

Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM
SAÚDE

Sávio Silas Farias Falcão

**Avaliação da função do fator EIF4E2 e suas proteínas parceiras SLBP1 e
SLBP2 em *Trypanosoma brucei***

Recife

2022

Sávio Silas Farias Falcão

**Avaliação da função do fator EIF4E2 e suas proteínas parceiras SLBP1 e
SLBP2 em *Trypanosoma brucei***

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadora: Dra. Maria José Ribeiro Bezerra

Recife

2022

Título do trabalho em inglês: Functional evaluation of the EIF4E2 factor and its partner proteins SLBP1 and SLBP2 in Trypanosoma brucei.

O presente trabalho foi realizado com apoio de Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) - Código de Financiamento 001.

F185a Falcão, Sávio Silas Farias.
Avaliação da função do fator EIF4E2 e suas proteínas parceiras SLBP1 e SLBP2 em Trypanosoma brucei / Sávio Silas Farias Falcão. -- 2022.
103 f. : il. color.

Orientador: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.
Coorientadora: Maria José Ribeiro Bezerra.
Dissertação (Mestrado Acadêmico em Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde), Instituto Aggeu Magalhães, 2022.
Bibliografia: f. 95-103.

1. Trypanosomatina. 2. Regulação da Expressão Gênica. 3. Fator de Iniciação 4E em Eucariotos. 4. Biossíntese de Proteínas. 5. Trypanosoma brucei brucei. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Rede de Bibliotecas da Fiocruz com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Bibliotecário responsável pela elaboração da ficha catalográfica: Adagilson Batista Bispo da Silva - CRB-1239
Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos

Sávio Silas Farias Falcão

**Avaliação da função do fator EIF4E2 e suas proteínas parceiras SLBP1 e
SLBP2 em *Trypanosoma brucei***

Dissertação de Mestrado Acadêmico em Biociências e Biotecnologia em Saúde apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências.

Aprovada em: 30 de setembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Tatiany Patrícia Romão Pompílio de Melo
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dra. Tamara de Carli da Costa Lima
Centro Universitário Tabosa de Almeida/Asces-Unita

Dedico esse trabalho...

A Deus que nunca me abandonou e não abandonará, minha fiel luz nesse mundo de trevas e o salvador dessa alma que outrora estava perdida.

À minha família, especialmente à minha mãe, que me auxiliou desde sempre e nunca me deixou faltar nada, sua dedicação e seu amor cuidadoso foram essenciais para que eu chegasse até essa etapa de minha vida. A meu amado irmão e a meus fiéis amigos e a todos que me ajudaram até aqui.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto pela oportunidade de aprimorar minha formação acadêmica na área da pesquisa científica, pela confiança depositada para realização deste trabalho e por toda paciência e dedicação em me ajudar em cada dificuldade desta jornada.

Agradeço a minha coorientadora Dra. Maria José Ribeiro Bezerra pelo grande auxílio, por todo o conhecimento oferecido e pela paciência e dedicação em me guiar em cada etapa no decorrer deste trabalho.

Agradeço ao departamento de Microbiologia e ao Instituto Aggeu Magalhães pela infraestrutura e todos os recursos essenciais durante a realização deste projeto, aos parceiros e colegas do grupo de pesquisa que sempre atenciosos me auxiliaram em diversas etapas desta pesquisa.

Agradeço ao financiamento pelos órgãos de fomento, que foram imprescindíveis para a realização deste trabalho.

Agradeço a Deus por todas as oportunidades que ele tem me dado, por me guiar e me dar sabedoria para que eu pudesse alcançar meus objetivos, a minha mãe pelo amor e ensinamentos que me fizeram quem sou, a meu irmão por ser o melhor amigo que eu poderia ter, e toda minha família e amigos que me acompanharam e me ajudaram nesta jornada da minha vida.

Enfim agradeço a todas as pessoas que colaboraram direta ou indiretamente no meu percurso acadêmico e profissional.

RESUMO

FALCÃO, Sávio Silas. Avaliação da função do fator EIF4E2 e suas proteínas parceiras SLBP1 e SLBP2 em *Trypanosoma brucei*. 2022. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Protozoários tripanosomatídeos incluem patógenos de importância médico-veterinária entre os quais se encontra o *Trypanosoma brucei*, espécie alvo deste estudo. A regulação gênica nesses organismos é mediada por mecanismos pós-transcricionais, tais como o controle da estabilidade e tradução dos mRNAs. Em eucariotos, a regulação da tradução ocorre principalmente na etapa de iniciação, mediada por fatores de iniciação eucarióticos (eIFs). O complexo eIF4F, composto pelas subunidades eIF4A, eIF4E e eIF4G, é o responsável pelo reconhecimento dos mRNAs, com a subunidade eIF4E se ligando a extremidade 5' do mRNA. O eIF4E possui seis homólogos já identificados nos tripanosomatídeos (EIF4E1 ao E6). O EIF4E2 é o menos conhecido deles, porém estudos mais recentes demonstraram que este é capaz de se ligar de forma específica a um de dois homólogos da proteína SLBP (*stem loop binding protein*) de tripanosomatídeos, a SLBP2. Na maior parte dos eucariotos um único homólogo de SLBP é encontrado e em metazoários demonstrou-se ter um papel na regulação do metabolismo de mRNAs de histonas. Esse estudo visa avançar no estudo do EIF4E2 e SLBPs através de duas abordagens principais: quantificação dos seus níveis intracelulares em células procíclicas de *T. brucei*; avaliação de proteínas parceiras associadas, através de reações de imunoprecipitação seguida de identificação por espectrometria de massas. A quantificação da expressão de ambas as proteínas foi realizada, confirmando um perfil de expressão da SLBP1, expresso constitutivamente, significativamente maior que a SLBP2, diferencialmente expressa durante o ciclo celular. Resultados de espectrometria demonstraram a associação do complexo de MKT-1 co-precipitando de forma específica com a SLBP1, sugerindo um possível papel funcional na ativação da tradução nesses organismos, enquanto que a SLBP2 e EIF4E2 aparentemente não estão associados diretamente a tradução, com a SLBP2 aparentemente se associando a um sistema de regulação envolvendo proteínas do sistema ubiquitina-proteassoma, influenciando na regulação do seu metabolismo proteico. Os resultados obtidos podem embasar futuros estudos que busquem métodos mais efetivos de combate para patologias causadas pelo *T. brucei* e organismos relacionados, como o *T. cruzi* e espécies de *Leishmania*.

Palavras-chave: Trypanosomatidae; Regulação da Expressão Gênica; Fator de Iniciação 4E em Eucariotos; Biossíntese de Proteínas; *Trypanosoma brucei brucei*.

ABSTRACT

FALCÃO, Sávio Silas. Functional evaluation of the EIF4E2 factor and its partner proteins SLBP1 and SLBP2 in *Trypanosoma brucei*. 2022. Thesis (Master's degree in Biosciences and Biotechnology in Health) - Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2022.

Trypanosomatid protozoa include pathogens of medical-veterinary importance, among which is *Trypanosoma brucei*, the target species of this study. Gene regulation in these organisms is mediated by post-transcriptional mechanisms, such as control of the stability and translation of mRNAs. In eukaryotes, translation regulation occurs mainly in the initiation step, mediated by eukaryotic initiation factors (eIFs). The eIF4F complex, formed by the eIF4A, eIF4E and eIF4G subunits, is responsible for the recognition of mRNAs, with the eIF4E subunit binding to the 5' end of the mRNA. eIF4E has six homologues already identified in trypanosomatids (EIF4E1 to E6). EIF4E2 is the least known of these, but more recent studies have shown that it is able to specifically bind to one of two homologues of the trypanosomatid SLBP (*stem loop binding protein*), SLBP2. In most eukaryotes a single homolog of SLBP is found and in metazoans a function in the regulation of histone mRNA metabolism has been shown. This study aimed to advance the study of EIF4E2 and SLBPs through two main approaches: quantification of their intracellular levels in *T. brucei* procyclic cells; evaluation of associated partner proteins, through immunoprecipitation reactions followed by identification through mass spectrometry. The quantification of the expression of both proteins was realized, confirming an expression profile of SLBP1, constitutively expressed, significantly higher than SLBP2, expressed differentially during the cell cycle. Spectrometry results demonstrated the association of the MKT-1 complex coprecipitating specifically with SLBP1, suggesting a possible functional role in the activation of translation in these organisms, while SLBP2 and EIF4E2 are apparently not directly associated with translation, with SLBP2 apparently associating with a regulatory system involving proteins of the ubiquitin-proteasome system, influencing the regulation of its protein metabolism. The obtained results can support future studies that seek more effective methods of controlling pathologies caused by *T. brucei* and related organisms, such as *T. cruzi* and *Leishmania* species.

Keywords: Trypanosomatidae; Regulation of Gene Expression; Eukaryotic Initiation Factor-4E; Protein Biosynthesis; *Trypanosoma brucei brucei*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estruturas celulares de <i>Trypanosoma brucei</i>	19
Figura 2 -	Principais variações morfológicas dos tripanossomatídeos	20
Figura 3 -	<i>Glossina spp.</i> mosca Tsé-Tsé.....	21
Figura 4 -	Ciclo biológico de <i>Trypanosoma brucei</i>	23
Gráfico 1 -	Distribuição de HAT em áreas de risco	26
Figura 5 -	Distribuição geográfica de HAT <i>gambiense</i> e <i>rhodesiense</i> na África.....	27
Figura 6 -	Esquema representativo da iniciação da tradução em eucariotos	34
Figura 7 -	Modelo representativo das múltiplas atividades do fator eIF4E e suas associações na célula.	36
Figura 8 -	Mecanismos gerais dos complexos do tipo eIF4F de tripanossomatídeos	38
Figura 9 -	Processamento de pré-mRNAs de Histona pela SLBP	43
Figura 10 -	Representação esquemática dos domínios gênicos de SLBP1 e SLBP2 de <i>Trypanosoma brucei</i>	45
Figura 11 -	Estrutura tridimensional da proteína SLBP1 e SLBP2 de <i>Trypanosoma brucei</i>	47
Figura 12 -	Organograma metodológico.....	49
Quadro 1 -	Construções plasmidiais obtidas em trabalhos anteriores	50
Quadro 2 -	Primers utilizados na amplificação de SLBP1	52
Figura 13 -	Expressão das proteínas recombinantes fusionadas a histidina	60
Figura 14 -	Purificação das proteínas recombinantes	61
Figura 15 -	Quantificação das proteínas recombinantes com curva de BSA.....	62
Figura 16 -	Quantificação da expressão endógena de SLBP1 e SLBP2 em extratos de <i>T. brucei</i> 427	64
Figura 17 -	PCR e processo de clonagem de SLBP1 em p2477	66
Figura 18 -	Processo de clonagem de SLBP2 em p2477	68
Figura 19 -	Linearização das construções em p2477 e pC-PTP para transfecção...	70
Figura 20 -	Curvas de crescimento de proteínas fusionadas ao <i>tag</i> PTP em células de <i>T.brucei</i>	72
Figura 21 -	Avaliação do perfil de expressão de SLBP1, SLBP2 e EIF4E2 fusionadas ao <i>tag</i> HA em <i>T. brucei</i>	73

Figura 22 - Ensaio de western blot das imunoprecipitações das proteínas SLBP1 e SLBP2 –pC-PTP	75
Figura 23 - Ensaio de western blot das imunoprecipitações das proteínas fusionadas ao <i>tag</i> HA.....	77
Figura 24 - Desenho esquemático da ação das proteínas do complexo MKT1 na iniciação da tradução	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes e construções plasmidiais.....	51
Tabela 2 - Principais peptídeos detectados pela técnica de espectrometria de massas correlacionadas a proteína SLBP1.....	79
Tabela 3 - Principais peptídeos detectados pela técnica de espectrometria de massas correlacionadas a proteína SLBP2.....	82
Tabela 4 - Principais peptídeos detectados pela técnica de espectrometria de massas correlacionadas a proteína EIF4E2.....	84

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
BARP	<i>Bloodstream stage Alanine Rich Protein</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i>
Cap	Estrutura presente na extremidade 5' do Mrna
CATT	<i>Card agglutination test for trypanosomiasis</i>
CENP-A	Proteína centromérica A
DEAD	Ácido Aspártico (D) Ácido Glutâmico (E), Alanina (A), Ácido aspártico (D)
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
D.O.	Densidade Óptica
DTN	Doença tropical negligenciada
DTT	Ditiotreitol
eIF	Fator de Iniciação Eucariótico
EP	(Gli-Pro)
EMA	<i>European Medicines Agency</i>
Glu	Ácido Glutâmico
Gly	Glicina
His	Histidina
HAT	Tripanossomíase Africana Humana
HBP	Proteína ligadora de histonas
IgG	Imunoglobulina G
ImageJ	<i>Image Processing and Analysis in Java</i>
IP	Imunoprecipitação
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo
kDa	kiloDalton
LB	Luria Bertani
LCR	Líquido cefalorraquidiano
LMW	<i>Low Molecular Weight Protein Marker</i>
mL	Mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA Mensageiro

ng	Nanograma
ONG	Organização não governamental
PABP	Proteína de ligação ao Poli A
pb	Pares de base
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline</i>
PCF	Forma procíclica
PCR	Reação em cadeia da polymerase
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
Pro	Prolina
PTP	Proteína C, sítio de clivagem TEV protease, Proteína A
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i>
PML	Leucemia promielocítica
RBP	Proteína ligadora de RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RPM	Rotação por minuto
SFB	Soro fetal bovino
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida – Dodecil Sulfato de Sódio
SLIP1	Proteína de interação a SLBP 1
SL-RNA	Sequência Líder RNA
SLBP	Proteína ligadora da alça em haste
SNC	Sistema nervoso central
Tb	<i>Trypanosoma brucei</i>
TBS	Tampão Salino de Tris
TET	Tetraciclina
tRNA	RNA Transportador
UTR	Região não traduzida
VSG	Glicoproteína variante de superfície
OMS	Organização Mundial da Saúde
WT	Linhagem do tipo selvagem
μL	Microlitro
μg	Micrograma.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1	FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE	18
2.2	TRYPANOSOMA BRUCEI E TRIPANOSSOMÍASE HUMANA AFRICANA	20
2.2.1	Ciclo biológico	22
2.2.2	Epidemiologia	24
2.2.2.1	Fatores de risco	24
2.2.2.2	Distribuição geográfica	26
2.2.3	Aspectos clínicos	28
2.2.4	Diagnóstico e tratamento	29
2.3	BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS	31
2.3.1	Regulação da Expressão Gênica	31
2.3.2	Transcrição Policistônica e Processamento dos mRNAs	31
2.4	SÍNTESE PROTEICA E COMPLEXO EIF4F EM EUCARIOTOS	32
2.4.1	eIF4A - RNA helicase	34
2.4.2	eIF4E - Proteína de ligação ao cap	35
2.4.3	eIF4G - Estruturador do complexo eIF4F	36
2.4.4	PAPB - Proteína de ligação à cauda poli-A	37
2.5	SÍNTESE PROTEICA E COMPLEXO EIF4F EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	37
2.5.1	Homólogos de eIF4A	39
2.5.2	Homólogos de eIF4E	39
2.5.3	Homólogos de eIF4G	40
2.5.4	Homólogos de PABP	41
2.6	PROTEÍNA LIGADORA DE HISTONA (SLBP) E CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	41
2.6.1	Regulação de mRNAs de histonas	41
2.6.2	Proteínas Histonas Eucarióticas	43
2.6.3	Expressão de Histonas em Tripanossomatídeos	44
2.6.4	Interação da SLBP2 com o EIF4E2	46
3	OBJETIVOS	48
3.1	OBJETIVO GERAL	48

3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	48
4	METODOLOGIA.....	49
4.1	OBTENÇÃO DAS CONTRUÇÕES PLASMIDIAIS	50
4.1.1	Clonagem de SLBP1 e SLBP2 em p2477	51
4.2	CULTIVO E TRANSFECCÃO DE CÉLULAS DE T. BRUCEI	53
4.3	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	55
4.4	OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS E REALIZAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO	56
4.4.1	Ensaio de <i>Western blot</i>.....	57
4.5	LISADO E IMUNOPRECIPITAÇÃO.....	58
4.6	PREPARAÇÃO E ANÁLISE DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	58
5	RESULTADOS	60
5.1	EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES	60
5.2	ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO ENDÓGENA DAS SLBPS	63
5.3	CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS	64
5.3.1	Amplificação e Subclonagem de SLBP1 em p2477	64
5.3.2	Subclonagem de SLBP2 em p2477	67
5.4	TRANSFECCÃO DE CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS	69
5.5	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG PTP.....	71
5.6	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG HA.....	72
5.7	LISADOS E IMUNOPRECIPITAÇÕES DE PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG PTP	74
5.8	LISADOS E IMUNOPRECIPITAÇÕES DE PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG HA	76
5.9	AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PARCEIROS PROTEICOS ATRAVÉS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	77
6	DISCUSSÃO	87
7	CONCLUSÃO.....	94
	REFERÊNCIAS	95

1 INTRODUÇÃO

Protozoários flagelados da família Trypanosomatidae dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* são agentes causadores de enfermidades de importância para saúde pública. Esses parasitos são capazes de infectar todas as classes de vertebrados, alguns invertebrados e plantas. As três doenças humanas provocadas por esses patógenos, a Doença do Sono, a Doença de Chagas e as diversas formas de Leishmaniose, podem ser fatais quando não tratadas e juntas chegam a afetar cerca de 21 milhões de pessoas. No que concerne aos tratamentos disponíveis, estes apresentam limitações que prejudicam o controle efetivo das respectivas doenças.

Em relação a síntese dos mRNAs destes parasitas, chama então a atenção a ausência de mecanismos conhecidos de regulação dessa síntese. Já no que concerne a sua tradução, os tripanosomatídeos se destacam por possuírem múltiplos complexos do tipo eIF4F de iniciação da tradução. Em outros eucariotos, mais bem conhecidos, o complexo eIF4F é responsável por dar início a tradução dos mRNAs, mediando seu reconhecimento pela sua extremidade 5' e recrutamento da subunidade 40S ribossomal. Este complexo é baseado em duas subunidades principais: eIF4E, que reconhece a extremidade 5' do mRNA; e eIF4G, que estrutura o complexo e permite a ligação ao eIF4E e outras proteínas parceiras, como a RNA helicase eIF4A.

Em dois dos homólogos de eIF4E de tripanosomatídeos, os EIF4E1 e EIF4E2, ainda não foi observado a atuação em complexos do tipo eIF4F, suas funções ainda permanecem desconhecidas, embora o EIF4E2, foco deste trabalho, tenha sido previamente identificado em associação com polissomos em *Leishmania*, um indicativo de provável atuação na tradução, mas que precisa ser confirmada. Até recentemente o EIF4E2 era o homólogo de eIF4E menos conhecido, mas estudos recentes demonstraram que em *Trypanosoma brucei* este se liga de forma específica a um de dois homólogos da proteína SLBP (“*Stem Loop Binding Protein*”)

de tripanosomatídeos, a SLBP2, e tem sua expressão regulada de acordo com o crescimento do parasita.

Em metazoários, a SLBP (*Stem Loop Binding Protein*), também conhecida como HBP (*Histone mRNA Binding Protein*) é uma proteína predominantemente nuclear que se localiza no citoplasma apenas durante a fase S do ciclo celular, quando ocorre a tradução dos mRNAs nos quais se liga, codificantes das histonas. Foi observado que as SLPBs apresentam como função regular o metabolismo desses mRNAs, participando da sua tradução, transporte, degradação e processamento. Em metazoários, foi observado que a SLPB interage com o complexo eIF4F, através da interação com a proteína SLIP1 (*SLBP interacting protein*), uma proteína que se liga à SLBP de humano, promovendo a tradução da região terminal de mRNAs na alça em haste, porém não sendo capaz de estimular a expressão na região 5' dos mRNAs.

Em tripanosomatídeos, dos dois homólogos da proteína SLBP identificados, (SLBP1 e 2) a SLBP1 é a que mais se assemelha a SLBP de mamíferos. Já a SLBP2, é bem menos conservada e apresenta ainda uma região diferenciada que parece mediar sua interação específica com o EIF4E2. A SLBP2 localiza-se estritamente no citoplasma, mas é encontrada restrita a alguns loci citoplasmáticos que se assemelham a grânulos. Em contraste, a SLBP1 é mais amplamente distribuída por todo o citoplasma, mas também está ausente do núcleo. A SLBP1 apresenta expressão constitutiva em formas procíclicas de *T. brucei*, enquanto que a SLBP2 é diferencialmente expressa durante o crescimento em cultura, como o EIF4E2, embora no caso da SLBP2 esta expressão diferencial também esteja ligada ao ciclo celular. É possível que a associação EIF4E2/SLBP2 seja necessária para que o EIF4E2 se ligue a populações de mRNAs selecionados, influenciando sua tradução via repressão ou estimulando a expressão dos mesmos ou interferindo na sua estabilidade por mecanismos, ainda desconhecidos, mas ligados ao ciclo celular. E talvez a SLBP1 e SLBP2 funcionem de forma antagônica atuando sobre os mesmos mRNAs, o que também precisa ser demonstrado ou descartado.

O presente estudo tem então como principal objetivo contribuir para o estudo da função do EIF4E2 e dos dois homólogos de SLBP de *T. brucei*. Nesse sentido esse trabalho se propôs a quantificar a expressão dos dois homólogos de SLBPs de *T. brucei* ao longo do seu crescimento e ciclo celular, comparando com resultados previamente definidos para o EIF4E2. Também buscou identificar parceiros proteicos diferencialmente associados a cada uma das três proteínas e que podem ajudar a melhor definir sua função. O conhecimento gerado com estas abordagens poderá ajudar a esclarecer um modelo novo de regulação da tradução em tripanosomatídeos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

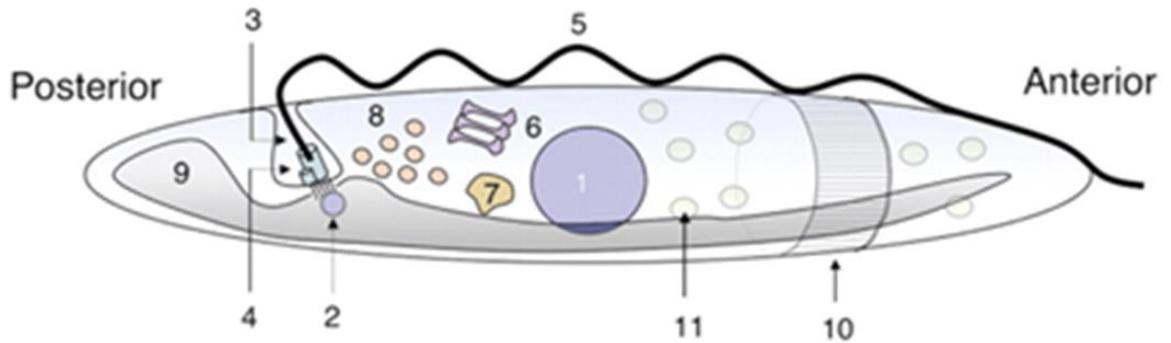
2.1 FAMÍLIA TRYPANOSOMATIDAE

Os tripanossomatídeos constituem um grupo de protozoários parasitas flagelados pertencentes à ordem Kinetoplastida, dos quais participam diversos patógenos de humanos e animais de grande importância na saúde pública. Os parasitas dessa família são predominantemente monoxenos, ou seja, utilizam apenas um hospedeiro, porém alguns tripanossomatídeos possuem um ciclo de vida heteroxeno, precisando de hospedeiros intermediários para completar seu ciclo biológico. Entre estes destacam-se as espécies dos gêneros *Trypanosoma* e *Leishmania*, com ciclos zoonóticos ou antroponóticos e transmitidas por insetos hematófagos (KAUFER et al., 2017).

Dentre as principais doenças humana provocadas por tripanossomatídeos temos a tripanossomíase humana africana (HAT), causada pelo agente etiológico *Trypanosoma brucei*, a doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, e as diversas formas de leishmanioses, associadas com cerca de 20 espécies do gênero *Leishmania*. As tripanossomíases são majoritariamente zoonóticas, ou seja, possuem reservatórios animais para manutenção de sua endemicidade, com ressalva da HAT causada pelo *Trypanosoma brucei gambiense* e algumas leishmanioses causadas pela *Leishmania tropica* e *Leishmania donovani*, no qual o homem é o principal reservatório (FRANCO et al., 2014).

As características da biologia celular dos parasitas tripanossomatídeos são em geral bem parecidas entre as suas espécies, podendo ter a presença ou ausência de estruturas morfológicas comuns dependendo do estágio do ciclo de vida em que se encontram. Todas as espécies apresentam apenas um único flagelo e uma bolsa flagelar podendo se externar dependendo da forma celular, além de uma única mitocôndria, com seu DNA mitocondrial normalmente condensado próximo aos corpos basais do flagelo, região denominada cinetoplasto (figura 1) (SIMPSON et al., 2006).

Figura 1 - Estruturas celulares de *Trypanosoma brucei*

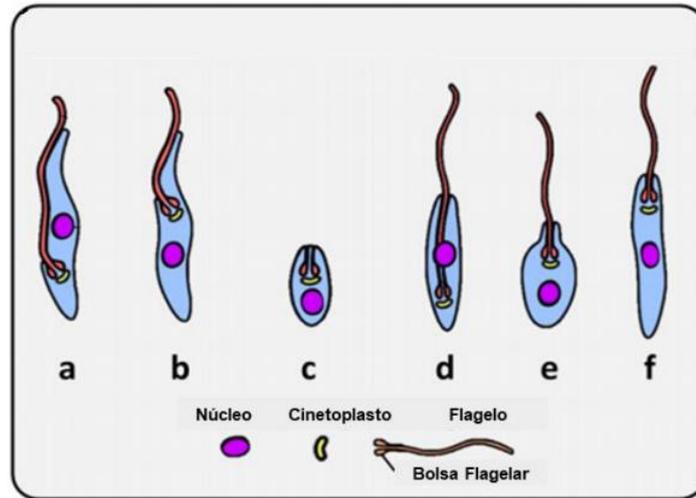


- | | |
|-------------------------------------|----------------------------------|
| 1. Núcleo | 7. Lisossomo |
| 2. Cinetoplasto | 8. Endossomos |
| 3. Bolsa Flagelar | 9. Mitocôndria |
| 4. Corpo Basal e Corpo probasal | 10. Microtúbulo do citoesqueleto |
| 5. Axonema e estrutura paraflagelar | 11. Glicossomos |
| 6. Golgi | |

Fonte: Adaptado de KEITH et al., 2005.

Os tripanossomatídeos também possuem várias características genômicas incomuns comparado a outros eucariotos, como por exemplo o *trans-splicing*, a escassez de íntrons e a edição de RNA mitocondrial. Estes organismos possuem uma variedade de pleomorfismos celulares, dependendo da espécie e da interação parasito-hospedeiro, dentre essas variações morfológicas podem-se destacar as formas promastigota, tripomastigota, amastigota, epimastigota, opistomastigota e coanomastigota (Figura 2) (KAUFER et al., 2017).

Figura 2 – Principais variações morfológicas dos tripanossomatídeos



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

Fonte: adaptado de KAUFER et al., 2017.

2.2 *TRYPANOSOMA BRUCEI* E TRIPANOSSOMÍASE HUMANA AFRICANA

A HAT ou doença do sono é uma grave doença meningo-encefálica que se desenvolve após uma infecção linfática aguda. Ela é causada pela infecção com o parasita *T. brucei gambiense* ou *T. brucei rhodesiense*, transmitidos através das moscas do gênero *Glossina*, conhecidas pelo nome comum de moscas tsé-tsé (Figura 3) (PONTE-SUCRE et al., 2016).

Figura 3 – *Glossina* spp. mosca Tsé-Tsé.



Legenda: Mosca Tsé-Tsé do gênero *Glossina*, vetor do *Trypanosoma brucei*, realizando repasto sanguíneo.

Fonte: *Encyclopedia Britannica*. 2017.

Segundo a OMS, os primeiros casos de epidemias de HAT na era moderna foram descritos no final do século XIX, com mais duas epidemias em 1920 e na década de 1960, com as ações tomadas no século XX a doença pareceu poder ser efetivamente controlada (OMS, 2012). Entretanto, número alarmantes de novos casos foram relatados no início do século XXI, após décadas de negligência, no qual cerca de 300.000 pessoas foram identificadas infectadas pelo *Trypanosoma brucei*. Este ao infectar o cérebro é capaz de causar um colapso neurológico, induzindo ao coma ou causando a morte se o paciente não for tratado (OMS, 2012). A partir disso, novas estratégias foram tomadas pela OMS para controlar a tendência ascendente da doença e têm se mostrado eficazes com menos de 8000 casos notificados em 2012, e menos de 2000 casos reportados em 2020 (OMS, 2013; OMS, 2021).

A HAT atualmente é incluída no roteiro da OMS para erradicação (interrupção de transmissão) e eliminação da doença como problema de saúde pública em diversos

países visando reduzir a transmissão a zero em 15 países, cerca de 62% dos países afetados, até 2030. (OMS, 2021)

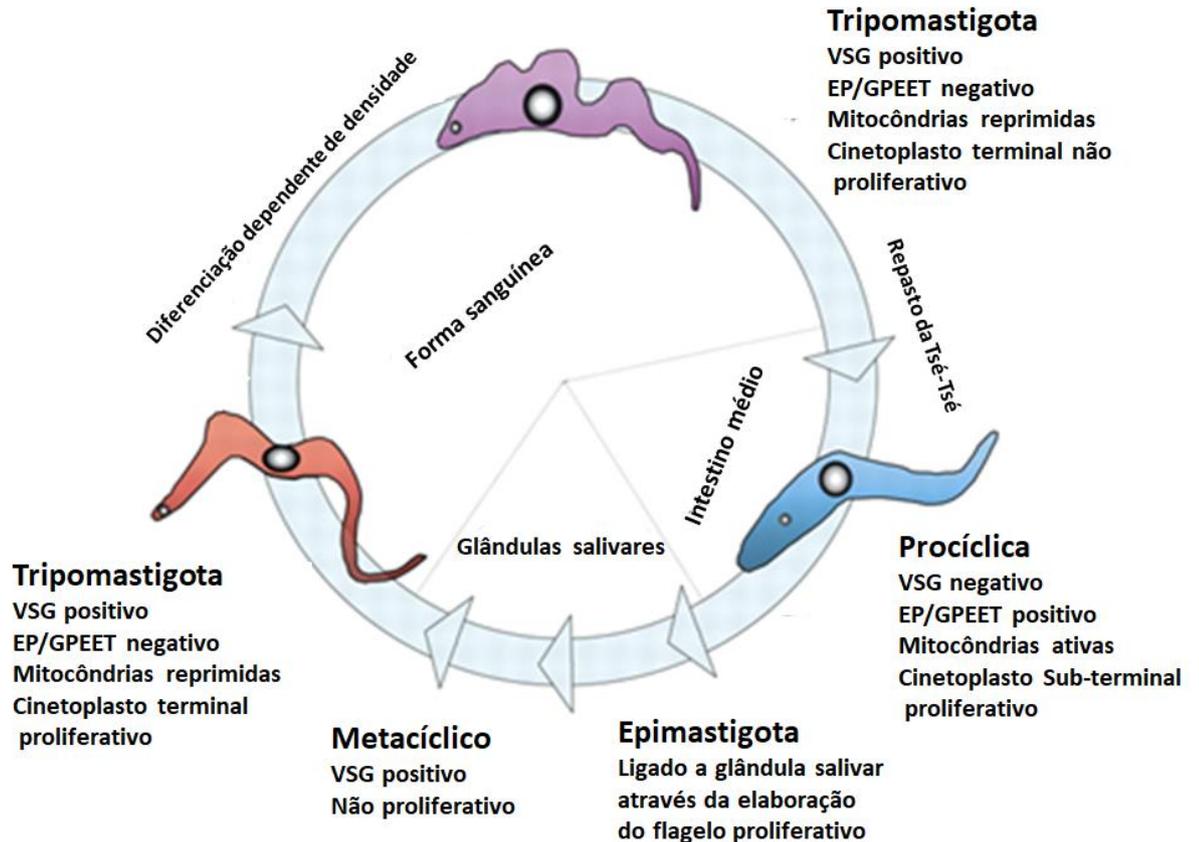
2.2.1 Ciclo biológico

A forma do *T. brucei* presente na corrente sanguínea de hospedeiros mamíferos se encontra originalmente em sua morfologia de tripomastigota sanguínea proliferativa. Durante sua estada na corrente sanguínea, os parasitas são capazes de expressar uma glicoproteína variante de superfície (VSG) fornecendo a capacidade de evitar o seu reconhecimento pelo sistema imune do hospedeiro (MATTHEWS, 2005). A partir da proliferação dos parasitas na corrente sanguínea, esses parasitas se diferenciam para uma forma tripomastigota sanguínea não proliferativa, fase adaptada para sobreviver a transmissão através da mosca tsé-tsé. O processo de transmissão do hospedeiro mamífero para o hospedeiro intermediário invertebrado ocorre após a hematofagia com a ingestão pelo inseto do sangue contaminado com tripomastigotas sanguíneas não proliferativas (FRANCO et al., 2014).

Após a ingestão, os parasitas se estabelecem no intestino médio do inseto vetor, onde são geradas as formas tripomastigotas procíclicas proliferativas que expressam uma camada superficial distinta da presente na corrente sanguínea. A proteína VSG é então substituída por prociclinas EP (Glu-Pro) e GPEET (Gly-Pro-Glu-Glu-Thr), ambas importantes para o desenvolvimento celular e para a sobrevivência do parasita no vetor. Já o cinetoplasto é recondicionado para a região subterminal da célula. Após o estabelecimento dos parasitas no intestino médio, ocorre a migração das formas procíclicas para as glândulas salivares, onde se diferenciam para a forma epimastigota proliferativa e se fixam na região através da atividade flagelar e expressão de uma nova glicoproteína de superfície, a proteína de fase sanguínea rica em alanina (BARP). Após a sua proliferação os tripanossomas

se diferenciam na forma tripomastigota metacíclica não proliferativa, se preparando para uma nova transmissão a um hospedeiro mamífero (Figura 4) (MCCULLOCH, 2004).

Figura 4 – Ciclo biológico de *Trypanosoma brucei*



Legenda: Os tripanossomas proliferam na corrente sanguínea na forma tripomastigota, capaz de expressar um revestimento de VSG para evitar a resposta imune. Com o aumento dos parasitas ocorre a diferenciação para a forma tripomastigota não proliferativa ingerida pelo vetor após o seu repasto sanguíneo. Ocorre então a migração para o intestino médio do inseto e a diferenciação para a forma procíclica, mudando seu perfil de expressão de VSG para EP e GPEET. Em seguida os parasitas migram para as glândulas salivares do inseto, onde se diferenciam para formas epimastigotas, capazes de se proliferar e eventualmente gerar as formas metacíclicas não proliferativas, prontas para a transmissão a um novo hospedeiro.

Fonte: adaptado de KEITH et al., 2005.

2.2.2 Epidemiologia

A HAT é uma doença presente principalmente em comunidades rurais e de baixa renda na região da África Subsaariana e, por esse motivo, é considerada uma doença tropical negligenciada (DTN) (OMS, 2021). No decorrer do século XX, a HAT, apelidada de doença colonial, foi responsável por diversas epidemias graves, a última ocorrendo no final da década de 1990, com mais de 25.000 casos relatados por ano, alcançando cerca de 35.000 casos por ano em 1997 e 1998, com um total de cerca de 300.000 casos reais (OMS, 2012). Devido a essa gravidade e aumento progressivo da HAT, diversos programas nacionais de controle da doença do Sono (NSSCPs) nos países endêmicos surgiram para conter a crescente onda de casos (SIMARRO et al., 2015). Esses programas nacionais foram coordenados pela OMS e contaram com o apoio de diversas empresas, farmacêuticas, ONGs, instituições de pesquisa e organizações de filantropia. Através desses esforços, em uma década a doença pôde em fim ser controlada, reduzindo drasticamente o número de casos relatados (OMS, 2013) (FRANCO et al., 2020).

2.2.2.1 Fatores de risco

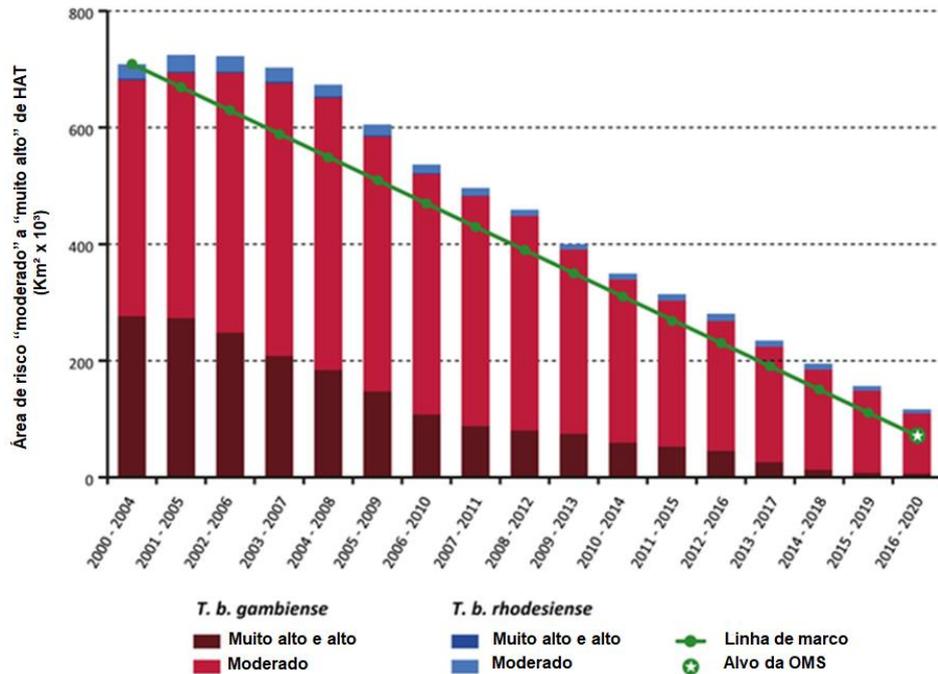
Em contraste com a constante redução de casos relatados em nível global, certas áreas ainda continuam mapeadas como área de risco para a infecção com HAT, áreas com potencial gerador de aumento de endemicidade e possíveis novas epidemias. Isso se deve a vários fatores, podendo variar a depender das configurações ambientais, características do vetor e ocupações humanas dessas regiões (OMS, 2021).

As florestas úmidas são um fator para a disseminação das moscas tsé-tsé, aumentando assim o contato humano com o vetor possivelmente contaminado, através de tarefas como a caça, busca de madeira e desmatamento para prática da

agricultura, entre outras (GRÉBAUT et al., 2001). Outro fator de risco associado ao local é a região de matas ribeiras, onde o vetor pode constituir seu habitat. O risco de transmissão aumenta quando os habitats do vetor estão restritos, como em estações de seca (ROBAYS et al., 2004). A HAT *gambiense* é considerada uma doença rural, mas também está associada ocasionalmente ao ambiente urbano, geralmente em periferias suburbanas e áreas próximas de vegetação. Além disso, o processo de migração de pessoas vindas de áreas rurais gera um potencial de proliferação mesmo em regiões urbanas (GRÉBAUT et al., 2009). A HAT provocada pelo *T. rhodesiense* possui fatores de risco diferentes, uma vez que é causada por uma espécie que está comumente presente em reservatórios animais e não é muito bem adaptada a humanos (ZOLLER et al., 2008). Um dos fatores de risco é a entrada em áreas normalmente restritas onde a fauna é preservada, como em parques e reservas nacionais, também associadas à movimentação de gado usado para pastagem. Esse é o principal fator de risco observado com a infecção de indivíduos associados a prática da pecuária (KINUNG'HI et al., 2006).

Em análises mais recentes no período de 2019 e 2020, das áreas de risco classificadas em muito alto, alto ou moderado para HAT foi demonstrada uma diminuição constante, assim como visto na ao longo de toda a década anterior (Gráfico 1) (FRANCO et al., 2022).

Gráfico 1 – Distribuição de HAT em áreas de risco



Legenda: Risco de infecção, em áreas com risco de moderado a muito alto para a HAT causada tanto pelo *T. b. rhodesiense* como *T. b. gambiense* em comparação com os resultados esperados de redução de contaminação pela OMS.

Fonte: Adaptado de Franco et al., 2022.

2.2.2.2 Distribuição geográfica

O *T. b. gambiense* é encontrado na África ocidental e central, normalmente relacionada com o aspecto crônico da doença (HAT *gambiense*). É uma doença que infecta principalmente o homem com uma influência menor dos reservatórios animais. A HAT *gambiense* está associado com cerca de 98% dos casos totais de HAT que foram notificados na última década (BRUN, 2010). O *T. b. rhodesiense*, por sua vez, é encontrado mais comumente na parte oriental e no sul da África. Essa subespécie é menos adaptada aos seres humanos, sendo caracterizada como uma

zoonose, que acomete principalmente animais, geralmente o gado da região e animais selvagens, contaminando os humanos acidentalmente. Visto isso, a forma *rhodesiense* possui um grande potencial epidêmico, sendo responsável por grandes surtos anteriormente notificados (HIDE et al., 1999; KOERNER et al., 1995).

As duas formas da doença possuem uma separação geográfica bem evidente relacionado com o Vale do Rift, com a HAT *rhodesiense* presente no lado oriental do vale enquanto que a HAT *gambiense* situada no lado ocidental do vale. Com o passar do tempo, entretanto, essas fronteiras vêm sendo reduzidas principalmente no noroeste de Uganda e na fronteira entre a República Unida da Tanzânia e a República Democrática do Congo, podendo ter a sobreposição das duas formas em um futuro próximo (Figura 5) (PICOZZI et al., 2005).

Figura 5 – Distribuição geográfica de HAT *gambiense* e *rhodesiense* na África

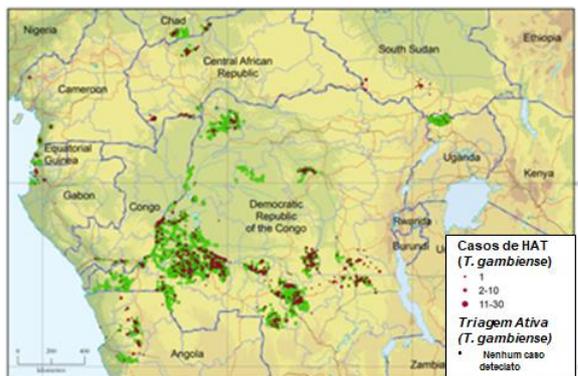
Casos de HAT *gambiense* na parte ocidental da África (2019-2020)



Casos de HAT *rhodesiense* na parte oriental e sul da África (2019-2020)



Casos de HAT *gambiense* na África central (2019-2020)



Legenda: Mapa dos casos notificados de HAT gambiense na parte central, oeste, e HAT rhodesiense na parte leste e sul da África no período de 2019 a 2020.

Fonte: Adaptado de FRANCO, et al. 2022.

2.2.3 Aspectos clínicos

O aspecto clínico da HAT evolui em basicamente dois estágios. O primeiro estágio, ou inicial, começa quando os parasitas infectam a corrente sanguínea e o sistema linfático (fase hemolinfática). O segundo estágio, por sua vez, ocorre no momento em que os parasitas tripomastigotas sanguíneos conseguem penetrar a barreira hematoencefálica, sendo capazes de invadir o sistema nervoso central (fase meningoencefálica) (BRUN, 2010). A invasão do SNC é seguida de um dano neurológico progressivo que pode ser fatal se não tratada, pois geralmente os pacientes evoluem gradativamente para o coma, falência grave de múltiplos órgãos e, eventualmente, morte (OMS, 2013; BRUN, 2010). Os aspectos clínicos variam a depender dos estágios clínicos e das duas formas da doença, a HAT *rhodesiense* e a *gambiense*, porém os sinais e sintomas são geralmente os mesmos para ambas as formas, diferindo em questão de periodicidade e intensidade. A HAT *rhodesiense* é uma doença aguda que normalmente evolui para morte em cerca de seis meses e a HAT *gambiense*, por sua vez, tem uma progressão mais crônica com uma duração de cerca de três anos (CHECCHI, 2008).

Os principais sinais e sintomas do primeiro estágio de ambas as formas da HAT compreendem febre intermitente, cefaleia, prurido, linfadenopatias, astenia, anemia, distúrbios endócrinos e cardíacos, dores musculoesqueléticas e hepatoesplenomegalia. A maioria dos sintomas neuropsiquiátricos englobando os distúrbios do sono são vistos durante o segundo estágio da doença (SAHLAS, 2002; SIMARRO, 2012).

2.2.4 Diagnóstico e tratamento

Nas últimas décadas, apenas pequenos avanços foram realizados quando se trata do diagnóstico da HAT, uma vez que a detecção parasitária ainda possui uma sensibilidade insatisfatória, além da falta de um simples teste de diagnóstico sorológico para a forma *rhodesiense* (CHAPPUIS et al., 2005, CHAPPUIS, 2018). Entretanto, avançadas pesquisas foram realizadas na caracterização do estágio e na área molecular que possivelmente podem levar a uma nova geração de diagnósticos mais efetivos (MATTHEWS et al., 2015). Devido à alta toxicidade do melarsoprol, fármaco mais utilizado durante o segundo estágio de HAT, o diagnóstico e estadiamento da doença precisam ser bastante precisos. A existência de testes de triagem e comprovação de forma prática, precisa e barata são de extrema importância no controle da doença, que se resume tanto na eliminação do vetor quanto do parasita do reservatório humano, auxiliando tanto o indivíduo infectado como o coletivo (FIELD et al., 2017).

A detecção dos casos de HAT acontece geralmente por duas estratégias: a detecção passiva, por meio de atividades rotineiras de saúde; e a detecção ativa, por meio de campanhas de triagem realizada por equipes preparadas. No caso da HAT *gambiense*, principal forma da doença, a detecção passiva é responsável pela metade dos casos verificados, devido a cronicidade da doença (SIMARRO et al., 2013). A estratégia ativa é periodicamente realizada com os moradores de áreas endêmicas. Estes são testados com o teste de aglutinação em cartão para tripanossomíase ou CATT (*Card agglutination test for trypanosomiasis*). Se os resultados de CATT forem positivos, os indivíduos são submetidos aos testes parasitológicos, como uso da microscopia, para confirmação da doença, e posterior estadiamento e início do tratamento especializado (SIMARRO et al., 2014). Geralmente os casos da doença no estágio 1 são identificados pela detecção ativa através das campanhas de saúde. Em contrapartida, os do estágio 2 geralmente ocorrem através da detecção passiva com os testes rotineiros, como na avaliação

clínica e exames laboratoriais como o hemograma, pois os indivíduos estão mais sujeitos a procurar auxílio médico (PALMER et al., 2013).

Os métodos moleculares no diagnóstico de HAT possuem grande potencial na identificação definitiva das duas espécies, sendo capaz de diferenciar ambas as formas da doença mesmo quando há infecção mista. São bastante específicos, mas com sensibilidade variável, capazes de identificar regiões específicas de DNA ou RNA e amplificá-las. Quando associados às técnicas de bioinformática, podem facilitar o diagnóstico confirmatório, porém possuem um alto custo e necessitam de uma boa capacitação de profissionais, além de equipamentos e processos laboriosos (GAITHUMA et al., 2019).

O tratamento da HAT varia conforme a espécie e o estágio da doença. Anteriormente ao início do tratamento, contudo, é necessário que os pacientes sejam submetidos a uma punção lombar para exame do líquido cefalorraquidiano, de forma a diferenciar o primeiro estágio (hemolinfático) do segundo (meningoencefálico) (OMS, 2013). Atualmente, o tratamento de primeira linha para HAT *gambiense*, no primeiro estágio (≤ 5 glóbulos brancos por μL com ausência de tripanossoma no LCR), consiste da pentamidina administrada uma vez ao dia por via intramuscular durante sete dias. No segundo estágio (> 5 glóbulos brancos por μL ou presença de tripanossomas no LCR), a pentamidina é combinada com nifurtimox (via oral, três vezes ao dia durante dez dias) e eflornitina (via intravenosa, duas infusões por dia durante sete dias) (PRIOTTO et al., 2009). O tratamento combinado com nifurtimox e eflornitina se demonstrou melhor que o melarsoprol ou monoterapia com eflornitina, porém necessita internação, auxílio de enfermagem intensiva e melhor logística de transporte dos medicamentos (EPERON et al., 2014).

Outra terapia que se demonstrou eficaz contra a HAT *gambiense* é o fexinidazol, um medicamento recente aprovado em 2018 pela agência europeia de medicamentos (EMA) e comercializado para tratamento na República Democrática do Congo, país com maior caso de infecção de HAT *gambiense* na África. O fexinidazol é administrado por via oral uma vez ao dia durante dez dias, sendo

efetivo em ambos os estágios da doença, o que demonstra um avanço no sistema terapêutico de HAT e contorna a necessidade da punção lombar. Entretanto, esta droga ainda possui certas limitações, sendo menos eficaz em caso de comprometimento grave do sistema nervoso central, e em casos de pacientes desnutridos, uma vez que sua absorção é bastante limitada (ANDREAS K et al., 2020).

2.3 BIOLOGIA MOLECULAR DOS TRIPANOSSOMATÍDEOS

2.3.1 Regulação da expressão gênica

O *T. brucei* e outros tripanossomatídeos desassociaram-se muito cedo da linhagem evolutiva comum a maioria dos eucariotos conhecidos, motivo de disporem de características peculiares que os distinguem destes. Ao contrário da grande maioria dos eucariotos, a síntese global de mRNAs nos tripanossomatídeos ocorre de forma constitutiva e associada a uma escassez de promotores clássicos da RNA polimerase II e de fatores transcrpcionais (PREUBER et al., 2012).

Devido as características únicas relacionadas a organização genômica dos tripanossomatídeos e à síntese e processamento dos seus mRNAs, a expressão gênica nesses organismos é controlada quase que individualmente por mecanismos pós-transcrpcionais. A etapa de iniciação da tradução é vista como fase limitante para permitir uma correta regulação (KRAMER e CARRINGTON, 2011).

2.3.2 Transcrição policistrônica e processamento dos mRNAs

Diferentemente da maioria dos eucariotos, que transcrevem seus genes em unidades monocistrônicas, ou seja, uma única sequência codificante é transcrita e

regulada por um único promotor, nos tripanossomatídeos os genes são transcritos em unidades policistrônicas. Estas compreendem dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas que são agrupados lado a lado em uma única fita de DNA e transcritos a partir de uma mesma região promotora (MARTÍNEZ-CALVILLO et al., 2010).

Uma vez transcritos, os mRNAs eucarióticos passam por um processo denominado *cis-splicing* para remoção dos *introns* e união dos *exons*, gerando um mRNA maduro pronto para iniciar a sua tradução (CLAYTON; SHAPIRA, 2007). Porém, nos tripanossomatídeos, quase não há *introns*, mas os mRNAs policistrônicos passam por um processo particular denominado *trans-splicing*, no qual seus transcritos primários policistrônicos são clivados em mRNAs monocistrônicos maduros. Esse processo ocorre em duas etapas: na primeira é adicionado à extremidade 5' de cada um dos mRNA maduros, uma sequência comum de 39 nucleotídeos denominada *Spliced-Leader* (SL), típica dos tripanossomatídeos; na segunda etapa é adicionada uma sequência de adeninas (poli-A) contendo entre 100 e 300 nucleotídeos, um processo denominado poliadenilação (KRAMER; CARRINGTON, 2011).

2.4 SÍNTESE PROTEICA E COMPLEXO EIF4F EM EUCARIOTOS

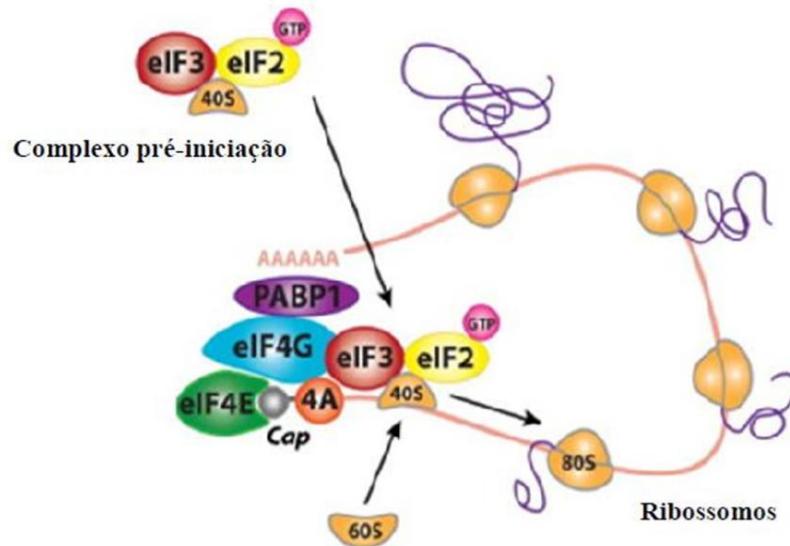
A síntese proteica ou tradução é um importante processo encarregado da produção das mais variadas proteínas dos organismos vivos. A tradução é o último passo no fluxo de informação genética, e a regulação nesse nível permite uma resposta imediata e rápida às mudanças em condições fisiológicas, porém muito das particularidades deste processo ainda encontram-se desconhecidas (FRASER, 2015).

A tradução é composta por quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. Dentre elas, a iniciação é vista como a etapa principal para o controle da expressão gênica, pois é nessa fase que ocorre o recrutamento

das subunidades ribossomais, reconhecimento do códon de iniciação do mRNA e a sua ligação ao anti-códon do tRNA. Todos esses processos envolvem a participação de uma diversidade de fatores de iniciação, os eIFs (fatores de iniciação eucarióticos). Estes contribuem desde o recrutamento até o correto posicionamento dos ribossomos no códon de iniciação AUG do mRNA, permitindo o início da síntese proteica (JACKSON et al., 2010).

Em eucariotos mais bem conhecidos já foi identificada a participação de, no mínimo, onze eIFs. Dentre eles, o complexo eIF4F é alvo das principais etapas de regulação da tradução, sendo responsável por dar início à tradução dos mRNAs, mediando seu reconhecimento pela sua extremidade 5' e recrutamento da subunidade 40S ribossomal (HINNEBUSCH et al.; 2014). Este complexo possui três principais componentes: o eIF4E, eIF4G e eIF4A. O eIF4E é um pequeno polipeptídeo (24 – 25 kDa em mamíferos) que, além da síntese proteica, tem participado de vários processos envolvidos no metabolismo do mRNA, como o transporte e o controle de sua estabilidade (GOODFELLOW et al., 2008). O eIF4A é uma helicase e o eIF4G atua como proteína âncora que vincula eIF4E ao eIF4A assim como ao complexo eIF3, este responsável por mediar o recrutamento da subunidade menor do ribossomo (PREVOT et al., 2003). Junto a proteína de ligação a cauda poli-A (PABP) esses fatores promovem a circularização do mRNA e estimulam sua tradução, mas sua ação depende de outros fatores, como os eIF5 e eIF4B (MARINA V e WOLFANG, 2009) (Figura 6).

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



Legenda: Reconhecimento do cap e da ligação das subunidades do complexo eIF4F (eIF4A, eIF4E e eIF4G) ao mRNA, a PABP e ao eIF3, como parte do processo de recrutamento do complexo ribossomal.

Fonte: Adaptado de YÁNGUIEZ e NIETO, 2011.

2.4.1 eIF4A - RNA helicase

O eIF4A é uma RNA helicase dependente de ATP pertencente a família DEAD-box, a maior família das helicases. Estas proteínas possuem o domínio DEAD (Ácido Aspártico (D) Ácido Glutâmico (E), Alanina (A), Ácido aspártico (D)) e atuam no metabolismo do RNA, desde a transcrição e tradução de mRNAs como na modificação e transporte de diferentes tipos de RNAs. O eIF4A é uma proteína de cerca de 46 kDa, responsável pelo desenrolamento das estruturas secundárias de RNA encontradas na região 5'-UTR dos mRNAs, favorecendo a sua ligação a subunidade ribossomal 40S e subsequente leitura do códon AUG (ANDREOU e KLOSTERMEIER, 2013).

2.4.2 eIF4E- Proteína de ligação ao cap

O eIF4E é uma proteína de aproximadamente 25 kDa que desempenha diversos papéis importantes no controle da composição do proteoma, atuando em processos que permitem a chegada dos mRNAs a maquinária da tradução, na exportação dos mRNAs do núcleo ao citoplasma, no sequestro dos corpos nucleares da PML (PML-NB - promovem a manutenção da estabilidade de mRNAs instáveis) e controle da degradação citoplasmática dos mRNAs, como mostrado na figura 7 (BORDEN, 2016). Múltiplos homólogos de eIF4E foram descritos em vários organismos, e suas funções celulares variam a depender do homólogo relacionado, podendo estar envolvido na tradução ou em outras funções do metabolismo de mRNAs (RHOADS, 2009).

As funções do eIF4E são possíveis devido a sua capacidade de ligação a extremidade 5' dos mRNAs. Na tradução, para o recrutamento do ribossomo, afim de aumentar a eficiência da tradução, o eIF4E se associa a outras proteínas do complexo eIF4F, como o eIF4G, estimulando a iniciação da tradução de distintos transcritos (SONENBERG, 2008).

ao cap (eIF4E), através de sítios na região N-terminal, favorecendo desta forma a ligação do ribossomo a região 5' do mRNA. O eIF4G funciona como um andaime coordenando o recrutamento e estimulando a atividade dos outros fatores de iniciação da tradução, como o eIF4A e a PABP, esta última se ligando simultaneamente ao eIF4G e ao poli A e permitindo a circularização do mRNA através das suas extremidades 5' e 3'. Essa conformação, conhecida como *loop* fechado, é vista como o modelo eficiente de iniciação da tradução de mRNAs cap dependentes (ZHAO et al., 2017; PESTOVA e HELLEN, 2006).

2.4.4 PABP - Proteína de ligação à cauda poli-A

A PABP é um polipeptídeo bastante conservado em eucariotos e envolvido em muitos processos do metabolismo de mRNA (Figura 9). Esta proteína foi identificada a partir de sua interação com a cauda poli-A, desempenhando o papel tanto na síntese do mRNA como da modulação de suas funções biológicas, além de auxiliar na iniciação da tradução e em outras etapas do processo (IVANOV et al., 2016). Já foram descritos dois tipos diferentes de PABP em eucariotos, sendo um nuclear (participa na etapa de poliadenilação do mRNA imaturo) e outro citoplasmático (auxília na iniciação e em outras etapas da tradução, participando ainda em eventos de degradação do mRNA) (WAHLE, 1991).

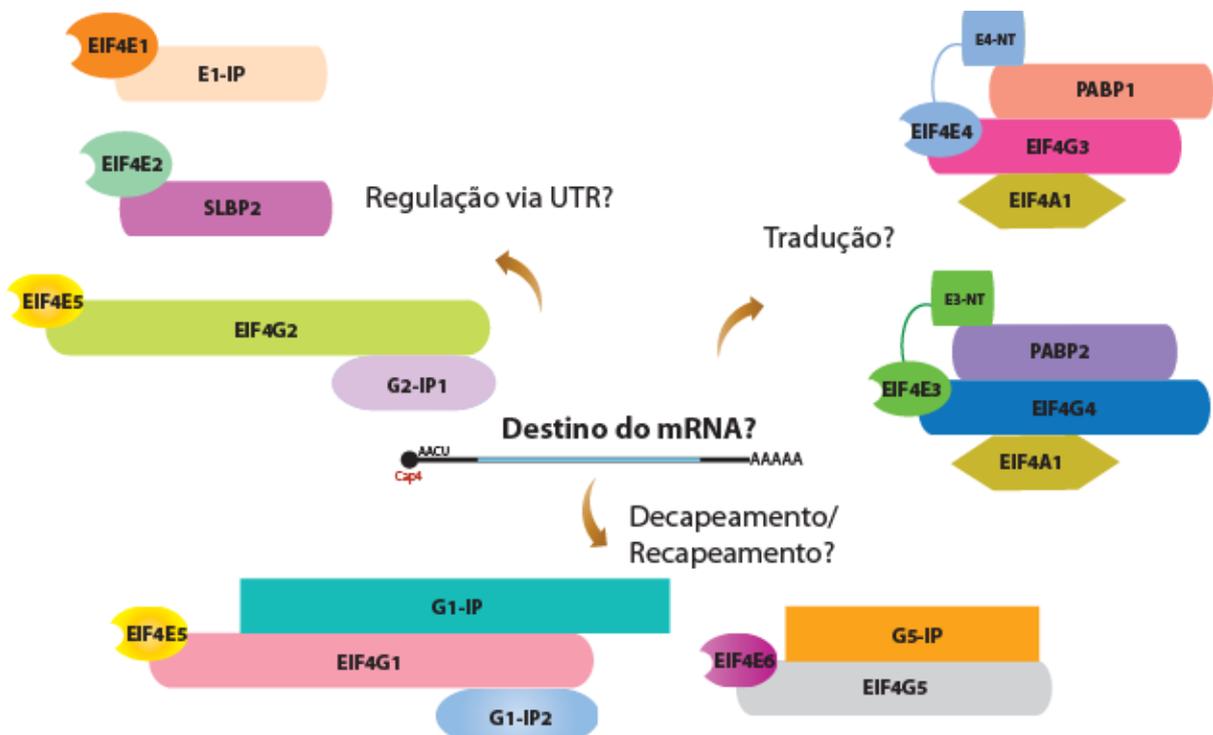
2.5 SÍNTESE PROTEICA E COMPLEXO eIF4F EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

Ao contrário da transcrição, onde ocorre a ausência de elementos observados em outros eucariotos, no que concerne a sua tradução, os tripanossomatídeos se destacam por possuírem múltiplos complexos do tipo eIF4F de iniciação da tradução (FREIRE et al., 2017). Diversos homólogos das subunidades do complexo eIF4F já foram identificados conservados em diferentes tripanossomatídeos, dentre eles seis

homólogos do fator eIF4E (EIF4E1 ao 6) (DHALLIA et al., 2005; FREIRE et al., 2014), cinco do eIF4G (EIF4G1 a 5) (DHALLIA et al., 2005) e dois de eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII) (DHALLIA et al., 2006). No que se refere aos homólogos de PABP, foram identificados um total de três homólogos em *Leishmania* (PABP1, PABP2 e PABP3), e em *Trypanosoma* apenas dois homólogos (PABPs 1 e 2) (DA COSTA LIMA et al., 2010).

Até o momento cinco complexos do tipo eIF4F foram identificados nos tripanossomatídeos, sendo dois já bem descritos, envolvendo a participação dos fatores EIF4E3/EIF4G4 e outro dos fatores EIF4E4/EIF4G3/EIF4AI (DHALLIA et al., 2005), e mais três complexos com papel ainda desconhecido, envolvendo os fatores EIF4E5/EIF4G1, EIF4E5/EIF4G2 e EIF4E6/EIF4G5 (Figura 8) (FREIRE et al., 2014).

Figura 8: Mecanismos gerais dos complexos do tipo eIF4F de trypanossomatídeos



Legenda: Figura esquemática de múltiplos homólogos de eIF4E agindo como parte de diferentes

complexos do tipo eIF4F (a exceção dos EIF4E1 e EIF4E2) que podem estar relacionados a regulação de mRNAs em diferentes aspectos da iniciação da tradução.

Fonte: Adaptado de FREIRE et al., 2017.

2.5.1 Homólogos do eIF4A

O eIF4A é um dos fatores mais bem caracterizados em tripanossomatídeos, sendo descritos dois homólogos, o EIF4AI e o EIF4AIII. O EIF4AI é uma proteína abundantemente encontrada no citoplasma, que diferentemente da EIF4AIII, é o único capaz de interagir com as outras subunidades do complexo eIF4F de tripanossomatídeos, possuindo envolvimento com o domínio HEAT-1/MIF4G do fator EIF4G3 no processo de iniciação da tradução (DHALIA et al., 2005). Em contrapartida, o EIF4AIII é uma helicase estritamente nuclear, não sendo capaz de interagir com os outros homólogos do complexo eIF4F (DHALIA et al., 2006).

2.5.2 Homólogos do eIF4E

Em tripanossomatídeos, um total de seis homólogos do fator eIF4E já foram identificados (EIF4E1 a 6), tanto em *T. brucei* como em *L. major*, observando-se uma variação entre os homólogos descritos tanto de tamanho e afinidade de ligação ao *cap*, como da sua capacidade de interação com os homólogo de eIF4G (YOFFE et al., 2006).

Os homólogos EIF4E1 e E2, primeiramente identificados em *Leishmania*, são proteínas menos abundantes presentes tanto no citoplasma como no núcleo, não sendo capazes de se ligar a homólogos de eIF4G, conseqüentemente não participando diretamente da tradução, mas com funções celulares ainda desconhecidas (FREIRE et al., 2011; 2017). Dados de espectrometria de massa em *Leishmania* identificaram um novo parceiro do EIF4E1 chamado 4E-IP (Proteína de ligação ao 4E). Esta proteína não encontra homólogos fora dos tripanossomatídeos

e parece interagir com o EIF4E1 com algum motivo de ligação regular ao eIF4E (ZINOVIEV et al., 2011). Em relação ao segundo homólogo de eIF4E, o EIF4E2, foram demonstrados resultados que indicam sua associação com homólogos de proteínas encontradas em mamíferos e que se ligam especificamente a mRNAs de histonas (SLBPs) (FREIRE et al., 2017).

Os homólogos EIF4E3 e E4, proteínas mais abundantes e estritamente citoplasmáticos, se mostraram capazes de participar da iniciação da tradução. Por meio de estudos de interação proteína-proteína, foi possível observar a interação dos fatores EIF4E3 e E4 com os homólogos de eIF4G, os EIF4G3 e G4, formando dois complexos (EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4) (FREIRE et al., 2011; MOURA et al., 2015). Em contrapartida, os homólogos EIF4E5 e EIF4E6 são proteínas citoplasmáticas que embora se liguem ao *cap*, não são necessárias para a sobrevivência desses parasitas. O EIF4E5 é capaz de se ligar ao EIF4G1 e EIF4G2, já o EIF4E6 interage com EIF4G5 (FREIRE et al., 2014b; FREIRE et al., 2014a).

2.5.3 Homólogos do eIF4G

Em se tratando da caracterização do eIF4G, foram descritos um total de cinco homólogos (EIF4G1 a 5) em *T. brucei* e *L. major* (DHALLIA et al., 2005; YOFFE et al., 2009). Para avaliar a capacidade de ligação entre homólogos de eIF4G, eIF4E e eIF4A, ensaios de interação proteína-proteína foram realizados, demonstrando a formação de cinco diferentes complexos do tipo eIF4F. Inicialmente, foi confirmado que EIF4G4 se ligava ao EIF4E3, e o EIF4G3 se ligava ao EIF4E4, (YOFFE et al., 2009). Foi observada também associação de EIF4G3 com a PABP1, formando o complexo EIF4G3/EIF4E4/EIF4A1/PABP1 com papel principal da tradução em tripanossomatídeos. Estudos em *Leishmania* demonstraram a interação de EIF4G3 com PABP1, no complexo EIF4G3/EIF4E4/EIF4A1/PABP1 (DA COSTA LIMA, 2010). Estudos, em *Leishmania amazonensis*, por sua vez, mostraram a possível interação da PABP2 no complexo EIF4G4/EIF4E3/EIF4A1, possivelmente atuando na

regulação de mRNAs específicos (ZINOVIEV et al., 2011).

A participação dos homólogos EIF4G1, EIF4G2 e EIF4G5 com homólogos da proteína ligadora ao *cap* (eIF4E) foi demonstrada, porém o seu papel no processo de tradução não está claro (FREIRE et al., 2014b; FREIRE et al., 2014a).

2.5.4 Homólogos da PABP

Em estudos de homologia da PABP em tripanossomatídeos, foi possível demonstrar a existência de dois homólogos de PABP (PABP1 e PABP2) em todas as espécies estudadas, além da existência de um terceiro homólogo (PABP3) ausente em espécies de *Trypanosoma*. Estes três homólogos são proteínas bem conservadas em relação a outros eucariotos, majoritariamente encontrados no citoplasma e associando-se diferentemente com os mRNAs e outras proteínas parceiras (DA COSTA LIMA et al., 2010). A PABP1 atua no complexo EIF4G3/EIF4E4/EI4A1, participando diretamente na regulação da tradução (ZINOVIEV et al., 2011). Os homólogos PABP2 e PABP3 são abundantemente expressos e parecem se ligar à mesma população de mRNAs, mas diferentes dos que se ligam ao PABP1, indicando funções diferentes das descritas em eucariotos (ASSIS et al., 2021).

2.6 PROTEÍNA LIGADORA DE HISTONA (SLBP) E CONTROLE DA EXPRESSÃO GÊNICA EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

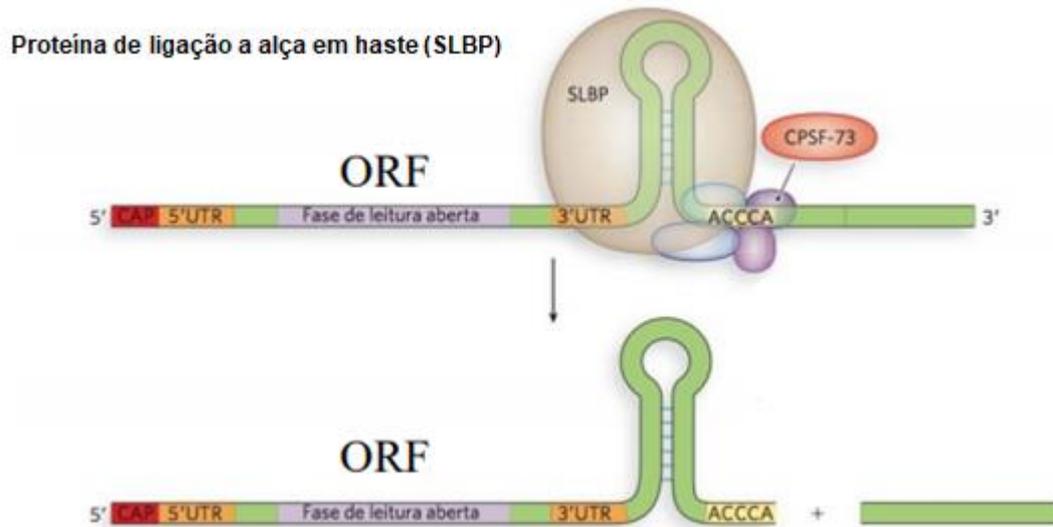
2.6.1 Regulação de mRNAs de histonas

Os mRNAs de histonas em metazoários são os únicos mRNAs eucarióticos que ao invés de possuírem uma terminação em cauda poli(A), terminam em uma sequência de 26 nucleotídeos altamente conservada, contendo uma alça em forma

de haste de 16 nucleotídeos. Seus genes também carecem de íntrons, dessa forma, o seu processamento e transformação em mRNA maduro se dá pela clivagem após a ligação da SLBP no sítio específico com o auxílio da proteína CPS-73 e posterior formação de uma alça em haste na extremidade 3' (Figura 9) (DOMINSKI E MARZLUFF, 1999). É possível que pela ausência da cauda poliadenilada, a participação de fatores regulatórios associados sejam importantes para sua tradução assim como no caso dos mRNAs poliadenilados que necessitam da participação das proteínas de ligação ao poli(A) (PABP) (JACOBSON, 1996).

Um dos fatores de ação conhecidos que é capaz de interagir com a região de alça em haste é a SLBP (*Stem Loop Binding Protein*), também chamado de HBP (*Histone mRNA Binding Protein*). Essa proteína foi identificada primeiramente em células de mamíferos e se demonstrou necessária para o processamento eficiente dos pré-mRNAs de histona, através de sua associação ainda no núcleo, acompanhando também no citoplasma como parte da ribonucleoproteína mensageira do mRNA de histona (mRNP) (WANG et al., 1996). A SLBP também é regulada pelo ciclo celular e na medida que as células adentram a fase S, ocorre o aumento da sua síntese pela maior tradução do seu mRNA. Após sua tradução a SLBP é degradada rapidamente no final da fase S como resultado de fosforilação (MARZLUFF e DURONIO, 2002; WHITFIELD et al., 2000). O mRNA de histona é rapidamente degradado quando as células na fase S são tratadas com inibidores da replicação de DNA, mas a SLBP se mantém estável e é capaz de se deslocar para o núcleo (MICHAEL L. et al., 2004).

Figura 9 – Processamento de pré-mRNAs de Histona pela SLBP



Legenda: Processamento do mRNA imaturo através da clivagem de sua região 3' terminal mediada pela participação da proteína SLBP em metazoários.

Fonte: Adaptado de MARZLUFF et al., 2008.

2.6.2 Proteínas Histonas Eucarióticas

As histonas são proteínas eucarióticas bem conservadas, de peso molecular baixo, que se ligam ao DNA e representam cerca de 50% do peso da cromatina. O conjunto de duas moléculas de cada uma das quatro histonas centrais (H2A, H2B, H3 e H4) formam uma estrutura octamérica denominada nucleossomo, cada um capaz de agrupar cerca de 146pb de DNA enrolado em formato de “colar em contas”, formando a subunidade básica da cromatina, o nucleossomo (KHORASANIZADEH, 2004). O processo de empacotamento ainda tem a participação da histona “ligante”, H1, histona com a maior quantidade de variantes, sendo a menos conservada delas. Esta proteína geralmente está relacionada com a proteção do DNA da ação de nucleases, e estabilidade da fita de DNA (HARSHMAN et al., 2013).

A histona H2A possui maior quantidade variantes comparado às outras histonas do nucleossomo e é caracterizada pela presença de uma região C-terminal divergente. As principais variantes encontradas são a H2ABbd, H2A.Z e H2A.X. A

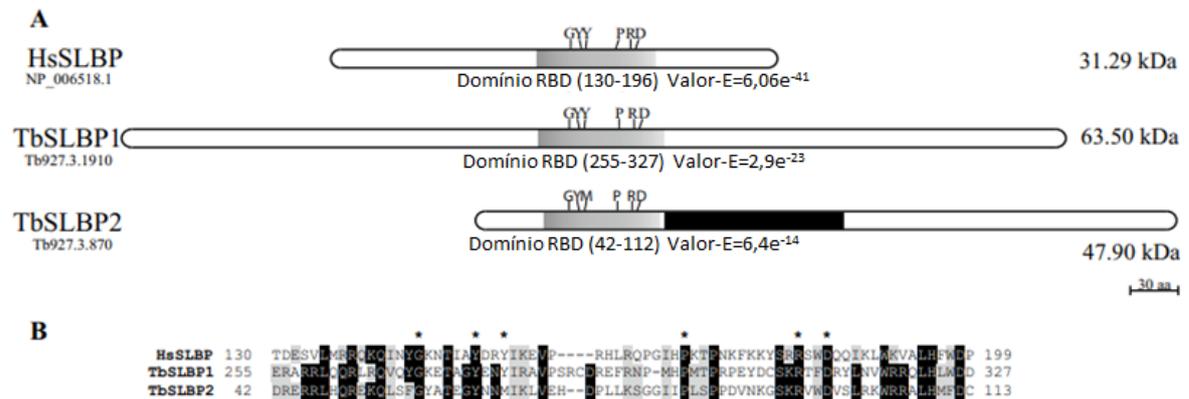
H2ABbd é localizada em regiões de eucromatina com atividade transcricional e é caracterizada pela presença de uma cauda C-terminal truncada causando instabilidade na estrutura do nucleossomo. A H2A.Z possui diferentes funções podendo atuar na compactação da cromatina e na ativação e silenciamento gênico. A H2A.X por sua vez, está relacionada ao processo de reparo do DNA por meio da recombinação homóloga. A histona H2B possui algumas variantes com pequenas mudanças em relação a H2B canônica, e geralmente não estão relacionados a nenhuma alteração estrutural na cromatina (BONENFANT et al., 2006). Já a histona H3 possui algumas variantes como a H3.1 e H3.2, associada a processos de replicação e H3.3 associada a sítios de transcrição, além da variante CENP-A associada a regiões centroméricas. A histona H4, por sua vez, é a proteína mais conservada entre as histonas, possuindo maior interação com as outras proteínas que participam do nucleossomo. As únicas variantes conhecidas dessa proteína estão presentes em tripanossomatídeos e organismos do subfilo chordata (BUSCHBECK; HAKE, 2017).

2.6.3 Expressão de histonas em tripanossomatídeos

Diferente da maioria dos eucariotos, muitos dos genes de histonas nos tripanossomatídeos estão agrupados em *tandem*, com cada tipo de gene em um único agrupamento distinto, geralmente em diferentes cromossomos. Um exemplo dessa organização é o gene da histona H2B, com seus genes organizados em um grupo de 10 a 15 cópias ligadas em *tandem* em *T. brucei*, enquanto em *Leishmania infantum* são dois grupos, cada um com três cópias (SOTO et al., 2003). Esse tipo de arranjo é encontrado na maioria dos subtipos de histonas em tripanossomatídeos. As múltiplas cópias parecem ser um fator facilitador do aumento dos níveis de expressão enquanto a ligação em *tandem* pode reduzir a deriva genética, como no caso dos genes da histona H3 de *T. brucei* com um total de sete genes em *tandem* no cromossomo I, sendo todos idênticos (HALL et al., 2003).

Outra característica que torna os tripanossomatídeos distintos da maioria dos eucariotos, é a presença de dois genes codificantes de SLBPs. No caso do genoma de *T. brucei*, temos os genes Tb927.3.870 (SLBP2) e Tb927.3.1910 (SLBP1). A SLBP2 é uma proteína conservada de 47,90 kDa (432 aa), com um N terminal curto seguido da ligação de RNA na região do domínio RBD, entre os resíduos 42 e 112 (JAEGER et al., 2005). Em comparação com a SLBP de humano, apresenta 38% de homologia com vários resíduos envolvidos com a ligação de mRNA conservados, como o G57, Y63, P83, R95 e D98. A SLBP1 é uma proteína conservada de 63,50 kDa (591 aa) com domínio RBD conservado, entre os resíduo 255 e 327. Em comparação com a SLBP de humano possui 41% de homologia, sendo esta maior que a SLBP2 e com tanto sua estrutura como seus resíduos conservados (G270, Y276, Y279, P297, R309 e D312) se assemelhando mais ao homólogo de SLBP de humano (JAEGER et al., 2004);FREIRE et al., 2018) (Figura 10).

Figura 10 – Representação esquemática dos domínios gênicos de SLBP1 e SLBP2 de *Trypanosoma brucei*



Legenda: A. Representação dos domínios conservados da SLBP de humano e SLBP1 e 2 de *T. brucei*. Em cinza, o domínio RBD com os aminoácidos envolvidos na ligação com o mRNA e em preto, uma região conservada presente apenas na SLBP2. B. Alinhamento das sequências dos domínios de SLBP de humano e SLBP1 e 2 de *T. brucei*.

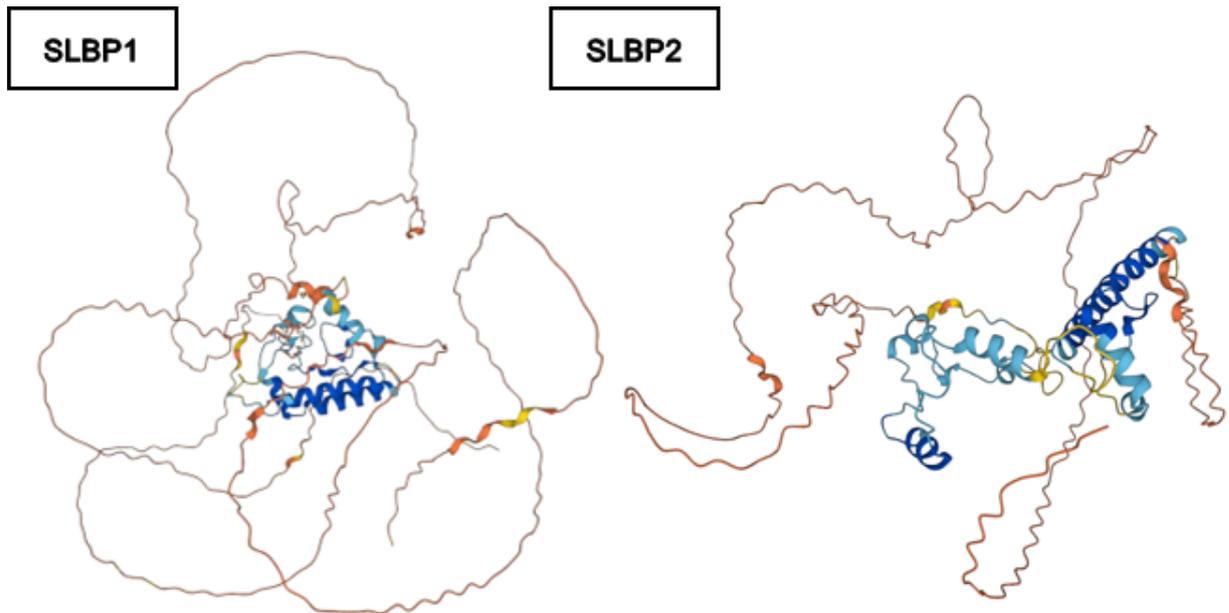
Fonte: Adaptado de Freire et al., 2018

2.6.4 Interação da SLBP2 com o EIF4E2

Assim como o EIF4E1, o EIF4E2 não parece se associar a nenhum dos homólogos da proteína estrutural do complexo eIF4F, o EIF4G, em diversas condições e fases do ciclo de vida já analisadas, além de não demonstrar indícios de sua atuação em processos de ativação traducional em *T. brucei* (FREIRE et al., 2011). Embora exista uma carência de caracterização funcional, estudos mais recentes demonstraram que um dos homólogos das SLBPs, mais especificamente a SLBP2, se mostrou associada como parceiro de ligação do EIF4E2 na forma procíclica de *T. brucei*. Essa associação se faz por meio de uma região central conservada que não está presente em outros homólogos conhecidos de SLBP (FREIRE et al., 2018).

Em metazoários a principal proteína envolvida nas etapas do metabolismo de mRNAs de histonas, como processamento do pré-mRNA, transporte, estabilidade e degradação, é a SLBP/SLBP1, enquanto que uma segunda SLBP (SLBP2) é expressa apenas durante o estágio de oócito, suprimindo o processamento de mRNAs imaturos de histonas até que a SLBP1 atue (Figura 11) (MICHAEL et al., 2004). Assim como a maioria dos eucariotos, os metazoários não possuem seus mRNAs de histonas poliadenilados, possuindo apenas a estrutura de alça em haste, diferentemente, os tripanossomatídeos possuem a cauda poliadenilada e a estrutura de alça em haste em seus mRNAs de histonas sugerindo uma regulação diferenciada desses mRNAs nesses organismos (MARZLUFF et al., 2008).

Figura 11 – Estrutura tridimensional da proteína SLBP1 e SLBP2 de *Trypanosoma brucei*



Legenda: Representação da estrutura de SLBP1 e SLBP2 de *Trypanosoma brucei* (Protein Data Bank - Banco de dados de proteínas - PDB: AF_AFQ57WX0F1; PDB: AF_AFQ57ZC0F1)

Fonte: Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org>).

O papel funcional do possível complexo formado pela interação EIF4E2/SLBP2 ainda permanece desconhecido. Tanto a SLBP2 como o EIF4E2 tem sua expressão aumentada durante a fase logarítmica inicial de crescimento do *T. brucei*, com uma redução brusca assim que as células começam a entrar na fase estacionária. Já a SLBP1 possui uma expressão constante durante todas as fases do crescimento em *T. brucei* (THELIE et al., 2012; FREIRE et al., 2018). Até o momento, contudo, não está claro quanto a associação destes complexos com mRNAs de histonas ou com outras populações de mRNAs e qual seria o papel destas proteínas em eventos de regulação gênica.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Contribuir na definição do papel funcional das proteínas SLBP1, SLBP2 e EIF4E2 em formas procíclicas de *Trypanosoma brucei*.

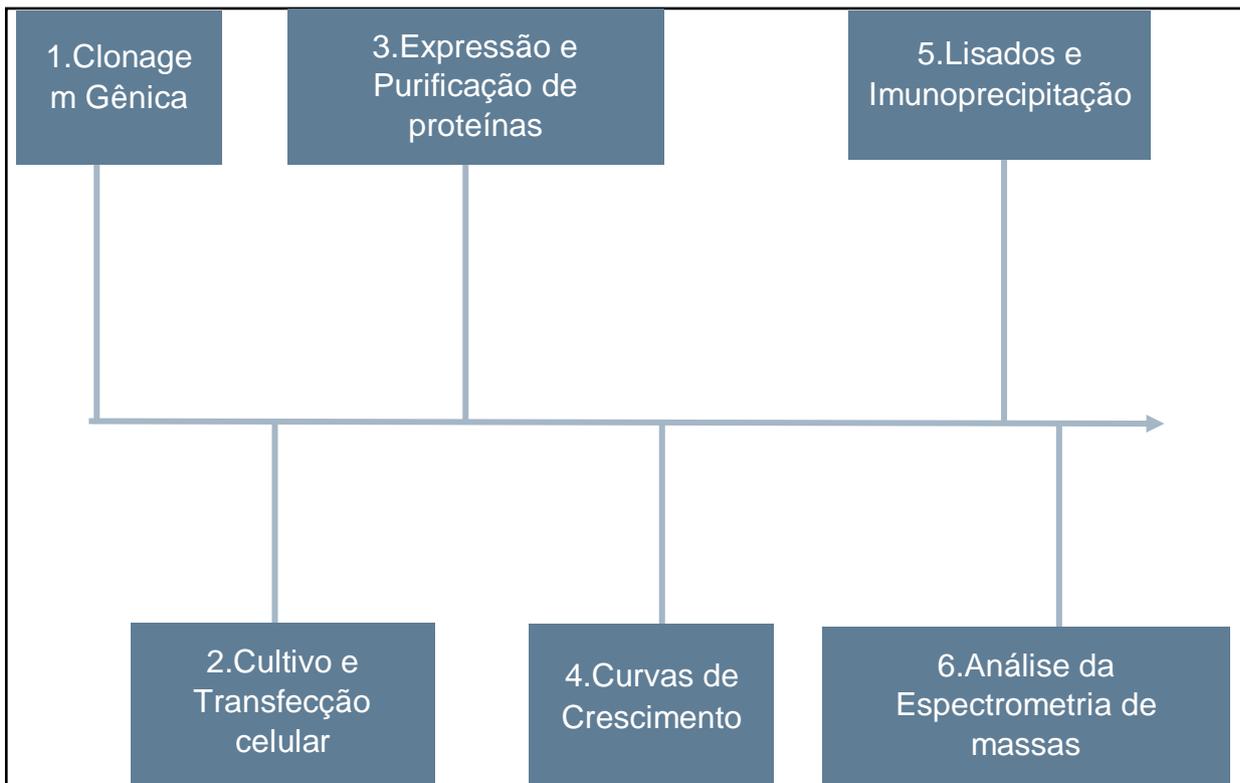
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar, de forma comparativa, a expressão das SLBP1 e SLBP2 nativas ao longo de curvas de crescimento do *T. brucei*.
- Avaliar a expressão das SLBP1 e SLBP2 fusionadas a marcadores específicos em células transgênicas de *T. brucei*.
- Identificar o perfil de parceiros proteicos co-precipitados com as proteínas EIF4E2, SLBP1 e SLBP2, avaliando aquelas associadas ao processo de síntese proteica.

4 METODOLOGIA

Este estudo visou contribuir para avaliação funcional das proteínas EIF4E2, SLBP1 e SLBP2 através das etapas de obtenção das construções plasmidiais por meio de clonagem gênica; do cultivo e transfecção das construções plasmidiais em linhagens celulares da forma procíclica de *T. brucei*; da expressão e purificação de proteínas recombinantes em *E. coli*; da obtenção de extratos proteicos para avaliação do perfil de expressão em curvas de crescimento através de *western blot*; da produção de lisados citoplasmáticos e da realização de reações de imunoprecipitação das proteínas fusionadas a epítomos de reconhecimento; e da avaliação dos parceiros proteicos associados com as proteínas de estudo através da identificação por espectrometria de massas (Figura 12).

Figura 12 – Organograma metodológico



Legenda: Passo a passo metodológico.

Fonte: Autor.

4.1 OBTENÇÃO DAS CONTRUÇÕES PLASMIDIAIS

Para expressar as proteínas fusionadas ao epítopo HA utilizadas na avaliação do perfil de expressão e ensaios de imunoprecipitação, foi necessário realizar a clonagem dos genes de SLBP1 e SLBP2 no vetor p2477, o gene de EIF4E2, por sua vez, já se encontrava clonado neste vetor. Para expressar as proteínas fusionadas ao epítopo PTP com o mesmo intuito de uso das proteínas fusionadas ao tag HA, foram utilizadas as construções plasmidiais pC-PTP-Puro-SLBP1 e pC-PTP-Puro-SLBP2. Para avaliar o perfil de expressão em *T. brucei* na forma procíclica (cepa 427) foram utilizadas as construções clonadas em plasmídeos SLBP1-pET15b e SLBP2-pET21a, capazes de expressar as proteínas fusionadas com um *tag* de múltiplas histidinas. Todas as construções plasmidiais em vetores de expressão utilizadas neste trabalho e as construções obtidas em trabalhos prévios estão descritas nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Quadro 1 –Construções plasmidiais obtidas em trabalhos anteriores

Construção	Autor
EIF4E2-p2477	Freire et al., 2011
SLBP1-pET15b	Coelho, 2018
SLBP2-pET21a	Coelho, 2018
pC-PTP-Puro-SLBP1	Freire et al., 2018
pC-PTP-Puro-SLBP2	Freire et al., 2018
SLBP2-p3927	Moura et al., 2015

Legenda: Lista de construções obtidas trabalhos prévios que foram utilizadas nesta pesquisa e seus respectivos autores.

Fonte: Autor.

Tabela 1 – Genes e construções plasmidiais

Gene	GeneDB ID	Tamanho (pb)	Peso Molecular (kDa)	Construções plasmidiais
<i>Tb</i> SLBP1	Tb927.3.1910	1773	63,52	p2477, pC-PTP-puro e pET15b
<i>Tb</i> SLBP2	Tb927.3.870	1296	47,88	p2477, pC-PTP-puro e pET21a
<i>Tb</i> EIF4E2	Tb927.10.16070	780	28,30	p2477

Legenda: GeneDB ID são referentes a *T. brucei* cepa 927 do banco de dados TritrypDB (<http://tritrypdb.org>).

Fonte: Autor.

4.1.1 Clonagem dos genes SLBP1 e SLBP2 em p2477

O gene codificando o homólogo SLBP1 foi amplificado através de uma reação de *touchdown*-PCR, utilizando a enzima “*Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase*”, e como molde uma construção previamente obtida de SLBP1 no vetor p3927 e um par de *primers* específicos (tabela 3). A reação de amplificação dispôs de uma etapa inicial de desnaturação de 95°C por 4 min e 25 ciclos de 95°C por 40s (desnaturação), 58°C por 30s (anelamento dos *primers*), 72°C por 1min e 15s (extensão dos fragmentos).

Quadro 2 – Primers utilizados na amplificação de SLBP1

Primer	Sequência
SLBP1 forward	<u>AAGCTT</u> CCGCCACCATGTCCATGACTGAGAGCAGCA
SLBP1 reverse	AGATCTCTGACGCTGCTGGCGTAAC

Legenda: Sequência sublinhada referente aos sítios de restrição HindIII (*Primer forward*) e BglII (*Primer reverse*)

Fonte: Autor.

Para sua clonagem, o produto da reação de PCR foi inicialmente tratado com a enzima Taq polimerase (Sigma®) na presença de dATP para inserção de adeninas em suas extremidades e posteriormente clonado no vetor pGEM-T Easy® (Promega) através do uso da enzima T4 DNA Ligase (*New England Biolabs*®) e seu respectivo tampão para um volume final de 10µl, por aproximadamente 18h a 4°C. Em seguida as bactérias foram transformadas com as amostras, através de choque térmico (30 min a 4°C seguido de 37°C por 1 min 30s) em células da linhagem Top10 de *Escherichia coli*, e semeadas em meio Agar LB (Luria Bertani) sólido na presença de ampicilina (100 µl/mL) previamente acrescido de X-GAL/IPTG na proporção de 1:2 e, em seguida, foram colocadas em estufa a 37°C por cerca de 18h. As colônias brancas foram selecionadas e inoculadas em meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 µl/ml) sob agitação a 200 rpm a 37°C por cerca de 18h, seguido da extração de DNA plasmidial das bactérias crescidas utilizando o “*Quick-DNA™ Miniprep Kit - Zymo Research*”, conforme a orientação do fabricante. Os plasmídeos resultantes foram submetidos a confirmação da presença do inserto por digestão com a enzima de restrição EcoRI e também por digestão dupla com as BglII e HindIII. O fragmento desta segunda digestão, correspondente ao gene SLBP1, foi recuperado através da purificação do fragmento de DNA, usando o “*GE Healthcare Life Sciences PCR DNA and Band Purification Kit*” conforme as orientações do fabricante. Após a purificação, o fragmento foi clonado nos sítios HindIII e BamHI

(complementar de BglII) do vetor p2477 (resistência a fleomicina). Após a clonagem, as células da linhagem Top10 de *E. coli* foram transformadas com os fragmentos obtidos, e plaqueadas em meio LB sólido com ampicilina (100 µl/ml) a 37°C por cerca de 18h. A extração de DNA foi feita usando “*Quick-DNA™ Miniprep Kit - Zymo Research*” conforme a orientação do fabricante.

Diferentemente do homólogo SLBP1, o gene codificante da SLBP2 podia ser recuperado diretamente do vetor p3927 por meio da digestão com as enzimas de restrição HindIII e BamHI. Os sítios destas enzimas são específicos para clonagem no vetor de expressão p2477 capaz de expressar as proteínas fusionada ao epítipo HA em *T. brucei*. Após a purificação de DNA, através do “*GE Healthcare Life Sciences PCR DNA and Band Purification Kit*”, o fragmento de DNA correspondente ao gene SLBP2, foi clonado no vetor p2477, através do uso da enzima T4 DNA Ligase e seu respectivo tampão para um volume final de 10µl, por aproximadamente 18h a 4°C. Assim como na clonagem de SLBP1, as bactérias foram transformadas através de choque térmico e semeadas em meio LB sólido com ampicilina (100 µl/ml) a 37°C por cerca de 18h. A extração de DNA foi feita usando “*Quick-DNA™ Miniprep Kit - Zymo Research*” conforme a orientação do fabricante. Antes de prosseguir para a etapa de transfecção, ambas as construções foram encaminhadas para análise de sequenciamento no Núcleo de Plataforma Tecnológica do Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz, Pernambuco, para confirmação da integridade da sequência, através da comparação do DNA sequenciado com a sequência encontrada no banco de dados TritypDB.

4.2 CULTIVO E TRANSFECÇÃO DE CÉLULAS DE *T. BRUCEI*

As células de *T. brucei* da forma procíclica (linhagem selvagem 427 e 29-13) foram cultivadas a 27°C em meio SDM-79 (LgcBio) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,2% de hemina e 1% de solução de estreptomicina/ampicilina

(Sigma®). A cepa selvagem 427 foi utilizada para análise do perfil de expressão das SLBPs de forma nativa e fusionadas ao *tag* PTP, ao longo da curva de crescimento do parasita, enquanto que a cepa 29-13 foi utilizada para a expressão de proteínas fusionadas ao *tag* HA (Y-P-Y-D-V-P-D-Y-A) um pequeno epítipo derivado da proteína hemaglutinina do vírus da *influenza*. As culturas foram monitoradas por meio da contagem em câmara de *Neubauer* para análise da morfologia celular em microscópio óptico e manutenção das células em fase exponencial através de repasses sucessivos para obtenção de extratos proteicos.

As transfecções foram realizadas através da obtenção de alíquotas contendo 2×10^7 células das linhagens 29-13 e 427, para cada transfecção, provenientes de cultura em fase logarítmica, através de centrifugação (5000 rpm por 5 min). O sobrenadante foi transferido para Falcon de 50 ml, para uso como meio condicionado após filtragem e o sedimento, por sua vez, foi ressuspenso com 5ml de tampão Cytomix (2 mM de EGTA pH 7,6, 120 mM de KCl, 0,15 mM de CaCl_2 , 10 mM de $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$, pH 7,6, 25 mM de HEPES pH 7,6, 5 mM de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5% de glicose, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de BSA, 1 mM de hipoxantina) e centrifugado novamente (5000 rpm por 5 min). Após descartar o sobrenadante, o sedimento foi ressuspenso em 500 μl de tampão Cytomix, e posteriormente transferido para uma cuvetta de eletroporação de 0,4 mm contendo cerca de 10 μg de DNA plasmidial linearizado anteriormente com enzimas de restrição específicas a depender da construção utilizada, e para o controle negativo apenas foram adicionados o tampão contendo as células. As construções plasmidiais SLBP1-p2477 e EIF4E2-p2477 foram linearizadas com a enzima de restrição NotI, a SLBP2-p2477 com SacII, pC-PTP-Puro-SLBP1 com ApaI e pC-PTP-Puro-SLBP2 com HpaI. Para a transfecção foi utilizado o eletroporador *BioRad Gene Pulser II* (1,5 kV). Após a eletroporação, as células foram transferidas para garrafas de cultura contendo 10 ml de meio SDM-79 para recuperação por cerca de 24h a 27°C. Em seguida, as células transfectadas com construções HA-*tag* foram selecionadas com a adição do antibiótico Flomicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) e as construções PTP-*tag* com Puomicina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) incubando-os por um período médio aproximado de 10 dias.

4.3 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

Para avaliação do perfil de expressão das SLBPs, células quimiocompetentes, da linhagem BL21 foram transformadas com as construções SLBP1-pET15b e SLBP2-pET21a. As colônias obtidas foram inicialmente pré-inoculadas em 20 mL de meio LB líquido acrescido de ampicilina (100 µl/mL), mantidos em agitação (200 rpm) a 37°C por cerca de 18h. Posteriormente, os 20 mL foram transferidos para 500 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 µl/mL), mantendo sob agitação até alcançar a densidade óptica (D.O.) de 0,6. Neste instante, foi retirado uma alíquota de 500 µl do meio para uso como amostra de pré-indução. Dessa forma, foi adicionado IPTG (100 µM), mantendo em agitação a 37°C por 3h para a expressão ideal da proteína de interesse, retirando uma alíquota de 500 µl do meio, para uso como amostra de pós-indução. Toda a cultura foi então centrifugada a 5000 rpm por 5 min, o sobrenadante foi descartado e o sedimento celular ressuscitado em 20 mL de tampão PBS, e por fim armazenado a -20°C.

A amostra em tampão PBS foi lisada por ultrasonicação (6 pulsos de 30s com intervalos de 1 min) seguida de centrifugação a 10000g por 10 min a 4°C. O sobrenadante foi transferido para Falcon e incubado por uma hora a 4°C com a resina Ni-NTA agarose (Qiagen) previamente equilibrada com tampão de lise e equilíbrio (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Uréia, 20 mM de imidazol – pH 8,0). Após centrifugação, a amostra foi centrifugada a 10000g por 1 minuto, descartando o sobrenadante, e lavando a resina três vezes com 1 mL de tampão de lise e equilíbrio através de etapas de suspensão e centrifugação. A amostra foi então submetida a mais duas etapas de lavagens com o tampão de lavagem (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de uréia, 30 mM de imidazol – pH 6,0), e duas etapas de lavagem com o tampão de eluição (100 mM fosfato de sódio, 10 mM Tris, 8 M de Ureia, 1 M de imidazol – pH 4,5). Em cada uma das três etapas, os sobrenadantes foram separados e armazenados a -80°C, retirando alíquotas de 10

μL de cada amostra e da resina, com adição de volume igual de tampão de amostra para SDS-PAGE 15% e visualização com o corante Azul de Comassie.

Após a confirmação da purificação, as proteínas foram submetidas a uma corrida de SDS-PAGE em diversas diluições com uma curva de Albumina de soro bovino (BSA) com concentrações conhecidas (2 μg a 0,25 μg), com o intuito de quantificar as proteínas purificadas. A quantificação se deu através do uso do programa *ImageJ* (*Image Processing and Analysis in Java* - <https://imagej.nih.gov/ij/index.html>), através do cálculo das médias dos picos de intensidades entre as bandas das amostras em comparação com as bandas da curva de BSA.

4.4 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS PROTEICOS E REALIZAÇÃO DAS CURVAS DE CRESCIMENTO

O perfil de expressão das proteínas fusionadas ao *tag* HA foi avaliada através da realização de curvas de crescimento de extratos proteicos não induzidos (-TET) e induzidos (+TET) com tetraciclina (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$), através primeiramente da contagem celular em câmara de *Neubauer*, mantendo as células em estágio inicial (0h) com uma densidade de 5×10^5 células/mL acrescidos de Fleomicina (2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os extratos foram produzidos em uma concentração de 10^5 células por μL de tampão de corrida para SDS-PAGE, tanto das linhagens não induzidas (-TET) com tetraciclina (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) como das induzidas (+TET), retirando extratos a cada 24h até 96h após o primeiro repasse.

Os níveis de expressão endógena das SLBPs e das proteínas fusionadas ao *tag* PTP da cepa selvagem 427 foram avaliadas através da realização de curvas de crescimento com auxílio da câmara de *Neubauer*, mantendo as células em estágio inicial (0h) com uma densidade de 5×10^5 células por μL de tampão de corrida para SDS-PAGE, retirando extratos a cada 24h até 96h após o repasse inicial. A quantificação da expressão das proteínas selvagens no decorrer da curva de

crescimento se deu como descrito no tópico 4.3. O gráfico das curvas de crescimento foi realizado usando a plataforma do Excel de geração de gráficos usando os dados obtidos na contagem diária em câmara de *Neubauer* de cada linhagem celular, permitindo visualizar as fases *lag*, *log*, estacionária e a fase de morte celular dos parasitas.

4.4.1 Ensaio de *Western Blot*

Para reconhecimento das proteínas de interesse, os extratos proteicos foram fracionados em gel SDS-PAGE 15% e posteriormente transferidos para membranas PVDF (Immobilon-P, Millipore®). As membranas foram submetidas a etapa de bloqueio com leite 5% em TBS (20 mM Tris, 500 mM NaCl – pH 7,5) + Tween-20 1% por uma hora e incubadas com os anticorpos específicos pelo mesmo período de tempo. Para os extratos da cepa selvagem 427, foram utilizados os soros de coelho anti-SLBP1 e anti-SLBP2 (COELHO, 2018), na diluição final de 1:1000. Para os extratos de confirmação de expressão das proteínas fusionadas ao *tag* PTP foi utilizada o anticorpo monoclonal anti-proteína A (Sigma®) na diluição final de 1:5000. Para os extratos de confirmação de expressão das proteínas fusionadas ao *tag* HA foi utilizada o anticorpo monoclonal anti-HA *tag* (Abcam) na diluição final de 1:5000. As membranas foram lavadas uma vez com leite 5% em TBS + Tween-20 1% por 10 min, seguido de duas lavagens com TBS + Tween-20 1% por 10 min cada. Após as lavagens, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho (anti- SLBP1, anti-SLBP2 e anti-proteína A) ou anti-IgG de camundongo (anti-HA *tag*) por 1h ambos na diluição final de 1:10000, seguida de mais três lavagens iguais as realizadas anteriormente.

A membrana foi então incubada com a solução de revelação (*Commercial Chemiluminescence Solution*) por cerca de três minutos e visualizada após exposição por período variado padrão no equipamento “*iBright™ Western Blot Imaging Systems*”.

4.5 LISADO E IMUNOPRECIPITAÇÃO

As linhagens transfectadas com as construções EIF4E2-p2477, SLBP1-p2477 e SLBP2-p2477 foram induzidas com tetraciclina por cerca de 48h até atingir uma densidade celular de aproximadamente $2-5 \times 10^6$ células/ml. A cultura celular foi então centrifugada a 5000 rpm por 5 min, para obtenção das amostras em triplicata cada uma contendo cerca de $5 \times 10^8 - 10^9$ células no total. O sedimento celular foi ressuscitado com 1,5 mL de tampão de lise (HEPES-KOH 20 mM pH 7,4; acetato de potássio 75 mM, acetato de magnésio 4 mM, DTT 2 mM e inibidor de protease 1x). As células foram submetidas a lise celular através da cavitação na câmara de ruptura celular a uma pressão de 70 bar por 30 min mantidos a 4°C, seguida de uma rápida despressurização. As amostras foram então centrifugadas a 10000 rpm por 15 min a 4°C, e o sobrenadante armazenado a -80°C.

Para obtenção das imunoprecipitações, os lisados foram incubados por uma hora a 4°C com 10 μ L de anti-HA *magnetic beads* (*Thermo Scientific*®) previamente lavada com PBS. Após o período de incubação, o sobrenadante (fração depletada) foi separado e armazenado a -80°C, as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 1 min e lavadas com 1 ml de tampão de lise seguidos de mais três lavagens com 1 mL de PBS. Após as lavagens, a resina foi ressuscitada em 50 μ L de tampão de corrida para SDS-PAGE, retirando alíquotas de 5 μ L do lisado, da fração depletada do lisado e da eluição da resina para corrida de confirmação através de ensaios de *Western blot*.

4.6 PREPARAÇÃO E ANÁLISE DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Para espectrometria de massas, as imunoprecipitações foram submetidas a uma corrida de empacotamento durante aproximadamente 15 min, o suficiente para que as amostras migrem para o começo do gel (região de resolução). Após a migração, o gel foi corado com *Comassie Blue* 250-R e posteriormente descorado,

cortando as bandas correspondentes a cada amostra de imunoprecipitação, mantendo-as separadas e guardadas em água ultrapura, sendo em seguida enviadas a Plataforma Tecnológica de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná.

A espectrometria de massas baseou-se, primeiramente, na etapa de digestão das proteínas empacotadas em gel de poliacrilamida, através do uso da tripsina, capaz de clivar os peptídeos nos seus resíduos de arginina ou lisina. A segunda etapa foi a purificação dos peptídeos com a remoção de sais que pudessem interferir na cromatografia e espectrometria de massas. A terceira etapa consistiu da análise dos peptídeos por nano cromatografia líquida (LC-ESI-MS-MS) acoplada à espectrometria de massas (LTQ Orbitrap XL ETD). Por fim, ocorreu o reconhecimento e quantificação dos peptídeos utilizando a plataforma MaxQuant.

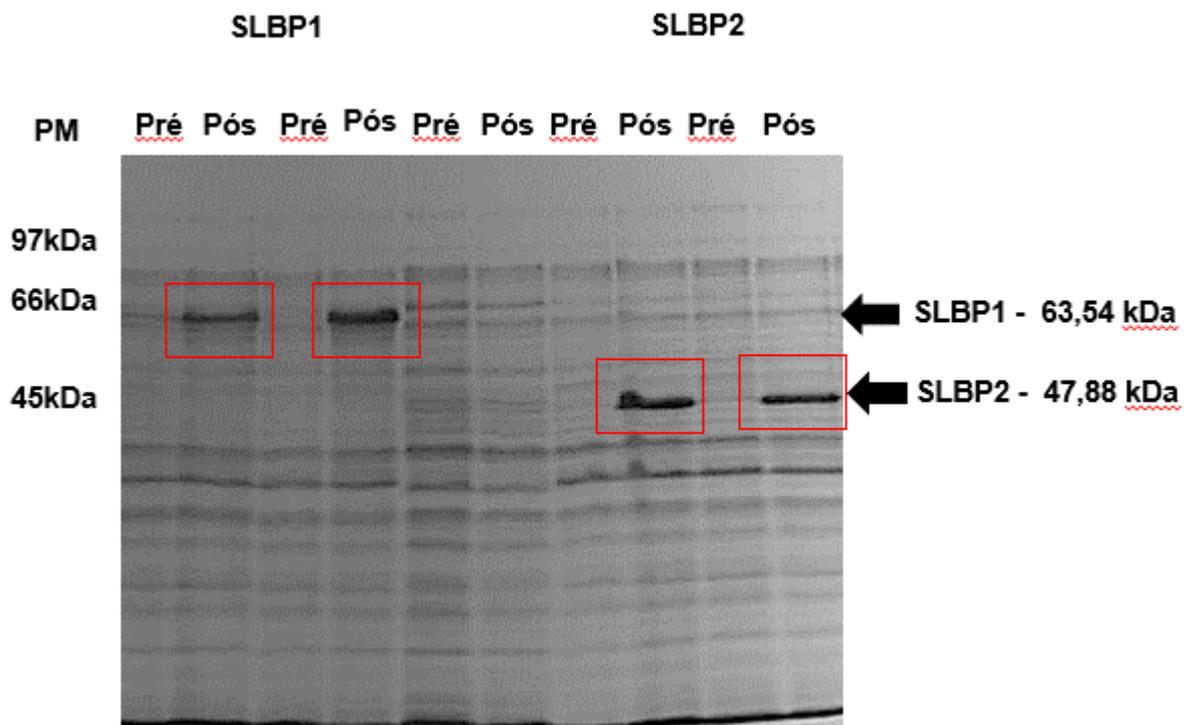
A análise dos dados brutos obtidos após a espectrometria de massas consistiu, inicialmente, na normalização dos valores de intensidade encontrados, para corrigir discrepâncias de intensidade entre as replicatas. Isto se deu através da soma de intensidade de cada replicata e a divisão do valor de soma maior pela soma individual de cada um dos clones, gerando um fator de normalização para cada triplicata. Após a normalização, foi feita a média das intensidades normalizadas e dos peptídeos únicos entre as replicatas tanto do controle como das amostras alvo, e a partir disso, foi calculada a razão entre a média das intensidades das amostras e a média das intensidades do controle para cada proteína analisada. Por fim, ocorreu a filtragem dos dados através da remoção de todas as proteínas zeradas (no caso de triplicatas, a exclusão de proteínas com duas replicatas zeradas) e a exclusão de proteínas com enriquecimento em relação ao controle negativo abaixo da linha de corte (razão menor que 4).

5 RESULTADOS

5.1 EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES

As células competentes da linhagem BL21 foram transformadas com as construções plasmidiais SLBP1-pET15b e SLBP2-pET21a, previamente obtidos em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa, com o intuito de avaliar a expressão das proteínas recombinantes fusionadas a *tag* de histidina (SLBP1-His – 63,54 kDa; SLBP2-His – 47,88 kDa) através do fracionamento de alíquotas pré e pós-indução com IPTG, em gel de SDS-PAGE 15%, sendo possível visualizar que apenas as amostras induzidas com IPTG expressavam as proteínas conforme o tamanho esperado de ambas, como apresentado na Figura 13.

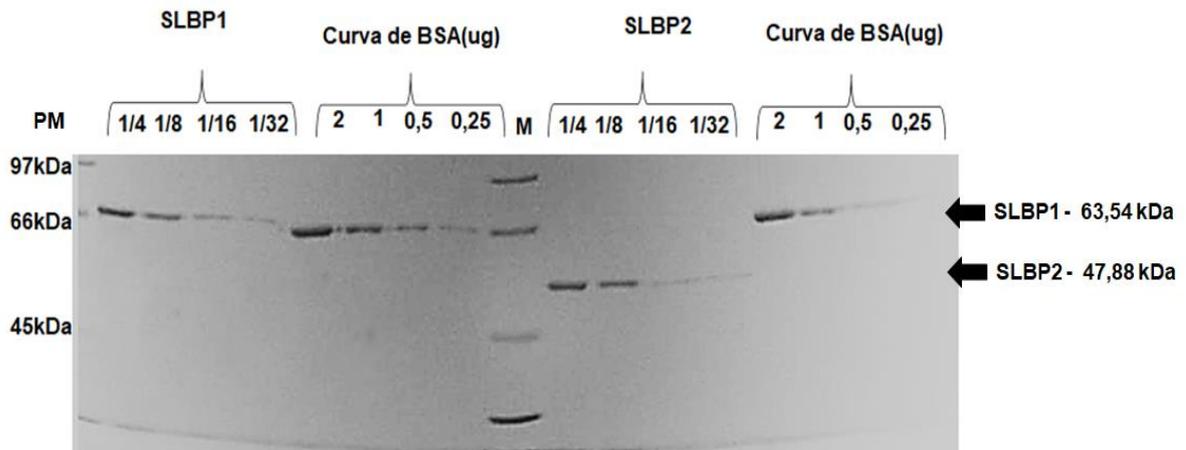
Figura 13 - Expressão das proteínas recombinantes fusionadas a histidina



Legenda: Gel SDS-PAGE 15% mostrando a sequência de alíquotas da resina, sedimento, sobrenadante, lavagens e eluições, obtidas durante a purificação de SLBP1 e SLBP2.

Após a expressão e purificação, as proteínas recombinantes foram quantificadas através de comparação com uma curva de BSA (2 μ g, 1 μ g, 0,5 μ g, 0,25 μ g) e diluições de 1/4 a 1/32 da eluição de ambas as proteínas (Figura 15). Após o cálculo de quantificação das médias de intensidades usando o programa *ImageJ* (Tópico 4.3) foi possível determinar que a diluição $\frac{1}{4}$ da proteína SLBP1 e SLBP2 equivalia a 1,42 μ g e 1,48 μ g, respectivamente. A quantificação é importante para análise dos níveis de expressão endógena em extratos de *T. brucei*, visto que é possível estabelecer uma o número de moléculas produzidas por célula ao longo do ciclo celular do parasita comparando com o nível de expressão com outras proteínas já quantificadas na célula.

Figura 15 - Quantificação das proteínas recombinantes com curva de BSA

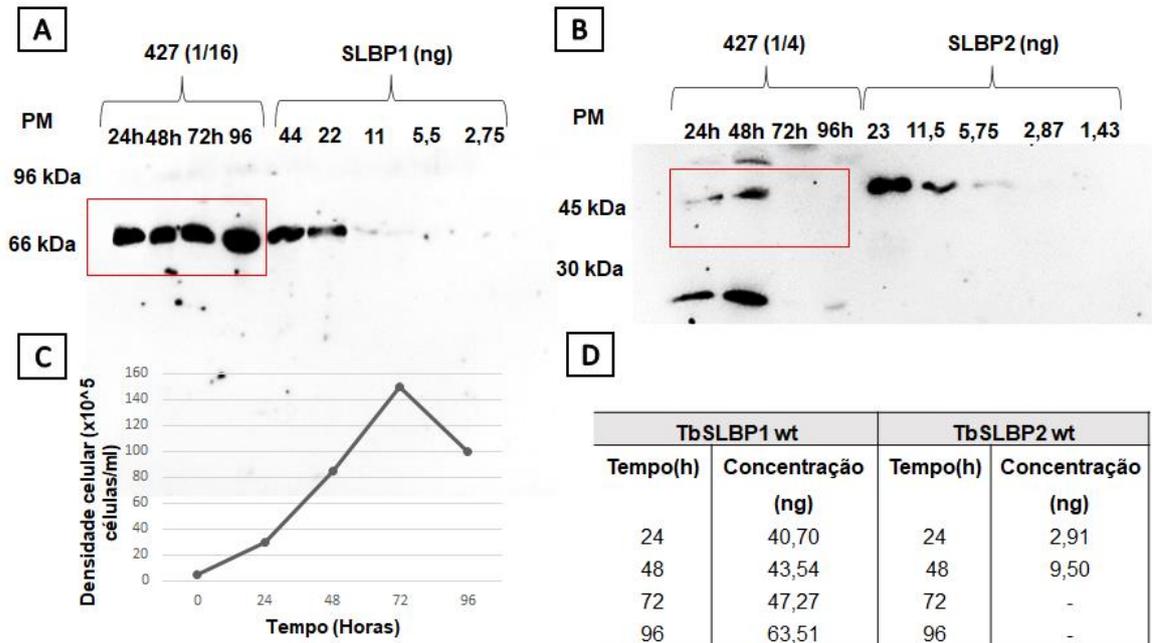


Legenda: Gel SDS-PAGE 15% mostrando a quantificação das proteínas recombinantes fusionadas a tag de histidina nas concentrações de 1:4 a 1:32, a partir de uma curva de BSA nas concentrações padrões (2 μ g, 1 μ g, 0,5 μ g, 0,25 μ g).

5.2 ANÁLISE DO PERFIL DE EXPRESSÃO ENDÓGENA DAS SLBPS

Para a quantificação da expressão de SLBP1 e SLBP2 na fase exponencial do ciclo de vida de *T. brucei*, extratos de 24-96h da cepa 427 na forma procíclica foram testados utilizando soros policlonais anti-SLBP1 e anti-SLBP2 (COELHO, 2018). Na figura 16 é possível verificar o reconhecimento das proteínas nativas de SLBP1 e SLBP2 nos pesos moleculares 63,52kDa e 47,88kDa, respectivamente, em comparação com as proteínas recombinantes em diluições com concentrações conhecidas. A curva de crescimento da SLBP1 confirma a expressão dessa proteína em todos os pontos do ciclo celular, diferentemente, a SLBP2 é expressa em maior quantidade no início do ciclo e possui seu pico de expressão em cerca de 48h após o repasse celular e tem sua expressão bastante reduzida em 72 e 96h conforme o parasita alcança a fase de decaimento. A curva de SLBP1 está 2 vezes mais diluída que a curva de SLBP2, com uma densidade celular de $6,25 \times 10^4$ células/ μL , a SLBP2, por sua vez, está com uma densidade celular de $2,5 \times 10^5$ células/ μL , com intuito de alinhar os níveis de expressão dos extratos de *T. brucei* com a concentração das proteínas recombinantes e favorecer a quantificação intracelular dessas proteínas. A partir da quantificação é possível estimar que a SLBP1 é expressa em níveis intracelulares maiores que a SLBP2, com a concentração de 48,7 ng em média em todos os pontos da curva de crescimento, com cerca de 737000 moléculas por célula, sendo uma proteína mais abundante e expressa de forma constitutiva, e a SLBP2 é expressa diferencialmente, a concentração de 24h e 48h foram 2,9 ng e 9,5 ng, equivalente a cerca de 14300 e 47000 moléculas por célula, respectivamente, os extratos de 72 e 96h não foram quantificadas devido ao limite de reconhecimento do soro policlonal.

Figura 16 - Quantificação da expressão endógena de SLBP1 e SLBP2 em extratos de *T. brucei* 427



Legenda: *Western blot* de extratos de *T. brucei* 427 e diluições de proteínas recombinantes em concentrações conhecidas, com uso de soros com anticorpos específicos para cada proteína, mostrando o nível de expressão endógena de SLBP1 (A) e SLBP2 (B), gráfico da curva de crescimento de 24-96h (C) e a tabela de concentração (ng) das proteínas em relação ao tempo analisando a densidade celular em relação ao tempo.

Fonte: Autor

5.3 CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS

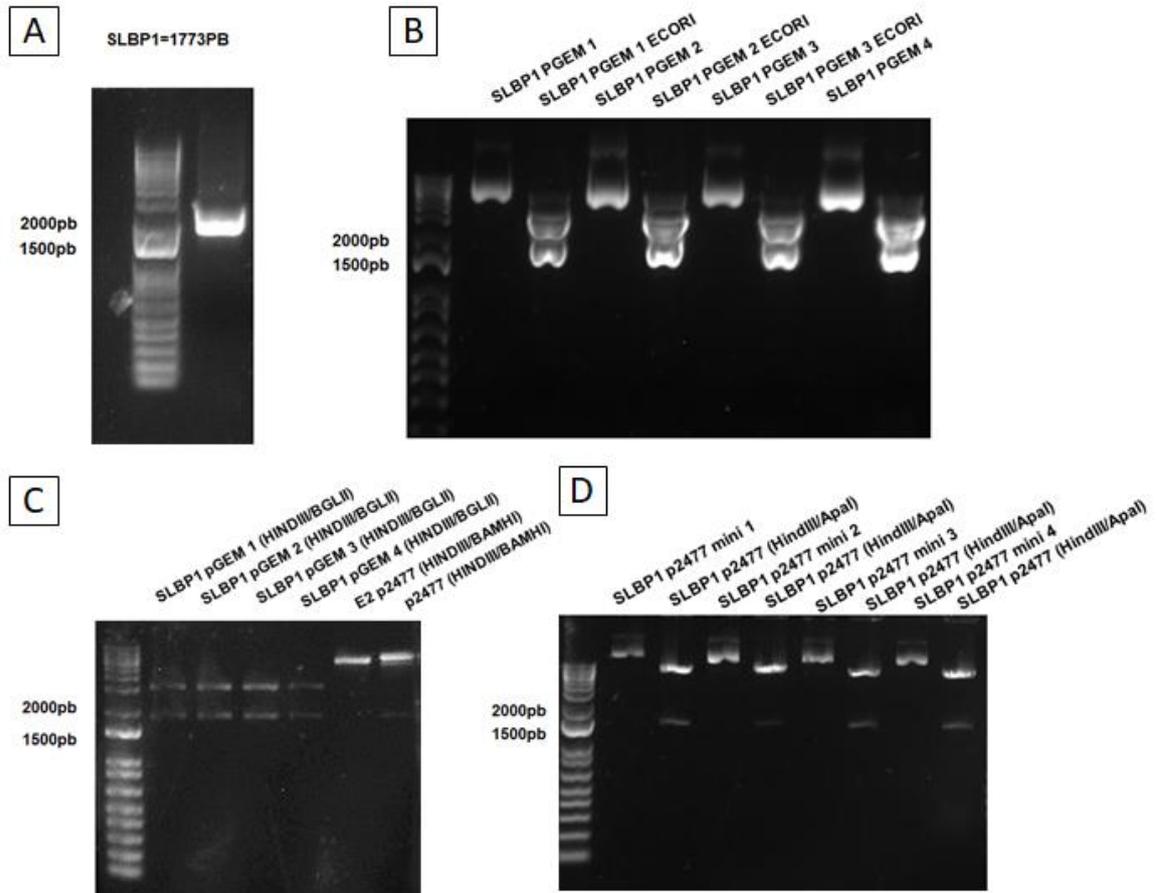
5.3.1 Amplificação e subclonagem de SLBP1 em p2477

O gene codificante da proteína SLBP1 foi amplificado com sucesso por meio de PCR, e o seu produto de amplificação foi observado em gel de agarose 1%. O

fragmento gênico apresentou o tamanho esperado (Tb927.3.1910- 1773 pb) mostrado na figura 17a. Após confirmação da amplificação, o fragmento foi submetido a adenilação, quantificado e enfim, clonado em vetor pGEM-T Easy, para posterior realização de minipreparações plasmidiais, a fim de aumentar a concentração de DNA a ser utilizado na subclonagem. A construção SLBP1-pGEM-T Easy foi então submetido a digestão nos sítios de restrição específicos do vetor de clonagem, utilizando a enzima EcoRI, resultando na correta liberação do inserto do vetor como observado na figura 17b. A construção foi então encaminhada para análise de sequenciamento e a integridade da sequência foi confirmada, observando ausência de mutações e 100% de alinhamento do DNA sequenciado com a sequência encontrada no banco de dados TritypDB.

Para permitir a expressão da SLBP1 fusionada a *tag* HA, foi utilizado o vetor p2477 que possui o *tag* de seis epítomos HA, sítios internos HindIII e BamHI, e resistência a fleomicina. Dessa forma, a construção SLBP1 pGEM-T Easy foi digerida com as enzimas de restrição BglII, capaz de se ligar de forma complementar ao sítio BamHI do vetor p2477, e HindIII, sendo possível observar a liberação do inserto no tamanho molecular esperado de 1773 pb (Figura 17c). Em seguida, o fragmento de digestão correspondente ao inserto foi purificado e quantificado para clonagem no vetor de p2477 previamente digerido com as enzimas HindIII e BamHI. Para confirmação da subclonagem de SLBP1 em p2477, foi utilizado as enzimas HindIII, sítio de restrição do vetor e ApaI, sítio interno presente apenas na sequência gênica do SLBP1, sendo possível observar a liberação de um fragmento no tamanho esperado de 1278 pb com o padrão esperado através da comparação com digestão *in silico* da construção (Figura 17d).

Figura 17 - PCR e processo de clonagem de SLBP1 em p2477



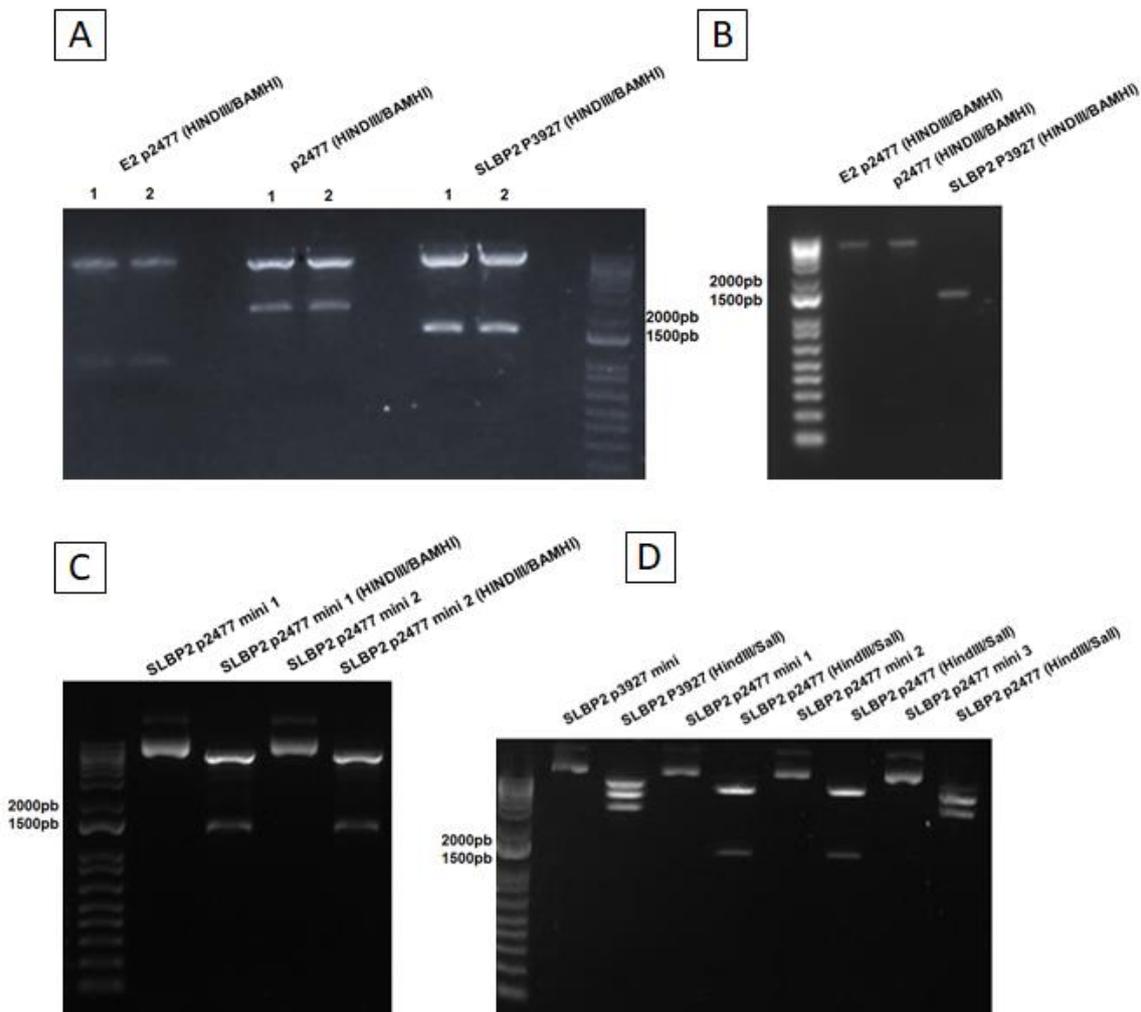
Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1%. (A) produto de PCR de SLBP1 para clonagem em pGEM-T Easy(1773pb). (B) Digestão de minipreparação de DNA plasmidial de SLBP1 pGEM-T Easy com EcoRI verificando a liberação do inserto em quatro diferentes clones em comparação com o DNA plasmidial não digerido. (C) Digestão de SLBP1 pGEM-T Easy com as enzimas de restrição HindIII e BglIII e E2-p2477 e p2477 (plasmídeo fechado) com as enzimas de restrição HindIII e BamHI para purificação e clonagem do inserto no vetor p2477. (D) Digestão de confirmação de clonagem de SLBP1-p2477 com as enzimas de restrição HindIII e ApaI (sítio interno de SLBP1). Marcador utilizado 1 Kb plus Ladder (Invitrogen®).

5.3.2 Subclonagem de SLBP2 em p2477

A construção SLBP2/p2477 foi obtida através digestão do fragmento gênico presente no vetor p3927 previamente obtida em trabalhos anteriores, possuindo os mesmos sítios de restrição que o p2477. Dessa forma a construção SLBP2/p3927 foi digerida com as enzimas de restrição HindIII e BamHI, resultando na liberação do inserto correspondente ao gene de SLBP2 com tamanho esperado de 1296 pb (Figura 18a). O fragmento da digestão correspondente ao SLBP2 foi purificado, assim como o fragmento correspondente ao vetor p2477 nos tamanhos esperados como é possível observar na figura 18b. Após a transformação e realização das minipreparações plasmidiais, a clonagem da construção SLBP2-p2477 foi confirmada através do uso das enzimas de restrição HindIII e BamHI, sendo possível observar nas bandas do gel, a liberação do inserto SLBP2 do vetor no tamanho esperado de 1296 pb (Figura 18c). Uma segunda digestão de confirmação foi realizada avaliando os padrões de digestão SLBP2 no vetor p3927 em comparação com o vetor p2477 utilizando as mesmas enzimas de restrição HindIII e Sall, observando dois clones com padrões de digestão diferentes conforme o esperado e apenas 1 clone com padrão errôneo (Figura 18d).

A construção foi então encaminhada para análise de sequenciamento confirmando a integridade da sequência, observando ausência de mutações e 100% de alinhamento do DNA sequenciado com a sequência encontrada no banco de dados TritypDB.

Figura 18 - Processo de clonagem de SLBP2 em p2477

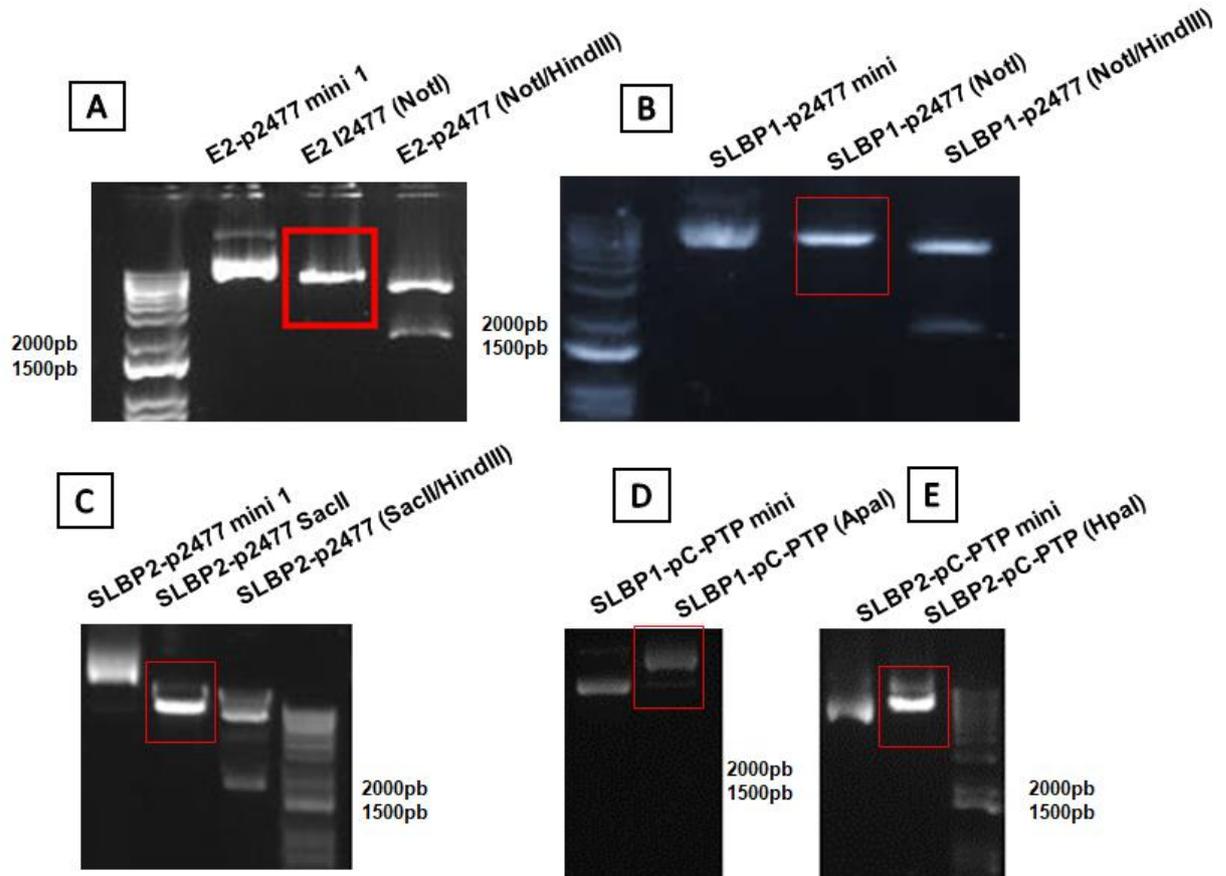


Legenda: Eletroforese em gel de agarose 1%. (A) Digestão de E2 p2477 e p2477 (plasmídeo não clonado) e SLBP2 p3927 com as enzimas de restrição HindIII e BamHI para purificação e clonagem do fragmento SLBP2 ao vetor p2477. (B) Fragmentos purificados do vetor p2477 (proveniente da construção E2-p2477 e do plasmídeo não clonado) e do inserto SLBP2. (C) Digestão de confirmação de clonagem de SLBP2 em p2477 utilizando as enzimas de restrição HindIII e BamHI liberando o inserto SLBP2 (1296pb). (D) Digestão de confirmação de SLBP2-p3927 e SLBP2-p2477 com as enzimas de restrição HindIII e Sall para comparação de padrão de bandas, observando o clone 1 e 2 com o padrão previsto. Marcador utilizado 1 Kb plus Ladder (Invitrogen®).

5.4 TRANSFEÇÃO DE CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS

Para avaliação das possíveis interações proteicas com EIF4E2 e as SLBPs, as construções SLBP1-p2477 e SLBP2-p2477, obtidas após clonagem (tópico 5.3) e EIF4E2-p2477 obtido previamente, foram linearizados com as enzimas de restrição NotI (E2 e SLBP1) e SacII (SLBP2) e confirmado com outras enzimas de restrição e o perfil de digestão de banda foi observado in silico confirmando a correta liberação do fragmento nos tamanhos esperados (Figura 19 A-C). As construções foram então transfectadas em *T. brucei*, cepa 29-13 para a expressão das proteínas fusionadas ao tag HA. As construções pC-PTP-Puro-SLBP1 e pC-PTP-Puro-SLBP2 foram utilizadas nesse estudo com o objetivo de avaliar o perfil de expressão em *T. brucei* na forma procíclica (cepa 427) através de extratos de curva de crescimento expressando as proteínas fusionadas com o tag PTP. Inicialmente, as construções foram linearizadas com as enzimas de restrição ApaI (SLBP1) e HpaI (SLBP2), sítios internos de recombinação do inserto observando a correta linearização de ambas as construções através da variação de tamanho do DNA linearizado com o observado no DNA não linearizado (Figura 19 D e E).

Figura 19 - Linearização das construções em p2477e pC-PTP para transfecção



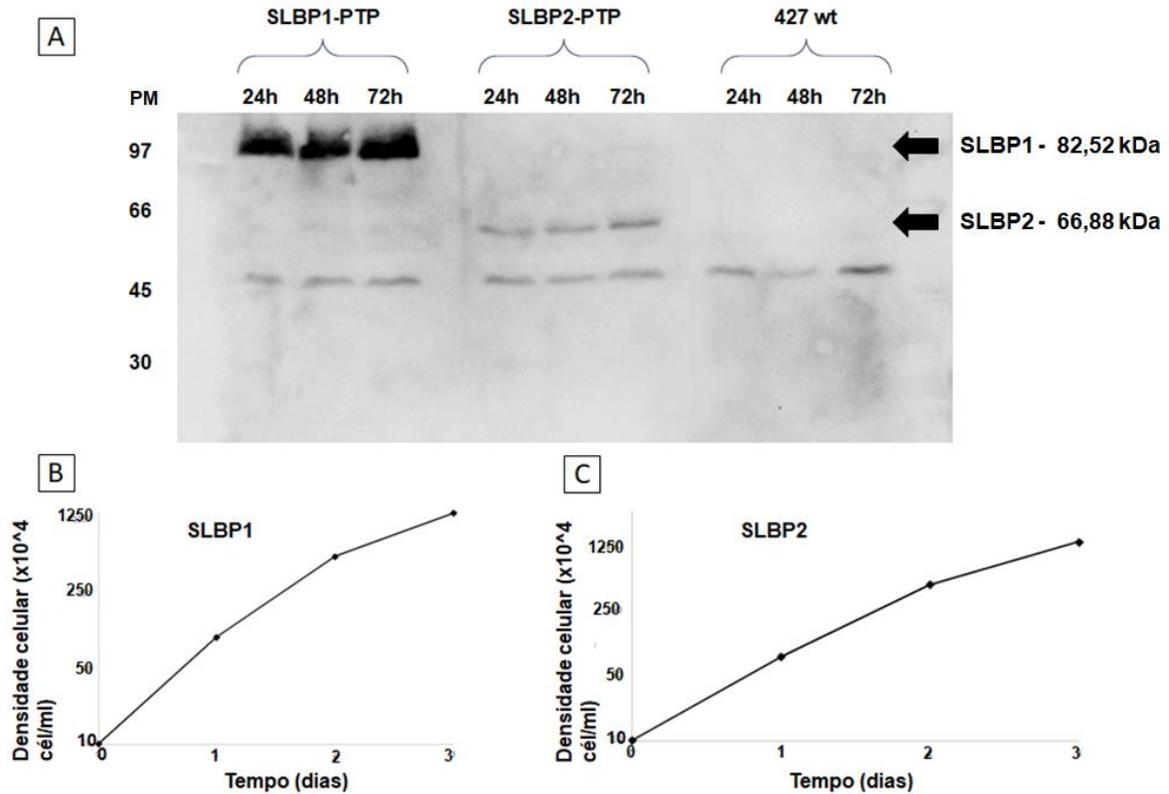
Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1%. Linearização de E2 p2477 (A) e SLBP1 p2477 (B) com a enzima de restrição NotI e SLBP2 p2477 (C) com a enzima de restrição SacII, as três construções também foram também digeridas com HindIII para verificação do padrão de liberação de banda e confirmação de linearização. A linearização de SLBP1-pC-PTP (D) com a enzima de restrição ApaI e SLBP2-pC-PTP (E) com a enzima de restrição HpaI também foram avaliadas, com o padrão de banda do DNA digerido comparado com a construção equivalente não digerida. Marcador utilizado 1 Kb plus Ladder (Invitrogen®).

5.5 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG PTP

A expressão das SLBPs foi avaliada por meio de ensaios de *western blot* com o anticorpo anti-proteína A (Sigma®), com o objetivo de avaliar as possíveis proteínas associadas, através de análise de espectrometria de massas.

As construções foram então transfectadas em *T. brucei* na cepa selvagem 427, e em seguida foram retirados extratos durante a curva de crescimento no período de 24-72h, submetidos a gel em SDS-PAGE 15%, transferidas para membranas de PVDF e analisadas através de ensaios de *western blot* com anticorpo anti-proteína A (Sigma®), sendo possível observar a expressão contínua durante a fase inicial e de crescimento logarítmico das proteínas nos tamanhos moleculares esperados (SLBP1 – 63,52 + 19 kDa e SLBP2 – 47,88 + 19 kDa), não sendo observadas as fases estacionária e de morte celular (Figura 20).

Figura 20 - Curvas de crescimento de proteínas fusionadas ao *tag* PTP em células de *T.brucei*



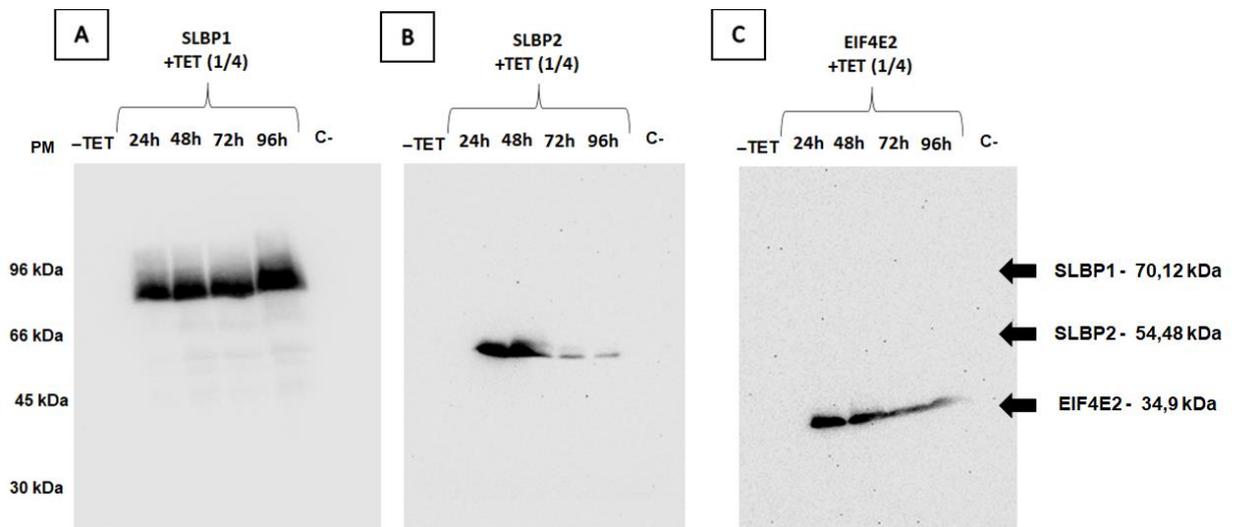
Legenda: Ensaio de *western blot* mostrando a expressão de SLBP1 e SLBP2 fusionados ao *tag* PTP em curvas de 24 a 72h em comparação ao controle negativo correspondente a linhagem selvagem 427 (A). Curvas de crescimento analisando a densidade celular das linhagens SLBP1-PTP (B) e SLBP2-PTP (C), utilizadas para obtenção dos extratos submetidos ao ensaio de *western blot* (A) em relação ao tempo em dias.

5.6 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG HA

Passado o período de seleção, foram retirados extratos induzidos e não induzidos com tetraciclina (1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) no período de 24-96h, para avaliação da expressão das proteínas através de ensaios de *Western blot* com anticorpo anti-HA

(Abcam). Foi possível verificar a expressão das proteínas SLBP1 (63,52 + 6,6kDa), SLBP2 (47,88 + 6,6kDa), EIF4E2 (28,3 kDa + 6,6kDa) fusionados ao *tag* HA (6x HA: 6,6 kDa), identificando a expressão constitutiva de SLBP1 ao longo da curva do crescimento, enquanto que SLBP2 possui uma expressão diferencial, sendo expresso inicialmente na fase *lag* e alcançando o pico de expressão no crescimento logarítmico do parasita e reduzindo significativamente sua expressão na fase estacionária e de morte celular. O EIF4E2 também é expresso diferencialmente, com uma redução aparente em 72 e 96h conforme as células entram em senescência (Figura 21).

Figura 21 - Avaliação do perfil de expressão de SLBP1, SLBP2 e EIF4E2 fusionados ao *tag* HA em *T. brucei*

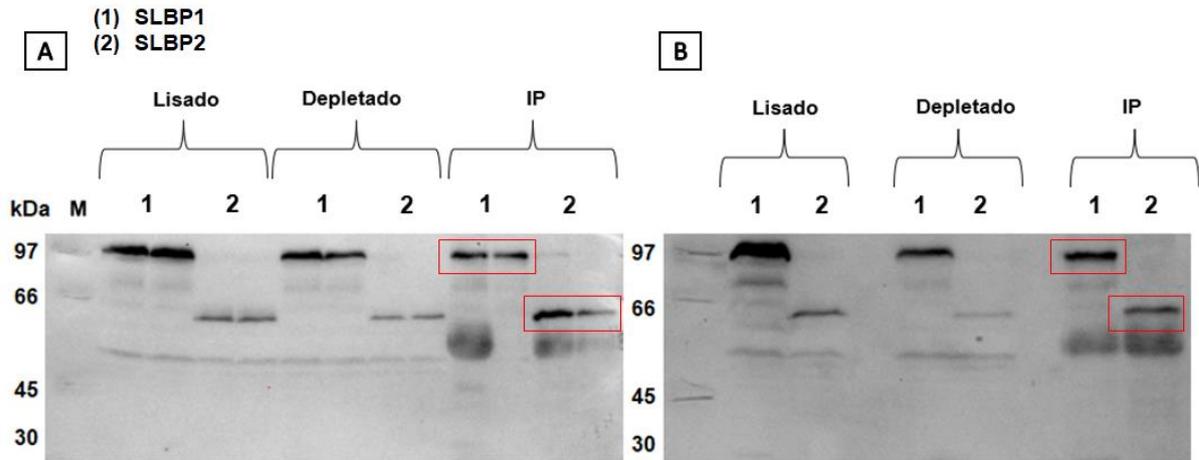


Legenda: Ensaio de *western blot* da indução das proteínas fusionadas ao *tag* HA, das linhagens SLBP1-p2477 (63,52 + 6,6kDa), em A, SLBP2-p2477 (47,88 + 6,6kDa), em B, e EIF4E2-p2477 (28,3 kDa + 6,6kDa), em C, em células de *T. brucei* cepa 29-13, em comparação ao controle negativo (extrato 29-13 induzido com tetraciclina).

5.7 LISADOS E IMUNOPRECIPITAÇÕES DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG PTP

Após a confirmação da expressão das proteínas fusionadas ao *tag* PTP, as linhagens transfectadas, derivadas de culturas celulares de 427, foram utilizadas para obtenção de lisados celulares, em triplicata, com o objetivo de avaliar a interação de proteínas associadas as SLBPs. Os lisados foram fracionados em SDS-PAGE para verificação da expressão das proteínas e eventos de degradação no decorrer da lise celular. Posteriormente, os lisados foram submetidos a etapa de imunoprecipitação com a resina IgG Sepharose® 6 Fast Flow (GE Healthcare), para isolamento das proteínas co-precipitadas e visualizados após um ensaio de western blot com o anticorpo anti-proteína A (Sigma®). É possível observar a expressão das proteínas SLBP1 (63,52 + 19kDa) e SLBP2 (47,88 + 19kDa) fusionadas ao *tag* PTP, em triplicatas de lisado, depletado e imunoprecipitação (Figura 22). O resultado está de acordo com o observado nas curvas de crescimento, em relação ao tamanho e nível de expressão esperado. Após a confirmação da reação de imunoprecipitação, as amostras foram preparadas e enviadas para realização da espectrometria de massas no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná.

Figura 22 – Ensaio de *western blot* das imunoprecipitações das proteínas SLBP1 e SLBP2 –pC-PTP



Legenda: Ensaio de *western blot* mostrando a expressão proteica, nas amostras correspondentes ao lisado, depletado e imunoprecipitação (IP) em triplicatas, das linhagens SLBP1-pC-PTP (1) e SLBP2-pC-PTP (2).

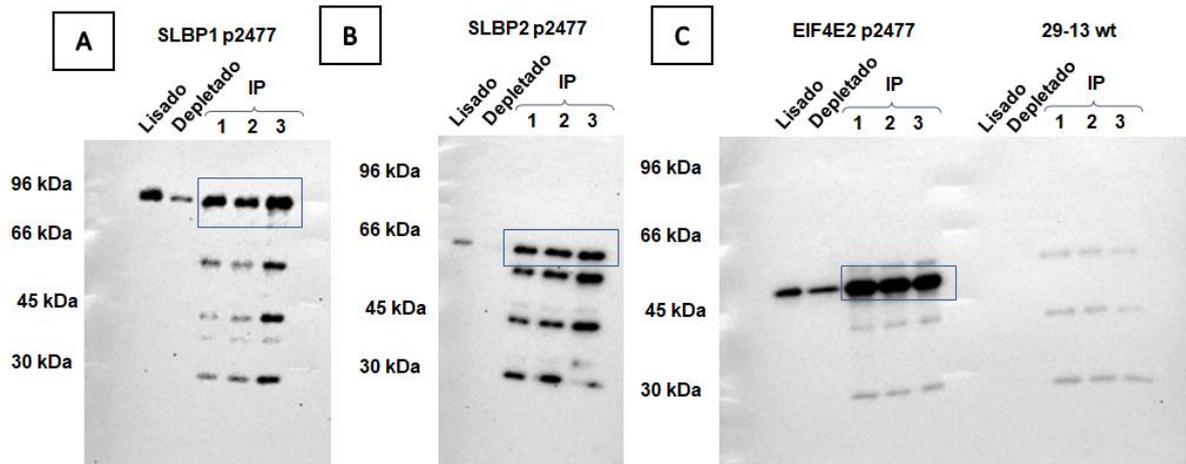
Após a realização das imunoprecipitações, seguiu-se com a preparação das amostras para envio e realização de espectrometria de massas no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná. Os resultados das imunoprecipitações tanto da pC-PTP-Puro-SLBP1 como da pC-PTP-Puro-SLBP2 se demonstraram insuficientes, devido à ausência das próprias proteínas SLBP1 e SLBP2, por motivos desconhecidos, presumindo uma possível degradação das mesmas durante a preparação. É importante salientar, contudo, que ao analisar os padrões das proteínas co-precipitadas, foi possível observar a presença de diferenças significativas entre os possíveis parceiros em cada experimentos. Nas amostras da SLBP2 chama a atenção a presença de grande quantidade de proteínas ribossomais constituintes da subunidade menor 40S, em comparação com as proteínas co-precipitadas com a SLBP1. Entretanto, tendo em vista da ausência das proteínas-alvo, o ensaio ficou inconclusivo. Decidiu-se então pela substituição do plasmídeo pC-PTP-puro por construções com o vetor p2477, capaz de expressar as proteínas fusionadas ao *tag* HA com o intuito de aperfeiçoar a imunoprecipitação das proteínas para obtenção de

resultados mais confiáveis, confirmando a especificidade e integridade das proteínas e complexos proteicos na análise de espectrometria de massas.

5.8 LISADOS E IMUNOPRECIPITAÇÕES DE PROTEÍNAS FUSIONADAS AO TAG HA

Após a confirmação da expressão das proteínas fusionadas ao *tag* HA, as linhagens transfectadas, derivadas de culturas celulares de 29-13, foram utilizadas para obtenção de lisados celulares com o objetivo de avaliar a interação de proteínas associadas ao fator EIF4E2 e às SLBPs. Os lisados foram submetidos a reação de imunoprecipitação, em triplicatas, e as amostras foram fracionadas em SDS-PAGE para verificação da expressão das proteínas através de *western blot* com anticorpo anti-HA (Abcam). É possível verificar a expressão das proteínas SLBP1 (63,52 + 6,6kDa), SLBP2 (47,88 + 6,6kDa) e EIF4E2 (28,3 kDa + 6,6kDa), fusionadas ao *tag* HA, enquanto que o controle apresenta três bandas inespecíficas mais fortes que aparecem em todas amostras em tamanhos distintos as observadas nas proteínas de interesse (figura 23). O resultado está de acordo com o observado nas curvas de crescimento, em relação ao tamanho e nível de expressão esperado. Após a confirmação da reação de imunoprecipitação, as amostras foram preparadas e enviadas para realização da espectrometria de massas no Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná.

Figura 23 - Ensaio de *western blot* das imunoprecipitações das proteínas SLBP1 e EIF4E2 fusionadas ao *tag* HA



Legenda: Ensaio de *western blot* mostrando o teste de confirmação de expressão proteica, das amostras correspondentes aos lisados, depletados e imunoprecipitações das linhagens SLBP1-p2477 (A), SLBP2-p2477 (B) e EIF4E2-p2477 (C) fusionados ao *tag* HA em comparação com o controle negativo (extrato 29-13 induzido com tetraciclina) utilizando o anticorpo anti-HA (Abcam).

5.9 AVALIAÇÃO DO PERFIL DE PARCEIROS PROTEICOS ATRAVÉS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após o recebimento dos dados brutos fornecidos pela Plataforma Tecnológica de Espectrometria de Massas, foi feita a avaliação dos peptídeos que co-purificaram com as proteínas alvo enviadas, através de análise da sequência proteica de *T. brucei* em um banco de dados online (*T. brucei brucei* TREU927, 2022, TriTrypDB). A análise dos valores de intensidade, normalização e filtragem dos dados prosseguiu conforme o tópico 4.6.

As proteínas de maior abundância que co-purificaram com as proteínas SLBP1, SLBP2 e EIF4E2 são mostrados na tabela 4-6, respectivamente, em ordem decrescente de média de intensidade. É possível observar a presença das proteínas

alvo SLBP1 e EIF4E2 identificadas com maior abundância em relação as demais, enquanto a proteína SLBP2 não foi identificada no processo de análise dos dados de espectrometria, com ausência da co-precipitação com a própria SLBP2 e com seu parceiro proteico EIF4E2. Sua ausência também nos resultados de EIF4E2 supõe que não foi possível identifica-la por alguma limitação da técnica de detecção ou possível modificação pós-traducional. Em uma repetição da espectrometria de massas foi possível observar a SLBP2 em baixa intensidade co-precipitando com as amostras de SLBP2 e EIF4E2, o que demonstra uma possível degradação. Foi identificado a presença do fator de iniciação EIF4E3 com maior abundância co-precipitando com ambas as proteínas de interesse, e os fatores de iniciação EIF3G, EIF4G3 e EIF6 com menor abundância se comparado ao homólogo EIF4E3.

Outro resultado relevante observado a partir das análises de espectrometria de massa foi a identificação da proteína de ligação ao mRNA MKT1 co-precipitando especificamente com a SLBP1 de forma abundante, juntamente com seu complexo de proteínas LSM12, PBP1, XAC1 e MKT1L, complexo que auxilia os fatores de iniciação da tradução na sua ligação com os mRNAs, demonstrando uma possível participação da SLBP1 na ativação da tradução. Foi identificado também a co-precipitação de três proteínas de ligação ao mRNA Zinc Finger (ZC3H40, ZC3H39 e ZC3H18) e da proteína de ligação TRRM2 de forma específica apenas com a SLBP1. Foi observado co-precipitando com SLBP2, a presença da proteína S27a ribossomal associado a Ubiquitina e da proteína de ligação a Ubiquitina da família PLAA, proteína do complexo proteassoma importante para ação de protease e regulação do metabolismo de proteínas, envolvido nos processos de controle da degradação de proteínas. A proteína S27a ribossomal também é identificada em menor abundância com a EIF4E2. Este resultado também é corroborado pelo resultado de espectrometria anteriormente realizado com a SLBP2 fusionado ao *tag* PTP, que também demonstrou a presença da proteína S27a ribossomal.

Foi identificado a presença de algumas proteínas relacionadas ao mRNA em ambas as proteínas de interesse como a DRBD4 e MRT4, esta última co-precipitando de forma abundante com a SLBP2 e do dímero de proteínas 14-3-3-I e II

co-precipitando de forma abundante com ambas as proteínas de interesse, em especial com a SLBP2. Foi identificado também a presença de diversas proteínas envolvidas no metabolismo de forma abundante co-precipitando principalmente com EIF4E2 e algumas proteínas associadas a função flagelar, como proteínas de transporte flagelar (IFTs) e a SMP1-1 também encontrada co-precipitando especificamente com a SLBP1 em resultados de espectrometria anteriores (FREIRE et al., 2018).

Tabela 2 – Principais peptídeos detectados pela técnica de espectrometria de massas correlacionadas a proteína SLBP1

SLBP1-p2477 (Tb927.3.1910)					
Gene ID	Identificação	Função	Média intensidade	Média do nº de peptídeos	Razão
Fatores de iniciação da tradução					
Tb927.11.11770	EIF4E3	Fator de iniciação da tradução	5,5+E7	2,33	8,8
Tb927.4.1930	EIF3G	Fator de iniciação da tradução	1,7+E7	2	8,7
Tb927.8.4820	EIF4G3	Fator de iniciação da tradução	1,6+E7	2	5,3
Relacionadas ao mRNA					
Tb927.3.1910	SLBP1	Proteína de ligação ao mRNA	5,5+E8	7	*
Tb927.6.2550	TRRM2	Proteína de ligação ao mRNA	2,9+E8	1	116
Tb927.6.4770	MKT1	Proteína de ligação ao mRNA	1,8+E8	6,3	12
Tb927.9.9060	LSM12	Proteína de ligação ao mRNA	8,7+E7	3,66	7,5
Tb927.8.990	RBP33	Proteína de ligação	8,7+E7	2,66	94

Tb927.10.14950	ZC3H40	Proteína de ligação ao mRNA	8,5+E7	3,66	6,2
Tb927.10.10010	MRT4	Proteína envolvida na montagem do ribossomo	7,2+E7	4	41
Tb927.8.4540	PBP1	Proteína de ligação ao mRNA	5,5+E7	1,33	8,3
Tb11.01.5690	DRBD4	Proteína de ligação ao mRNA	5+E7	2,33	188
Tb927.10.1490	MKT1L	Proteína de ligação ao mRNA	4,4+E7	3,66	14
Tb927.10.14930	ZC3H39	Proteína de ligação ao mRNA	3,9+E7	1,33	6,1
Tb927.7.2140	ZC3H18	Proteína de ligação ao mRNA	2,4+E7	1,66	22
Tb927.7.320	RBP8	Proteína de ligação ao mRNA	2,4+E7	2	5,3
Tb927.9.5320	NRBP	Proteína de ligação ao mRNA	1,7+E7	2	4,8
Tb927.7.2780	XAC1	Proteína envolvida na ativação da expressão proteica	1,3+E7	1	*
Proteínas de metabolismo					
Tb927.11.6870	14-3-3-II	Proteína chaperona	4,1+E8	8,33	5,9
Tb927.11.9530	14-3-3-I	Proteína chaperona	2,4+E8	4,66	9,6
Tb927.10.8530	T. Glicose 2A	Proteína envolvida no transporte intracelular	3,4+E7	1,66	*
Tb927.10.5940	NEK17-2	Proteína envolvida em processos de	2,5+E7	3	25

fosforilação					
Relacionadas a função flagelar					
Tb927.1.2230	SMP1-1	Proteína envolvida na organização do flagelo	1,5+E8	3,66	7,6
Tb927.10.14980	IFT52	Proteína envolvida no transporte flagelar	1+E8	6,66	193
Tb927.11.1740	IFT88	Proteína envolvida no transporte flagelar	7,2+E7	6	63
Tb927.7.3370	IFT74	Proteína envolvida no transporte flagelar	3,8+E7	2,33	*
Tb927.6.1470	Proteína hipotética	Proteína nuclear	1,4+E8	2,66	5,5
Tb927.6.2390	Proteína hipotética	Proteína mitocondrial	3,2+E7	2,33	*
Tb927.5.4450	Proteína hipotética	-	2,8+E7	1,33	*

Legenda: Os resultados das proteínas que co-purificaram com a SLBP1 foram organizados segundo o Gene ID (www.tritrypdb.org), identidade, função molecular, média dos valores de intensidade de peptídeos e razão entre as amostras e o controle de cada uma das proteínas identificadas. * Proteínas não identificadas no controle.

Fonte: Autor.

Tabela 3 – Principais peptídeos detectados pela técnica de espectrometria de massas correlacionadas a proteína SLBP2

SLBP2-p2477 (Tb927.3.870)					
Gene ID	Identificação	Função	Média intensidade	Média do nº de peptídeos	Razão
Fatores de iniciação da tradução					
Tb927.11.11770	EIF4E3	Fator de iniciação da tradução	9,8+E7	3,33	10
Tb927.4.1930	EIF3G	Fator de iniciação da tradução	2,3+E7	1,66	7,4
Tb927.10.5300	EIF6	Fator de iniciação da tradução	3,3+E6	0,66	
Relacionadas ao mRNA					
Tb927.10.10010	MRT4	Proteína envolvida na montagem do ribossomo	1,1+E8	4,33	40
Tb927.4.1270	ruvB	DNA helicase	1,1+E8	10	5,2
Tb927.9.5320	NRBP	Proteína de ligação ao mRNA	9+E7	5,66	16
Tb927.4.3890	RNA helicase dependente de ATP	RNA helicase	4,2+E7	3	6,7
Tb11.01.5690	DRBD4	Proteína de ligação ao mRNA	1,8+E7	1,33	42
Tb927.3.870	SLBP2	Proteína de ligação ao mRNA	1,2+E6	1	*
Proteínas de metabolismo					
Tb927.11.6870	14-3-3-II	Proteína chaperona	6,8+E8	9,66	6,2
Tb927.11.9530	14-3-3-I	Proteína chaperona	4,1+E8	7	11
Tb927.1.1670	Domínio ARM	Proteína envolvida na	2,8+E8	16	703

señalización celular					
Tb927.10.2890	fosfopiruvato hidratase	Proteína envolvida na via glicolítica	1,3+E8	5,66	7
Tb927.10.5030	Proteína ribossomal S27a	Proteína ribossomal associada ao proteassoma	8,2+E7	1,33	*
Tb927.8.6330	Proteína de ligação de Ubiquitina da família PLAA	Proteína associada ao proteassoma	6,5+E7	5,33	*
Tb927.11.16760	TCP-1-alfa	Proteína envolvida no metabolismo mitocondrial	4,8+E7	5	10
Tb927.6.2790	L-treonina 3-desidrogenase	Proteína envolvida em processos de oxirredução	4,2+E7	2,66	*
Tb927.6.4740	Proteína re-exportadora importina-alfa	Proteína envolvida no transporte intracelular	3,9+E7	3	35
Tb927.8.4950	Cinesina	Proteína envolvida no transporte intracelular	3,3+E7	1	*
Tb927.10.8530	T. de Glicose 2A	Proteína envolvida no transporte intracelular	3,3+E7	1	*
Relacionadas a função flagelar					
Tb927.10.14980	IFT52	Proteína envolvida no transporte flagelar	1,5+E7	2,66	18
Tb927.6.5080	Proteína hipotética	Proteína do retículo endoplasmático	2,5+E8	10	12
Tb927.9.4290	Proteína hipotética	Proteína nuclear	1,34+E8	1	8,5

Legenda: Os resultados das proteínas que co-purificaram com a SLBP2 foram organizados segundo o Gene ID (www.tritrypdb.org), identidade, função molecular, média dos valores de intensidade de peptídeos e razão entre as amostras e o controle de cada uma das proteínas identificadas. * Proteínas não identificadas no controle.

Fonte: Autor.

Tabela 4 – Principais peptídeos detectados pela técnica de espectrometria de massas correlacionadas a proteína EIF4E2

EIF4E2-p2477 (Tb927.10.16070)					
Gene ID	Identificação	Função	Média intensidade	Média do nº de peptídeos	Razão
Fatores de iniciação da tradução					
Tb927.10.16070	EIF4E2	Fator de iniciação da tradução	4,2+E8	3,33	*
Tb927.11.11770	EIF4E3	Fator de iniciação da tradução	4+E7	2,66	6,4
Relacionadas ao mRNA					
Tb927.9.5320	NRBP	Proteína de ligação ao mRNA	3,4+E7	3,33	9,7
Tb927.9.12510	DED1	RNA helicase	2,8+E7	5,33	5,8
Tb927.10.10010	MRT4	Proteína envolvida na montagem do ribossomo	2,6+E7	3	14
Tb927.4.3890	RNA helicase dependente de ATP	RNA helicase	2,5+E7	2,66	4,3
Tb11.01.5690	DRBD4	Proteína de ligação ao mRNA	1,3+E7	1,33	51
Tb927.3.870	SLBP2	Proteína de ligação ao mRNA	4,8+E6	1	*
Proteínas de metabolismo					

Tb927.10.2890	fosfopiruvato hidratase	Proteína envolvida na via glicolítica	2,8+E8	9,33	23
Tb927.11.16760	TCP-1-alfa	Proteína envolvida no metabolismo mitocondrial	1,9+E8	13	20
Tb927.11.9590	S-adenosil-L- homocisteína hidrolase	Proteína envolvida no metabolismo de aminoácidos	1,78+E8	4	*
Tb927.11.6870	14-3-3-I	Proteína chaperona	1,2+E8	4	4,9
Tb927.11.9530	14-3-3-II	Proteína chaperona	1,1+E8	6,33	4
Tb927.6.4000	SGT	Proteína envolvida com transporte intracelular	8,8+E7	2	*
Tb927.11.6590	Metaloprotease M17	Proteína envolvida no metabolismo de proteínas	7,8+E7	4,33	86
Tb927.11.880	CYPA	Proteína envolvida no metabolismo de proteínas	7,2+E7	3,66	*
Tb927.11.16730	GCVL-2	Proteína envolvida em processos de oxirredução	6,6+E7	3,66	74
Tb927.3.3780	TXN1a	Proteína envolvida em processos de oxirredução	5,8+E7	2,33	166
Tb927.6.2790	L-treonina 3- desidrogenase	Proteína envolvida em processos de oxirredução	3,9+E7	4	*
Tb927.10.5030	Ubiquitina S27a	Proteína associada ao proteassoma	2,4+E7	1,33	*
Tb927.8.4950	Cinesina	Proteína envolvida no transporte intracelular	1,9+E7	1	*

Relacionadas a função flagelar					
Tb927.10.14980	IFT52	Proteína envolvida no transporte flagelar	3+E6	1	5,9

Legenda: Os resultados das proteínas que co-purificaram com a EIF4E2 foram organizados segundo o Gene ID (www.tritrypdb.org), identidade, função molecular, média dos valores de intensidade de peptídeos e razão entre as amostras e o controle de cada uma das proteínas identificadas. *Proteínas não identificadas no controle. Fonte: Autor.

6 DISCUSSÃO

Os tripanossomatídeos têm sido objeto de estudo de diversos pesquisadores nas últimas décadas, principalmente, em razão das características únicas que apresentam no que tange a sua biologia celular e molecular quando comparado a maior parte dos organismos eucariotos, como a sua regulação gênica, baseada em modificações pós-transcricionais, envolvendo o processamento, estabilidade e degradação de mRNAs, com a participação de diversas proteínas no controle da expressão gênica (CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

A iniciação da tradução é uma importante etapa da expressão gênica, devido a grande quantidade de proteínas que atuam em conjunto para permitir o recrutamento dos ribossomos, o reconhecimento dos mRNAs e sua tradução, como os componentes do complexo heterotrimérico eIF4F (eIF4A, eIF4G e eIF4E) (DE MELO NETO et al., 2016). Em tripanossomatídeos, múltiplos homólogos das proteínas do complexo de iniciação eIF4F foram identificados associados ao processo de regulação da tradução de diversos mRNAs. Alguns, porém, não aparentam estar diretamente associados, como é o caso do homólogo EIF4E2, visto que até o momento, não se demonstrou capaz de se ligar aos homólogos de eIF4G envolvidos na iniciação da tradução (MOURA et al., 2015). O EIF4E2 é um dos homólogos menos conhecidos de eIF4E, mas em pesquisas recentes foi identificado sua co-precipitação com um dos homólogos da SLBP (*Stem Loop Binding Protein*), a SLBP2, proteína que em mamíferos é responsável pela regulação de mRNAs de histonas, forte indício de que essa interação esteja associada ao metabolismo de mRNAs (FREIRE et al., 2017).

Este trabalho teve como objetivo contribuir para a caracterização funcional das proteínas SLBP1, SLBP2 e EIF4E2 de *Trypanosoma brucei*, através da avaliação do perfil de expressão das SLBPs de forma nativa e fusionadas a epítopos de reconhecimento em células procíclicas de *T. brucei*, e da identificação do perfil de

possíveis proteínas parceiras que co-precipitam com as proteínas de interesse por espectrometria de massas.

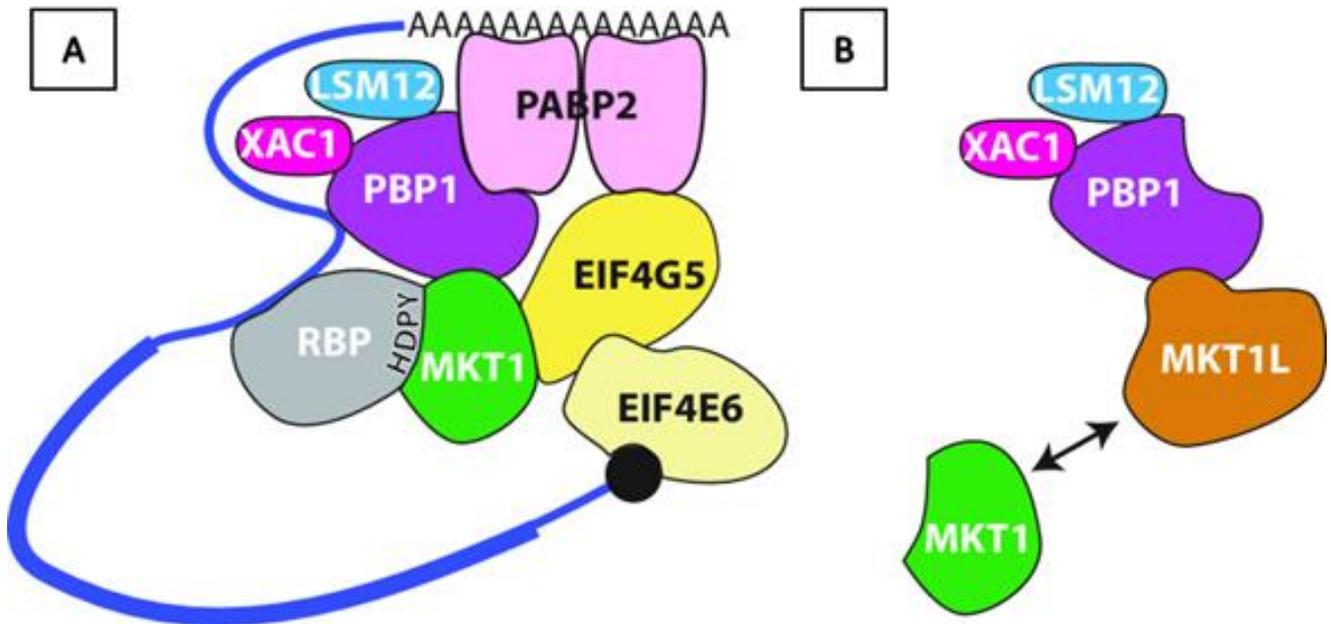
Através de ensaios de *western blot*, foi possível observar a expressão diferencial das proteínas EIF4E2 e SLBP2 ao longo da curva de crescimento, iniciando sua expressão na fase *lag* alcançando seu pico em torno de 48h após o repasse inicial e reduzindo drasticamente à medida que as células começam a morrer na fase estacionária e de morte celular. A SLBP1, por sua vez, se manteve expressa de forma constante durante toda a curva. Em trabalhos anteriores de análise de transcriptoma total de mRNAs em *Trypanosoma brucei*, foi verificado que os níveis máximos de mRNA de SLBP2 e EIF4E2 ocorrem durante a fase G1 do ciclo celular, seguido por uma diminuição significativa durante a fase S (ARCHER et al., 2011). Isso reforça a ideia da possível ação da SLBP2 como repressor da tradução de mRNAs impedindo a sua ligação com a SLBP1 como demonstrado em estudos em células embrionárias de anfíbios do gênero *Xenopus* (THELIE et al., 2012).

Com o intuito de quantificar a expressão das SLBPs, foram utilizados soros policlonais produzidos previamente (COELHO, 2018) em conjunto com a expressão das proteínas recombinantes quantificadas através de análise de variação da média de intensidade das bandas em comparação com a curva de BSA com concentrações conhecidas usando o programa *ImageJ*. As proteínas recombinantes de SLBP1 e SLBP2 foram expressas e testadas com os soros policlonais que apresentaram alta sensibilidade sendo capazes de reconhecer tanto as proteínas recombinantes como a proteína nos extratos celulares, identificando as variações de expressão de SLBP2 e a expressão constitutiva de SLBP1. Os níveis intracelulares das proteínas demonstraram que a SLBP1 é expressa cerca de 10-15 vezes mais que a SLBP2, se analisados os picos de expressão de ambas proteínas e a quantidade de moléculas por célula. Ensaios de imunofluorescência indireta já demonstraram que ambas as proteínas são encontradas predominantemente no citoplasma diferentemente da SLBP de metazoários, predominantemente nuclear (FREIRE et al., 2018).

Os primeiros resultados de espectrometria foram realizados através da imunoprecipitação das SLBPs fusionadas ao *tag* PTP, porém esses resultados se mostraram inconclusivos, pois as proteínas de interesse não foram identificadas na análise de proteínas co-precipitadas. Erros na realização das reações de imunoprecipitação, baixo nível de proteínas precipitadas devido ao limite de reconhecimento do *tag* PTP, degradação da proteína pós imunoprecipitação, foram possíveis motivos analisados para o não reconhecimento das proteínas alvo na espectrometria de massas. Dessa forma, foi proposto repetição das reações de imunoprecipitação, entretanto, com a mudança da molécula de reconhecimento atual, como *tag* PTP sendo substituído por um epítipo derivado da proteína hemaglutinina de influenza, o *tag* HA.

Foi observado a presença de todas as proteínas do complexo MKT1 (MKT1, PBP1, XAC1, LSM12 e MKT1L) co-precipitando de forma específica com a SLBP1. O complexo MKT1 foi caracterizada por interagir com algumas proteínas de ligação ao mRNA, demonstrando alguma participação no metabolismo de mRNAs (Singh et al., 2014; FALK et al., 2022). Foi identificado que o complexo MKT1 é capaz de se associar ao complexo EIF4E6/EIF4G5 e em conjunto com as PABPs estimulam a tradução e a estabilidade dos mRNAs, entretanto, neste caso, apenas os fatores EIF4E3, G3 e EIF3G foram identificados co-precipitando com as proteínas do complexo MKT-1 (NASCIMENTO et al., 2020). Dessa forma a SLBP1 parece ter alguma função de estimular a tradução mediada por sua participação com o complexo MKT1. Algumas proteínas de transporte foram encontradas precipitando principalmente com SLBP1, como a IFT52, IFT88 e a proteína SMP1-1 também encontrada co-precipitando com SLBP1 em trabalhos anteriores (FREIRE et al., 2018).

Figura 24 – Desenho esquemático da ação das proteínas do complexo MKT1 na iniciação da tradução



Legenda: Esquema demonstrando a interação das proteínas do complexo MKT1 com outros fatores na iniciação da tradução. Primeiramente, a RBP se liga ao mRNA permitindo que o MKT1 livre se ligue a ela através do sítio de interação HDPY, o MKT1 ligado a RBP favorece o desligamento do complexo heterotrimérico PBP1 (PBP1, XAC1 e LSM12) da MKT1L, permitindo que esse complexo se ligue ao MKT1 (B). Após a ligação do complexo MKT1 ao mRNA, outros fatores são recrutados como os fatores EIF4G5 interagindo com o MKT1 e EIF4E6 se ligando ao cap 5' do mRNA, e a PABP2 se ligando ao PBP1 e a cauda poli-A estabilizando o complexo e permitindo que o mRNA seja traduzido (A).

Fonte: Adaptado de NASCIMENTO et al., 2020.

Foram identificadas duas proteínas 14-3-3-I e II co-precipitando com ambas proteínas de forma abundante, principalmente a SLBP2. As proteínas 14-3-3 formam um dímero e estão envolvidas em diversas funções celulares atuando como moléculas chaperonas importantes para sinalização de sobrevivência celular de diversas espécies (INOUE et al., 2005). Estudos já demonstraram que as proteínas 14-3-3 são importantes reguladores de enzimas fosforiladas do metabolismo de

plantas, além de estarem associadas a via de sinalização da proteína quinase ativada por Ras/mitógeno (STE-20), em *Saccharomyces cerevisiae* e a fosfatase dependente do ciclo celular (cdc25) em *Schizosaccharomyces pombe* (BUNNEY et al., 2001; VAN et al., 2001). A presença das proteínas 14-3-3 é um indicativo de um possível mecanismo envolvendo processos de fosforilação das proteínas de interesse como demonstrado em estudos de 14-3-3 em *Trypanosoma brucei* (INOUE et al., 2015).

Foi observado a presença da proteína ribossomal S27a e da proteína de ligação a Ubiquitina da família PLAA, co-precipitando de forma abundante nos resultados de espectrometria da SLBP2. A proteína ribossomal S27a é codificada pelo gene RPS27A, um dos 4 genes que codificam a Ubiquitina, neste caso, fusionado a proteína ribossomal S27a (ANDRÉ e HIDDE, 2005). Ubiquitinas são proteínas do complexo proteassoma responsáveis pela regulação do metabolismo de proteínas, envolvidos em processos de modificação pós-traducional e de regulação da estabilidade de proteínas, através de sinalização e degradação proteica (PAULA et al., 2017). A Ubiquitina S27a também foi identificada em menor abundância co-precipitando com a EIF4E2 e nos resultados de espectrometria de massas anteriormente realizados com a SLBP2 fusionada ao *tag* PTP, mas não foram encontradas co-precipitando com a SLBP1. A associação das Ubiquitinas com a SLBP2 e EIF4E2, pode sugerir que o metabolismo da SLBP2 pode ser regulado pelas modificações provocadas pela Ubiquitinas, como um possível sistema de regulação da degradação de SLBP2, permitindo a participação da SLBP1 na ativação da tradução através da associação com o complexo MKT1. A abundância dessas proteínas também pode ser uma possível explicação da não detecção da SLBP2 nos resultados de espectrometria de massas da própria SLBP2 e da EIF4E2, sugerindo que tenham sofrido alguma modificação pós-traducional e possível degradação da mesma devido a ubiquitinação dessas proteínas. Após a não detecção da SLBP2 a espectrometria de massas foi novamente realizada com as mesmas amostras enviadas, porém com algumas modificações visando detectar baixos níveis de proteínas, através principalmente do aumentando do FDR (False

Discovery Rate), que controla o limite de detecção para as proteínas menos abundantes e possíveis contaminantes. Após essa repetição a SLBP2 foi encontrada com baixíssima intensidade e com média de peptídeos, porém de forma específica apenas nas amostras de SLBP2 e EIF4E2, ausentes nas amostras controle. É importante salientar que os lisados foram realizados após 48h do repasse inicial, no pico de expressão da SLBP2, porém como observado nas curvas de crescimento tanto das proteínas nativas identificadas com soros policlonais, como das proteínas fusionadas ao *tag* HA, a expressão da SLBP2 cai drasticamente após 48h, sendo detectado em baixas quantidades em 72h e 96h, na fase estacionária e de morte celular, respectivamente. Essa queda drástica da expressão pode estar sendo regulada pela ação de Ubiquitinas, talvez com a realização de lisados antes de 48h a detecção da SLBP2 possa ser possível, demonstrando que as Ubiquitinas podem ser importantes para regulação dessa proteína. Mais estudos direcionados para esse objetivo parecem ser importantes para a caracterização funcional dessas proteínas.

Várias proteínas relacionadas ao metabolismo co-precipitaram com a EIF4E2 como fosfopiruvato hidratase, TCP-1-alfa, S-adenosil-L-homocisteína hidrolase, SGT, Metaloprotease M17 e CYP4, além de algumas proteínas de ligação ao mRNA como NRB1, DRBD4 e MRT4, além de uma helicase pertencente à família de proteínas DEAD-box, a DED1. As proteínas DEAD-box são proteínas com a função de RNA helicase e estão associados com diversos processos envolvendo o RNA, principalmente no que tange sua participação com a tradução (MOKDADI et al., 2021). Sua ação de ligação ao RNA e o desenrolamento da dupla fita na iniciação da tradução são ATP-dependentes, sendo regulados por pequenas moléculas com ação de fosforilação, como as ubiquitinas (LINDER et al., 2011). A EIF4E2 aparentemente não está associada diretamente com a tradução, participando indiretamente da regulação de mRNAs através do seu parceiro SLBP2. Acredita-se que os mRNAs de histonas sejam os principais alvos da SLBP1 e SLBP2, uma vez que são as únicas proteínas com domínio RBD das SLBPs (FREIRE et al., 2018).

Também foi encontrada, de forma curiosa, A EIF4E3 co-precipitando com ambas proteínas, é sabido que este homólogo de eIF4E, interage fortemente com a proteína EIF4G4 formando um dos complexos de regulação da tradução em tripanossomatídeos mais bem descritos, através de sua interação com a PABP2 e EIF4AI, sugerindo que não seja algo específico das proteínas alvo deste estudo (FREIRE et al., 2011; DHALIA et al., 2005).

Os resultados deste trabalho devem contribuir para a caracterização funcional da SLBP1, SLBP2 e EIF4E2, demonstrando a possível função da SLBP1 como ativador da tradução através da associação com o complexo MKT1, e um possível sistema de regulação pós-traducional de SLBP2 através da associação com proteínas do complexo Ubiquitina-Proteassoma, e sua associação com seu parceiro EIF4E2 atuando na regulação da expressão de mRNAs. As proteínas recombinantes purificadas e os soros policlonais testados e capazes de reconhecer as proteínas nos extratos celulares de *T. brucei* ao longo da curva de crescimento podem ser utilizados para dar continuidade a caracterização funcional dessas proteínas através de ensaios de interação proteica e outros experimentos. Novas pesquisas são necessárias com a utilização de novas abordagens e confirmação de possíveis hipóteses, através de ensaios de imunoprecipitação para verificação da população de mRNAs associados, ensaios de interação entre as proteínas e identificação dos seus sítios de ligação, entre outros experimentos, afim de elucidar a função dessas proteínas.

7 CONCLUSÃO

- As proteínas SLBP1 e SLBP2 de *Trypanosoma brucei* expressas, purificadas e quantificadas e os soros policlonais testados são ferramentas de estudo em possíveis novas abordagens visando a elucidação funcional dessas proteínas.
- A proteína SLBP1 foi expressa de forma constitutiva, enquanto a SLBP2 foi expressa de forma diferencial ao longo da curva de crescimento, seus níveis intracelulares foram quantificados através da comparação com as proteínas recombinantes, observando uma expressão da SLBP1 de 10-15 vezes mais abundante que a da SLBP2.
- Resultados de espectrometria demonstraram a associação do complexo MKT1 a SLBP1, sugerindo uma possível função de ativação da tradução.
- Resultados de espectrometria demonstraram a associação de proteínas do complexo Ubiquitina-Proteassoma a SLBP2, sugerindo um possível sistema de regulação pós-traducional envolvidas no metabolismo dessa proteína.
- Resultados de espectrometria de EIF4E2 não apresentaram um perfil de parceiros proteicos envolvidos diretamente na tradução.

REFERÊNCIAS

ANDRÉ, Catic e Hidde L. Ploegh. Ubiquitin – conserved protein or selfish gene? CellPress, v. 30, n. 11, p. 600-604, 2005.

ANDREAS K Lindner et al. New WHO guidelines for treatment of gambiense human African trypanosomiasis including fexinidazole: substantial changes for clinical practice. The Lancet Infectious Diseases, v.20, n. 2. p. 38-46,2020.

ANDREOU, Alexandra Z, and Dagmar Klostermeier. “The DEAD-box helicase eIF4A: paradigm or the odd one out?.” RNA biology, v. 10, n. 1, p. 19-32, 2013.

ARCHER, Stuart K. The Cell Cycle Regulated Transcriptome of Trypanosoma brucei. Plos One, United States of America, p. 18425-18425, 2011.

ASSIS, L. A. et al. Identification of novel proteins and mRNAs differentially bound to the Leishmania Poly(A) Binding Proteins reveals a direct association between PABP1, the RNA-binding protein RBP23 and mRNAs encoding ribosomal proteins. PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 15, p. 9899, 2021.

BONENFANT, D. et al. Characterization of Histone H2A and H2B Variants and Their Post-translational Modifications by Mass Spectrometry. Molecular & Cellular Proteomics v. 5 n. 3, p. 541–552, 2006.

BORDEN, Katherine LB. The eukaryotic translation initiation factor eIF4E wears a “cap” for many occasions. Translation, v. 4, n. 2, p. 1220899, 2016.
BRITANNICA, The Editors of Encyclopaedia. "tsetse fly". Encyclopedia Britannica, 16 nov. 2017, Disponível em: <https://www.britannica.com/animal/tsetse-fly>. Acesso em: 7 jun. 2022.

BRUN R, Blum J, Chappuis F, Burri C. Human African trypanosomiasis. Lancet, v. 375 n. 9709, p.148–159, 2010.

BUNNEY TD, van Walraven HS, de Boer AH. 14-3-3 protein is a regulator of the mitochondrial and chloroplast ATP synthase. Proc Natl Acad Sci, U S A, v. 98, n.7, p.4249-54, 2001.

BUSCHBECK, M.; HAKE, S. B. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. Nature Reviews Molecular Cell Biology, v. 18, n. 5, p. 299–314, 2017.

CHAPPUIS, F, Louis Loutan, Pere Simarro, Veerle Lejon, Philippe Büscher. Options for Field Diagnosis of Human African Trypanosomiasis. Clinical Microbiology Reviews, v.18, n. 1. p.133 – 146, 2005.

CHAPPUIS, F. Oral fexinidazole for human African trypanosomiasis. Lancet, v. 391 p. 100-102, 2018.

CHECCHI F, Filipe JA, Haydon DT, Chandramohan D, Chappuis F. Estimates of the duration of the early and late stage of gambiense sleeping sickness. BMC Infect Dis., v. 8 p 16, 2008.

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

COELHO, M. I. L. Produção de soro policlonal e avaliação da expressão de dois homólogos da proteína SLBP (Stem Loop Binding Protein) em *Trypanosoma brucei*. TCC, Bacharelado em Biomedicina. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

DA COSTA LIMA, TD. et al. Functional characterization of three *Leishmania* poly(a) binding protein homologues with distinct binding properties to RNA and protein partners. Eukaryotic Cell, v. 9, n. 10, p. 1484-1494, 2010.

DANIELS J., et al. Cell biology of the trypanosome genome. Microbiol. Mol. Biol. Rev., v. 74, n. 4, p. 552-569, 2010.

DE MELO NETO, Osvaldo P. et al. Unique and conserved features of the protein synthesis apparatus in parasitic trypanosomatid (*Trypanosoma* and *Leishmania*) species. In: *Evolution of the Protein Synthesis Machinery 90 and Its Regulation*. Springer, Cham. p. 435-475, 2016.

DHALIA, R. et al. Translation initiation in *Leishmania major*: characterisation of multiple eIF4F subunit homologues. Molecular and Biochemical Parasitology, v. 140, n. 1, p. 23–41, 2005.

DHALIA, Rafael et al. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. Nucleic acids research, v. 34, n. 9, p. 2495-2507, 2006.

DOMINSKI Z. e Marzluff,W.F. Formation of the 3' end of histone mRNA. Gene, v. 239, p. 1–14, 1999.

ERKMANN, J.A., et al., Nuclear import of the stem-loop binding protein and localization during the cell cycle. Mol Biol Cell, v. 16, n.6 p. 2960-71, 2005.

FALK F., Rafael M. P., Albina W. e Christine C. Roles and interactions of the specialized initiation factors EIF4E2, EIF4E5 and EIF4E6 in *Trypanosoma brucei*:

EIF4E2 maintains the abundances of S-phase mRNAs. Molecular Microbiology, v. 118, n. 4, p. 457-476, 2022.

FIELD, Mark C. et al. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. Nature Reviews Microbiology, v. 15, n. 4, p. 217, 2017.

FRANCO JR, Simarro PP, Diarra A, Jannin JG. Epidemiology of human African trypanosomiasis. Clin Epigenetics. v. 6, p. 257–75, 2014.

FRANCO, Jose R. et al. Epidemiology of human African trypanosomiasis. Clinical epidemiology, v. 6, p. 257, 2014.

FRANCO JR, Cecchi G, Priotto G, Paone M, Diarra A, Grout L, et al. Monitoring the elimination of human African trypanosomiasis: update to 2018. PLoS Negl Trop Dis., v. 14, n. 5, p.0008261, 2020.

FRANCO, Jose R.; Cecchi, Giuliano; Paone, Massimo; Diarra, Abdoulaye; Grout, Lise; Ebeja, Augustin Kadima; et al. Geographical distribution of human African trypanosomiasis, subregional maps. PLOS Neglected Tropical Diseases, v. 16, n. 1, p. 0010047, 2022.

FRASER, C. S. Quantitative studies of mRNA recruitment to the eukaryotic ribosome. Biochimie, v. 114, p.58-71, 2015.

FREIRE, E. et al. The four trypanosomatid eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. Mol Biochem Parasitol, v. 176, n. 1, p. 25-26, 2011.

FREIRE, E., et al. Trypanosoma brucei translation initiation factor homolog EIF4E6 forms tripartite cytosolic complex with EIF4G5 and a capping enzyme homolog. Eukaryotic Cell, v. 13, p. 896-908, 2014a.

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

FREIRE, E., et al. The roles of cytoplasmatic mRNA cap-binding protein complexes in *Trypanosoma brucei* and other trypanosomatids. Pathogens, v. 6, n. 4, p. 55, 2017.

FREIRE, E.R., Moura, D.M.N., Bezerra, M.J.R. et al. *Trypanosoma brucei* EIF4E2 cap-binding protein binds a homolog of the histone-mRNA stem-loop-binding protein. Curr. Genet., v. 64, p. 821–839, 2018.

G EPERON, M Balasegaram, J Potet, C Mowbray, O Valverde, F Chappuis. Treatment options for second-stage gambiense human African trypanosomiasis. Expert Rev Anti Infect Ther., v. 12 p. 1407-1417, 2014.

G PRIOTTO, S Kasparian, W Mutombo, et al. Nifurtimox–eflornithine combination therapy for second-stage African *Trypanosoma brucei* gambiense trypanosomiasis: a multicentre, randomised, phase III, non-inferiority trial. Lancet, v. 374 p. 56-64, 2009.

GAITHUMA, A.K., Yamagishi, J., Martinelli, A., Hayashida, K., Kawai, N., Marsela, M., Sugimoto, C. A single test approach for accurate and sensitive detection and taxonomic characterization of trypanosomes by comprehensive analysis of internal transcribed spacer 1 amplicons. PLoS Negl. Trop. Dis., v. 13, p. 1–20, 2019.

GRÉBAUT P, Bodo JM, Assona A, et al. Risk factors for human African trypanosomiasis in the Bipindi region of Cameroon. Med Trop (Mars), v. 61, n. (4–5) p. 377–383, 2001.

GRÉBAUT P, Bena JM, Manzambi EZ, et al. Characterization of sleeping sickness transmission sites in rural and periurban areas of Kinshasa (République Démocratique du Congo) Vector Borne Zoonotic Dis., v. 9 n. 6 p. 631–636, 2009.

GOODFELLOW, I.; ROBERTS, L. Eukaryotic initiation factor 4E. Int. J. Biochem. Cell Biol., Exeter, v. 40, p. 2675-2680, 2008.

HALL, N., Berriman, M., Lennard, N.J., Harris, B.R., Hertz-Fowler, C., Bart-Delabesse, E.N., et al. The DNA sequence of chromosome I of an African trypanosome: gene content, chromosome organisation, recombination and polymorphism. Nucleic Acids Res., v. 31, p. 4864– 4873, 2003.

HARSHMAN, S. W. et al. H1 histones: current perspectives and challenges. Nucleic Acids Research, v. 41, n. 21, p. 9593–9609, 2013.

HIDE G. History of sleeping sickness in East Africa. Clin Microbiol Rev., v.12 n.1 p.112–125, 1999.

HINNEBUSCH AG. The scanning mechanism of eukaryotic translation initiation. Annu Rev Biochem., v. 83 p.779–812, 2014.

INOUE M, Nakamura Y, Yasuda K, et al. The 14-3-3 proteins of *Trypanosoma brucei* function in motility, cytokinesis, and cell cycle. J Biol Chem., v.280 n. 14 p. 14085–14096, 2005.

INOUE M, Okamoto K, Uemura H, et al. Identification and characterization of a cell division-regulating kinase AKB1 (associated kinase of *Trypanosoma brucei* 14-3-3) through proteomics study of the Tb14-3-3 binding proteins. J Biochem, v.158 n.1 p. 49–60, 2015.

IVANOV, Alexandr et al. PABP enhances release factor recruitment and stop codon recognition during translation termination. Nucleic acids research, v. 44, n. 16, p. 7766-7776, 2016.

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

JACOBSON A. PolyA metabolism and translation: the closed loop model. In Hershey, J.W., Mathews, M.B. and Sonenberg, N. (eds), Translational Control. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 451–480, 1996.

JAEGER S, Eriani G, Martin F. Critical residues for RNA discrimination of the histone hairpin binding protein (HBP) investigated by the yeast three-hybrid system. FEBS Lett, v. 556, p. 265–270, 2004.

JAEGER S, Barends S, Giegé R et al. Expression of metazoan replication dependent histone genes. Biochimie, v. 87, p. 827–834, 2005.

KAUFER, A., Ellis, J., Stark, D. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. Parasites Vectors, v. 10, p. 287, 2017.

KEITH R. Matthews. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*, J Cell Sci, v. 118, n. 2, p. 283-290, 2005.

KHORASANIZADEH, S. The nucleosome: from genomic organization to genomic regulation. Cell, v. 116, p. 259–272, 2004.

KINUNG'HI SM, Malele II, Kibona SN, et al. Knowledge, attitudes and practices on tsetse and sleeping sickness among communities living in and around Serengeti National Park, Tanzania. Tanzan Health Res Bull, v.8 n.3, p. 168–172, 2006.

KOERNER T, De Raadt P, Maudlin I. The 1901 Uganda sleeping sickness epidemic revisited: a case of mistaken identity? Parasitol Today, v.11, n.8 p.303–306. 1995.

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

LINDER, P., Jankowsky, E. From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family. Nat Rev Mol Cell Biol., v. 12, p. 505–516, 2011.

MANDEL CR, Bai Y, Tong L. Protein factors in pre-mRNA 3'-end processing. Cell Mol Life Sci., v. 65, n. (7-8), p.1099-122, 2008.

MARINA V Rodnina, Wolfgang Wintermeyer. Recent mechanistic insights into eukaryotic ribosomes. Current Opinion in Cell Biology, v. 21, n. 3. p. 435-443, 2009.

MARZLUFF W.F. and Duronio,R.J. Histone mRNA expression: multiple levels of cell cycle regulation and important developmental consequences. Current Opinion in Cell Biol., v. 14, p. 692–699, 2002.

MARZLUFF WF, Wagner EJ, Duronio RJ. Metabolism and regulation of canonical histone mRNAs: life without a poly(A) tail. Nat Rev Genet., v. 9 n. 11 p. 843-54, 2008.
MARTÍNEZ-CALVILLO S, Vizuet-De-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, ManningCela RG and Figueroa-Angulo EE Gene expression in trypanosomatid parasites. J Biomed Biotechnol., v 5 n. 25 p. 241, 2010.

MATTHEWS, Keith R. The developmental cell biology of *Trypanosoma brucei*. Journal of cell science, v. 118, n. 2, p. 283-290, 2005.

MATTHEWS, Keith R. 25 years of African trypanosome research: From description to molecular dissection and new drug discovery. Molecular and biochemical parasitology, v. 200, n. 1-2, p. 30-40, 2015.

MCCALL, L.I. AND MCKERROW, J.H. Determinants of disease phenotype in trypanosomatid parasites. Trends Parasitol., v. 30 n. 7 p.342-9, 2014.

MCCULLOCH, R. Antigenic variation in African trypanosomes: monitoring progress. Trends Parasitol., v. 20 p. 117-121, 2004.

MICHAEL L. Whitfield, Handan Kaygun, Judith A. Erkmann, W. H. Davin Townley-Tilson, Zbigniew Dominski, William F. Marzluff, SLBP is associated with histone mRNA on polyribosomes as a component of the histone Mrnp. Nucleic Acids Research, v. 32, n. 16, P. 4833–4842, 2004.

MOKDADI, M.; Abdelkrim, Y.Z.; Banroques, J. et al. The In Silico Identification of Potential Members of the Ded1/DDX3 Subfamily of DEAD-Box RNA Helicases from the Protozoan Parasite *Leishmania infantum* and Their Analyses in Yeast. Genes, v. 12, p. 212, 2021.

MOURA, Danielle MN et al. Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. RNA biology, v. 12, n. 3, p. 305-319, 2015.

NASCIMENTO, L., Terrao, M., Marucha, K., Liu, B., Egler, F., Helbig, C., and Clayton, C. The RNA-associated proteins MKT1 and MKT1L form alternative PBP1-containing complexes in *Trypanosoma brucei*. The Journal of biological chemistry, v. 295: p. 10940-10955, 2020.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Accelerating work to overcome neglected tropical diseases: a roadmap for implementation. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2012.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis Report of a WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series 984*. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2013.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Ending the neglect to attain the Sustainable Development Goals A road map for neglected tropical diseases 2021–2030 Overview. Geneva, Switzerland: World Health Organization, 2021.

PALMER JJ, Surur EI, Goch GW et al. Syndromic algorithms for detection of gambiense human African trypanosomiasis in South Sudan. *PLoS Negl Trop Dis.*, v. 7, p. 2003. 2013

PAULA G. C.; Danielle G. P. S; João P. V. R. et al. Effect of ionizing radiation exposure on *Trypanosoma cruzi* ubiquitin-proteasome system. *Molecular and Biochemical Parasitology.*, v. 212, p. 55-67, 2017.

PESTOVA T. V., and Hellen C. U. Small molecule derails translation initiation. *Nat. Chem. Biol.*, v. 2, p. 176–177, 2006.

PICOZZI K, Fèvre EM., Odiit M, et al. Sleeping sickness in Uganda: a thin line between two fatal diseases. *BMJ*, v. 331 n. 7527, p.1238–1241, 2005.

PONTE-SUCRE A. An Overview of *Trypanosoma brucei* Infections: An Intense Host-Parasite Interaction. *Front Microbiol*, v. 7, p.2126, 2016.

PREUSSE, C.; Jaé, N.; Bindereif, A. mRNA splicing in trypanosomes. *International Journal of Medical Microbiology*, v. 302, n. 4–5, p. 221–224, 2012.

PRÉVÔT, D.; DARLIX, J.; OHLMANN, T. Conducting the initiation of protein synthesis: the role of eIF4G. *Biol. Cell*, Cambridge, v. 95, p. 141-156, 2003.

RHOADS, R. E. eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. *J. Biol. Chem.*, Baltimore, v. 284, p. 16711-16715, 2009.

ROBAYS J, Ebeja Kadima A, Lutumba P, et al. Human African trypanosomiasis amongst urban residents in Kinshasa: a case-control study. *Trop Med Int Health*, v. 9 n. 8, p.869–875, 2004.

SAHLAS DJ, MacLean JD, Janevski J, Detsky AS. Clinical problem-solving. Out of Africa. *N Engl J Med.*, v. 347, n.10, p. 749–753, 2002.

SIMARRO PP, Franco JR, Cecchi G, et al. Human African trypanosomiasis in non-endemic countries (2000–2010). *J Travel Med*, v. 19 n. 1, p. 44–53, 2012.

SIMARRO PP, Franco JR, Diarra A, Ruiz Postigo JA, Jannin J. Diversity of human African trypanosomiasis epidemiological settings requires fine-tuning control strategies to facilitate disease elimination. Res Rep Trop Med., v. 4, p.1–6, 2013.

SIMARRO PP, Cecchi G, Franco JR, Paone M, Diarra A, Priotto G, et al. Monitoring the progress towards the elimination of gambiense human African trypanosomiasis. PLoS Negl Trop Dis, v. 9, p. 3785, 2015.

SIMPSON AGB, Stevens JR, Lukeš J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol, v. 22 n. 4, p. 168-74, 2006.

SINGH, Aditi et al. Trypanosome MKT1 and the RNA-binding protein ZC3H11: interactions and potential roles in post-transcriptional regulatory networks. Nucleic acids research, v. 42, n. 7, p. 4652-4668, 2014.

SONENBERG, N. eIF4E, the mRNA cap-binding protein: from basic discovery to translational research. Biochem. Cell Biol., Ottawa, v. 86, p. 178-183, 2008.

SOTO, M., Quijada, L., Larreta, R., Iborra, S., Alonso, C., and Requena, J.M. Leishmania infantum possesses a complex family of histone H2A genes: structural characterization and analysis of expression. Parasitology, v. 127, p. 95– 105, 2003.

STUART K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gurtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. J Clin Invest, v. 118 p. 1301–10, 2008.

STEVENS J. Kinetoplastid phylogenetics, with special reference to the evolution of parasitic trypanosomes. Parasite, v. 15, n.3, p.226-232, 2008.

THELIE, A., et al., An oocyte-preferential histone mRNA stem-loop-binding protein like is expressed in several mammalian species. Mol Reprod Dev, v. 79, n. 6 p. 380-91, 2012.

VAN Hemert MJ, van Heusden GP, Steensma HY. Yeast 14-3-3 proteins. Yeast, v. 10 p. 889-95, 2001.

VON MOELLER, H. et al. Structural and biochemical studies of SLIP1-SLBP1 identify DBP5 and eIF3g as SLIP1-binding proteins. Nucleic Acids Research, v. 41, n.16, p. 7960-7971, 2013a.

VON MOELLER, H. et al. Structural and biochemical studies of SLIP1-SLBP1 identify DBP5 and eIF3g as SLIP1-binding proteins. Nucleic Acids Research, v. 41, n.16, p. 7960-7971, 2013b.

WAHLE, E. A novel poly(A)-binding protein acts as a specificity factor in the second phase of Messenger RNA polyadenylation. Cell, v. 66, n. 4, p. 759-68, 1991.

WANG Z.-F., Whitfield, M.L., Ingledue, T.I., Dominski, Z. and Marzluff, W.F. The protein which binds the 3' end of histone mRNA: a novel RNA-binding protein required for histone pre-mRNA processing. Genes Dev, v.10, p.3028–3040, 1996.

WHITFIELD M.L., Zheng, L.-X., Baldwin, A., Ohta, T., Hurt, M.M. and Marzluff, W.F. Stem-loop binding protein, the protein that binds the 3' end of histone mRNA, is cell cycle regulated by both translational and posttranslational mechanisms. Mol. Cell. Biol, v. 20, p. 4188–4198, 2000.

YÁNGÜEZ, E. and Nieto, A. So similar, yet so different: selective translation of capped and polyadenylated viral mRNAs in the influenza virus infected cell. Virus Res, v. 156 n.(1-2), p.1-12, 2011.

YOFFE, Yael et al. Binding specificities and potential roles of isoforms of eukaryotic initiation factor 4E in Leishmania. Eukaryotic cell, v. 5, n. 12, p. 1969-1979, 2006.

YOFFE, Yael et al. Evolutionary changes in the Leishmania eIF4F complex involve variations in the eIF4E–eIF4G interactions. Nucleic acids research, v. 37, n. 10, p. 3243-3253, 2009.

ZOLLER T, Fèvre EM, Welburn SC, Odiit M, Coleman PG. Analysis of risk factors for *T. brucei* rhodesiense sleeping sickness within villages in south-east Uganda. BMC Infect Dis, v. 8, p. 88, 2008.

ZHAO P, Liu Q, Miller WA, Goss DJ. Eukaryotic translation initiation factor 4G (eIF4G) coordinates interactions with eIF4A, eIF4B, and eIF4E in binding and translation of the barley yellow dwarf virus 3' cap-independent translation element (BTE). J Biol Chem, v. 292, n. 14, p.5921–5931, 2017.

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