

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde

Rafaela Mikaella Arruda Martins da Silva

Avaliação comparativa do perfil de expressão e de isoformas associadas a dois homólogos do fator de tradução eIF2 γ de *Leishmania infantum*

Recife
2021

Rafaela Mikaella Arruda Martins da Silva

Avaliação comparativa do perfil de expressão e de isoformas associadas a dois homólogos do fator de tradução eIF2 γ de *Leishmania infantum*

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

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadora: Dra. Maria José Ribeiro Bezerra

Recife

2021

Rafaela Mikaella Arruda Martins da Silva

Avaliação comparativa do perfil de expressão e de isoformas associadas a dois homólogos do fator de tradução eIF2 γ de *Leishmania infantum*

Aprovada em: 29/09/2021

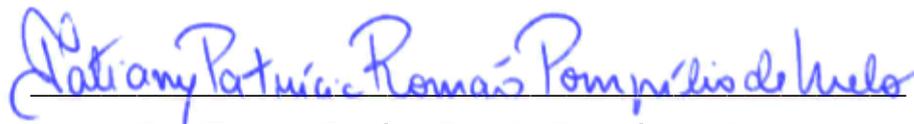
Dissertação apresentada ao Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde do Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

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

Dr. Nilmar Silvio Moretti

Escola Paulista de Medicina/Universidade Federal de São Paulo

Dedico este trabalho a todos os profissionais de saúde e cientistas que batalharam pela vida e pela ciência na pandemia da COVID-19.

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus que me deu força, sabedoria e paciência ao longo de todo o caminho até aqui.

Agradeço aos meus pais e minha irmã por todo amor, suporte, educação, cuidado e ao meu cunhado e todos os meus familiares por todo encorajamento. Em especial aos meus avós, tios e primos por sempre estarem na torcida por mim.

Agradeço ao meu orientador, Dr. Osvaldo Pompílio, pela paciência, apoio e orientação.

Agradeço à minha coorientadora, Dra. Maria Ribeiro, pela orientação, apoio e suporte.

Agradeço ao Dr. Gustavo Lima, pela amizade, paciência, suporte desde o início do TCC com o eIF2 γ e por todos os aprendizados práticos de biologia molecular.

Agradeço à minha amiga, Dra. Crhis Vasconcelos, por todo apoio, paciência, ajuda com as modelagens, suporte emocional nos momentos difíceis e por caminhar comigo na pesquisa e na vida.

Agradeço às minhas amigas de infância, Ana Laura Lima, Nathália Melo e Monicky Lauriano por todo o suporte, incentivo e torcida desde sempre.

Agradeço aos meus amigos Rafael Bastos, Grasielle Braga, Janderson Lopes, Felipe Matos e Crhis Vasconcelos pelas conversas e distrações durante a pandemia.

Agradeço a todo o departamento de Microbiologia em especial: Carol Pereira, a melhor e mais prestativa secretária; aos técnicos Cláudio, Bruna e Matheus; ao chefe de departamento Christian Reis; aos todos os alunos que deram suporte, em especial Igor Rocha pelo auxílio.

Agradeço a todo grupo BioMolTrip por todo auxílio e suporte dentro do laboratório, em especial: Adalúcia, Adriana Neuman, Allana, Amanda Lopes, Amanda Soares, Camila, Dani Moura, Deyvisson, Guilherme Alburqueque, Guilherme Barbosa, Hemilly, Ludmilla, Karwhory, Maressa, Mayara Sabino, Renata, Romero, Sávio, Stephanny, Wagner, Yallen, Tallyta, Moezio, Irassandra, Thaíse.

Agradeço a toda minha turma de Biociências de 2019.1 por dividir choros e risadas, conversas de almoço, por debater ciência de forma divertida e por me socorrer em momentos difíceis. Em especial, Sarah Lacerda, Laryssa Katheleen,

Luísa Maria, Carol Targino, Marcus Villander, Renata Pessoa. E Katherine Aquino e Rodrigo Loy por todo auxílio nas áreas burocráticas.

Agradeço a todo corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia em ciência pela minha formação.

Agradeço à Secretaria Acadêmica pela resolução de todas as burocracias. Em especial Rivadelte Soares.

Agradeço também a Dra. Nilza, Leda Sellaro, Edilene e Tainá por sempre estarem na torcida por mim.

Agradeço à plataforma NPT, pelos serviços prestados com excelência. Em especial Viviane Carvalho.

Agradeço à comissão organizadora da SBBS de 2019 e 2020 por dividir experiências, risos e correrias. Em especial Gabriel, Aline, Ana Emília, Carol, Cícero, Cleo, Débora, Janderson, Kamila Kássia, Kamilla Gaudêncio, Larissa Krokovsky, Michelle, Romário, Rômulo, Thiago e Victor.

Agradeço à turma do vôlei e futsal do por dividir um tempo de lazer após dias cansativos de aulas e experimentos (pré-pandemia).

Agradeço à FACEPE pelo apoio financeiro.

Por fim, agradeço a todos que me ajudaram de alguma forma ou deram apoio para que esse trabalho fosse realizado.

“Cada descoberta nova da ciência é uma porta nova pela qual encontro mais uma vez Deus, o autor dela.”

(EINSTEIN).

SILVA, Rafaela Mikaella Arruda Martins da. **Avaliação comparativa do perfil de expressão e de isoformas associadas a dois homólogos do fator de tradução eIF2 γ de *Leishmania infantum***. 2021. Dissertação Biociência e Biotecnologia em Saúde – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

Os tripanosomatídeos são protozoários patogênicos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* que possuem mecanismos moleculares únicos associados à sua expressão gênica. Acredita-se que a etapa de iniciação da tradução seja um dos principais alvos de regulação da expressão gênica nestes parasitas. O fator eIF2 é responsável por mediar a associação do GTP e do tRNA ligado a Metionina inicial (Met-tRNA_i) com a subunidade menor ribossomal e é formado pelas subunidades α , β e γ , com o eIF2 γ constituindo o núcleo do complexo. Em *Leishmania*, a descoberta de dois homólogos de eIF2 γ (EIF2 γ -1 e EIF2 γ -2) ressalta a possibilidade de sua ação em eventos de regulação. Este trabalho teve início com análises de expressão usando soro policlonal dirigido a ambos os homólogos de eIF2 γ de *Leishmania* que foi capaz de reconhecer os dois homólogos quando superexpressos de forma ectópica, entretanto apenas o EIF2 γ -1 nativo foi reconhecido de forma clara e reprodutível. Em curvas de crescimento da forma promastigota de *L. infantum*, foram vistas duas isoformas para o EIF2 γ -1 durante crescimento exponencial, com diminuição da isoforma de maior tamanho a partir de 120h. Em curva de crescimento amastigota, o EIF2 γ -1 apresenta duas isoformas. Esse padrão se manteve inalterado em condições de estresse de temperatura, nutricional e oxidativo. Em nenhuma dessas condições se observou maior expressão do EIF2 γ -2 nativo, cuja abundância foi tentativamente estimada, com níveis de 10 a 30 vezes menores do que os do EIF2 γ -1. As isoformas observadas para o EIF2 γ -1 sugere alterações por modificações pós-traducionais. Para investigar e mapear possíveis sítios alvos dessas alterações foram realizados ensaios de mutagênese sítio dirigida no gene codificante do EIF2 γ -1 em motivos candidatos. Os genes mutantes foram clonados em vetor para expressão no parasita fusionado ao epítipo HA, seguido de transfecção em *L. infantum*. O impacto destas mutações foi avaliado e não afetaram o perfil de expressão das isoformas.

Palavras-chave: trypanosomatina; *Leishmania infantum*; fatores de iniciação em eucariotos; fator de iniciação 2 em eucariotos.

SILVA, Rafaela Mikaella Arruda Martins da. **Comparative evaluation of the expression profile and isoforms associated with two homologues of the *Leishmania infantum* eIF2 γ translation factor.** 2021. Dissertação Biociência e Biotecnologia em Saúde – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

ABSTRACT

Trypanosomatids are pathogenic protozoa of the genera *Leishmania* and *Trypanosoma* that have unique molecular mechanisms associated with their gene expression. It is believed that the translation initiation step is one of the main targets of gene expression regulation in these parasites. The eIF2 factor is responsible for mediating the association of GTP and initial Methionine-bound tRNA (Met-tRNA_i) with the smaller ribosomal subunit and is formed by α , β , and γ subunits, with eIF2 γ constituting the nucleus of the complex. In *Leishmania*, the discovery of two eIF2 γ homologues (EIF2 γ -1 and EIF2 γ -2) highlights the possibility of its action on regulatory events. This work started with expression analyzes using polyclonal serum directed to both homologues of *Leishmania* eIF2 γ which was able to recognize the two homologues when overexpressed ectopically, however, only native EIF2 γ -1 was recognized clearly and reproducibly. In growth curves of the promastigote form of *L. infantum*, two isoforms for EIF2 γ -1 were seen during exponential growth, with a decrease in the larger isoform after 120h. In an amastigote growth curve, EIF2 γ -1 has two isoforms. This pattern remained unchanged under conditions of temperature, nutritional and oxidative stress. In none of these conditions was observed greater expression of native EIF2 γ -2, whose abundance was tentatively estimated, with levels 10 to 30 times lower than those of EIF2 γ -1. The observed isoforms for EIF2 γ -1 suggest alterations due to post-translational modifications. To investigate and map possible target sites for these alterations, site-directed mutagenesis assays were performed on the EIF2 γ -1 encoding gene in candidate motifs. Mutant genes were cloned into a vector for expression in the parasite fused to the HA epitope, followed by transfection into *L. infantum*. The impact of these mutations was evaluated and did not affect the expression profile of the isoforms.

Key words: trypanosomatina; *Leishmania infantum*; eukaryotic initiation factors; eukaryotic initiation factor-2.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Diferentes formas de desenvolvimento de <i>Trypanosoma cruzi</i> por microscopia eletrônica de transmissão.....	19
Figura 2 - Organização das fitas de DNA do cinetoplasto em maxicírculos e minicírculos.....	19
Figura 3 - Representação esquemática dos estágios morfológicos dos tripanosomatídeos	21
Figura 4 - Classificação atualizada de espécies de <i>Leishmania</i>	23
Figura 5 - Endemicidade da leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral no mundo em 2018.....	24
Figura 6 - Formas clínicas de leishmaniose cutânea.....	26
Figura 7- Criança com hepatoesplenomegalia característica de LV.....	27
Figura 8 - Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i>	29
Figura 9 - Representação esquemática da maturação de mRNA por <i>trans-splicing</i> e poliadenilação.....	31
Figura 10 - Figura esquemática da tradução dependente de <i>cap</i>	34
Figura 11 - Modelo da via de iniciação da tradução eucariótica.....	36
Figura 12 - Representação do complexo eIF2 ligado ao Met-tRNA _i	38
Figura 13 - Subunidade eIF2 α	39
Figura 14 - Representação esquemática da fosforilação Ser51 na subunidade eIF2 α	40
Figura 15 - Subunidade eIF2 β	42
Figura 16 - Subunidade eIF2 γ	44
Figura 17 - Fator eIF2 e interações entre a subunidade γ com as subunidades α e β	44
Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos para mutagêneses.....	50
Figura 18 - Alinhamento para escolha de sítios de mutagênese.....	51
Figura 19 - Modelagem estrutural da proteína eIF2 γ	52
Figura 20 - Esquema de amplificação de DNA.....	53
Figura 21 - Representação esquemática das etapas de clonagem e subclonagem.....	54
Figura 22 - Análise da expressão dos homólogos de eIF2 γ de <i>L. infantum</i> após transfecção com genes fusionados ao epítipo HA.....	59

Figura 23. Curva de crescimento de <i>L. infantum</i> WT promastigota.	60
Figura 24 - Análise da expressão dos homólogos de eIF2 γ de <i>L. infantum</i> WT em curva de crescimento de sua forma promastigota.	60
Figura 25 - Curva de diluição de células promastigotas de <i>L. infantum</i> WT.	61
Figura 26 - Curva de crescimento de <i>L. infantum</i> WT amastigota.	62
Figura 27 - Análise da expressão dos homólogos de eIF2 γ de <i>L. infantum</i> WT em curva de crescimento de sua forma amastigota.	62
Figura 28 - Análise da expressão do eIF2 γ em condições de estresse de <i>L. infantum</i> WT.	64
Figura 29 - Amplificação dos fragmentos de mutagênese.	65
Figura 30 - Digestões com BamHI e HindIII das construções MUT1, MUT2, MUT3 e MUT4 no vetor pGEM®-T Easy.	66
Figura 31 - Confirmação das extrações plasmidiais em pSP-BT1-Y-Neo-alfa por digestão com BamHI e HindIII das mutações MUT1, MUT2, MUT3 e MUT4.	67
Figura 32 - Análise da expressão do eIF2 γ em extratos totais das células transfectadas.	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 40S** – Subunidade ribossômica menor
- 60S** – Subunidade ribossomal maior
- ATP** – Adenosina trifosfato
- AUG** – Códon de iniciação
- Ax** – Axonema
- B.O.D.** – *Biochemical Oxygen Demand*
- BB** – Corpo pró-basal
- Ca** – Cálcio
- cap** – 7-metilguanosina
- CK2** – Creatina quinase 2
- CT** – Complexo ternário
- D83** – Ácido aspártico 83
- DNA-PK** – Proteína quinase dependente de DNA
- E49** – Ácido glutâmico 49
- eIF2** – Fator de Iniciação Eucariótico 2
- eIFs** – Fatores de Iniciação da Tradução
- FP** – Bolso flagelar
- GAP** – *GTPase-Activating Protein*
- GCN2** – *General control non-depressible-2*
- GDP** – Guanosina difosfato
- GEF** – *Guanine nucleotide exchange factors*
- GPI** – Glicosilfosfatidilinositol
- GTP** – Guanosina trifosfato
- h1** – α -hélice N-terminal
- HAT** – *Human African Trypanosomiasis*
- HRI** – *Heme-regulated inhibitor*
- I82** – Isoleucina 82
- IRES** – *Internal ribosome entry site*
- K79** – Lisina 79
- kb** – Quilo bases
- kDa** – Quilo daltons

KDNA – DNA mitocondrial dos cinetoplastídeos
KSRP – *Kinetoplastid-specific ribosomal protein*
LC – Leishmaniose cutânea
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LD – Leishmaniose cutânea disseminada
LM – Leishmaniose mucocutânea
LV – Leishmaniose visceral
Mb – Megabase
Met-tRNAi – Metionil-tRNA iniciador
MFC – *Multifactor complex*
mRNA – RNA mensageiro
OMS – Organização Mundial de Saúde
PABP – Proteína de ligação à cauda poli-A
pb – Pares de base
PCR – *Polymerase chain reaction*
PERK– *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*
PFR – Haste paraflagelar
PIC – Complexo de pré-iniciação 43S
PKA – Proteína quinase A
PKC – Proteína quinase C
PKR – Proteína quinase ativada por RNA
R88 – Arginina 88
RE – Retículo endoplasmático
RFLP – *Restriction Fragment Length Polymorphism*
RNA – Ácido ribonucleico
RPM – Rotação por minuto
rRNA – RNA ribossômico
S51 – Serina 51
SFB – Soro Fetal Bovino
SL – *Spliced leader*
TcK2 – Proteína quinase eIF2 α de *Trypanosoma cruzi*
tRNA – RNA transportador

UTR – *Untranslated region*

WB – *Western blotting*

WT – *Wild type*

Y81 – *Tirosina 81*

ZBD – *Zinc-binding domain*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 OS TRIPANOSOMATÍDEOS	18
2.2 O GÊNERO <i>Leishmania</i>	21
2.3 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES	24
2.4 FORMAS CLÍNICAS E TRATAMENTOS DAS LEISHMANIOSES	25
2.5 CICLO DE VIDA DOS PARASITAS DO GÊNERO <i>Leishmania</i>	28
2.6 BIOLOGIA MOLECULAR DE <i>Leishmania</i>	30
2.7 SÍNTESE PROTEICA EM EUCARIOTOS	32
2.7.1 Início da tradução em eucariotos	33
2.8 O FATOR eIF2 DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO	37
2.8.1 eIF2α	38
2.8.2 eIF2β	41
2.8.3 eIF2γ	42
3 JUSTIFICATIVA	46
4 OBJETIVO GERAL	47
4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
5 MATERIAIS E MÉTODOS	48
5.1 CULTIVO CELULAR DE FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>L. infantum</i>	48
5.2 <i>WESTERN BLOTTING</i>	49
5.3 AMPLIFICAÇÃO DE DNA E MUTAGÊNESE	50
5.4 CLONAGEM, DIGESTÃO ENZIMÁTICA E EXTRAÇÃO PLASMIDIAL	54
5.5 SEQUENCIAMENTO	55
5.6 TRANSFEÇÃO DE <i>L. infantum</i>	55

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	57
7 RESULTADOS	58
7.1 PADRÃO DE EXPRESSÃO DE DIFERENTES ISOFORMAS DOS HOMÓLOGOS DE eIF2 γ	58
7.1.1 Promastigota.....	58
7.1.2 Amastigota	61
7.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS HOMÓLOGOS DE eIF2 γ EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM <i>L. infantum</i> WT NA FORMA PROMASTIGOTA	63
7.3 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE MUTAGÊNESE, CLONAGEM E SUBCLONAGEM.....	64
7.4 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING COM AS MUTAÇÕES OBTIDAS	67
8 DISCUSSÃO	69
9 CONCLUSÕES	73
REFERÊNCIAS	74

1 INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos são protozoários parasitas pertencentes a classe Kinetoplastida, caracterizados por apresentarem um único flagelo e morfologia celular característica e que varia de acordo com o hospedeiro. Os gêneros mais bem caracterizados são *Leishmania* e *Trypanosoma*, parte da família Trypanosomatidae e que incluem diversas espécies que causam doenças em seres humanos e em outros mamíferos. Em comparação com outros eucariotos, estes protozoários se destacam, por apresentarem mecanismos particulares da sua expressão gênica. Apresentam escassez de íntrons e transcrição policistrônica, com seus pré-mRNAs passando pelo processo de *trans-splicing* e poliadenilação para assim formar o RNA mensageiro (mRNA) maduro. Sua adaptação a diferentes condições ambientais se dá com um amplo controle da sua expressão gênica, porém não há controle específico do processo de transcrição, sendo sua regulação gênica mediada por mecanismos pós transcricionais que tem como alvo importante a tradução.

A tradução, o processo de síntese proteica, pode ser dividida em quatro etapas: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem de ribossomos. Sua regulação ocorre principalmente na etapa de iniciação, a mais complexa, permitindo assim um controle rápido e reversível da expressão gênica. Nessa etapa atuam diversas proteínas chamadas de Fatores de Iniciação da Tradução, os eIFs, (*Eukaryotic Initiation Factors*), que podem ser constituídos de uma ou várias subunidades. Dentre eles estão o eIF1, eIF2, eIF3, eIF5 e o eIF4F.

O eIF2 é um fator heterotrimérico, carreador de tRNA, composto pelas subunidades eIF2 α , eIF2 β e eIF2 γ . Dentro do complexo ternário de tradução, o papel do eIF2 é o de se ligar ao GTP e ao Met-tRNA_i e transferir o Met-tRNA_i para a subunidade ribossomal menor, assim permitindo o início da tradução. Ao fim da iniciação, o GTP ligado ao eIF2 é hidrolisado em GDP e o complexo eIF2-GDP é liberado do ribossomo como complexo inativo. O GDP deve ser trocado por GTP para que o complexo eIF2 possa participar de outra rodada de iniciação da tradução, papel este realizado pelo complexo eIF2B. É importante salientar que a atuação do complexo eIF2B sobre o eIF2 é alvo de inúmeros processos de controle da tradução que atuam através da fosforilação da subunidade eIF2 α de forma a inibir a tradução global em momentos específicos.

Levando em consideração o fato da regulação gênica dos tripanosomatídeos ser, em sua maioria, pós-transcricional, a função do eIF2 deve ser ainda mais relevante. Em *Leishmania* a descoberta de dois homólogos da sua subunidade eIF2 γ (EIF2 γ -1 e EIF2 γ -2) ressalta ainda mais a possibilidade de ação deste complexo em eventos de regulação. Em estudos anteriores que precederam esta proposta, foi obtido um soro policlonal capaz de reconhecer ambos os homólogos de eIF2 γ . Neste trabalho este soro foi utilizado em ensaios de *western blotting* em que foi visto um padrão de diferentes isoformas do eIF2 γ para o EIF2 γ -1, corroborando com a premissa deste ser alvo de modificações pós-traducionais, como a fosforilação, que possam estar associadas a mecanismos regulatórios relacionados à tradução. No eIF2 γ humano foi observada a presença de oito possíveis locais de fosforilação e que, a depender dos níveis de fosforilação, podem ser menos ou mais significativos biologicamente. Em continuidade o padrão de expressão do EIF2 γ -1 foi avaliado em curvas de crescimento, nas formas promastigota e amastigota do parasita, e em condições de estresse. Já o EIF2 γ -2 se mostrou bem menos abundante que o EIF2 γ -1 e de detecção difícil em todas as condições testadas. O papel de modificações pós-traducionais no EIF2 γ -1 também foi investigado, através de mutagêneses de sítios candidatos a alvos para estas modificações, avaliando a presença das isoformas identificadas nas proteínas mutadas e buscando definir melhor em que condições as isoformas associadas às modificações pós-traducionais estão presentes.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Os tripanosomatídeos, protozoários patogênicos, pertencem aos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* que possuem mecanismos moleculares únicos associados à sua expressão gênica.

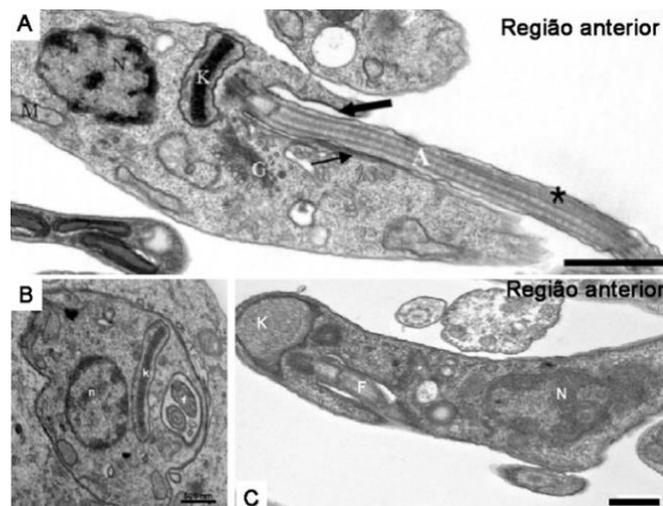
2.1 OS TRIPANOSOMATÍDEOS

Os tripanosomatídeos são protozoários parasitas flagelados unicelulares pertencentes à classe Kinetoplastida. A maioria desses organismos apresentam ciclo de vida monoxênico (possuem apenas um hospedeiro definitivo) restrito a hospedeiros invertebrados, como aqueles distribuídos entre os gêneros *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas* e *Leptomonas* (entre outros gêneros menores ou duvidosos) (LOPES, 2010; KAUFER *et al.*, 2017; MASLOV *et al.*, 2019). Há, entretanto, espécies heteroxênicas (com ciclo de vida se alternando entre dois hospedeiros) que são responsáveis por infectar animais (incluindo seres humanos) e plantas, representados pelos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania*, *Phytomonas*, entre outros. Estes dois primeiros são capazes de causar graves doenças em humanos: a Tripanossomíase africana humana (HAT) ou doença do sono, através da espécie *Trypanosoma brucei*; a Doença de Chagas, pelo *Trypanosoma cruzi*; e os diversos tipos de Leishmanioses, provocadas por aproximadamente 20 espécies de *Leishmania* (KAUFER *et al.*, 2017; LUKEŠ *et al.*, 2018; MASLOV *et al.*, 2019; STUART *et al.*, 2008).

Estudos com tripanosomatídeos mostram que, apesar de eucariotos, esses parasitas apresentam uma linhagem evolutiva altamente divergente comparados com os “sistemas modelos” comuns de mamíferos, plantas e fungos. Isso se reflete em características únicas em relação ao que foi descrito para os processos biológicos básicos eucarióticos, como por exemplo no mecanismo único de *trans-splicing* ligado ao processamento de seus mRNAs (LUKEŠ *et al.*, 2018; MASLOV *et al.*, 2019). Dentre as particularidades de sua morfologia os protozoários da classe Kinetoplastida possuem uma estrutura exclusiva denominada cinetoplasto que pode apresentar diferentes formas e consiste em uma região específica da mitocôndria onde está concentrado o DNA mitocondrial (kDNA). Na maioria dos tripanosomatídeos o cinetoplasto forma uma estrutura semelhante a disco; por outro lado, as formas

tripomastigotas de *T. cruzi* possuem um cinetoplasto mais arredondado (Figura 1). Existem dois tipos de DNA no cinetoplasto, minicírculos e maxicírculos (Figura 2), que juntos representam 30% do genoma total da célula e também podem servir como alvos para definições taxonômicas (CAVALCANTI; SOUZA, 2018; SOUZA; CARVALHO; BARRIAS, 2017; KAUFER; STARK; ELLIS, 2020).

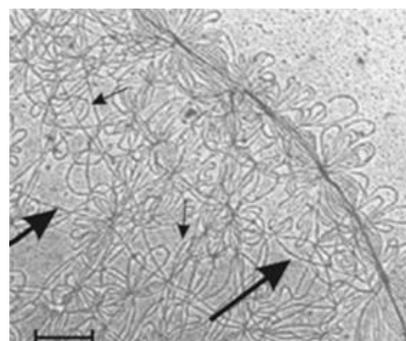
Figura 1 - Diferentes formas de desenvolvimento de *Trypanosoma cruzi* por microscopia eletrônica de transmissão



Fonte: Carvalho (2017).

Legenda: **A)** Forma epimastigota - Cinetoplasto (K) em formato de bastão localizado na região anterior lateral em relação ao núcleo (N); **B)** Forma amastigota - Cinetoplasto (K) em formato de bastão localizado na região anterior ao núcleo; **C)** Forma tripomastigota - apresenta o corpo fino, núcleo alongado e cinetoplasto (K) arredondado localizado na região posterior.

Figura 2 - Organização das fitas de DNA do cinetoplasto em maxicírculos e minicírculos.

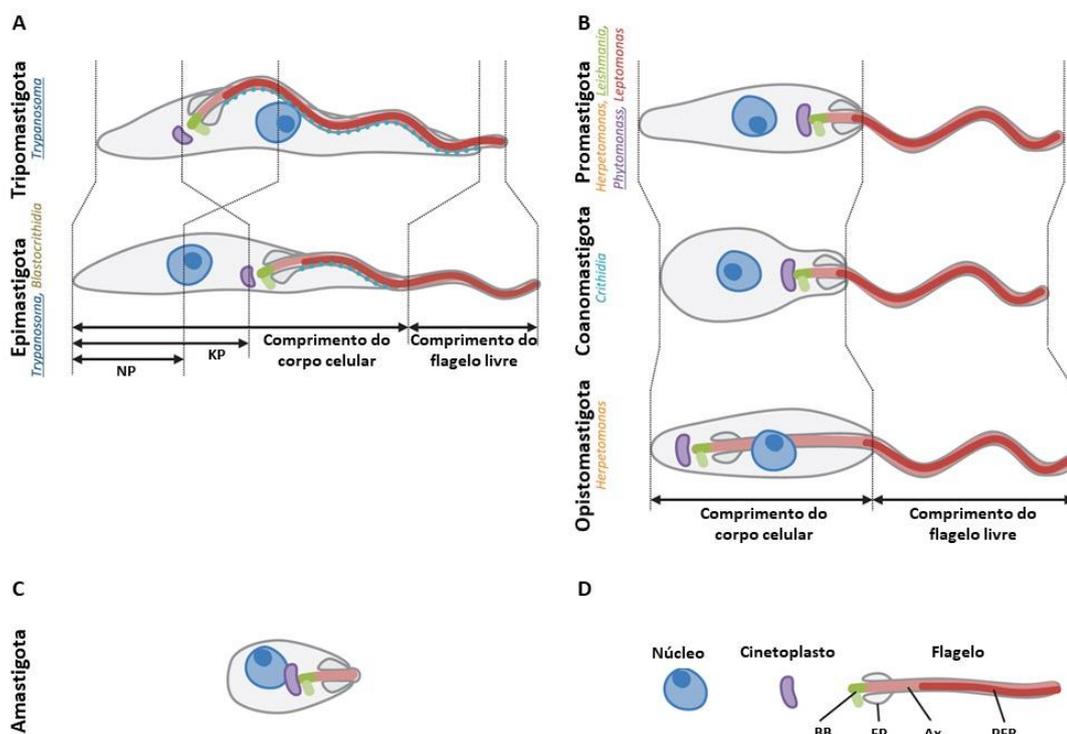


Fonte: Cavalcanti e Souza (2018).

Legenda: Setas indicam maxi e minicírculos. Barra: 0,3 μm .

Os tripanosomatídeos podem apresentar grande variação morfológica tanto entre os estágios do ciclo de vida quanto entre as espécies, apesar de terem uma similaridade ultraestrutural conservada. As principais formas evolutivas são tripomastigota, epimastigota, amastigota, opistomastigota, coanomastigota e promastigota (Figura 3), definidas pela posição e profundidade da bolsa flagelar, comprimento do flagelo e fixação lateral do flagelo ao corpo celular. A função das formas celulares não está totalmente elucidada, porém há exemplos que mostram que a morfologia correta é vital para sua patogenicidade e adaptação a diferentes ambientes de hospedeiros (KAUFER *et al.*, 2017; KAUFER; STARK; ELLIS, 2020; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2013). Diferentes espécies de tripanosomatídeos podem ser cultivadas *in vitro*. Em *Leishmania*, o estágio em que o protozoário se encontra no intestino dos hospedeiros invertebrados é a forma promastigota (H. LOPES, 2010; KAUFER *et al.*, 2017). Em macrófagos de vertebrados os parasitas se encontram na forma amastigota intracelular (KAZEMI, 2011).

Figura 3 - Representação esquemática dos estágios morfológicos dos tripanosomatídeos



Fonte: Modificado de Wheeler; Gluenz; Gull (2013).

Legenda: As seis principais morfologias dos tripanosomatídeos. Os gêneros em que cada morfologia ocorre estão indicados, os gêneros monofiléticos sublinhados. (A) Morfologias com flagelo anexado lateralmente ao corpo celular. (B) Morfologias com flagelo livre (sem fixação lateral do flagelo ao corpo celular). As métricas usadas para registrar a morfologia celular são indicadas (comprimento do corpo celular, comprimento do flagelo livre, distância cinetoplasto-posterior (KP) e distância núcleo-posterior (NP)). (C) Amastigota, que não possui flagelo longo e móvel. (D) Estruturas associadas ao flagelo: corpo pró-basal (BB), bolsa flagelar (FP), axonema (Ax) e haste paraflagelar (PFR).

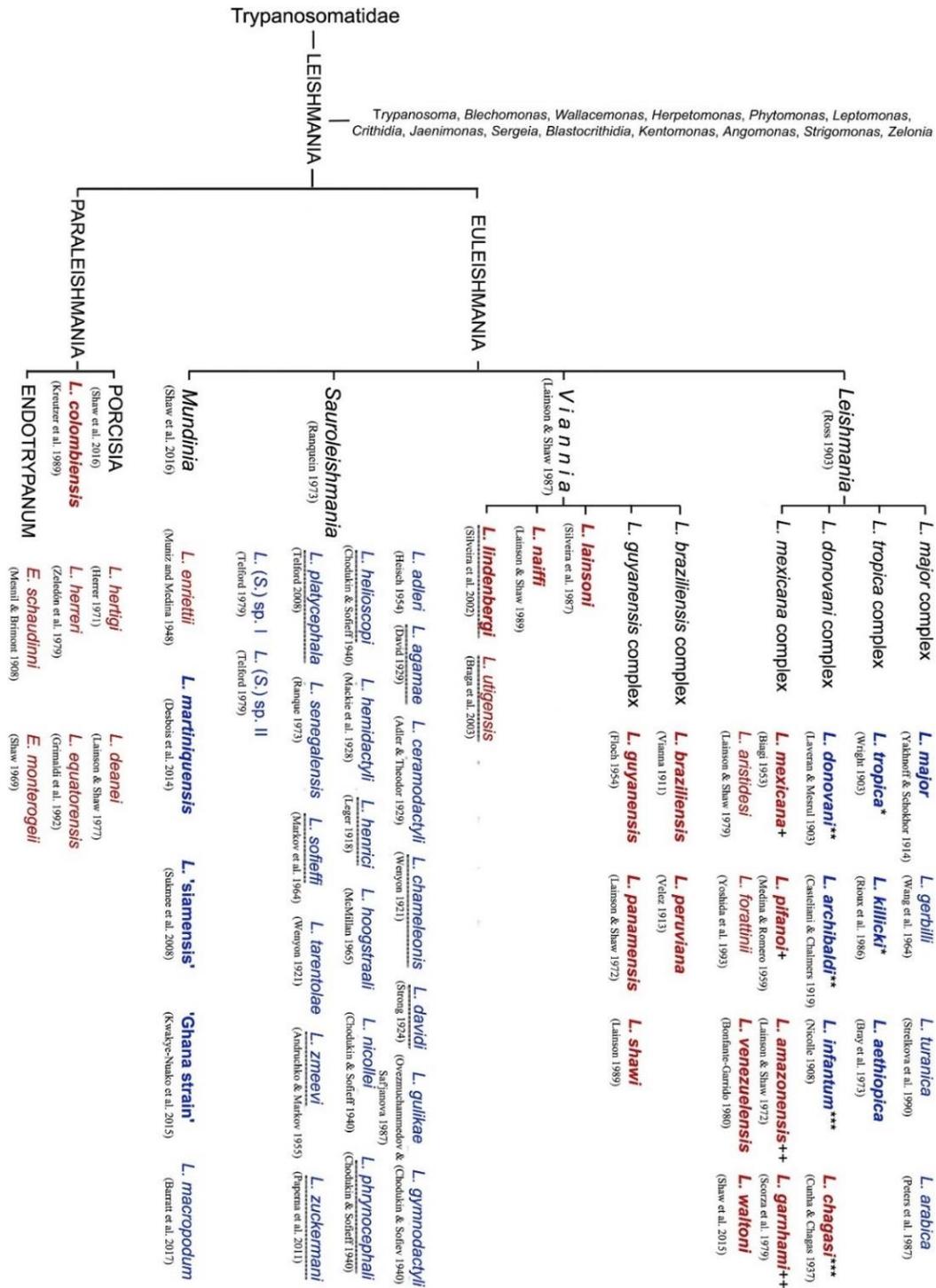
2.2 O GÊNERO *Leishmania*

O gênero *Leishmania* engloba protozoários causadores de leishmanioses, doenças que afetam humanos e animais, principalmente nas regiões dos trópicos e subtropicais (BATES, 2007). O progresso do diagnóstico das leishmanioses depende do desenvolvimento de métodos e biomarcadores adequados, que quanto mais sensíveis e eficazes mais facilmente permitirão se aprimorar os programas de controle de infecção por esse parasita. Para isso se faz necessário também uma classificação atualizada das espécies desse protozoário (RAMÍREZ *et al.*, 2016). O gênero *Leishmania* possui mais de 50 espécies (RAMÍREZ *et al.*, 2016) e é dividido em quatro

subgêneros: *Leishmania*, *Sauroleishmania*, *Viannia* e *Mundinia*. O último subgênero foi estabelecido recentemente e permanece pouco estudado, embora contenha espécies infectantes (BUTENKO *et al.*, 2019; KAUFER; STARK; ELLIS, 2020).

As espécies e subespécies de *Leishmania* estão agrupadas em complexos e estão sob constante revisão, porém a classificação (Figura 4) de múltiplas espécies ainda é difícil, mas extremamente necessária para fornecer o tratamento adequado aos pacientes infectados (RAMÍREZ *et al.*, 2016). Esse tratamento se baseia na classificação: a) Biológica: desenvolvimento nos vetores flebotomíneos, crescimento em meios de cultura e desenvolvimento em hospedeiros vertebrados; b) Bioquímica: padrões isoenzimáticos, sequenciamento de múltiplos *loci* (tipagem enzimática multilocus); c) Imunológica: análise parasitária com anticorpos monoclonais e d) Filogenética: tipagem de sequência multilocus e sequenciamento de DNA de loci único/múltiplo (RAMÍREZ *et al.*, 2016).

Atualmente a OMS sugere a técnica de MLEE (eletroforese de isoenzimas, do inglês *Multilocus Enzyme Electrophoresis*) como padrão-ouro para classificação e tipificação de *Leishmania*, porém, recentemente, o uso da PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase - polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição, do inglês *Restriction Fragment Length Polymorphism*) direcionada aos genes da proteína de choque térmico mostrou um potencial razoável para a tipagem de espécies (AKHOUNDI *et al.*, 2017; RAMÍREZ *et al.*, 2016), além de outras técnicas como as sorológicas (uso de anticorpos monoclonais) e técnicas de biologia molecular (detecção e sequenciamento de DNA) (AKHOUNDI *et al.*, 2017; DEAN *et al.*, 2015; RAMÍREZ *et al.*, 2016).

Figura 4 - Classificação atualizada de espécies de *Leishmania*.

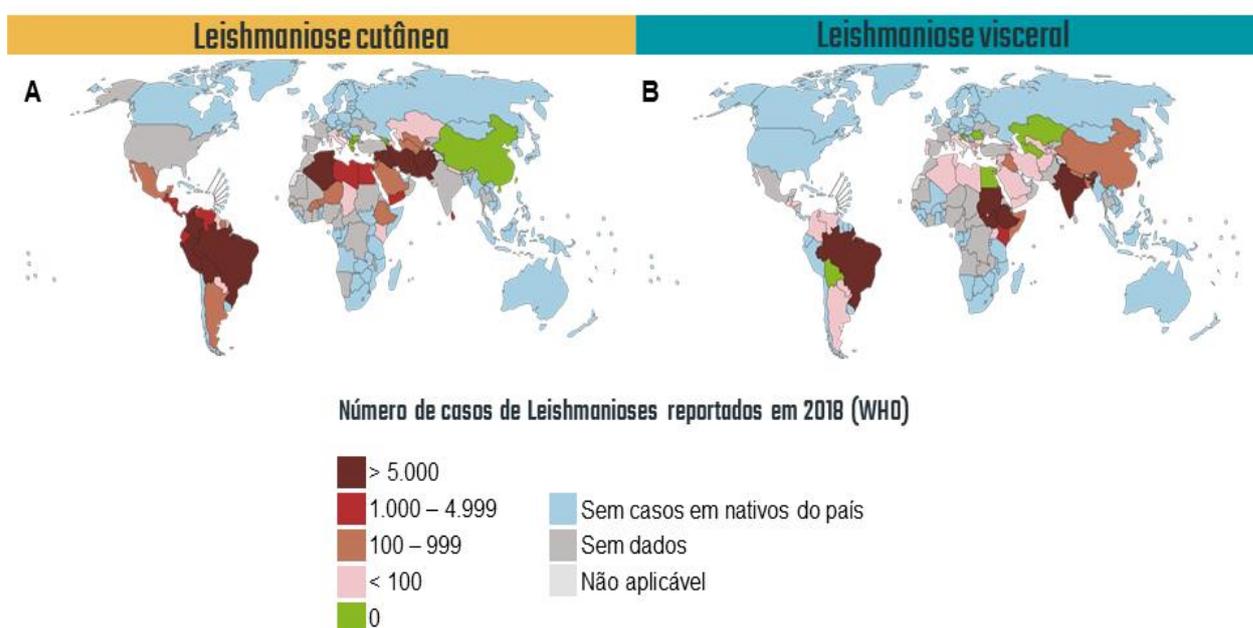
Fonte: Akhoundi et al. (2017).

Legenda: Os nomes de *Leishmania* entre aspas são nomes não oficiais sem descrições formais. As espécies patogênicas humanas estão escritas em negrito. As espécies do Velho e Novo Mundo são destacadas em azul e vermelho, respectivamente. * e +: Sinônimo - números diferentes de sinais de estrela (*) e mais (+) significam qual nome de espécie é o sinônimo para qual espécie original. Sublinhado - nenhuma classificação final. *L. siamensis* e *L. martiniquensis* foram encontradas também no Novo Mundo.

2.3 EPIDEMIOLOGIA DAS LEISHMANIOSES

O gênero *Leishmania* pode ser encontrado em 98 países onde são estimados cerca de 1 milhão de casos anuais para leishmaniose cutânea e 300 mil para leishmaniose visceral, com aproximadamente 20 mil mortes por ano (Figura 5) (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE, 2020). Há diversas espécies de *Leishmania* que causam variados tipos de leishmaniose e são responsáveis por um grande impacto para a saúde pública. (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; DE VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015; STEVERDING, 2017).

Figura 5 - Endemicidade da leishmaniose cutânea e leishmaniose visceral no mundo em 2018.



Fonte: Adaptado da Organização Mundial de Saúde (2020).

Legenda: Situação endêmica das leishmanioses em todo mundo em 2018. A figura A mostra o número total de casos anuais notificados para leishmaniose cutânea (LC). A imagem B mostra o número total de casos anuais notificados para leishmaniose visceral (LV).

Existem cerca de 53 espécies de *Leishmania* descritas em diferentes regiões do mundo podendo ser classificadas em dois grupos principais: espécies do Velho Mundo, que ocorrem na Europa, África e Ásia; e espécies do Novo Mundo, que ocorrem nas Américas. Cerca de 31 espécies são conhecidas por serem parasitas de

mamíferos e 20 espécies são patogênicas para seres humanos (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; STEVERDING, 2017).

A infecção causada por diversas espécies de *Leishmania* pode ser encontrada em todos os continentes e é endêmica em 49% dos países (DOUGALL *et al.*, 2009; RUIZ-POSTIGO; GROUT; JAIN, 2020; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017; WHO, 2010). A distribuição global de cada uma das espécies de *Leishmania* determina o tipo de doença que ocorre em uma área. Por exemplo, *L. donovani* causa leishmaniose visceral no sul da Ásia e na África; enquanto *L. infantum* causa esta mesma doença no Mediterrâneo, Oriente Médio, América Latina e partes da Ásia (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; KAZEMI, 2011; STEVERDING, 2017; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

No Brasil sete espécies de *Leishmania* foram identificadas, sendo as principais: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Leishmania) infantum* (BRASIL, 2019). Em 2019, em todo o país foram registrados 15.484 casos de leishmaniose cutânea e mucosa e 2.529 casos de leishmaniose visceral, seguindo como o país com maior taxa de letalidade das américas (7,7%) para essa última forma clínica (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2020). Foram 16.063 casos confirmados de leishmaniose visceral na região Nordeste entre os anos de 2010 e 2017. Pernambuco representou 8,52% dos casos totais de acometidos no Brasil em 2017, tendo uma das taxas de letalidade mais altas do Nordeste (LUCENA; MEDEIROS, 2018).

2.4 FORMAS CLÍNICAS E TRATAMENTOS DAS LEISHMANIOSES

As leishmanioses estão, segundo a OMS, entre as sete doenças tropicais e subtropicais mais importantes, representando um grave problema de saúde pública, com seu amplo espectro de manifestações clínicas e com um desfecho potencialmente fatal (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; KAZEMI, 2011; STEVERDING, 2017; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017). Podem ser divididas em duas formas clínicas principais: leishmaniose tegumentar ou cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV) (STEVERDING, 2017).

Na LC os parasitas infectam macrófagos residentes na pele e amastigotas liberados infectam macrófagos vizinhos. Na LV as amastigotas liberadas são disseminadas pela corrente sanguínea e infectam células do fígado, baço, linfonodos etc. A LC pode ainda se apresentar em quatro formas diferentes: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea disseminada (LD), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LM) (Figura 6). A LCL apresenta lesões cutâneas e úlceras em partes expostas do corpo, enquanto a LCD apresenta múltiplos nódulos por todo corpo de progressão lenta e sem ulceração. Já a LD é a forma mais rara da doença, caracterizada pelo aparecimento de diversas lesões ulcerativas que podem se estender por diferentes áreas do corpo. A LM por sua vez engloba os casos em que a doença se espalha para as mucosas de nariz, boca e garganta, levando a destruição do septo nasal, lábios e palato. A LV é a forma mais grave das leishmanioses e sem tratamento é fatal em mais de 95% dos casos. Seus sintomas incluem febre irregular, perda de peso, hepatomegalia, esplenomegalia (podendo apresentar ambos, hepatoesplenomegalia) (Figura 7), pancitopenia e anemia (STEVERDING, 2017).

Figura 6 - Formas clínicas de leishmaniose cutânea.



Fonte: Modificado de Anversa *et al.* (2018).

Legenda: (A) Lesão única característica da leishmaniose cutânea localizada. (B) Setas indicam diferentes lesões na face do paciente, característica de leishmaniose cutânea disseminada. (C) Múltiplas lesões na face e no braço de uma criança, característica de leishmaniose cutânea difusa. (D) Representa lesão em mucosa nasal, típica de leishmaniose mucocutânea.

Figura 7 - Criança com hepatoesplenomegalia característica de LV.



Fonte: Bowles *et al.* (2015).

As espécies de *Leishmania* que causam a LC no Velho Mundo são as *Leishmania major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*, prevalentes na Bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio, no Chifre da África ou no subcontinente indiano. No Novo Mundo a LC é provocada pelas *Leishmania amazonensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania guyanensis*, endêmicas na América Central e do Sul (BURZA; CROFT; BOELAERT, 2018; VRIES; REEDIJK; SCHALLIG, 2015). No Brasil, as espécies mais presentes são: *Leishmania braziliensis* que pode causar leishmaniose cutânea e suas variações (LCL, LCD e LM); *Leishmania guyanensis*, causando LCL e LM; *Leishmania amazonensis*, ocasionando todas as formas de LC; e *Leishmania infantum* (ou *L. chagasi*) originando LV. Outras espécies causadoras de LCL também podem ser encontradas, porém são menos comuns, como por exemplo, *L. lainsoni*, *L. naiff*, *L. shawi* e *L. lindenbergi* (ANVERSA *et al.*, 2018).

A escolha do tratamento e o prognóstico para as leishmanioses vai variar de acordo com a espécie, porém a identificação da espécie por cultura e pelo exame isoenzimático é lenta e cansativa e novas ferramentas, como amplificação genômica pela reação da cadeia da polimerase, não estão amplamente disponíveis. Nesse cenário, os pacientes com leishmaniose são tratados frequentemente sem a identificação da espécie, a partir do contexto geográfico do paciente e epidemiologia da doença na região. Entretanto, existem espécies de *Leishmania* com diferentes cursos clínicos que são endêmicas concomitantemente, principalmente na América do Sul (MINODIER; PAROLA, 2007).

Os tratamentos disponíveis para as leishmanioses são baseados em quimioterápicos, como por exemplo os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, anfotericina B lipossomal, miltefosina, pentamidina, etc. No entanto, as drogas disponíveis possuem desvantagens como elevada toxicidade, alto custo e resistência ao tratamento desenvolvido pelos parasitas, o que leva a busca de novos agentes leishmanicidas (AKBARI; ORYAN; HATAM, 2017; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2017; MONZOTE, 2009; SUNDAR; SINGH, 2018).

2.5 CICLO DE VIDA DOS PARASITAS DO GÊNERO *Leishmania*

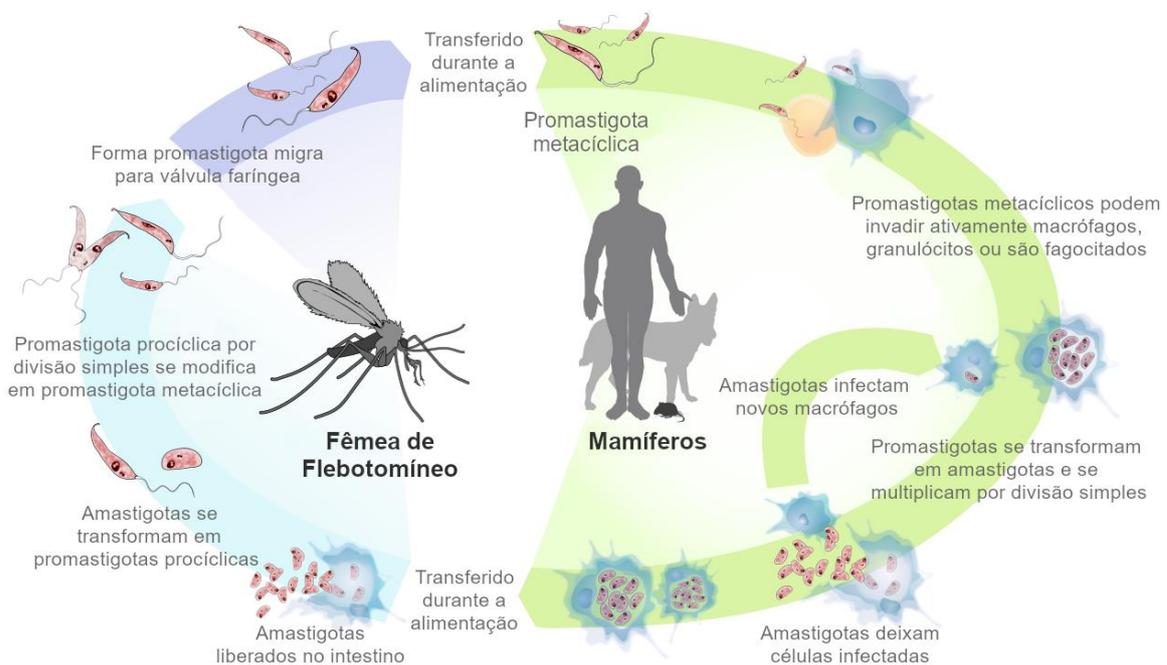
A maioria das espécies de *Leishmania* possui ciclo de vida heteroxênico (precisa de dois hospedeiros para completar seu ciclo). Esse parasita é transmitido para o hospedeiro vertebrado através de um vetor invertebrado, flebotomíneo, conhecido popularmente como mosquito-palha. (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2017; PINHEIRO *et al.*, 2014; STEVERDING, 2017). Existem mais de 600 espécies de flebotomíneos, porém os únicos vetores comprovados de leishmaniose humana são espécies e subespécies do gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; STEVERDING, 2017; TORRES-GUERRERO *et al.*, 2017).

O ciclo de vida de *Leishmania* spp. (Figura 8) se inicia quando o flebotomíneo fêmea injeta promastigotas infectantes em um mamífero suscetível durante o repasto sanguíneo. As formas promastigotas metacíclicas do parasita, que são rapidamente fagocitados por fagócitos residentes, se transformam em amastigotas e se dividem no vacúolo parasitóforo. O parasita pode infectar mais células fagocíticas no local da infecção cutânea ou em órgãos linfoides secundários (com eventual parasitemia), dependendo de fatores do hospedeiro e parasita. Os flebotomíneos são infectados pela aquisição de parasitas quando estes se alimentam do sangue de um hospedeiro mamífero infectado (com lesão cutânea ativa na LC ou com parasitemia na LV). Os parasitas se modificam para a forma promastigota no intestino médio dos flebotomos e se multiplicam em números altos dentro de quatro a 14 dias (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; ESCH; PETERSEN, 2013).

Em um segundo momento os parasitas promastigotas migram para as glândulas salivares e se transformam em promastigotas metacíclicos infecciosos.

Estes são inoculados na pele de um novo hospedeiro mamífero quando o flebotomíneo se alimenta de sangue, levando à transmissão da doença. É importante salientar que estes parasitas apresentam diferentes mecanismos de virulência que visam manter sua persistência nos fagócitos do hospedeiro para estabelecer uma infecção crônica de longo prazo. Assim, depois que um flebotomíneo faz o repasto sanguíneo no hospedeiro, quimioatratantes salivares promovem um influxo de neutrófilos e macrófagos para o local de alimentação. Os parasitas inibem a acidificação dos fagossomos, permitindo que eles sobrevivam nos neutrófilos. No momento da apoptose dos neutrófilos, os parasitas sobreviventes são fagocitados por macrófagos residentes e infiltrados (ALEMAYEHU; ALEMAYEHU, 2017; ESCH; PETERSEN, 2013).

Figura 8 - Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*.



Fonte: Anversa *et al.* (2018, tradução nossa).

Legenda: Os flebotomíneos injetam formas promastigotas metacíclicas em mamíferos suscetíveis durante a alimentação. As formas promastigotas metacíclicas são fagocitados pelos fagócitos residentes, transformam-se em amastigotas em estágio tecidual e se multiplicam dentro dessas células por meio de divisão simples. O parasita continua infectando células fagocitárias no local da infecção cutânea ou em órgãos linfoides secundários, com eventual parasitemia. Os flebotomíneos são infectados pela alimentação de um hospedeiro com uma lesão cutânea ativa na LC ou com parasitemia na LV. Os parasitas se convertem em promastigotas no intestino médio do flebotomíneo. As promastigotas migram do intestino médio e novamente se transformam em promastigotas metacíclicas altamente infecciosas.

2.6 BIOLOGIA MOLECULAR DE *Leishmania*

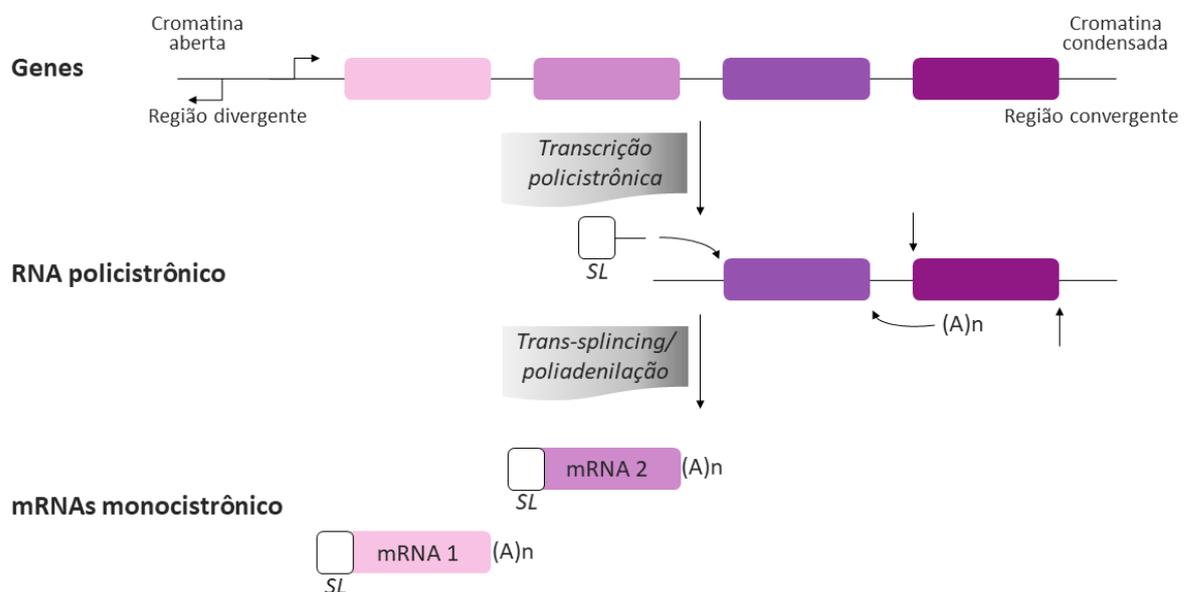
Espécies de *Leishmania* e outros tripanosomatídeos possuem genoma em geral diploide, porém podem apresentar aneuploidias que podem ser mecanismos de adaptação (MANNAERT *et al.*, 2012; REQUENA *et al.*, 1997). O tamanho dos genomas de *Leishmania* varia de 29 Mb (megabase) (*L. amazonensis*) a 33 Mb (*L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis*). O número de cromossomos também se diferencia de acordo com espécies: 34 em *L. amazonensis* e *L. mexicana*, 35 em *L. braziliensis* e 36 em *L. major*, *L. donovani* e *L. infantum*. (CANTACESSI *et al.*, 2015; KAZEMI, 2011; LLANES *et al.*, 2015). Os genomas de *Leishmania spp.* possuem aproximadamente 8.000 genes codificadores de proteínas (KAZEMI, 2011; LLANES *et al.*, 2015). As diferentes espécies de *Leishmania* possuem genomas semelhantes e grande conservação genética, embora apresentem alta variabilidade na patogenicidade e no tropismo tecidual (CANTACESSI *et al.*, 2015).

A divergência da maioria dos tripanosomatídeos ocorreu antes do surgimento de vetores e hospedeiros, logo, as propriedades moleculares únicas são comuns nessa família em comparação com outros eucariotos. Devido a diferenças na estrutura e composição, os cinetoplastídeos possuem uma maquinaria de tradução diferente de outras espécies eucarióticas. Por exemplo, sua subunidade ribossômica menor (40S) contém uma proteína ribossômica específica para cinetoplasto (KSRP) e segmentos de expansão de RNA ribossômico incomumente grandes (rRNA). Outro exemplo é a diferença estrutural significativa na subunidade ribossomal 40S, quando comparado com seus hospedeiros mamíferos. Essas características únicas podem desempenhar funções específicas na tradução, podendo também ser importantes alvos específicos para drogas inibitórias (BOCHLER *et al.*, 2020; QUERIDO *et al.*, 2017; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012).

Ao longo do seu ciclo de vida, a adaptação dos tripanosomatídeos é de extrema importância para se ajustar a diferentes ambientes hospedeiros e é alcançada através da modulação da sua expressão gênica (HAILE; PAPADOPOULOU, 2007; KAZEMI, 2011). Porém, como já mencionado, são eucariotos que possuem uma forma diferente de controlar sua expressão gênica, além de uma organização genômica única, com escassez de íntrons e cromossomos menores, resultando em um número maior de genes confinados a um espaço menor dentro do núcleo. Seus genes são organizados

em uma ou em ambas as fitas de DNA e são transcritos como transcritos policistrônicos (codificam mais de uma proteína) (KAZEMI, 2011). O mRNA policistrônico resultante é processado através do *trans-splicing* (na região 5') e poliadenilação (na região 3') (Figura 9). O *trans-splicing* é um processo que adiciona na região 5' uma sequência de 39 a 41 nucleotídeos, sequência esta derivada da clivagem de um pequeno RNA nuclear rico em resíduos de uridina denominado RNA *Spliced-Leader* (SL). Simultaneamente ocorre a poliadenilação que consiste em ligação de caudas poli(A) a uma molécula de RNA mensageiro. (KAZEMI, 2011; MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2017; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; MICHAELI, 2011).

Figura 9 - Representação esquemática da maturação de mRNA por *trans-splicing* e poliadenilação.



Fonte: Modificado de De Gaudenzi *et al.* (2011).

Legenda: O esquema representa o processo de maturação do mRNA por *trans-splicing* e poliadenilação em tripanosomatídeos. A transcrição inicia em regiões de cromatina aberta e termina em regiões de cromatina condensada. SL: RNA *Spliced-Leader*; (A)_n: Cauda poli(A).

A maioria dos processos regulatórios da expressão gênica nos tripanosomatídeos se dá no nível pós-transcricional, devido à natureza constitutiva da sua transcrição, à ausência de promotores definidos da RNA polimerase II e às unidades longas de transcrição policistrônica. A regulação gênica pode acontecer

então nos estágios de processamento, transporte, armazenamento, tradução e meia-vida do mRNA ou no nível pós-traducional (modificação e degradação de proteínas) ou até mesmo por mecanismos ainda não totalmente elucidados (CLAYTON, 2002, 2016). Logo, a tradução é uma etapa fundamental na regulação da expressão gênica dos tripanosomatídeos, principalmente na etapa de iniciação, onde atuam diversos fatores proteicos (CLAYTON, 2014; CLAYTON; SHAPIRA, 2007).

2.7 SÍNTESE PROTEICA EM EUCARIOTOS

A síntese proteica ou tradução compreende um conjunto complexo de reações bioquímicas que permitem que a célula gere uma resposta a sinais externos e internos por meio da produção de suas próprias proteínas. Esse processo é altamente coordenado e controlado por diversos elementos e macromoléculas. Tem por finalidade a produção correta e eficientemente de todas as proteínas de uma célula (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012). A tradução pode ser dividida em quatro etapas principais: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem dos ribossomos. É um processo regulado principalmente na etapa de iniciação, permitindo assim o controle rápido, reversível e espacial da expressão gênica e servindo como alvo para uma infinidade de atividades regulatórias (JACKSON; HELLEN; PESTOVA, 2010; MARINTCHEV; WAGNER, 2004; ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012).

A etapa de alongamento da tradução consiste na síntese da cadeia polipeptídica pelo ribossomo que se desloca ao longo do mRNA a partir do códon de início AUG até alcançar o códon de parada. Na terminação da tradução ocorre o reconhecimento de um códon de parada no mRNA, liberando o polipeptídeo nascente e dissociando complexos ribossômicos. Em eucariotos há apenas um fator de terminação de classe I, eRF1, que reconhece todos os três códons de parada (UAA, UAG ou UGA). O processo de reciclagem ocorre depois que a cadeia polipeptídica concluída é liberada. O mRNA e o sítio P do tRNA desacetilado permanecem associados aos ribossomos nos complexos pós-terminação, que devem ser reciclados liberando o mRNA e o tRNA desacetilado e dissociando as subunidades dos ribossomos. A reciclagem dos complexos pós-terminação em bactérias precisa do fator de alongamento EF-G e do fator de reciclagem de ribossomo RRF. Nos eucariotos não há a codificação de nenhum homólogo de RRF e seu mecanismo de

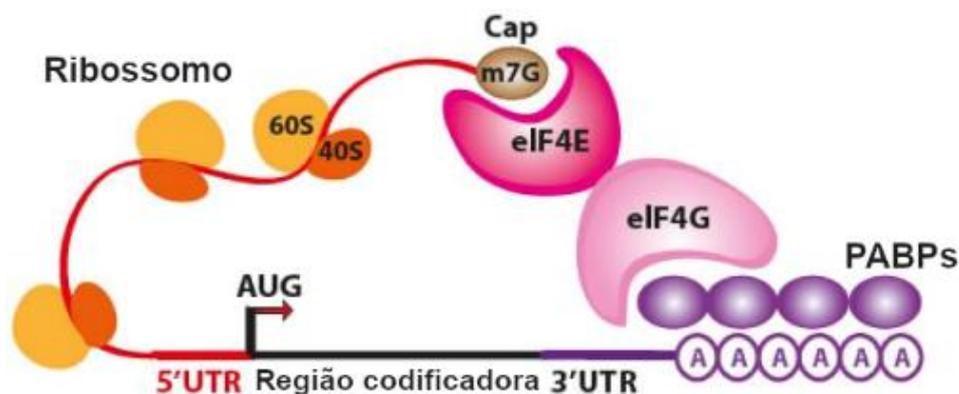
reciclagem ribossômica ainda é pouco conhecido (DEVER; GREEN, 2012; MARINTCHEV; WAGNER, 2004).

2.7.1 Início da tradução em eucariotos

A iniciação da tradução em eucariotos requer a ação de pelo menos 12 fatores de iniciação, chamados de eIFs (*eukaryotic Initiation Factors*) e é um importante ponto de controle na expressão gênica. Um melhor entendimento do mecanismo de iniciação da tradução é imprescindível para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para diversas doenças (ACKER; LORSCH, 2008; HINNEBUSCH; LORSCH, 2012).

A iniciação dependente de *cap* (Figura 10) se dá geralmente pelo reconhecimento da estrutura do *cap*, encontrada na extremidade 5' dos mRNAs, pelo fator eIF4F (HINNEBUSCH, 2014; HINNEBUSCH; LORSCH, 2012; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). O fator eIF4F é um complexo heterotrimérico composto das subunidades: eIF4E, proteína de ligação ao *cap*; eIF4A, uma RNA helicase; e eIF4G, a proteína que estrutura o complexo. Este complexo também interage com a proteína de ligação de poli-A (PABP), que reconhece a extremidade 3' terminal do mRNA, fazendo com que haja uma circularização transitória dos mRNAs a serem traduzidos (HINNEBUSCH, 2014; HINNEBUSCH; LORSCH, 2012; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009).

Figura 10 - Figura esquemática da tradução dependente de *cap*.



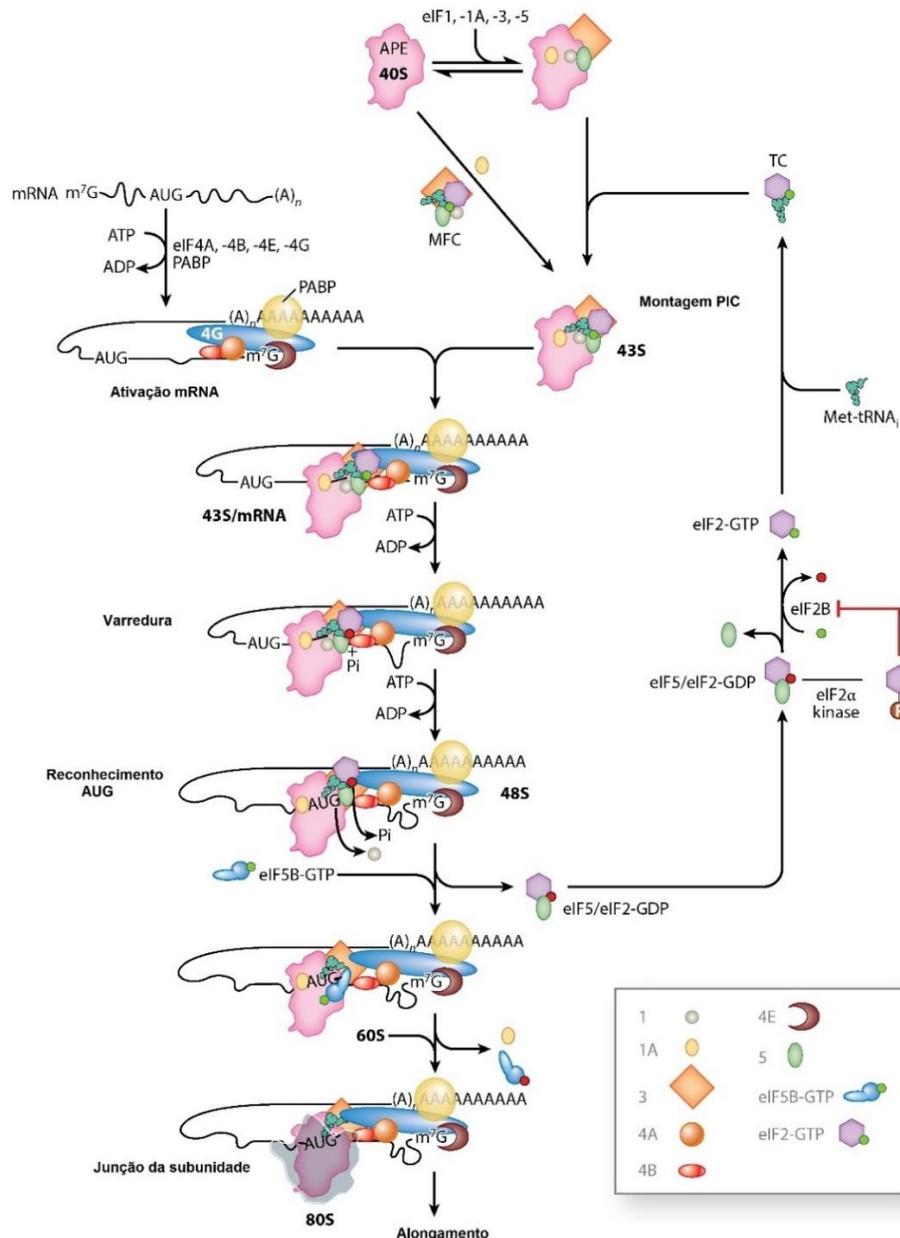
Fonte: Modificado de Sacco; Masotti (2013).

Legenda: O fator de iniciação eIF4E reconhece a extremidade 5' *cap* do mRNA e promove o recrutamento do eIF4G gerando o complexo de iniciação eIF4F. O ribossomo é recrutado na extremidade 5' do mRNA, e a tradução ocorre quando a varredura de 5' UTR é concluída e o códon AUG é atingido.

Concomitantemente com a ligação do complexo eIF4F ao mRNA, outra etapa preliminar da iniciação da tradução é a formação do complexo ternário, formado pelo metionil-tRNA iniciador (Met-tRNA_i) e eIF2 ligado a GTP. O complexo ternário se associa então com a subunidade ribossomal menor 40S para formar o complexo de pré-iniciação 43S (PIC), com o auxílio dos fatores eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5 (Figura 11) (ACKER; LORSCH, 2008; HINNEBUSCH, 2014; HINNEBUSCH; LORSCH, 2012; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). O PIC 43S se liga então ao mRNA, próximo ao *cap*, em um processo facilitado pelo eIF3, eIF4F, eIF4B, eIF4H (em mamíferos) e pela proteína de ligação ao poli-A (PABP). A iniciação da tradução depende então de um processo de busca realizado pela subunidade ribossomal 40S e fatores associados ao longo da região 5' não traduzida do mRNA (5'UTR), com o intuito de se identificar o códon (AUG) de iniciação da tradução. Esta busca é realizada no sentido 5'-3' usando a complementariedade do anticódon do Met-tRNA_i, em um processo de varredura que requer hidrólise de ATP (adenosina trifosfato). Para que isso ocorra é necessário a presença do eIF4A, com sua atividade helicase, eliminando estruturas secundárias do mRNA (em mamíferos essa função tem apoio dos eIF4B e eIF4H) (HASHEM; FRANK, 2018; HINNEBUSCH, 2014; HINNEBUSCH; LORSCH, 2012; KAPP; LORSCH, 2004).

O reconhecimento do códon de iniciação consiste no pareamento entre o anticódon do Met-tRNA_i e o códon AUG do mRNA dentro do sítio peptidil (sítio P) na subunidade 40S, formando o complexo de iniciação 48S. Ocorre então a hidrólise do GTP ligado ao eIF2, através da sua atividade GTPase que é estimulada pelo eIF5 (atividade GAP, do inglês, *GTPase-Activating Protein*), com a subsequente liberação de fosfato inorgânico (HASHEM; FRANK, 2018; HERNÁNDEZ *et al.*, 2012; HINNEBUSCH; LORSCH, 2012). A dissociação de eIF2 faz com que haja a exposição dos locais de ligação para eIF5B e a interação entre eIF5B e Met-tRNA_i permite que ambos adquiram conformações competentes para a ligação da subunidade ribossomal maior (60S). Por fim, a interação do eIF5B com o ribossomo promove a união com a subunidade 60S e, após a hidrólise de GTP no eIF5B, esse fator, juntamente com o eIF1A, se dissocia, tornando competente o alongamento do ribossomo (agora 80S). É importante salientar que o complexo eIF2-GDP que foi liberado será reciclado, havendo a troca de GDP por GTP através da atividade GEF (fator de troca de nucleotídeo guanosina) do complexo eIF2B (HASHEM; FRANK, 2018; HERNÁNDEZ *et al.*, 2012; HINNEBUSCH; LORSCH, 2012).

Figura 11 - Modelo da via de iniciação da tradução eucariótica.



Fonte: Hinnebusch (2014, tradução nossa).

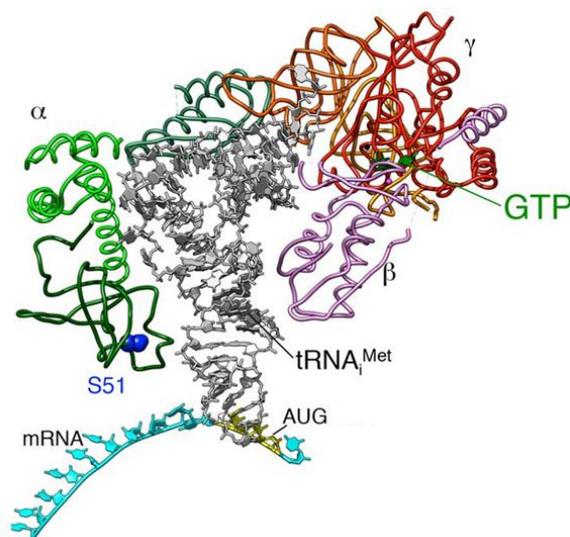
Legenda: A iniciação começa com a montagem do complexo de pré-iniciação 43S (PIC), em uma única etapa via complexo multifatorial (MFC) ou através de duas etapas distintas, nas quais os fatores de iniciação eucariótica (eIFs) eIF1, -1A, e -3 se ligam primeiro à subunidade 40S, seguidos pelo complexo ternário (CT) e eIF5. O PIC 43S é então carregado em um complexo de RNA-mensageiro ativado próximo ao *cap* 5'. A varredura subsequente do mRNA é acompanhada por hidrólise de GTP sem liberação de fosfato (Pi) do eIF2-GDP. O reconhecimento do códon de início desencadeia a dissociação de eIF1, liberação Pi do eIF2 e conversão para a conformação presa por varredura do PIC. O eIF5B em sua forma ligada a GTP promove a junção da subunidade 60S ao PIC, acompanhada pela liberação de eIF5B-GDP e eIF1A para formar o complexo de iniciação 80S, pronto para a fase de alongamento da síntese de proteínas. O eIF2-GDP, liberado após a junção da subunidade, é então reciclado de volta para eIF2-GTP pelo fator de troca eIF2B, reação impedida pela fosforilação de eIF2α. O GTP aparece como um círculo verde e o GDP como um círculo vermelha. Abreviações: Met-tRNA_i: RNA de transferência do iniciador de metionil; PABP: proteína de ligação de poli-A.

A ausência de nutrientes, exposição a diversos fatores ambientais e estresses causados por vírus podem ocasionar a inibição global da tradução dependente de *cap*. Porém, alguns mRNAs continuam a ser traduzidos de maneira alternativa, dependentes de uma iniciação da tradução diferente na qual o ribossomo se liga diretamente a uma região interna do mRNA, denominada de IRES (Sítio Interno de Entrada Ribossomal). A IRES não responde por todos os casos de tradução independente do *cap*, e outras vias menos compreendidas são provavelmente também usadas por células eucarióticas (CHRISTOPHER; SARNOW, 2001).

2.8 O FATOR eIF2 DE INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO

Em eucariotos, o fator de iniciação eucariótico eIF2 desempenha um papel importante no início da tradução, sendo uma GTPase heterotrimérica que entrega o Met-tRNA_i ao sítio P na pequena subunidade ribossomal durante a etapa de iniciação, um passo limitante da taxa de tradução. Esse complexo é formado por três subunidades: eIF2 α , eIF2 β e eIF2 γ (Figura 12). O eIF2 α é inserido no sítio E da subunidade ribossomal 40S durante o início da tradução, o eIF2 β faz parte da bolsa de ligação de nucleotídeos nos eucariotos e o eIF2 γ possui o local catalítico da atividade de GTPase e reconhece e liga ao Met-tRNA_i (GORDIYENKO; LLÁCER; RAMAKRISHNAN, 2019; ROLL-MECAK *et al.*, 2004; SCHMITT; NAVEAU; MECHULAM, 2010).

Figura 12 - Representação do complexo eIF2 ligado ao Met-tRNAi.



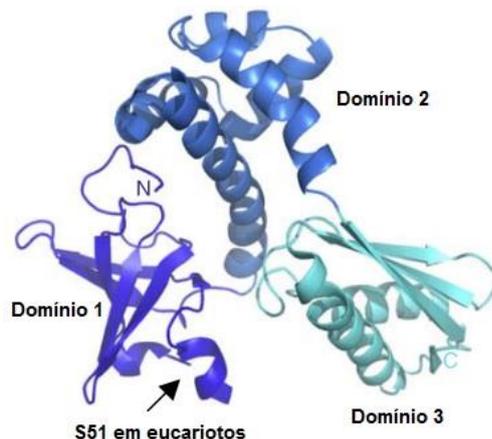
Fonte: Modificado de Dever; Kinzy; Pavitt (2016).

Legenda: Em verde encontra-se a subunidade α com seu resíduo de serina 51 em azul; em lilás, a subunidade β ; em vermelho, a subunidade γ ; em azul turquesa, mRNA com região amarela representando o códon AUG. Met-tRNAi encontra-se em cinza.

2.8.1 eIF2 α

A subunidade α do complexo eIF2 possui aproximadamente 36 kDa em mamíferos e contém três domínios, sendo os domínios 1 e 2 mais rígidos ligados ao terceiro domínio móvel (Figura 13). Nos eucariotos, essa subunidade possui um resíduo de serina (S51 em levedura e humano) localizado no domínio 1 e é alvo de várias quinases, sendo a fosforilação desse resíduo fundamental para o controle da tradução. Depois que ocorre a fosforilação do resíduo de serina, há um aumento da afinidade entre o eIF2 e eIF2B (ANDAYA *et al.*, 2011, 2014; AVILA *et al.*, 2016; SCHMITT; NAVEAU; MECHULAM, 2010; SUDHAKAR *et al.*, 2000). Esta maior afinidade impede que ocorra a reciclagem de GDP ligado ao eIF2, mediada pela atividade GEF exercida por eIF2B e assim o eIF2 é convertido de um substrato para um inibidor de fator de troca. Com o rápido esgotamento do *pool* de eIF2-GTP, geralmente a tradução é inibida. Isso ocorre em especial devido à baixa concentração intracelular de eIF2B, em comparação à do eIF2, o que torna a fosforilação de uma fração de eIF2 suficiente para inibição da síntese proteica (AVILA *et al.*, 2016; SCHMITT; NAVEAU; MECHULAM, 2010; SUDHAKAR *et al.*, 2000).

Figura 13 - Subunidade eIF2 α .

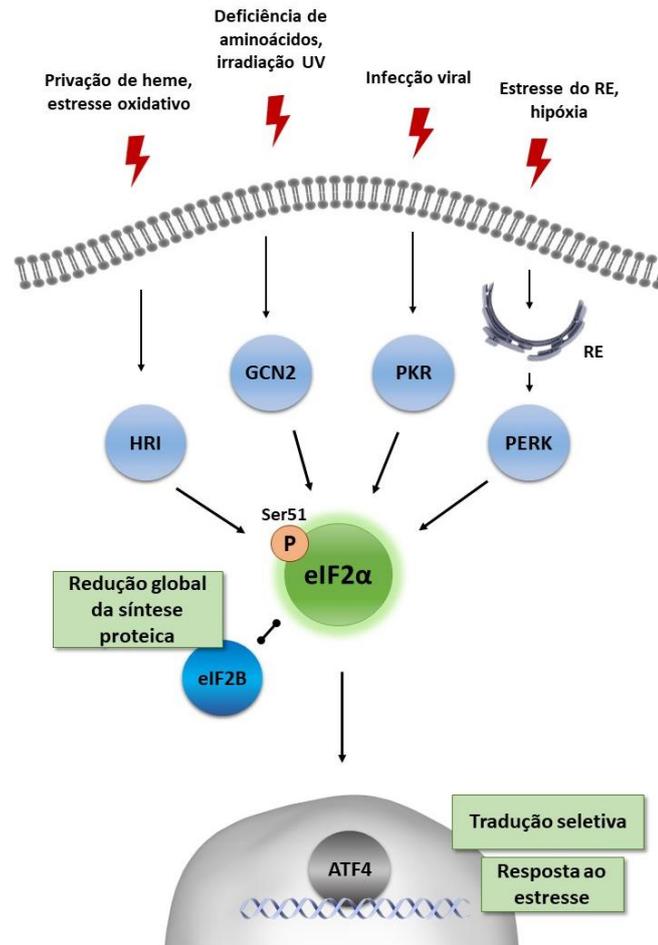


Fonte: Modificado de Schmitt; Naveau; Mechulam (2010).

Legenda: Domínio 1 em azul escuro, domínio 2 em marinho e domínio 3 em ciano. O resíduo S51 em eIF2 α é indicado pela seta.

Em condição de estresse ou inanição a fosforilação da S51 no eIF2 α de humanos é mediada por quatro quinases diferentes: a quinase inibidora heme-regulada, HRI (do inglês, *heme-regulated inhibitor*) ativada por privação de heme; a proteína quinase ativada por RNA, PKR (do inglês, *protein kinase RNA-activated*) produzida em células infectadas por vírus; a quinase do retículo endoplasmático (RE) semelhante à PKR, PERK (do inglês, *PKR-like endoplasmic reticulum kinase*); e a quinase de controle não passível de inibição-2, GCN2 (do inglês, *general control non-depressible-2*) ativada por inanição de aminoácidos (AVILA *et al.*, 2016; BURWICK; AKTAS, 2017; HOLCIK; SONENBERG, 2005; KRAMER, 2012). Outras condições adversas, por exemplo, estresse oxidativo ou inibição de proteassoma, também podem ativar diferentes quinases responsáveis pela modulação do eIF2, dependendo do contexto celular. No geral, a fosforilação de eIF2 reduz a tradução de forma global, como mencionado anteriormente. Porém, contraditoriamente, a tradução de alguns poucos mRNAs, específicos para adaptação ao estresse, é aumentada, como os que codificam os fatores de transcrição GCN4 (em leveduras) e ATF4 (fator de transcrição de ativação 4) (em mamíferos). Estes fatores são responsáveis por regular a expressão de centenas de genes necessários para a recuperação das células do estresse inicial (Figura 14) (AVILA *et al.*, 2016; BURWICK; AKTAS, 2017; CLOUTIER *et al.*, 2012; HOLCIK; SONENBERG, 2005; KRAMER, 2012).

Figura 14 - Representação esquemática da fosforilação Ser51 na subunidade eIF2 α .



Fonte: A autora, 2021.

Legenda: Condições de estresse que resultam na fosforilação do eIF2 α , realizada por quatro proteínas quinases distintas: HRI, GCN2, PKR e PERK. A fosforilação de eIF2 α inibe a troca de GDP-GTP, reduzindo a taxa de dissociação de eIF2B. O resultado é a inibição da tradução global. A tradução seletiva de um subconjunto de mRNAs continua, o que permite que as células se adaptem às condições de estresse. RE: Retículo Endoplasmático; Ser51: Serina 51; P: Fosforilação; HRI: quinase inibidora heme-regulada; GCN2: quinase de controle não passível de inibição-2; PKR: proteína quinase ativada por RNA; PERK: a quinase do retículo endoplasmático semelhante à PKR.

Os tripanosomatídeos possuem algumas divergências na regulação e estrutura do eIF2. A subunidade eIF2 α de tripanosomatídeos foi identificada pela primeira vez em sequências genômicas de *T. brucei* em um estudo para a caracterização de suas quinases que também seriam alvos de fosforilação, podendo estar envolvidas na detecção de transporte de proteínas/nutrientes (CHOW *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2007). Também foi identificada uma proteína quinase eIF2 α de *Trypanosoma cruzi* (Tck2) como uma proteína transmembrana localizada em organelas que acumulam nutrientes. Na ausência de heme, a Tck2 é ativada, cessando o crescimento celular

e levando a diferenciação de formas proliferativas em infecciosas e não proliferativas. Parasitas que não possuem Tck2 apresentam incapacidade de diferenciação e deficiência de crescimento (AUGUSTO *et al.*, 2015).

O resíduo S51 de mamíferos corresponde a treonina 166 (T166) no eIF2 α de *Leishmania*, que também é fosforilado e ativado por diferentes situações de estresse citoplasmáticas. Exemplificando, alta temperatura e pH ácido juntos são condições fisiológicas predominantes dentro do compartimento fagolisossômico. Estes eventos desempenham um papel importante no seu ciclo de vida, induzindo a diferenciação e mantendo a forma latente necessária para o parasita se adaptar e sobreviver no ambiente estressado dentro do hospedeiro. Foi visto em *Leishmania infantum* que o eIF2 α possui 47 kDa e que fatores de estresse induzem a fosforilação dessa subunidade, levando a uma diminuição da tradução global e aumentando os níveis de expressão relativa de proteínas responsivas ao estresse. Esta resposta desencadeia a diferenciação do parasita e permite que se adapte às condições adversas dos macrófagos hospedeiros (ABHISHEK *et al.*, 2017; CLOUTIER *et al.*, 2012; NASCIMENTO, 2016).

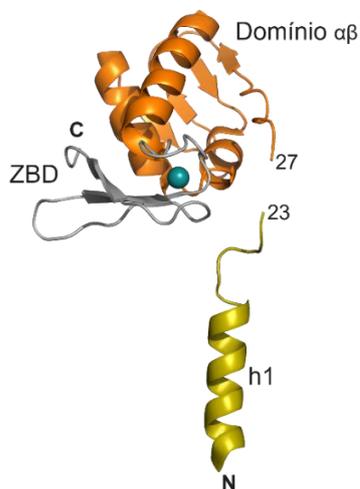
2.8.2 eIF2 β

A subunidade eIF2 β possui 37 kDa em mamíferos e 38 kDa em *Leishmania infantum*. Em eucariotos é rica em lisina na sua porção N-terminal, estando relacionada à ligação nos eIF5, eIF2B e ao mRNA. A porção C-terminal também é necessária para a ligação ao tRNA e sua função ainda é controversa (LAURINO *et al.*, 1999; NASCIMENTO, 2016; NAVEAU *et al.*, 2013; SCHMITT; NAVEAU; MECHULAM, 2010). Essa subunidade também interage com o eIF1 (KAPP; LORSCH, 2004), e esse recrutamento evita a hidrólise prematura de GTP no eIF2 (UNBEHAUN, 2004).

A interação entre as subunidade β e γ do complexo eIF2 é necessária para a identificação correta do códon de iniciação da tradução (HASHIMOTO; CARNEVALLI; CASTILHO, 2002). O núcleo da subunidade β é conservado e pode ser dividido em três partes (Figura 15): uma α -hélice N-terminal (h1) que é conectada por um ligante flexível a um domínio α - β central, seguido por um domínio de ligação de zinco C-terminal (ZBD). A h1 não interage com os outros domínios e o domínio ZBD é

compactado no domínio α - β central, formando um corpo rígido (SCHMITT; NAVEAU; MECHULAM, 2010).

Figura 15 - Subunidade eIF2 β



Fonte: A autora, 2021.

Legenda: Hélice 1 em amarelo, domínio $\alpha\beta$ central em laranja e domínio de ligação de zinco (ZBD) em cinza. Zinco (Zn^{2+}) representado como esfera ciano. Os resíduos 23-27 não estão visíveis. A visualização é deduzida da estrutura de Ss-eIF2a3bc (PDB ID 2QMU).

Sítios fosforilados *in vitro* em eIF2 β de mamífero foram mapeados em S2, S67 (alvos da creatina quinase 2 (CK2)), S13 (alvo da proteína quinase C (PKC)) e S218 (alvo da proteína quinase A (PKA)). A subunidade β também é um substrato para proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK), porém o local de fosforilação ainda não foi identificado. Estudos sobre as consequências funcionais da fosforilação de eIF2 β em mamíferos para a síntese proteica mostraram que ela não afetou a capacidade do complexo eIF2 de formar o complexo ternário com GTP e Met-tRNA_i. Porém, posteriormente foi observado que a fosforilação de eIF2 β pela CK2 diminui a afinidade da ligação entre GDP e eIF2 (LLORENS *et al.*, 2006).

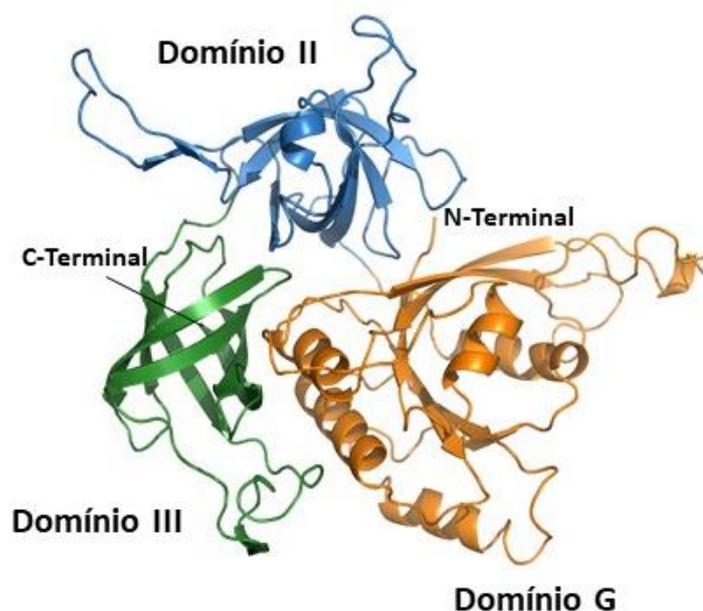
2.8.3 eIF2 γ

A subunidade eIF2 γ eucariótica é um membro da superfamília das proteínas de ligação a GTP e é altamente semelhante ao fator de alongamento bacteriano EF1A (antigo EF-Tu). A similaridade funcional entre eIF2 γ e EF1A ainda é sugerido por

dados genéticos e bioquímicos que indicam que a subunidade γ desempenha um papel significativo na ligação de nucleotídeos e ligantes de tRNA (ERICKSON; HANNIG, 1996; LES ERICKSON *et al.*, 2001; ROLL-MECAK *et al.*, 2004). Estudos mostram que o eIF2 γ se liga diretamente ao GDP/GTP e Met-tRNA_i. Em humanos, esta subunidade possui 472 aminoácidos, peso molecular de aproximadamente 52 kDa e compartilha cerca de 72% de homologia de sequência com o eIF2 γ de *Saccharomyces cerevisiae* (GASPAR *et al.*, 1994; LES ERICKSON *et al.*, 2001).

A subunidade eIF2 γ foi cristalizada pela primeira vez em 2002, apresentando uma estrutura composta de três domínios denominados de G, II e III (Figura 16).

Figura 16 - Subunidade eIF2 γ .



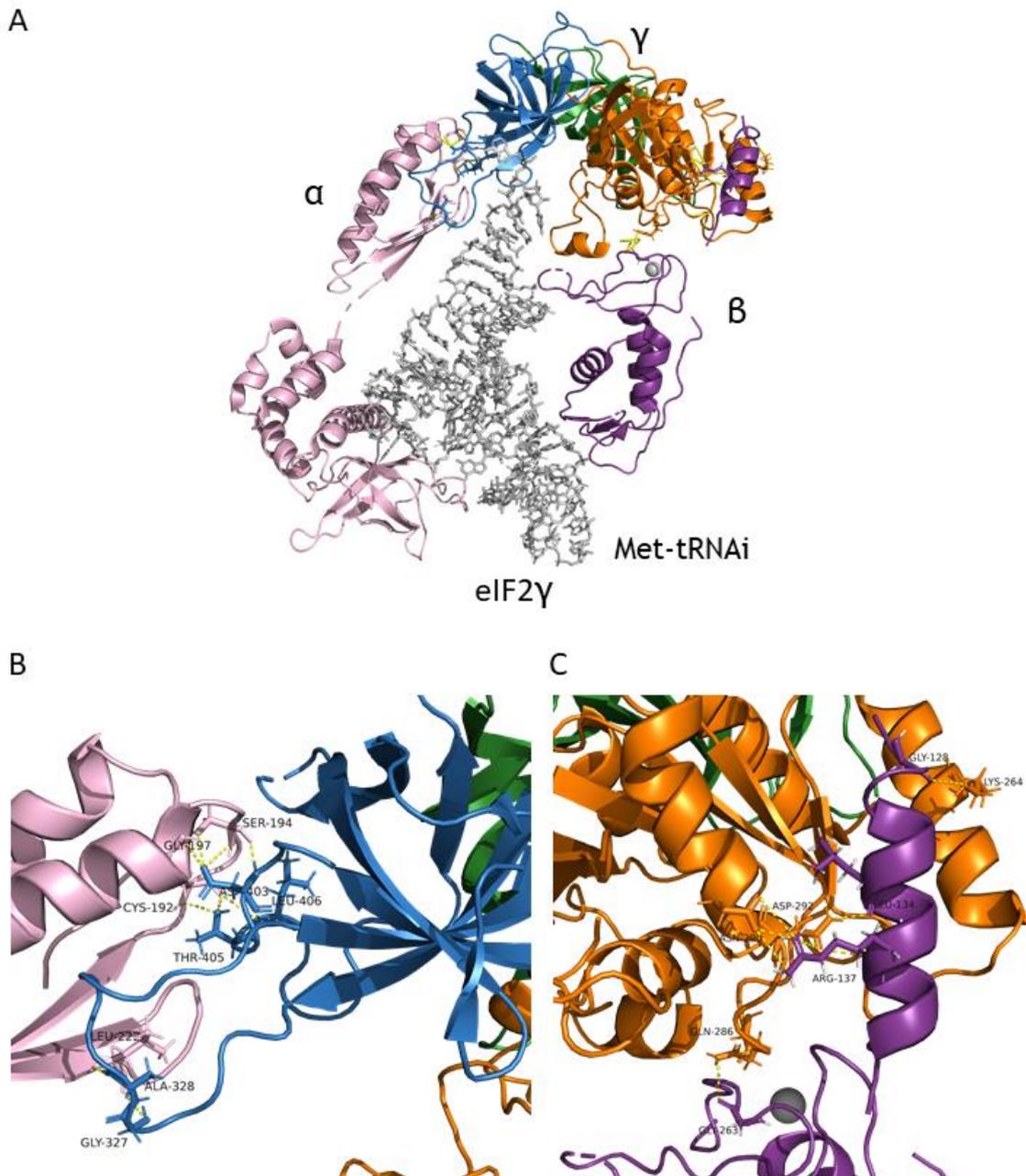
Fonte: A autora, 2021.

Legenda: Domínios da subunidade γ do complexo eIF2. Em laranja: domínio G da subunidade γ . Em azul: domínio II da subunidade γ . Em verde: domínio III da subunidade γ . PDB ID 1S0U.

O domínio G possui homologia estrutural com outras GTPases, logo contém o domínio de ligação de GTP/GDP no N terminal, caracterizado pela presença de regiões comuns a todas as proteínas G. Os domínios II e III são estruturados em β -barril (BORCK *et al.*, 2012; HASHEM; FRANK, 2018; ROLL-MECAK *et al.*, 2004; SCHMITT; NAVEAU; MECHULAM, 2010). Na maioria dos eucariotos, a subunidade γ é o núcleo da proteína eIF2 heterotrimérica uma vez que as subunidades eIF2 α e

eIF2 β não interagem entre si, porém estão ligadas à eIF2 γ (Figura 17) (SCHMITT; NAVEAU; MECHULAM, 2010).

Figura 17 - Fator eIF2 e interações entre a subunidade γ com as subunidades α e β .



Fonte: A autora, 2021.

Legenda: A: O fator eIF2 e as interações entre as suas subunidades e o Met-tRNAi. Em cinza: Met-tRNAi. Em amarelo: interações entre as subunidades. Em rosa: subunidade α . Em roxo: subunidade β . Em laranja: domínio G da subunidade γ . Em azul: domínio II da subunidade γ . Em verde: domínio III da subunidade γ . Esfera em cinza: Zinco. B: As prováveis interações entre γ e α acontecem entre: glicina 327 e leucina 222, alanina 328 e leucina 222, ácido aspártico 403 e serina 194, ácido aspártico 403 e glicina 197, treonina 405 e cisteína 192, leucina 406 e cisteína 192. C: As prováveis interações entre γ e β ocorrem entre: glutamina 286 e glicina 263, asparagina 290 e arginina 137, asparagina 290 e leucina 134, ácido aspártico 292 e arginina 137, lisina 264 e glicina 128. PDB ID 3JAP.

Em *Leishmania infantum*, a subunidade γ possui aproximadamente 53 kDa e foram encontrados dois homólogos diferentes dessa subunidade: EIF2 γ -1 e EIF2 γ -2. Ambos interagem com as subunidades eIF2 α e eIF2 β , além do parceiro eIF5. A análise realizada sugere que o EIF2 γ -2 surgiu após um evento de duplicação de genes precoce na família Trypanosomatidae, porém que pode ter se perdido nas espécies de *Trypanosoma*. É importante salientar que esses homólogos possuem divergências, resultando em sequências diferentes para o local de ligação do tRNA. Também foi visto que os dois homólogos são divididos filogeneticamente em dois grandes grupos e que evoluíram independentemente. O EIF2 γ -2, com aproximadamente 65 kDa, apresenta mais mutações e inserções quando comparado com a sequência consenso eucariótica. E em ensaios de deleção e complementação gênica foi visto que EIF2 γ -1 é essencial para viabilidade celular e que não foi possível realizar a substituição de EIF2 γ -1 pelo EIF2 γ -2, corroborando com a ideia que os genes não apresentam a mesma função (NASCIMENTO, 2016). Com isso se faz necessário investigar ambos os homólogos para definir seus papéis na tradução e em eventos de regulação, podendo assim definir divergências e semelhanças funcionais no modo de ação nos parasitas em relação a outros eucariotos.

3 JUSTIFICATIVA

Pesquisas realizadas em mamíferos mostram que a tradução mal regulada de mRNAs e a atividade anormal de eIFs são características comuns do câncer, evidências que levaram ao estudo destes fatores como alvos terapêuticos para vários tipos de neoplasias (BURWICK; AKTAS, 2017; HAO *et al.*, 2020; KARAKI *et al.*, 2015; VOLPON; OSBORNE; BORDEN, 2019). Caracterizar os mecanismos moleculares da tradução pode elucidar pontos importantes de controle da expressão gênica em tripanosomatídeos e, nesse sentido, seus eIFs também podem se tornar alvos para inibidores específicos do processo de tradução. Apesar de eucariotos, os tripanosomatídeos possuem características moleculares únicas no início da tradução, o que pode permitir uma interferência mais específica nesse seu processo, permitindo o desenvolvimento de drogas mais eficientes contra as tripanossomíases e leishmanioses e menos tóxicas contra mamíferos. Portanto, desvendar por completo o papel dos eIFs, com destaque para o eIF2 nesse trabalho, é de extrema relevância, justificando estudos em busca de compreender as particularidades do papel deste fator nesses parasitas. Da mesma forma se justifica o conhecimento a ser gerado na área de síntese proteica e em estudos de biologia básica e aplicada de protozoários patogênicos de forma geral.

4 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão e investigar modificações pós-traducionais dirigidas a dois homólogos do fator de tradução eIF2 γ de *Leishmania infantum*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a expressão dos dois homólogos eIF2 γ de *Leishmania infantum* em curvas de crescimento nas formas promastigotas e amastigotas;
- b) Avaliar o impacto de condições de estresse de temperatura, estresse nutricional e estresse oxidativo na expressão dos homólogos de eIF2 γ de *L. infantum* na sua forma promastigota;
- c) Avaliar o efeito de mutagêneses sobre possíveis sítios de fosforilação no perfil de expressão de isoformas dos dois homólogos de eIF2 γ em formas promastigotas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

O projeto foi realizado de acordo com os procedimentos metodológicos a seguir.

5.1 CULTIVO CELULAR DE FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *L. infantum*

A manutenção e cultivo das formas promastigotas de *L. infantum* foram realizados em meio Schneider pH 7,2 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,25% de hemina e mantidas em estufa B.O.D. a 26°C. O cultivo das formas amastigotas de *L. infantum* foi realizado em meio MAA/20, pH 5,5, suplementado de 20% de soro fetal bovino, 1% de hemina a 37°C em estufa de CO₂ a 5%. O meio MAA/20 é obtido por modificação do meio 199 (cat no. M9163, Sigma®), suplementado com 0,5% de trypto caseína de soja (Pasteur Diagnostics®), 0,25% de glucose, 4 mM de NaHCO₃ e 25 mM de HEPES. A diferenciação morfológica em amastigotas foi analisada através de microscopia de luz em campo invertido.

Para as curvas de crescimento de promastigotas, foram realizados inóculos de 10⁶ células em meio Schneider pH 7,2 e o crescimento celular foi acompanhado diariamente até a fase de morte celular. Todos os dias foram retiradas alíquotas para obtenção de extratos celulares para os ensaios de *western blotting* (WB), em que as células foram coletadas por centrifugação (3000 RPM / 5 minutos / 4°C) e em seguida ressuspensas em 100µL de tampão de proteína para gel SDS-PAGE desnaturante. Para as condições de estresse foram utilizadas três condições: temperatura (37°C em meio Schneider) (CODONHO *et al.*, 2016), nutrição (meio Schneider não suplementado nem com SFB nem com hemina) (ZINOVIEV; SHAPIRA, 2012) e estresse oxidativo (H₂O₂ – peróxido de hidrogênio na concentração 0,2mM) (SILVA *et al.*, 2017). Foram feitos inóculos de 10⁶ células na fase exponencial e o crescimento celular foi acompanhado. No tempo de 48h, as células foram contadas e separadas em garrafas distintas para cada condição de estresse citada acima. Os extratos celulares foram retirados nos tempos 1h e 6h. Os controles foram mantidos no próprio meio Schneider pH 7,2 em condições padrão de cultivo a 26°C.

Para as curvas de crescimento de amastigotas de *L. infantum* foram realizados inóculos de 10^6 células em meio específico descrito acima, pH 5,5, sob pressão de CO_2 e o crescimento celular foi acompanhado diariamente até a fase de morte celular. Os extratos totais do parasita, utilizados nos ensaios de WB, foram obtidos a partir de culturas em fase exponencial de crescimento (10^6), das quais as células foram tratadas semelhantes as condições acima realizada em promastigotas.

5.2 WESTERN BLOTTING

Para ensaios de *western blotting* dos homólogos eIF2 γ , foi utilizado soro policlonal previamente obtido capaz de reconhecer ambos os homólogos de eIF2 γ (SILVA, 2018) bem como extratos proteicos de *L. infantum* selvagem, ou expressando EIF2 γ -1 e EIF2 γ -2, fracionados em gel SDS PAGE 15%. Estes extratos foram então transferidos para membrana de PVDF (Immobilon-P – Millipore) por uma hora, com a membrana bloqueada em solução de leite (Molico®) 5% em TBS-Tween 20 (20 mM Tris, 500 mM NaCl, Tween 20 0,05%, pH 7,5) sob agitação por uma hora, em temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário anti-eIF2 γ (soro policlonal anti-eIF2 γ purificado) na diluição de 1:100 em solução de composição igual a usada para o bloqueio, durante 16 horas a 4°C, sob agitação. Após três lavagens de 10 minutos com TBS-Tween 20, a membrana foi incubada com o segundo anticorpo anti-IgG de coelho (*Jackson ImmunoResearch Laboratories*) marcado com peroxidase na diluição de 1:10000, sob agitação por uma hora, em temperatura ambiente. Em seguida as membranas foram lavadas novamente três vezes com TBS-Tween 20 por 10 minutos. Após as lavagens, as membranas foram banhadas em solução reveladora comercial (Merck) e reveladas no equipamento iBright (Thermo Fisher Scientific). Também foi realizado *western blotting* com o anticorpo primário monoclonal anti-HA (Sigma-Aldrich) na diluição de 1:5000 e com o segundo anticorpo na diluição de 1:3000 (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase) com as mesmas etapas citadas acima.

5.3 AMPLIFICAÇÃO DE DNA E MUTAGÊNESE

Para obtenção dos fragmentos mutados em sítios candidatos a fosforilação na sequência do EIF2 γ -1 de *Leishmania infantum* (ID Trytrip LinJ.09.1130 ou LINF_090018100) foram realizadas reações de amplificação (PCR) *touchdown* com oligonucleotídeos desenhados para cada mutagênese (Quadro 1). Cada reação foi realizada utilizando a enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (*New England's BioLabs*), com um volume final de 50 μ L tendo como molde o DNA plasmidial EIF2 γ -1 de *Leishmania infantum* (pSP-BT1-Y-Neo-alfa-EIF2 γ -1) já disponível no laboratório. A reação foi realizada a 98°C por três minutos para desnaturação inicial em seguida dez ciclos de desnaturação 98°C por 45 segundos, anelamento dos oligonucleotídeos a 70°C durante 45 segundos com decaimento de 1°C a cada ciclo e extensão a 72°C por um minuto. Em seguida mais 30 ciclos são realizados a temperatura de 98°C para desnaturação durante 45 segundos, 60°C para anelamento durante 45 segundos e extensão de 72°C durante um minuto e extensão final a 72°C por três minutos.

Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos para mutagêneses.

Nome do primer	Sequência
MUT1 Foward	GGATCCATGGCCGAGGAGGATATTGCGGACTTCACCCTCGATGACGA GAAGGTCATCGACACAGACCAGGGGCTCGCCAAGCAGGACTTCGCC AAGATCGACCTCGAT
MUT1 Reverse	AAGCTTGCTGCTCTGCTTCATGGGCAC
MUT2 Foward	GGATCCATGGCCGAGGAGGATATTGCG
MUT2 Megaprimer	CTCTCCGCAGTTGGGGCACCCCTGTGCTGTCCGGCTGCGAGGACGGG TAGGCCTGGTAGCAGGCGGGCGCGGGCAGGTCTC
MUT2 Reverse	AAGCTTGCTGCTCTGCTTCATGGGCAC
MUT3 Foward	GGATCCATGGCCGAGGAGGATATTGCG
MUT3 Megaprimer	GCAGTTGGGGCACGGCGCGGGGTCCGGCTGCGAGGA
MUT3 Reverse	AAGCTTGCTGCTCTGCTTCATGGGCAC
MUT4 Foward	GGATCCATGGCCGAGGAGGATATTGCG
MUT4 Reverse	AGCATAATCTGGCACATCATAAGGATAAAGCTTGGCGGCCTGCTTCAT GGGCAC

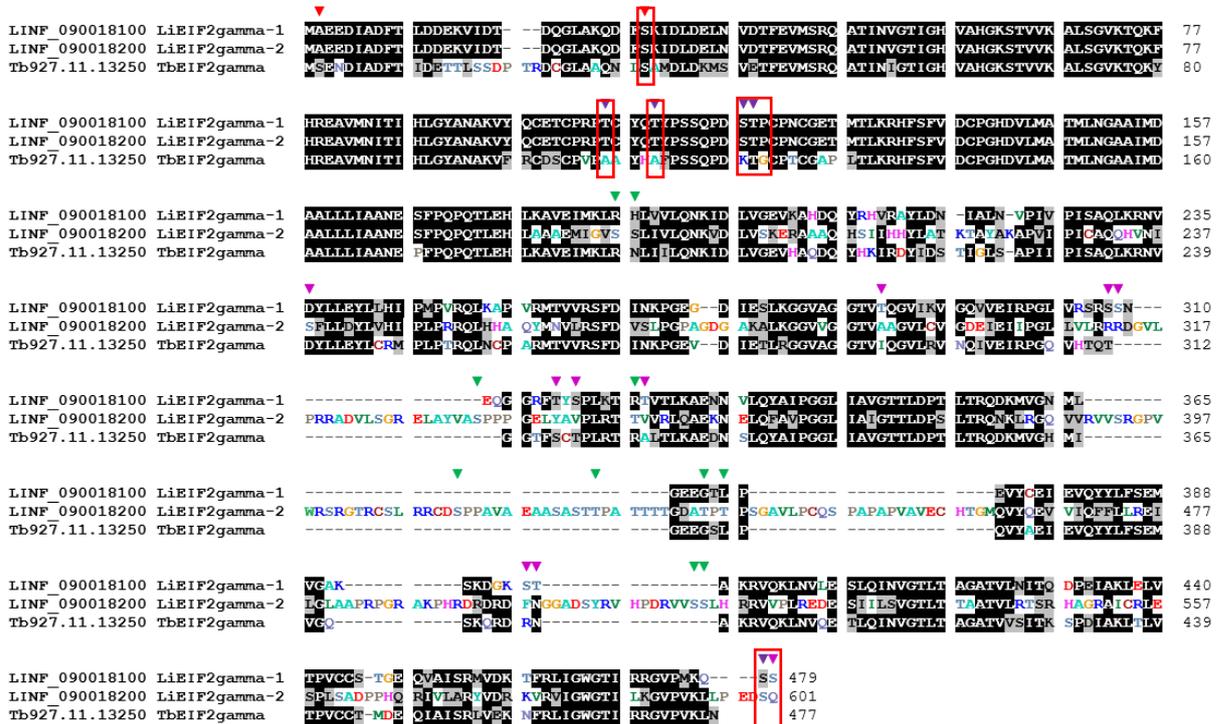
Fonte: A autora, 2021.

Legenda: Sequência dos primers utilizado para as mutações em LinJ.09.1130. Sequências em rosa: Sítios de BamHI. Sequências em azul: Sítios de HindIII. Sequências destacadas em amarelo: mutações desejadas.

Foi feito um alinhamento entre as isoformas de eIF2 γ de *Leishmania infantum* e eIF2 γ de *T. brucei* para selecionar possíveis sítios de fosforilação e que fossem

responsáveis pelo aparecimento da isoforma de maior peso molecular identificada no EIF2γ-1. A partir desse alinhamento foram identificados sítios para realização de mutagênese e verificação dos efeitos sobre a expressão dessa isoforma (Figura 18).

Figura 18 - Alinhamento para escolha de sítios de mutagênese.

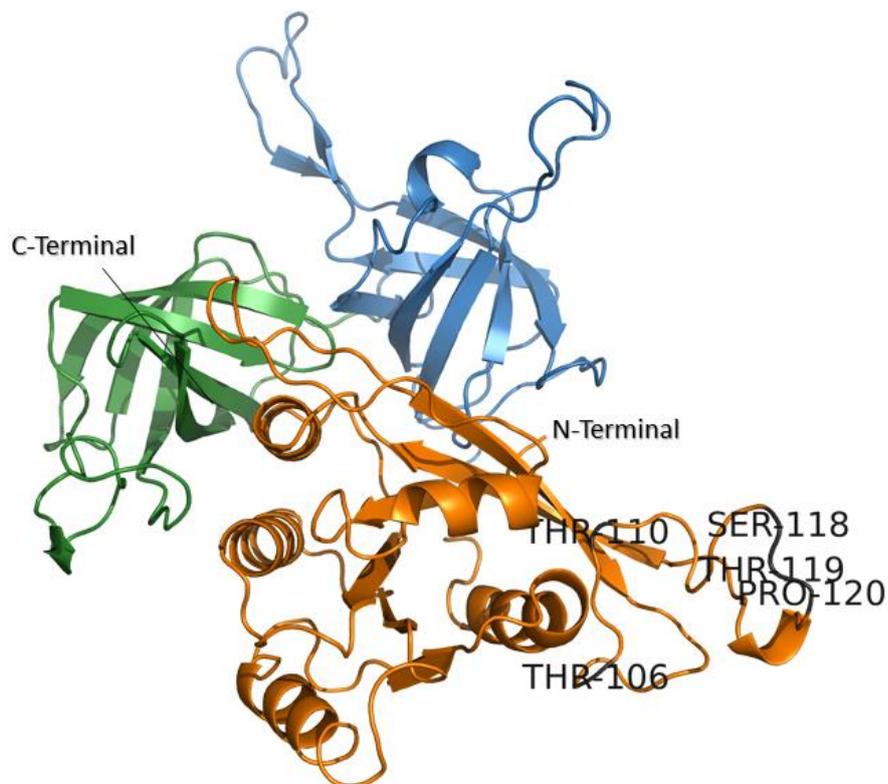


Legenda: Sítios escolhidos para mutagênese estão destacados em vermelho. Serina 29 (S29), Treonina 106 (T106), Treonina (T110), Prolina 120 (P120), Serina 118 (S118), Treonina 119 (T119), Serina 478 (S478) e Serina 479 (S479).

A primeira mutação (MUT1) foi selecionada na serina 29 (S29) em substituição por uma alanina, mutação essa direcionada ao resíduo conservado e fosforilado em *T. brucei* (URBANIYAK; MARTIN; FERGUSON, 2013). A segunda mutação (MUT2) substitui os resíduos de treonina 106 (T106) e 110 (T110) por alanina e o resíduo de prolina 120 (P120) por uma glicina. A terceira mutação (MUT3) substitui serina na posição 118 (S118) e treonina na posição 119 (T119) por uma alanina em um contexto favorável a fosforilação. Esses sítios da MUT2 e da MUT3 foram escolhidos por serem regiões que estão ligados a um átomo de zinco e que tem função importante para proteína, além de estarem presentes em *Leishmania* e ausentes em *T. brucei*. A quarta mutação (MUT4) ocorre nas serinas 478 (S478) e 479 (S479) em um contexto desfavorável para a fosforilação, mas que pode servir como um controle negativo. A

modelagem comparativa foi realizada para ilustrar os locais das mutações escolhidas (Figura 19).

Figura 19 - Modelagem estrutural da proteína eIF2 γ .

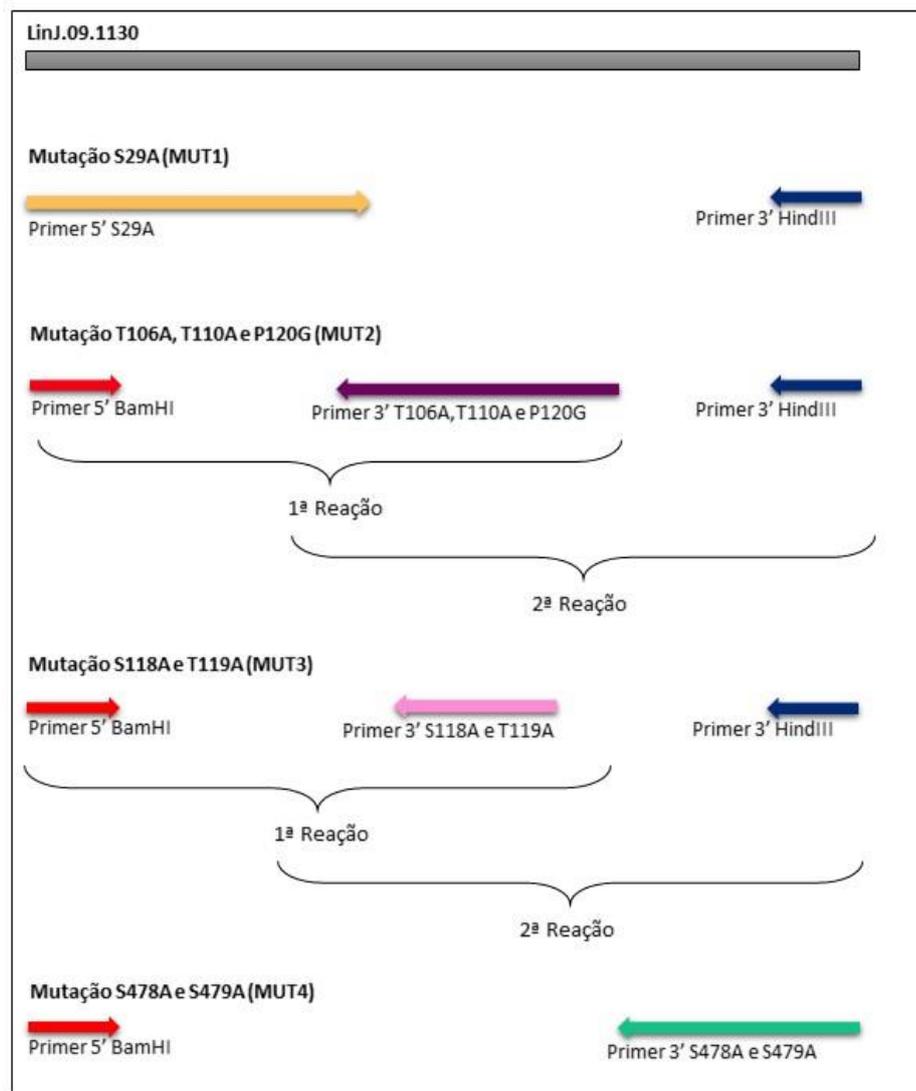


Legenda: Modelagem comparativa através do Swiss-model utilizando como *template* a estrutura ID: 1S0U do PDB. Em laranja: domínio G da subunidade γ . Em azul: domínio II da subunidade γ . Em verde: domínio III da subunidade γ . Destaque para os sítios com mutações escolhidas (MUT2 e MUT3) no domínio G (laranja). O modelo representa do aminoácido 47 ao 469, sendo assim não houve cobertura nem do N-terminal nem do C-terminal, desta forma não foi possível representar nem MUT1 e nem MUT4, embora as extremidades N e C-terminais estejam indicadas.

Para a obtenção dos fragmentos mutados, foram desenhados *primers* específicos para as mutações (Quadro 1). O esquema de amplificação foi realizado conforme a figura abaixo (Figura 20). Nas mutações S29A (MUT1) e S478A, S479A (MUT4) foram realizadas apenas uma etapa de PCR. Nas mutações T106A, T110A, P120 (MUT2) e mutações S118A e T119A (MUT3) foram realizadas PCRs em duas etapas. Na primeira etapa foi amplificado o início do gene com sítio de BamHI até a região das mutações, modificando o *primer* reverso com as mutações desejadas. Em uma segunda PCR foi realizada amplificação do gene completo utilizando o produto da primeira PCR como um *megaprimer* iniciador e com *primer* reverso comum (sem

mutação e com sítio de HindIII) do fim do gene. Assim gerando o gene completo e com as mutações desejadas. A estratégia de amplificação também incluiu nos *primers* sítios para as enzimas de restrição BamHI e HindIII, de modo que os fragmentos a serem amplificados seriam flanqueados por estes sítios para posterior subclonagem no vetor de expressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa. Os amplicons foram obtidos através de PCR e posteriormente purificados.

Figura 20. Esquema de amplificação de DNA.



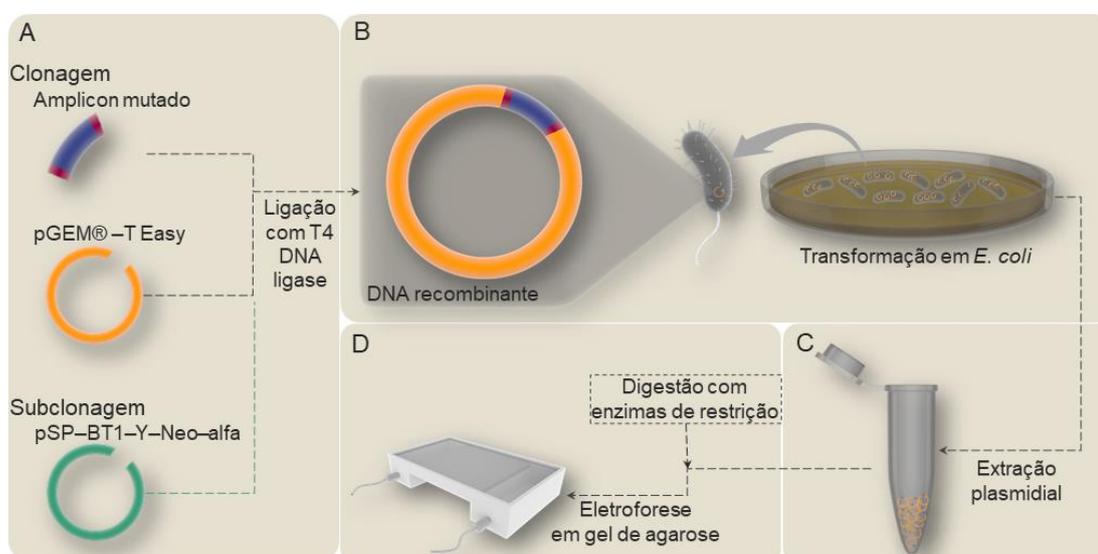
Fonte: A autora, 2020.

Legenda: Representação esquemática das mutagêneses. O retângulo em cinza representa o gene selvagem (WT), com 1440 pb (ID no tritrypdb.org: LinJ.09.1130 ou LINF_090018100). Em amarelo, *primer 5'* contendo a mutação S29A e sítio da enzima BamHI. Em azul escuro, *primer reverse* com sítio da enzima HindIII e sem mutação. Em vermelho, *primer 5'* com sítio BamHI e sem mutação. Em roxo, *primer 3'* intermediário com mutações T106A, T110A e P120G. Em rosa, *primer reverse* intermediário com mutações S118A e T119A. Em verde, *primer 3'* com mutações S478A e S479 e sítio HindIII.

5.4 CLONAGEM, DIGESTÃO ENZIMÁTICA E EXTRAÇÃO PLASMIDIAL

Os amplicons mutados foram introduzidos no vetor de clonagem pGEM®-T Easy (Promega) (3015 pb) por ligação com a enzima T4 Ligase (*New England Biolabs*) e em seguida foi feita a transformação em *Escherichia coli* linhagem TOP10. Posteriormente foi realizada extração plasmidial e digestão com enzimas de restrição, EcoRI, BamHI e HindIII de acordo com as instruções do fabricante (*New England Biolabs*). As digestões foram confirmadas por eletroforese em gel de agarose e, posteriormente, por sequenciamento. Para se obter as construções dos mutantes em vetor de expressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa (5925 pb) foram realizadas subclonagens em que os fragmentos mutados foram recuperados do plasmídeo pGEM®-T Easy (Promega) por digestão com BamHI e HindIII, purificados e submetidos a nova ligação com o pSP-BT1-Y-Neo-alfa, digerido com as mesmas enzimas, seguida de transformação em *E. coli*. A partir desses clones foi feita a extração plasmidial e as clonagens confirmadas por digestão com BamHI e HindIII em eletroforese (gel de agarose) e sequenciamento (Figura 21). As extrações plasmidiais foram feitas seguindo o protocolo do fabricante, Gen-Elute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich).

Figura 21 - Representação esquemática das etapas de clonagem e subclonagem.



Fonte: A autora, 2021.

Legenda: (A) Amplicon mutado representado em azul com sítios BamHI e HindIII representados em rosa. Vetor de clonagem (pGEM®-T Easy) representado em amarelo e vetor de expressão (pSP-BT1-Y-Neo-alfa) representado em verde. Linha tracejada em verde representa a subclonagem em pSP-BT1-Y-Neo-alfa. (B) Representa a etapa de transformação em *E. coli* com DNA recombinante (vetor + inserto)

mutado). (C) Representa a extração plasmidial. (D) Mostra a etapa de digestão enzimática e confirmação por eletroforese em gel de agarose.

5.5 SEQUENCIAMENTO

As amostras de DNAs obtidas a partir das extrações plasmidiais foram enviadas para o sequenciamento e foram analisadas através do sequenciador automático de DNA ABI Prism 3100 (Applied *Biosystems*®) disponível para utilização no Núcleo de Plataformas Tecnológicas do IAM/FIOCRUZ-PE. A integridade das sequências foi comparada com o gene *wild type* (WT) Linj.09.1130 ou LINF_090018100 depositada no tritrypdb.org através dos programas Seqman e SeqBuilder (DNASTAR®).

5.6 TRANSFEÇÃO DE *L. infantum*

Para inserir o plasmídeo de interesse dentro da célula de *L. infantum* foi realizada a técnica de transfecção por eletroporação. Para isso foram utilizadas formas promastigotas de *L. infantum* WT, mantidas em crescimento em cultura, em estufa B.O.D. a 26°C, através de repiques sucessivos a cada 4 ou 5 dias em meio Schneider, pH 7,2, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e adicionado de 0,1% v/v de Penicilina e Estreptomicina (Sigma-Aldrich). A técnica foi utilizada com culturas em fase exponencial de crescimento.

Para cada transfecção, aproximadamente $2,5 \times 10^8$ células promastigotas de *L. infantum* em fase exponencial foram utilizadas para a realização de eletroporação com o DNA recombinante. A cultura celular foi centrifugada a 3000 RPM por 5 minutos, lavada com 1 ml de tampão HEPES-NaCl pH 7,05 (HEPES 20 mM, NaCl 85 mM, KCl 5 mM, Na₂PO₄ 0,7 mM e glicose 20 mM) e ressuspensa em 450 µl do mesmo tampão. Em seguida, as células foram repassadas para cuvetas de eletroporação de 2 mm (Bio-Rad) contendo de 5 a 10 µg do DNA plasmidial circular a ser transfectado e então mantidas no gelo durante 10 minutos. Para o controle negativo foi utilizado o mesmo procedimento, porém sem a presença de DNA.

As células foram eletroporadas com 1 pulso de 450 Volts e capacitância de 450 µF, utilizando o eletroporador *Gene Pulser Xcell™ system* (BIO-RAD). Após o choque, o material foi repassado para uma garrafa de cultura de 25 cm² contendo 5 ml de meio Schneider pH 7,2 e incubado a 26°C, por 24 horas. Em seguida, foi realizada a pré-seleção dos transfectantes, onde foi adicionado 5 ml de meio Schneider à cultura

juntamente com a metade da quantidade do antibiótico Neomicina (G418) utilizado para manutenção da linhagem. Após 24 horas, 1 ml das células pré-selecionadas foi transferido para uma garrafa de cultura contendo 9 ml de meio Schneider pH 7,2 juntamente com a concentração total do antibiótico utilizado. Posteriormente, as culturas foram incubadas a 26°C e acompanhadas durante 5 a 10 dias até que as células selecionadas se tornassem viáveis para um repasse celular.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente trabalho não envolveu seres humanos e/ou animais, seja de forma direta ou indireta, portanto não necessitou ser avaliado criteriosamente pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) e/ou Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

7 RESULTADOS

Em um estudo anterior foi descoberto que *Leishmania infantum* apresenta dois homólogos do fator eIF2 γ , denominados de EIF2 γ -1 e EIF2 γ -2, que apresentam diferenças importantes ao longo das suas sequências (NASCIMENTO, 2016).

7.1 PADRÃO DE EXPRESSÃO DE DIFERENTES ISOFORMAS DOS HOMÓLOGOS DE eIF2 γ

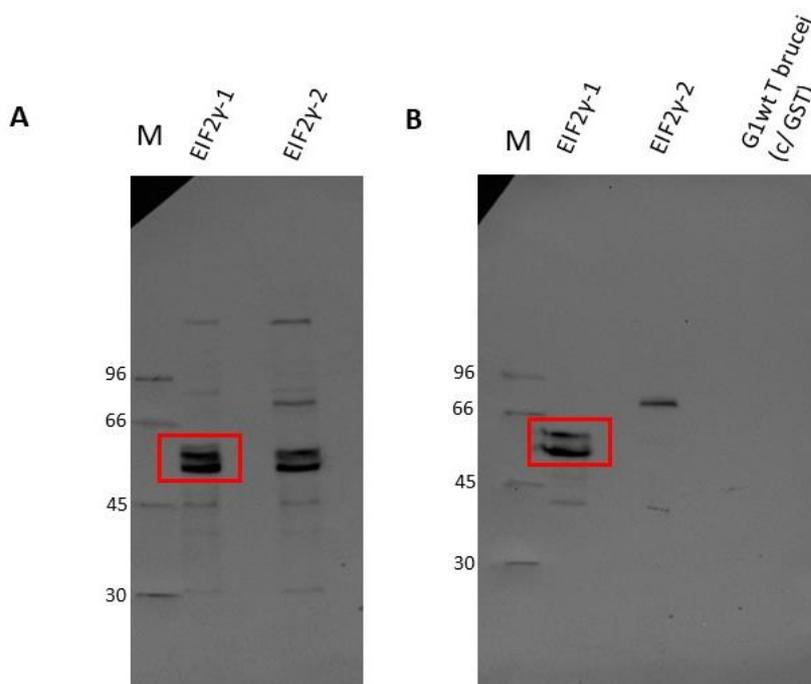
Desta forma, se faz necessário definir suas prováveis distinções funcionais na iniciação da tradução desse parasita. Para isso, em estudos que precederam este trabalho, foi realizada a subclonagem em vetor de expressão de fragmentos gênicos codificando a região N-terminal do EIF2 γ -1, sendo a região N-terminal idêntica a encontrada no EIF2 γ -2. O fragmento N-terminal foi utilizado para a produção da proteína EIF2 γ -1 recombinante em *E. coli*. O fragmento N-terminal foi então purificado e utilizado para imunização em coelhos e assim foi possível a obtenção de soro policlonal capaz de reconhecer ambos os homólogos do eIF2 γ (SILVA, 2018). Com essa ferramenta foi possível iniciar o presente trabalho a partir da realização de *western blotting* para análise da expressão de ambos os homólogos de eIF2 γ em células de *Leishmania infantum*. Para isso foram utilizadas células transfectadas com vetor de expressão pSP-BT1-Y-Neo-alfa expressando o EIF2 γ -1, bem como células de *L. infantum* transfectadas com o mesmo plasmídeo expressando o EIF2 γ -2 ambos fusionados com Tag-HA.

7.1.1 Promastigota

Na forma promastigota foi observado um padrão claro de duas isoformas apenas para o EIF2 γ -1, tanto na proteína nativa (reconhecida com soro policlonal anti-EIF2 γ purificado) quanto na que está expressa fusionada ao epítopo HA (reconhecida com soro anti-HA (Sigma-Aldrich)) (Figura 22). Para a proteína nativa EIF2 γ -1 é importante salientar que esta é claramente observada nas células transfectadas expressando o EIF2 γ -2 fusionado com o epítopo HA. Já a proteína EIF2 γ -2 apresenta apenas uma isoforma que pode ser visualizada tanto com o soro policlonal específico

como com o soro anti-HA, mas apenas nas células transfectadas expressando o mesmo homólogo, uma vez que não é possível visualizar claramente a forma nativa desta proteína nas células transfectadas expressando o EIF2 γ -1 fusionados com o HA.

Figura 22 - Análise da expressão dos homólogos de eIF2 γ de *L. infantum* após transfecção com genes fusionados ao epítipo HA.



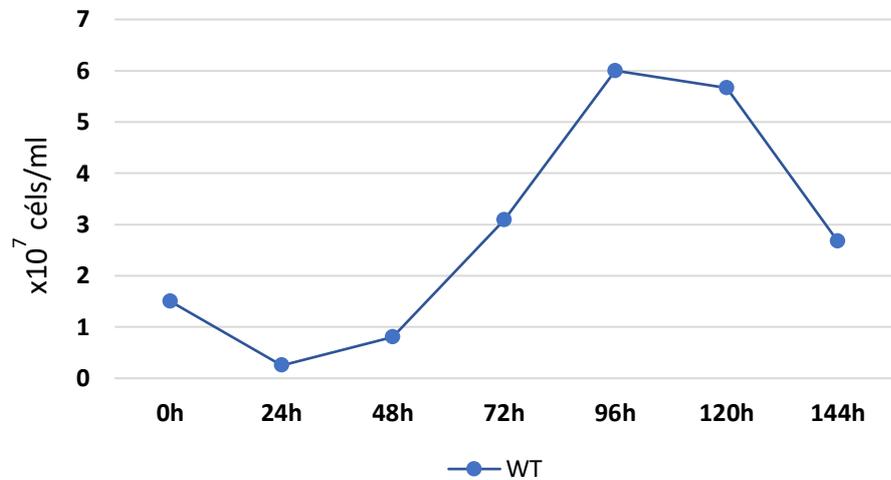
Fonte: A autora, 2019.

Legenda: A: *Western blotting* com soro policlonal anti-eIF2 γ purificado. B: *Western blotting* com anticorpo anti-HA (Sigma-Aldrich). Áreas destacadas em vermelho mostram padrão de duas isoformas. O EIF2 γ -1 com peso molecular de aproximadamente 53 kDa e o EIF2 γ -2 com aproximadamente 65 kDa. Gel SDS Page 15%. M: Marcador. Poços EIF2 γ -1 e EIF2 γ -2 são células transfectadas expressando o EIF2 γ -1 e EIF2 γ -2 fusionado com o HA, respectivamente. G1 WT *T. brucei* com GST: controle negativo do anti-HA.

Para melhor avaliar eventuais alterações de expressão dos dois homólogos ao longo do cultivo, foram realizados ensaios semelhantes com curva de *L. infantum* WT nas formas promastigotas. Foram feitos inóculos de 10^6 células e o crescimento celular foi acompanhado do tempo 0h a 144h (Figura 23), em que foram retiradas alíquotas para obtenção de extratos celulares para ensaios de WB seguintes. Nota-se o padrão de duas isoformas do EIF2 γ -1 na maior parte da curva, sendo mais abundante em na fase exponencial (72h) e com o desaparecimento da isoforma de

maior tamanho desse homólogo a partir de 120h (fase estacionária). Também é possível identificar o homólogo EIF2 γ -2 fracamente no tempo 72h (Figura 24).

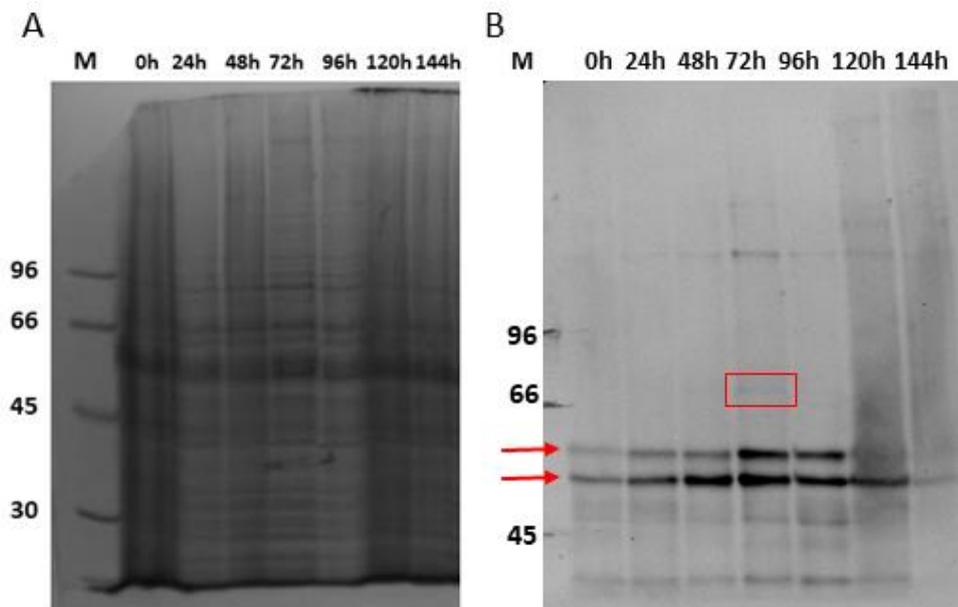
Figura 23 - Curva de crescimento de *L. infantum* WT promastigota.



Fonte: A autora, 2019.

Legenda: Gráfico representa curva de crescimento de *L. infantum* WT promastigota.

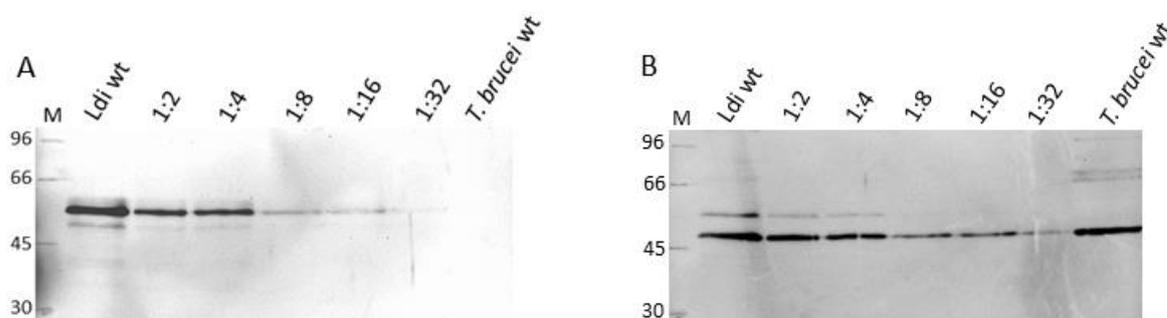
Figura 24 - Análise da expressão dos homólogos de eIF2 γ de *L. infantum* WT em curva de crescimento de sua forma promastigota.



Legenda: A: Gel SDS-PAGE 15% com extratos totais proteicos, corado com Azul de Comassie R-250 mostra a uniformidade das amostras. B: *Western blotting* com soro policlonal anti-eIF2 γ purificado em extratos totais de formas promastigotas de *L. infantum* WT retirados de pontos sucessivos de uma curva de crescimento (em horas). Cada poço contém 10^6 células. Seta em vermelho destaca as duas isoformas do EIF2 γ -1 (53kDa). Área destacada em vermelho evidencia o aparecimento fracamente do homólogo EIF2 γ -2. M: Marcador.

Uma curva de diluição seriada (até 1:32) do EIF2 γ -1 foi realizada em células promastigotas de *L. infantum* WT. Com base na (Figura 25 A), a expressão do EIF2 γ -2 é inferior do EIF2 γ -1 diluído 32 vezes, portanto o homólogo EIF2 γ -2 está presente em níveis não detectáveis, com 30 vezes ou mais abaixo do EIF2 γ -1. Porém, na (Figura 25 B), um sinal fraco de EIF2 γ -2 é visto em células promastigotas de *L. infantum* WT sem diluição (poço Ldi wt) que, se não for reação cruzada com o soro anti-eIF4A1, representa que o EIF2 γ -2 se encontra, aproximadamente, dez vezes menos abundante que o EIF2 γ -1. O anticorpo da proteína eIF4A1 de expressão constitutiva foi utilizada como controle da reação. Importante salientar que o soro policlonal anti-eIF2 γ purificado é específico para o eIF2 γ de *Leishmania* e não reconhece esse fator em *Trypanosoma brucei* (Figura 25 A).

Figura 25 - Curva de diluição de células promastigotas de *L. infantum* WT.



Fonte: A autora, 2021.

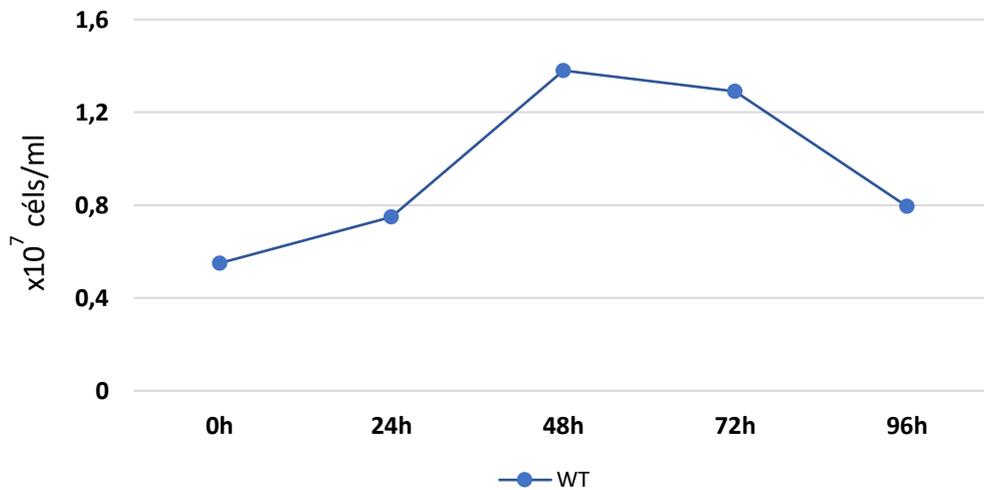
Legenda: A: *Western blotting* com soro policlonal anti-eIF2 γ purificado. Curva de diluição mostra a abundância do EIF2 γ -1. Extrato total de 48h. Poços Ldi wt e *T. brucei* wt contêm 10⁶ células. B: *Western blotting* com soro anti-eIF4A1 (diluição de 1:1000) de *L. major* como controle. eIF4A1, proteína expressa constitutivamente, possui, aproximadamente, 45kDa. Gel SDS Page 15%. M: Marcador. *T. brucei* wt: Controle negativo em A e positivo em B.

7.1.2 Amastigota

Nas formas amastigotas também foram realizadas curvas de crescimento de *L. infantum* WT para se avaliar a expressão dos homólogos de eIF2 γ (Figura 26). A curva foi iniciada após um repique celular de células promastigotas em fase estacionária. A contagem foi feita diariamente até a morte celular em que foi observado a mudança da forma promastigota para amastigota através do fenótipo,

sendo a primeira fusiforme com flagelo bem aparente e a segunda apresentando formato arredondado e flagelo não visível.

Figura 26 - Curva de crescimento de *L. infantum* WT amastigota.

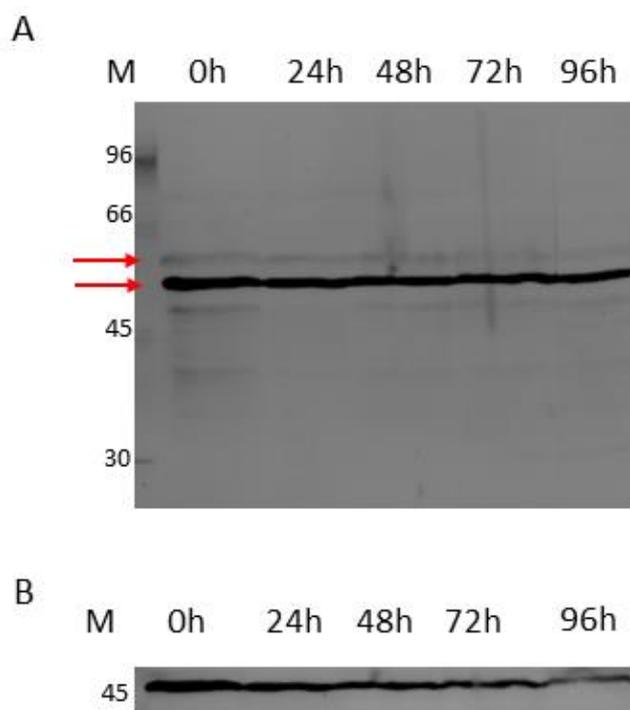


Fonte: A autora, 2021.

Legenda: Gráfico representa curva de crescimento de *L. infantum* WT amastigota.

Ensaio de *western blotting* foram então realizados utilizando soro policlonal anti-eIF2 γ purificado em curva nos tempo de 0h a 96h. É possível observar um padrão de duas isoformas apenas no EIF2 γ -1, estando presente durante toda curva, porém com provável diminuição da isoforma de maior tamanho ao longo dela (Figura 27). O EIF2 γ -2 não é visualizado. O anticorpo da proteína eIF4A1 de expressão constitutiva foi utilizada como controle da reação.

Figura 27 - Análise da expressão dos homólogos de eIF2 γ de *L. infantum* WT em curva de crescimento de sua forma amastigota.



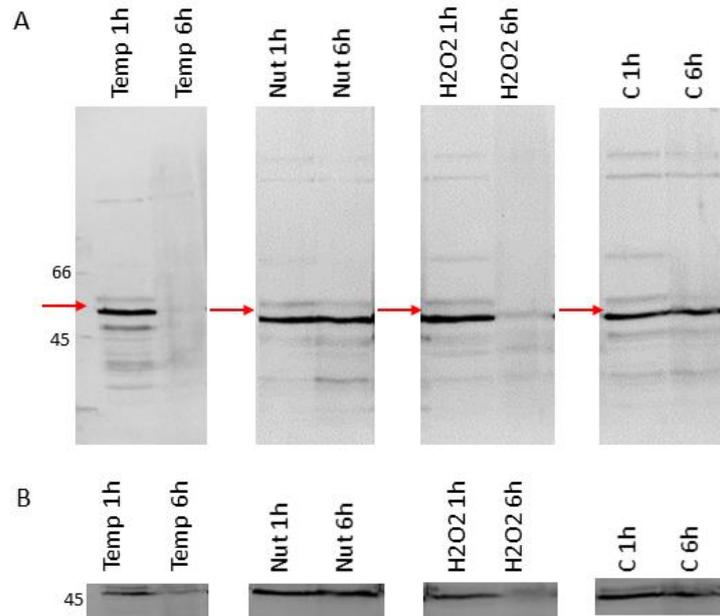
Fonte: A autora, 2021.

Legenda: A: *Western blotting* com soro policlonal anti-eIF2 γ purificado em extratos totais de formas amastigotas de *L. infantum* WT retirados de pontos sucessivos de uma curva de crescimento (em horas). Seta em vermelho destaca as duas isoformas do EIF2 γ -1 (53kDa). B: *Western blotting* com soro anti-eIF4A1(45kDa) (diluição de 1:1000) de *L. major* como controle. M: Marcador.

7.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DOS HOMÓLOGOS DE eIF2 γ EM CONDIÇÕES DE ESTRESSE EM *L. infantum* WT NA FORMA PROMASTIGOTA

Para avaliar o perfil de expressão dos homólogos de eIF2 γ em condições de estresse foram utilizadas três condições em células *L. infantum* WT na forma promastigota: temperatura, nutrição e estresse oxidativo como citados anteriormente. Em ensaios de *western blotting* com soro policlonal anti-eIF2 γ purificado é possível notar o padrão de duas isoformas no homólogo EIF2 γ -1 em células *L. infantum* WT em todas as condições realizadas. Também é possível observar a expressão ínfima do EIF2 γ -2 em todas as condições no tempo de 1h (Figura 28). Nas condições de estresse de temperatura e estresse oxidativo em 6h não foi possível encontrar células viáveis suficientes para retirar extrato. O anticorpo anti-eIF4A1 foi utilizado para o controle das reações.

Figura 28 - Análise da expressão do eIF2 γ em condições de estresse de *L. infantum* WT.



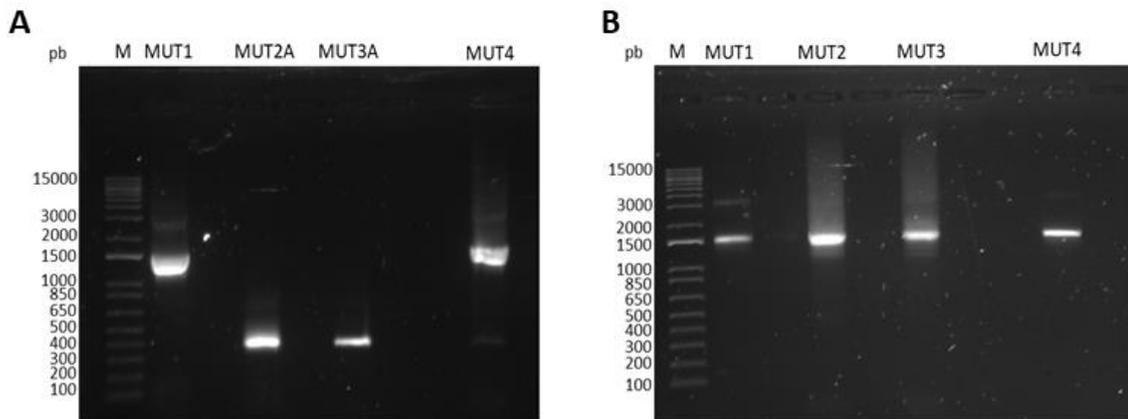
Fonte: A autora, 2021.

Legenda: A: *Western blotting* com soro policlonal anti-eIF2 γ purificado em extratos totais de formas promastigotas de *L. infantum* WT. Setas em vermelho destacam as duas isoformas do EIF2 γ -1 (53kDa). B: *Western blotting* com soro anti-eIF4A1 (diluição de 1:1000) de *L. major* como controle (45kDa) M: Marcador. Temp: estresse de temperatura. Nut: estresse nutricional; H2O2: estresse oxidativo.

7.3 OBTENÇÃO DOS FRAGMENTOS DE MUTAGÊNESE, CLONAGEM E SUBCLONAGEM

Após o alinhamento entre as isoformas de eIF2 γ de *Leishmania infantum* e eIF2 γ de *T. brucei* para selecionar possíveis sítios de fosforilação, foi realizada amplificação dos fragmentos mutados com primers previamente desenhados e obtidos (Quadro 1). Importante salientar que as mutações S29A (MUT1) e S478A, S479A (MUT4) foram realizadas apenas uma etapa de PCR. Nas mutações T106A, T110A, P120 (MUT2) e mutações S118A e T119A (MUT3) foram realizadas PCRs em duas etapas como mostrado na (Figura 20). Em seguida, os amplicons obtidos foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1% (Figura 29) e posteriormente purificados.

Figura 29 - Amplificação dos fragmentos de mutagênese.

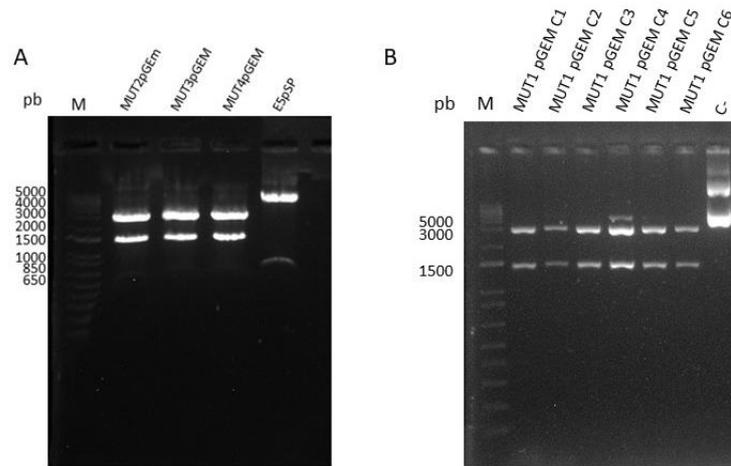


Fonte: A autora, 2021.

Legenda: A: Mostra fragmentos totais da MUT1 e MUT4 e *megaprimers* da MUT2 (MUT2A) e da MUT3 (MUT3A). B: Mostra todas as mutações completas com aproximadamente 1500pb. A mutagênese S29A (MUT1) possui 1437 pb; a mutagênese T106A, T110A e P120G (MUT2) possui *megaprimer* de 378 pb (MUT2A) e fragmento total de 1437pb; a mutagênese S118A e T119A (MUT3) possui *megaprimer* de 372 pb (MUT3A) com fragmento total de 1437pb e a mutagênese S478A e S479A (MUT4) possui um total 1470pb. Gel de agarose 1% corado com sybr safe (invitrogen). M: Marcador 1Kb DNA Ladder (invitrogen).

Após obtenção dos fragmentos, foi realizado a clonagem no pGEM®-T Easy (Promega) e em seguida extração plasmidial. As minipreparações de extração plasmidial foram submetidas a digestão com as enzimas ECORI (para confirmação do fragmento) e BamHI e HindIII (Figura 30), a fim de tornar as regiões de restrição adesivas para realizar a subclonagem no vetor pSP-BT1-Y-Neo-alfa.

Figura 30 - Digestões com BamHI e HindIII das construções MUT1, MUT2, MUT3 e MUT4 no vetor pGEM®-T Easy.

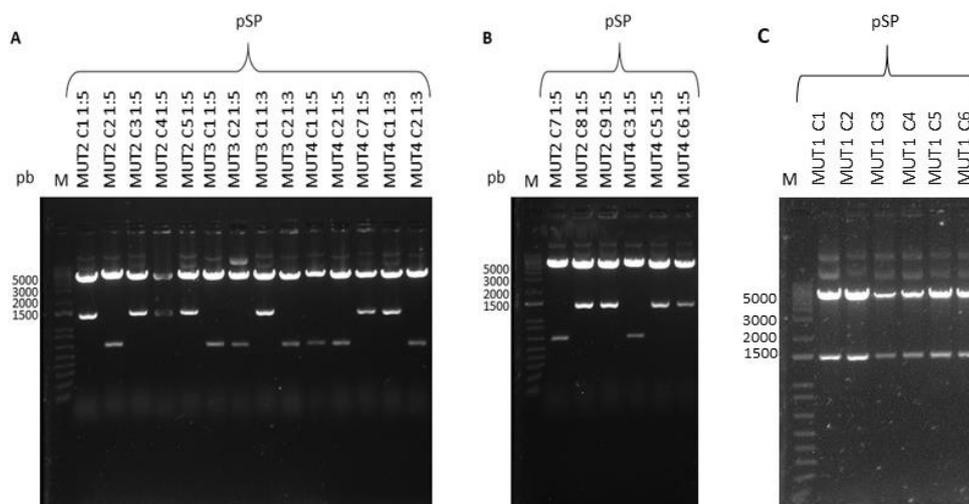


Fonte: A autora, 2020.

Legenda: A e B mostram confirmação da clonagem em pGEM®-T Easy com a liberação do inserto com 1440 pb das mutações. A: MUT1 e B: MUT2, MUT3 e MUT4. Último poço mostra (A) o vetor pSP com um inserto de aproximadamente 800 pb em que foi purificado apenas o vetor para ligação das mutagêneses obtidas. Gel de agarose 1% corado com sybr safe (invitrogen). M: Marcador 1kb DNA Ladder (invitrogen).

Foi realizada a ligação do inserto no vetor na proporção de 1:3 e 1:5 das mutações MUT2, MUT3 e MUT4 e 1:1 da MUT1. As extrações plasmidiais foram obtidas. Em seguida foram realizadas digestões com BamHI e HindIII (Figura 31) para confirmação e as amostras foram enviadas para o sequenciamento. Após a confirmação das mutações desejadas pelo sequenciamento foi realizada a transfecção em *Leishmania infantum*.

Figura 31 - Confirmação das extrações plasmidiais em pSP-BT1-Y-Neo-alfa por digestão com BamHI e HindIII das mutações MUT1, MUT2, MUT3 e MUT4.



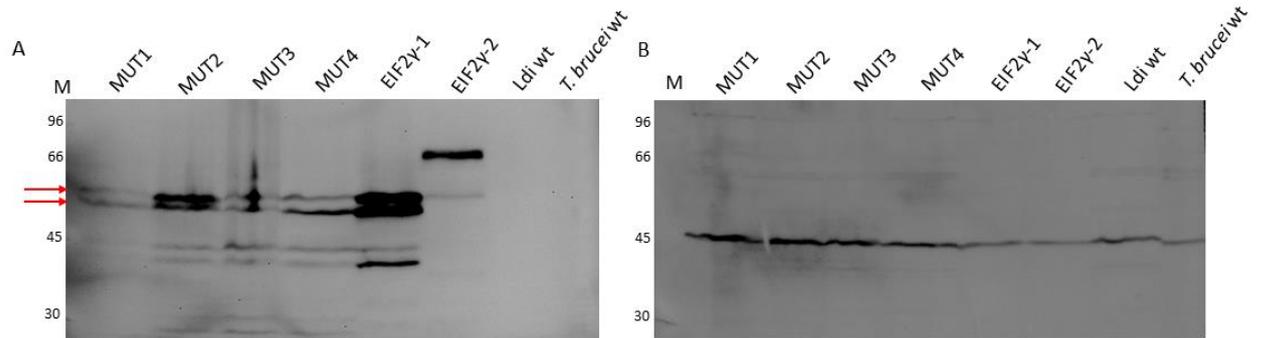
Fonte: A autora, 2020.

Legenda: A, B e C mostram a confirmação da clonagem em pSP com a liberação do inserto com 1440 pb das mutações MUT2 (C1, C3, C4, C5 1:5), MUT3 (C1 1:3), MUT4 (C5, C6, C7 1:5 e C1 1:3) e MUT1 (C1 a C6). Gel de agarose 1% corado com sybr safe (invitrogen). M: Marcador 1kb DNA Ladder (invitrogen).

7.4 ENSAIOS DE WESTERN BLOTTING COM AS MUTAÇÕES OBTIDAS

Após a obtenção das células transfectadas, foi realizado extrato total dessas células e em seguida feito ensaio de *western blotting* com o anticorpo monoclonal anti-HA. Todas as mutações (MUT1, MUT2, MUT3 e MUT4) apresentam o mesmo padrão de duas isoformas do EIF2 γ -1 de *L. infantum* WT (Figura 32 A) semelhante a expressão em curva de crescimento de promastigota do parasita selvagem mostrado na figura 22. Porém em diferentes intensidades, comparados com o *western blotting* anti-eIF4A1 como controle da reação (Figura 32 B). Portanto, as mutações escolhidas não afetaram o padrão das duas isoformas da proteína EIF2 γ -1 de *L. infantum*.

Figura 32 - Análise da expressão do eIF2 γ em extratos totais das células transfectadas.



Fonte: A autora, 2020.

Legenda: A: *Western blotting* com anticorpo anti-HA (Sigma-Aldrich). Extratos totais de 72h com 10^6 células. EIF2 γ -1 possui 53 kDa e EIF2 γ -2, 65kDa. Ldi wt e *T. brucei* wt: controles negativos. Seta em vermelho destaca a padrão de duas isoformas do EIF2 γ -1. B: *Western blotting* com soro anti-eIF4A1 (45 kDa) de *L. major* como controle. Gel SDS Page 15%. M: Marcador.

8 DISCUSSÃO

Estudos realizados com fatores de iniciação da tradução em mamíferos estão principalmente voltados a investigação do seu potencial como alvo terapêutico em tumores, onde também se enquadra o complexo eIF2 (HAO *et al.*, 2020; SONENBERG; HINNEBUSCH, 2009). Este complexo é essencial para o início e regulação da tradução, mas enquanto se sabe muito sobre a fosforilação do eIF2 α , pouco é conhecido sobre a fosforilação do eIF2 γ . A subunidade α do eIF2, quando é fosforilada, leva a uma diminuição na tradução global durante a diferenciação de *Leishmania* (CLOUTIER *et al.*, 2012). Em relação a subunidade γ do mesmo complexo, também foi visto que ela pode ser fosforilada pela PKC em células humanas, contudo seus efeitos *in vitro* sobre a tradução ainda não foram elucidados (ANDAYA *et al.*, 2011, 2014). Nesse cenário, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar a expressão e investigar modificações pós-traducionais dirigidas aos dois homólogos do fator de tradução eIF2 γ de *Leishmania infantum*.

Os resultados descritos em trabalhos anteriores demonstram que as interações do eIF2 são reguladas por modificações pós-traducionais assim como outros fatores da iniciação da tradução, por exemplo, o complexo eIF4F (BEILSTEN-EDMANDS *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2013). Em estudos anteriores foi visto que a subunidade eIF2 α de tripanossomatídeos é expressa constitutivamente durante toda a curva de crescimento (de 0h a 144h) e com uma única banda presente, em promastigotas e amastigotas, em análise de *western blotting* e que a subunidade eIF2 γ apresenta dois homólogos em *Leishmania infantum* (NASCIMENTO, 2016). Neste trabalho, a subunidade eIF2 γ não se comporta da mesma forma durante as curvas de crescimento uma vez que em promastigota o homólogo EIF2 γ -1 apresenta um perfil de expressão com duas isoformas durante a maior parte da curva, com o desaparecimento na fase estacionária e o homólogo EIF2 γ -2 é fracamente expresso apenas na fase exponencial. Em curva da forma amastigota, o primeiro homólogo também apresenta o mesmo perfil de duas isoformas, porém com provável diminuição da isoforma de maior tamanho ao longo da curva e o segundo homólogo não é visualizado.

O homólogo EIF2 γ -2 surgiu após uma duplicação gênica que ocorreu apenas nos tripanosomatídeos e evoluiu acumulando inserções e mutações que não foram

encontradas no gene EIF2 γ -1. Porém, importante salientar que no gênero *Trypanosoma*, apenas a espécie *Trypanosoma grayi* possui ambos os homólogos, ou seja, após o evento de duplicação ocorrido nos tripanossomatídeos houve um evento de perda nesse gênero (NASCIMENTO, 2016). Esse evento de duplicação também ocorreu no surgimento do gene da PABP3, identificado no gênero *Leishmania* (KRAMER *et al.*, 2013; NASCIMENTO, 2016). Há ainda diversos homólogos dos fatores da iniciação da tradução em tripanossomatídeos, por exemplo, eIF4E (eIF4E1 a 6) e eIF4G (eIF4G1 a 5) e que não é possível realizar a deleção de alguns desses homólogos, indicando assim que esses fatores são funcionalmente divergentes (DE MELO NETO *et al.*, 2015; MOURA *et al.*, 2015). Portanto, é provável uma diferença funcional entre esses dois homólogos corroborando com os resultados das diferenças no perfil de expressão dos homólogos EIF2 γ -1 e EIF2 γ -2. Porém, esses dois homólogos ainda apresentam conservação das suas sequências (NASCIMENTO, 2016), respaldando os resultados mostrados em ensaios de *western blotting* em que o EIF2 γ -2 é detectado pelo soro policlonal específico contra eIF2 γ .

Em seu ciclo de vida, os parasitas do gênero *Leishmania* passam por diferentes ambientes em seus hospedeiros. Com isso, ocorrem alterações dinâmicas na expressão gênica para se adaptar as condições de estresse. Aumento de temperatura, pH ácido e estresse nutricional pode desempenhar um papel importante na diferenciação da forma promastigota em amastigota além de levar a fosforilação do fator eIF2 α e com isso a diminuição da tradução global do mRNA, como já citado anteriormente (ABHISHEK *et al.*, 2017; CLOUTIER *et al.*, 2012; KARAMYSHEVA; GUARNIZO; KARAMYSHEV, 2020). Neste estudo foi possível avaliar o padrão de expressão dos homólogos do eIF2 γ em condições de estresses relacionados a temperatura, nutrição e peróxido de hidrogênio em células de *L. infantum* WT. Foi visto que tanto EIF2 γ -1 quanto o EIF2 γ -2 apresentaram o mesmo padrão que em condições normais. O primeiro com duas isoformas e o segundo não apresentando padrão de bandas.

A fosforilação como um mecanismo fisiológico regulatório desempenha um papel importante na vida celular (JOHNSON, 2009). Por exemplo, a taxa de síntese de proteínas em mamíferos é largamente regulada pela fosforilação da eIF2 α . Em condição de estresse ou inanição, como privação nutricional e infecção viral, ocorre a fosforilação do eIF2 α fazendo com que haja diminuição da tradução geral e facilitando

a tradução de transcritos específicos para adaptação ao estresse, por exemplo o ATF4 em mamíferos (BAIRD; WEK, 2012; DATTA *et al.*, 2001). Porém, nem todos os mecanismos pós-traducionais estão totalmente elucidados. Em estudo prévios de comparação dos fosfoproteomas de amastigotas e promastigotas de *L. donovani*, foram revelados 1614 resíduos de fosforilação (p-sítios) correspondente a 627 proteínas (TSIGANKOV *et al.*, 2013). Essa análise mostrou também que *Leishmania* contém proteínas com múltiplos p-sítios que são fosforilados em diferentes estágios do ciclo de vida do parasita e que o evento de fosforilação não necessariamente é proporcional à aumento de proteínas (exemplo da fosforilação do eIF2 α), sugerindo assim uma regulação funcional.

Como em outros tripanosomatídeos, a regulação da expressão gênica em *Trypanosoma brucei* ocorre exclusivamente pós-transcricional e foi observado que o controle da estabilidade de mRNAs nesse organismo pode estar relacionada a extensa fosforilação das proteínas de ligação ao RNA. Em estudo do fosfoproteoma de tripanosomatídeos realizado por (URBANIÁK; MARTIN; FERGUSON, 2013) foi visto que em *T. brucei*, o resíduo S29 do seu eIF2 γ único é um resíduo conservado e fosforilado. Com isso, foi realizada a mutação (MUT1) nesse sítio alvo para avaliar se esse resíduo também era responsável pela fosforilação em *Leishmania infantum*. Porém, após a mutação e avaliação por ensaios de *western blotting* não foi visto alteração no perfil de expressão do EIF2 γ -1, sugerindo que há diferenças nos sítios de fosforilação entre *T. brucei* e *L. infantum* ou que outras modificações pós-traducionais possam estar associadas com as duas isoformas observadas para essa proteína em *Leishmania*.

Em estudos anteriores foram vistos oito sítios de fosforilação no eIF2 γ humano e através de alinhamento entre as sequências dessa subunidade contra levedura e outras duas espécies de arqueas foi possível notar que somente a fosforilação treonina 66 (T66) exibiu conservação evolutiva em todas as quatro espécies. A partir deste resultado foi possível detectar a quinase PKC responsável pela fosforilação desse resíduo e do resíduo de treonina 56 (T56). Com isso, foi observado que mutação do domínio de ligação de GTP em resíduo de treonina (conhecidos por se ligarem a fosfato) diminuem a ligação do fator eIF2 γ ao Met-tRNAⁱ (ALONE; CAO; DEVER, 2008; ANDAYA *et al.*, 2011). Mutações nos resíduos E49 ou D83 do domínio N-terminal de eIF2 α bloqueiam a regulação da tradução em *Saccharomyces*

cerevisiae, porém apenas subconjuntos de mutações (K79, Y81, I82 e R88) prejudicou a fosforilação da serina 51 (DEY *et al.*, 2005). Neste trabalho foram escolhidos quatro sítios para mutações no EIF2 γ -1 em que a hipótese seria que esses sítios mutados alterariam a padrão de duas isoformas da subunidade EIF2 γ -1. No entanto, em análise por *western blotting* foi possível notar a permanência das duas isoformas do EIF2 γ -1 mesmo após as mutações terem sido realizadas. Provavelmente o resultado é semelhante a (DEY *et al.*, 2005) em que será necessário um conjunto de mutações simultâneas ou um estudo *in silico* mais aprofundado para descobrir os resíduos responsáveis pela fosforilação no EIF2 γ -1 e assim realizar as mutações nos sítios adequados.

Em ensaios de imunoprecipitação, seguido de espectrometria de massa, usando os dois homólogos ectopicamente expressos, marcados com um epítipo HA foi visto que o EIF2 γ -1 co-precipitou com o parceiro clássico do eIF2, o complexo EIF2B além de outras subunidades eIF2. Em relação ao EIF2 γ -2, nem o eIF2 β nem as subunidades do EIF2B foram co-precipitadas de forma eficiente. Ambos os homólogos co-precipitaram outros parceiros do eIF2 já conhecidos, como eIF5 e D123 (reguladora do eIF2). Também foi visto a co-precipitação por ambos os homólogos de proteínas quinases, incluindo a CRK3 regulada pelo ciclo celular (LIMA, dados não publicados), corroborando assim que um ou ambos os homólogos de eIF2 γ estão envolvidos em eventos regulatórios que podem estar relacionados com as modificações pós-traducionais.

Em geral esse estudo avaliou a diferença de expressão dos homólogos de eIF2 γ em *L. infantum* tanto nas formas promastigotas quanto nas formas amastigotas o que sugere que um ou ambos os homólogos de eIF2 γ possam estar envolvidos em eventos regulatórios. Porém, é importante conhecer e elucidar os diversos mecanismos de regulação dos fatores de iniciação da tradução, incluindo todas as subunidades o eIF2 (relevante fator do estágio de iniciação da tradução do mRNA) para elucidar pontos importantes de controle da expressão gênica em tripanosomatídeos, tornando-os alvos para inibidores específicos do processo de tradução.

9 CONCLUSÕES

- a) O homólogo EIF2 γ -1 apresenta um padrão de duas isoformas tanto na proteína nativa quanto na proteína com epítipo de HA;
- b) O homólogo EIF2 γ -2 exibe apenas um padrão de uma isoforma tanto na proteína nativa quanto na proteína com epítipo de HA;
- c) Em curvas de promastigotas de *Leishmania infantum* o padrão de duas isoformas da subunidade EIF2 γ -1 é mantido durante a maior parte da curva, tendo diminuição a partir de 120h (fase estacionária); EIF2 γ -2 se expressa fracamente apenas no tempo de 72h (fase exponencial);
- d) O EIF2 γ -1 é pelo menos dez vezes mais abundante do que EIF2 γ -2 em células promastigotas de *L. infantum* WT;
- e) Em curva de amastigota *Leishmania infantum* WT o padrão de duas isoformas do EIF2 γ -1 está presente durante toda curva, no entanto a de menor peso molecular é predominante;
- f) Condições de estresse de temperatura, estresse nutricional e estresse oxidativo em 1h e 6h em *L. infantum* WT promastigota não alteram significativamente o perfil de expressão de ambos os homólogos em *L. infantum* WT.
- g) As mutações realizadas não afetaram o perfil de expressão das isoformas.

REFERÊNCIAS

- ABHISHEK, K. *et al.* Crossm Phosphorylation of Translation Initiation. **Molecular and cellular biology**, Washington, DC, v. 37, n. 1, p. 1–19, Dec. 2017. Disponível em: https://journals.asm.org/doi/10.1128/MCB.00344-16?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed. Acesso em: 20 ago. 2019.
- ACKER, M. G.; LORSCH, J. R. Mechanism of ribosomal subunit joining during eukaryotic translation initiation. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 36, n. 4, p. 653–657, Aug. 2008.
- AKBARI, M.; ORYAN, A.; HATAM, G. Application of nanotechnology in treatment of leishmaniasis: A Review. **Acta Tropica**, Basel, v. 172, p. 86–90, Jan. 2017.
- AKHOUNDI, M. *et al.* Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 57, p. 1–29, Oct. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0098299716300450?via%3Dihub>. Acesso em: 22 ago. 2019.
- ALEMAYEHU, B.; ALEMAYEHU, M. Leishmaniasis: A Review on Parasite, Vector and Reservoir Host. **Health Science Journal**, Wolaita Sodo, v. 11, n. 4, p. 1–6, 2017. Aug. 2017. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/319675680_Leishmaniasis_A_Review_on_Parasite_Vector_and_Reservoir_Host/link/5a16cff0a6fdcc50ade4f65d/download. Acesso em: 23 ago. 2019.
- ALONE, P. V.; CAO, C.; DEVER, T. E. Translation Initiation Factor 2 γ Mutant Alters Start Codon Selection Independent of Met-tRNA Binding. **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 28, n. 22, p. 6877–6888, Nov. 2008.
- ANDAYA, A. *et al.* Phosphorylation of Human Eukaryotic Initiation Factor 2 γ : Novel Site Identification and Targeted PKC Involvement. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 10, n. 10, p. 4613–4623, Oct. 2011.
- ANDAYA, A. *et al.* Phosphorylation stoichiometries of human Eukaryotic initiation factors. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 15, n. 7, p. 11523–11538, Jun. 2014.
- ANVERSA, L. S. *et al.* Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associacao Medica Brasileira**, São Paulo, v. 64, n. 3, p. 281–289, Mar. 2018.
- AUGUSTO, L. *et al.* A Membrane-bound eIF2 Alpha Kinase Located in Endosomes Is Regulated by Heme and Controls Differentiation and ROS Levels in Trypanosoma cruzi. **PLOS Pathogens**, San Francisco, v. 11, n. 2, p. 1–32, Feb. 2015. Disponível em: <https://journals.plos.org/plospathogens/article?id=10.1371/journal.ppat.1004618>. Acesso em: 20 jan. 2021.
- AVILA, C. C. D. C. *et al.* Phosphorylation of eIF2 α on Threonine 169 is not required for Trypanosoma brucei cell cycle arrest during differentiation. **Molecular and**

Biochemical Parasitology, Amsterdam, v. 205, n. 1–2, p. 16–21, Mar. 2016.

BAIRD, T. D.; WEK, R. C. Eukaryotic initiation factor 2 phosphorylation and translational control in metabolism. **Advances in Nutrition**, Bethesda, v. 3, n. 3, p. 307–321, May. 2012.

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, Aug. 2007.

BEILSTEN-EDMANDS, V. *et al.* EIF2 interactions with initiator tRNA and eIF2B are regulated by post-translational modifications and conformational dynamics. **Cell Discovery**, London, v. 1, n. , p. 1–14, Aug. 2015. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(20\)31523-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS221124720315230%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(20)31523-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS221124720315230%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 30 ago. 2020.

BOCHLER, A. *et al.* Structural Differences in Translation Initiation between Pathogenic Trypanosomatids and Their Mammalian Hosts. **Cell Reports**, Cambridge v. 33, n. 12, p. 1–33, Dec.2020. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247\(20\)31523-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS221124720315230%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/cell-reports/fulltext/S2211-1247(20)31523-0?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS221124720315230%3Fshowall%3Dtrue). Acesso em: 30 ago. 2020

BORCK, G. *et al.* eIF2 γ Mutation that Disrupts eIF2 Complex Integrity Links Intellectual Disability to Impaired Translation Initiation. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 48, n. 4, p. 641–646, Nov. 2012.

BOWLES, D. *et al.* Armed Forces Pest Management Board. **Sand Flies (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): Significance, Surveillance, and Control in Contingency Operations**. Maryland: Armed Forces Pest Management Board, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia de vigilância em saúde**. 3 ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+3+-+Critérios+Diagnósticos+de+Infecção+Associada+à+Assistência+à+Saúde+Neonatalogia/9fa7d9be-6d35-42ea-ab48-bb1e068e5a7d>. Acesso em: 30 ago. 2020

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2017.

BROWNING, K. S.; BAILEY-SERRES, J. Mechanism of Cytoplasmic mRNA Translation. **The Arabidopsis Book**, Rockville, v. 13, n. 2, p. 176–264, Apr. 2015.

BURWICK, N.; AKTAS, B. H. The eIF2-alpha kinase HRI: a potential target beyond the red blood cell. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, London, v. 21, n. 12, p. 1171–1177, Dec. 2017.

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The Lancet**, London, v. 392, n. 10151, p. 951–970, Set. 2018.

- BUTENKO, A. *et al.* Comparative genomics of *Leishmania* (Mundinia). **BMC Genomics**, London, v. 20, n. 1, p. 1–12, Oct. 2019. Disponível em: <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-019-6126-y>. Acesso em: 30 ago. 2020
- CANTACESSI, C. *et al.* The past, present, and future of *Leishmania* genomics and transcriptomics. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 31, n. 3, p. 100–108, Mar. 2015.
- CARVALHO, T. U. de. **Microscopia Óptica**. Jun. 2017. Disponível em: <http://http://chagas.fiocruz.br/parasita/organizacao-estrutural/> Acesso em: 2 abr. 2020.
- CAVALCANTI, D. P.; SOUZA, W. The kinetoplast of trypanosomatids: From early studies of electron microscopy to recent advances in atomic force microscopy. **Scanning**, London, v. 2018, n. 1, p. 1–10, Jun 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/scanning/2018/9603051/>. Acesso em: 2 abr. 2020.
- CHOW, C. *et al.* Promastigote to amastigote differentiation of *Leishmania* is markedly delayed in the absence of PERK eIF2 α kinase-dependent eIF2 α phosphorylation. **Cellular Microbiology**, Oxford, v. 13, n. 7, p. 1059–1077, July. 20v11.
- CHRISTOPHER, U. T. H.; SARNOW, P. Internal ribosome entry sites in eukaryotic mRNA molecules. **Genes e Development**, Cold Spring Harbor, v. 15, n. 7, p. 1593–1612, July. 2001.
- CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 32, p. 46–51, Aug. 2016.
- CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal**, London, v. 21, n. 8, p. 1881–1888, Apr. 2002.
- CLAYTON, C. E. Networks of gene expression regulation in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 195, n. 2, p. 96–106, July. 2014.
- CLAYTON, C.; SHAPIRA, M. Post-transcriptional regulation of gene expression in trypanosomes and leishmanias. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 156, n. 2, p. 93–101, Dec. 2007.
- CLOUTIER, S. *et al.* Translational control through eIF2 α phosphorylation during the *Leishmania* differentiation process. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 7, n. 5, p.1-20, May. 2012. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0035085>. Acesso em: 2 abr. 2020.
- CODONHO, B. S. *et al.* HSP70 of *Leishmania amazonensis* alters resistance to different stresses and mitochondrial bioenergetics. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 111, n. 7, p. 460–468, June 2016.
- DANIELS, J.-P.; GULL, K.; WICKSTEAD, B. Cell Biology of the Trypanosome

Genome. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, DC, v. 74, n. 4, p. 552–569, Dec. 2010.

DATTA, R. *et al.* Protection of translation initiation factor eIF2 phosphorylation correlates with eIF2-associated glycoprotein p67 levels and requires the lysine-rich domain I of p67. **Biochimie**, Paris, v. 83, n. 10, p. 919–931, Oct. 2001.

DE GAUDENZI, J. G. *et al.* Gene expression regulation in trypanosomatids. **Essays In Biochemistry**, London, v. 51, p. 31–46, Oct. 2011.

DE MELO NETO, O. P. *et al.* The unique Leishmania EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. **RNA Biology**, Georgetown, v. 12, n. 11, p. 1209–1221, Sep. 2015.

DE VRIES, H. J. C.; REEDIJK, S. H.; SCHALLIG, H. D. F. H. Cutaneous Leishmaniasis: Recent Developments in Diagnosis and Management. **American Journal of Clinical Dermatology**, Auckland, v. 16, n. 2, p. 99–109, Apr. 2015.

DEAN, S. *et al.* A toolkit enabling efficient, scalable and reproducible gene tagging in trypanosomatids. **Open Biology**, London, v. 5, n. 1, p. 1–19, Jan. 2015. Disponível em: https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsob.140197?rfr_dat=cr_pub++0pubmed&url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org. Acesso em: 2 abr. 2020.

DEVER, T. E.; GREEN, R. The Elongation, Termination, and Recycling Phases of Translation in Eukaryotes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 4, n. 7, p. 1–29, July. 2012. Disponível em: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/4/7/a013706.long>. Acesso em: 2 abr. 2020.

DEVER, T. E.; KINZY, T. G.; PAVITT, G. D. Mechanism and regulation of protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Genetics**, Austin, v. 203, n. 1, p. 65–107, May. 2016.

DEY, M. *et al.* PKR and GCN2 Kinases and Guanine Nucleotide Exchange Factor Eukaryotic Translation Initiation Factor 2B (eIF2B) Recognize Overlapping Surfaces on eIF2 α . **Molecular and Cellular Biology**, Washington, DC, v. 25, n. 8, p. 3063–3075, Apr. 2005.

DONNELLY, N. *et al.* The eIF2 α kinases: Their structures and functions. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 70, n. 19, p. 3493–3511, Oct. 2013.

DOUGALL, A. *et al.* New reports of Australian cutaneous leishmaniasis in Northern Australian macropods. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 137, n. 10, p. 1516–1520, Oct. 2009.

ERICKSON, F. LES; HANNIG, E. M. Ligand interactions with eukaryotic translation initiation factor 2: Role of the γ -subunit. **EMBO Journal**, Eynsham, v. 15, n. 22, p. 6311–6320, Nov. 1996.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, DC, v. 26, n. 1, p. 58–85, Jan. 2013.

GASPAR, N. J. *et al.* Translation initiation factor eIF-2. Cloning and expression of the human cDNA encoding the γ -subunit. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 5, p. 3415–3422, Feb. 1994.

GORDIYENKO, Y.; LLÁCER, J. L.; RAMAKRISHNAN, V. Structural basis for the inhibition of translation through eIF2 α phosphorylation. **Nature Communications**, London, v. 10, n. 1, p. 1–11, June. 2019. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41467-019-10606-1>. Acesso em: 2 abr. 2020.

H. LOPES, A. Trypanosomatids: Odd Organisms, Devastating Diseases. **The Open Parasitology Journal**, London, v. 4, n. 1, p. 30–59, Mar. 2010.

HAILE, S.; PAPADOPOULOU, B. Developmental regulation of gene expression in trypanosomatid parasitic protozoa. **Current Opinion in Microbiology**, London, v. 10, n. 6, p. 569–577, Dec. 2007.

HAO, P. *et al.* Eukaryotic translation initiation factors as promising targets in cancer therapy. **Cell Communication and Signaling**, London, v. 18, n. 1, p. 1–20, Nov. 2020. Disponível em: <https://biosignaling.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12964-020-00607-9>. Acesso em: 2 jun. 2020.

HASHEM, Y.; FRANK, J. The Jigsaw Puzzle of mRNA Translation Initiation in Eukaryotes: A Decade of Structures Unraveling the Mechanics of the Process. **Annual Review of Biophysics**, Palo Alto, v. 47, n. 1, p. 125–151, May. 2018.

HASHIMOTO, N. N.; CARNEVALLI, L. S.; CASTILHO, B. A. Translation initiation at non-AUG codons mediated by weakened association of eukaryotic initiation factor (eIF) 2 subunits. **Biochemical Journal**, London, v. 367, n. 2, p. 359–368, Oct. 2002.

HERNÁNDEZ, G. *et al.* On the diversification of the translation apparatus across eukaryotes. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 2012 n.1, p. 1–30, May. 2012. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2012/256848/>. Acesso em: 2 jun. 2020.

HINNEBUSCH, A. G. The Scanning Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 83, n. 1, p. 779–812, Jan. 2014.

HINNEBUSCH, A. G.; LORSCH, J. R. The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, Woodbury, v. 4, n. 10, p. 1–25, Oct. 2012. Disponível em: <https://cshperspectives.cshlp.org/content/4/10/a011544.long>. Acesso em: 2 jun. 2020.

HOLCIK, M.; SONENBERG, N. Translational control in stress and apoptosis. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 6, n. 4, p. 318–327, Apr. 2005.

JACKSON, R. J.; HELLEN, C. U. T.; PESTOVA, T. V. The mechanism of eukaryotic translation initiation and principles of its regulation. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, London, v. 11, n. 2, p. 113–127, Feb. 2010.

JENNINGS, M. D. *et al.* eIF2 β is critical for eIF5-mediated GDP-dissociation inhibitor activity and translational control. **Nucleic acids research**, London, v. 44, n. 20, p. 9698–9709, Nov. 2016.

JOHNSON, L. N. The regulation of protein phosphorylation. **Biochemical Society Transactions**, London, v. 37, n. 4, p. 627–641, Aug. 2009.

KAPP, L. D.; LORSCH, J. R. The Molecular Mechanics of Eukaryotic Translation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto v. 73, n. 1, p. 657–704, Jun. 2004.

KARAKI, S. *et al.* The Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E (eIF4E) as a Therapeutic Target for Cancer. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 1–26. Oct. 2015. Disponível em: [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876-1623\(15\)00051-6](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876-1623(15)00051-6). Acesso em: 2 jun. 2020.

KARAMYSHEVA, Z. N.; GUARNIZO, S. A. G.; KARAMYSHEV, A. L. Regulation of translation in the protozoan parasite leishmania. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 21, n. 8, p. 1–15, 2020. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1422-0067/21/8/2981>. Acesso em: 2 jun. 2020.

KAUFER, A. *et al.* The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 1–17, Jun. 2017. Disponível em: <https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2204-7>. Acesso em: 2 jun. 2020.

KAUFER, A.; STARK, D.; ELLIS, J. A review of the systematics, species identification and diagnostics of the Trypanosomatidae using the maxicircle kinetoplast DNA: from past to present. **International Journal for Parasitology**, Oxford, v. 50, n. 6, p. 449–460, Jun. 2020.

KAZEMI, B. Genomic organization of Leishmania species. **Iranian Journal of Parasitology**, Tehran, v. 6, n. 3, p. 1–18, Aug. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3279888/>. Acesso em: 5 jun. 2020.

KIMBALL, S. R. Eukaryotic initiation factor eIF2. **Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 31, n. 1, p. 25–29, Jan. 1999.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: The case of kinetoplastids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 181, n. 2, p. 61–72, Oct. 2012.

KRAMER, S. *et al.* Differential Localization of the Two T. brucei Poly(A) Binding Proteins to the Nucleus and RNP Granules Suggests Binding to Distinct mRNA Pools. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. 1–30, Jan. 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0054004>. Acesso

em: 5 jun. 2020.

LAURINO, J. P. *et al.* The beta subunit of eukaryotic translation initiation factor 2 binds mRNA through the lysine repeats and a region comprising the C2-C2 motif. **Cell Biol**, Washington, DC, v. 19, n. 1, p. 173–181, Jan. 1999.

LES ERICKSON, F. *et al.* Minimum requirements for the function of eukaryotic translation initiation factor 2. **Genetics**, Austin, v. 158, n. 1, p. 123–132, May. 2001.

LIANG, X. H. *et al.* Trans and cis splicing in trypanosomatids: Mechanism, factors, and regulation. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 2, n. 5, p. 830–840, Oct. 2003.

LLANES, A. *et al.* The genome of *Leishmania panamensis*: insights into genomics of the *L.* (*Viannia*) subgenus. **Scientific Reports**, London, v. 5, n. 1, p. 1–24, Feb. 2015. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep08550>. Acesso em: 5 jun. 2020.

LLORENS, F. *et al.* The N-terminal domain of the human eIF2beta subunit and the CK2 phosphorylation sites are required for its function. **The Biochemical journal**, London, v. 394, n. 1, p. 227–236, Feb. 2006.

LUCENA, R. V.; MEDEIROS, J. S. Epidemiological characterization of human visceral leishmaniasis in northeast Brazil between 2010 and 2017. **Biofarm**, São Paulo, v. 14, n. 4, p. 285–298, July. 2018.

LUKEŠ, J. *et al.* Trypanosomatids Are Much More than Just Trypanosomes: Clues from the Expanded Family Tree. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 34, n. 6, p. 466–480, June. 2018.

MANNAERT, A. *et al.* Adaptive mechanisms in pathogens: Universal aneuploidy in *Leishmania*. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 28, n. 9, p. 370–376, Sep. 2012.

MARINTCHEV, A.; WAGNER, G. Translation initiation: structures, mechanisms and evolution. **Quarterly Reviews of Biophysics**, London, v. 37, n. 3–4, p. 197–284, Nov. 2004.

MARTINEZ-CALVILLO, S. *et al.* Epigenetic Regulation of Transcription in Trypanosomatid Protozoa. **Current Genomics**, Saif Zone, v. 19, n. 2, p. 140–149, Feb. 2017.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Akron, v. 2010, n. 1, p. 1–15, Feb. 2010. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2010/525241/>. Acesso em: 5 jun. 2020.

MASLOV, D. A. *et al.* Recent advances in trypanosomatid research: Genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**, London, v. 146, n. 1, p. 1–27, Jan. 2019. Disponível em: <https://www.cambridge.org/core/journals/parasitology/article/recent-advances-in-trypanosomatid-research-genome-organization-expression-metabolism-taxonomy-and-evolution/0B71FE52E53074DF5C82D03FF236ACFE>. Acesso em: 5 jun. 2020.

- MICHAELI, S. Trans-splicing in trypanosomes: Machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, London, v. 6, n. 4, p. 459–474, Apr. 2011.
- MINODIER, P.; PAROLA, P. Cutaneous leishmaniasis treatment. **Travel Medicine and Infectious Disease**, Amsterdam, v. 5, n. 3, p. 150–158, May. 2007.
- MONZOTE, L. Current treatment of leishmaniasis: a review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, New York, v. 1, n. 1, p. 9–19, Aug. 2009.
- MORAES, M. C. S. *et al.* Novel membrane-bound eIF2 α kinase in the flagellar pocket of *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, Washington, DC, v. 6, n. 11, p. 1979–1991, Nov. 2007.
- MOURA, D. M. N. *et al.* Two related trypanosomatid eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA Biology**, Georgetown, v. 12, n. 3, p. 305–319, Mar. 2015.
- NASCIMENTO, L. M. **Complexo eIF2 em Leishmania sp.**: expressão proteica, função biológica, interações moleculares e descrição de novo fator de iniciação da tradução. 2016. Tese Programa de Pós-Graduação em Genética - Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.
- NAVEAU, M. *et al.* Roles of yeast eIF2 α and eIF2 β subunits in the binding of the initiator methionyl-tRNA. **Nucleic Acids Research**, London, v. 41, n. 2, p. 1047–1057, Jan. 2013.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Avanços para superar o impacto global de doenças tropicais negligenciadas. **Primeiro relatório da OMS sobre doenças tropicais negligenciadas**. Geneva: WHO, 2010.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **Weekly epidemiological record**, Geneva, v. 95, n. 25, p. 265–280, 2020.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. **Leishmanioses: Informe epidemiológico das Américas**. Washington, DC: OPAS, 2020. Disponível em: <https://iris.paho.org/handle/10665.2/51742>. Acesso em: 20 ago. 2020.
- PEREIRA, M. M. C. *et al.* The eIF4E subunits of two distinct trypanosomatid eIF4F complexes are subjected to differential post-translational modifications associated to distinct growth phases in culture. **Molecular & Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 190, n. 2, p. 82–86, Aug. 2013.
- PINHEIRO, I. DE O. *et al.* First inventory of the sandfly fauna (Diptera: Psychodidae, Phlebotominae) in the municipality of Juiz de Fora, State of Minas Gerais, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio De Janeiro, v. 47, n. 1, p. 97–100, Feb. 2014.
- PREUSSER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes.

International Journal of Medical Microbiology, Jena, v. 302, n. 4–5, p. 221–224, Oct. 2012.

QUERIDO, J. B. *et al.* The cryo-EM Structure of a Novel 40S Kinetoplastid-Specific Ribosomal Protein. **Structure**, London, v. 25, n. 12, p. 1785–1794.e3, Dec. 2017.

RAMÍREZ, J. D. *et al.* Taxonomy, diversity, temporal and geographical distribution of Cutaneous Leishmaniasis in Colombia: A retrospective study. **Scientific Reports**, London, v. 6, n. 3, p. 1–10, Jun. 2016. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/srep28266>. Acesso em: 20 ago. 2020.

REQUENA, J. M. *et al.* Genes and Chromosomes of *Leishmania infantum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 92, n. 6, p. 853–858, Dec. 1997.

ROLL-MECAK, A. *et al.* X-ray Structure of Translation Initiation Factor eIF2 γ : Implications for tRNA and eIF2 α binding. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 11, p. 10634–10642, Mar. 2004.

RUIZ-POSTIGO, J. A.; GROUT, L.; JAIN, S. Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators. **World Health Organization Weekly epidemiological record**, Geneva, v. 95, n. 25, p. 265–280, June. 2020.

SACCO, L.; MASOTTI, A. Recent insights and novel bioinformatics tools to understand the role of MicroRNAs binding to 5' untranslated region. **International Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 14, n. 1, p. 480–495, Dec. 2013.

SCHMITT, E.; NAVEAU, M.; MECHULAM, Y. Eukaryotic and archaeal translation initiation factor 2: A heterotrimeric tRNA carrier. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 584, n. 2, p. 405–412, Jan. 2010.

SILVA, M. S. *et al.* Consequences of acute oxidative stress in *Leishmania amazonensis*: From telomere shortening to the selection of the fittest parasites. **Biochimica et Biophysica Acta Molecular Cell Research**, Amsterdam, v. 1864, n. 1, p. 138–150, Jan. 2017.

SILVA, R. M. A. M. da. **Da clonagem gênica ao anticorpo: avaliação da expressão de homólogos da subunidade gamma do fator de iniciação da tradução EIF2 de *Leishmania infantum***. 2018. Monografia Biomedicina - Centro de Biociências, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SONENBERG, N.; HINNEBUSCH, A. G. Regulation of translation initiation in eukaryotes. **Cell**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 731–745, Feb. 2009.

SOUZA, W.; DE CARVALHO, T. U.; BARRIAS, E. S. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with host cells. **American Trypanosomiasis Chagas Disease**, Amsterdam, v. 2, n. 18, p. 401–427. Sep. 2017

STEVEDING, D. The history of leishmaniasis. **Parasites and Vectors**, London, v. 10, n. 1, p. 1–10, Feb. 2017. Disponível em:

<https://parasitesandvectors.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13071-017-2028-5>. Acesso em: 20 jan. 2021.

STUART, K. *et al.* Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, New Haven, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, Apr. 2008.

SUDHAKAR, A. *et al.* Phosphorylation of serine 51 in initiation factor 2 α (eIF2 α) promotes complex formation between eIF2 α (P) and eIF2B and causes inhibition in the guanine nucleotide exchange activity of eIF2B. **Biochemistry**, Washington, DC, v. 39, n. 42, p. 12929–12938, Oct. 2000.

SUNDAR, S.; SINGH, B. Emerging therapeutic targets for treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, London, v. 22, n. 6, p. 467–486, June. 2018.

TORRES-GUERRERO, E. *et al.* Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, London, v. 6, n. May, p. 1–15, May. 2017. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/6-750/v1>. Acesso em: 20 abr. 2020

TSIGANKOV, P. *et al.* Phosphoproteomic analysis of differentiating Leishmania parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. **Journal of Proteome Research**, Washington, DC, v. 12, n. 7, p. 3405–3412, July. 2013.

UNBEHAUN, A. Release of initiation factors from 48S complexes during ribosomal subunit joining and the link between establishment of codon-anticodon base-pairing and hydrolysis of eIF2-bound GTP. **Genes & Development**, v. 18, n. 24, p. 3078–3093, Dec. 2004.

URBANIYAK, M. D.; MARTIN, D. M. A.; FERGUSON, M. A. J. Global quantitative SILAC phosphoproteomics reveals differential phosphorylation is widespread between the procyclic and bloodstream form lifecycle stages of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Proteome Research**, Cold Spring Harbor, v. 12, n. 5, p. 2233–2244, Dec. 2013.

VOLPON, L.; OSBORNE, M. J.; BORDEN, K. L. B. Biochemical and Structural Insights into the Eukaryotic Translation Initiation Factor eIF4E. **Current Protein & Peptide Science**, Hilversum, v. 20, n. 6, p. 525–535, Jan. 2019.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The limits on trypanosomatid morphological diversity. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 8, n. 11, p. 1–45, Nov. 2013. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0079581>. Acesso em: 20 abr. 2020.

ZINOVIEV, A.; SHAPIRA, M. Evolutionary conservation and diversification of the translation initiation apparatus in trypanosomatids. **Comparative and Functional Genomics**, Chichester, v. 2012, n. 1, p. 1–23, Jul. 2012. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2012/813718/>. Acesso em: 20 abr. 2020.