal para o parasito. Além disso, foi visto que TbelF4E1 é essencial apenas nas formas sanguíneas de *T. brucei* (Freire et al., 2011). Acredita-se que tanto TbelF4E1, quanto TbelF4E2, não estejam envolvidas no processo de iniciação da tradução, uma vez que nenhum desses homólogos formam complexos eIF4F-*like*. No entanto estas proteínas podem estar envolvidas no processo de regulação da tradução, reprimindo ou estimulando a mesma. Dois complexos foram previamente descritos envolvendo TbelF4E1, o primeiro entre TbelF4E1 e 4E-IP, capaz de reduzir a taxa de tradução de mRNA marcados. O segundo envolvido no estímulo da tradução via interação TbelF4E1 e eIF4E3a (revisado por Freire et al., 2017a). Recentemente, foi visto que TbelF4E2 associa-se a um homólogo da proteína de ligação a haste-alça (SLBP) de um mRNA de histona (SLBP2). O complexo TbelF4E2:SLBP2 parece estar envolvido na seleção de diferentes mRNAs que possuam estruturas em haste-alça (Freire et al., 2017b).

Por fim, TbelF4E5 e TbelF4E6 apesar de interagirem com diferentes homólogos de eIF4G e formarem complexos com proteínas envolvidas na formação do *cap*, não parecem estar envolvidas no processo de iniciação da tradução, uma vez que o *knockdown* de TbelF4E5 e TbelF4E6 não afetou os níveis de tradução (Freire et al., 2014a; Freire et al., 2014b). Sendo assim um indicativo de que estes homólogos estejam envolvidos em mecanismos de regulação da tradução ainda não descritos.

### 1.2.3.2 *Leishmania*

O primeiro homólogo de eIF4E descrito e caracterizado de tripanosomatídeos na literatura foi LmeIF4E1 que apresenta 42% de similaridade com eIF4E de mamíferos, e assim como LmeIF4E2 possui localização citoplasmática (Yoffe et al., 2006). Em *L. major*, foi demonstrado que LmeIF4E1 não interage com nenhum homólogo de eIF4G, mas interage com a proteína 4E-IP de função desconhecida.

Essa interação parece estar associada a função de regulação da tradução nas formas promastigotas desse parasito (Zinoviev et al., 2011).

Enquanto TbelF4E3 é o homólogo essencial para a sobrevivência de ambas as formas de diferenciação de *T. brucei*, em *Leishmania* foi visto que LmelF4E4 é essencial para o crescimento celular (Freire et al., 2011; De Melo Neto, 2015). Em *L. major*, assim como em *T. brucei*, o complexo LmelF4E4:LmelF4G3 é o candidato mais forte para atuar na tradução global do parasito (Yoffe et al., 2006; Yoffe et al., 2009; Moura et al., 2015). Entretanto, a formação do complexo TbelF4E3:TbelF4G4 também é bastante eficiente em *T. brucei*, o que leva a proposição do papel destas proteínas no início da tradução neste organismo (Freire et al., 2011).

Em contraste ao observado em *T. brucei*, o complexo LaelF4E3:LaelF4G4 de *L. amazonenses* não parece participar diretamente do processo de tradução. No entanto, LaelF4E3 está envolvido na resposta celular quando submetida ao estresse nutricional, sendo essa proteína deslocada para grânulos citoplasmáticos (Zinoviev et al., 2012).

Embora os homólogos do fator eIF4E sejam alvos de estudo em *T. brucei* e *Leishmania*, até o momento estas proteínas não foram caracterizadas em *T. cruzi*. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi iniciar a caracterização molecular dos seis homólogos de eIF4E neste parasito. O entendimento de como os homólogos de eIF4E estão envolvidos na tradução, seja diferindo na sua capacidade de associação com ribossomos ou alterando a afinidade dos mesmos por mRNAs distintos, pode desvendar mecanismos de regulação traducional peculiares de *T. cruzi*.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar, molecular e funcionalmente, os homólogos de eIF4E de *Trypanosoma cruzi*.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão e localização das proteínas nos parasitos em fase exponencial de crescimento, parasitos submetidos ao estresse nutricional e nas formas tripomastigotas metacíclicas por *Western blotting* e imunofluorescência indireta.
- Verificar a distribuição das proteínas em estudo nas frações polissomais e/ou não polissomais obtidas pelo fracionamento dos lisados celulares em gradiente de sacarose.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 LOCAL DE DESENVOLVIMENTO DO TRABALHO

Este trabalho foi desenvolvido no laboratório de regulação da expressão gênica do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR com o auxílio de uma bolsa de mestrado CAPES durante o período de março de 2016 a março de 2018.

#### 3.2 SOLUÇÕES E TAMPÕES

**Solução de anestésico e sedativo:** 100 mg/kg<sup>-1</sup> Ketamina; 1 mg/kg<sup>-1</sup> Xilazina.

**Solução de bloqueio para imunofluorescência indireta:** Tampão PBS 1X; 1 ou 4% de albumina de soro bovino.

**Solução de *Coomassie Blue*:** 0,1% azul de coomassie G-250; 45% metanol; 10% ácido acético.

**Solução de *Ponceau S*:** 0,5% Ponceau S (Sigma P-3504); 1% ácido acético glacial.

**Solução de revelação para fosfatase alcalina:** NBT (50 mg/mL nitroblue tetrazolium) e BCIP (50 mg/mL 5-bromo-4-chloro-3-indolylphosphate) em tampão AP Buffer.

**Tampão AP Buffer:** 100 mM Tris-HCl pH 9,5; 100 mM NaCl; 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

**Tampão de amostra para proteína:** 160 mM Tris-HCl pH 8,0; 4% SDS; 10% β-mercaptoetanol; 24% glicerol; 0,02% azul de bromofenol.

**Tampão de bloqueio para *Western blotting*:** Tampão PBS 1X; 0,1% Tween20; 5% Leite em pó desnatado.

**Tampão de corrida para gel SDS-PAGE:** 0,037 M Tris-HCl pH 8,4; 192 mM Glicina; 20% Metanol.

**Tampão de Ligação:** 300 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 8 M Uréia; 10 mM Imidazol.

**Tampão PBS (*Phosphate-buffer saline*):** 2,7 mM KCl; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 4,3 mM NaHPO<sub>4</sub>.7HO; 137 mM NaCl.

**Tampão PBS-Tween 20:** Tampão PBS 1X; 0,05% Tween 20.

**Tampão de sonicação:** 300 mM NaCl; 2% Triton X-100; 10 mM Tris-HCl pH 7,5.

**Tampão de transferência para *Western blotting*:** 25 mM Tris-HCl pH 8,3; 192 mM glicina; 20% metanol.

### 3.3 MEIOS DE CULTURA

#### 3.3.1 Meio LB (Lysogeny Broth)

Bacto-triptona.....	10,0 g/L
NaCl.....	5,00 g/L
Extrato de levedura.....	5,00 g/L

(LB-ágar: adição de 1,5% de agar-ágar)

#### 3.3.2 Meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*)

Extrato de Levedura.....	15,0 g/L
Fosfato dibásico de sódio.....	11,56 g/L
Glicose.....	2,20 g/L
Hemina.....	0,02 g/L
Infuso de fígado.....	5,00 g/L
KCl.....	0,40 g/L
NaCl.....	4,40 g/L
Triptose.....	5,00 g/L

(pH 7,2 - Ajustado com HCl)

#### 3.3.3 Meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*)

KCl.....	17 mM
NaCl.....	190 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	2 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	2 mM
Tampão fosfato pH 6,0.....	8 mM

#### 3.3.4 Meio TAU3AAG

KCl.....	17 mM
NaCl.....	190 mM



CaCl <sub>2</sub> .....	2 mM
MgCl <sub>2</sub> .....	2 mM
Tampão fosfato pH 6,0.....	8 mM
Ácido L-aspártico.....	2 mM
Ácido L-glutâmico.....	50 mM
L-prolina.....	10 mM
Glicose.....	10 mM

### 3.4 MICROORGANISMOS

#### 3.4.1 *Escherichia coli*

A cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG  $\Phi$ 80dlacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK- mK+),  $\lambda$ -) foram mantidos à 37 °C em meio de cultivo LB por 18 horas ou estocadas em glicerol à -80 °C. A cepa de *Escherichia coli* BL21(DE) $\rho$ LysS (F-, ompT, hsdSB (rB-, mB-), dcm, gal,  $\lambda$ (DE3),  $\rho$ LysS, Cmr) foram mantidas em meio LB com 50  $\mu$ g/mL de cloranfenicol à 37 °C por 18 horas ou estocadas em glicerol à -80 °C.

#### 3.4.2 *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c

##### 3.4.2.1 Epimastigotas

As células do clone Dm28c de *T. cruzi* foram mantidas em estufa à 28 °C em meio de cultivo LIT (Camargo, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB). A cada três dias foi feito novo cultivo dos parasitos com inóculo inicial de 10<sup>6</sup> células/mL e após 72 horas de cultivo foram obtidos os parasitos em fase exponencial de crescimento, com densidade celular de aproximadamente 3 x 10<sup>7</sup> células/mL.

##### 3.4.2.2 Epimastigotas sob estresse nutricional

As formas epimastigotas foram obtidas após 72h de cultivo, como descrito no item 3.4.2.1, e centrifugadas a 7.000 x g por 5 minutos à 4 °C. Em seguida, os

parasitos na concentração de  $5 \times 10^8$  células/mL foram submetidas ao estresse nutricional por incubação em meio TAU pH 6,0 por 2 horas à 28 °C (Contreras et al., 1985).

#### 3.4.2.3 Triposmastigotas metacíclicos

O processo de diferenciação da forma replicativa epimastigota de *T. cruzi* para a forma infectiva, tripomastigota metacíclica, pode ser realizado por meio do ensaio de metaciclogênese *in vitro*, mimetizando o que ocorre naturalmente na porção final do intestino no inseto vetor. Este ensaio consiste em um sistema de diferenciação celular utilizando meios quimicamente definidos que permitem o isolamento dos parasitos nas diversas etapas de diferenciação celular (Contreras et al., 1985).

As formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas a partir da forma replicativa epimastigota, em densidade celular de aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/mL, centrifugadas a  $7.000 \times g$  por 5 minutos à 4 °C. Os parasitos foram então submetidos ao estresse nutricional como descrito no item 3.4.2.2 e após as 2 horas foram incubados em meio TAU 3AAG na concentração final de  $5 \times 10^6$  células/mL por 72 horas à 28 °C. Durante este processo, sem perturbação do meio, as formas epimastigotas aderem-se nas paredes da garrafa de cultivo e após diferenciação em tripomastigota metacíclico são liberadas no sobrenadante da cultura. Após 72 horas, o sobrenadante da cultura é coletado, sendo possível observar que 80 a 90% dos parasitos são tripomastigotas metacíclicos (Bonaldo et al., 1988).

As formas tripomastigotas metacíclicas foram separadas através de passagem em resina de DEAE celulose (IonSep DE52 BIOpHORETICS) como descrito por Contreras e colaboradores (1985).

### 3.5 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEINAS RECOMBINANTES

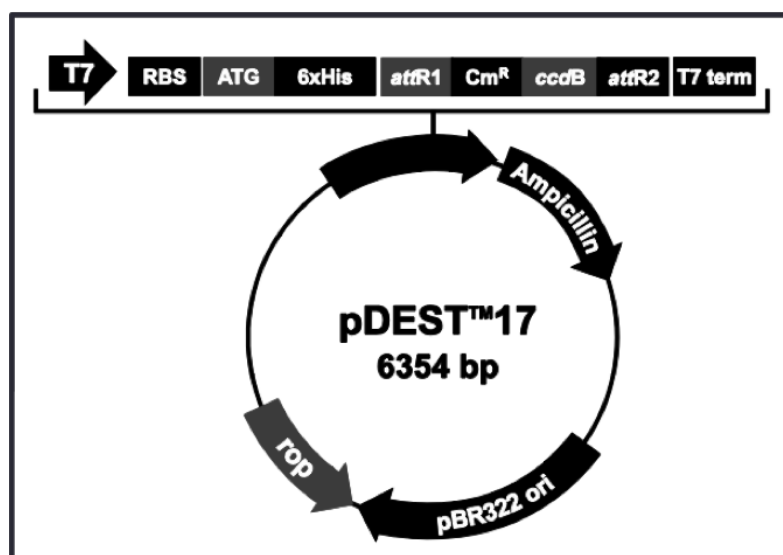
#### 3.5.1 Identificação dos seis homólogos de eIF4E de *T. cruzi*

As análises computacionais foram realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, relatou que assim como os outros tripanosomatídeos, o *T. cruzi* também possui seis homólogos para o fator de início de tradução eIF4E. Para a busca das sequências dos genes dos seis homólogos foram utilizados os genes homólogos de *T. brucei* e

*Leishmania major* (Freire et al., 2011; Freire et al., 2014a; Freire et al., 2014b). Para isso foi utilizada a ferramenta BLAST do banco de dados TriTrypDB e NCBI. Os IDs utilizados nesse estudo são os da cepa de *T. cruzi* CL Brener uma vez que o depósito das sequências dos fatores está completo e correto.

### 3.5.2 Clonagem dos genes em vetores do sistema Gateway

A amplificação dos genes, clonagens nos vetores de entrada e de destino do sistema Gateway e análise do sequenciamento dos clones foram realizados pela aluna de doutorado Jimena Ferreira da Costa. Os plasmídeos pDEST<sup>TM</sup>17 contendo as sequências dos seis homólogos foram utilizados para transformação e expressão das proteínas recombinantes em linhagens bacterianas.



**FIGURA 4 – Mapa do vetor de expressão pDEST<sup>TM</sup>17.** Destacados estão as principais características do vetor, tais como a resistência a ampicilina, o promotor T7, a sequência que codifica seis histidinas e os sítios de recombinação attR (Fonte: Adaptado de Manual Gateway Technology - Invitrogen).

### 3.5.3 Expressão e purificação das proteínas recombinantes

Células da linhagem *E. coli* BL21(DE)pLysS competente foram transformadas com o DNA plasmidial contendo os genes de interesse e cultivadas em LB-ágar 1,5% suplementado com 100 µg/mL de ampicilina. As colônias contendo os plasmídeos de interesse foram selecionadas pelo gene de resistência e inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 100 µg/mL ampicilina e incubadas à 37 °C, sob agitação constante,

durante 18 horas. Posteriormente, foram realizados inóculos (1:10) em 10 mL do mesmo meio seletivo e as células foram incubadas à 37 °C, sob agitação constante, até a cultura atingir a densidade óptica entre 0,6 a 0,8 quantificada em espectrofotômetro a 600 nm. Esta densidade óptica foi atingida em aproximadamente 1 hora e 30 minutos de incubação.

As culturas foram divididas em duas alíquotas e foi adicionado 1 mM IPTG em apenas uma alíquota de cada cultura. As alíquotas sem IPTG foram utilizadas como controle da indução da proteína recombinante. Todas as alíquotas foram incubadas por 4 horas, nas mesmas condições descritas. Após este período, foram centrifugadas a 8.000 x g por 1 minuto à 4 °C, lavadas em PBS, suspensas em 75 µL de PBS e 25 µL de tampão de amostra para proteína, aquecidas à 95 °C por 5 minutos para desnaturação das proteínas e submetidas a eletroforese em gel SDS-PAGE para avaliação da expressão das proteínas de interesse.

Para analisar a solubilidade das proteínas recombinantes, os clones foram cultivados e induzidos como descrito anteriormente. As culturas foram centrifugadas a 8.000 x g por 1 minuto à 4 °C, lavadas com PBS e suspensas em tampão de sonicação. As células foram lisadas por 5 ciclos de sonicação em potência 4 por 15 segundos, mantidas no gelo por 1 minuto entre as sonicações, e o lisado celular obtido foi centrifugado a 8.000 x g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante, onde se encontram as proteínas solúveis (fração solúvel), foi coletado e adicionado tampão de amostra para proteína. O sedimento, contendo as proteínas insolúveis (fração insolúvel), foi suspenso no mesmo volume utilizado para a fração solúvel e foi adicionado tampão de amostra para proteína. Ambas as frações foram aquecidas à 95 °C por 5 minutos e analisadas em gel desnaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970).

O vetor pDEST<sup>TM</sup>17 contém uma sequência de nucleotídeos que permite fusionar uma etiqueta de seis histidinas na extremidade amino terminal da proteína de interesse, possibilitando sua identificação por *Western blotting* (utilizando anticorpo primário anti-histidina) e purificação por cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

Após a análise da solubilidade, constatou-se a presença das proteínas de interesse nas frações insolúveis. Assim, para a purificação das proteínas recombinantes os clones bacterianos foram inoculados novamente em um volume maior de meio de cultivo e induzidos como descrito anteriormente, com a finalidade de obter maiores quantidades das proteínas de interesse. Posteriormente, as bactérias foram sedimentadas por centrifugação a 8.000 x g por 1 minuto à 4 °C,

lavadas com tampão PBS e suspendidas em tampão de sonicação. As células sofreram lise através de 5 ciclos de sonicação em potência 4 por 15 segundos, sendo mantidas no gelo por um minuto entre as sonicações. Por fim, o lisado foi centrifugado a 7.000 x g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante, correspondente a fração solúvel, foi coletado e ao sedimento, contendo proteínas insolúveis, foi adicionado o tampão de ligação e a mistura foi sonicada 5 vezes por 15 segundos na potência 7, seguido de centrifugação a 7.000 x g por 10 minutos à 4 °C. O sobrenadante (fração insolúvel) foi reservado e o sedimento descartado. A purificação das proteínas recombinantes TcelF4E1-6 foi realizada por cromatografia de afinidade em coluna Ni-Sepharose (GE Healthcare) de acordo com as instruções do fabricante. As proteínas que interagiram com a coluna de níquel foram eluídas pela adição de imidazol, análogo estrutural da cadeia lateral da histidina, concentrações crescentes. As amostras que não se ligaram a resina (*flow-through*, lavados e eluídos) foram reservados e posteriormente analisados em gel SDS-PAGE 13%.

Quando necessário a obtenção de proteína com maior grau de pureza mesmo após a purificação em coluna de níquel as frações proteicas, contendo as proteínas recombinantes de interesse, foram aplicadas em um gel preparativo de poliacrilamida 13% (SDS-PAGE). Para visualizar a banda referente a proteína recombinante, o gel foi tratado com solução gelada de 100 mM de KCl. A região do gel contendo a proteína recombinante foi cortada e a proteína foi eluída por difusão em PBS. Para isso, o gel foi macerado e armazenado em tubo de 1,5 mL à 4 °C contendo PBS. Após 18 horas, o PBS foi removido e a presença da proteína nesta solução foi analisada através de um novo gel SDS-PAGE. As soluções contendo as proteínas purificadas foram quantificadas no equipamento *Qubit Fluorometric Quantitation* (Thermo Fisher Scientific), de acordo com as instruções do fabricante.

## 3.6 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

### 3.6.1 Obtenção dos anticorpos policlonais anti-TcelF4E1-6

Dezoito camundongos isogênicos da linhagem BALB/c ou Swiss do biotério do Instituto Carlos Chagas foram imunizados com as proteínas recombinantes purificadas. Para a produção de anticorpos policlonais anti-TcelF4E1-6 os camundongos foram separados em seis grupos de três animais, de aproximadamente

seis semanas de idade. Os animais foram previamente sangrados pela via caudal para retirada de aproximadamente 50 µL de sangue total por animal para obter o soro pré-imune, e apenas foram utilizados os camundongos cujo soro pré-imune não foi reativo ao extrato proteico de *T. cruzi*. Os camundongos foram imunizados 3 vezes, a cada quinze dias. A primeira imunização, por via intraperitoneal, foi realizada com 200 µL de emulsão contendo 40 µg da proteína em 100 µL PBS e 100 µL de adjuvante de Freud (dose/animal). Nas inoculações seguintes foram aplicados 20 µg de proteína em 100 µL PBS e 100 µL de Alugel (dose/animal) em um intervalo de quinze dias entre as inoculações. Dois dias após a última inoculação o soro dos animais foi analisado por *Western blotting*, como descrito nos itens 3.7.1. O soro pós-imune foi obtido por punção cardíaca nos animais previamente anestesiados, e o sangue total foi centrifugado a 3.000 RPM por 5 minutos e armazenado à -20 °C. Os procedimentos de imunização murina foram realizados de acordo com o protocolo aprovado pela CEUA-Fiocruz (Protocolo P-434/07 com licença número L-005/09).

As proteínas recombinantes TcelF4E3, TcelF4E4 e TcelF4E5 purificadas também foram enviadas para a inoculação e produção de anti-soro policlonal em coelho no Centro de Biotecnologia – UFRGS.

### 3.6.2 Purificação dos anticorpos policlonais

Em um gel preparativo SDS-PAGE foi aplicado 50 µg de proteína recombinante purificada, correspondente ao anticorpo a ser purificado. Em seguida, a proteína presente no gel foi transferida para uma membrana de nitrocelulose *Amersham Hybond™-C* (GE Healthcare) como descrito por Towbin e colaboradores (1979). A transferência foi realizada em tampão de transferência para *Western blotting* durante 1 hora em temperatura ambiente, utilizando diferença de potencial de 20 V e amperagem constante no equipamento *Trans-Blot® SD Semi-dry Transfer Cell* (BIO-RAD).

A membrana foi corada com a solução *Ponceau S* e a banda única correspondente a proteína recombinante foi cortada, descorada em água Milli-Q e incubada em tampão de bloqueio em temperatura ambiente por 1 hora, com leve agitação. A membrana contendo a proteína foi então incubada com o soro a ser purificado por 16 horas, à 4 °C, sob agitação constante. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão PBS-*Tween* 20 e incubada com Tampão glicina (HCl

0,1 M pH 3,0) por 2 minutos. Em seguida, foi adicionado Tampão Tris-HCl 1M pH 9,5 para corrigir o pH 7,0. O soro purificado foi então testado contra extrato de *T. cruzi*, como descrito no item 3.7.1.

Para os soros policlonais obtidos em coelho, foi necessária a adição de uma etapa anterior a incubação com a proteína recombinante, em que o soro é incubado com extrato de *E. coli*, uma vez que esses animais são expostos a uma maior quantidade de microorganismos.

### 3.7 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DOS SEIS HOMÓLOGOS DE eIF4E DURANTE A METACICLOGÊNESE *IN VITRO*

#### 3.7.1 Obtenção do extrato proteico de *T. cruzi* e análise por *Western blotting*

Os extratos proteicos das formas epimastigotas, epimastigotas submetidos ao estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* foram obtidos após concentração dos parasitos por centrifugação a 7.000 x g por 5 minutos à 4 °C. Um total de 10<sup>8</sup> células foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com tampão PBS nas mesmas condições de centrifugação, para retirada do meio de cultura. Ao final das lavagens as células foram suspensas em tampão PBS, seguida da adição de tampão de amostra para proteína (10<sup>6</sup> células/μL). O extrato proteico foi lentamente homogeneizado em gelo por 5 minutos, aquecidas à 95 °C por 5 minutos e centrifugadas a 16.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante das amostras e o marcador *BenchMarck Ladder* (Invitrogen) foram aplicados e submetidos à eletroforese em gel SDS-PAGE.

Após a eletroforese, as proteínas separadas no gel SDS-PAGE foram transferidas para uma membrana de nitrocelulose *Amersham Hybond™-C* (GE Healthcare). A transferência foi realizada em tampão de transferência para *Western blotting* durante 16 horas à 4 °C, utilizando diferença de potencial de 30 V, ou 100 V durante 1 hora à 4 °C, e amperagem constante. Para os ensaios de *Dot blotting*, 500 ng das proteínas recombinantes purificadas foram aplicados em uma membrana de nitrocelulose.

A membrana foi corada com a solução *Ponceau S*, descorada em água bidestilada e incubada em tampão de bloqueio em temperatura ambiente por 1 hora, com leve agitação ou por 16 horas à 4 °C. A membrana foi incubada com o anticorpo primário, previamente diluído em tampão PBS-*Tween* 20 por 1 hora em temperatura



ambiente. Posteriormente, a membrana foi lavada 3 vezes com tampão PBS-*Tween* 20 e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado com fosfatase alcalina (Promega, Madison, WI, USA) ou peroxidase (Amersham Biosciences), ambos diluídos 1:10.000 em tampão PBS-*Tween* 20 por 1 hora em temperatura ambiente, com leve agitação. A membrana foi novamente lavada com tampão PBS-*Tween* 20 por 3 vezes.

As membranas incubadas com o anticorpo secundário conjugado com fosfatase alcalina foram reveladas com solução de revelação para fosfatase alcalina.

O produto da reação enzimática da peroxidase conjugada aos anticorpos foi detectado por quimioluminescência utilizando o kit SuperSignal West Pico (Thermo Scientific), seguindo as instruções do fabricante, e a imagem foi detectada pelo fotodocumentador L-PIX Chemi Express (Loccus). Os tempos de exposição foram padronizados para cada experimento.

### 3.7.2 Ensaio de localização celular por imunofluorescência indireta

Os parasitos nas formas epimastigotas, epimastigotas submetidos ao estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi* foram centrifugados a 2.000 x *g* por 5 minutos, lavados 3 vezes com tampão PBS para retirada do meio de cultura e suspensos em paraformaldeído 4% por 10 minutos em temperatura ambiente, numa densidade de 5 x 10<sup>4</sup> células/μL. Lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina em campos delimitados por teflon, contendo 2 x 10<sup>6</sup> parasitos por campo foram incubadas em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida as células foram lavadas 2 vezes com tampão PBS e permeabilizadas com Triton X-100 0,1% diluído em PBS por 5 minutos, lavadas 3 vezes com tampão PBS e incubadas com solução de bloqueio por 1 hora em temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram diluídos em solução PBS/BSA 1% e incubados com os parasitos por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação os parasitos foram lavados 3 vezes com tampão PBS por 5 minutos, os anticorpos secundários conjugados aos fluoróforos Alexa 488 ou Alexa 546 (Invitrogen) diluídos na solução de PBS/BSA 1% foram adicionados e as etapas de incubação e lavagem repetidas. O núcleo e o cinetoplasto foram corados com DAPI, diluído na mesma solução contendo o anticorpo secundário, na concentração final de 1 μg/μL.

Após esta etapa, foram adicionados 8 µL de N-propil-galato na concentração de 200 µg/mL sobre cada campo e as lâminas foram seladas com lamínulas. A fluorescência foi observada em microscópio de fluorescência Leica DMI6000 B, sendo algumas imagens processadas por deconvolução utilizando o *software* LAS - AF - Leica na plataforma de microscopia do ICC - FIOCRUZ/PR.

### 3.8 ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DOS FATORES TceIF4E1-6 NAS FRAÇÕES POLISSOMAIS E/OU NÃO POLISSOMAIS EM GRADIENTE DE SACAROSE

Esta análise foi realizada com parasitos transfectantes que expressam as proteínas de interesse fusionadas a GFP. As construções plasmidiais e os parasitos transfectantes foram obtidos pela aluna de doutorado Jimena Ferreira da Costa. Para tanto, o extrato citoplasmático dos parasitos transfectantes foi centrifugado em gradiente de densidade de sacarose para avaliar a associação das proteínas de interesses com polissomos como descrito por Brecht & Parsons (1998), com modificações. Para a obtenção do extrato citoplasmático foram utilizados  $5 \times 10^8$  parasitos nas formas epimastigotas.

Os parasitos foram incubados com 100 µg/mL de cicloheximida por 10 minutos à 28 °C ou com 2 mg/mL de puromicina por 1 hora à 28 °C. Em seguida as células foram centrifugadas a 5.000 x g por 5 minutos à 4 °C e lavadas com tampão TKM. Os parasitos foram então suspensos em 900 µL de tampão TKM suplementado com 100 µg/mL de cicloheximida, 10 µg/mL de heparina, 10 µM de E-64, 1 mM de PMSF e coquetel de inibidores de proteases (Roche). Para a lise dos parasitos tratados previamente com puromicina utilizou-se o mesmo tampão, porém sem a adição de cicloheximida.

A lise dos parasitos ocorreu após a adição de 100 µL do tampão de lise (tampão TKM com adição de 10% NP-40 e 2 M Sacarose). O lisado foi centrifugado a 13.000 x g por 5 minutos à 4 °C e o sobrenadante foi adicionado sobre gradientes de sacarose linear de 15-55%. O gradiente foi centrifugado em ultra centrífuga Hitachi com rotor SW40 a 39.000 RPM por 3 horas à 4 °C. A coleta das frações (500 µL cada) foi realizada utilizando o equipamento ISCO com a leitura de perfil de absorvância contínua em 256 nm. Trinta microlitros de cada fração foram aplicados em gel SDS-PAGE seguido da transferência para membrana de nitrocelulose para realização do ensaio de *Western blotting* com anti-GFP monoclonal 2mAbP66B3H2012 diluído 1:50

cedido gentilmente pelo Dr. Juliano Bordignon do ICC – FIOCRUZ/PR. A proteína ribossomal S7 foi utilizada como controle (Gradia et al., 2009).

### 3.8.1 Quantificação dos homólogos de eIF4E de *T. cruzi* nas frações do gradiente de sacarose

As quantificações das proteínas em estudo foram realizadas pelo programa ImageJ a partir das imagens obtidas por ensaios de *Western blotting*. Foi calculada a razão entre a intensidade de cada banda da proteína de interesse, ao longo do gradiente, e a intensidade da banda correspondente a essa proteína presente na fração livre de ribossomos. Os valores obtidos dessa relação foram representados em escala logarítmica na base 2, em gráficos.

## 4 RESULTADOS

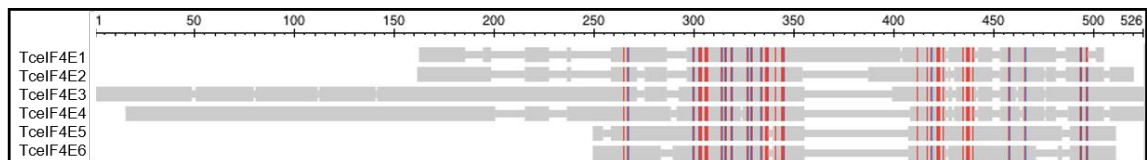
### 4.1 IDENTIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE

Os genes que codificam os homólogos de eIF4E de *T. cruzi* foram identificados por análises de bioinformática realizadas pelo nosso grupo de pesquisa, tendo como base as sequências dos genes codificantes dos homólogos de eIF4E de *T. brucei*, como descrito no item 3.5.1. As sequências de *T. cruzi* tiveram sua identidade comparada com os organismos *T. brucei*, *L. major* e *H. sapiens*, como pode ser observado no Quadro 1. Os homólogos de TcelF4E1-6 possuem maior identidade com os homólogos de *T. brucei*. A análise *in silico* nos permitiu identificar o tamanho predito dos homólogos de TcelF4E1-6, a localização cromossômica e a massa molecular de cada proteína.

Gene	ID <i>T. cruzi</i>	Cromossomo CLB	Tamanho do Gene (pb)	Massa Molecular (kDa)	Identidade entre sequência proteica		
	TriTrypDB Cepa CLBrener				<i>T. Brucei</i> eIF4E1-6	<i>L. major</i> eIF4E1-6	<i>Homo sapiens</i> eIF4E1
TcelF4E1	TcCLB.503593.10	TcChr39-S	786	28,9	57%	49%	24%
TcelF4E2	TcCLB.511353.40	TcChr40-S	753	28,6	64%	43%	32%
TcelF4E3	TcCLB.508827.30	TcChr30-S	1374	49,7	54%	53%	25%
TcelF4E4	TcCLB.509037.40	TcChr32-S	1233	45,2	55%	49%	26%
TcelF4E5	TcCLB.508661.10	TcChr20-S	603	22,5	69%	46%	24%
TcelF4E6	TcCLB.507519.30	TcChr29-S	561	21,3	68%	48%	23%

**Quadro 1 – Homólogos de eIF4E de *T. cruzi*.** Identificação dos homólogos de eIF4E de *T. cruzi*, com as características gerais obtidas e a porcentagem de identidade entre as proteínas de *T. cruzi* com *T. brucei*, *L. major* e *H. sapiens* disponíveis em banco de dados.

Em seguida foi realizada a análise comparativa das sequências dos homólogos de eIF4E de *T. cruzi* entre si com o auxílio do programa de alinhamento Clustal Omega versão 1.2.4. O resultado do alinhamento está apresentado na Figura 5 e mostra a baixa identidade entre os homólogos de eIF4E em *T. cruzi*, com exceção das regiões conservadas dos núcleos do domínio eIF4E representado em vermelho.



```

TcelF4E1 -----
TcelF4E2 -----
TcelF4E3 ---MNPAAQEFVPRKCCAMDSNAIHMGRNPPQQQQKQPQISPPPATTTKLRATAPA
TcelF4E4 MSSLVKADVKEYIPSWANKR-----SSGVNPAATSTNKNGFATSVPTSNVMTTHSGCTG
TcelF4E5 -----
TcelF4E6 -----

TcelF4E1 -----
TcelF4E2 -----
TcelF4E3 FVPKGSFLPMATPPPTSFLQPPVSIPPPAPPTVPQYADPNTAVGSGLPGPKSFSPSAP
TcelF4E4 IN--AQNF---TSSPRAAAGLPLCSPTTA-----LRLPTRMSPMHA
TcelF4E5 -----
TcelF4E6 -----

TcelF4E1 -----
TcelF4E2 -----
TcelF4E3 PYTPANPKV--VAKFSSPKTSGSP--NPDPKTTRTPSPHPEQQEEEQP-NEEKQPR
TcelF4E4 PFPSVSI SMNPATDF--VPHLTGANS LAPLPTSTADLAEERQKQESHLS SSMKWTT
TcelF4E5 -----
TcelF4E6 -----

TcelF4E1 -----MS-DVKS-K-----EAGANPAASKSGAGE
TcelF4E2 -----MQTRLKS-RPDEPKLAV-----HPTSC---
TcelF4E3 E--EQEPKPDQSPLAQKAQTLGVSNRIDS-ARQEDSFGSTS-AADETSSNALQQTGALGE
TcelF4E4 TSTRKNI TQPALPLAVKANFTPTFAPIYVEKTEEEI LEISKRSSLKVGA AAFVPRRTL--
TcelF4E5 -----
TcelF4E6 -----

TcelF4E1 DV-----AETKLA VPRSLDTGSKKHPLNSSWTLWYDSLSTYDS----
TcelF4E2 -----ITPLWGVWEMMVCVLPDPVGGAVGNNTGVRGSAVKKCAVHKEG NR-----
TcelF4E3 AVENDFSGSVLPSVFEVSVVAKPPPAEAI RF-----NTWALHADDHPTPF G----
TcelF4E4 -----I RENTYDPTLVFRVDSVATFWKVFNNIPQPTMKIGT-LYFFRDGINPKWEDPGN
TcelF4E5 -----NRV-MIAK---PSPFSLTPATGEMTLGDLWLCFLYLPAGLGE C-----
TcelF4E6 -----MKETAHALKDPWFLSYIPQLTPDVTVKYD
-----MSAQ TSSQPHLPKDRWFTVYFFVFRQKKKGKD
:

TcelF4E1 --ERWE---L S LVEVITVRTVEEFFTMLHYCKPPHVRVLSAQYHFFREGVKPMWEDPSN
TcelF4E2 --ATWL---DQVRSIGLFDNAEGFWGIATCTLPSSQLPPGITYMYLRRNIAPMWEHEAN
TcelF4E3 --APLA---YDPVLVHLVGDVECFWRLWRYLPPSAL LPAFTYHWRFRDIKPNWEHARN
TcelF4E4 -----I RENTYDPTLVFRVDSVATFWKVFNNIPQPTMKIGT-LYFFRDGINPKWEDPGN
TcelF4E5 FKGDWNAKQALQPLDYIRTVEEFWSTINSLPKLHQLGNGSTFI FARNNVDA S YEAFPN
TcelF4E6 FDE-----Q QKPKELDWVTTAEELYATINSFPSLVLLP SDDNLV FARNKVEPYFENFPE
: . . : : * : * :

TcelF4E1 KAGGKLWISLDDKPVGDVGRKWNENANTS GAAGGEDN ASAATNNSNSNQNAKAKKEEQE
TcelF4E2 RRGGRWVRFQDQHRQQ-----RKG EEEEEIT
TcelF4E3 KNGGTITIVIFDRDKPGQ-----N-----
TcelF4E4 RDGGILKMKLDSHCI-----
TcelF4E5 --GTRVLVDLYKASVA-----
TcelF4E6 --GDRVCVTRTKAQS-----
* :

TcelF4E1 TEKKPELDTMWNELMAMVGEYLDPEPDG-DHIMGLVLSR-----RKYHNRIALWLRDA
TcelF4E2 EDRSSRVDEAWESL CIALIGEQLPCPETE---VCGVALRRA----ERRRWEKLSLWTRTA
TcelF4E3 --SKQTMDDAFMTLMACCGETLAESTTN---LNGIMLKVR---Q-NKPTTQIWTASS
TcelF4E4 -----NDAMVYLLCRTIGESWSKSVR--DTVNGVALKA----RERAYLLEWVWTEQ
TcelF4E5 -----EKGMDFVLSV LGEGLTYDVFNGKTVCDVWVLRSSRPNQESPELVRLVWLS DQ
TcelF4E6 -----EQAVVLVLAAMVGEHLR-SVT DSECVADVVR IAHKPGNVVPESLRVEVWLHKS
: : ** : : : *

TcelF4E1 SASEAV--ARIEKKLVKEAGLPPAMKFI FTPHSTGK-----
TcelF4E2 ADRETQLCIGRFMKTLLNL---EDDLVQLYLSHRELMQA-S-----KEGCWKV
TcelF4E3 DQRKLKALAGSLRNLLLEKIIGAKPLQKLEYFSHQQTQVG-GAGSLAGRM----KGKPTRI
TcelF4E4 SAELMM---DISELLRPL LGDVF--SVFYAPHSVTQERAAAAALAEKKRSRNNRRR--
TcelF4E5 LYAKDV--IPYIRKGLNE-AGLSFTDFIM--GESTFEKDKKPSVSGAK---S-----
TcelF4E6 DFCEKV--VQYVDL FKYTPGIRVARRPI--SSEVTA--D-----
: . :

TcelF4E1 -----
TcelF4E2 PPKYEL
TcelF4E3 TPDFTL
TcelF4E4 -----
TcelF4E5 -----
TcelF4E6 -----

```

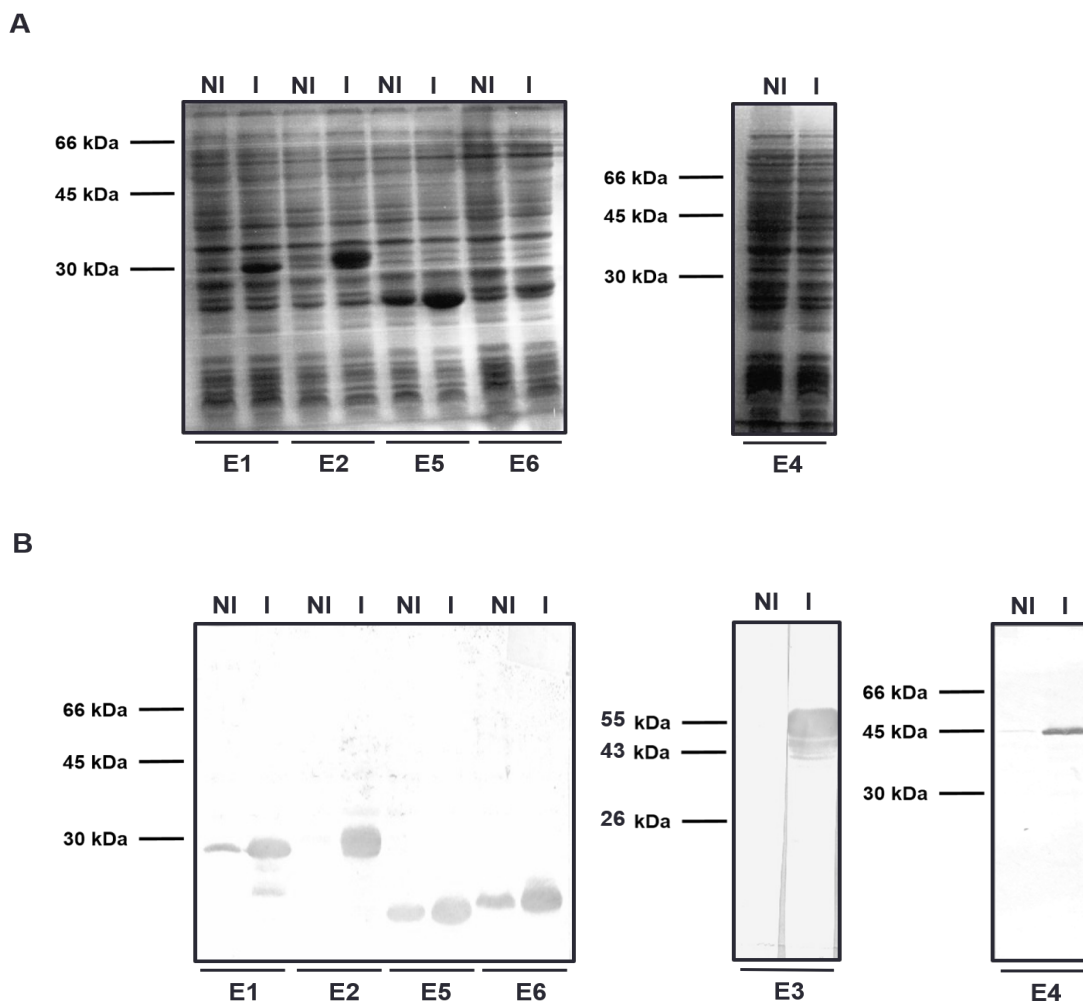
**FIGURA 5 – Alinhamento das sequências dos seis homólogos de eIF4E de *T. cruzi*.** Foram utilizados os programas de alinhamento Clustal Omega e COBALT (*Constraint-based Multiple Alignment Tool*). O número de acesso para estas proteínas no TriTrypDB são TcCLB.506127.170, TcCLB.511301.40, TcCLB.508827.30, TcCLB.509037.40, TcCLB.508661.10 e TcCLB.507519.30, respectivamente. Os resíduos idênticos estão identificados por um asterisco. Os resíduos mais e menos similares por dois pontos e um ponto, respectivamente.

Através do alinhamento dos homólogos de TcelF4E1-6 é possível visualizar que as porções N e C-terminal possuem tamanhos variáveis e que a região N-terminal de TcelF4E3 e TcelF4E4 é intrinsecamente desestruturada. Além disso, podemos notar uma inserção no domínio eIF4E apenas no homólogo TcelF4E1.

## 4.2 INDUÇÃO, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES

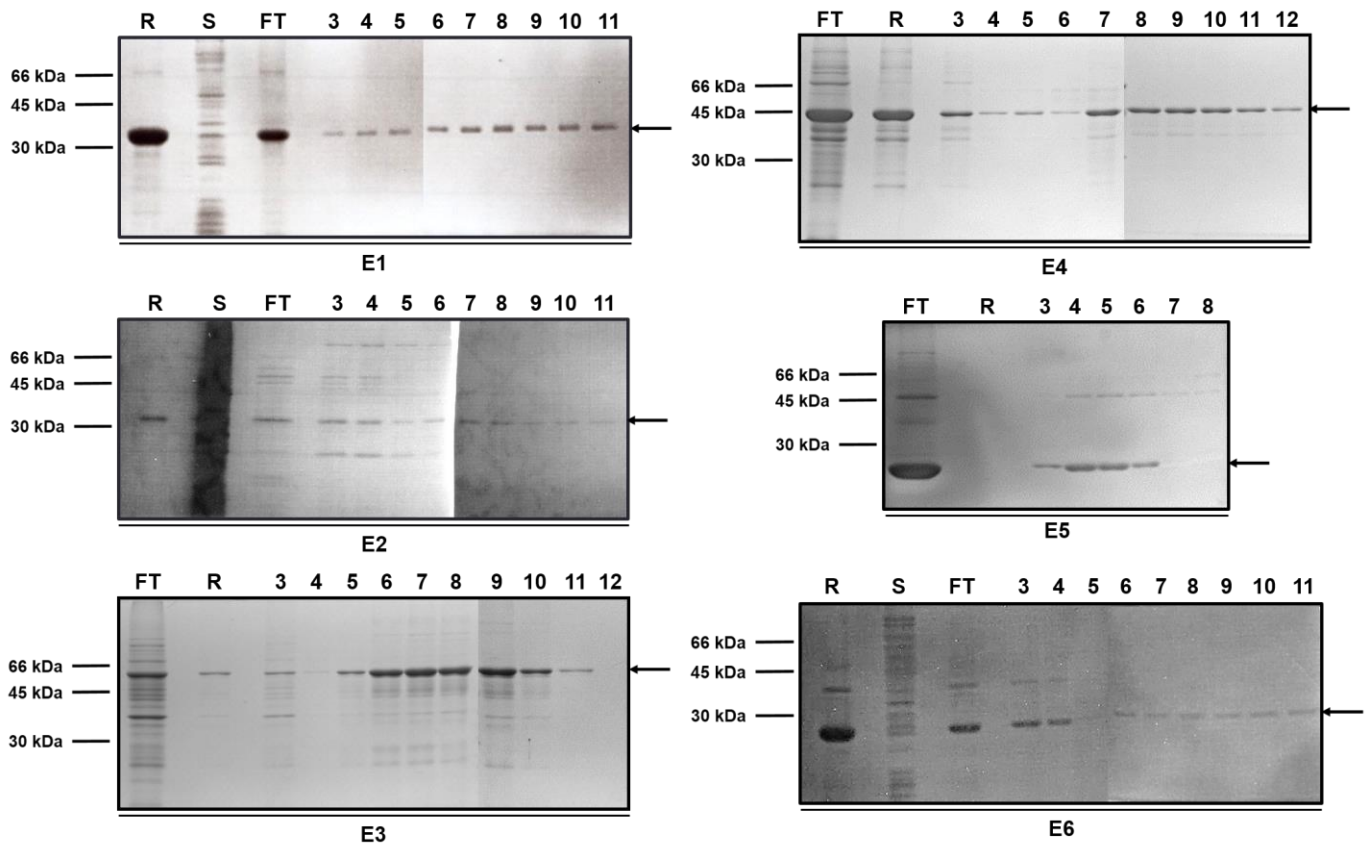
### 4.2.1 Indução e expressão das proteínas TcelF4E1-6

Os vetores contendo os genes de TcelF4E1-6 foram cedidos pela aluna de doutorado Jimena Ferreira da Costa e utilizados para transformação em *E. coli* BL21(DE)pLysS. As colônias crescidas em meio contendo antibiótico para a seleção de clones positivos, foram inoculadas em meio líquido e a expressão da proteína recombinante foi induzida com 1 mM de IPTG (Figura 6A). Após a indução, a expressão das proteínas recombinantes foi verificada por ensaio de *Western blotting* com alíquotas das frações induzidas e não-induzidas (Figura 6B), onde foi possível observar as bandas de tamanho esperado para as proteínas TcelF4E1-6, como descrito no Quadro 1.



**FIGURA 6 – Análise da expressão de TcelF4E1-6. (A)** Eletroforese em gel SDS-PAGE 13% corado com *coomassie blue* G-250 0,1%. **(B)** *Western blotting* de extratos proteicos de *E. coli* incubados com o anticorpo primário anti-histidina na diluição 1:5.000. NI: Extrato de *E. coli* não induzido. I: Extrato de *E. coli* induzido com 1mM de IPTG. E1: TcelF4E1 (massa molecular prevista de 28,9 kDa). E2: TcelF4E2 (massa molecular prevista de 29,6 kDa). E3: TcelF4E3 (massa molecular prevista de 49,7 kDa). E4: TcelF4E4 (massa molecular prevista de 45 kDa). E5: TcelF4E5 (massa molecular prevista de 22,5 kDa). E6: TcelF4E6 (massa molecular prevista de 21,3 kDa).

Posteriormente, foi realizado o teste de solubilidade e observou-se que todas as proteínas estavam sendo expressas nas frações insolúveis, ou seja, estavam presentes no *pellet* obtido na primeira centrifugação após a lise das células, nas condições utilizadas. As proteínas recombinantes TcelF4E1-6 contendo a etiqueta de histidina foram purificadas em condições desnaturantes por cromatografia de afinidade com resina de níquel, seguindo o protocolo do item 3.5.3 (Figura 7).



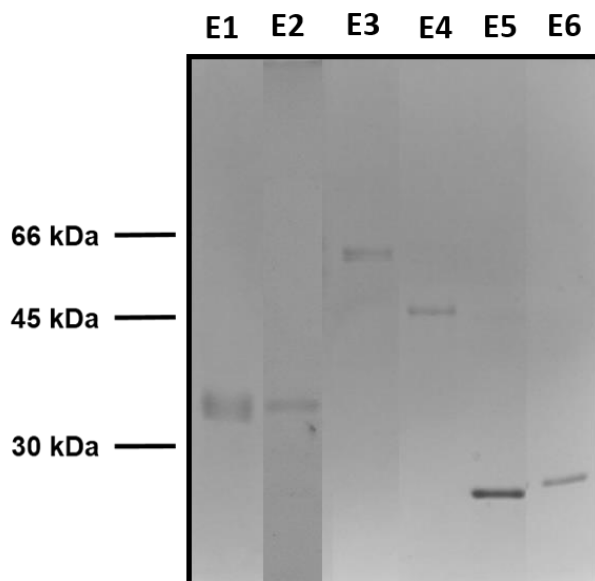
**FIGURA 7 – Perfil eletroforético da purificação das proteínas recombinantes TcelF4E1-6.** Eletroforese em gel SDS-PAGE 13% corado com *coomassie blue* G-250 0,1%. E1-E6: Proteínas recombinantes dos homólogos TcelF4E1-6, respectivamente. R: Resina. S: Fração solúvel. FT: Material não retido na coluna. 3-6: Lavagens da coluna. 7-12: Material eluído da coluna com imidazol.

As frações contendo as proteínas recombinantes purificadas E1 (frações 7 a 11), E2 (frações 8 a 11), E4 (frações 8 a 12) e E6 (frações 7 a 11) foram concentradas por centrifugação em um filtro 10K (Amicon ultra – 0,5mL), seguindo as orientações do fabricante. As frações eluídas das proteínas recombinantes de E3 (frações 5 a 11) e E5 (frações 3 a 6) foram reunidas e submetidas a um gel preparativo. A banda correspondente a cada proteína foi retirada do gel e o método de difusão em tampão PBS foi utilizado para a obtenção das proteínas de interesse em solução, como descrito no item 3.5.3.

Dessa maneira, as proteínas recombinantes TcelF4E1-6 purificadas foram quantificadas no equipamento *Qubit Fluorometric Quantitation* (Thermo Fisher Scientific) – TcelF4E1 (732 ng/μL), TcelF4E2 (652 ng/μL), TcelF4E3 (3,74 μg/μL), TcelF4E4 (2,76 μg/μL), TcelF4E5 (16,2 μg/μL) e TcelF4E6 (776 ng/μL) – e destinadas para imunização de camundongos BALB/c ou *Swiss*, visando a obtenção de anticorpos policlonais. Alternativamente, as proteínas recombinantes TcelF4E3,



TcelF4E4 e TcelF4E5 foram enviadas para produção de anticorpos policlonais em coelhos.



**FIGURA 8 – Proteínas recombinantes TcelF4E1-6 purificadas.** Eletroforese em gel SDS-PAGE 13% corado com *coomassie blue* G-250 0,1%. Após quantificação pelo *Qubit Fluorometric Quantitation* (Thermo Fisher Scientific) das frações purificadas, 500 ng de cada fração foram aplicados no gel. E1-E6: Proteínas recombinantes dos homólogos de TcelF4E1-6, respectivamente.

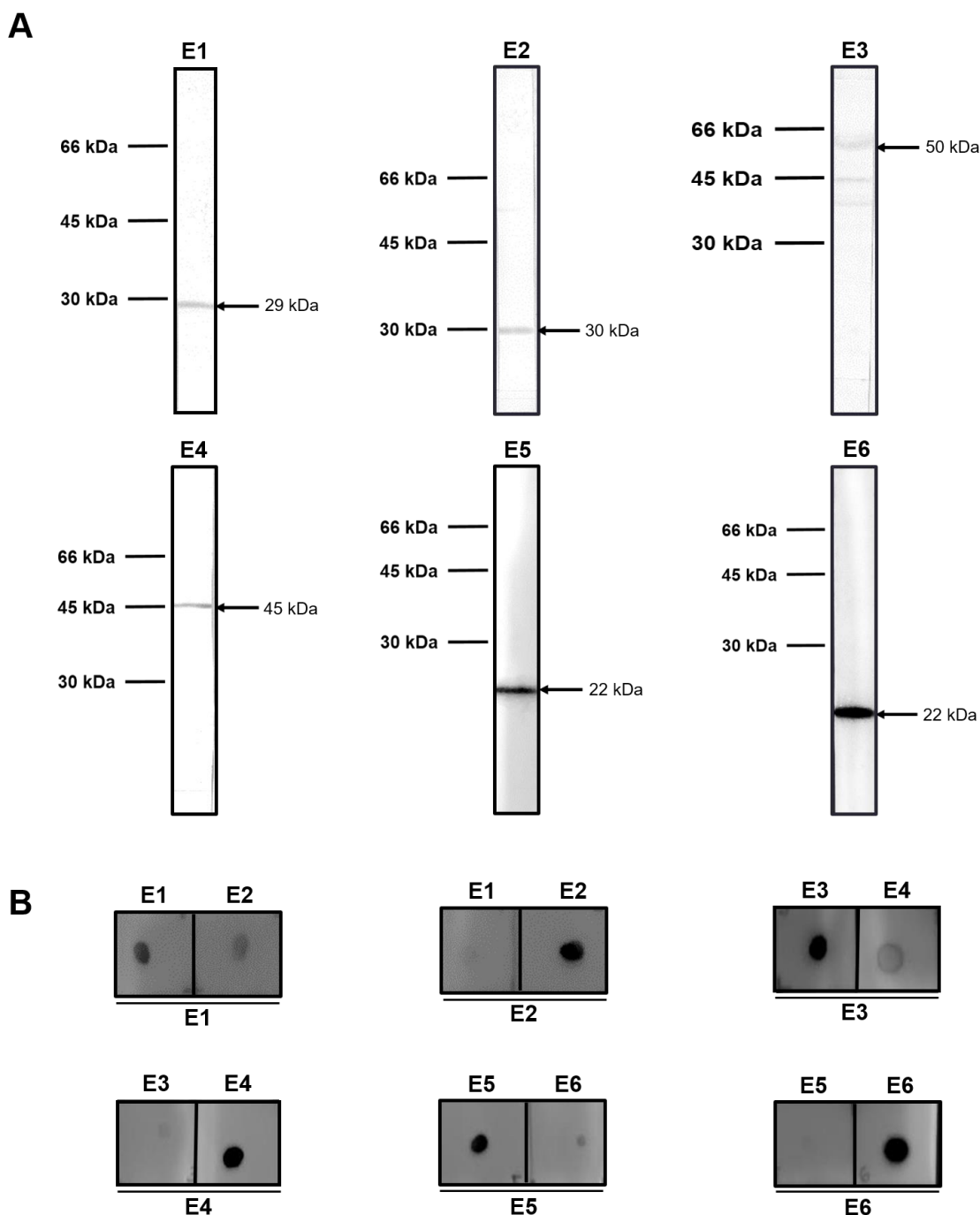
#### 4.3 OBTENÇÃO DOS SOROS POLICLONAIS

Antes de iniciar a inoculação das proteínas, alíquotas de soro pré-imune de cada camundongo foram avaliadas por ensaios de *Western blotting* contra extrato proteico de *T. cruzi* e nenhum camundongo apresentou reatividade contra proteínas do parasito. Da mesma forma, após as inoculações os soros foram testados em relação à especificidade de reconhecimento das proteínas TcelF4E1-6 em extrato proteico de *T. cruzi* (Figuras 9).

Ao final das inoculações todos os camundongos imunizados com a proteína recombinante TcelF4E1 produziram anticorpos policlonais que reconhecem a proteína de tamanho esperado (~29 kDa). O soro do camundongo 1 apesar de apresentar maior titulação, também apresentou reatividade contra proteínas inespecíficas. O anti-soro obtido do camundongo 3 foi o mais específico (Figura 9A – E1) e, portanto, foi o soro utilizado nos ensaios de *Western blotting* e imunofluorescência indireta.

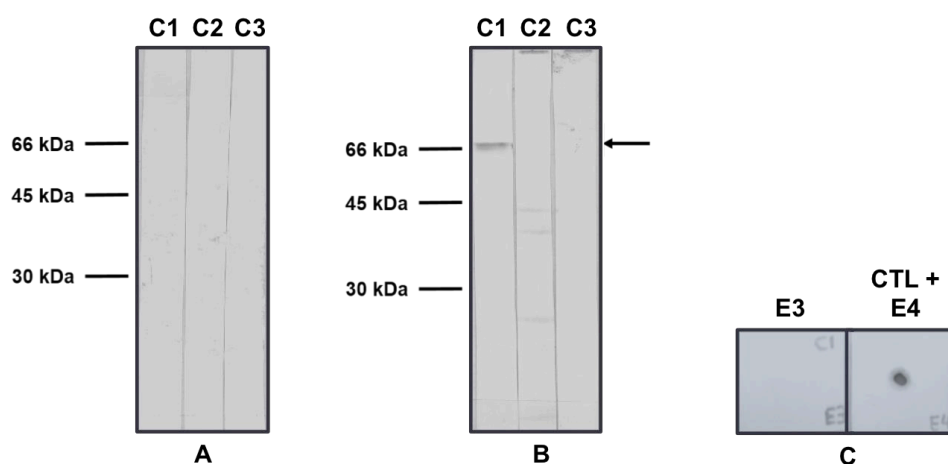
Quanto aos camundongos imunizados com a proteína recombinante TcelF4E2, apenas os anticorpos obtidos dos camundongos 1 e 2 foram reativos e reconheceram a proteína em questão com a banda de tamanho esperado (~28 kDa).

No entanto, como o anti-soro produzido pelo camundongo 1 reconhece proteínas inespecíficas, o anti-soro do camundongo 2 foi utilizado nos demais ensaios (Figura 9A – E2).



**FIGURA 9 – Ensaios de *Western blotting* para análise da especificidade dos anti-soros produzidos contra as proteínas TcelF4E1-6. (A)** Extratos proteicos das formas epimastigotas de *T. cruzi* ( $10^7$  células) foram analisados por ensaios de *Western blotting* com anti-soros obtidos após as imunizações. **(B)** As proteínas recombinantes purificadas (500 ng) foram analisados por ensaios de *Dot blotting* com os anti-soros após as imunizações para confirmar a especificidade dos anticorpos policlonais. E1: Anti-TcelF4E1 (1:100). E2: Anti-TcelF4E2 (1:100). E3: Anti-TcelF4E3 (1:100). E4: Anti-TcelF4E4 (1:2.000). E5: Anti-TcelF4E5 (1:100). E6: Anti-TcelF4E6 (1:500). Os anticorpos para as proteínas TcelF4E1, TcelF4E2, TcelF4E4 e TcelF4E6 foram obtidos em camundongos e para as proteínas TcelF4E3 e TcelF4E5 foram obtidos em coelhos.

Ao final das inoculações com a proteína recombinante TcelF4E3, nenhum camundongo produziu anticorpo que reconhecesse a proteína com marcação próxima da esperada (~50 kDa). Entretanto, um camundongo (C1) produziu anti-soro com reatividade contra proteína de aproximadamente 66 kDa, indicada pela seta na Figura 10B. Para confirmar que se tratava de uma marcação realmente inespecífica, esse soro policlonal (C1) foi testado contra a proteína TcelF4E3 recombinante, e não houve reatividade contra proteína (Figura 10C). Sendo assim, não foi possível obter um soro policlonal específico para a proteína TcelF4E3 em camundongo.



**FIGURA 10 – Ensaio de *Western blotting* para análise da especificidade dos anti-soros produzidos contra a proteína TcelF4E3.** Extratos proteicos das formas epimastigotas de *T. cruzi* ( $10^7$  células) foram incubados com soros pré-ímmes (A) e com soros obtidos após a imunização (B) na diluição de 1:100. C1, C2 e C3: camundongos 1, 2 e 3, respectivamente. (C) *Dot blotting* com a proteína recombinante de TcelF4E3 incubado com anti-soro anti-TcelF4E3 produzido pelo camundongo 1 na diluição 1:100. Como controle positivo da técnica, a proteína recombinante TcelF4E4 foi testada com o soro anti-TcelF4E4 na diluição de 1:2.000.

Após as inoculações com a proteína recombinante TcelF4E4, todos os anti-soros produzidos nos camundongos reconheceram uma banda de tamanho esperado (~45 kDa) correspondente à proteína de interesse. Entretanto, todos os anti-soros obtidos reconhecem bandas inespecíficas quando diluídos 100 vezes. No entanto, quando aumentamos a titulação para 1:2.000 observamos que o soro do camundongo 1 reconhece apenas a banda correspondente ao tamanho esperado da proteína de interesse (Figura 9A – E4). Por esse motivo, para os ensaios subsequentes de *Western blotting* o soro do camundongo 1 foi utilizado nesta diluição. Para os ensaios de imunofluorescência indireta, procedemos com a purificação do anticorpo.

Por fim, ao final das inoculações com a proteína recombinante TcelF4E6, só obtivemos o anti-soro de dois camundongos, pois o camundongo 1 foi a óbito durante o processo de imunizações. Dentre os dois restantes, apenas o camundongo 3

produziu anticorpos policlonais que reconheceram uma banda de aproximadamente 21 kDa, correspondente ao tamanho esperado da proteína TcelF4E6. Sendo assim, apenas este soro foi utilizado nos ensaios de *Western blotting* e imunofluorescência indireta (Figura 9A – E6).

Como descrito no item 3.6.1, as proteínas recombinantes TcelF4E3, TcelF4E4 e TcelF4E5 purificadas também foram enviadas para a inoculação e produção de anti-soro policlonal em coelho. No entanto, os soros pré-ímmunes destes animais apresentam reatividade contra inúmeras proteínas, quando testados em extrato proteico de *T. cruzi*. Por isso, foram necessárias as purificações desses soros com as respectivas proteínas recombinantes e a especificidade dos soros purificados foi verificada (Figura 9A – E3 e E5). Como o soro produzido em coelho para a proteína TcelF4E4 reconheceu muitas bandas inespecíficas, optamos por utilizar o soro produzido em camundongo (Figura 9A – E4).

Além disso, para confirmar a especificidade dos soros policlonais e ter certeza que eles não reconheciam outro homólogo de tamanho próximo, foi realizado o ensaio de *Dot blotting* (Figura 9B). Uma vez que os anticorpos policlonais de TcelF4E1-6 foram produzidos e purificados, nós iniciamos os experimentos de expressão e a localização dessas proteínas.

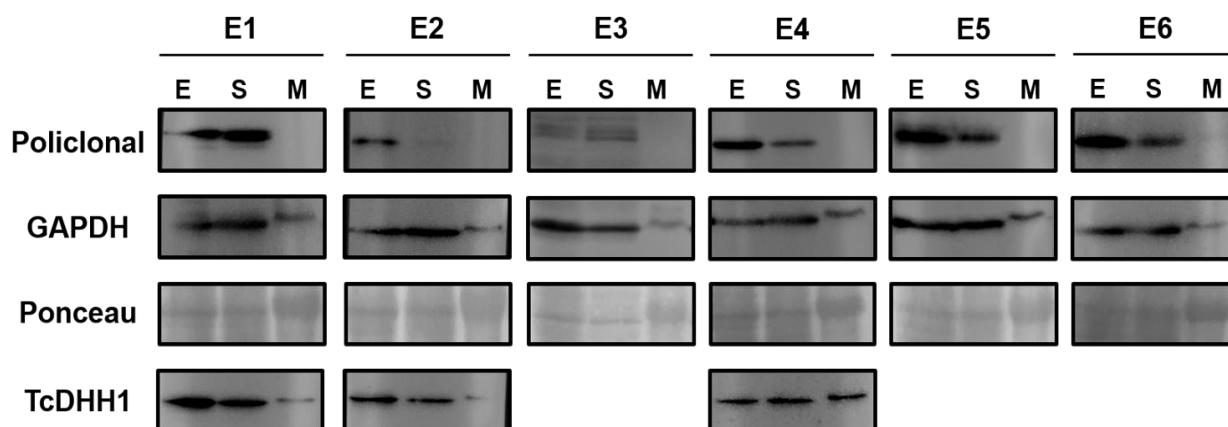
#### 4.4 ANÁLISE DA EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO DOS FATORES DE INÍCIO DE TRADUÇÃO TcelF4E1-6 AO LONGO DA METACICLOGÊNESE

##### 4.4.1 Os fatores de início de tradução TcelF4E1-6 são regulados ao longo da metaciclogênese *in vitro*

Os soros policlonais descritos no item 4.3 foram utilizados para realizar a análise da expressão dos fatores de tradução nas formas epimastigotas em fase logarítmica de crescimento, epimastigotas sob estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicas (Figura 11). Os extratos proteicos das três formas de *T. cruzi* foram quantificados no *Qubit Fluorometric Quantitation* (Thermo Fisher Scientific) e posteriormente, foi definida a quantidade de 200 µg de proteína para as análises de expressão por *Western blotting*. Como controles positivos de expressão proteica foram utilizadas as proteínas TcGAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e TcDHH1. No entanto, não foi possível visualizar as bandas correspondentes a

proteína TcDHH1 nas membranas correspondentes a TcelF4E3, E5 e E6, devido a problemas durante a técnica de revelação.

Como mostra a Figura 11, todos os homólogos de eIF4E em *T. cruzi*, com exceção de TcelF4E2, são expressos tanto nas formas replicativas quanto nas formas epimastigotas sob estresse nutricional. No entanto, nenhum desses fatores é expresso nas formas tripomastigotas metacíclicas, indicando que a expressão destas proteínas seja regulada ao longo do processo de diferenciação.

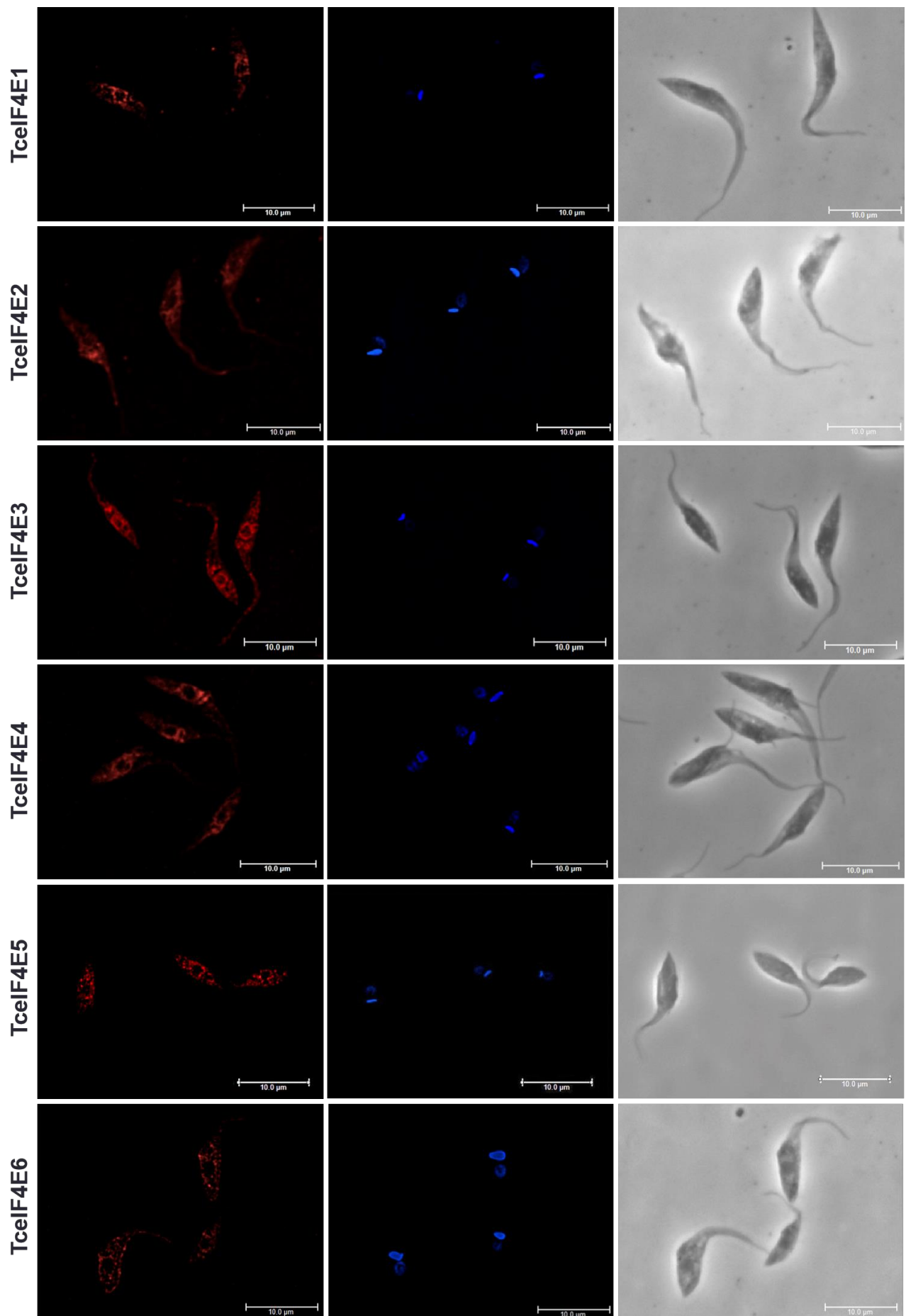


**FIGURA 11 – Análise da expressão dos fatores de início de TcelF4E1-6 na metaciclogênese.** Western blotting utilizando o extrato de *T. cruzi* nas formas epimastigotas (E), epimastigotas sob estresse nutricional (S) e tripomastigotas metacíclicos (M) incubados com os soros policlonais anti-TcelF4E1, TcelF4E2, TcelF4E3, TcelF4E4, TcelF4E5 e TcelF4E6 diluídos 1:150, 1:1.000, 1:100, 1:2.000, 1:500 e 1:500, respectivamente. O ponceau, o soro anti-GAPDH diluído 1:200 e o soro anti-DHH1 diluído 1:500 foram utilizados como controle.

#### 4.4.2 Os fatores de início de tradução TcelF4E1-6 estão localizados no citoplasma do parasito

A fim de determinar a localização subcelular dos homólogos TcelF4E1-6, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta, e as imagens foram processadas por deconvolução tridimensional através do software LAS - AF – Leica. Todas as proteínas em questão estão dispersas no citoplasma das formas replicativas do *T. cruzi* (Figura 12) e não apresentam localização nuclear. Observamos que as proteínas TcelF4E1, TcelF4E3 e TcelF4E4 estão distribuídas na região perinuclear. Entretanto, após uma análise mais criteriosa, observamos que o padrão de marcação ao redor do núcleo é distinto para cada proteína. TcelF4E1 apresenta padrão de marcação granular ao redor do núcleo. Por outro lado, a proteína TcelF4E3 está dispersa pelo citoplasma, com marcação perinuclear contínua e TcelF4E4 está

distribuída preferencialmente na região anterior ao parasito, mais especificamente circundando o núcleo e o cinetoplasto. A proteína TcelF4E2 está distribuída por todo o parasito e em algumas células esta marcação se assemelha ao padrão de marcação de TcelF4E4, na parte anterior do parasito. Observamos também que as proteínas TcelF4E5 e TcelF4E6 apresentam um padrão de fluorescência granular distribuído por todo o citoplasma.



**FIGURA 12 –** Localização subcelular de TcelF4E1-6 nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Ensaio de imunofluorescência indireta com parasitos nas formas epimastigotas ( $10^6$  céls) marcados com o

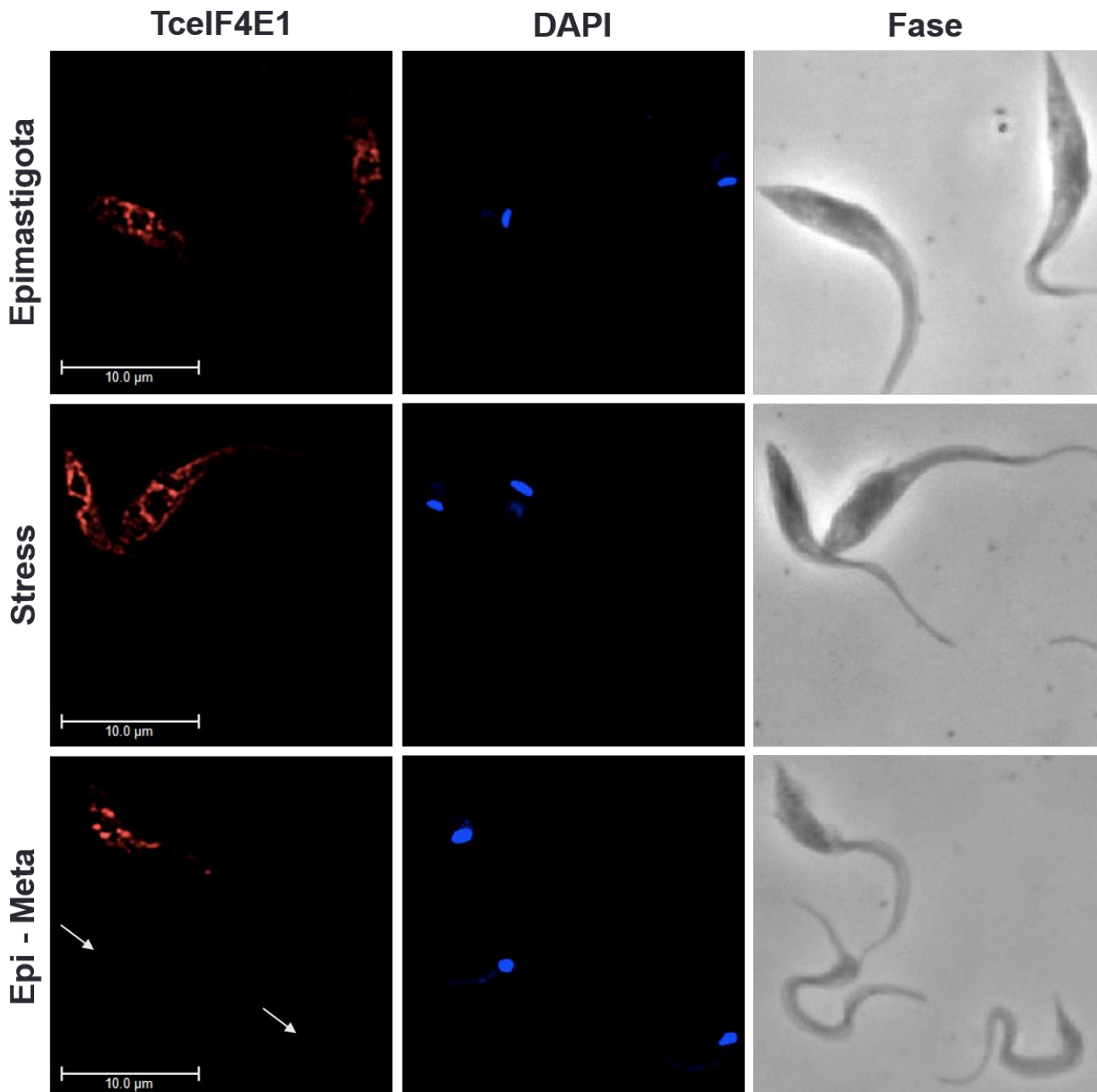
anticorpo policlonal anti-TcelF4E1 1:50, anti-TcelF4E2 1:50, anti-TcelF4E3 1:25, anti-TcelF4E4 1:1.000, TcelF4E5 1:50 e TcelF4E6 1:100. O anticorpo secundário anti-IgG de camundongo ou coelho conjugado com o fluoróforo Alexa 488 foi diluído 1:400 e a cor do fluoróforo foi trocada manualmente. O DNA do núcleo e do cinetoplasto foram corados com DAPI. Barra = 10 µM.

A análise da localização celular dos fatores de tradução eIF4E durante a diferenciação celular é um dos objetivos deste trabalho. Entretanto, a pequena quantidade de anti-soros purificados obtidos, bem como a baixa titulação dos mesmos, dificultou a análise da localização das proteínas TcelF4E2, TcelF4E3, TcelF4E5 e TcelF4E6 durante a diferenciação celular do parasito. Assim, apresentaremos os resultados obtidos para as proteínas de TcelF4E1 e TcelF4E4.

#### 4.4.3 Localização celular da proteína TcelF4E1 ao longo da metaciclogênese

Para determinar a localização celular da proteína TcelF4E1 nas formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicas, foi realizado primeiramente o ensaio de metaciclogênese *in vitro*, seguido de imunofluorescência indireta utilizando o anticorpo policlonal obtido em camundongo. Como pode ser visualizado na Figura 13, nas formas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional, TcelF4E1 apresenta localização citoplasmática, enquanto nas formas tripomastigotas metacíclicas não é possível observar nenhuma marcação, corroborando os resultados obtidos nas análises da expressão proteica. Além disso, assim como nas formas replicativas, TcelF4E1 apresenta marcação perinuclear granular quando o parasito é submetido ao estresse nutricional. No quadro identificado com as formas tripomastigotas metacíclicas (indicados pelas setas), observamos marcação apenas em parasitos que ainda não foram capazes de se diferenciar para tripomastigota metacíclico.



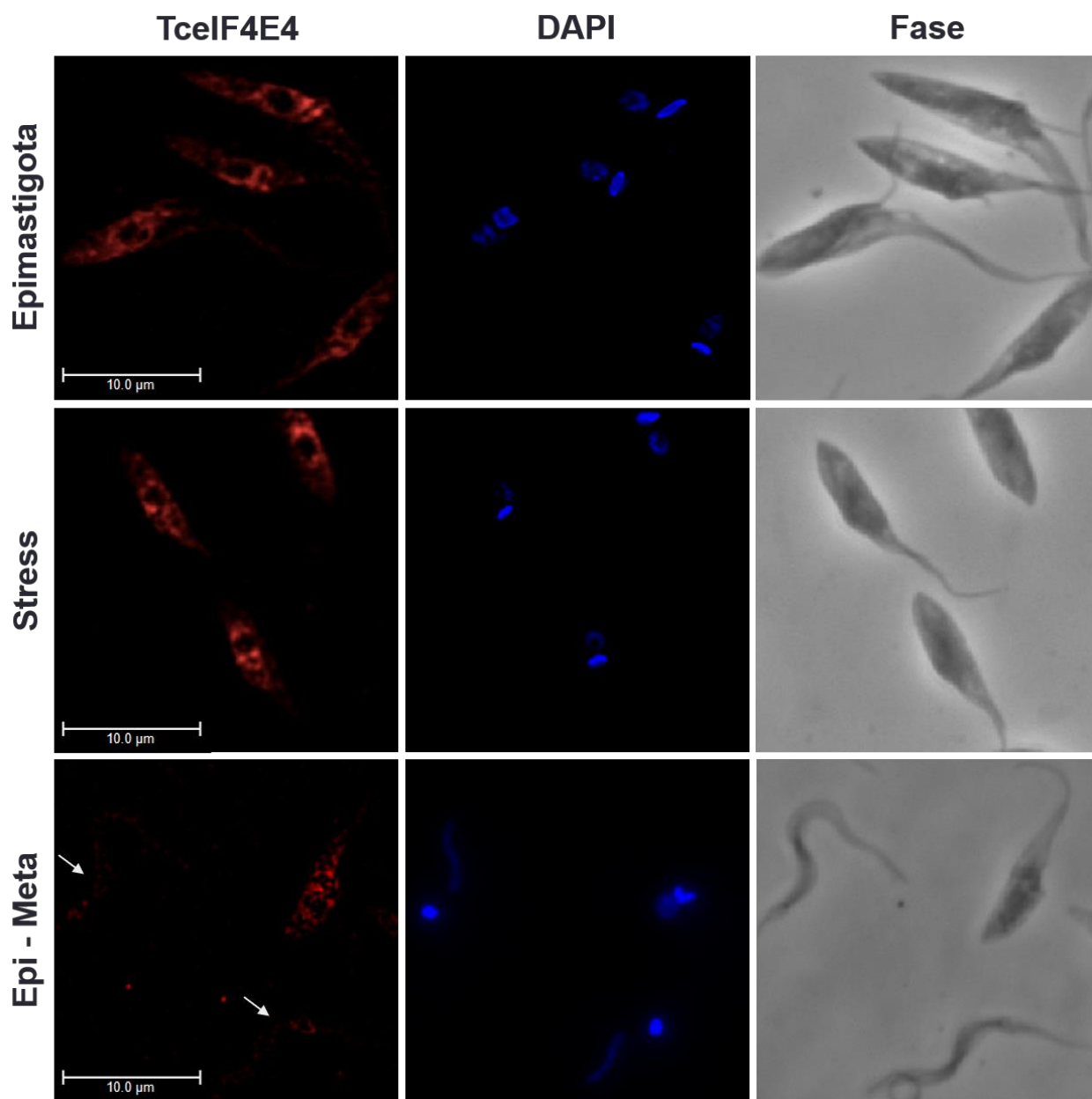


**FIGURA 13 – Localização subcelular de TcelF4E1 ao longo da metaciclógênese in vitro de *T. cruzi*.** Ensaio de imunofluorescência indireta com parasitos nas formas epimastigotas (**Epimastigota**), epimastigotas sob estresse nutricional (**Stress**) e tripomastigota metacíclicos (**Epi-Meta**) marcados com o anticorpo policlonal anti-TcelF4E1 diluído 1:50 e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com o fluoróforo Alexa 488 e a cor do fluoróforo foi trocada manualmente. O DNA do núcleo e do cinetoplasto foram corados com DAPI. Barra = 10  $\mu$ m.

#### 4.4.4 Localização celular da proteína TcelF4E4 ao longo da metaciclógênese

Assim como TcelF4E1, TcelFE4 teve a sua a localização celular analisada nas formas epimastigotas, epimastigotas sob estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicas, por ensaios de imunofluorescência indireta. Como pode ser visualizado na Figura 14, nas formas epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional,

TcelF4E4 apresenta localização citoplasmática, enquanto nas formas tripomastigotas metacíclicas é possível observar uma marcação muito reduzida (indicados pelas setas), quando comparada às outras formas. Além disso, como descrito anteriormente, tanto nas formas epimastigotas quanto nas formas epimastigotas sob estresse, a proteína TcelF4E4 está preferencialmente localizada na parte anterior do parasito, com marcação mais intensa ao redor do núcleo e do cinetoplasto.



**FIGURA 14 – Localização subcelular de TcelF4E4 ao longo da metaciclogênese in vitro de *T. cruzi*.** Ensaio de imunofluorescência indireta com parasitos nas formas epimastigotas (**Epimastigota**), epimastigotas sob estresse nutricional (**Stress**) e tripomastigota metacíclicos (**Epi-Meta**) marcados com o anticorpo policlonal anti-TcelF4E4 diluído 1:1.000 e com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com o fluoróforo Alexa 488 e a cor do fluoróforo foi trocada manualmente. O DNA do núcleo e do cinetoplasto foram corados com DAPI. Barra = 10 µM.

#### 4.5 ANÁLISE DA ASSOCIAÇÃO DOS HOMÓLOGOS DE TcelF4E COM POLISSOMOS

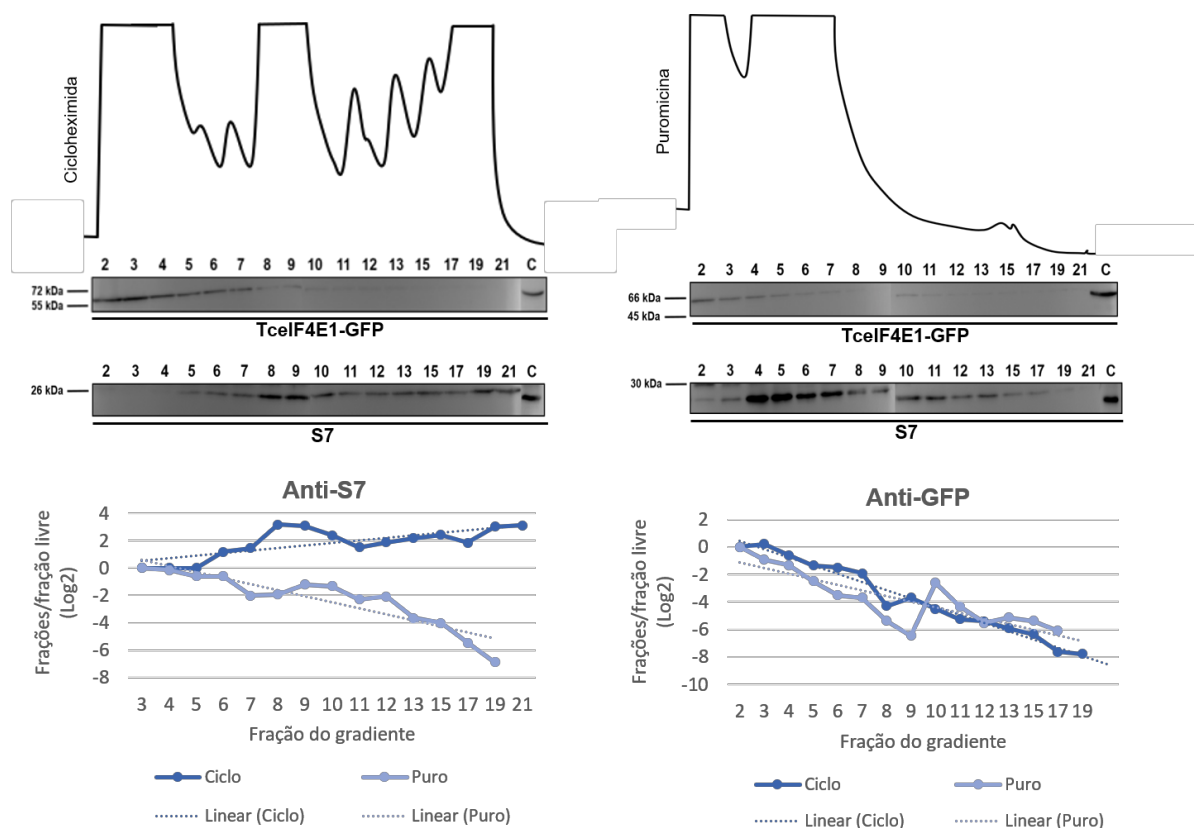
Para investigar se os homólogos TcelF4E1-6 estão envolvidos com o processo de tradução, analisamos a associação destas proteínas com as frações polissomais e não polissomais. Para tanto, parasitos tranfectantes expressando as proteínas de interesse fusionadas a proteína verde fluorescente (GFP) foram tratados com cicloheximida ou puromicina. Após a lise celular, os extratos obtidos foram fracionados em gradientes de sacarose (Figuras 15-22). A distribuição da proteína S7 foi analisada ao longo das frações dos gradientes e serviu como parâmetro de comparação para as demais proteínas em estudo.

Foram obtidas duplicatas biológicas de gradientes de sacarose dos parasitos tratados com cicloheximida ou puromicina para os homólogos TcelF4E1, E2, E5 e E6. Os homólogos TcelF4E3 e E4 sofrem intensa degradação durante o processo, e mesmo após o tratamento dos extratos proteicos com vários inibidores de proteases, não foi possível visualizar a distribuição destas proteínas ao longo dos gradientes. No momento, estamos padronizando diferentes condições para otimizar o processo. Entretanto, para o homólogo TcelF4E4, conseguimos obter um resultado preliminar a partir de parasitos selvagens. Este resultado está descrito no tópico 4.5.1.

A análise da distribuição da proteína ribossomal S7 ao longo do gradiente, após o tratamento com o cicloheximida ou puromicina, coincide com a sedimentação esperada para o processo de tradução. Quando o parasito é tratado com cicloheximida, uma droga que bloqueia a elongação de tradução mantendo os polissomos, verificamos a presença de S7 desde as frações que contém as subunidades ribossomais 40S, 60S, a fração monossomal 80S e em todas das frações polissomais. Por outro lado, quando o parasito é tratado com puromicina, uma droga que bloqueia o processo de tradução na etapa da segunda ligação peptídica, promovendo a dissociação dos polissomos, observamos um aumento da intensidade das proteínas nas frações iniciais do gradiente e uma redução relativa da mesma nas frações polissomais. O gráfico da quantificação da distribuição de S7 ao longo do gradiente, demonstra essa dinâmica (Figura 15).

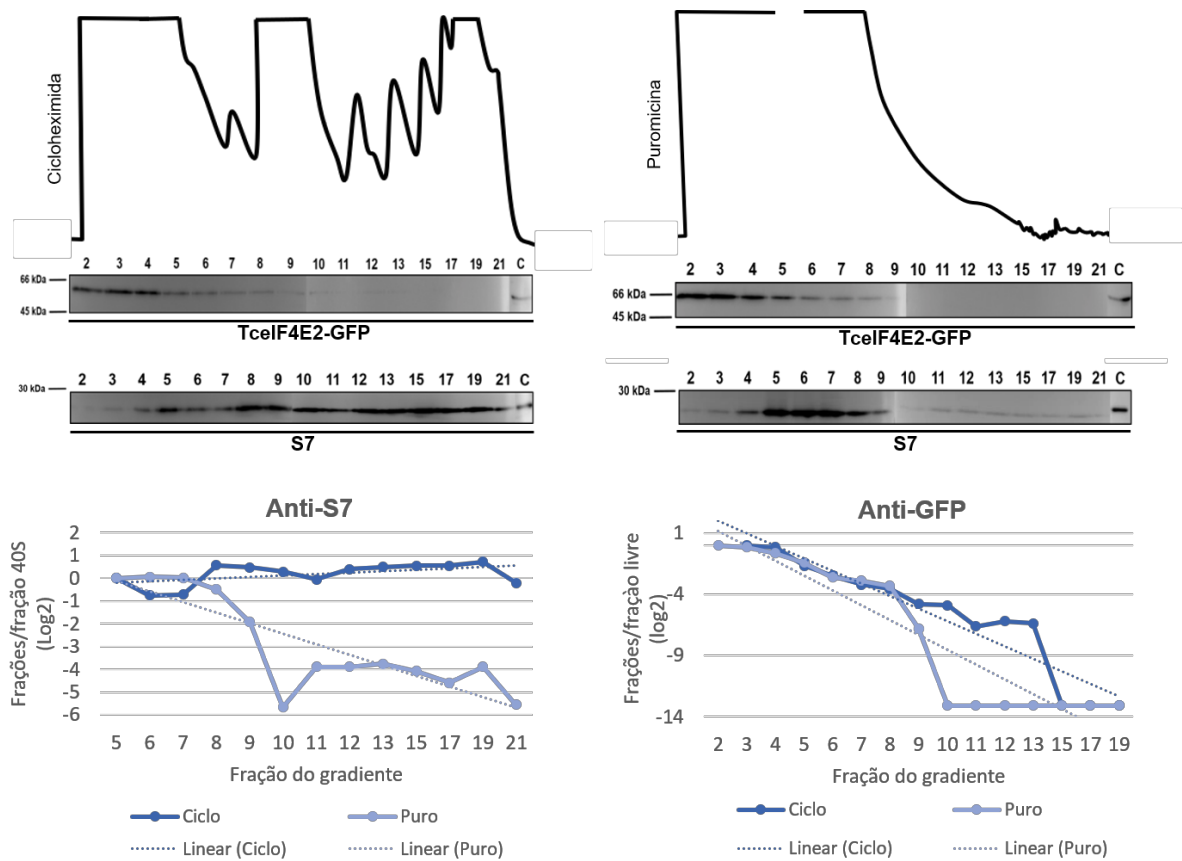
Ao compararmos o perfil de distribuição de TcelF4E1-GFP com o perfil de distribuição da proteína S7, percebemos uma dinâmica diferente (Figura 15). Este resultado pode ser visualizado pela linha de tendência do gráfico (TcelF4E1 – Anti-GFP), em que ciclo e puro possuem o mesmo padrão, ou seja, uma redução da

proteína nas frações polissomais, independente do tratamento com cicloheximida ou puromicina. Sendo assim, este resultado sugere que TcelF4E1 não está associado aos polissomos.



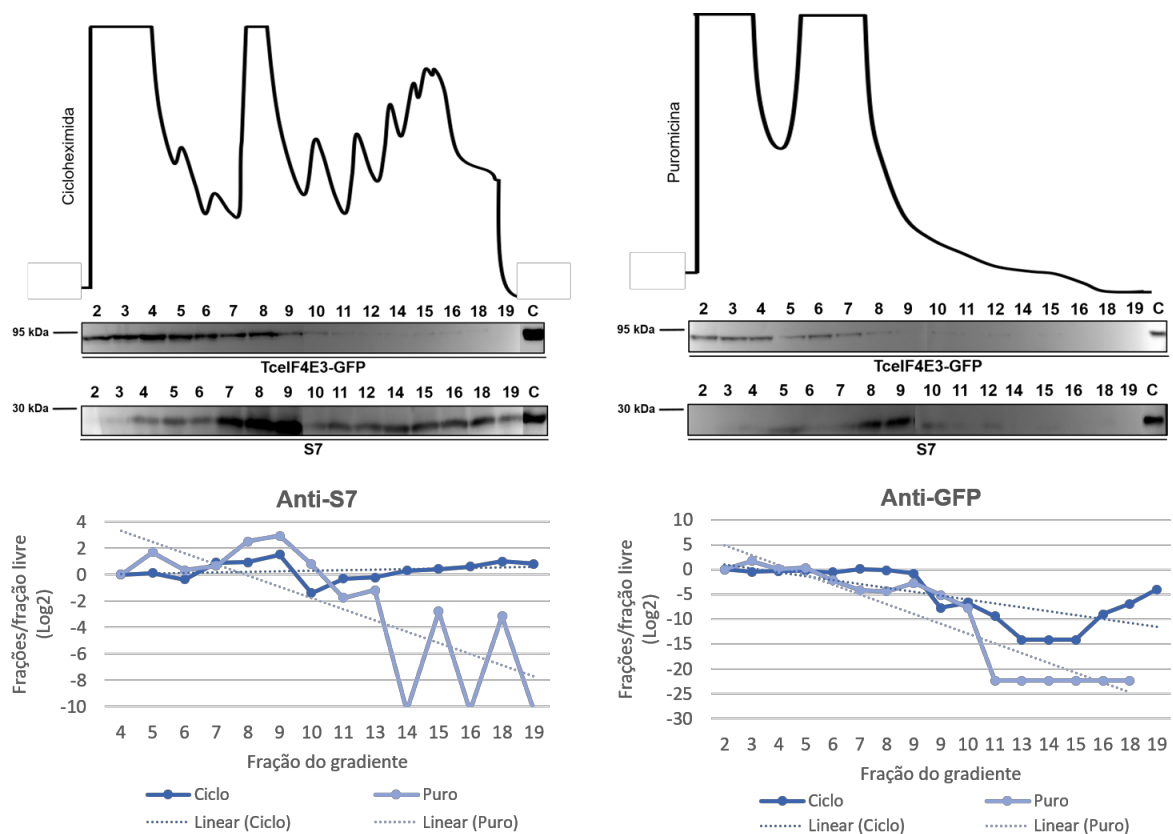
**FIGURA 15 – Análise da associação do homólogo TcelF4E1 a polissomos.** Os parasitos foram tratados com cicloheximida ou puromicina como descrito no item 3.8. As frações foram analisadas por *Western blotting* com o soro contra a proteína GFP diluído 1:50. O soro anti-S7 diluído 1:250 foi utilizado como controle. 2-21: Frações do gradiente. C: Controle com extrato de epimastigota de *T. cruzi* ( $10^7$  células). A quantificação das proteínas nas frações dos gradientes foi realizada no programa ImageJ e os valores obtidos estão representados nos gráficos. O eixo X representa os números das frações ao longo do gradiente e o eixo Y representa a razão entre a intensidade da banda de cada fração do gradiente e a intensidade da banda da primeira fração livre de ribossomos. Os valores estão representados em  $\log_2$ . A reta linear corresponde a linha de tendência da distribuição da proteína em estudo ao longo do gradiente.

Por outro lado, quando os parasitos expressando TcelF4E2-GFP foram tratados com puromicina, ocorreu o deslocamento dessa proteína para as frações mais leves com acentuada redução nas frações polissomais, indicando que essa proteína é afetada pela dissociação dos polissomos. Além disso, podemos notar uma similaridade nas linhas de tendência do gráfico de TcelF4E2 quando comparados com os de S7, sugerindo um possível envolvimento de TcelF4E2 no processo de tradução (Figura 16).



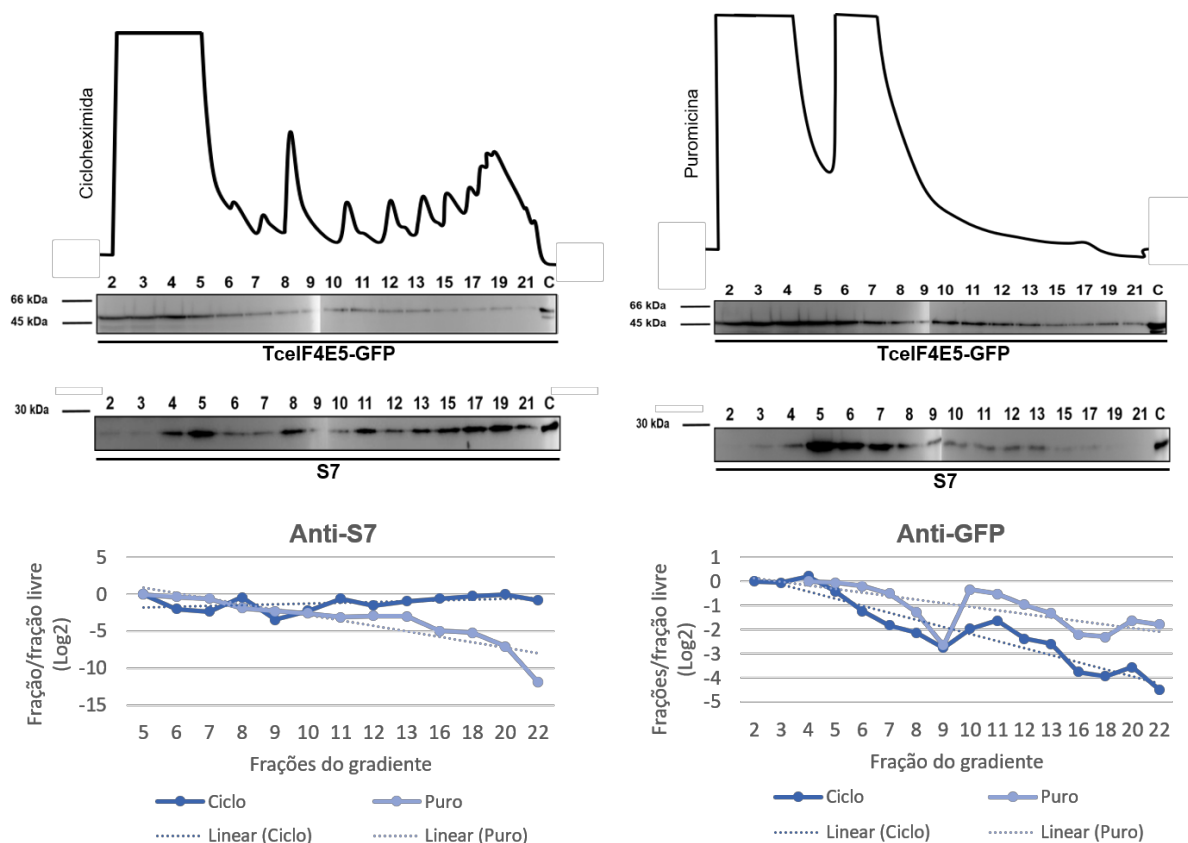
**FIGURA 16 – Análise da associação do homólogo TcelF4E2 a polissomos.** Os parasitos foram tratados com cicloheximida ou puromicina como descrito no item 3.8. As frações foram analisadas por *Western blotting* com o soro contra a proteína GFP diluído 1:50. O soro anti-S7 diluído 1:250 foi utilizado como controle. 2-21: Frações do gradiente. C: Controle com extrato de epimastigota de *T. cruzi* ( $10^7$  células). A quantificação das proteínas nas frações dos gradientes foi realizada no programa ImageJ e os valores obtidos estão representados nos gráficos. O eixo X representa os números das frações ao longo do gradiente e o eixo Y representa a razão entre a intensidade da banda de cada fração do gradiente e a intensidade da banda da primeira fração livre de ribossomos. Os valores estão representados em  $\log_2$ . A reta linear corresponde a linha de tendência da distribuição da proteína em estudo ao longo do gradiente.

O padrão de distribuição da proteína TcelF4E3-GFP é similar a distribuição da proteína ribossomal S7 ao longo do gradiente. Quando os parasitos expressando TcelF4E3-GFP foram tratados com puromicina, ocorreu o deslocamento dessa proteína para as frações mais leves, indicando que essa proteína é afetada pela dissociação dos polissomos, sugerindo o envolvimento de TcelF4E3-GFP no processo de tradução (Figura 17).



**FIGURA 17 - Análise da associação do homólogo TcelF4E3 a polissomos.** Os parasitos foram tratados com cicloheximida ou puromicina como descrito no item 3.8. As frações foram analisadas por *Western blotting* com o soro contra a proteína GFP diluído 1:50. O soro anti-S7 diluído 1:250 foi utilizado como controle. 2-21: Frações do gradiente. C: Controle com extrato de epimastigota de *T. cruzi* ( $10^7$  células). A quantificação das proteínas nas frações dos gradientes foi realizada no programa ImageJ e os valores obtidos estão representados nos gráficos. O eixo X representa os números das frações ao longo do gradiente e o eixo Y representa a razão entre a intensidade da banda de cada fração do gradiente e a intensidade da banda da primeira fração livre de ribossomos. Os valores estão representados em  $\log_2$ . A reta linear corresponde a linha de tendência da distribuição da proteína em estudo ao longo do gradiente.

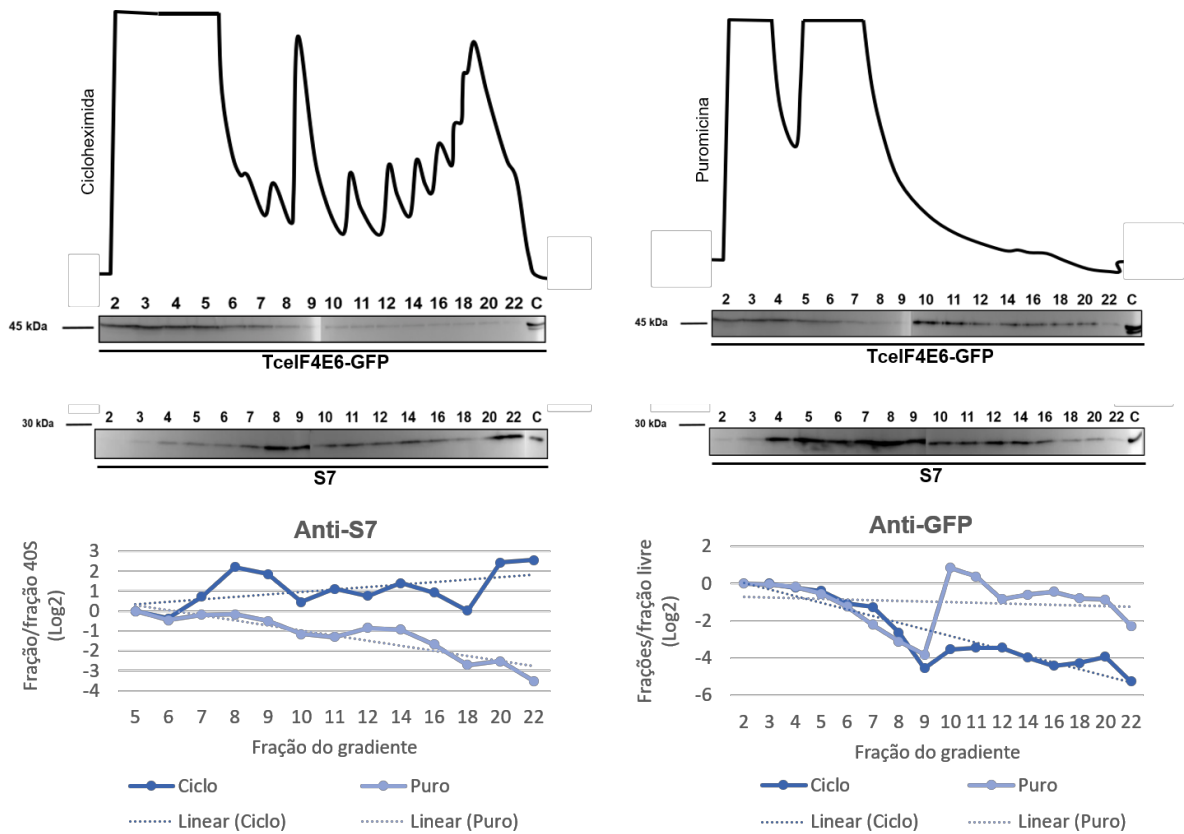
Os homólogos TcelF4E5 e TcelF4E6, possuem um padrão de distribuição similar (Figuras 18 e 19). Quando os parasitos transfectantes foram tratados com cicloheximida, TcelF4E5 e TcelF4E6 distribuem-se desde as frações livres de ribossomos até as frações polissomais mais pesadas. Entretanto, quando os parasitos foram tratados com puromicina observamos um deslocamento significativo das proteínas para as frações polissomais. Essa dinâmica de distribuição é oposta à da proteína S7, indicando que TcelF4E5 e TcelF4E6 não estão envolvidas no processo de iniciação da tradução.



**FIGURA 18 – Análise da associação do homólogo TcelF4E5 a polissomos.** Os parasitos foram tratados com cicloheximida ou puromicina como descrito no item 3.8. As frações foram analisadas por *Western blotting* com o soro contra a proteína GFP diluído 1:50. O soro anti-S7 diluído 1:250 foi utilizado como controle. 2-22: Frações do gradiente. C: Controle com extrato de epimastigotas de *T. cruzi* ( $10^7$  células). A quantificação das proteínas nas frações dos gradientes foi realizada no programa ImageJ e os valores obtidos estão representados nos gráficos.

Diante destes resultados, nós levantamos a hipótese de que estes fatores pudessem estar associados a complexos ribonucleoproteicos (RNPs) pesados, como por exemplo, os grânulos de RNA. Para verificar esta possibilidade, foi realizado um ensaio de co-localização por imunofluorescência indireta entre TcelF4E5 e TcelF4E6 e a proteína TcDHH1 (Figura 20), uma proteína marcadora de grânulos de RNA em *T. cruzi* (Holetz et al., 2010).

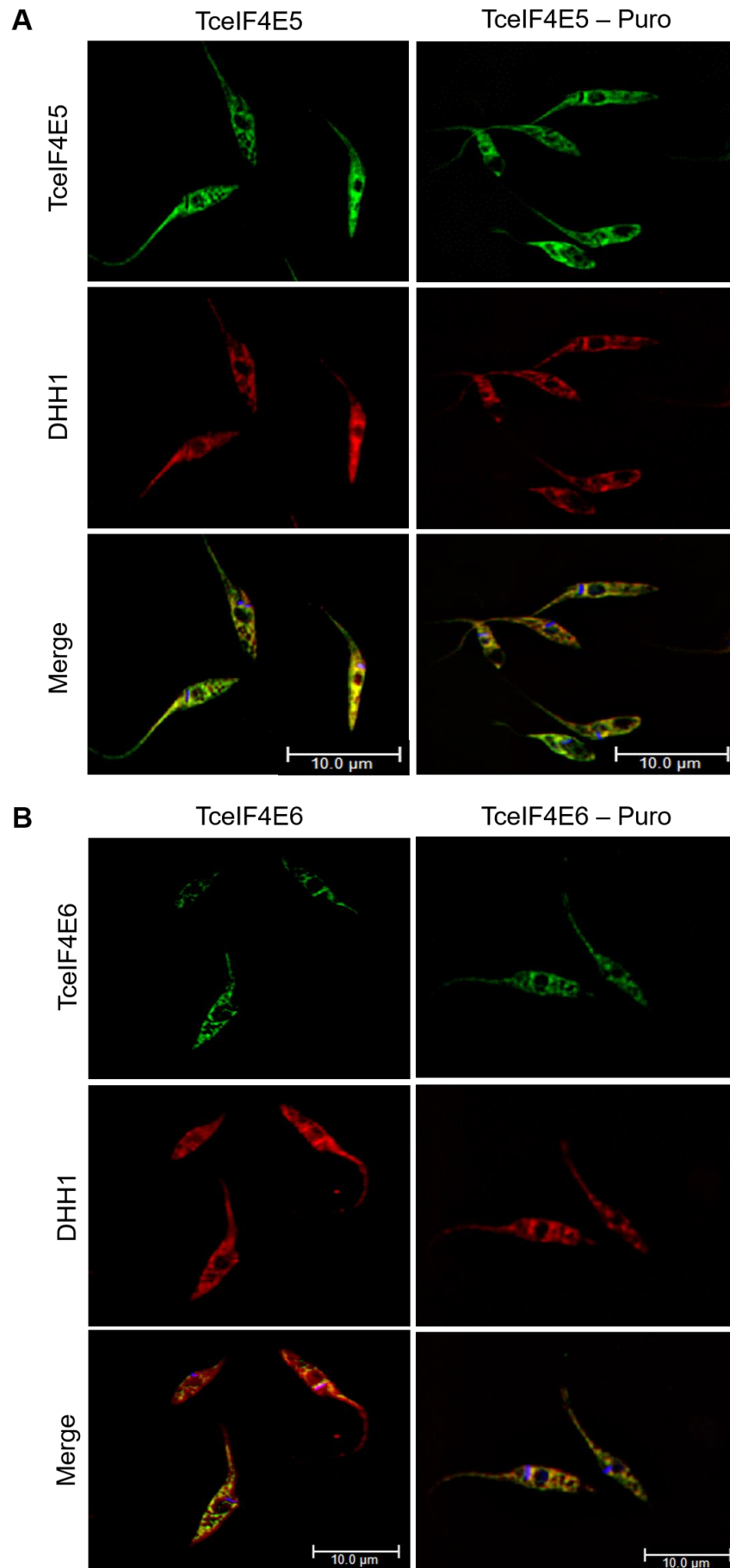
Como descrito anteriormente, TcelF4E5 e TcelF4E6 apresentam um padrão de marcação granular no citoplasma das formas epimastigotas, e a maioria dos grânulos parecem co-localizar com os grânulos que contém a proteína DHH1, enquanto os que não co-localizam permanecem adjacentes uns aos outros. O mesmo padrão de fluorescência observado em parasitos tratados com puromicina. Estes resultados sugerem o envolvimento destes fatores em mecanismos de regulação gênica.



**FIGURA 19 – Análise da associação do homólogo TcelF4E6 a polissomos.** Os parasitos foram tratados com cicloheximida ou puromicina como descrito no item 3.8. As frações foram analisadas por *Western blotting* com o soro contra a proteína GFP diluído 1:50. O soro anti-S7 diluído 1:250 foi utilizado como controle. 2-22: Frações do gradiente. C: Controle com extrato de epimastigota de *T. cruzi* ( $10^7$  células). A quantificação das proteínas nas frações dos gradientes foi realizada no programa ImageJ e os valores obtidos estão representados nos gráficos. O eixo X representa os números das frações ao longo do gradiente e o eixo Y representa a razão entre a intensidade da banda de cada fração do gradiente e a intensidade da banda da primeira fração livre de ribossomos. Os valores estão representados em  $\log_2$ . A reta linear corresponde a linha de tendência da distribuição da proteína em estudo ao longo do gradiente.

Entretanto, resultados recentes do nosso grupo (ainda não publicados) demonstraram a associação do fator TcelF4E5 com o fator TcelF4G5 em parasitos submetidos ao estresse nutricional, o que sugere que a proteína TcelF4E5 faça parte de um complexo de iniciação da tradução eIF4F nestas condições. Assim, para investigar a participação de TcelF4E5 no mecanismo de tradução de parasitos submetidos ao estresse nutricional, analisamos o padrão de distribuição desta proteína em gradientes de sacarose (Figura 21).

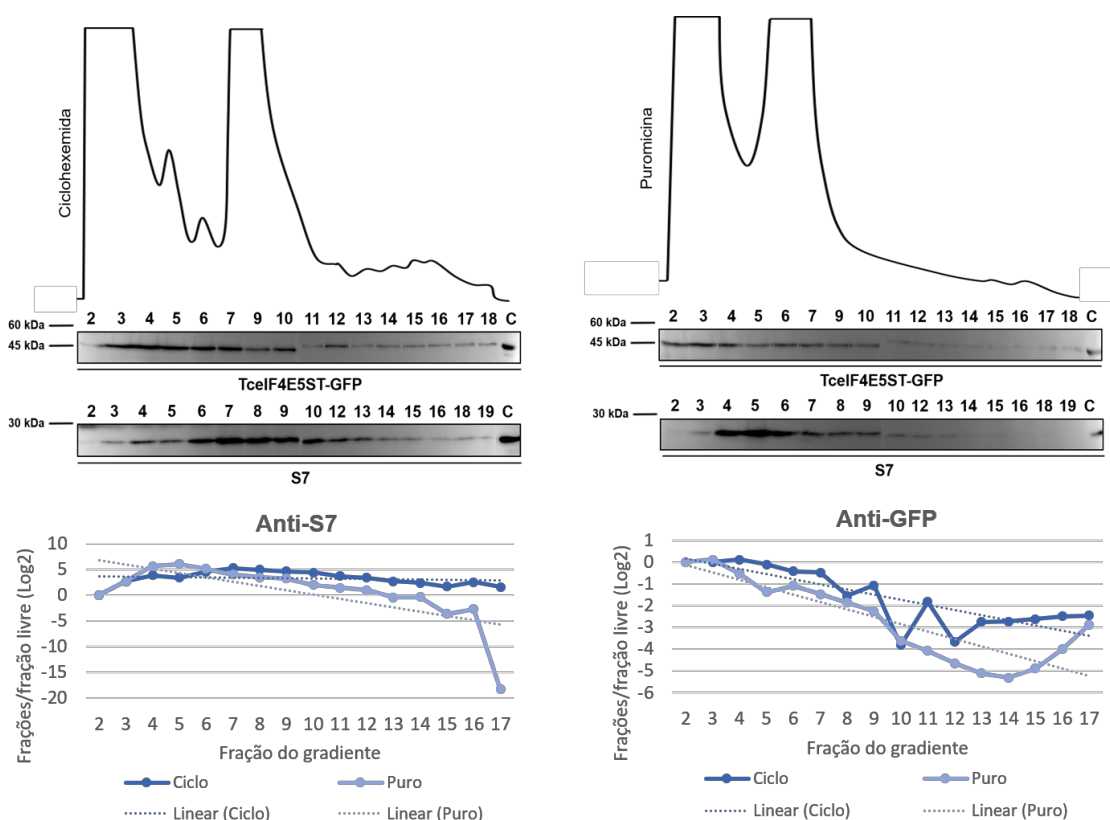




**FIGURA 20 – Co-localização de TcelF4E5 e TcelF4E6 com a proteína de grânulos TcDHH1 em parasitos tratados com puromicina. Ensaio de imunofluorescência indireta com parasitos**

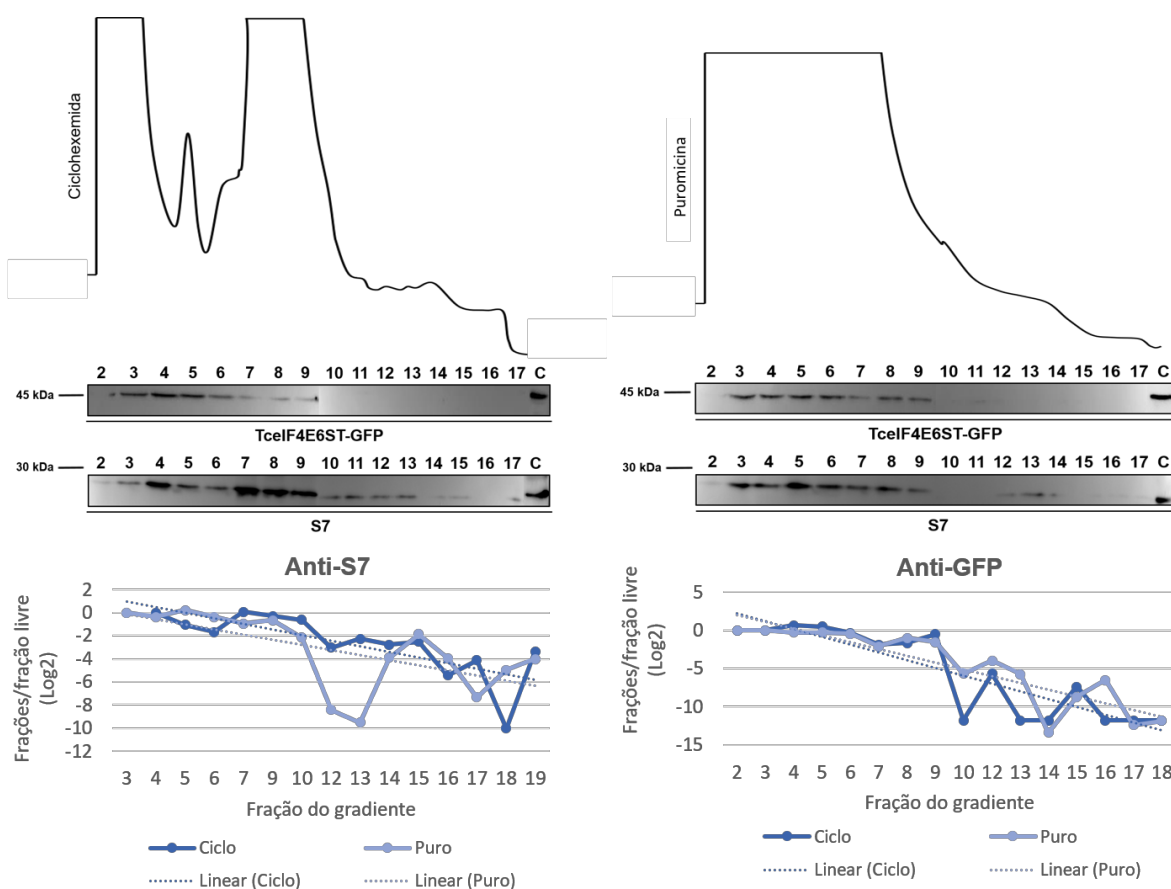
transfectantes expressando TcelF4E5 (A) e TcelF4E6 (B) fusionada a GFP nas formas epimastigotas marcados com o anticorpo anti-GFP de coelho diluído 1:1.000 co-localizado com o anticorpo anti-TcDHH1 de camundongo diluído 1:500. Foram utilizados os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo e coelho conjugado com o fluoróforo Alexa 594 e 488, respectivamente em que as cores dos fluoróforos foram trocadas manualmente. O DNA do núcleo e do cinetoplasto foram corados com DAPI. Barra = 10  $\mu$ M.

Ao contrário do padrão de distribuição observado em epimastigotas, quando os parasitos estressados foram tratados com puromicina, observamos o deslocamento da proteína TcelF4E5 para as frações mais leves com redução nas frações polissomais, indicando que essa proteína é afetada pela dissociação dos polissomos. Além disso, podemos notar uma similaridade nas linhas de tendência do gráfico de TcelF4E5 quando comparados com os de S7, sugerindo um possível envolvimento de TcelF4E5 no processo de tradução dos parasitos sob estresse nutricional (Figura 21).



**FIGURA 21 – Análise da associação do homólogo TcelF4E5 a polissomos em parasitos sob estresse nutricional.** Os parasitos foram submetidos ao estresse nutricional de 2 horas e tratados com cicloheximida ou puromicina como descrito no item 3.8. As frações foram analisadas por *Western blotting* com o soro contra a proteína GFP diluído 1:50. O soro anti-S7 diluído 1:250 foi utilizado como controle. 2-17: Frações do gradiente. C: Controle com extrato de epimastigotas de *T. cruzi* ( $10^7$  células). A quantificação das proteínas nas frações dos gradientes foi realizada no programa ImageJ e os valores obtidos estão representados nos gráficos. O eixo X representa os números das frações ao longo do gradiente e o eixo Y representa a razão entre a intensidade da banda de cada fração do gradiente e a intensidade da banda da primeira fração livre de ribossomos. Os valores estão representados em  $\log_2$ . A reta linear corresponde a linha de tendência da distribuição da proteína em estudo ao longo do gradiente.

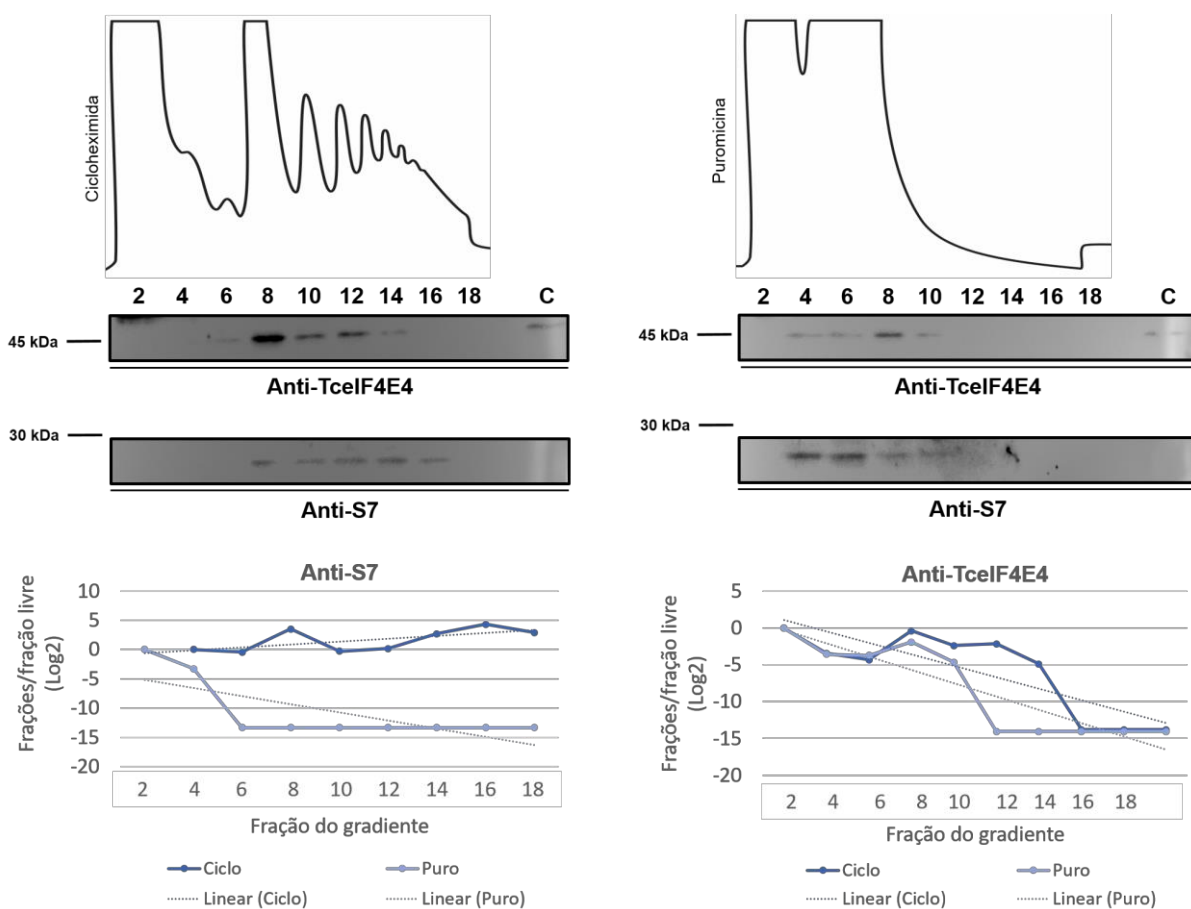
Uma vez que o padrão de distribuição polissomal da proteína TcelF4E6 em epimastigotas foi similar ao da proteína TcelF4E5, verificamos se em parasitos estressados esta similaridade seria mantida. No entanto, após o estresse nutricional, o padrão de distribuição da proteína TcelF4E6 foi distinto do observado em epimastigotas, tanto em parasitos tratados com cicloheximida, quanto com puromicina. TcelF4E6 parece não se associar aos polissomos em nenhuma das condições de tratamento (Figura 22), indicando que, ao contrário de TcelF4E5, TcelF4E6 em parasito sob estresse nutricional não está envolvido no processo de tradução.



**FIGURA 22 – Análise da associação do homólogo TcelF4E6 a polissomos em parasitos sob estresse nutricional.** Os parasitos foram submetidos ao estresse nutricional de 2 horas e tratados com cicloheximida ou puromicina como descrito no item 3.8. As frações foram analisadas por *Western blotting* com o soro contra a proteína GFP diluído 1:50. O soro anti-S7 diluído 1:250 foi utilizado como controle. 2-19: Frações do gradiente. C: Controle com extrato de epimastigotas de *T. cruzi* ( $10^7$  células). A quantificação das proteínas nas frações dos gradientes foi realizada no programa ImageJ e os valores obtidos estão representados nos gráficos. O eixo X representa os números das frações ao longo do gradiente e o eixo Y representa a razão entre a intensidade da banda de cada fração do gradiente e a intensidade da primeira fração livre de ribossomos. Os valores estão representados em  $\log_2$ . A reta linear corresponde a linha de tendência da distribuição da proteína em estudo ao longo do gradiente.

#### 4.5.1 O fator de início de tradução TcelF4E4 migra com os polissomos e o monômero ribossomal 80S em parasitos selvagens.

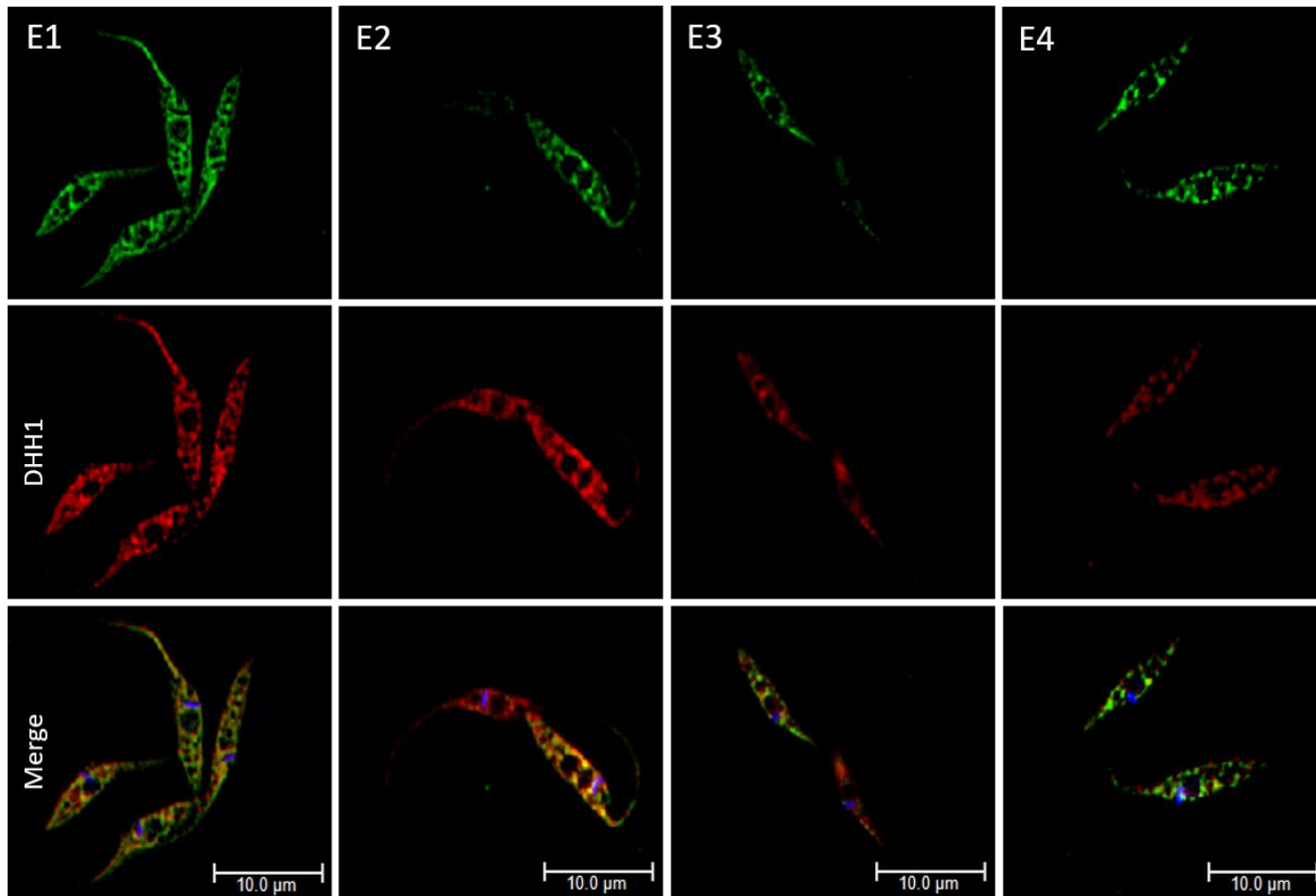
Como descrito anteriormente, até o momento não foi possível verificar a distribuição de TcelF4E4 nas frações polissomais nos parasitos transfectantes devido a degradação da proteína no processo. Sendo assim, resolvemos utilizar os parasitos selvagens, onde os lisados dos parasitos foram tratados com cicloheximida e puromicina, seguido de fracionamento em gradiente de sacarose. O padrão de distribuição da proteína TcelF4E4 é similar a distribuição da proteína ribossomal S7 ao longo do gradiente. Nos extratos de epimastigotas tratados com cicloheximida percebe-se a presença de TcelF4E4 até as frações polissomais pesadas (Figura 23). Entretanto, quando os parasitos foram tratados com puromicina, houve deslocamento de TcelF4E4 para as frações mais leves do gradiente indicando que a mesma pode estar envolvida no processo de tradução (Figura 23).



**FIGURA 23 – Análise da associação de TcelF4E4 a polissomos.** *Western blotting* com as frações do gradiente de sacarose de epimastigotas de *T. cruzi* ( $10^9$  céls) tratadas com cicloheximida 100  $\mu$ g/mL ou puromicina 2 mg/mL. As membranas foram incubadas com anti-TcelF4E4 diluído 1:1.000. O soro anti-S7 diluído 1:250 foi utilizado como controle. 2-18: Frações do gradiente. C: Controle com extrato de epimastigota de *T. cruzi* ( $10^7$  céls).

#### 4.5.2 Os fatores de início de tradução TcelF4E1-4 possuem co-localização parcial com a proteína DHH1 em parasitos transfectantes.

Uma vez que os resultados obtidos a partir dos ensaios de gradiente de sacarose indicaram que as proteínas TcelF4E1, E5 e E6, nas formas epimastigotas, não estão envolvidas no processo de tradução, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta para verificar a associação dos demais fatores com a proteína de grânulos TcDHH1. Para isso, foram utilizados os parasitos transfectantes expressando os fatores TcelF4E1, TcelF4E2, TcelF4E3 e TcelF4E4 com a etiqueta GFP e o anticorpo policlonal anti-TcDHH1. As imagens foram processadas por deconvolução tridimensional através do *software* LAS - AF – Leica e a co-localização das proteínas de interesse com TcDHH1 foi analisada em um único plano focal. Todas as proteínas em questão, fusionadas a GFP, apresentam localização citoplasmática nas formas replicativas do *T. cruzi* (Figura 24) corroborando os resultados obtidos com os parasitos selvagens (Figura 12). Observamos a co-localização quase total da proteína TcelF4E2 com TcDHH1. Por outro lado, embora a proteína TcelF4E1 apresente padrão de fluorescência granular, poucos grânulos estão co-localizados com TcDHH1. Para as proteínas TcelF4E3 e TcelF4E4 a co-localização com TcDHH1 é ainda menos evidente. Ensaio de imunofluorescência indireta em microscópio confocal precisam ser realizados para confirmar esses resultados.



**FIGURA 24 – Co-localização dos parasitos transfectantes expressando os homólogos TcelF4E1-4 com a etiqueta GFP e DHH1.** Ensaio de IFI com parasitos transfectantes nas formas epimastigotas ( $10^6$  céls) marcados com o anticorpo anti-GFP de coelho diluído 1:1.000 co-localizado com o anticorpo anti-DHH1 de camundongo diluído 1:500. Foram utilizados os anticorpos secundários anti-IgG de camundongo e coelho conjugado com o fluoróforo Alexa 594 e 488, respectivamente em que as cores dos fluoróforos foram trocadas manualmente. O DNA do núcleo e do cinetoplasto foram corados com DAPI. Barra = 10 μm.

## 5 DISCUSSÃO

Compreender o processo de tradução e sua regulação em parasitos é relevante tanto para o desenvolvimento de quimioterapias mais eficazes, quanto para o esclarecimento da atuação da regulação da expressão gênica e suas peculiaridades nesses organismos. Para a sobrevivência desses parasitos aos diferentes microambientes ao quais são expostos, mecanismos de regulação da expressão gênica como, por exemplo, o controle de estabilidade de mRNAs e de regulação da tradução são essenciais, uma vez que esses organismos parecem ter perdido a habilidade de regular a transcrição de genes individualmente (Clayton, 2002).

A multiplicidade de homólogos do fator eIF4E ocorre em diversos eucariotos, participando de diversas etapas relacionadas, ou não, ao processo de tradução. Além disso, complexos alternativos eIF4F podem ser formados em diversos organismos e são capazes de controlar a tradução de grupos de mRNAs distintos em momentos específicos do desenvolvimento (Joshi et al., 2005; Rhoads, 2009). Nos tripanosomatídeos já foi descrita essa multiplicidade de homólogos de fatores de início de tradução, assim como a capacidade dessas subunidades formarem diferentes complexos eIF4F-like (Dhalia et al., 2005; Yoffe et al., 2006; Yoffe et al., 2009; Freire et al., 2011; Reis, 2009; Freire et al., 2014a; Freire et al., 2014b). Sendo assim, um indicativo de que essas proteínas podem estar envolvidas tanto no processo da tradução quanto em sua regulação.

Assim como nos outros tripanosomatídeos, foi visto por análise de homologia de sequências gênicas que o *T. cruzi* também apresenta seis homólogos para o fator de início de tradução eIF4E. Pela análise do alinhamento desses homólogos, é possível verificar que se trata de seis proteínas distintas. Essas proteínas apresentam algumas peculiaridades, tais como, a região intrinsecamente desestruturada N-terminal de TcelF4E3 e TcelF4E4, existente apenas nos tripanosomatídeos, e a inserção na região do domínio eIF4E de TcelF4E1. O alinhamento estrutural e outras análises *in silico* desses fatores estão sendo estudados pelo nosso grupo de pesquisa, visando entender melhor como essas modificações poderiam afetar a função dessas proteínas (dados não mostrados).

O projeto que deu origem a esta dissertação de mestrado faz parte de um projeto maior que tem como foco o estudo do controle traducional em *T. cruzi*, envolvendo o estudo dos fatores de início da tradução (eIFs) presentes no complexo

eIF4F, desde a caracterização dos seis homólogos do fator de início de tradução eIF4E de *T. cruzi*, assim como investigar como esses fatores atuam no ciclo do RNA mensageiro e na regulação da expressão gênica em nível pós-transcricional de maneira geral.

Sendo assim, iniciamos este trabalho com a expressão e purificação das proteínas recombinantes para a produção de anticorpos policlonais para os seis homólogos de eIF4E de *T. cruzi*. Uma vez que todos os anticorpos necessários para o desenvolvimento desse projeto foram obtidos, foi possível determinar por ensaios de *Western blotting* que os homólogos TcelF4E1-6 estão sendo expressos nas formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento e são regulados ao longo da metaciclologênese *in vitro*. TcelF4E2 é a única proteína que não é expressa nas formas epimastigotas submetidas ao estresse nutricional. Em outro trabalho do grupo, onde realizamos o sequenciamento massivo dos RNA mensageiros totais e dos mRNAs associados a polissomos pela técnica de *Ribosome profiling* de epimastigotas e epimastigotas sob estresse nutricional, o mRNA de TcelF4E2 não está associado aos polissomos dos parasitos sob estresse. Por outro lado, observamos que o mRNA de TcelF4E1 está significativamente mais expresso na fração polissomal dos parasitos sob estresse (Costa, et al., 2018 – em preparação). Estes dados corroboram os resultados de expressão de TcelF4E1 e TcelF4E2 nos ensaios de *Western blotting*. Por outro lado, nenhum dos homólogos de TcelF4E1-6 foi detectado nas formas tripomastigotas metacíclicas pelo ensaio de *Western blotting*. Entretanto, existe tradução em tripomastigotas e este processo é significativamente regulado quando comparado às formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento (Smircich et al., 2015).

Por meio de ensaios de imunofluorescência indireta, relatamos que todos os homólogos estudados apresentam localização citoplasmática nas formas replicativas, diferente do que foi visto nas formas procíclicas de *T. brucei*, onde TbelF4E1 e TbelF4E2 localizam-se tanto no citoplasma quanto no núcleo do parasito (Freire et al., 2011). Dados mais recentes obtidos pelo projeto de etiquetamento fluorescente de todas as proteínas de *T. brucei* (TrypTag) indicam que a localização de TbelF4E1 e TbelF4E2 seja citoplasmática, corroborando os dados obtidos em *T. cruzi* (Dean et al., 2017).

Os fatores TcelF4E1, E3, e E4 apresentam nas formas epimastigotas uma marcação concentrada ao redor do núcleo. Essa marcação também foi vista nas formas epimastigotas submetidas a estresse nutricional quando marcadas com anti-



TcelF4E1 e TcelF4E4. Entretanto, o padrão de fluorescência perinuclear destas proteínas é distinto. TcelF4E4 está concentrada ao redor do núcleo e do cinetoplasto, principalmente na região anterior do parasito. Este padrão de fluorescência é bastante similar a marcação de retículo endoplasmático (RE) em *T. cruzi* (Ferella et al., 2008), portanto, é razoável considerar que a marcação celular de TcelF4E4 corresponda a marcação de RE, sendo assim um indicativo de que este homólogo poderia estar envolvido de alguma maneira no início da tradução de mRNAs destinados ao RE. Por outro lado, enquanto TcelF4E1 está distribuído de forma granular ao redor do núcleo, TcelF4E3 apresenta marcação perinuclear contínua, com pontos dispersos pelo citoplasma. Dados recentes do nosso grupo mostram que a região perinuclear pode funcionar como um local para o controle de qualidade dos mRNAs recentemente exportados do núcleo (Costa et al., 2018 – artigo submetido). Esta evidência se baseia no fato de que muitas proteínas sabidamente envolvidas na regulação da estabilidade de mRNAs, entre elas DHH1, XRNA e CAF1, concentram-se nesta região, e colocalizam-se parcialmente entre elas. Assim, o fato de que em mamíferos já tenha sido demonstrado o papel de alguns homólogos de eIF4E como proteínas regulatórias, pode ser um indício de que em *T. cruzi*, alguns homólogos de eIF4E possam também atuar em mecanismos de controle de estabilidade e/ou tradução, justificando assim, a presença desses fatores ao redor do núcleo (Rhoads, 2009; Borden, 2016).

Nenhuma marcação de TcelF4E1 foi vista nas formas tripomastigotas metacíclicas nos ensaios de imunofluorescência indireta, corroborando o resultado de expressão após a metaciclogênese *in vitro*. No entanto, uma leve marcação para TcelF4E4 foi vista no citoplasma das formas tripomastigotas metacíclicas, inferindo que este fator possa ser expresso em pequenas quantidades nessas formas, não sendo detectado pela técnica de *Western blotting*. Sendo assim, TcelF4E4 pode ser o fator de início de tradução atuante nas formas tripomastigotas metacíclicas. Entretanto, como ainda não determinamos a localização das proteínas TcelF4E2, E3, E5 e E6 nas formas epimastigotas sob estresse nutricional e tripomastigotas metacíclicas por imunofluorescência, não podemos descartar a participação destas proteínas no processo de tradução nestas formas. Protocolos alternativos serão testados para cada um desses anticorpos para melhor aquisição dessas imagens.

Através da análise de associação destes fatores com os polissomos foi possível inferir que as proteínas TcelF4E2 e TcelF4E4, nas formas epimastigotas, apresentam padrão de distribuição similar à proteína ribossomal S7 em gradientes de

sacarose. Este resultado sugere um papel canônico destas proteínas no processo de tradução. De fato, em *T. brucei* e *Leishmania* eIF4E4 está envolvido no processo de tradução e junto com o homólogo eIF4G3, formam o complexo de iniciação eIF4F (Freire et al., 2011; Yoffe et al., 2009; Moura et al., 2015). A associação de TcelF4E4 com os polissomos, somado ao fato de nosso grupo ter identificado a interação de TcelF4E4 com TcelF4G3 por ensaios de duplo-híbrido (Costa et al., 2018 – em preparação) reforça o papel canônico deste fator no processo de tradução. Além disso, TcelF4E4 não se associa a TcDHH1, uma proteína marcadora de grânulos de RNA. A associação do fator eIF4E2 com polissomos ainda não foi investigada em tripanosomatídeos e acredita-se que este homólogo não tenha função direta no processo de tradução, uma vez que não se associa a nenhum dos homólogos de eIF4G (Freire et al., 2017b). Em *T. brucei*, foi visto que TbelF4E2 forma um complexo TbelF4E2:SLBP2 que parece estar envolvido na seleção de diferentes mRNAs que possuem estruturas em haste-alça, indicando um possível papel de regulação da tradução via seleção de mRNAs (Freire et al., 2017b). Embora nossos dados dos experimentos em gradiente de sacarose indiquem um possível papel TcelF4E2 na tradução, a co-localização desta proteína com TcDHH1, levanta a hipótese de que TcelF4E2 possa funcionar como uma proteína reguladora, fazendo a ponte de determinados RNAs entre a tradução e estocagem e/ou degradação.

Por outro lado, o perfil de sedimentação das proteínas TcelF4E1, E5 e E6 em gradientes de sacarose nas formas epimastigotas, sugere que estas proteínas não estejam envolvidas com o processo de tradução. Em *T. brucei* e *Leishmania* o fator eIF4E1 não interage com eIF4G e funciona como um inibidor traducional, uma vez que interage com a proteína de interação a 4E (4E-IP), levando a repressão da tradução (Zinoviev et al., 2011; Erben et al., 2014; Lueong et al., 2016). Como descrito anteriormente, dados não publicados do nosso grupo indicam um aumento da expressão de TcelF4E1 nas formas epimastigotas submetidas a estresse nutricional. O processo de tradução em parasitos submetidos a estresse nutricional é significativamente reduzido quando comparado às formas replicativas do parasito (Holetz et al., 2007; Alves et al., 2010). Assim, o aumento de expressão desta proteína num estado de estresse, somado ao fato de que esta proteína co-localiza parcialmente com TcDHH1, sugerem um papel regulatório de TcelF4E1 em *T. cruzi*.

Ao contrário do esperado para um fator de tradução típico, observamos um deslocamento de TcelF4E5 e TcelF4E6 das frações leves para as frações pesadas do gradiente após o tratamento com puromicina. O fato de TcelF4E5 e TcelF4E6

estarem sedimentando em frações pesadas após a dissociação dos polissomos, sugere a participação das mesmas em complexos ribonucleoproteicos (RNPs) de elevado peso molecular, como por exemplo, os grânulos de RNA. De fato, TcelF4E5 e TcelF4E6 apresentaram co-localização parcial com TcDHH1 em parasitos em fase exponencial de crescimento. Entretanto, observamos que em parasitos submetidos ao estresse nutricional, TcelF4E5 e TcelF4E6 apresentam perfis de distribuição em gradientes de sacarose distintos. Surpreendentemente, nesta condição, TcelF4E5 está associado a polissomos, apresentando perfil de distribuição em gradiente de sacarose semelhante à proteína ribossomal S7. Estes dados sugerem a participação de TcelF4E5 no processo de tradução de parasitos sob estresse. Por ensaios de duplo-híbrido e co-imunoprecipitação, verificamos a interação de TcelF4E5 com TcelF4G5 somente em parasitos sob estresse nutricional (Costa et al., 2018 – em preparação). A interação TcelF4E5:TcelF4G5 é inédita em tripanosomatídeos. Juntos, esses resultados indicam que dependendo do estado traducional do parasito, TcelF4E5 possa funcionar tanto como uma proteína regulatória (epimastigotas), ou como um fator de iniciação da tradução eIF4E canônico que traduz grupos de mRNAs específicos sob condições de estresse. Freire e colaboradores (2011, 2014a, 2014b) descreveu a formação de diferentes complexos entre os seis fatores eIF4Es e os cinco homólogos eIF4Gs de *T. brucei*, indicando que estes complexos podem se associar a mRNAs distintos apresentando diferentes funções no parasito envolvidos tanto no processo de tradução canônico, quanto em processos que regulam o metabolismo de mRNAs. Outra hipótese para explicar a associação de TcelF4E5 com complexos proteicos pesados nas formas epimastigotas, seria uma maneira encontrada pelo parasito de manter esta proteína separada do *pool* de mRNAs para que a mesma participe da tradução de mRNAs específicos apenas em parasitos sob estresse.

Ao contrário de TcelF4E5, o fator TcelF4E6 parece não estar presente nas frações pesadas do gradiente de sacarose com parasitos sob estresse nutricional tratados com cicloheximida e com puromicina. Ao que tudo indica, esta proteína faz parte de complexos ribonucleoproteicos pesados apenas nas formas replicativas do parasito. Por ensaios de duplo-híbrido (Costa et al., 2018 – em preparação) demonstramos que TcelF4E6, assim com TcelF4E5, interage com TcelF4G5. A interação de eIF4E6 com eIF4G5 também ocorre em *T. brucei* (Freire et al., 2014b). Entretanto, ao observarmos o perfil de distribuição de TcelF4E6 nos gradientes de sacarose, é notório que TcelF4E6 não participa do processo de tradução em nenhuma das condições analisadas. Uma vez que, TcelF4E5 e TcelF4E6 compartilham a

interação com TcelF4G5, e apenas em condições de estresse ocorre a interação TcelF4E5:TcelF4G5, é possível supor que estas três proteínas façam parte de complexos de mRNPs pesados nas formas epimastigotas, que se dissociam em parasitos sob estresse, liberando os fatores TcelF4E5 e TcelF4G5 para atuarem no processo de tradução.

Apesar de existirem diversos estudos sobre a caracterização dos seis homólogos de eIF4E em *T. brucei* e *Leishmania*, não existem estudos de caracterização destes fatores em *T. cruzi*. Sendo assim, iniciamos a caracterização dessas proteínas neste parasito. Nossos resultados são bastante promissores e demonstram que embora essas proteínas apresentem similaridade com os homólogos de outros tripanosomatídeos, em *T. cruzi* parecem exercer algumas funções peculiares à espécie. Entretanto, existe um longo caminho a ser percorrido para desvendar o papel de TcelF4E1-6 no processo de tradução e/ou em mecanismos específicos de regulação da expressão gênica em *T. cruzi*.

## 6 CONCLUSÕES

- Assim como outros tripanosomatídeos, o *T. cruzi* apresenta seis homólogos para o fator de início de tradução eIF4E.

- As proteínas TcelF4E1-6 são reguladas durante o processo de metaciclogênese *in vitro*, sendo que todas são expressas nas formas replicativas, apenas TcelF4E2 não é expressa nas formas epimastigotas sob estresse nutricional e nenhum homólogo de eIF4E de *T. cruzi* foi detectado nas formas tripomastigotas metacíclicas, através de experimentos de *Western blotting*.

- As proteínas TcelF4E1-6 apresentam localização subcelular citoplasmática. TcelF4E1, E3 e E4 apresentam marcação perinuclear nas formas epimastigotas e TcelF4E1 e TcelF4E4 exibem a mesma marcação nas formas epimastigotas submetidas ao estresse nutricional.

- A proteína TcelF4E4 apresenta uma leve marcação nas formas tripomastigotas metacíclicas analisadas por imunofluorescência indireta.

- Os perfis de sedimentação em gradiente de sacarose das proteínas TcelF4E2, TcelF4E3 e TcelF4E4 nas formas epimastigotas e TcelF4E5 nas formas epimastigotas sob estresse nutricional sugerem a associação desses homólogos com a maquinaria de tradução.

- O oposto ocorre com os homólogos TcelF4E1, E5 e E6 nas formas epimastigotas, sugerindo que estas proteínas não atuam no processo de tradução diretamente.

- A co-localização parcial dos homólogos TcelF4E1-6 com a proteína marcadora de grânulos de RNA TcDHH1 indicam que essas proteínas também podem estar associadas a mecanismos de regulação de mRNAs em *T. cruzi*.

## 7 PERSPECTIVAS

Visando contribuir para a compreensão dos mecanismos de início e regulação da tradução em *T. cruzi*, esse trabalho mais do que responder perguntas, abriu diversas perspectivas para a investigação da função dos seis homólogos do fator de início de tradução eIF4E, entre elas:

1. Definir se esses homólogos são essenciais para o parasito por meio da realização do *knockout* dessas proteínas.
2. Investigar quais homólogos de TcelF4Es são fosforilados e diferencialmente expressos ao longo do processo de diferenciação.
3. Definir o conteúdo proteico e de RNA dos complexos formados pelos diferentes homólogos TcelF4Es por espectrometria de massas e RNA-seq.

## REFERÊNCIAS

ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.; LANE, C.E.; LUKES, J.; BASS, D.; BOWSER, S.S.; BROWN, M.W.; BURKI, F.; DUNTHORN, M.; HAMPL, V.; HEISS, A.; HOPPENRATH, M.; LARA, E.; LE GALL, L.; LYNN, D.H.; MCMANUS, H.; MITCHELL, E.A.; MOZLEY-STANRIDGE, S.E.; PARFREY, L.W.; PAWLOWSKI, J.; RUECKERT, S.; SHADWICK, L.; SCHOCH, C.L.; SMIRNOV, A.; SPIEGEL, F.W. The revised classification of eukaryotes. **J Eukaryot Microbiol**, v.59, p.429-493, 2012.

ALVES, L.R.; AVILA, A.R.; CORREA, A.; HOLETZ, F.B.; MANSUR, F.C.; MANQUE, P.A.; MENEZES, P.A.; BUCK, G.A.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Proteomic analysis reveals the dynamic association of proteins with translated mRNAs in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v.2, p.72-78, 2010.

BANGS, J.D.; CRAIN, P.F.; HASHIZUME, T.; MCCLOSKEY, J.A.; BOOTHROYD, J.C. Mass spectrometry of mRNA cap 4 from trypanosomatids reveals two novel nucleosides. **J Biol Chem**, v.267, p.9805-9815, 1992.

BELLI, S.I. Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. **Int J Parasitol**, v.30, p.679-687, 2000.

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **Cell Biol**, v.106, p.1349-1358, 1988.

BORDEN, K.L. The eukaryotic translation initiation factor eIF4E wears a “cap” for many occasions. **Transl**, v.4, p.1-12, 2016.

BRECHT, M. & PARSONS, M. Changes in polysome profiles accompany trypanosome development. **Mol Biochem Parasitol**, v.97, p.189-198, 1998.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi*: morfologia e ciclo evolutivo. In: **Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral**, p.25-31, 1997.

CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.6, p.93-100, 1964.

CHAGAS, C.; Nova tripanozomíase humana: Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v.1, p.159-218, 1909.

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

CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Mol Biochem Parasitol**, v.156, p.93-101, 2007.

CLAYTON, C. Gene expression in Kinetoplastids. **Curr Opin Microbiol**, v.32, p.46-51, 2016.

CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol**, v.16, p.315-327, 1985.

DEAN, S.; SUNTER, J.D.; WHEELER, R.J. TrypTag.org: A trypanosome genome-wide protein localisation resource. **Trends Parasitol**, v.33, p.80-82, 2017.

DE MELO NETO, O.P.; DA COSTA LIMA, T.D.; XAVIER, C.C.; NASCIMENTO, L.M.; ROMÃO, T.P.; ASSIS, L.A.; PEREIRA, M.M.; REIS, C.R.S.; PAPADOPOULOU, B. The unique *Leishmania* eIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. **RNA Biol**, v.12, p.1209-1221, 2015.

DE MELO NETO, O.P.; REIS, C.R.S.; MOURA, D.M.; FREIRE, E.R.; CARRINGTON, M. Unique and conserved features of the protein synthesis apparatus in parasitic trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania*) species. In: **Evolution of the protein synthesis machinery and its regulation**, p.435-475, 2016.

DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int Rev Cytol**, v.86, p.197-283, 1984.

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. Translation initiation in *Leishmania major*: Characterisation of multiple eIF4E subunit homologues. **Mol Biochem Parasitol**, v.140, p.23-41, 2005.



DNDi – Drugs for Neglected Diseases initiative. About Chagas disease. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/chagas/>> Acessado em: 18/01/2018.

ERBEN, E.D.; FADDA, A.; LUEONG, S.; HOHEISEL, J.D.; CLAYTON, C. A genome-wide tethering screen reveals novel potential post-transcriptional regulators in *Trypanosoma brucei*. ***PloS Pathog***, v.10, p.1-15, 2014.

FARELLA, M.; NILSSON, D.; DARBAN, H.; RODRIGUES, C.; BONTEMPI, E.J.; DOCAMPO, R.; ANDERSSON, B. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*: location of novel proteins to various organelles. ***Proteomics***, v.8, p.2735-2749, 2008.

FRANCO DA SILVEIRA, J. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***, p.127-152, 2000.

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. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. ***Mol Biochem Parasitol***, v.176, p.25-36, 2011.

FREIRE, E.R.; VASHISHT, A.A.; MALVEZZI, A.M.; ZUBEREK, J.; LANGOUSIS, G.; SAADA, E.A.; NASCIMENTO, J.D.F.; STEPINSKI, J.; DARZYNKIEWICZ, E.; HILL, K.; DE MELO NETO, O.P.; WOHLSCHEGEL, J.A.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. ***RNA***, v.20, p.1272-1286, 2014a.

FREIRE, E.R.; MALVEZZI, A.M.; VASHISHT, A.A.; ZUBEREK, J.; SAADA, E.A.; LANGOUSIS, G.; NASCIMENTO, J.D.F.; MOURA, D.; DARZYNKIEWICZ, E.; HILL, K.; DE MELO NETO, O.P.; WOHLSCHEGEL, J.A.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A. *Trypanosoma brucei* translation initiation factor homolog eIF4E6 forms a tripartite cytosolic complex with eIF4G5 and a capping enzyme homolog. ***Eukaryot Cell***, v.13, p.896-908, 2014b.

FREIRE, E.; STURM, N.R.; CAMPBELL, D.A.; DE MELO NETO, O.P. The role of cytoplasmic mRNA cap-binding protein complexes in *Trypanosoma brucei* and other trypanosomatids. ***Pathogens***, v.55, p.1-25, 2017a.

FREIRE, E.; MOURA, D.; BEZERRA, M.; XAVIER, C.C.; MORAIS-SOBRAL, M.C.; VASHISHT, A.A.; REZENDE, A.M.; WOHLSCHLEGEL, J.A.; STURM, N.R.; DE MELO NETO, O.P.; CAMPBELL, D.A. *Trypanosoma brucei* eIF4E2 cap-binding protein binds a homolog of the histone-mRNA stem-loop-binding protein. **Curr Genet**, v.294, p.1-19, 2017b.

GINGRAS, A.C.; RAUGHT, B.; SONENBERG, N. eIF4 initiation factors: effectors of mRNA recruitment to ribosomes and regulators of translation. **Annu Rev Biochem**, v.68, p.913-963, 1999.

GRADIA, D.F.; RAU, K.; UMAKI, A.C.S.; SOUZA, F.S.P.; PROBST, C.M.; CORREA, A.; HOLETZ, F.B.; AVILA, A.R.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; FRAGOSO, S.P. Characterization of a novel Obg-like ATPase in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. **Int J Parasitol**, v.39, p.49-58, 2009.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today**, v.12, p.108-114, 1996.

HO, J.J. & LEE, S. A cap for every occasion: alternative eIF4F complexes. **Trends Biochem Sci**, v.41, p.821-823, 2016.

HOLETZ, F.B.; CORREA, A.; AVILA, A.R.; NAKAMURA, C.V.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S. Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **BBRC**, v.356, p.1062-1067, 2007.

HOLETZ, F.B.; ALVES, L.R.; PROBST, C.M. Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. **FEBS J**, v.277, p.3415-3426, 2010.

JACKSON, R.J.; HELLEN, C.U.T.; PESTOVA, T.V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Mol Cell Biol**, v.11, p.113-127, 2010.

JOSHI, B.; LEE, K.; MAEDER, D.L.; JAGUS, R. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. **BMC Evol Biol**, v.5, p.1-20, 2005.

KLEIN, C.; TERRAO, M.; INCHAUSTEGUI, G.; CLAYTON, C. Polyssomes of *Trypanosoma brucei*: association with initiation factors and RNA-binding proteins. **PloS One**, v.10, p.1-12, 2015.

KRAMER, S.; QUEIROZ, R.; ELLIS, L.; WEBB, H.; HOHEISEL, J.D.; CLAYTON, C.; CARRINGTON, M. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. **J Cell Sci**, v.121, p.3002-3014, 2008.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. **Mol Biochem Parasitol**, v.181, p.61-72, 2012.

KRAMER, S.; BANNERMAN-CHUKUALIM, B.; ELLIS, L.; BOULDEN, E.A.; KELLY, S.; FIELD, M.C.; CARRINGTON, M. Differential localization of the two *T. brucei* poly(A) binding proteins to the nucleus and RNP granules suggests binding to distinct mRNA pools. **PloS One**, v.8, p.1-13, 2013.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LANDON, A.L.; MUNIANDY, P.A.; SHETTY, A.C.; LEHRMANN, E.; VOLPON, L.; HOUNG, S.; ZHANG, Y.; DAI, B.; PEROUTKA, R.; MAZAN-MAMCZARZ, K. STEINHARDT, J.; MAHURKAR, A.; BECKER, K.G.; BORDEN, K.L.; GARTENHAUS, R.B. MNKs act as a regulatory switch for eIF4E1 and eIF4E3 driven mRNA translation in DLBCL. **Nat Commun**, v.5, p.1-15, 2014.

LAPLANTE, M. & SABATINI, D.M. mTOR signaling at a glance. **J Cell Sci**, v.122, p.3589-3594, 2009.

LUEONG, S.; MERCE, C.; FISCHER, B.; HOHEISEL, J.D.; ERBEN, E.D. Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. **Mol Microbiol**, v.100, p.457-471, 2016.

MALEPPATTU, S.; KAMUS-ELIMELEH, D.; ZINOVIEV, A.; COHEN-MOR, S.; ORR, I.; SHAPIRA, M. The eIF3 complex of *Leishmania* – subunit composition and mode of recruitment to different cap-binding complexes. **Nucleic Acids Res**, v.43, p.6222-6235, 2015.

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

MARTÍNEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J.C.; FLORENCIO-MARTÍNEZ, L.E., MANNING-CELA, R.G.; FIGUEROA-ANGULO, E.E. Gene expression in trypanosomatid parasites. *J Biomed Biotechnol*, v. 2010, p.1-15, 2009.

MAZUMDER, B.; SESHADRI, V.; FOX, P. Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem Sci*, v.28, p.91-98, 2003.

METHOT, N.; PAUSE, A.; HERSHEY, J.W.B.; SONENBERG, N. The translation initiation factor eIF-4B contains an RNA-binding region that is distinct and independent from its ribonucleo-protein consensus sequence. *Mol Cell Biol*, v. 14, p.2307-2316, 1994.

MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. *Future Microbiol*, v.6, p.459-474, 2011.

MOURA, D.M.; REIS, C.R.; XAVIER, C.C.; DA COSTA LIMA, T.D.; LIMA, R.P.; CARRINGTON, M.; DE MELO NETO, O.P. Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. *RNA Biol*, v.12, p.305-319, 2015.

OBADO, S. O; BRILLANTES, M; URYU, K; ZHANG, W; KETAREN, N. E; CHAIT, B.T; FIELD, M. C; ROUT, M. P. Interactome mapping reveals the evolutionary history of the nuclear pore complex. *PLoS Biol*, v.14. 2016.

OEFFINGER, M.; WEI, K.E.; ROGERS, R.; DEGRASSE, J.A.; CHAIT, B.T.; AITCHISON, J.D.; ROUT, M.P. Comprehensive analysis of diverse ribonucleoprotein complexes. *Nat Methods*, v.4, p.951-956, 2007.

OUELLETTE, M. & PAPADOPOULOU, B. Coordinated gene expression by posttranscriptional regulons in African trypanosomes. *J Biol*, v.8, p.100, 2009.

PARSONS, M.; MYLER, P.J. Illuminating parasite protein production by ribosome profiling. *Trends Parasitol*, v.32, p.446-457, 2016.

PEREIRA, M.M.C.; MALVEZZI, A.M.; NASCIMENTO, L.M.; DA COSTA LIMA, T.D.C; ALVES, V.S.; PALMA, M.L., FREIRE, E.R.; MOURA, D.M.N.; REIS, C.R.S.; DE MELO NETO, O.P. The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected do differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. *Mol Biochem Parasitol*, v.190, p.82-86, 2013.

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

RHOADS, R.E. eIF4E: new family members, new binding partners, new roles. **J Biol Chem**, v.284, p.16711-16715, 2009.

SMIRCICH, P.; EASTMAN, G.; BISPO, S.; DUHAGON, M.A.; GUERRA-SLOMPO, E.P.; GARAT, B.; GOLDENBERG, S.; MUNROE, D.J.; DALLAGIOVANNA, B.; HOLETZ, F.; SOTELO-SILVEIRA, J.R. Ribosome profiling reveals translational control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 16, p.1-14, 2015.

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

THOMPSON, M.K. & GILBERT, W.V. mRNA length-sensing in eukaryotic translation: reconsidering the “closed loop” and its implications for translational control. **Curr Genet**, v.63, p.613-620, 2017.

TOWBIN, H.; STAEGELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of protein from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proc Natl Acad Sci**, v.76, p.4350-4354, 1979.

UNIACKE, J.; HOLTERMAN, C.E.; LACHANCE, G.; FRANOVIC, A.; JACOB, M.D.; FABIAN, M.R.; PAYETTE, J.; HOLCIK, M.; PAUSE, A.; LEE, S. An oxygen-regulated switch in the protein synthesis machinery. **Nature**, v.486, p.126-129, 2012.

VANHAMME, L. & PAYS, E. Control of Gene Expression in Trypanosomes. **Microbiol Rev**, v.59, p.223-240, 1995.

WHO – WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Bulletin of the world health organization: Chagas disease**. Disponível em: <<http://www.who.int/chagas/en/>> Acessado em: 18/01/2018.

YOFFE, Y.; ZUBEREK, J.; LERER, A.; LEWDOROWICZ, M.; STEPINSKI, M.; DARZYNKIEWICZ, E.; SHAPIRA, M. Binding specificities and potential roles of

isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in *Leishmania*. ***Eukaryot Cell***, v.5, p.1969-1979, 2006.

YOFFE, Y.; LÉGER, M.; ZINOVIEV, A.; ZUBEREK, J.; DARZYNKIEWICZ, E.; WAGNER, G.; SHAPIRA, M. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. ***Nucleic Acids Res***, v.37, p.3243-3253, 2009.

ZAMUDIO, J.R.; MITTRA, B.; CAMPBELL, D.A.; STURM, N.R. Hypermethylated cap 4 maximizes *Trypanosoma brucei* translation. ***Mol Microbiol***, v.72, p.1100-1110, 2009.

ZINOVIEV, A.; LÉGER, M.; WAGNER, G.; SHAPIRA, M. A novel 4-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. ***Nucleic Acids Res***, v.39, p.8404-8415, 2011.

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

ZINOVIEV, A. & SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. ***Comp Funct Genomics***, p.813718, 2012.