

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

DANIELA DE LAET SOUZA

**Caracterização da ribonucleoproteína RBP42
no parasito *Trypanosoma cruzi*
sob condições de estresse**

Belo Horizonte
Fevereiro, 2019

DANIELA DE LAET SOUZA

**Caracterização da ribonucleoproteína RBP42
no parasito *Trypanosoma cruzi*
sob condições de estresse**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientadora: Prof. Dra. Glória Regina Franco
Coorientadora: Dra. Daniela Ferreira Chame

Belo Horizonte
Fevereiro, 2019

043 Souza, Daniela de Laet.
Caracterização da ribonucleoproteína RBP42 no parasito *Trypanosoma cruzi*
sob condições de estresse [manuscrito] / Daniela de Laet Souza. – 2019.
130 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Glória Regina Franco. Coorientadora: Dra. Daniela
Ferreira Chame.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia.

1. Bioquímica. 2. Ribonucleoproteínas. 3. *Trypanosoma cruzi*. I. Franco,
Glória Regina. II. Chame, Daniela Ferreira. III. Universidade Federal de Minas
Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 577.1



Universidade Federal de Minas Gerais
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3409-2615



ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE DANIELA DE LAET SOUZA. Aos vinte e cinco dias do mês de fevereiro de 2019 às 14:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da dissertação de Mestrado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado ""Caracterização da ribonucleoproteína RBP42 no parasito Trypanosoma cruzi sob condições de estresse"", requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Bioquímica e Imunologia, área de concentração: Bioquímica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa. Glória Regina Franco, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Vinicius de Toledo Ribas (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Daniela Ferreira Chame - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. Glória Regina Franco - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

APROVADA
 REPROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 25 de fevereiro de 2019.

Dr. Vinicius de Toledo Ribas (UFMG)

Dr. Ronaldo Alves Pinto Nagem (UFMG)

Dra. Daniela Ferreira Chame - Coorientadora (UFMG)

Dr. Glória Regina Franco - Orientadora (UFMG)

DECANO DO PPG
 EM BIOQUÍMICA E IMUNOLOGIA

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha orientadora Glória Regina Franco pela confiança e pela oportunidade de integrar o seu grupo de pesquisa. Seus ensinamentos foram muito importantes para o meu crescimento acadêmico e para a minha formação científica. Agradeço pelo seu suporte, dedicação e pelo incentivo de fazer sempre o melhor possível. Obrigada também pelo seu grande carinho e generosidade.

À minha coorientadora Daniela Ferreira Chame um agradecimento especial pela grande amizade, generosidade e enorme colaboração na realização deste trabalho. Obrigada pelo seu bom humor, paciência, dedicação e cuidado durante os nossos longos dias de experimento. Agradeço também pelo seu suporte e por ter me ensinado a maioria das técnicas que utilizei nesse trabalho. Agradeço ainda pelo auxílio na preparação das minhas apresentações e resumos. Saiba que você também contribuiu muito para a minha formação científica e para o meu crescimento como pessoa.

Aos professores Carlos Renato Machado, Erich Birelli Tahara e Andrea Mara Macedo agradeço por todo o suporte e pelas sugestões durante as nossas reuniões.

À doutora Helaine Grazielle Santos Vieira agradeço pela sua imensa contribuição na construção dos vetores utilizados nesse trabalho.

À professora Patrícia Massara Martinelli agradeço pelo suporte e orientação que foram muito importantes para o sucesso de nossos experimentos de microscopia eletrônica de transmissão.

Obrigada ao Bruno Marçal Repolês por ter dividido comigo um pouco de seus conhecimentos sobre modelagem comparativa. Obrigada pela sua disposição em ajudar sempre que preciso.

Obrigada ao Willian Prado pela sua grande ajuda nas análises de bioinformática.

Agradeço aos meus amigos Gloriosos pela amizade, apoio e pelas contribuições durante as nossas reuniões.

A todos os membros do Laboratório de Genética Bioquímica da UFMG agradeço pela amizade, boa convivência e ajuda durante esses dois anos de trabalho.

Agradeço ao CAPI, Centro de Microscopia da UFMG e CDTN pelo apoio técnico.

Agradeço às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG pelo suporte financeiro.

Um agradecimento especial a minha família por todo apoio e carinho durante essa longa caminhada. Vocês acreditaram no meu sonho e me incentivaram a fazer sempre o melhor com muito zelo e dedicação. Saibam que vocês são os meus maiores exemplos de força e coragem.

*“O começo de todas as ciências é o espanto
de as coisas serem o que são.”*

Aristóteles

RESUMO

Proteínas ligantes de RNA (RBPs) são componentes essenciais na regulação da expressão gênica. A interação entre RBPs e seus mRNA alvos formam os complexos ribonucleoproteicos que ditam o destino dos transcritos e podem se agregar em grânulos citoplasmáticos microscopicamente visíveis em resposta a estímulos capazes de causar a parada súbita da tradução. No *Trypanosoma cruzi* existe um grande repertório de grânulos, que podem integrar os mecanismos que conferem a esse parasito a sua notável resistência a diferentes tipos de estresse. A ribonucleoproteína RBP42, estudada frequentemente nos tripanosomatídeos, foi descrita pela primeira vez no *Trypanosoma brucei* como sendo uma proteína citoplasmática essencial para a viabilidade celular. Nesse trabalho realizamos a caracterização da proteína RBP42 do *T. cruzi* CL Brener (TcbRBP42). Inicialmente, as características dos genes e da proteína TcbRBP42 foram estudadas *in silico*. As predições de estrutura secundária e buscas por domínios conservados mostraram que a proteína TcbRBP42 apresenta uma estrutura modular composta por dois domínios estruturados, NTF2-like e RRM, ligados entre si por uma longa região central desordenada e enriquecida em sequências de baixa complexidade. Essas características também foram encontradas em seus ortólogos presentes em outros cinetoplastídeos. Adicionalmente, essa proteína é codificada por apenas dois alelos no genoma do parasito. A proteína TcbRBP42 também foi caracterizada no contexto do estresse celular induzido pela radiação gama e pelo benzonidazol, dois agentes aos quais esse parasito apresenta resistência. Para fins de detecção, uma versão recombinante dessa proteína marcada com uma cauda de histidina (rTcbRBP42) foi expressa em epimastigotas. A expressão de rTcbRBP42 não alterou o padrão de crescimento das epimastigotas mantidas em condições normais de cultivo ou submetidas aos tratamentos com radiação gama e benzonidazol. A parada de crescimento ocasionada pelo estresse foi muito similar em epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e *wild type*. Ensaios de imunofluorescência mostraram que o tratamento dos parasitos com esses agentes promove a distribuição diferencial de rTcbRBP42 que se acumula em estruturas citoplasmáticas granulares, cujas características variam de acordo com o tipo de estresse aplicado. A marcação dos RNAs sintetizados após a indução de estresse também revelou o efeito diferencial dos tratamentos na distribuição celular desses RNAs. Após a irradiação, os RNAs recém-sintetizados não formam grânulos; em vez disso, estes são transportados e se espalham por todo o citoplasma dos parasitos. Em contrapartida, foi observada a agregação desses em focos citoplasmáticos após exposição ao benzonidazol. Esses focos não foram colocalizados com aqueles de rTcbRBP42, o que sugere que os RNAs

presentes nessas estruturas provavelmente não são alvos dessa proteína. Em conjunto, os dados sugerem que TcbRBP42 é uma ribonucleoproteína capaz de formar grânulos em resposta a diferentes condições de estresse. Esses grânulos provavelmente variam em composição de acordo com o estresse aplicado e podem ser parte dos muitos mecanismos que permitem a sobrevivência do *T. cruzi* aos estresses causados pela radiação gama e pelo benzonidazol.

ABSTRACT

RNA binding proteins (RBPs) are essential components for gene expression regulation. The interaction between RBPs and target mRNAs forms ribonucleoprotein complexes that dictate RNA fate and may aggregate into microscopically visible cytoplasmic foci in response to stimuli capable of stalling translation. In *Trypanosoma cruzi*, there is a large repertoire of granules that may integrate the mechanisms underlying the remarkable resistance this parasite presents to different kinds of stress. The ribonucleoprotein RBP42, frequently studied in trypanosomatids, was first described in *Trypanosoma brucei* as a cytoplasmic protein essential for cell viability. In this work, we characterize the protein RBP42 present in the *T. cruzi* CL Brener (TcbRBP42). Initially, TcbRBP42 genes and protein characteristics were studied *in silico*. Secondary structure predictions and conserved domain searches revealed the modular architecture of TcbRBP42. There are two structured domains, NTF2-like and RRM, linked together by an extended disordered region enriched in low complexity sequences. These characteristics were also found in its orthologues from other kinetoplastids. Additionally, only two alleles code for this protein in the parasite genome. TcbRBP42 was also characterized under the cellular stress induced by gamma radiation and benznidazole. *T. cruzi* presents resistance to both agents. For detection purposes, a 6His-tagged version of this protein was transfected into epimastigotes (rTcbRBP42). The rTcbRBP42 expression did not modify epimastigotes growth pattern in both normal and stress culturing conditions. The growth arrest caused by stress was very similar in transfected and *wild-type* epimastigotes. Immunofluorescence assays revealed that both stress conditions tested promote a differential distribution of rTcbRBP42. This protein accumulates into granular cytoplasmic structures with characteristics varying according to the kind of stress applied. Labeling of RNAs synthesized after stress induction also showed the differential effect of both treatments tested on RNA cellular distribution. After irradiation, newly synthesized RNAs do not form granules; instead, they are transported to and spread throughout the parasite cytoplasm. In contrast, after benznidazole exposure these RNAs aggregate into cytoplasmic foci. These foci were not colocalized with those of rTcbRBP42, suggesting this protein does not interact with the RNAs present in these structures. Taken together, our data suggest that TcbRBP42 is a ribonucleoprotein capable of forming granules in response to stress conditions. These structures probably vary in composition according to the kind of stress applied and may be part of the various mechanisms allowing parasite survival to the stresses caused by gamma radiation and benznidazole.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Distribuição mundial dos casos de doença de Chagas no período de 2006 a 2015 baseada em estimativas oficiais. | 20 |
| Figura 2: Fases da doença de Chagas. | 21 |
| Figura 3: Vista esquemática e micrografias dos estágios de desenvolvimento do <i>T. cruzi</i> | 23 |
| Figura 4: Ciclo de vida do parasito <i>T. cruzi</i> | 24 |
| Figura 5: Processamento de mRNAs nos tripanosomatídeos. | 27 |
| Figura 6: Mapa do vetor pROCKGFP_Neo..... | 29 |
| Figura 7: Ciclo do mRNA..... | 35 |
| Figura 8: Microscopia de fluorescência dos grânulos de RNA de tripanosomatídeos. | 36 |
| Figura 9: Representação esquemática das etapas de clonagem utilizadas na construção dos vetores para expressão de proteínas recombinantes..... | 49 |
| Figura 10: Cobertura de <i>reads</i> do gene TcbRBP42 do haplótipo Não Esmeraldo-like..... | 56 |
| Figura 11: Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes RBP42 do <i>T. cruzi</i> CL Brener. | 58 |
| Figura 12: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas RBP42 do <i>T. cruzi</i> CL Brener. | 59 |
| Figura 13: Contexto genômico do gene TcbRBP42 do haplótipo Esmeraldo-like..... | 60 |
| Figura 14: Contexto genômico do gene TcbRBP42 do haplótipo Não Esmeraldo-like..... | 61 |
| Figura 15: Análise da estrutura da proteína RBP42 do <i>T. cruzi</i> CL Brener e de outros tripanosomatídeos. | 64 |
| Figura 16: Comparação de sequência entre as proteínas RBP42 de tripanosomatídeos. | 66 |
| Figura 17: Modelos moleculares propostos para os domínios de TcbRBP42. | 68 |
| Figura 18: Validação dos modelos 3D propostos para os domínios de TcbRBP42..... | 69 |
| Figura 19: Logo do alinhamento múltiplo de sequências de proteínas RBP42 de diferentes espécies de cinetoplastídeos. | 71 |
| Figura 20: Relações filogenéticas entre espécies de cinetoplastídeos inferidas a partir de sequências proteicas de RBP42. | 72 |
| Figura 21: Confirmação da presença dos insertos de TcbRBP42 e GFP por PCR de colônia..... | 74 |
| Figura 22: Resultado do sequenciamento do vetor pRock_SBP/6His_RBP42. | 75 |
| Figura 23: Digestão dos vetores para transfecção do <i>T. cruzi</i> CL Brener. | 77 |
| Figura 24: Confirmação da expressão de rTcbRBP42 e GFP por <i>Western blot</i> | 78 |

| | |
|---|----|
| Figura 25: Expressão relativa dos transcritos de TcbRBP42. | 79 |
| Figura 26: Avaliação do crescimento de epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e GFP nas condições normais e de estresse. | 81 |
| Figura 27: Localização celular de rTcbRBP42 e GFP na condição normal e irradiada. | 83 |
| Figura 28: Localização do RNA recém-sintetizado na condição normal e irradiada. | 84 |
| Figura 29: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas irradiadas e não irradiadas. | 86 |
| Figura 30: Efeito da actinomicina D na condição normal e irradiada. | 88 |
| Figura 31: Efeito da puromicina na condição normal e irradiada. | 89 |
| Figura 32: Expressão do gene TcbRBP42 (Esmeraldo-like) e de seus genes vizinhos em condições normais e 24 h após exposição à radiação gama. | 91 |
| Figura 33: Expressão do gene TcbRBP42 (Não Esmeraldo-like) e de seus genes vizinhos em condições normais e 24 h após exposição à radiação gama. | 92 |
| Figura 34: Localização celular de rTcbRBP42 e GFP no estresse induzido por benzonidazol. | 94 |
| Figura 35: Localização do RNA recém-sintetizado no estresse induzido por benzonidazol. | 96 |
| Figura 36: Efeito da puromicina no estresse induzido por benzonidazol. | 97 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Lista de <i>primers</i> para TcbRBP42 e GFP | 50 |
| Tabela 2: Características dos genes de RBP42 do <i>T. cruzi</i> CL Brener..... | 57 |
| Tabela 3: Identidade e similaridade de sequência (%) entre as proteínas RBP42 do <i>T. cruzi</i> CL Brener e suas proteínas homólogas de outros tripanosomatídeos e G3BP1 de humanos | 65 |

LISTA DE ABREVIATURAS

- ARE:** Elementos ricos em adeninas e uracilas
- BSA:** Albumina sérica bovina
- BZ:** Benzonidazol
- CAPI:** Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB-UFMG
- CDTN:** Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear
- CTNBio:** Comissão Técnica Nacional de Biossegurança
- DMSO:** Dimetilsulfóxido
- DTUs:** Unidades discretas de tipagem
- EU:** 5-etiniluridina
- FISH:** Hibridização fluorescente *in situ*
- G3BP1:** Proteína ligante do domínio SH3 de RasGAP 1
- GAPDH:** Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
- GFP:** Proteína verde fluorescente
- ICB:** Instituto de Ciências Biológicas
- IDRs:** Regiões intrinsecamente desordenadas
- LbRBP42:** Proteína RBP42 da *Leishmania braziliensis*
- LGB:** Laboratório de Genética Bioquímica
- MASPs:** Proteínas de superfície associadas a mucinas
- NMR:** Ressonância magnética nuclear
- NTF2:** Fator de transporte nuclear 2
- NTF2-like:** Fator de transporte nuclear 2-like
- PABP:** Proteína ligante de cauda poli-A
- P-bodies:** Corpos de processamento
- PBS:** Tampão fosfato-salino
- PCR:** Reação em cadeia da polimerase
- PDB:** *Protein Data Bank*
- PPII:** Hélice de proliprolina II
- PVDF:** Fluoreto de polivinilideno
- PxxP:** Motivos ricos em prolina
- RBP42:** Proteína ligante de RNA 42
- RBPs:** Proteínas ligantes de RNA
- RMSD:** Desvio médio quadrático

RNA-seq: Sequenciamento de RNA

RNP1: Motivo ligante de RNA 1

RNP2: Motivo ligante de RNA 2

RNPs: Complexos ribonucleoproteicos

RRM: Motivo de reconhecimento de RNA

rTcbRBP42: Versão recombinante da proteína RBP42 do *Trypanosoma cruzi* CL Brener

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SGs: Grânulos de estresse

SL: *Spliced Leader*

SLe: Região exônica do RNA *Spliced Leader*

SLi: Região intrônica do RNA *Spliced Leader*

SLTS: *Spliced Leader Trans Splicing*

SNPs: Polimorfismos de nucleotídeo único

SSR: Regiões de inversão de fita

TbRBP42: Proteína RBP42 do *Trypanosoma brucei*

TcbRBP42: Proteína RBP42 do *Trypanosoma cruzi* CL Brener

TcyRBP42: Proteína RBP42 do *Trypanosoma cruzi* Y

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UTR: Regiões não traduzidas

WT: *Wild type*

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 17 |
| 1.1 Ordem Kinetoplastida..... | 17 |
| 1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 18 |
| 1.2.1 Doença de Chagas | 18 |
| 1.2.2 Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> | 22 |
| 1.2.3 Genoma de referência..... | 25 |
| 1.2.4 Transcrição e processamento do RNA | 26 |
| 1.2.5 Manipulação genética..... | 28 |
| 1.3 Proteínas ligantes de RNA e regulação da expressão gênica | 30 |
| 1.4 Grânulos de RNA..... | 32 |
| 1.5 Proteína Ligante de RNA 42..... | 37 |
| 1.6 Efeitos da Radiação Gama..... | 39 |
| 1.7 Mecanismo de ação do benzonidazol..... | 40 |
| 2. JUSTIFICATIVA..... | 41 |
| 3. OBJETIVOS | 42 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 42 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 42 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 43 |
| 4.1 Caracterização do gene TcbRBP42 | 43 |
| 4.2 Caracterização das estruturas primária e secundária de TcbRBP42 | 44 |
| 4.3 Modelagem comparativa | 44 |
| 4.4 Análise de conservação proteica e inferência filogenética..... | 45 |
| 4.5 Construção de vetores de expressão..... | 47 |
| 4.6 Cultura e transfecção de epimastigotas do <i>T. cruzi</i> CL Brener | 48 |
| 4.7 <i>Western blot</i> | 51 |
| 4.8 PCR em tempo real | 52 |
| 4.9 Tratamento do <i>T. cruzi</i> com radiação gama e benzonidazol | 52 |
| 4.10 Microscopia de Fluorescência e Eletrônica de Transmissão | 53 |
| 5. RESULTADOS..... | 54 |
| 5.1 Caracterização do gene de TcbRBP42 e de seu contexto genômico | 54 |

| | |
|--|------------|
| 5.2 Caracterização da sequência e da estrutura secundária da proteína TcbRBP42..... | 62 |
| 5.3 Estrutura 3D dos domínios de TcbRBP42..... | 67 |
| 5.4 Análise de conservação proteica e filogenia..... | 70 |
| 5.5 Construção de vetores | 73 |
| 5.6 Expressão de proteínas recombinantes no <i>T. cruzi</i> | 76 |
| 5.7 Avaliação fenotípica das epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e GFP em condições normais e de estresse | 80 |
| 5.8 Avaliação da localização celular de rTcbRBP42 e GFP por microscopia de fluorescência..... | 82 |
| 5.8.1 Estresse induzido por radiação gama | 82 |
| 5.8.2 Estresse induzido por benzonidazol | 93 |
| 6. DISCUSSÃO | 98 |
| 7. CONCLUSÕES | 112 |
| REFERÊNCIAS | 114 |
| APÊNDICE A – Alinhamentos para a modelagem dos domínios de TcbRBP42..... | 127 |
| APÊNDICE B – Alinhamento múltiplo de sequências de RBP42 | 128 |

1. INTRODUÇÃO

1.1 Ordem Kinetoplastida

Os cinetoplastídeos constituem um grupo de protozoários flagelados que engloba espécies de vida livre e parasitos de animais, insetos e plantas. Incluída nessa ordem está a família Tripanosomatidae que possui várias espécies de importância médica. Dentre as quais estão o *Trypanosoma cruzi*, que é o agente etiológico da doença de Chagas no continente americano, o *Trypanosoma brucei* que causa a doença do sono no continente africano, e espécies do gênero *Leishmania* que são responsáveis pelas leishmanioses no Novo e no Velho Mundo. Todos esses parasitos apresentam ciclos biológicos muito complexos, acompanhados de uma regulação precisa da expressão gênica capaz de promover as mudanças morfológicas e metabólicas essenciais para a sobrevivência desses organismos em seus hospedeiros mamíferos e insetos vetores (BERTHIER *et al.*, 2016; KRAMER, 2012; LUKEŠ *et al.*, 2014).

Entre os cinetoplastídeos, os organismos mais estudados são aqueles pertencentes à família dos tripanosomatídeos. Além da relevância médica, a organização do genoma e regulação da expressão gênica nesses parasitos apresentam características únicas entre os eucariotos. Uma das características mais marcantes dos tripanosomatídeos é a presença do cinetoplasto (DNA mitocondrial). O cinetoplasto, que também dá nome à ordem Kinetoplastida, é constituído por um grande número de moléculas de DNA circular (maxicírculos e minicírculos) conectados entre si. Cerca de doze maxicírculos idênticos codificam as proteínas mitocondriais e milhares de minicírculos heterogêneos codificam diferentes RNAs guias, que são utilizados para a edição de RNAs mitocondriais pela inserção e deleção de uridinas (READ; LUKEŠ; HASHIMI, 2016). Outras características singulares dos tripanosomatídeos incluem: (i) genes organizados em grandes unidades transcricionais policistrônicas, (ii) número reduzido de promotores típicos da RNA polimerase II, (iii) transcrição de alguns genes codificadores de proteína pela RNA polimerase I, (iv) processamento dos pré-mRNAs policistrônicos pelo mecanismo do *Spliced leader trans-splicing*, (v) via glicolítica compartimentalizada em organelas (glicossomos) e (vi) capacidade de evasão de vacúolos fagocíticos (CAMPBELL; THOMAS; STURM, 2003; SIMPSON; STEVENS; LUKEŠ, 2006).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana foi descoberta pelo pesquisador e médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas em 1909. Na ocasião, Carlos Chagas realizou o feito notável de identificar o agente etiológico da doença, os vetores, alguns dos animais reservatórios e as manifestações clínicas. Atualmente a doença de Chagas figura entre as 20 doenças tropicais negligenciadas que acometem mais de um bilhão de pessoas residentes de 149 países. Estima-se que de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, principalmente na América Latina onde a doença é endêmica em 21 países, e que 75 milhões de indivíduos se encontrem sob o risco de infecção. Nos últimos anos, casos da doença também vêm sendo reportados de forma crescente em países não endêmicos em decorrência, principalmente, de eventos de migração populacional (**Figura 1**). No Brasil, estimativas do ano de 2010 indicavam que cerca de 1,2 milhões de pessoas eram portadoras da doença e que cerca de outras 25,5 milhões estavam sob o risco de infecção pelo parasito (DIAS, 2015; WHO, 2017, 2018).

A infecção do ser humano pelo *T. cruzi* nas áreas endêmicas ocorre principalmente pela via vetorial. Nessa via, a transmissão acontece quando as fezes de insetos triatomíneos contaminados, depositadas durante o repasto sanguíneo do vetor, entram em contato com o local da picada, lesões já existentes na pele ou com as mucosas íntegras dos olhos e da boca. Outras vias de transmissão da doença são o consumo de alimentos contaminados com as fezes dos insetos vetores infectados, transfusões de sangue ou transplantes de órgãos oriundos de doadores infectados, transmissão de mãe para o filho na gestação ou parto e por acidentes de laboratório. Dados os mecanismos de transmissão da doença e a inexistência de uma vacina, o controle do vetor e a triagem de doadores de sangue e órgãos são medidas essenciais para a prevenção de novos casos da doença (STANAWAY; ROTH, 2015; WHO, 2016).

Após a transmissão do parasito, a doença de Chagas se desenvolve nas fases aguda e crônica. A fase aguda da doença se inicia após um período de incubação de 1-2 semanas no caso da infecção vetorial. Essa fase se caracteriza pela alta parasitemia e pode se estender de 4 a 8 semanas. A grande maioria das infecções em fase aguda são assintomáticas ou exibem sintomas leves e inespecíficos como febre. Um número limitado de pessoas apresenta nódulos na pele ou edema de pálpebra (chagomas e sinal de Romana, respectivamente) que podem indicar o local de entrada do parasito no organismo. Na fase crônica da doença, os parasitos se

encontram principalmente nos músculos cardíaco e digestivo. A maioria das pessoas em fase crônica permanece assintomática por toda vida (forma indeterminada), mas cerca de 20-30% dessas progridem para um quadro sintomático da doença (forma determinada) em um período que pode variar de anos a décadas. As complicações da fase crônica incluem o desenvolvimento de megaesôfago, megacólon e cardiomiopatias que podem levar à ocorrência de acidentes vasculares cerebrais (AVCs) em decorrência da formação de trombos no coração. Os pacientes podem apresentar apenas sintomas cardíacos, gastrointestinais ou ambos (**Figura 2**). O tratamento da doença é feito com as drogas benzonidazol e nifurtimox, sendo que o benzonidazol é a droga de primeira linha por ser melhor tolerada pelo paciente. Os tratamentos com ambas as drogas são mais eficientes na fase aguda da doença, alcançando taxas de cura próximas a 100% quando são iniciados logo no início da fase aguda (BERN, 2015; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018; WHO, 2016).

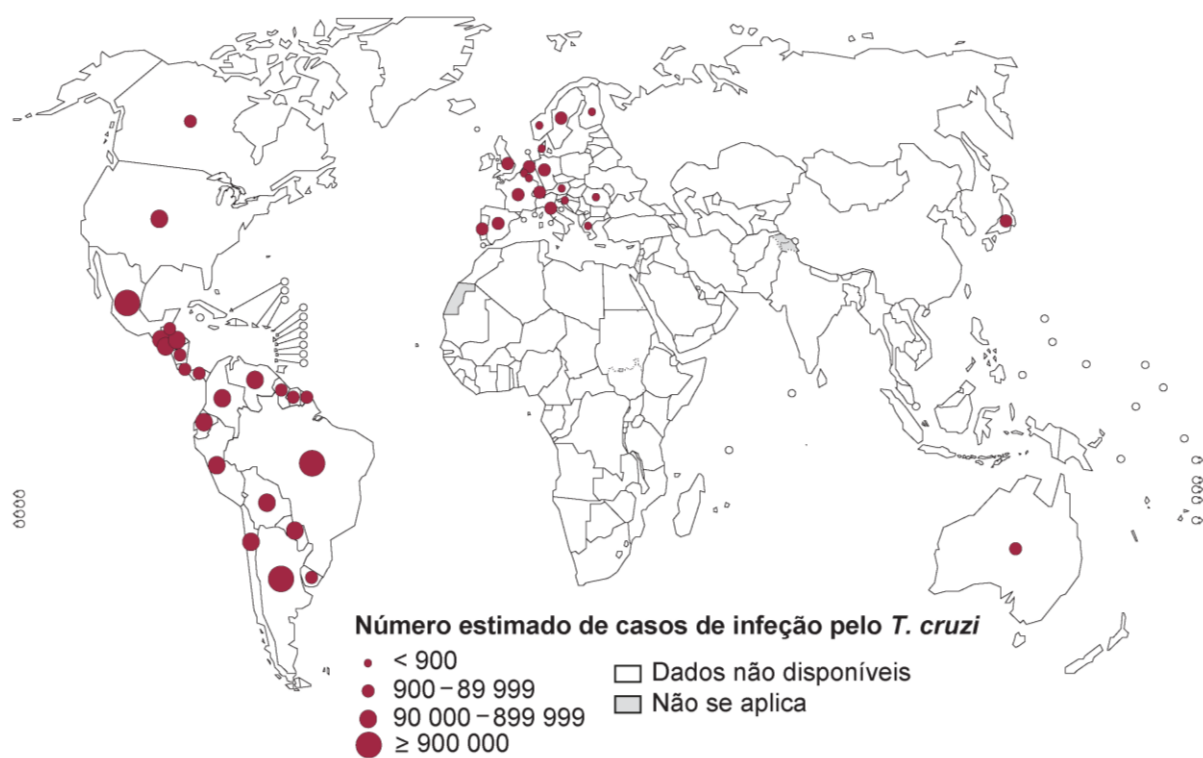


Figura 1: Distribuição mundial dos casos de doença de Chagas no período de 2006 a 2015 baseada em estimativas oficiais. Fonte: WHO (2017).

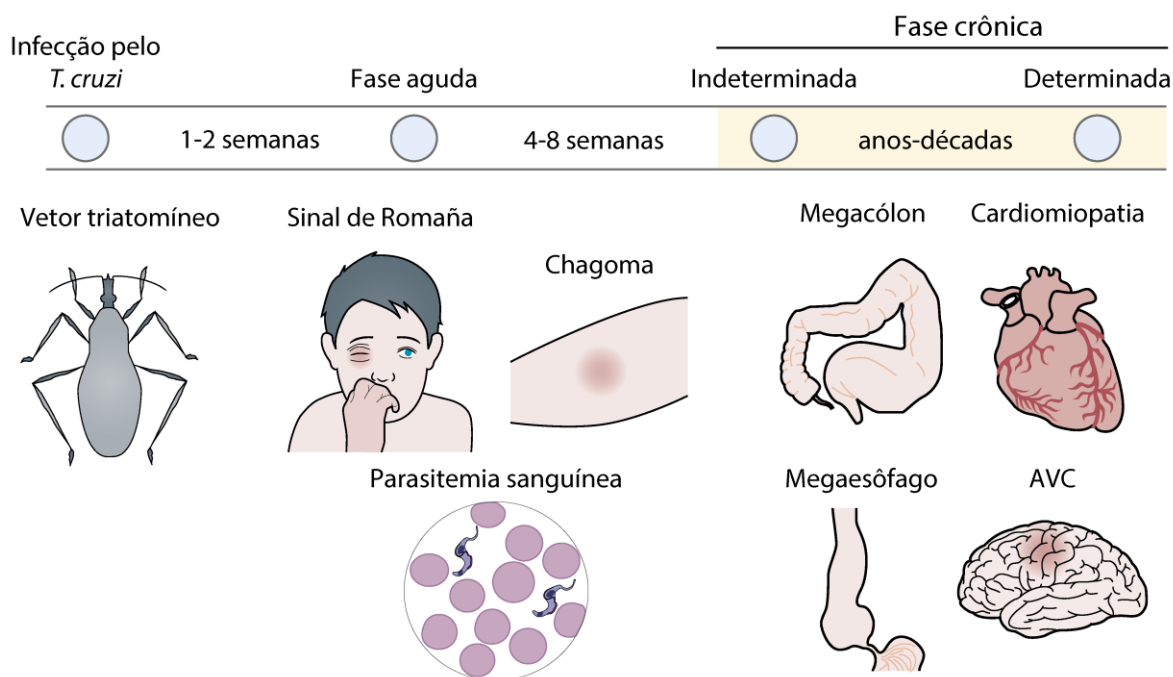


Figura 2: Fases da doença de Chagas.

A fase aguda da doença de Chagas, assintomática na maioria dos casos, se inicia após um período de incubação de 1-2 semanas após a infecção pelo *T. cruzi* (transmissão vetorial). Essa pode se estender por 4-8 semanas e se caracteriza pela alta parasitemia. O sinal de Romanã e chagomas podem ser observados em alguns pacientes. A fase crônica da doença é assintomática na maioria dos casos podendo durar por toda a vida (Forma indeterminada). Entretanto, 20-30% dos pacientes progridem para a forma determinada da doença, apresentando complicações gastrointestinais (megacólon e megaesôfago) e cardiomiopatias, que podem levar à ocorrência de AVC (Acidente vascular cerebral). Fonte: Adaptado de BERN (2015) e PÉREZ-MOLINA e MOLINA (2018).

1.2.2 Ciclo de vida do *T. cruzi*

O parasito *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo que requer a alternância entre insetos vetores hematófagos e hospedeiros mamíferos. Os vetores do parasito são conhecidos popularmente como barbeiros e pertencem à subfamília Triatominae (ordem Hemíptera, família Reduviidae). As espécies de maior importância na transmissão da doença de Chagas são integrantes do gênero *Triatoma*, seguidas por espécies dos gêneros *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Com relação aos hospedeiros mamíferos, o parasito pode se estabelecer em mais de 180 espécies distribuídas em seis ordens e uma superordem (Artiodactyla, Carnivora, Marsupialia, Chiroptera, Primata, Rodentia e Xenartra). Entre as espécies de mamíferos hospedeiras se destacam as espécies do gênero *Didelphis* (Marsupialia) que apresentam uma relação parasito-hospedeiro singular na medida em que além de serem importantes reservatórios também podem funcionar como vetores do parasito (NOIREAU; DIOSQUE; JANSEN, 2009; STANAWAY; ROTH, 2015). Em adição à multiplicidade de hospedeiros, o *T. cruzi* apresenta três formas de desenvolvimento durante o seu ciclo de vida: epimastigotas, amastigotas e tripomastigotas (**Figura 3**). Essas formas apresentam morfologias distintas, sendo que apenas as duas primeiras podem se replicar (KRAMER, 2012).

O ciclo de vida do *T. cruzi* (**Figura 4**) se inicia quando o inseto triatomíneo ingere formas tripomastigotas sanguíneas durante o repasto sanguíneo em mamíferos infectados. No intestino médio do inseto, as tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em epimastigotas, que ao atingirem o intestino posterior se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (forma infectiva) por meio de um processo denominado metaciclogênese. Durante um novo repasto sanguíneo, as tripomastigotas metacíclicas são liberadas nas fezes e podem contaminar o hospedeiro mamífero. Uma vez no citoplasma das células infectadas do mamífero, as tripomastigotas metacíclicas se transformam na forma replicativa amastigota que se divide a cada doze horas por 4 ou 5 dias. Ao final desse período, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea após a ruptura da célula hospedeira. As tripomastigotas sanguíneas podem então infectar novas células dando início a novos ciclos replicativos ou serem ingeridas pelo vetor (BERN, 2015; KRAMER, 2012).

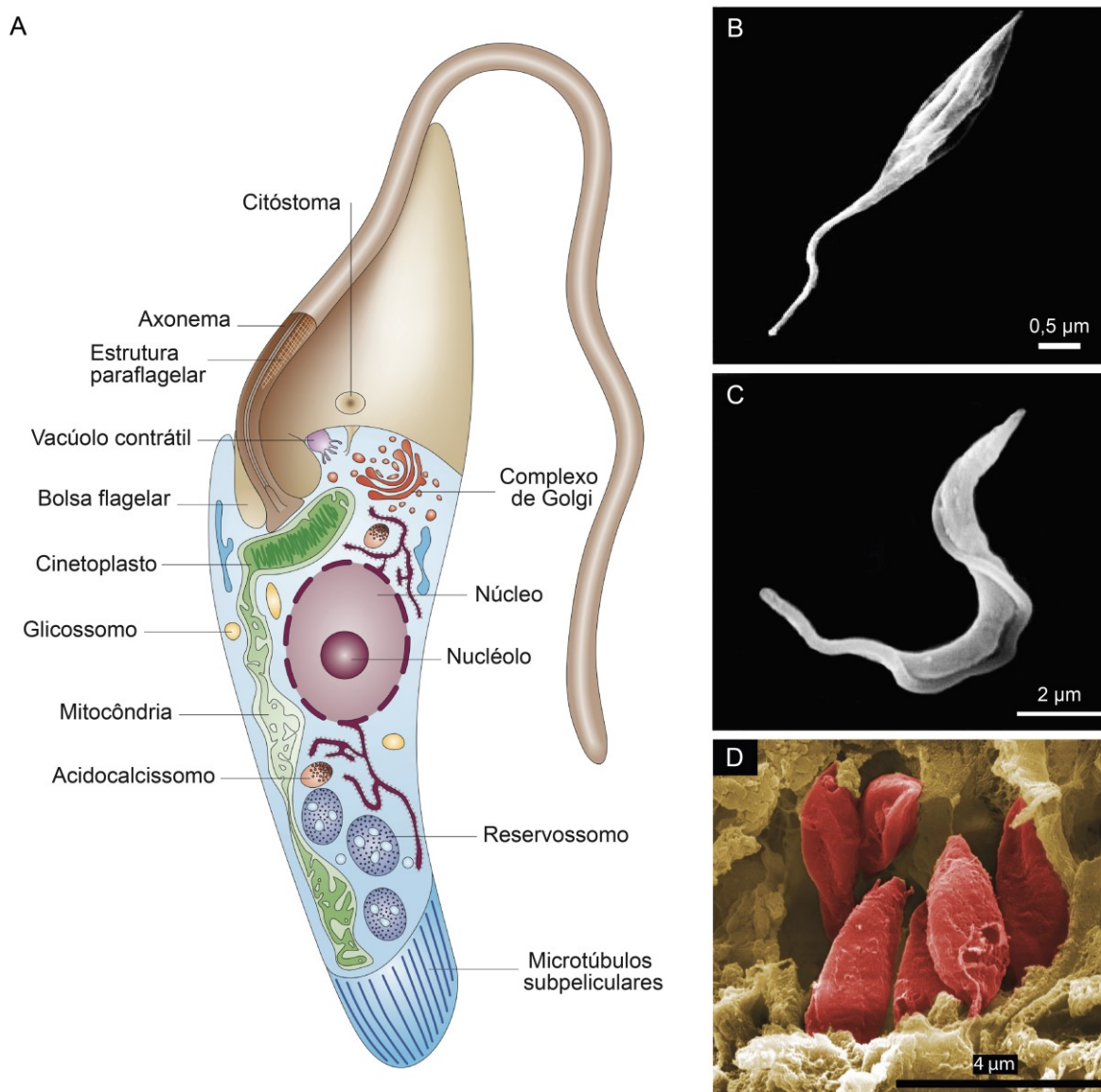


Figura 3: Vista esquemática e micrografias dos estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*.

(A) Representação esquemática da forma epimastigota em seção longitudinal. Fonte: Adaptado de DOCAMPO *et al.* (2005). Micrografias – (B) Forma epimastigota, (C) Forma tripomastigota e (D) Forma amastigota em músculo cardíaco. Micrografias B e C produzidas por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: Adaptado de MENNA-BARRETO *et al.* (2005). Micrografia D produzida por microscopia eletrônica de varredura por emissão de campo. Fonte: Adaptado de FLORENTINO *et al.* (2014).

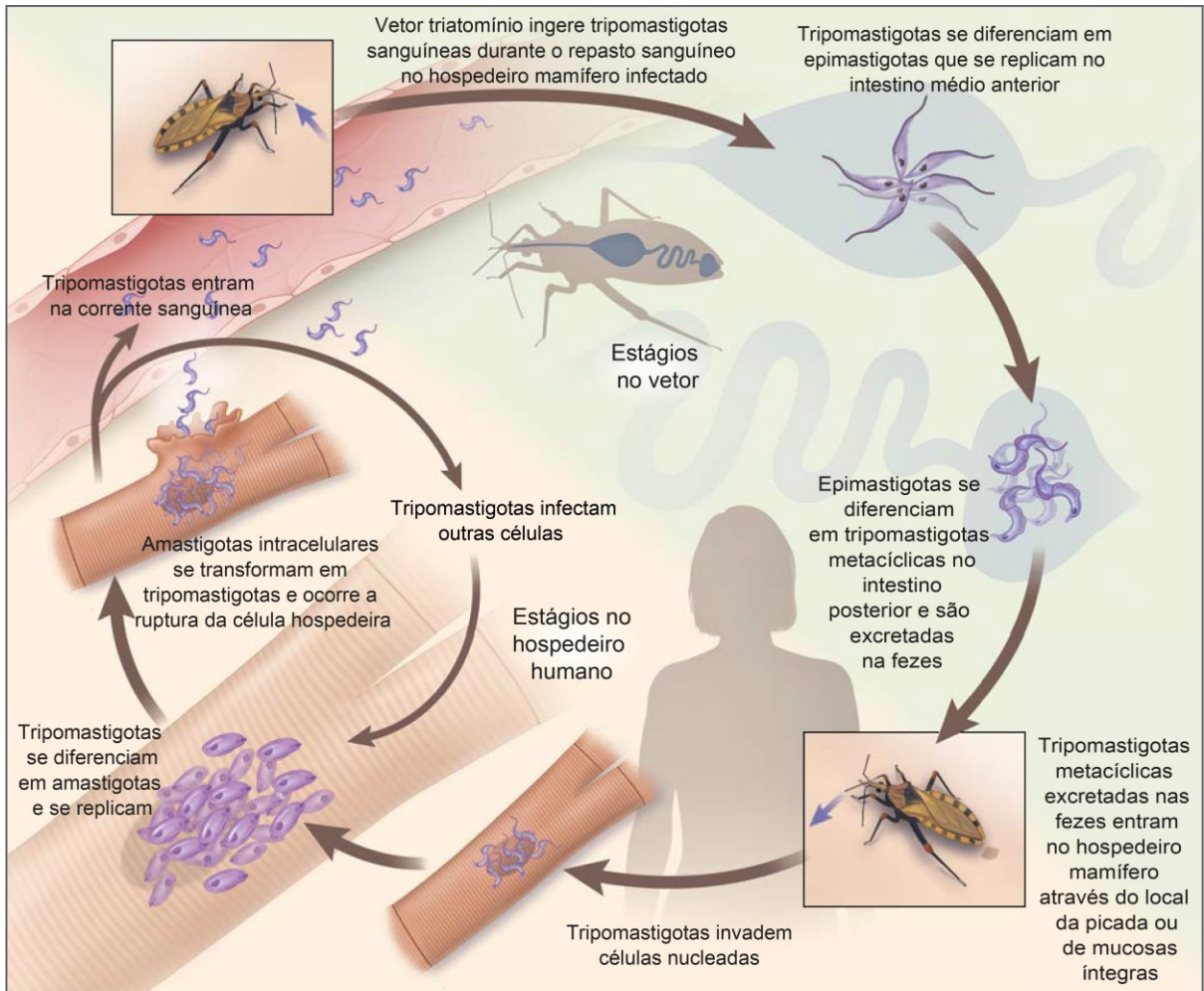


Figura 4: Ciclo de vida do parasito *T. cruzi*. Fonte: Adaptado de BERN (2015).

1.2.3 Genoma de referência

A espécie *T. cruzi* constitui um táxon de estrutura populacional complexa que apresenta uma grande diversidade genética. Atualmente, as diferentes linhagens do parasito são classificadas em sete unidades discretas de tipagem (DTUs) chamadas de TcI a TcVI e Tcbat (restrita a morcegos) (LIMA *et al.*, 2015; ZINGALES *et al.*, 2009). As diferentes DTUs (TcI a TcVI) possuem maior ou menor importância nos ciclos doméstico e silvestre de transmissão da doença de Chagas, podendo estas estarem conectadas com a variedade das manifestações clínicas desenvolvidas pelos pacientes e com as diferenças geográficas observadas nas taxas de mortalidade e morbidade (RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010).

O genoma do Clone CL Brener (TcVI) é atualmente o genoma de referência para a espécie, que foi escolhido em virtude de sua extensa caracterização experimental. O sequenciamento do genoma revelou que esse clone é um híbrido resultante da fusão de duas DTUs distintas: TcII e TcIII. Dada a natureza híbrida do clone, o genoma foi dividido em dois haplótipos que foram denominados Esmeraldo-like e Não Esmeraldo-like em virtude da grande semelhança de um dos haplótipos com o genoma do *T. cruzi* da cepa Esmeraldo. O sequenciamento mostrou que o genoma do CL Brener é altamente repetitivo e possui entre 106,4 e 110,7 Mb de tamanho (genoma diploide). As sequências repetitivas correspondem à cerca de 50% do genoma e consistem principalmente em *retrotransposons*, repetições subteloméricas e grandes famílias gênicas como as proteínas de superfície associadas a mucinas (MASPs). Em relação à quantidade de genes, estima-se que estejam presentes no genoma diploide 22.570 genes codificadores de proteínas, dispostos em 41 cromossomos. Com relação à organização do genoma, dezenas a centenas de genes codificadores de proteínas são organizados em longos *clusters* gênicos direcionais localizados na mesma fita de DNA, sendo que esses *clusters* são separados entre si por regiões denominadas de inversão de fita (mudança de fita codificadora) (*Strand switch regions - SSR*). Adicionalmente, a maioria dos genes incluídos em um mesmo *cluster* não são relacionados em função (EL-SAYED *et al.*, 2005; KRAMER, 2012; TEIXEIRA; EL-SAYED; ARAÚJO, 2011; WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009).

1.2.4 Transcrição e processamento do RNA

Em tripanosomatídeos, a transcrição dos grandes *clusters* gênicos é realizada pela RNA polimerase II gerando longos transcritos policistrônicos. O processo de transcrição se inicia bidirecionalmente em regiões denominadas de inversão de fita divergentes que separam *clusters* gênicos adjacentes. Essas regiões possuem múltiplos sítios de início da transcrição, longos tratos de guanina ou citosina e são enriquecidas em variantes de histonas e marcas epigenéticas (acetilação e metilação de histonas). Entretanto, não estão presentes nessas regiões nenhum dos elementos típicos encontrados nos promotores da RNA polimerase II. De fato, o único promotor da RNA polimerase II bem caracterizado nos tripanosomatídeos é o do RNA *Spliced leader* (SL). O término da transcrição também é dependente de marcas epigenéticas e variantes de histonas, ocorrendo em regiões de inversão de fita convergentes (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2018; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

Uma vez produzidos, os longos pré-RNAs policistrônicos são individualizados em mRNA monocistrônicos por dois processos acoplados: o *trans-splicing* e a poliadenilação (CLAYTON, 2002). O mecanismo do *trans-splicing* também chamado de *Spliced Leader trans-splicing* (SLTS) ocorre a partir da clivagem do RNA SL e adição de seu mini-éxon de 39 nucleotídeos à extremidade 5' de cada um dos genes presentes no policístron. Essa reação de clivagem também libera a fração intrônica (SLi) do RNA SL que possui função desconhecida (**Figura 5**) (BITAR *et al.*, 2013). Os transcritos também podem sofrer processamento alternativo, o que serve à regulação da expressão gênica. A entrada do éxon do SL e da cauda poli-A em sítios alternativos pode, por exemplo, incluir ou excluir elementos regulatórios presentes nas regiões 5' e 3' UTR do transcritos ou ainda gerar transcritos que não podem ser traduzidos pela ausência de AUG (NILSSON *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2012). A relevância do processamento alternativo dos mRNAs para a regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos ainda não foi definida, mas estudos realizados no *T. brucei* mostraram que uma grande parcela dos genes desse organismo apresenta mais de um sítio acceptor do SL e vários sítios aceptores da cauda poli-A (KRAMER, 2012). O *cis-splicing* também ocorre nos tripanosomatídeos, mas até o momento este foi detectado apenas no gene da polimerase poli-A. Com excessão desse gene, praticamente não são encontrados íntrons em genes codificadores de proteínas (MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010).

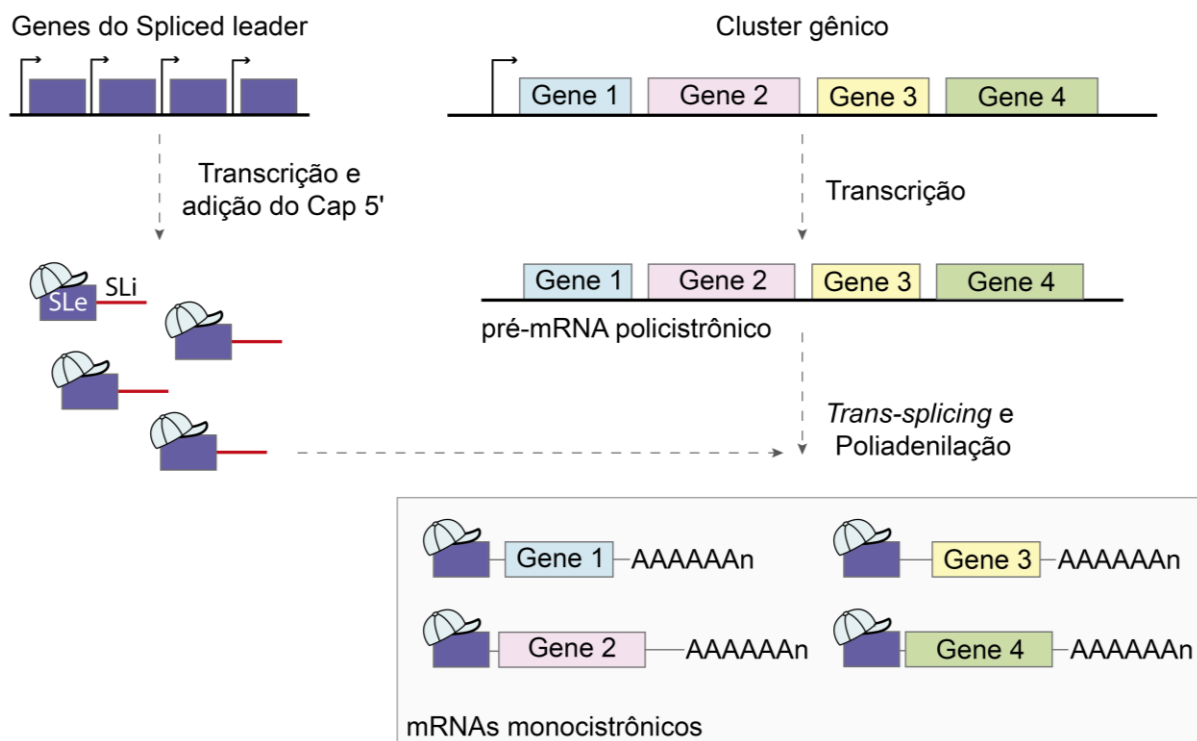


Figura 5: Processamento de mRNAs nos tripanosomatídeos.

A transcrição dos *clusters* gênicos pela RNA polimerase II produz longos pré-mRNAs policistrônicos que são processados em mRNAs únicos pelos mecanismos de *trans-splicing* e poliadenilação. Estas reações ocorrem simultaneamente e são guiadas pelos tratos de polipirimidinas presentes em cada uma das regiões intergênicas. No *trans-splicing*, a região exônica do RNA *Spliced leader* (SLe), previamente produzido e capeado, é transferida para a porção 5' de cada um dos genes presentes no transcrito policistrônico (TEIXEIRA *et al.*, 2012). SLi: região intrônica do RNA *Spliced leader*.

1.2.5 Manipulação genética

A expressão de genes exógenos no *T. cruzi* foi reportada pela primeira vez no início da década de 1990. Na ocasião, epimastigotas foram transfectadas com um vetor contendo um segmento do gene *Spliced leader* precedendo o gene bacteriano da cloranfenicol acetiltransferase (CAT) (LU; BUCK, 1991). Entretanto, o conhecimento limitado dos elementos reguladores da expressão gênica no *T. cruzi* levava a baixos níveis de expressão dos genes repórteres transfectados. Com o avanço dos conhecimentos sobre as peculiaridades da expressão gênica do *T. cruzi*, os vetores construídos se tornaram continuamente mais eficientes para a expressão de genes exógenos no parasito (TEIXEIRA; EL-SAYED; ARAÚJO, 2011). Os níveis de expressão dos genes transfectados aumentaram enormemente com a inclusão do promotor do gene do RNA ribossomal (rRNA), das regiões aceptoras do *Spliced Leader* e da cauda poli-A, das sequências 3' UTR e regiões intergênicas (Ig) de diferentes genes (aumento da estabilidade e tradução dos mRNAs), além da melhora nos protocolos de transfecção (BARTHOLOMEU *et al.*, 2002; DAROCHA *et al.*, 2004; TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1995; VAZQUEZ; LEVIN, 1999).

Os vetores de expressão utilizados neste trabalho são variações do vetor pROCKGFP_NEO (**Figura 6**). Esse vetor se integra de forma estável ao locus do gene da β -tubulina no genoma do parasito por recombinação homóloga. Estão presentes no vetor o promotor do gene rRNA, o gene reporter GFP, o gene de resistência NTPII (Neomicina fosfotransferase), sítios de restrição para XbaI e XhoI para a inserção dos genes de interesse no vetor e as sequências 5' e 3' UTR dos genes TcP2 β (proteína ribossomal) e GAPDHIII (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase II), respectivamente (DAROCHA *et al.*, 2004).

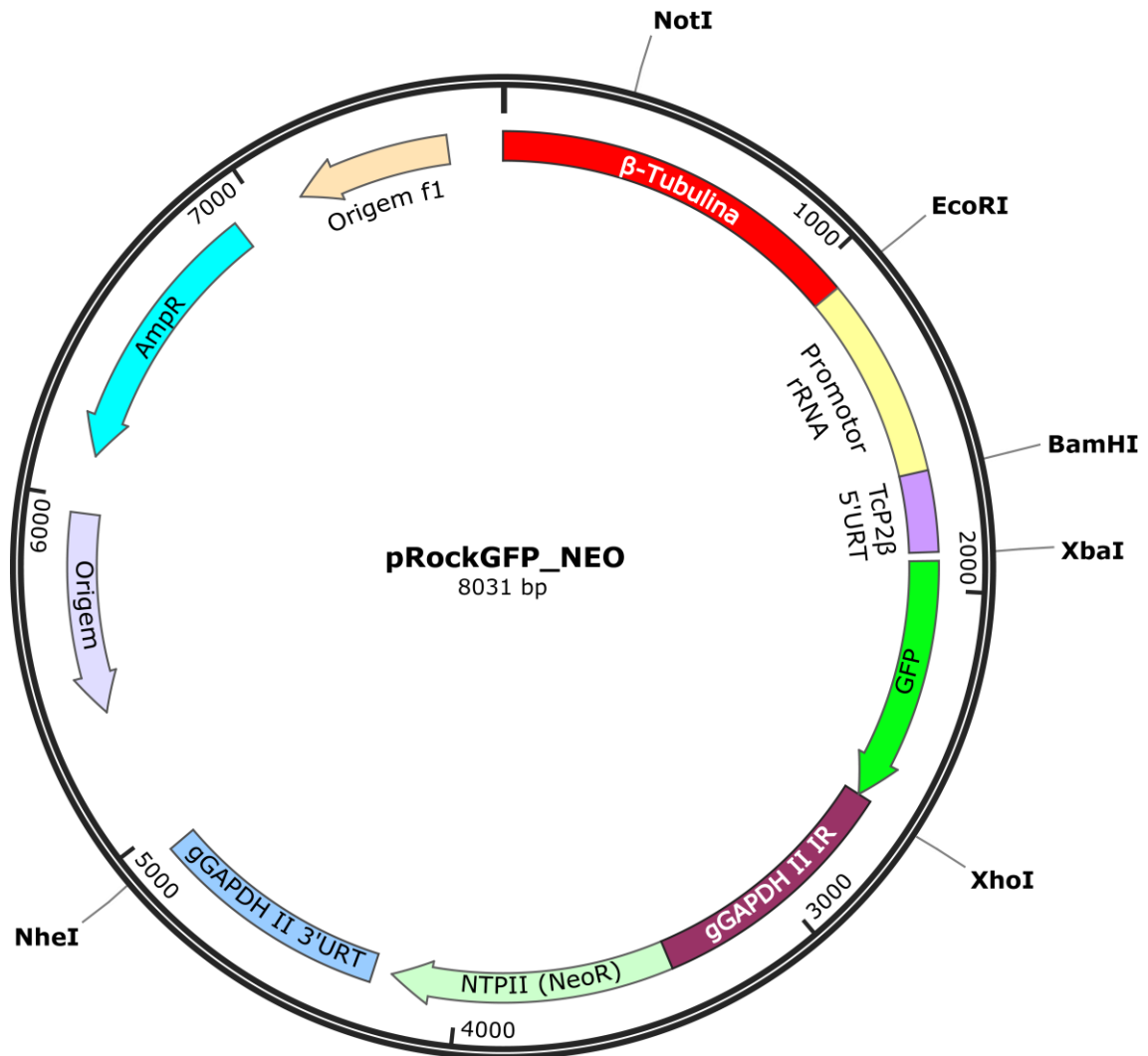


Figura 6: Mapa do vetor pROCKGFP_Neo.

A integração do vetor ao genoma do *T. cruzi* ocorre no locus do gene da β -tubulina por recombinação homóloga. O gene de interesse é inserido no vetor em substituição ao gene GFP. IR: região intergênica, AmpR e NeoR: genes de resistência à ampicilina e neomicina, respectivamente. Fonte: Adaptado de DAROCHA *et al.* (2004).

1.3 Proteínas ligantes de RNA e regulação da expressão gênica

Em virtude da organização de genes não relacionados em função em grandes unidades policistrônicas, a regulação da expressão gênica em tripanosomatídeos ocorre principalmente por mecanismos pós-transcricionais. Nesses organismos, embora os genes presentes nos diferentes policistrons possuam aproximadamente as mesmas taxas de transcrição, os níveis dos mRNAs maduros divergem imensamente entre si, podendo sofrer grandes variações de acordo com o estágio do ciclo de vida. Nesse contexto, o destino dos transcritos é dependente do efeito combinatório de diversos elementos regulatórios que afetam a estabilidade e a eficiência da tradução desses mRNAs. De fato, estudos recentes utilizando a técnica de *Ribosome profiling* demonstraram que o controle traducional é um dos mecanismos chave para a expressão diferencial dos genes no *T. cruzi* (FERNÁNDEZ-MOYA; ESTÉVEZ, 2010; KRAMER, 2012; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010; SMIRCICH *et al.*, 2015).

Proteínas ligantes de RNA (RBPs) são fatores essenciais para a regulação da expressão gênica. Coerentemente com a grande dependência de mecanismos pós-transcricionais, os tripanosomatídeos possuem em seu genoma um grande número de RBPs preditas, das quais a maior parte não possui ortólogos em outros eucariotos. Essas proteínas podem interagir com sequências regulatórias presentes nas regiões 5' e 3' UTR dos transcritos, com motivos específicos localizados na região codificadora destes ou ainda com estruturas comuns a todos os mRNAs como o *cap* e a cauda poli-A. A interação entre diferentes mRNAs e RBPs formam os complexos ribonucleoprotéicos (RNPs), cuja composição define o destino dos transcritos, que podem ser, por exemplo, exportados do núcleo, traduzidos e degradados (KRAMER; CARRINGTON, 2011; SINGH *et al.*, 2015). Nesse sentido, o conjunto dos elementos que governam o destino e a função dos transcritos (RBPs, RNAs não codificadores e outras moléculas) constituem o chamado código RNP, que é a unidade central para a regulação da expressão gênica nos eucariotos (GEHRING; WAHLE; FISCHER, 2017).

Foi proposto que as RBPs regulam grupos de transcritos relacionados por meio da formação de *operons* ou *regulons* de RNA. Dessa forma, diferentes RBPs se ligam aos mRNAs nascentes e os organizam em grupos contendo transcritos codificadores de proteínas funcionalmente relacionadas, que são processados e regulados em conjunto de forma a permitir respostas rápidas aos estímulos extracelulares (KEENE, 2007). Em tripanosomatídeos foi mostrado que transcritos relacionados ou co-regulados possuem os mesmos motivos para a interação com RBPs específicas (NAJAFABADI *et al.*, 2013; NOÉ; DE GAUDENZI; FRASCH, 2008).

Com relação à estrutura das RBPs, essas podem conter múltiplos domínios estruturais que permitem diversos modos de reconhecimento do RNA e a formação de complexos pela interação com outras proteínas. Esses domínios permitem a classificação das RBPs em diferentes grupos, sendo que as proteínas melhor caracterizadas são aquelas que possuem os domínios RRM (Motivo de reconhecimento de RNA), PUF e dedos de zinco (ALVES; GOLDENBERG, 2016; KRAMER; CARRINGTON, 2011). Dentre esses domínios, o RRM é o domínio mais abundantemente encontrado nas proteínas eucarióticas e também o mais estudado. Esse domínio possui tipicamente cerca de 90 aminoácidos organizados em duas α -hélices alinhadas contra uma folha- β antiparalela, assumindo a topologia $\beta_1\alpha_1\beta_2\beta_3\alpha_2\beta_4$. O RRM se liga ao RNA de fita simples através do reconhecimento de 2 a 8 nucleotídeos, sendo que essa interação ocorre comumente na superfície da folha- β mediada pelos motivos RNP1 e RNP2 (Motivos de ligação ao RNA 1 e 2), cujas sequências canônicas são (K/R)-G-(F/Y)-(G/A)-(F/Y)-(I/L/V)-X-(F/Y) e (I/V/L)-(F/Y)-(I/V/L)-X-N-L, respectivamente. Adicionalmente, esse domínio também pode interagir com o DNA e com proteínas (CLÉRY; BLATTER; ALLAIN, 2008; MARIS; DOMINGUEZ; ALLAIN, 2005).

Nos cinetoplastídeos, o grupo de proteínas contendo RRM é numeroso, sendo constituído por cerca de 77 proteínas. Entre os membros mais estudados desse grupo está a proteína TcUBP1 (*T. cruzi* Uridine-binding protein), que se liga a regiões ricas em AU presentes na região 3' UTR de transcritos da família das pequenas mucinas (TcSMUG), que são destabilizados na forma tripomastigota (D'ORSO; FRASCH, 2001). Recentemente, também foi demonstrado o envolvimento dessa proteína no processo de metaciclogênese do *T. cruzi* (ROMANIUK; FRASCH; CASSOLA, 2018).

1.4 Grânulos de RNA

Em células eucarióticas, os RNPs podem se agregar em subcompartimentos celulares desprovidos de membrana denominados grânulos de RNA. Essas estruturas são microscopicamente visíveis e se formam pelo processo de transição de fases líquido-líquido, que é mediado pela interação entre as regiões intrinsecamente desordenadas comumente encontradas nas RBPs e em outras proteínas presentes nos grânulos. A formação dos grânulos de RNA é um processo dinâmico e reversível, sendo um fenômeno de ocorrência constitutiva ou induzido por situações de estresse celular (SINGH *et al.*, 2015; UVERSKY, 2017). Entre os grânulos de RNA mais bem estudados em eucariotos estão os corpos de processamento (*P-bodies*) e os grânulos de estresse (SGs), que abrigam em seu interior RNPs tradicionalmente inativos, além de possuírem componentes em comum (IVANOV; KEDERSHA; ANDERSON, 2018).

Os *P-bodies* ocorrem de forma constitutiva nas células eucarióticas, sendo compostos por mRNPs associados a fatores de repressão da tradução tais como as proteínas DDX6, CPEB1 e 4E-T, fatores de decaimento de RNA incluindo DCP1/2, XRN1, DHH1, LSM1-7 e UPF1, e fatores associados à via do RNA de interferência como W182 e AGO1-4. Os RNPs condensados nos *P-bodies* podem ser degradados ou retornarem à fração polissomal para a tradução. Adicionalmente, estudos recentes sugerem que a principal função dos *P-bodies* seja a repressão da tradução e armazenamento de *regulons* de RNA que codificam funções regulatórias como o controle da metilação de histonas e da ubiquitinação de proteínas (PARKER; SHETH, 2007; STANDART; WEIL, 2018).

Em contraste com o que ocorre com os *P-bodies*, a formação dos SGs é induzida em condições de estresse celular que levam a uma parada súbita do processo de tradução. Nesse sentido, os SGs possuem em sua constituição fatores de início da tradução como o eIF4F e eIF3, a subunidade ribossomal 40S e diversas outras proteínas como PABP, G3BP1 e G3BP2 (Proteínas ligantes do domínio SH3 de RasGAP 1 e 2), sendo que as duas últimas são fatores essenciais para a formação dos grânulos. A função dos SGs ainda não foi completamente elucidada, mas propõe-se que estes desempenhem um papel na sinalização celular desencadeada pelo estresse por meio do sequestro e consequente retirada do citoplasma de fatores que promovem a apoptose, por exemplo. Adicionalmente, os SGs podem funcionar como centros de triagem de transcritos que podem ser armazenados, retornarem à tradução ou serem degradados (BUCHAN; PARKER, 2009; IVANOV; KEDERSHA; ANDERSON, 2018; KEDERSHA *et al.*, 2005, 2016).

Atualmente, um conjunto diverso de estudos envolvendo grânulos de RNA indicam a existência de um movimento citoplasmático dinâmico dos mRNAs entre os SGs, *P-bodies* e polissomos. O intercâmbio de transcritos entre essas três estruturas foi denominado ciclo do mRNA, durante o qual os transcritos sendo traduzidos ativamente nos polissomos podem ser reprimidos traducionalmente, se associarem a fatores da maquinaria de decapeamento e se agregarem em *P-bodies*, nos quais podem ser degradados ou destinados ao reinício da tradução por meio do rearranjo das proteínas que compõem os RNPs. Durante situações de estresse, os transcritos também podem se agregar em SGs, que por sua vez podem se acoplar aos *P-bodies* ou retornarem aos polissomos uma vez superada a condição de estresse (**Figura 7**) (BALAGOPAL; PARKER, 2009).

Nos tripanosomatídeos foi identificado um grande repertório de grânulos de mRNA, o que vem sendo interpretado como uma adaptação à quase ausência de controle transcricional, que é característica desses organismos. Foram identificados até o momento pelo menos seis tipos diferentes de grânulos de mRNA que foram chamados de *P-body like*, grânulos de estresse nutricional e de choque térmico, grânulo do polo posterior, grânulos da periferia nuclear e grânulos contendo as metades 5' e 3' de tRNAs (**Figura 8**) (KRAMER, 2014).

Grânulos semelhantes a *P-bodies* foram estudados em *T. cruzi* e *T. brucei*. De forma semelhante ao descrito para mamíferos e leveduras, estes grânulos possuem expressão constitutiva, aumentando em número e tamanho em situações de estresse celular que causem a parada da tradução. As proteínas identificadas como sendo componentes desses grânulos incluem a helicase *Dead box* DHH1, a deadenilase CAF1, a exoribonuclease XRNA, e o fator de iniciação da tradução eIF4E1. Proteínas do complexo de decapeamento como DCP1/2 e Lsm 1-7, que são marcadores clássicos de *P-bodies*, não possuem ortólogos facilmente identificáveis nos tripanosomatídeos. Entretanto, as funções atribuídas a esses marcadores podem ser desempenhadas por outras proteínas, a exemplo do que acontece com SCD6, descrita como uma proteína extremamente importante para a formação desses grânulos no *T. brucei* (HOLETZ *et al.*, 2007; KRAMER, 2014; KRÜGER; HOFWEBER; KRAMER, 2013).

Os grânulos de estresse nutricional são os mais estudados nos tripanosomatídeos. Esses grânulos se formam em condições de privação de fonte de carbono, sendo observados tanto em condições experimentais quanto em condições naturais de estresse nutricional que acontecem no intestino do inseto vetor. Embora a função desses grânulos não tenha sido completamente elucidada, dados experimentais sugerem que esses grânulos funcionem como centros de armazenamento de transcritos que são protegidos da degradação e podem retornar ao citoplasma para o reinício da tradução durante a recuperação pós-estresse. Os grânulos de

estresse nutricional possuem muitos componentes em comum com os *P-bodies*, entretanto esses grânulos são maiores e contêm proteínas como DHH1, XRNA e UBP1. Em contraste ao que acontece em outros eucariotos, não foram identificadas subunidades ribossomais nessas estruturas (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007; KRAMER, 2014).

Os grânulos de estresse de choque térmico e do polo posterior foram identificados no *T. brucei* ao se estudar os efeitos do choque térmico nesse organismo. Os grânulos de estresse induzidos pelo choque térmico se formam independentemente da fosforilação de eIF2 α ao contrário do que ocorre comumente durante a formação de grânulos de estresse, e se localizam principalmente na periferia celular. Esses grânulos não se colocalizam com os *P-bodies*, que aumentam em tamanho e número no choque térmico, além de possuírem componentes típicos dos grânulos de estresse como a proteína PABP1 e fatores de iniciação da tradução como o eIF3B. Com relação ao grânulo do polo posterior, esse se forma na região posterior do parasito e aumenta em tamanho durante o estresse por calor. Esse grânulo se caracteriza pela presença da exoribonuclease XRNA e ausências das proteínas DHH1 e SCD6 (KRAMER *et al.*, 2008).

Os grânulos da periferia nuclear também foram descobertos no *T. brucei* e se formam pela inibição do mecanismo de *trans-splicing*, o que leva ao acúmulo de mRNAs policistrônicos parcialmente processados. Esses grânulos se localizam ao redor do núcleo das células e contêm as proteínas identificadas nos *P-bodies* como DHH1 e SCD6, a proteína PABP1 e uma proteína homóloga à helicase de RNA VASA. Adicionalmente, a formação desses grânulos requer que a transcrição esteja ativa e que a estrutura nuclear esteja íntegra (KRAMER, 2014; KRAMER *et al.*, 2012).

Por fim, os grânulos contendo as metades 5' e 3' de tRNAs foram descobertos no *T. cruzi* por meio da detecção destes por ensaios de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Esses grânulos se formam na região posterior das células através do recrutamento das metades de tRNAs, o que ocorre de forma mais pronunciada em situações de privação nutricional. Esses grânulos não se colocalizam com os grânulos de estresse nutricional, sendo que até o momento a função destes permanece desconhecida (GARCIA-SILVA *et al.*, 2010).

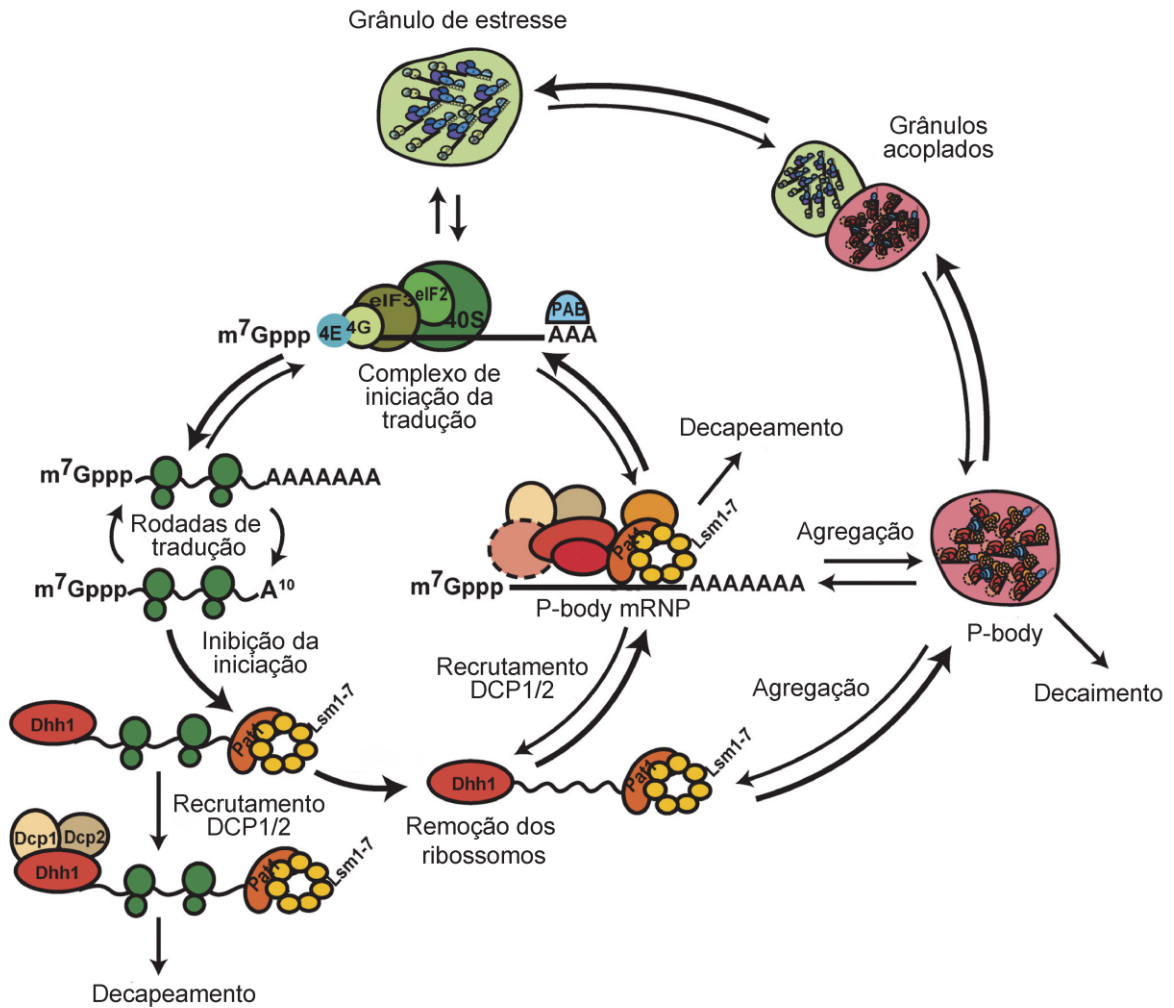


Figura 7: Ciclo do mRNA.

Modelo do movimento dinâmico dos mRNAs citoplasmáticos entre polissomos, *P-bodies* e grânulos de estresse. Nesse modelo, os transcritos que são reprimidos traducionalmente podem se associar a fatores da maquinaria de decapeamento e se agregar em *P-bodies*, sendo então encaminhados para a degradação ou para o retorno à fração polissomal. Em situações de parada súbita da tradução, os mRNAs podem se agregar em grânulos de estresse, de onde podem retornar à tradução cessado o estresse celular. O acoplamento entre os grânulos de estresse e *P-bodies* também pode ocorrer. Fonte: Adaptado de BALAGOPAL e PARKER (2009).

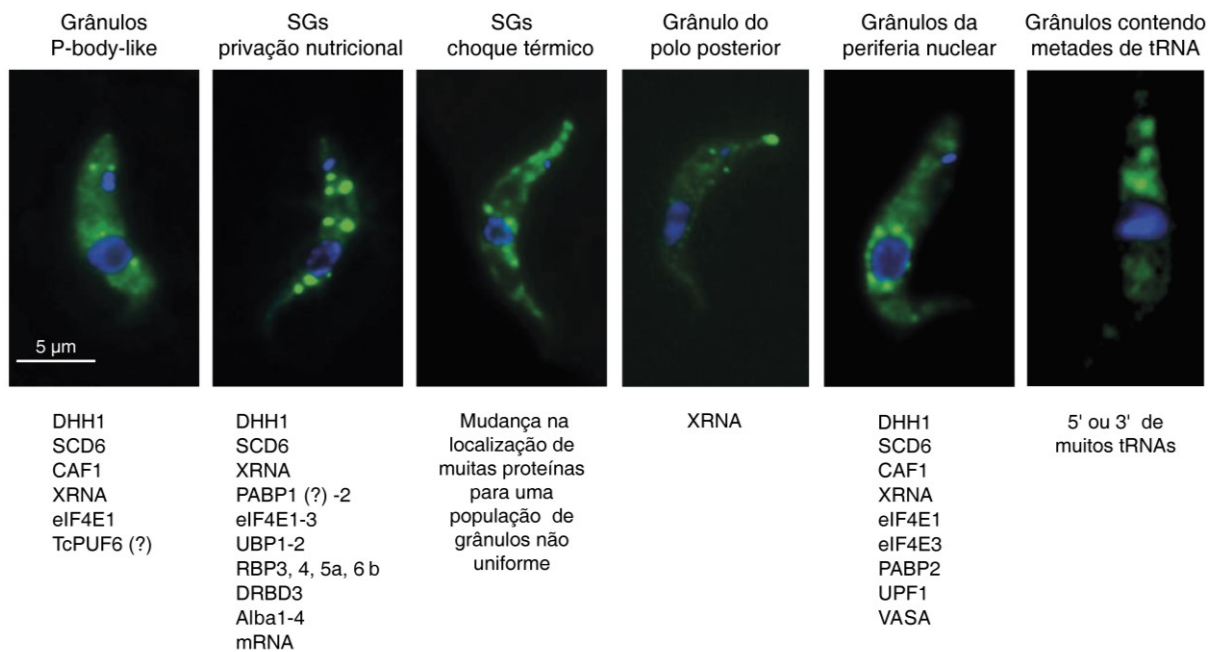


Figura 8: Microscopia de fluorescência dos grânulos de RNA de tripanosomatídeos.

Os grânulos mostrados foram identificados no *T. cruzi* (grânulos contendo as metades de tRNA) e *T. brucei* (todos os outros). Os componentes detectados nos diferentes grânulos são listados abaixo das imagens correspondentes. Barra de escala: 5 µm. SGs: grânulos de estresse. Fonte: Adaptado de Kramer (2014).

1.5 Proteína Ligante de RNA 42

A proteína ligante de RNA 42 (RBP42) vem sendo frequentemente estudada nos tripanosomatídeos. Nos últimos anos, estudos buscando caracterizar a função e a estrutura de ortólogos dessa proteína foram realizados no *T. brucei*, *T. cruzi* Y e *L. braziliensis*. A proteína RBP42 foi identificada pela primeira vez no *T. brucei* como sendo uma proteína hipotética copurificada com a subunidade RBP4 da RNA polimerase II. A denominação de RBP42 foi adotada posteriormente em referência ao fato desta ter sido a quadragésima segunda RBP identificada nos tripanosomatídeos (DAS *et al.*, 2006, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018).

A caracterização inicial da estrutura da proteína RBP42 do *T. brucei* (TbRBP42) revelou a presença de uma estrutura modular marcante composta pelos domínios NTF2-like (Fator de transporte nuclear 2-like) e RRM ligados entre si por uma região central, na qual estão presentes motivos PxxP (motivos ricos em prolínas) e uma região classificada como fracamente ácida pelos autores (DAS *et al.*, 2012). Estudos posteriores mostraram que as proteínas RBP42 do *T. cruzi* Y (TcyRBP42) e *L. braziliensis* (LbRBP42) também compartilham essa mesma estrutura modular. No entanto, a presença de uma região ácida nessas proteínas não foi reportada pelos autores (NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018).

Em relação aos elementos que compõem a estrutura das proteínas RBP42 já estudadas, o domínio NTF2-like recebe esse nome em razão de sua similaridade com a proteína NTF2 (Fator de transporte nuclear 2). Este domínio está presente em proteínas com funções diversas, estando envolvido, por exemplo, em interações do tipo proteína-proteína como a que acontece em G3BP1, na qual esse domínio promove a sua dimerização (DAS *et al.*, 2012; EBERHARDT *et al.*, 2013; TOURRIÈRE *et al.*, 2003). Além disso, um estudo do complexo Mex67:Mtr2 de leveduras mostrou que o NTF2-like também pode contribuir para a interação com o RNA quando associado a um RRM, um domínio de ligação ao RNA (AIBARA *et al.*, 2015; CLÉRY; BLATTER; ALLAIN, 2008). Os motivos PxxP são regiões adicionais para a interação com outras proteínas (ZARRINPAR; BHATTACHARYYA; LIM, 2003) e as regiões ricas em glutamato/aspartato (ácidas) podem desempenhar diversas funções como é evidenciado pela presença dessas regiões em proteínas envolvidas no remodelamento da cromatina, reparo do DNA, metabolismo do RNA, entre outros (CHOU; WANG, 2015; WANG, D. *et al.*, 2016).

As funções de RBP42 foram estudadas pela primeira vez no *T. brucei*, organismo em que foi descrita como sendo uma proteína essencial para a viabilidade e crescimento celular das formas procíclicas. Experimentos de RNA de interferência mostraram que o *knockdown* do

gene de RBP42 leva a um crescimento muito lento das culturas, alterações morfológicas, defeitos na citocinese e menor taxa de tradução. Com relação à localização celular, TbRBP42 é uma proteína citoplasmática que se liga majoritariamente à região codificadora de transcritos associados aos polissomos. Os transcritos aos quais TbRBP42 se liga codificam principalmente proteínas do metabolismo energético, o que sugere um possível papel desta na regulação da resposta celular à diferentes fontes nutricionais (DAS *et al.*, 2012). Adicionalmente, estudos recentes sugerem um papel de TbRBP42 na estabilização ou aumento da eficiência de tradução de seus transcritos alvos, além de sua provável interação com a proteína TOEFAZ1, que foi considerada recentemente um fator chave para o processo de citocinese nos cinetoplastídeos (ERBEN *et al.*, 2014; HILTON *et al.*, 2018; LUEONG *et al.*, 2016).

Na sequência, RBP42 foi descrita em *Leishmania braziliensis*, sendo a sua capacidade de ligação ao RNA demonstrada experimentalmente. Experimentos de desvio da mobilidade eletroforética mostraram que LbRBP42 interage com grande afinidade com uma região rica em adeninas e uracilas (ARE) presente na região 3' UTR do transcrito de HSP70-II. Além disso, os experimentos sugerem que esta interação seja dependente de uma sequência específica e não de um motivo estrutural. A interação entre LbRBP42 e a 3' UTR do transcrito de HSP70-II também foi demonstrada por meio de ensaios de *pull down*. Com relação à localização celular de LbRBP42, essa foi detectada distribuída por todo o citoplasma das células. Entretanto, o choque térmico causou a sua relocalização para a periferia nuclear das células, sendo observado também o acúmulo dessa proteína em algumas estruturas granulares presentes nessa região (NOCUA *et al.*, 2017; RAMÍREZ *et al.*, 2013).

Por fim, RBP42 foi estudada no *T. cruzi* Y. Nesse organismo, essa proteína também foi detectada no citoplasma das células, se mantendo citoplasmática nas três fases do ciclo de vida do parasito (amastigota, epimastigota e tripomastigota). Ademais, a conservação de RBP42 em algumas outras espécies de cinetoplastídeos também foi demonstrada por meio do alinhamento múltiplo de sequências (WEISBARTH *et al.*, 2018). Estudos adicionais das modificações pós-traducionais do proteoma revelaram ainda a existência de versões fosforiladas de RBP42 nos parasitos *T. cruzi* e no *T. brucei* (MARCHINI *et al.*, 2011; URBANIAK; MARTIN; FERGUSON, 2013).

A comparação de TbRBP42 com outras proteínas já conhecidas revelou a similaridade desta com as proteínas G3BP1 de mamíferos e de seu ortólogo Rasputina presente em espécies do gênero *Drosophila*. Apesar da similaridade entre TbRBP42 e G3BP1 ser relativamente baixa, essas proteínas compartilham basicamente a mesma estrutura modular, com exceção do domínio RGG (Domínio rico em argininas e glicinas), presente exclusivamente na proteína

humana. Os domínios RGG variam em tamanho e em número de repetições de argininas e glicinas, sendo descritos como domínios desordenados de ligação ao RNA que ocorrem frequentemente em associação com outros domínios de interação com o RNA. As proteínas da família G3BP são conservadas em eucariotes estando envolvidas em vias de transdução de sinal, regulação do ciclo celular, metabolismo do RNA e formação de SGs (CASTELLO *et al.*, 2012; DAS *et al.*, 2012; IRVINE *et al.*, 2004; MATSUKI *et al.*, 2013; TOURRIÈRE *et al.*, 2003). Adicionalmente, G3BP1 foi encontrada superexpressa em vários tipos de câncer, sendo associada à proliferação das células tumorais e à metástases (ZHANG *et al.*, 2019).

1.6 Efeitos da Radiação Gama

A radiação gama é um tipo de radiação ionizante altamente penetrante capaz de causar diversos tipos de lesões na molécula de DNA. Dentre essas lesões, as quebras de fita dupla possuem grande importância biológica em decorrência de serem letais para os organismos quando não reparadas (PFEIFFER; GOEDECKE; OBE, 2000). No Brasil, a exposição do *T. cruzi* à radiação gama foi realizada inicialmente com o intuito de eliminar o parasito do sangue a ser utilizado na hemoterapia (TAKEDA *et al.*, 1986). Entretanto, foi descoberto posteriormente que o parasito é extremamente resistente à radiação gama, sendo capaz de sobreviver a doses superiores a 1,5 KGy (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Os mecanismos moleculares que conferem ao parasito a sua alta resistência à radiação gama ainda não são conhecidos, mas experimentos realizados no Laboratório de Genética Bioquímica (LGB) fornecem evidências de que esta pode estar relacionada com a existência de um sistema de reparo de quebras de fita dupla muito eficiente mediado pela enzima TcRad51. Nesse sentido, foi mostrado que a exposição do *T. cruzi* à uma dose de 500 Gy de radiação gama causa uma extensa fragmentação do genoma que é completamente reparado pelo parasito em até 48 horas, quando o padrão normal de bandas cromossômicas é restabelecido. Após a recomposição do genoma, as culturas retomam o crescimento celular em até 144 horas (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Contrariamente à extensa fragmentação do DNA provocada pela irradiação, foi mostrado que o RNA permanece íntegro nos parasitos (GRYNBERG *et al.*, 2012).

Estudos adicionais sobre a resistência à radiação gama realizados no LGB avaliaram as mudanças na expressão gênica e no perfil proteico provocadas pela exposição a 500 Gy de radiação gama. Experimentos de microarranjos mostraram que os genes superexpressos após a irradiação fazem parte da família dos *Retrotransposons hot spots*, codificam proteínas hipotéticas ou correspondem a sequências obsoletas (não são consideradas regiões

codificadoras nas versões mais recentes do genoma de referência) que incluem genes mitocondriais. Em contrapartida, os genes subexpressos compreendem em sua maioria a genes de funções conhecidas como aqueles envolvidos na tradução de proteínas (GRYNBERG *et al.*, 2012). Com relação ao perfil proteico, foi mostrado que após a irradiação ocorre o aparecimento de diferentes isoformas de uma mesma proteína com pesos moleculares menores do que o predito, o que evidencia a ocorrência de processamento proteico e/ou modificações pós-traducionais durante a resposta ao estresse desenvolvida pelo parasito (VIEIRA *et al.*, 2014).

1.7 Mecanismo de ação do benzonidazol

O benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) é atualmente a droga de primeira linha utilizada no tratamento da doença de Chagas. Por ser uma pró-droga da classe dos nitro-heterocíclicos derivada do nitroimidazol, o efeito tripanomicida do benzonidazol requer a ação das enzimas nitroredutases do tipo I presentes no *T. cruzi*. Na reação catalizada por essas enzimas, o grupo nitro da droga é reduzido a um grupo amino gerando hidroxilamina e outros compostos reduzidos (WILKINSON *et al.*, 2011). Os mecanismos que geram o efeito tripanomicida desses compostos ainda não são inteiramente conhecidos, mas foram atribuídos em parte à ligação covalente ao DNA, proteínas e lipídios do *T. cruzi* (DE TORANZO *et al.*, 1988), e também à geração de estresse oxidativo (PEDROSA *et al.*, 2001). Nesse sentido, o tratamento com benzonidazol provoca a oxidação do *pool* de nucleotídeos, que quando incorporados ao DNA podem gerar mutações e induzir quebras de dupla fita, exercendo assim um efeito genotóxico (RAJÃO *et al.*, 2014). De fato, o cultivo do *T. cruzi* na presença do benzonidazol por longos períodos induz o acúmulo de mutações por todo o genoma (CAMPOS *et al.*, 2017). Além dos mecanismos reportados anteriormente, um estudo recente do metaboloma de epimastigotas tratadas com o benzonidazol demonstrou que a formação de adutos entre os compostos reduzidos do benzonidazol e tióis pode ser determinante para a toxicidade da droga para o parasito, visto que a formação dos adutos reduziu os níveis de tióis de baixo peso molecular como a tripanotiona (TROCHINE *et al.*, 2014).

A resistência do *T. cruzi* ao benzonidazol também foi reportada e ocorre naturalmente em suas várias cepas que apresentam diferentes níveis de susceptibilidade à droga. Os mecanismos responsáveis por essa resistência ainda não foram compreendidos, mas a seleção experimental de parasitos resistentes ao benzonidazol mostra que esta pode ser adquirida pela remoção da atividade da enzima nitroredutase mitocondrial, responsável pela redução do benzonidazol (FILARDI; BRENER, 1987; MEJIA *et al.*, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

Proteínas ligantes de RNA são componentes essenciais para a regulação da expressão gênica no *T. cruzi* que ocorre majoritariamente a nível pós-transcricional. Nesse parasito, o destino de grupos de transcritos funcionalmente relacionados, produzidos a partir de diferentes policistrons, é definido pela ação de diversas RBPs. No Laboratório de Genética Bioquímica (ICB, UFMG) a resistência deste parasito à radiação gama e ao benzonidazol vem sendo estudada nos últimos anos, mas ainda não se conhecem em detalhes os mecanismos moleculares que definem a resistência do parasito a esses agentes. Vários estudos, no entanto, fornecem evidências da importância das RBPs na recuperação pós-estresse do parasito, que foi estudada em condições tais como as de estresse nutricional e oxidativo (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007; FERNÁNDEZ-MOYA *et al.*, 2012). A proteína estudada nesse trabalho, RBP42, foi descrita primeiramente no *T. brucei* como sendo uma proteína essencial para a viabilidade celular. Essa proteína possui similaridade com G3BP1 de mamíferos, que é um fator essencial para a formação de grânulos de estresse. Em tripanosomatídeos existe um grande repertório de grânulos que se formam em resposta a diferentes condições celulares. No *T. cruzi*, esses grânulos de RNA poderiam funcionar como centros de triagem e armazenamento de transcritos importantes para a recuperação pós-estresse. Neste trabalho, propomos a caracterização da proteína RBP42 do *T. cruzi* CL Brener no contexto do estresse celular induzido pela radiação gama e pelo benzonidazol, com o intuito de ampliar os conhecimentos sobre os mecanismos de resistência ao estresse do parasito e contribuir para o melhor entendimento da estrutura e da função dessa proteína. O estudo de um ortólogo de TbRBP42 no contexto do estresse genotóxico não possui precedentes na literatura.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a ribonucleoproteína RBP42 em epimastigotas do *T. cruzi* CL Brener em condições normais e de estresse induzido por radiação gama e benzonidazol.

3.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos buscamos responder as seguintes perguntas:

- 1) Quais são as características do gene RBP42 do *T. cruzi* CL Brener?
- 2) Quais são as características da sequência e estrutura da proteína TcbRBP42? Essa é semelhante aos seus ortólogos encontrados em outros tripanosomatídeos?
- 3) Quais são os efeitos da expressão de uma versão recombinante de TcbRBP42 (estratégia para detecção) no crescimento de parasitos mantidos em condições normais de cultivo e após exposição à radiação gama e ao benzonidazol?
- 4) TcbRBP42 apresenta localização celular diferencial nas condições normais e de estresse? Ocorre o acúmulo dessa proteína em estruturas citoplasmáticas granulares?
- 5) Quais são os efeitos da radiação gama e do benzonidazol na localização celular dos RNAs recém-sintetizados nas células após a indução de estresse celular?

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização do gene TcbRBP42

A identificação dos genes codificadores para as proteínas RBP42 no parasito *T. cruzi* CL Brener foi realizada a partir de consulta ao banco de dados *TriTrypDB Kinetoplastid Genomics Resource* (ASLETT *et al.*, 2010) utilizando-se como *query* de busca a proteína RBP42 de *T. brucei* (ID: Tb927.6.4440). A anotação das características dos genes identificados baseou-se nos seguintes parâmetros: (i) número de cópias, (ii) localização cromossômica (iii) tamanho do gene, (iv) contexto genômico, (v) tamanho e anotação do produto proteico e (vi) análise de identidade de sequência entre os genes dos haplótipos Esmeraldo-like e Não Esmeraldo-like. A porcentagem de identidade entre os genes foi calculada com a ferramenta online *EMBOSS Needle* (MCWILLIAM *et al.*, 2013) e os alinhamentos foram gerados com o software *MAFFT* versão 7 (estratégia FFT-NS-i) (KATO; STANDLEY, 2013). A representação gráfica do alinhamento foi gerada pelo software *Jalview* versão 2 (WATERHOUSE *et al.*, 2009).

Para investigar os níveis de expressão de transcritos dos genes de TcbRBP42 de ambos os haplótipos e de seus genes vizinhos nas condições normais e de estresse por radiação gama foram utilizados dados de *RNA-Seq* de epimastigotas WT do *T. cruzi* CL Brener gerados previamente pelo Laboratório de Genética Bioquímica (UFMG) em parceria com o Dr. John S. Mattick (*Garvan Institute*, Austrália) e parcialmente disponíveis online no *Sequence Read Archive* (SRA– <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) sob o número de acesso SRP072756 (apenas dados da condição normal). Para a geração dos dados, o RNA total de epimastigotas WT nas condições normais e 24 horas após exposição à radiação gama foi extraído com os protocolos do *TRIzol* (Thermo Fischer Scientific) e *RNeasy* (Qiagen). Em seguida, bibliotecas *paired end* foram construídas com o kit *TruSeq Stranded mRNA* (Illumina, Estados Unidos) e sequenciadas com o sistema *HiSeq 2500*. A qualidade do sequenciamento foi avaliada com o *FastQC* (ANDREWS, 2010) e as *reads* obtidas foram alinhadas simultaneamente contra ambos os haplótipos do genoma de referência do *T. cruzi* CL Brener utilizando-se o software *STAR* versão 2.6 (DOBIN *et al.*, 2013). Apenas as *reads* de mapeamento único foram utilizadas nas análises, sendo que o alinhamento foi visualizado com o pacote *Bioconductor Gviz* do software *R* (HAHNE; IVANEK, 2016) ou com o software *Integrative Genomics Viewer (IGV)* versão 2.4.14 (THORVALDSDOTTIR; ROBINSON; MESIROV, 2013). A cobertura de *reads* dos genes foi utilizada para avaliar a expressão dos genes de TcbRBP42 em relação aos outros

genes presentes em suas regiões genômicas. Adicionalmente, o alinhamento gerado foi utilizado para investigar se a presença de uma região adicional na porção 5' do gene de TcbRBP42 do haplótipo Não Esmeraldo-like estava correta ou constituía um erro de anotação.

4.2 Caracterização das estruturas primária e secundária de TcbRBP42

A identificação de domínios e motivos conservados foi realizada com o software *InterProScan* versão 5 (JONES *et al.*, 2014) e também manualmente. Foram analisadas as proteínas RBP42 do *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like (TcCLB.509167.140), *T. cruzi* CL Brener Não Esmeraldo-like (TcCLB.485683.10), *T. cruzi* Y (WEISBARTH *et al.*, 2018), *T. brucei* TREU927 (Tb927.6.4440) e *L. braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (LbrM.30.3080). Em seguida, as sequências proteicas foram alinhadas com o software *MAFFT* versão 7 (estratégia FFT-NS-i) (KATO; STANDLEY, 2013) e a representação gráfica do alinhamento foi gerada com o software *Jalview* versão 2 (WATERHOUSE *et al.*, 2009). Posteriormente, a análise de identidade e similaridade entre as sequências foi realizada utilizando-se a ferramenta *EMBOSS Needle* (MCWILLIAM *et al.*, 2013). A similaridade e identidade entre a proteína G3BP1 de humanos (Uniprot ID: Q13283) e as proteínas RBP42 de ambos os haplótipos de *T. cruzi* CL Brener também foi calculada. A predição de estrutura secundária para todas as sequências proteicas analisadas foi realizada com o servidor web *RaptorX-Property* (WANG, S. *et al.*, 2016). A representação gráfica dos resultados obtidos na busca por domínios/motivos conservados e predição de estrutura secundária foi gerada com o *IBS - Illustrator for biological sequences* versão 1.0 (LIU *et al.*, 2015). A ferramenta *EMBOSS Pepstats* (MCWILLIAM *et al.*, 2013) também foi utilizada para analisar a composição de aminoácidos das proteínas estudadas.

4.3 Modelagem comparativa

Modelos moleculares para os domínios NTF2-like e RRM da proteína TcbRBP42 do haplótipo Esmeraldo-like do *T. cruzi* CL Brener foram produzidos por modelagem comparativa. A busca por estruturas homólogas foi realizada utilizando-se a função de modelagem intensiva do servidor web *Phyre2* (KELLY *et al.*, 2015). A escolha das estruturas homólogas mais adequadas para serem utilizadas como moldes foi baseada nos seguintes critérios: porcentagens de similaridade e identidade entre as sequências, cobertura da *query* e resolução para estruturas determinadas por cristalografia. A identidade e a similaridade entre as sequências foram calculadas com o servidor web *SIAS* (<http://imed.med.ucm.es/Tools/sias.html>). Para modelar o

domínio NTF2-like (resíduos 1-130), a estrutura molde selecionada foi o Fator de Transporte Nuclear 2 (NTF2) do *Cryptosporidium parvum* (código do PDB: 1ZO2) (VEDADI *et al.*, 2007). Para o domínio RRM (resíduos 289-372) a estrutura escolhida como molde foi o segundo domínio RRM da Proteína Ligante de RNA 19 (código do PDB: 2DGW). As sequências de aminoácidos de ambos os domínios de TcbRBP42 foram alinhadas contra aquelas de seus respectivos moldes utilizando-se o alinhador *Promals3D* (PEI; KIM; GRISHIN, 2008). Após pequenos ajustes manuais, o alinhamento foi utilizado pelo software *MODELLER* versão 9.1 (ŠALI; BLUNDELL, 1993) para gerar os modelos 3D. Inicialmente, um conjunto de cem modelos candidatos foram produzidos para cada domínio. Esses modelos foram ordenados de acordo com os valores de *DOPE* fornecidos pelo *MODELLER* e os dez melhores modelos candidatos foram submetidos manualmente ao *PDBsum* (LASKOWSKI *et al.*, 2018), *Verify3D* (EISENBERG; LÜTHY; BOWIE, 1997) e *ProSa-web* (WIEDERSTEIN; SIPPL, 2007). Foram avaliadas, respectivamente, a qualidade estereoquímica (diagramas de Ramachandran do *Procheck* (LASKOWSKI *et al.*, 1993)), a qualidade geral do modelo por meio dos *Z-scores* (desvio da energia total da estrutura em relação à uma distribuição de energia gerada a partir de conformações aleatórias) e a compatibilidade da estrutura 3D do modelo com a sua sequência de aminoácidos (*3D-ID score*). Em seguida, o modelo candidato melhor avaliado para cada domínio foi submetido ao protocolo de refinamento de *loops* do *MODELLER*. Os modelos refinados foram então novamente ordenados e validados como descrito anteriormente. Finalmente, o melhor modelo 3D para cada domínio de TcbRBP42 foi estruturalmente alinhado com a sua estrutura molde e o desvio quadrático médio (RMSD) foi calculado utilizando-se o software *UCSF Chimera* versão 1.12 (PETTERSEN *et al.*, 2004). Este último também foi utilizado para produzir imagens dos modelos 3D construídos. O banco de dados *OLDERADO* (KELLEY; SUTCLIFFE, 2008) foi utilizado para identificar a estrutura mais representativa do conjunto NMR (Ressonância magnética nuclear) da estrutura 2DGW antes da realização do alinhamento estrutural.

4.4 Análise de conservação proteica e inferência filogenética

Sequências de aminoácidos de proteínas RBP42 pertencentes a diferentes espécies de cinetoplastídeos foram recuperadas do banco de dados *TriTrypDB* (ASLETT *et al.*, 2010) após busca com os identificadores dos genes de RBP42 do *T. cruzi* CL Brener (TcCLB.509167.140, TcCLB.485683.10). Dentre as sequências recuperadas foram escolhidas para análise: *Trypanosoma vivax* Y486 (TvY486_0603830), *Trypanosoma congolense* IL3000

(TcIL3000_6_3860), *Trypanosoma brucei* TREU927 (Tb927.6.4440), *Trypanosoma evansi* STIB 805 (TevSTIB805.6.4570), *Trypanosoma cruzi* CL Brener Não Esmeraldo-like (TcCLB.485683.10), *Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo-like (TcCLB.509167.140), *Trypanosoma cruzi* Y (WEISBARTH *et al.*, 2018), *Trypanosoma cruzi* Dm28c (BCY84_01141), *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/1-2012 (TCSYLVIO_003340), *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 (LbrM.30.3080), *Leishmania major* SD 75.1 (LMJSD75_300038300), *Leishmania tropica* L590 (LTRL590_300039500), *Leishmania infantum* JPCM5 (LinJ.30.3130), *Leishmania donovani* BPK282A1 (LdBPK_303130.1), *Endotrypanum monterogeii* LV88 (EMOLV88_300036900), *Blechnomonas ayalai* B08-376 (Baya_060_0150), *Crithidia fasciculata* Cf-C1 (CFAC1_260055900) e *Leptomonas seymouri* ATCC 30220 (Lsey_0105_0110). As sequências escolhidas foram então alinhadas com o software *MAFFT* versão 7 (estratégia FFT-NS-i) (KATO; STANDLEY, 2013) e submetidas à análise de conservação e inferência filogenética. A sequência de *Bodo Saltans* (UniProt ID: BSAL_33520) foi incluída como grupo externo na reconstrução filogenética.

A análise de conservação proteica entre as espécies de cinetoplastídeos escolhidas baseou-se na inspeção do alinhamento múltiplo de sequências gerado e na geração de logos utilizando-se o *WebLogo* versão 2.8.2 (CROOKS *et al.*, 2004). As relações filogenéticas foram reconstruídas com o método de inferência Bayesiana utilizando-se o software *MrBayes* versão 3.2.6 (RONQUIST *et al.*, 2012) disponível como uma ferramenta no *CIPRES Science Gateway* versão 3 (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010). O modelo de evolução mais adequado aos dados foi determinado com o software *ProtTest* versão 3.4.2 (DARRIBA *et al.*, 2011) de acordo com o critério de informação Bayesiano (BIC). Para a construção da árvore filogenética os seguintes parâmetros foram utilizados: matriz de substituição de aminoácidos Jones-Taylor-Thornton (JTT) (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992), distribuição gama discreta da taxa de variação entre sítios (+G) (YANG, 1996) e frequência de aminoácidos estimadas a partir dos dados (+F) (CAO *et al.*, 1994). Adicionalmente, a distribuição de probabilidades no comprimento dos ramos foi calculada sob o modelo de relógio molecular estrito uniforme. A análise Bayesiana foi conduzida com quatro cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) (uma fria e três quentes) calculadas simultaneamente. Quatro corridas independentes, cada uma com quatro milhões de gerações, foram realizadas, sendo que árvores filogenéticas foram amostradas a cada 500 gerações. A convergência entre as corridas foi monitorada com o software *Tracer* versão 1.7 (<http://beast.community/tracer>) e 25% das árvores amostradas no início de cada corrida foram descartadas (*burn-in*) antes do cálculo das probabilidades a posteriori associadas aos ramos internos da filogenia (valores de confiança). A ferramenta

online *Interactive Tree Of Life-iTOL* versão 3 (LETUNIC; BORK, 2016) foi utilizada para visualizar e anotar a árvore filogenética consenso obtida.

4.5 Construção de vetores de expressão

Os vetores de expressão utilizados nesse trabalho, pRock_SBP/6His_RBP42 e pRock_SBP/His_GFP, foram construídos a partir do vetor pRockGFP_NEO cedido pela Doutora Santuza Teixeira (Departamento de Bioquímica e Imunologia, ICB, UFMG) (DAROCHA *et al.*, 2004). Os procedimentos de clonagem foram realizados pela Doutora Helaine Grazielle Santos Vieira conforme o descrito a seguir. Primeiramente, realizou-se a síntese de uma sequência de 173 pb contendo sítios de restrição flanqueadores para as enzimas NheI e Sall (extremidades 5' e 3', respectivamente), sítios de restrição internos para XbaI e XhoI, e as *tags* do peptídeo ligador de estreptavidina (SBP) e de histidina (6His) (Epoch Life Science) (**Figura 9**). Essa sequência foi então digerida com as enzimas NheI e Sall e purificada através da precipitação de DNA com acetato de sódio 3M e isopropanol (volume 1:3). Paralelamente, o vetor pRockGFP_NEO foi digerido com as enzimas XbaI e XhoI (as extremidades coesivas geradas são compatíveis com aquelas produzidas por NheI e Sall), submetido à eletroforese em gel de agarose 0,7% e purificado do gel utilizando-se o kit *Qiaquick Purification* (Qiagen). Em seguida, foi realizada a ligação do inserto no vetor (proporção 1:1) com uma unidade de DNA ligase T4 e o tampão da enzima (NEB Biolabs) por um período de 16 h a 16°C. Após a ligação, 50 µL de bactérias eletrocompetentes (*Escherichia coli* DH5α) foram transformadas com 3 µL da reação de ligação em cubetas de 0,2 cm (Bio-Rad) de acordo com as instruções do fabricante. As bactérias foram então incubadas em meio líquido *CircleGrow* (MP Biomedicals) por 45 minutos a 37°C e semeadas em meio sólido *CircleGrow* suplementado com 100 µg/mL de ampicilina, que foi incubado a 37°C por 16 h. Colônias isoladas foram selecionadas e expandidas em meio líquido *CircleGrow* suplementado com 100 µg/mL de ampicilina por 6 h a 37°C sob agitação. Os plasmídeos foram isolados com o kit *NucleoSpin® Plasmid NoLid* (MACHEREY-NAGEL).

Para a clonagem dos genes TcbRBP42 (Esmeraldo-like) e GFP no vetor, os genes foram amplificados por PCR a partir do DNA genômico do *T. cruzi* CL Brener (para TcbRBP42) e do vetor pRockGFP_Neo (para GFP) utilizando-se *primers* contendo sítios de restrição para XbaI e XhoI (**Tabela 1**) e a DNA polimerase *Phusion* (Thermo Scientific). Os produtos de PCR foram então clonados no vetor. No início desse trabalho, bactérias eletrocompetentes foram transformadas com os vetores construídos e plaqueadas em meio sólido conforme descrito

anteriormente. A presença dos genes de interesse em colônias isoladas foi confirmada com PCR de colônia previamente à expansão dessas em meio líquido para o isolamento dos plasmídeos. Ao final desses procedimentos, os vetores construídos foram confirmados por sequenciamento pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) utilizando-se 10 pmol de cada primer (**Tabela 1**) e 100 ng de cada um dos vetores. O sequenciamento foi realizado pela empresa Myleus Biotecnologia no sistema *ABI 3130 Genetic Analyzer* (Life Technologies).

4.6 Cultura e transfecção de epimastigotas do *T. cruzi* CL Brener

Epimastigotas do clone CL Brener foram cultivadas a 28°C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptone*) (CAMARGO, 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (Gibco) e com os antibióticos estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 U/mL) (Invitrogen). Para células transfectadas, o antibiótico G418 também foi adicionado ao meio, sendo retirado apenas antes de experimentos com radiação gama e benzonidazol. As culturas foram repicadas semanalmente e a contagem de células foi realizada periodicamente em câmaras de Neubauer com o corante vital eritrosina.

Para a transfecção dos parasitos, 4×10^7 epimastigotas em fase exponencial do crescimento foram centrifugadas por 3 minutos a 3500 rpm, lavadas em PBS e ressuspendidas em 80 µL do tampão Tb-BSF (50 mM HEPES, 0,15 mM de cloreto de cálcio, 90 mM de fosfato de sódio, 5 mM de cloreto de potássio, pH 7,3). Em seguida, as epimastigotas e 10 µg do vetor (pROCK_SPB/6His_RBP42 ou pROCK_SPB/6His_GFP) previamente linearizado com a enzima NotI foram combinados em um volume final de 100 µL do tampão Tb-BSF em uma cubeta de 0,2 cm (Bio-Rad) (BURKARD; JUTZI; RODITI, 2011). A eletroporação foi realizada com o programa U-033 do eletroporador *Amaza Nucleofector* (Lonza Cologne AG, Germany). A seleção dos parasitos que integraram os vetores foi realizada com 200 µg/mL do antibiótico G418 (neomicina) por um período de no mínimo trinta dias.

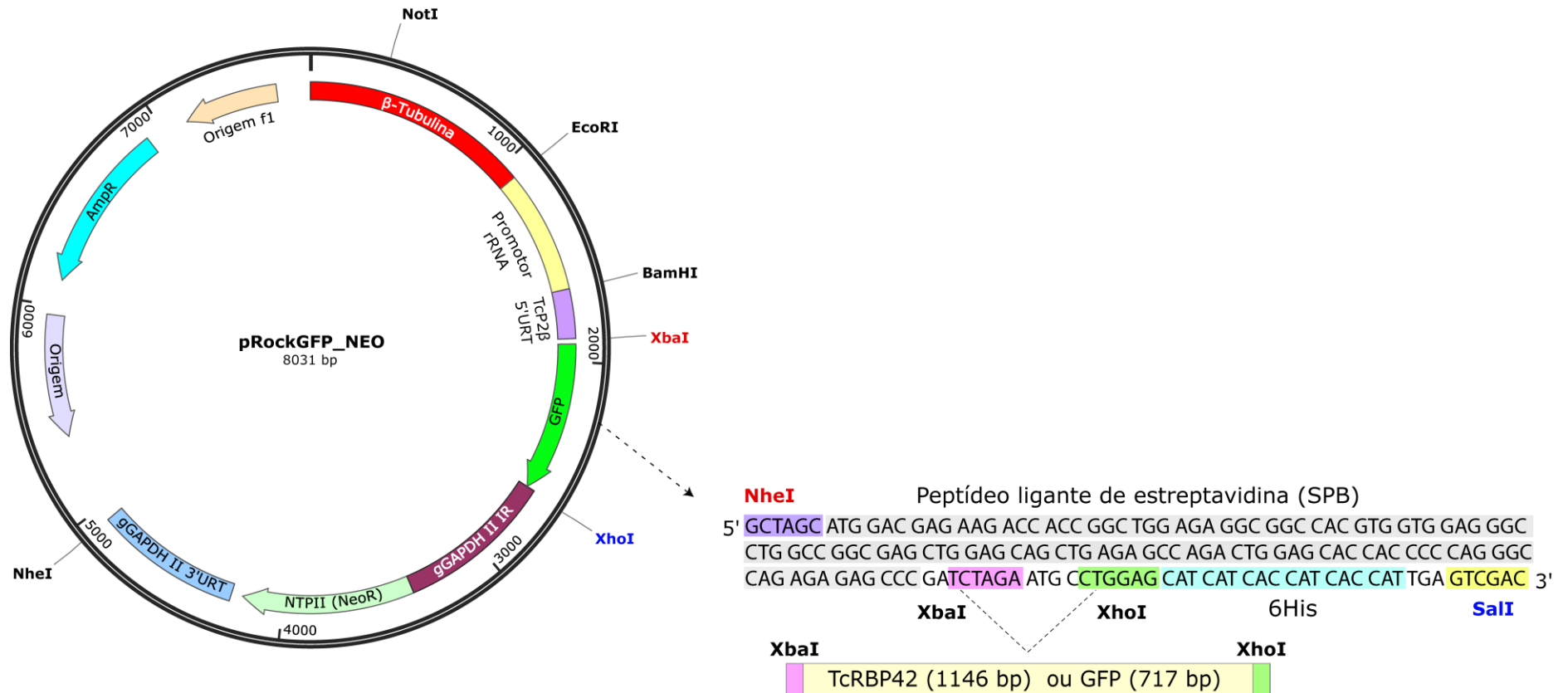


Figura 9: Representação esquemática das etapas de clonagem utilizadas na construção dos vetores para expressão de proteínas recombinantes.

Para a construção dos vetores pRock_SPB/6His_RBP42 e pRock_SPB/6His_GFP, uma sequência de 173 pares de bases contendo os sítios de restrição 5' NheI e 3' Sali, uma tag SPB, sítios de restrição internos XbaI e XhoI e uma tag 6His foi sintetizada e clonada no vetor pRockGFP_NEO em substituição ao gene GFP. Em seguida os genes TcRBP42 (Esmeraldo-like) e GFP foram clonados nos novos sítios de XbaI e XhoI inseridos. A expressão desses genes gera proteínas contendo uma tag SPB no N-terminal e 6His no C-terminal. O mapa do vetor pRockGFP_NEO foi adaptado de DAROCHA *et al.* (2004).

Tabela 1: Lista de *primers* para TcbRBP42 e GFP

| <i>Aplicação</i> | <i>Primers</i> | |
|-----------------------------|----------------|------------------------------------|
| Clonagem TcbRBP42 | Forward | ATGCTCTAGAGATGCTAACGTCTCAAGAGGT |
| | Reverse | TTCGCTCGAGGTGAGTCCTATTTTCGTTGTTCTC |
| Clonagem GFP | Forward | CTGCTCTAGATATGAGTAAAGGAGAA |
| | Reverse | ATCGCTCGAGTTTGTATAGTTCATCCA |
| Sequenciamento (vetores) | Forward | TGTGGATGCCAAGTCTGTGC |
| | Reverse | CAGAACAACCTGCCGAAGGA |
| Real time PCR TcbRBP42 | Forward | GTCAGCGACAGACGAAGAAA |
| | Reverse | TCAACGGCAGCTGTCTTATC |
| Real time PCR GAPDH | Forward | AGCGCGCGTCTAAGACTTACA |
| | Reverse | TGGAGCTGCGGTTGTCAATT |

As sequências sublinhadas nos *primers forward e reverse* identificam os sítios de restrição das enzimas XbaI e XhoI, respectivamente. Apenas a sequência de TcbRBP42 do haplótipo Esmeraldo-like foi clonada.

4.7 Western blot

Para a obtenção de extratos proteicos, 1×10^8 epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram centrifugadas por 3 minutos a 3500 rpm, lavadas com PBS e lisadas com 50 μ L de tampão de amostra 2X (200 mM DTT, 0,2% azul de bromofenol, 20% glicerol, 4% SDS, 100 mM Tris-HCL, pH 6,8). As amostras foram sonicadas (*Fisher Scientific™ Model 505 Sonic Dismembrator*) com 30% da amplitude máxima por um total de 5 ciclos de 20 segundos com 20 segundos de intervalo entre cada ciclo. Após cinco minutos de fervura, os extratos foram dosados com o kit *BCA Protein Assay* (Pierce™) e armazenados em freezer -80°C.

O fracionamento das proteínas foi realizado por eletroforese SDS-PAGE (LAEMMLI, 1970). Para tanto, os extratos proteicos foram descongelados em gelo, fervidos por cinco minutos e aplicados (20 μ g) em gel de poliacrilamida de 1mm composto por um gel *stack* (4%) e um gel de separação (12%). A corrida foi realizada a 100 V com o tampão Tris-Glicina (250 mM glicina, 0,01% SDS, 25 mM Tris-HCl, pH 8,3). Ao final da corrida, o gel foi incubado em tampão de transferência (48 mM Tris, 20% metanol, 30 mM glicina, 0,037% de SDS) por 10 minutos e o seu conteúdo foi transferido para uma membrana de PVDF (fluoreto de polivinilideno) lavada com metanol e água Milli-Q. A transferência foi realizada com o sistema *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) por 40 minutos a 200 mA. Em seguida, a eficiência da transferência foi verificada (coloração da membrana com 0,2 % de Ponceau S em 5% de ácido acético glacial e descoloração com água Milli-Q) e a membrana foi bloqueada por duas horas com solução contendo 5% de BSA em tampão TBST (150 mM cloreto de sódio, 0,1% Tween 20, 20 mM Tris e pH 7,5). Após o bloqueio, a membrana foi lavada três vezes em tampão TBST (5 minutos cada) e incubada *overnight* a 4°C em solução contendo o anticorpo Anti-His (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:1000 em tampão TBST suplementado com 3% de BSA. Após novas lavagens com TBST, a membrana foi incubada por uma hora com o anticorpo secundário Anti-mouse HPR-conjugado (Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab) diluído 1:10000 em tampão TBST suplementado com 3% de BSA. A membrana foi novamente lavada três vezes com TBST e revelada utilizando-se o *ECL Western Blotting System* (GE Healthcare) e o equipamento *Gel Logic 1500 Imaging System* (Carestream Health). Os géis espelhos produzidos foram corados por 30 minutos em *Coomassie Blue* (0,25% Coomassie Brilliant Blue G-250, 50% metanol, 10% ácido acético) e descorados *overnight* com solução de 10% de ácido acético e 30% de metanol sob agitação constante. Os géis foram fotografados com o *Gel Doc™ EZ Imager* (Bio-Rad).

4.8 PCR em tempo real

O RNA total de epimastigotas transfectadas com rTcbRBP42 e WT em fase exponencial de crescimento foi extraído utilizando-se o protocolo de extração com *TRIzol* (Life Technologies). As amostras de RNA obtidas foram tratadas com a *TURBO™ DNase* (Thermo Fisher Scientific) e o cDNA foi produzido utilizando-se o kit *Superscript II kit first strand synthesis* (Invitrogen). As reações de PCR em tempo real foram realizadas com kit *PowerUp SYBR Green Master Mix* (Thermo Fisher Scientific) e o sistema *7900HT Fast Real-Time PCR* (Applied Biosystems). Os níveis de expressão do gene alvo foi normalizado com os níveis de expressão do gene GAPDH e o valor de *fold-change* nas células transfectadas em relação ao WT foi calculado com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). As sequências dos *primers* utilizados estão disponíveis na **Tabela 1**.

4.9 Tratamento do *T. cruzi* com radiação gama e benzonidazol

Para o tratamento com radiação gama, 50 mL de culturas contendo 1×10^7 epimastigotas/mL foram irradiadas com 500 Gy (taxa dose: 1560 Gy/h) proveniente de uma fonte de cobalto Co^{60} localizada no Centro de Desenvolvimento de Tecnologia Nuclear (CDTN), UFMG. As células foram então contadas diariamente em câmaras de Neubauer com o corante vital eritrosina por um período de 264 h. Para o tratamento com benzonidazol, culturas contendo 1×10^7 epimastigotas/mL foram tratadas com 120 e 240 μM de benzonidazol em placas de 24 poços. O benzonidazol permaneceu no meio durante todo o período de duração do experimento. As células também foram contadas diariamente por um período de 144 h e foram mantidas em estufa a 28°C em ambos os experimentos. Os experimentos foram realizados em duplicata técnica com três réplicas biológicas e o software *GraphPad Prism 7* (www.graphpad.com/) foi utilizado para a geração das curvas de crescimento e cálculo do desvio padrão das contagens. Também foram coletadas amostras para experimentos de imunofluorescência e microscopia eletrônica. Para os ensaios de imunofluorescência, parasitos foram coletados nos tempos de 24 e 48 h após o início dos tratamentos com radiação gama e benzonidazol. Adicionalmente, os RNAs recém-sintetizados também foram marcados através da incorporação do análogo 5-etinil-uridina (EU), que permaneceu em contato com as células durante às 24 h que antecederam a coleta das amostras. Para os tratamentos com Actinomicina (10 $\mu g/mL$) e Puromicina (200 $\mu g/mL$), as drogas foram adicionadas, respectivamente, 24 e 1 h antes da

coleta das amostras conforme descrito anteriormente (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007; VIEIRA *et al.*, 2014). Para os ensaios de microscopia eletrônica foram coletadas células apenas no tempo de 24 h após a irradiação.

4.10 Microscopia de Fluorescência e Eletrônica de Transmissão

Para os ensaios de imunofluorescência, 1×10^7 células coletadas durante os tratamentos genotóxicos foram lavadas duas vezes com PBS, fixadas por 20 minutos em 500 μ L de uma solução de paraformaldeído a 4%, lavadas novamente e ressuspensas em 500 μ L de PBS. Um volume de 20 μ L de células fixadas foi adicionado a cada poço de lâminas de oito poços previamente revestidas com Poly-L-Lisina (Sigma) a 0,1%. Após vinte minutos de aderência, o excesso de células foi retirado por meio de novas lavagens com PBS e as células foram permeabilizadas e bloqueadas durante 30 minutos com solução contendo 0,5% Triton X-100 e 2% BSA diluídos em PBS. Após novas lavagens, as células foram incubadas *overnight* a 4°C com o anticorpo primário Anti-His (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology) diluído 1:100 em PBS suplementado com 2% de BSA. Em seguida, novas lavagens foram realizadas com PBS e as células foram incubadas por 1,5 h à temperatura ambiente com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 (ab150113, Abcam) diluído 1:600 em PBS suplementado com 5% de soro de cabra (Sigma). Na sequência, o RNA foi corado utilizando-se o *Click-iT™ RNA Alexa Fluor™ 594 Imaging Kit* (Thermo Fisher Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Para corar o DNA nuclear e Kinetoplasto, as células foram incubadas por 20 minutos com Hoechst 3342 (ThermoFisher Scientific) diluído 1:1000 em PBS e lavadas com PBS em seguida. As lâminas foram montadas utilizando-se o meio de montagem *ProLong® Diamond Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific) e as imagens foram adquiridas utilizando-se a objetiva de 63X (imersão em óleo) do microscópio de fluorescência Apotome.2 Zeiss disponível no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB-UFMG (CAPI).

Para a microscopia eletrônica, as células foram fixadas durante duas horas em solução contendo 5% de glutaraldeído diluído em tampão fosfato 0,1 M pH 7,2. Após lavagem com tampão fosfato 0,1 M pH 7,2, as células foram processadas de acordo com procedimentos rotineiramente adotados (PAIVA *et al.*, 2015). O processamento das amostras incluiu a fixação em tetróxido de ósmio, o tratamento com acetato de uranila e a inclusão em resina EPON. Os cortes ultrafinos foram tratados com citrato de chumbo e as imagens foram adquiridas com o Microscópio Eletrônico de Transmissão Tecnai G2-12—SpiritBiotwin FEI—120 kV disponível no Centro de Microscopia da UFMG.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização do gene de TcbRBP42 e de seu contexto genômico

A consulta realizada ao banco de dados *TriTrypDB* mostrou que apenas dois genes de RBP42 estão presentes no genoma do *T. cruzi* CL Brener: um no haplótipo Esmeraldo-like (TcCLB.509167.140) e outro no Não Esmeraldo-like (TcCLB.485683.10). Inicialmente, esses genes se encontravam anotados como hipotéticos no banco de dados, mas esta anotação foi atualizada no decorrer desse trabalho para refletir as relações de ortologia detectadas entre as proteínas TcbRBP42 e as proteínas RBP42 que foram sendo estudadas em tripanosomatídeos.

Em relação às características dos genes de TcbRBP42, as informações recuperadas do banco de dados revelaram uma divergência de tamanho entre eles, sendo que o gene do haplótipo Não Esmeraldo-like possuía 96 nucleotídeos adicionais em sua porção 5'. Para investigar se esta diferença entre os genes era real ou correspondia a um erro de anotação, dados de *RNA-seq* de epimastigotas WT do *T. cruzi* CL Brener (código de acesso no SRA: SRP072756) foram alinhados contra o genoma de referência. A análise da cobertura de *reads* nos dois genes de TcbRBP42 revelou que a região adicional observada não possui nenhuma cobertura de *reads*. Dessa forma, a região codificadora dos dois genes potencialmente se inicia no mesmo códon de metionina (**Figura 10**). Após a correção da discrepância de tamanho, a comparação entre os dois genes mostrou que estes são muito semelhantes entre si: ambos estão localizados no cromossomo 32 e codificam proteínas TcbRBP42 cujos tamanhos diferem apenas em um único aminoácido (**Tabela 2**). Com relação à análise de sequência, o alinhamento entre os dois genes (**Figura 11**) revelou a inserção de um códon de treonina no gene do haplótipo Não Esmeraldo-like e a presença de 13 SNPs, dos quais apenas seis causaram a substituição de aminoácidos nas proteínas (**Figura 12**). A identidade de sequência desses genes alcançou os 98,6%.

Quanto a análise do contexto genômico, os genes vizinhos aos genes de TcbRBP42 em ambos os haplótipos codificam proteínas de funções muito diversas e também proteínas hipotéticas. Estão presentes os genes das proteínas S-adenosilmetionina descarboxilase-proenzima, Homoserina quinase, Cinesina, tRNA (Guanina-1) metiltransferase e Valil-tRNA sintetase. Adicionalmente, os dados de *RNA-seq* de epimastigotas WT também foram utilizados para inferir a expressão dos genes e mostraram que os genes TcbRBP42 pertencentes a ambos os haplótipos são os mais expressos em suas regiões genômicas, como revela a cobertura de *reads* dessas regiões (**Figura 13 e Figura 14**). Em ambos os contextos genômicos também

foram detectadas regiões não anotadas, mas que possuem cobertura de *reads*. Adicionalmente, na região genômica de TcbRBP42 (Não Esmeraldo-like) também são encontrados genes anotados apenas como fragmentos, sendo que dois deles são potencialmente erros de anotação. Esses genes codificam apenas pequenos fragmentos da proteína TcbRBP42 (TcCLB.504257.9) e de uma proteína hipotética conservada (TcCLB.485683.5), não possuindo nenhuma cobertura de *reads*.

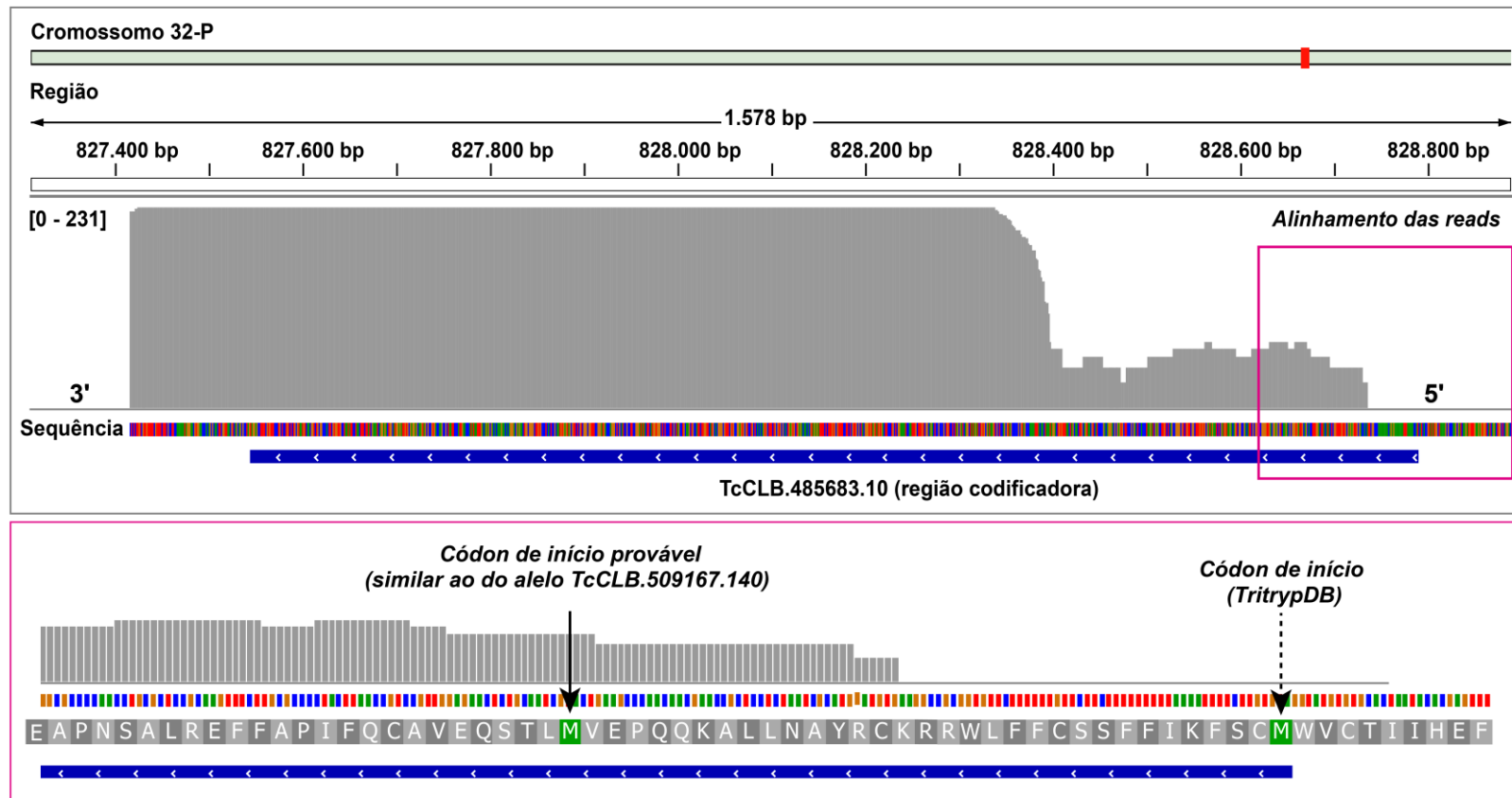


Figura 10: Cobertura de *reads* do gene TcbRBP42 do haplótipo Não Esmeraldo-like.

O alinhamento dos dados de *RNA-seq* contra o gene de referência (TcCLB.485683.10) revelou que a região anotada no *TryTripDB* como o início do gene (seta descontínua) não possui cobertura de *reads*. Provavelmente, o gene se inicia na segunda metionina indicada (seta contínua), que é similar ao início do gene de RBP42 do haplótipo Esmeraldo-like. Número entre colchetes: amplitude do número de *reads* alinhadas. A região delimitada pelo quadrado rosa foi ampliada na segunda parte da figura.

Tabela 2: Características dos genes de RBP42 do *T. cruzi* CL Brener

| | Esmeraldo-like TcCLB.509167.140 | Não Esmeraldo-like TcCLB.485683.10 |
|-----------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|
| <i>Tamanho do gene</i> | 1146 pb | 1149pb* |
| <i>Cromossomo</i> | 32-S | 32-P |
| <i>Número de cópias</i> | 1 | 1 |
| <i>Tamanho da proteína</i> | 381 aa | 382* aa |
| <i>Anotação da proteína</i> | Putativa | Putativa |

As informações foram recuperadas do banco de dados *TriTrypDB*. *Tamanho corrigido a partir do alinhamento de dados de *RNA-seq* contra o gene de referência.

| | | |
|----------------|---|------|
| <i>Esm</i> | a tgc taacg tc tcaagagg ttgcc tgc caat tca tccccgcg ttc t tgaacgcc tgcg tccaacccccgaggc tgcggaaa tg tacggccc | 96 |
| <i>Não-Esm</i> | a tgc taacg tc tcaagagg ttgcc tgc caat tca tccccgcg ttc t tgaacgcc tgcg tccaacccccgaggc tgcggaaa tg tacggccc | 96 |
| <i>Esm</i> | aac tgc tcc ttaacaa tgc tagac ttg ta tacggcacaacagaag tccgaaacgaggacg tccc tccggc tg tagagcaa tgggc tcagat ttc t | 192 |
| <i>Não-Esm</i> | aac tgc tcc ttaacaa tgc tagac ttg ta tacggcacaacagaag tccgaaacgaggacg tccc tccggc tg tagagcaa tgggc tcagat ttc t | 192 |
| <i>Esm</i> | cagggg tgcgagc tc tgcg tggagagc tac tccgccc tcccc t tgc tacgg tggag tgagcg tg tacg tgacaa tgc t cgc tgag tc taagacgaca | 288 |
| <i>Não-Esm</i> | cagggg tgcgagc tc tgcg tggagagc tac tccgccc tcccc t tgc tacgg tggag tgagcg tg tacg tgacaa tgc t tgc tgag tc taagacgaca | 288 |
| <i>Esm</i> | cg tcac tac t ttcag t t tgc tcaacat t t tggaggca tacggcgcgggggccc tacggc tccgaggcg tac t t ta tccg tcaccagat ttc tga tacgc | 384 |
| <i>Não-Esm</i> | cg tcac tac t ttcag t t tgc tcaacat t t tggaggca tacggcgcgggggccc tacggc tccgaggcg tac t t ta tccg tcaccagat ttc tga tacgc | 384 |
| <i>Esm</i> | cc tggatccgc tgagacggaacagccggagcca agagg tca c gcccgaccaagagccaaaa t taga ag t t t ccccaggcag tggaaag t tcagca | 480 |
| <i>Não-Esm</i> | cc tggatccgc tgagacggaacagccggagcca ggagg tca t gcccgaccaagagccaaaa t tagg ag t t t ccccaggcag tggaaag t tcagca | 480 |
| <i>Esm</i> | t tac tcaca tccccg t cagcga cagacgaagaaaggaaagaacagcagcaacagaagaagaa tac taccg t t g t tgg t c t tcaggcagc t gca | 573 |
| <i>Não-Esm</i> | t tac tcaca tccccg t cagcga cagacgaagaaaggaaagaacagcagcaacagaagaagaa tac taccg t t g t tgg t c t tcaggcagc t gca | 576 |
| <i>Esm</i> | gc tgcagca g cggcaga taagacagc tgc c g t t gaggccagagaccgcagc taccg tgcagcgacaacagccaccgg tgcca t cgaagccaaagaca | 669 |
| <i>Não-Esm</i> | gc tgcagca a cggcaga taagacagc tgc t g t t gaggccagagaccgcagc taccg tgcagcgacaacagccaccgg tgcca t cgaagccaaagaca | 672 |
| <i>Esm</i> | tgggc tagcc t t gccagcgc tcagccgaagggggagcagcgcagccac tgagag tga t ta tccccgagaa tggcg t gaa tgccga tgccac tgag | 765 |
| <i>Não-Esm</i> | tgggc tagcc t t gccagcgc tcagccgaagggggagcagcgcagccac tgagag tga t ta tccccgagaa tggcg g gaa tgccga tgccac tgag | 768 |
| <i>Esm</i> | g tcca t gccccggc aaagccgacccagacagagcaacggca taca tca tca t c tgcgggagg tgcaggggccacaaagcccc tgccaag t t tcc t | 861 |
| <i>Não-Esm</i> | g tcca t gccccggc aaagccgacccagacagagcaacggca taca tca tca t c tgcgggagg tgcaggggccacaaagcccc tgccaag t t tcc t | 864 |
| <i>Esm</i> | cg c tcccc tgc t g t t t c ta t tgg tga tgcgc tca t g t tcaacat tga t ta t gagg t t t caga t gaggaga t taag g cggcc t t tgg tccac tggca | 957 |
| <i>Não-Esm</i> | cg t tcccc tgc t g t t t c ta t tgg tga tgcgc tca t g t tcaacat tga t ta t gagg t t t caga t gaggaga t taag a cggcc t t tgg tccac tggca | 960 |
| <i>Esm</i> | gc taacat t g t c tccc t t c gcaacaac tc tgccaa tggccacg t c t tcc t gac t t t cggga taaagaaaagg t ta tggaca taa t taaggccaa t | 1053 |
| <i>Não-Esm</i> | gc taacat t g t c tccc t c gcaacaac tc tgccaa tggccacg t c t tcc t gac t t t cggga taaagaaaagg t ta tggaca taa t taaggccaa t | 1056 |
| <i>Esm</i> | ccaccgacag t cggggccc gcaagac tgc t g t gtagca t c taccgccagaggacgaggcagcaaggagagaacaacgaaaa taggac tca c tga | 1146 |
| <i>Não-Esm</i> | ccaccgacag t cggggccc gcaagac tgc t g t gtagca t c taccgccagaggacgaggcagcaaggagagaacaacgaaaa taggac tca c tga | 1149 |

Figura 11: Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes RBP42 do *T. cruzi* CL Brener.

Haplótipo Esmeraldo-like: Esm e Não Esmeraldo-like: Não-Esm. Identificadores: TcCLB.509167.140 e TcCLB.485683.10.

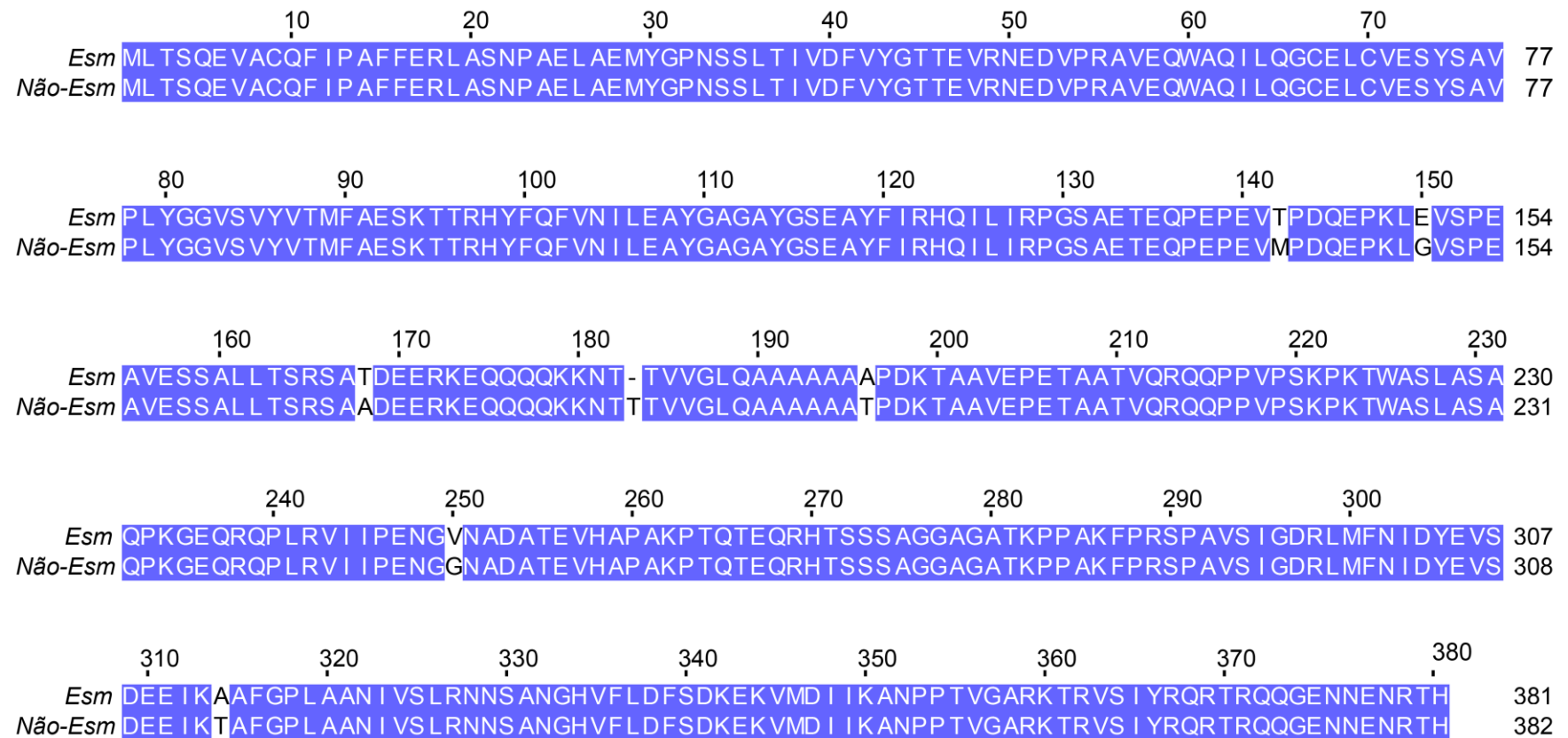


Figura 12: Alinhamento das sequências de aminoácidos das proteínas RBP42 do *T. cruzi* CL Brener.

Haplótipo Esmeraldo-like: Esm e Não Esmeraldo-like: Não-Esm. Identificadores: TcCLB.509167.140 e TcCLB.485683.10.

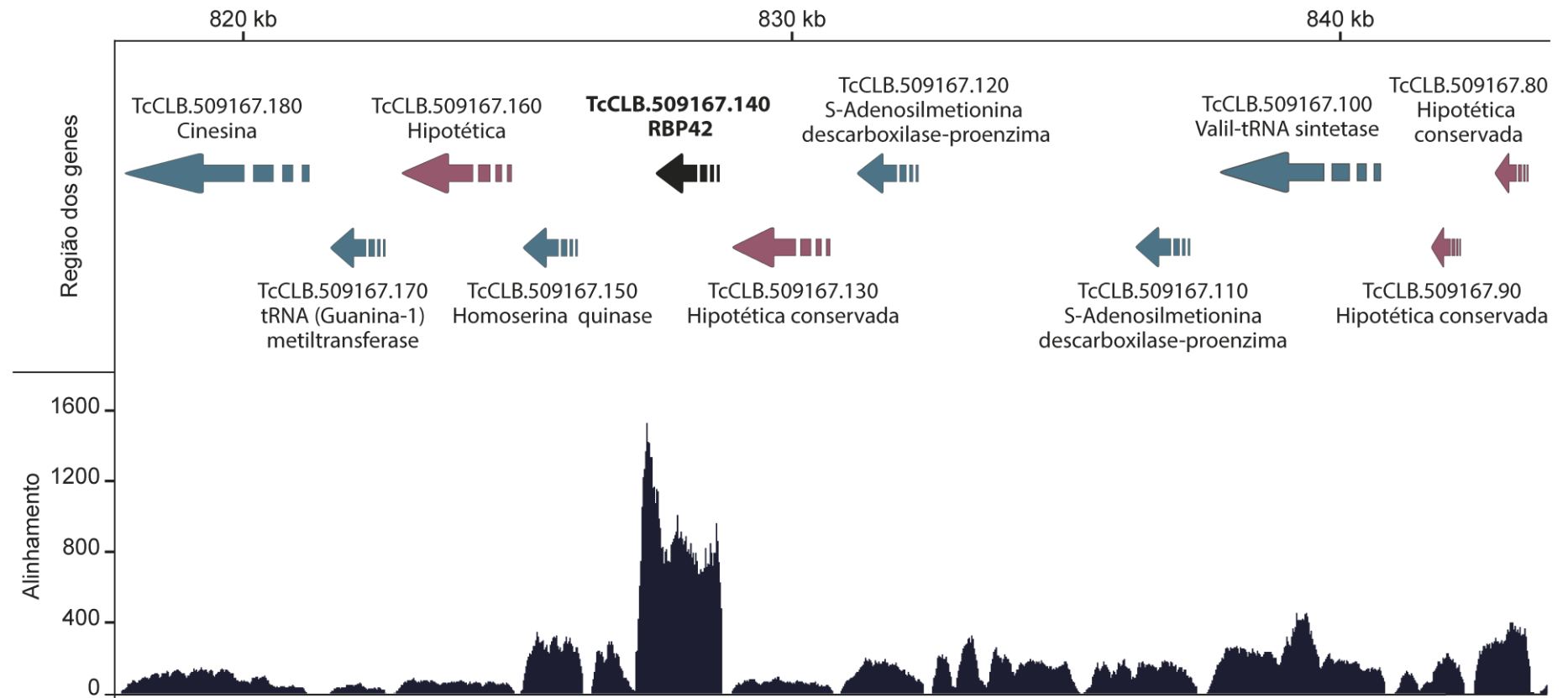


Figura 13: Contexto genômico do gene *TcbRBP42* do haplótipo Esmeraldo-like.

Os genes vizinhos a *TcbRBP42* (seta preta) codificam proteínas de funções conhecidas (setas azuis) ou hipotéticas (setas rosas). Os níveis de expressão dos genes são mostrados na região denominada de alinhamento, sendo que o gene de *TcbRBP42* é o mais expresso na região genômica mostrada (dados de *RNA-seq* de epimastigotas WT em condições normais).

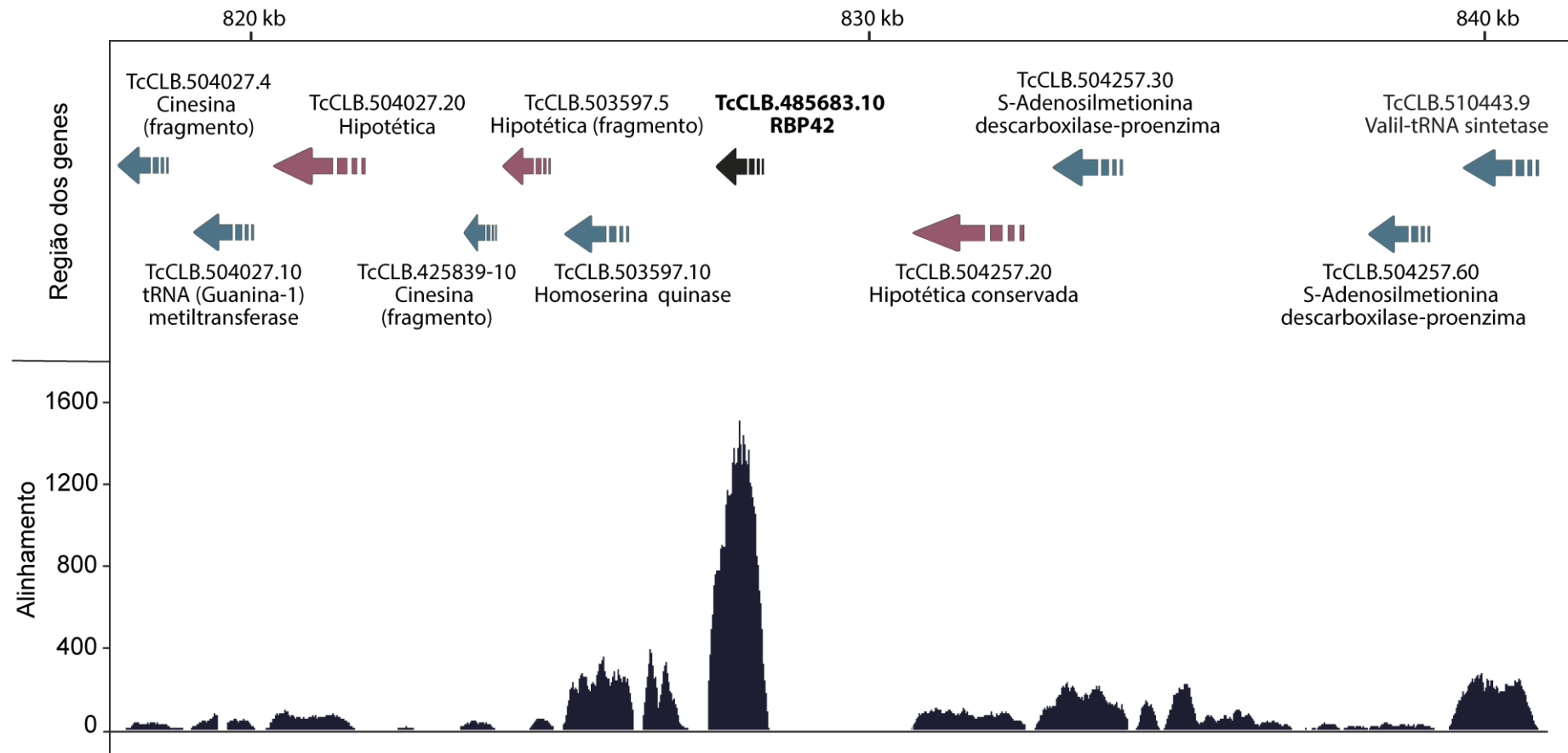


Figura 14: Contexto genômico do gene *TcbRBP42* do haplótipo Não Esmeraldo-like.

Os genes vizinhos a *TcbRBP42* (seta preta) codificam proteínas de funções conhecidas (setas azuis) ou hipotéticas (setas rosas). Os níveis de expressão dos genes são mostrados na região denominada de alinhamento, sendo que o gene de *TcbRBP42* é o mais expresso na região genômica mostrada (dados de *RNA-seq* de epimastigotas WT em condições normais). Os genes TcCLB.485683.5 e TcCLB.504257.9 não foram representados por estarem anotados apenas como fragmentos e não possuírem nenhuma cobertura de *reads*.

5.2 Caracterização da sequência e da estrutura secundária da proteína TcbRBP42

As buscas por motivos e domínios conservados somadas às predições de estrutura secundária revelaram que as proteínas RBP42 de ambos os haplótipos do *T. cruzi* CL Brener, inicialmente anotadas como hipotéticas no banco de dados *TriTrypDB*, compartilham a mesma estrutura modular de suas proteínas ortólogas pertencentes a *L. brasiliensis*, *T. brucei* e *T. cruzi* Y. Em todas essas proteínas estão presentes dois domínios estruturados, NTF2-like e RRM, ligados entre si por uma grande região central, cuja estrutura foi predita como sendo desordenada (*coil*). Em todas as proteínas RBP42 aqui analisadas, foi possível localizar nessa região central uma região rica em glutamatos e três motivos PxxP. Adicionalmente, essa região também se mostrou enriquecida em alaninas, prolinas e aminoácidos polares (Glu, Gln, Lys, Ser, Thr) (**Figura 15 A e B**). Com relação aos elementos de estrutura secundária que compõem os domínios das proteínas RBP42, foram preditos para o domínio NTF2-like três α -hélices e seis segmentos em conformação β dispostos na topologia de $\alpha\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\beta$. Para o domínio RRM foram preditas duas α -hélices e quatro segmentos em conformação β na topologia de $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$. A estrutura secundária predita para todas as proteínas RBP42 analisadas foram extremamente semelhantes entre si (**Figura 15 B**).

Dada a grande semelhança estrutural observada nas proteínas RBP42, a similaridade (% dos aminoácidos idênticos + similares) e a identidade (% dos aminoácidos idênticos) de sequência entre essas proteínas também foram analisadas. Comparando-se as proteínas TcbRBP42 de ambos os haplótipos entre si, foi observado que as mesmas apresentam 98,6% de identidade e similaridade de sequência. Quando a comparação é feita entre estas e as outras proteínas RBP42 estudadas em tripanosomatídeos, a similaridade e identidade de sequência ultrapassam os 97% para o *T. cruzi* Y e caem expressivamente para o *T. brucei* e *L. braziliences* (abaixo dos 57%) que são organismos um pouco mais distantes filogeneticamente (**Tabela 3**). Adicionalmente, o alinhamento múltiplo das sequências proteicas mostrou que as proteínas RBP42 de tripanosomatídeos possuem maior conservação nas regiões dos domínios e menor na região central em *coil*, que varia de tamanho entre elas indo de 132 a 164 aminoácidos. A variação na extensão dessa região central é a principal responsável pelas diferenças de tamanho observadas entre as proteínas RBP42 analisadas. Nas proteínas TcbRBP42 essa região central se estende por 163 ou 164 resíduos e possui pequenos segmentos de poli-alaninas e poli-glutaminas. Esses segmentos também estão presentes na proteína do *T. cruzi* Y. Além disso, as proteínas RBP42 das diferentes cepas do *T. cruzi* possuem uma pequena região em *coil*

adicional após o término do domínio RRM, o que não ocorre nas proteínas RBP42 pertencentes ao *T. brucei* e a *L. braziliensis* (**Figura 16**).

A comparação das proteínas RBP42 dos tripanosomatídeos com a proteína humana G3BP1 confirmou a semelhança na organização estrutural compartilhada entre elas. Em todas as proteínas estão presentes os mesmos domínios e motivos com exceção do domínio RGG, que está presente exclusivamente em G3BP1 e do número de motivos PxxP que ocorre apenas uma vez na proteína humana. Com relação à estrutura secundária, as regiões em *coil* presentes em G3BP1 são maiores do que aquelas das diferentes proteínas RBP42 e os domínios NTF2-like delas diferem em apenas um seguimento em conformação β (**Figura 15 A e B**). A identidade e similaridade de sequência entre G3BP1 e as proteínas TcbRBP42 são baixas, alcançando apenas 21 e 32%, respectivamente (**Tabela 3**).

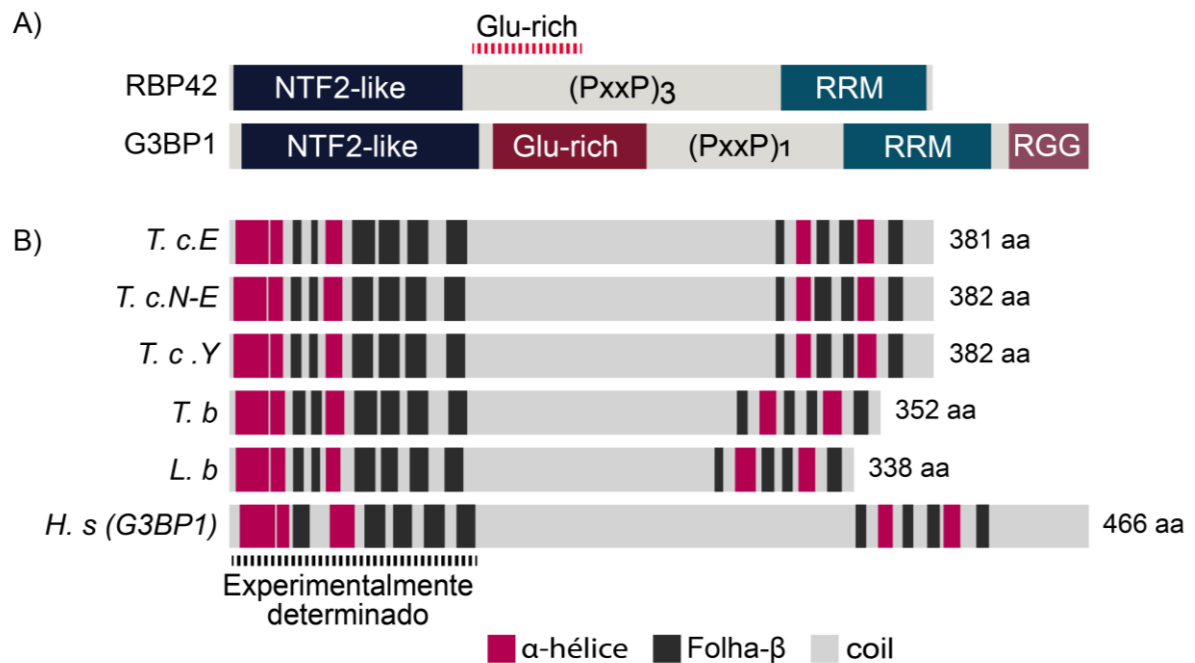


Figura 15: Análise da estrutura da proteína RBP42 do *T. cruzi* CL Brener e de outros tripanosomatídeos.

A) Diagrama esquemático dos domínios e motivos conservados presentes nas proteínas RBP42 de tripanosomatídeos em comparação com a proteína humana G3BP1. B) Predições de estrutura secundária. A estrutura do domínio NTF2-like de G3BP1 foi determinada experimentalmente por cristalografia (código do PDB: 4FCJ). NTF2-like: Fator de transporte nuclear 2-like, Glu-rich: Região rica em glutamatos, PxxP: Motivo rico em prolinas, RRM: Motivo de reconhecimento de RNA, RGG: Domínio rico em argininas e glicinas. Identificadores: *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like [*T.c.E*] (TcCLB.509167.140), *T. cruzi* CL Brener Não Esmeraldo-like [*T.c.N-E*] (TcCLB.485683.10), *T. cruzi* Y [*T.c.Y*] (WEISBARTH *et al.*, 2018), *T. brucei* [*T.b*] (Tb927.6.4440), *L. braziliensis* [*L.B*] (LbrM.30.3080) e *Homo sapiens* [*H.s*] (Uniprot: Q13283).

Tabela 3: Identidade e similaridade de sequência (%) entre as proteínas RBP42 do *T. cruzi* CL Brener e suas proteínas homólogas de outros tripanosomatídeos e G3BP1 de humanos

| | <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Brener | | | |
|---|------------------------------------|------|------------------------------|------|
| | Esmeraldo (381 aa) | | Não Esmeraldo (382 aa) | |
| | % de identidade/similaridade | | % de identidade/similaridade | |
| <i>Trypanosoma cruzi</i> Y (382 aa) * | 97,1 | 97,6 | 99,0 | 99,5 |
| <i>Trypanosoma brucei</i> (352 aa) | 42,7 | 56,5 | 42,8 | 56,4 |
| <i>Leishmania braziliensis</i> (338 aa) | 38,6 | 56,1 | 37,9 | 55,7 |
| <i>Homo sapiens</i> (G3BP1) (466 aa) | 20,6 | 32,2 | 20,8 | 32,4 |

Identificadores: TcCLB.509167.140, TcCLB.485683.10, Tb927.6.4440, LbrM.30.3080, Q13283.

* WEISBARTH *et al.*, 2018. aa: aminoácidos. A identidade e similaridade de sequência entre os haplótipos Esmeraldo e Não Esmeraldo alcançam os 98,2%.

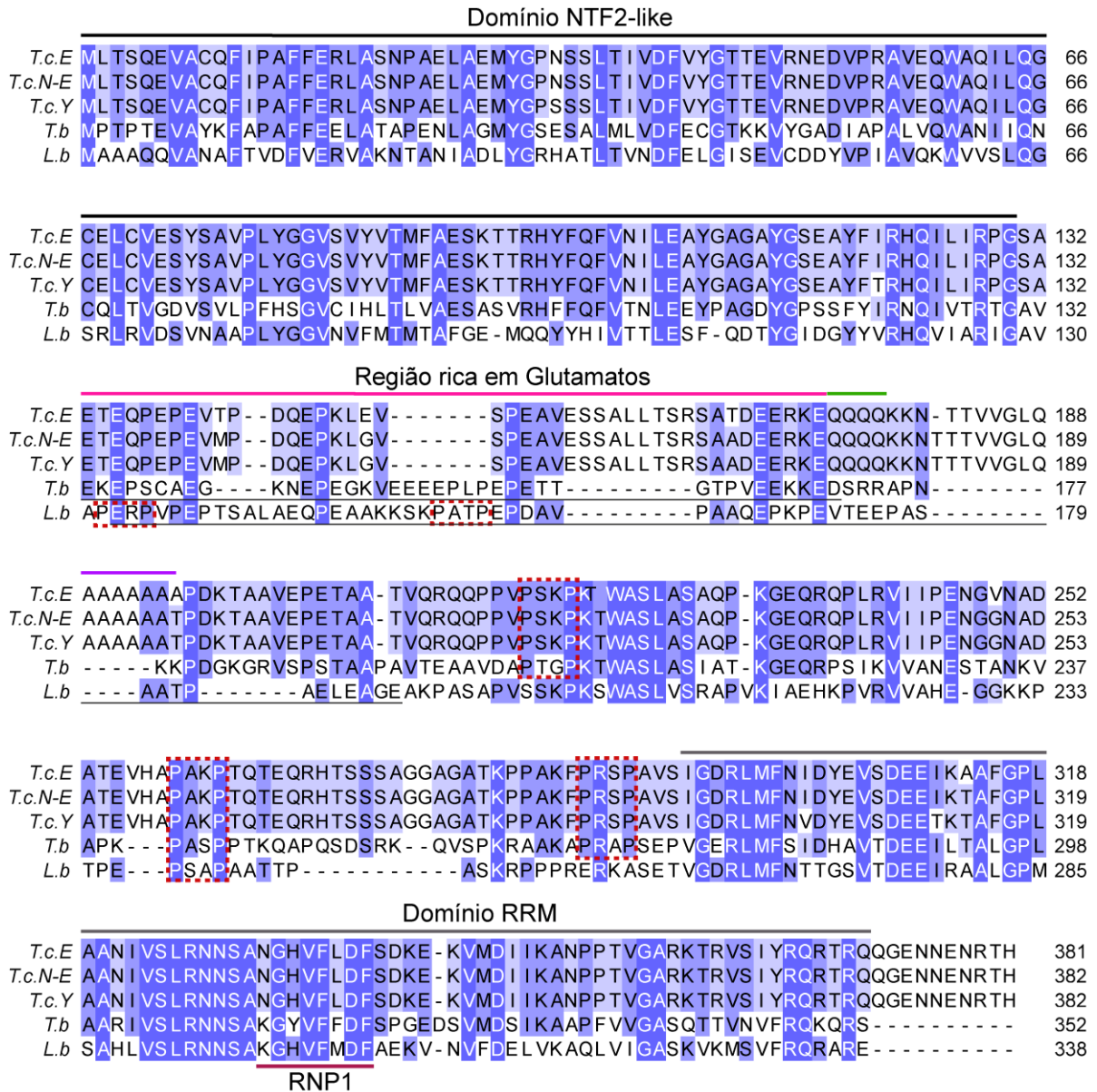


Figura 16: Comparação de sequência entre as proteínas RBP42 de tripanosomatídeos.

O alinhamento múltiplo de sequências foi produzido com as sequências de aminoácidos das proteínas RBP42 do *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like [*T.c.E*] (TcCLB.509167.140), *T. cruzi* CL Brener Não Esmeraldo-like [*T.c.N-E*] (TcCLB.485683.10), *T. cruzi* Y [*T.c.Y*] (WEISBARTH *et al.*, 2018), *T. brucei* [*T.b*] (Tb927.6.4440) e *L. braziliensis* [*L.b*] (LbrM.30.3080). Os resíduos foram coloridos pela identidade e conservação entre as sequências comparadas. Barras identificam os domínios NTF2-like (Fator de transporte nuclear 2) e RRM (Motivo de reconhecimento de RNA), e apenas nas sequências do *T. cruzi* identificam a região rica em glutamatos (sublinhada em preto nas outras espécies) e as regiões de poli-alaninas e poli-glutaminas. Os motivos PxxP (Motivos ricos em prolinas) são mostrados no interior de caixas vermelhas. O motivo conservado RNP1 (Motivo de ligação ao RNA – sequência (K/R)-G-(F/Y)-(G/A)-(F/Y)-(I/L/V)-X-(F/Y)), sublinhado em rosa, está presente nas sequências analisadas com o consenso (N/K)G(H/Y)VF(L/F/M)DF.

5.3 Estrutura 3D dos domínios de TcbRBP42

Para investigar a estrutura tridimensional adotada pelos domínios NTF2-like e RRM de TcbRBP42 foram produzidos modelos tridimensionais por modelagem comparativa para a proteína do haplótipo Esmeraldo-like. Os modelos foram construídos utilizando-se como estruturas molde a proteína NTF2 de *Cryptosporidium parvum* (código do PDB: 1ZO2) e o segundo RRM da proteína humana RBP19 (código do PDB: 2DGW) que possuem 30% e 33% de similaridade com os domínios NTF2-like e RRM de TcbRBP42, respectivamente (**Apêndice A**). Apesar da baixa similaridade de sequência, os modelos produzidos para ambos os domínios de TcbRBP42 (**Figura 17**) alcançaram valores satisfatórios em todos os critérios de qualidade avaliados. Os *Z-scores* calculados pelo *ProSa-web* mostraram que ambos os modelos produzidos possuem *Z-scores* (-4,85 e -5,62 para os domínios NTF2-like e RRM, respectivamente) compatíveis com o de estruturas de mesmo tamanho e de boa qualidade depositadas no PDB. Em relação aos valores de compatibilidade 3D-1D calculados pelo *Verify 3D*, ambos os modelos possuem porcentagens superiores a 97% dos resíduos com valores maiores do que 0,2, que são típicos de boas estruturas. Na avaliação estereoquímica, 100% dos resíduos de ambos os modelos estão nas regiões mais favorecidas e adicionalmente favorecidas do gráfico de Ramachandram (**Figura 18**). Finalmente, a superposição dos modelos gerados com suas estruturas molde possuem pequenos valores de RMSD (0,590 Å e 0,683 Å), indicando que são estruturas muito semelhantes (**Figura 17**).

A modelagem do domínio NTF2-like de TcbRBP42 mostrou que este possui três α -hélices alinhadas contra uma folha- β antiparalela composta por seis segmentos em conformação β (topologia $\alpha\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\beta$) (**Figura 17 A**). Para o domínio RRM são duas α -hélices alinhadas contra quatro segmentos em conformação β formando uma folha- β antiparalela (topologia $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$) (**Figura 17 B**). A sobreposição do modelo 3D produzido para o domínio NTF2-like de TcbRBP42 com a sua estrutura molde mostrou que esses possuem a mesma composição de α -hélices e segmentos em conformação β . Entretanto, as regiões em *loop* apresentam divergências de tamanho, concentradas principalmente na região dos *loops* 4 e 8 (**Figura 17 A**). O mesmo é observado para o domínio RRM e sua estrutura molde. As estruturas divergem em dois aminoácidos de tamanho na região do *loop* 2 (**Figura 17 B**).

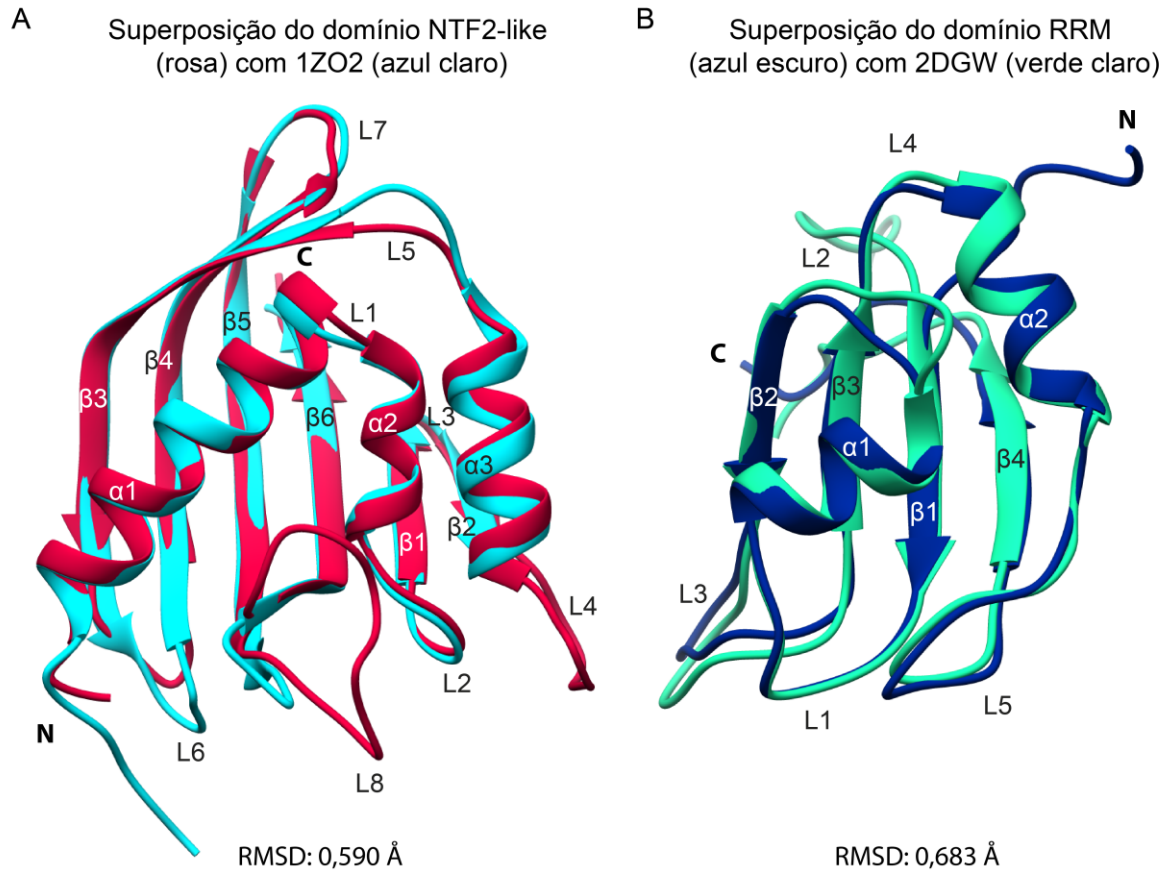


Figura 17: Modelos moleculares propostos para os domínios de TcbRBP42.

Os modelos 3D foram gerados para os domínios NTF2-like (rosa) (**A**) e RRM (azul escuro) (**B**) da proteína RBP42 do haplótipo Esmeraldo-like do *T. cruzi* CL Brener. Os modelos gerados são mostrados superpostos com as estruturas utilizadas como moldes no processo de modelagem comparativa. Para o domínio NTF2-like foi utilizado como molde o Fator de transporte nuclear 2 de *Cryptosporidium parvum* (código do PDB: 1ZO2 – azul claro) e para o RRM foi utilizado o segundo domínio RRM da proteína humana RBP19 (código do PDB: 2DGW – verde claro). As α -hélices, segmentos em conformação β e *loops* estão numerados apenas nos modelos moleculares propostos para os domínios de TcbRBP42. Os valores de RMSD das superposições das estruturas também são mostrados.

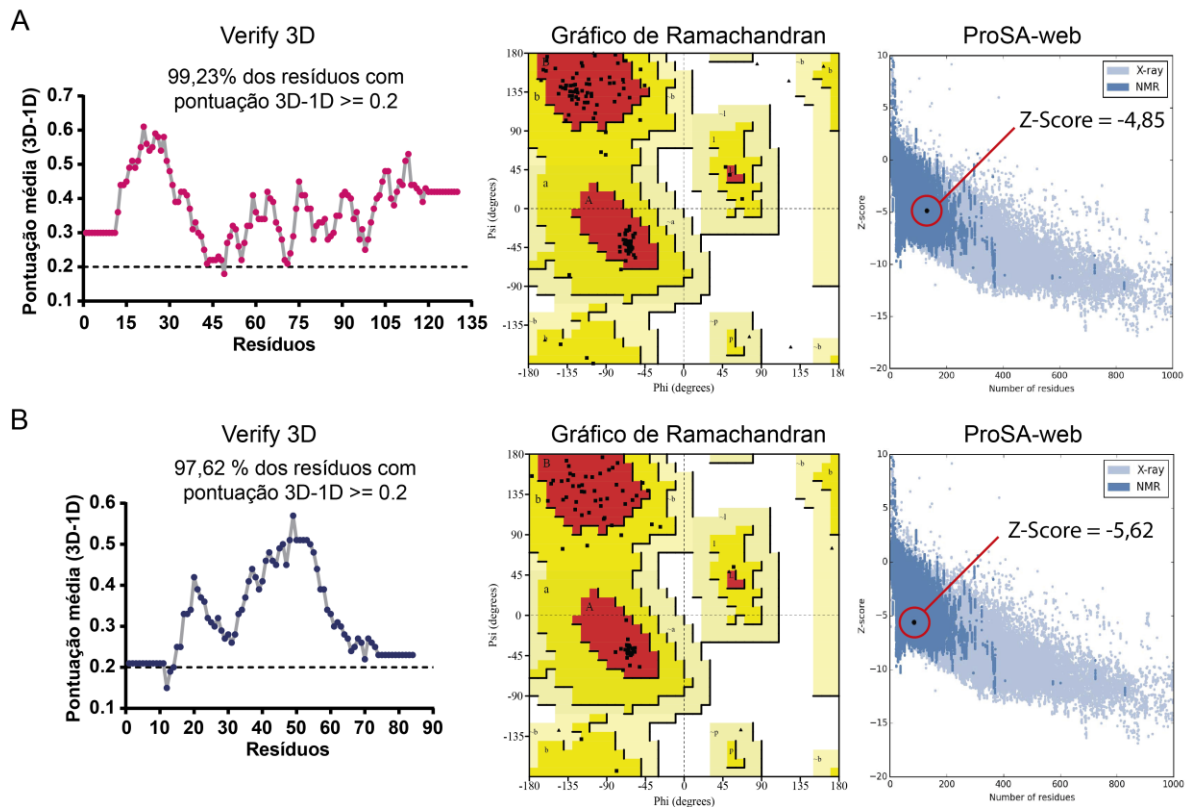


Figura 18: Validação dos modelos 3D propostos para os domínios de TcbRBP42.

A qualidade dos modelos propostos para os domínios NTF2-like (**A**) e RRM (**B**) da proteína RBP42 do haplótipo Esmeraldo-like do *T. cruzi* CL Brener foi acessada com os softwares *Verify 3D* (compatibilidade 3D-1D), *Procheck* – Gráficos de Ramachandran (qualidade estereoquímica) e *ProSA-web* – Z-scores (qualidade geral do modelo mostrada em comparação com estruturas resolvidas experimentalmente e depositadas no PDB). Gráficos de Ramachandran – Modelo do NTF2-like: 86,8% dos resíduos nas regiões mais favorecidas e 13,2% em regiões adicionalmente favorecidas. Modelo do RRM: 86,5% dos resíduos nas regiões mais favorecidas e 13,5% nas regiões adicionalmente favorecidas.

5.4 Análise de conservação proteica e filogenia

Para avaliar a conservação da proteína RBP42 entre os cinetoplastídeos foram produzidos alinhamentos múltiplos de sequência e uma árvore filogenética molecular com as sequências de aminoácidos de RBP42 de diferentes espécies. Algumas dessas sequências, no entanto, ainda se encontram anotadas como hipotéticas no banco de dados *TryTripDB*. O alinhamento das sequências mostrou que as regiões de maior conservação entre elas correspondem aos domínios NTF2-like e RRM. Em contrapartida, a região que liga esses domínios, predita como desordenada, possui sequência e tamanho mais variáveis entre as sequências analisadas. Adicionalmente, o número de motivos PxxP diverge entre essas sequências. O motivo RNP1 do domínio RRM está presente nas proteínas RBP42 como a sequência consenso (N/K)G(H/Y)VF(L/F/M)DF, desviando-se um pouco da sequência canônica (K/R)-G-(F/Y)-(G/A)-(F/Y)-(I/L/V)-X-(F/Y). A sequência canônica do motivo RNP2, que também está presente em domínios RRM, não foi identificada nas sequências de RBP42 (**Figura 19 e Apêndice B**).

Na árvore filogenética produzida podem ser identificados dois grandes clados: o primeiro contendo todas as espécies do gênero *Trypanosoma* e o segundo contendo todas as espécies do gênero *Leishmania* e outras espécies próximas filogeneticamente a elas. No primeiro grande grupo, todas as cepas do *T. cruzi* aparecem agrupadas formando o grupo irmão daquele que inclui as espécies de *Trypanosoma* do continente africano: *T. vivax*, *T. congolense*, *T. brucei* e *T. evansi*. No segundo grande clado, as espécies do gênero *Leishmania* aparecem todas agrupadas e junto com o *Endotrypanum monterogeii* formam o grupo irmão do grupo que inclui *Leptomonas seymouri* e *Crithidia fasciculata*. *Bleptomonas ayalai* aparece em posição mais externa a esses subgrupos. Os valores de confiança de todos os agrupamentos da filogenia (Probabilidade Bayesiana *a posteriori*) foram superiores ou iguais a 0,90. A espécie *Bodo saltans* foi utilizada como grupo externo (**Figura 20**).

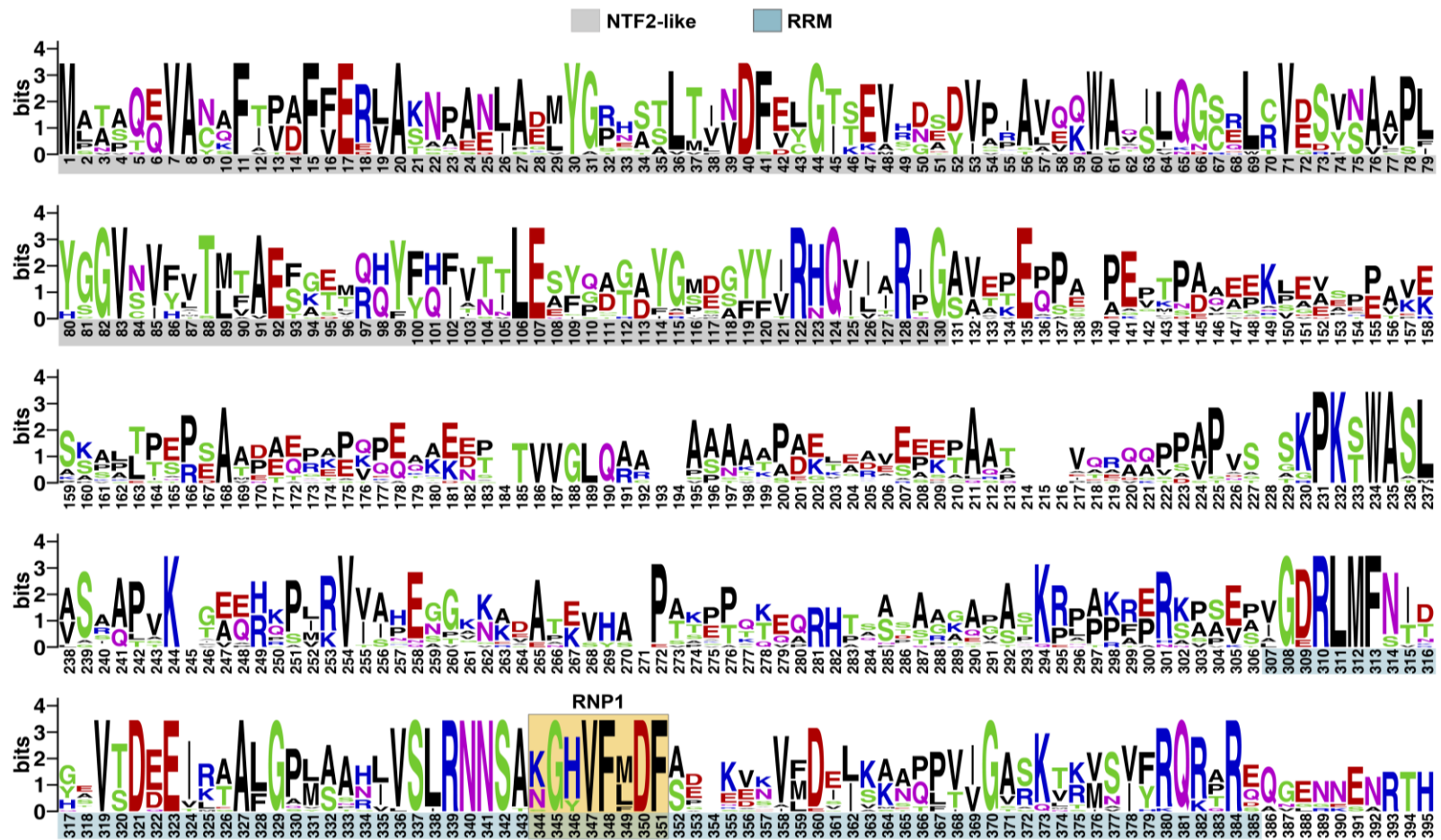


Figura 19: Logo do alinhamento múltiplo de seqüências de proteínas RBP42 de diferentes espécies de cinetoplastídeos.

As seqüências proteicas analisadas compartilham maior conservação nas regiões dos domínios NTF2-like e RRM. O motivo RNP1 de interação com o RNA está presente com a seqüência consenso (N/K)G(H/Y)VF(L/F/M)DF. A altura de cada coluna de letras empilhadas representa a conservação de seqüência (medida em *bits*) naquela posição do alinhamento e a altura de cada letra da coluna representa a sua freqüência relativa naquela posição. Código de cores para os aminoácidos – azul: básicos, preto: hidrofóbicos, verde: polares, vermelho: ácidos e rosa: neutros.

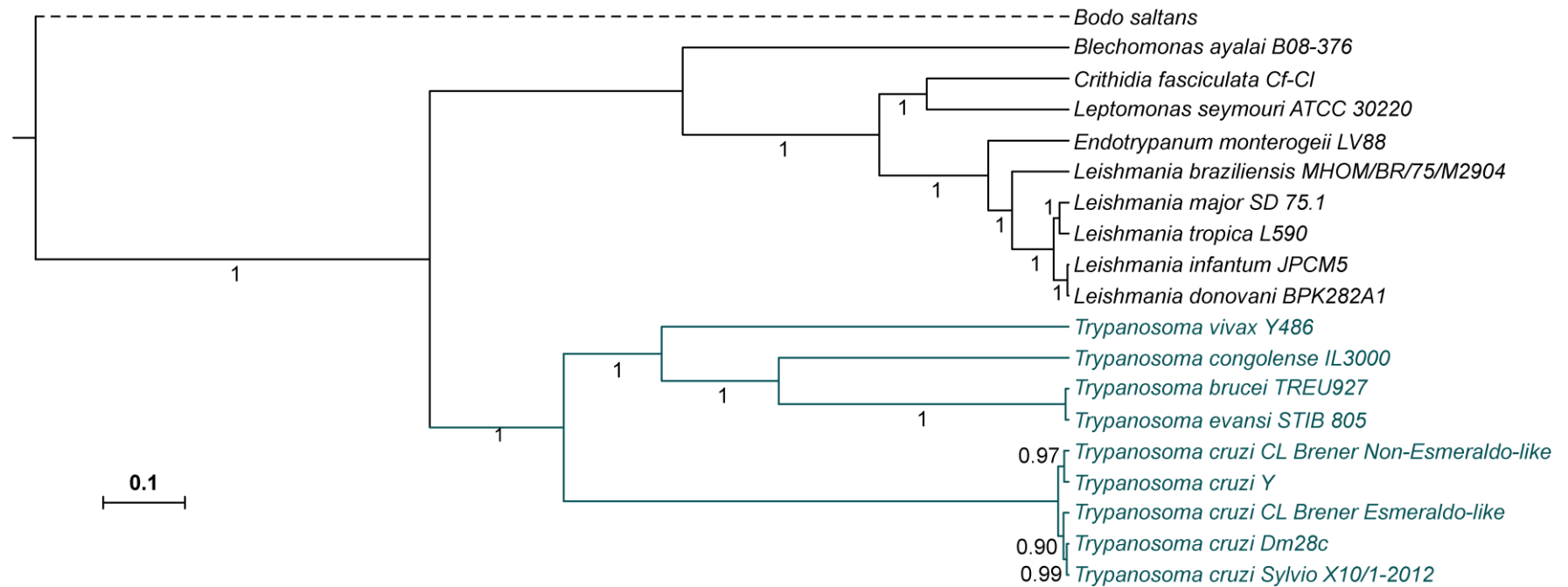


Figura 20: Relações filogenéticas entre espécies de cinetoplastídeos inferidas a partir de sequências proteicas de RBP42.

A inferência filogenética foi realizada com o modelo JTT+G+F. As probabilidades Bayesianas *a posteriori* são reportadas como porcentagens nos ramos internos da árvore. A barra de escala representa o número de substituições por posição. O clado incluindo todas as espécies do gênero *Trypanosoma* está destacado em verde. Identificadores dos genes no *TriTrypDB*: TcCLB.509167.140, TcCLB.485683.10, BCY84_01141, TCSYLVIO_003340, TvY486_0603830, TcIL3000_6_3860, Tb927.6.4440, TevSTIB805.6.4570, LbrM.30.3080, LMJSD75_300038300, LTRL590_300039500, LinJ.30.3130, LdBPK_303130.1, EMOLV88_300036900, Baya_060_0150, CFAC1_260055900, Lsey_0105_0110, BSAL_33520 (UniProt ID). A sequência para *T. cruzi* Y está disponível em WEISBARTH *et al.* (2018).

5.5 Construção de vetores

O estudo da proteína RBP42 no *T. cruzi* CL Brener foi realizado por meio da expressão e detecção de uma versão recombinante da proteína codificada pelo haplótipo Esmeraldo-like (rTcbRBP42). Essa versão recombinante contém o peptídeo de ligação à estreptavidina (SBP) em sua porção N-terminal e uma cauda de 6His em sua porção C-terminal. Como controle positivo, foi utilizada a proteína GFP contendo as mesmas caudas flanqueadoras. Para a expressão dessas proteínas recombinantes foram construídos os vetores pRock_SBP/6His_RBP42 (sequência Esmeraldo-like) e pRock_SBP/His_GFP, que são modificações do vetor pROCK_GFP_NEO (DAROCHA *et al.*, 2004). Após a construção dos vetores, estes foram utilizados para transformar bactérias eletrocompetentes (*E. coli* DH5 α), que após crescimento em meio sólido foram testadas por PCR de colônia para confirmar a presença dos insertos de TcbRBP42 e GFP utilizando-se os *primers* da **Tabela 1**. Em seguida, os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% e mostraram que todos os três clones testados foram positivos para os genes de interesse (**Figura 21**). Confirmada a presença do inserto, uma colônia foi escolhida para expansão em meio líquido e isolamento dos plasmídeos. Em seguida, os vetores foram confirmados por sequenciamento (um clone para cada gene), mostrando que todas as etapas de clonagem ocorreram como o planejado sem a ocorrência de mutações na sequência dos genes. Apenas o resultado do sequenciamento do vetor pRock_SBP/6His_RBP42 é mostrado na **Figura 22**.

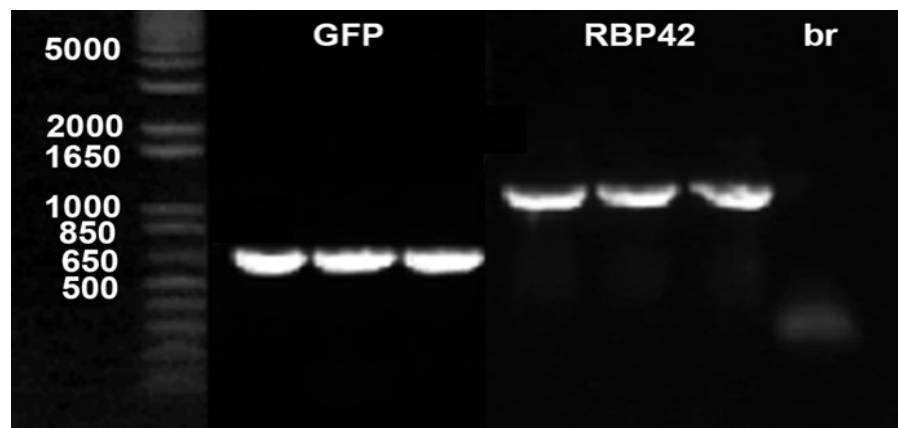


Figura 21: Confirmação da presença dos insertos de TcbRBP42 e GFP por PCR de colônia.

As bandas representam a amplificação dos genes de interesse em três colônias selecionadas para TcbRBP42 e GFP. Os produtos de PCR foram fracionados por eletroforese em gel de agarose a 1% e corados com *SYBR Safe*. O padrão de peso molecular utilizado foi o 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen). GFP:728 pb e RBP42: 1146 pb. br: branco.



Figura 22: Resultado do sequenciamento do vetor *pRock_SBP/6His_RBP42*.

A sequência de *TcbRBP42* (sequência Esmeraldo-like) presente no vetor *pRock_SBP/6His_RBP42* foi traduzida e alinhada com a sequência de referência para a proteína *RBP42* (Identificador do gene: *TcCLB.509167.140*). As sequências não alinhadas correspondem às *tags* SBP (região 5') e 6His (região 3') inseridas durante o processo de clonagem.

5.6 Expressão de proteínas recombinantes no *T. cruzi*

Para gerar as linhagens de *T. cruzi* CL Brener expressoras das proteínas recombinantes rTcbRBP42 e GFP, os vetores pRock_SBP/6His_RBP42 e pRock_SBP/His_GFP foram linearizados com a enzima de restrição NotI e submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8%. A **Figura 23** mostra que os vetores foram digeridos eficientemente, sendo que os vetores não digeridos possuem duas bandas que resultam da diferença de migração das conformações relaxadas e super-enroladas das moléculas de DNA circulares. Em seguida, epimastigotas do clone CL Brener foram transfectadas por eletroporação com os vetores digeridos. A linearização dos vetores facilita a integração destes ao genoma do parasito por recombinação homóloga no locus da β -tubulina (DAROCHA *et al.*, 2004). Após a transfecção e seleção dos parasitos com o antibiótico G418 (Neomicina), a expressão das proteínas de interesse foi confirmada por *Western blot*. Nesse experimento, as proteínas recombinantes rTcbRBP42 e GFP foram eficientemente detectadas através de suas *tags* de 6His em extratos de proteínas totais das epimastigotas transfectadas. Nenhuma proteína foi detectada no extrato proteico de epimastigotas WT, demonstrando a alta especificidade de reconhecimento da cauda de histidina pelo anticorpo Anti-His utilizado (**Figura 24**).

Os níveis de expressão dos transcritos dos genes de TcbRBP42 em epimastigotas WT e transfectadas com a versão recombinante do gene presente no haplótipo Esmeraldo-like foram quantificados por PCR em tempo real. Os primers utilizados (**Tabela 1**) reconhecem tanto os transcritos provenientes dos genes nativos quando da cópia recombinante. Após a normalização dos níveis de expressão com o gene de referência GAPDH, os valores de *fold change* foram calculados pelo método $2^{-\Delta\Delta CT}$. As epimastigotas transfectadas com o gene rTcbRBP42 possuem 36 vezes mais transcritos dos genes codificadores de TcbRBP42 do que as epimastigotas WT (**Figura 25**). Infelizmente, os níveis de expressão das proteínas TcbRBP42 nessas células não puderam ser calculados devido a indisponibilidade de um anticorpo que reconheça a proteína nativa. Todos os procedimentos para a geração das epimastigotas geneticamente modificadas foram aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) sob o número de processo 01250.026820/2017-07.

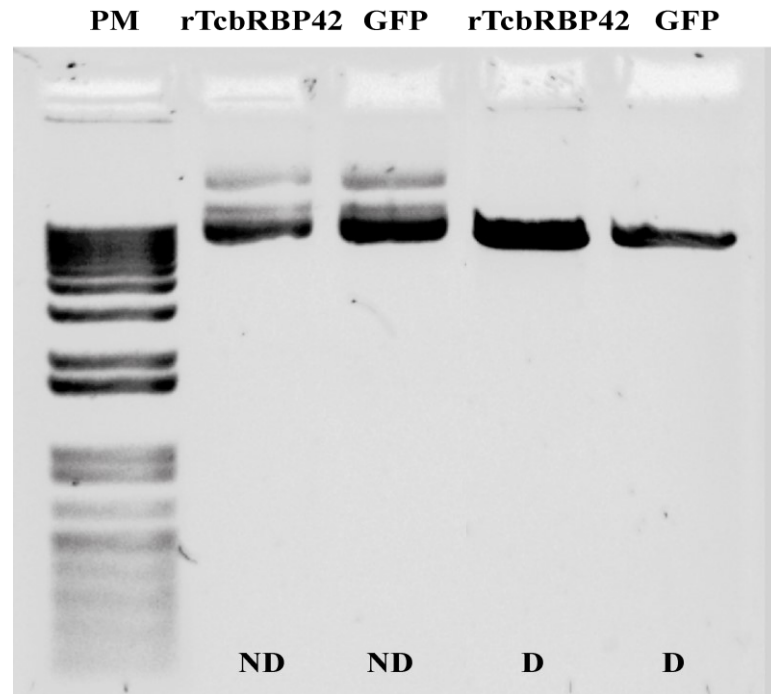


Figura 23: Digestão dos vetores para transfecção do *T. cruzi* CL Brener.

Os vetores pRock_SBP/6His_RBP42 e pRock_SBP/His_GFP foram digeridos com a enzima de restrição NotI previamente à transfecção de epimastigotas do *T. cruzi* CL Brener. Os produtos da digestão foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 0,8% e corados com *SYBR Safe*. São mostrados os vetores não digeridos (ND) e digeridos totalmente (D). As duas bandas presentes nos vetores não digeridos resultam da diferença de migração entre as conformações relaxada e super-enrolada das moléculas de DNA circulares. O padrão de peso molecular (PM) utilizado foi o 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen).

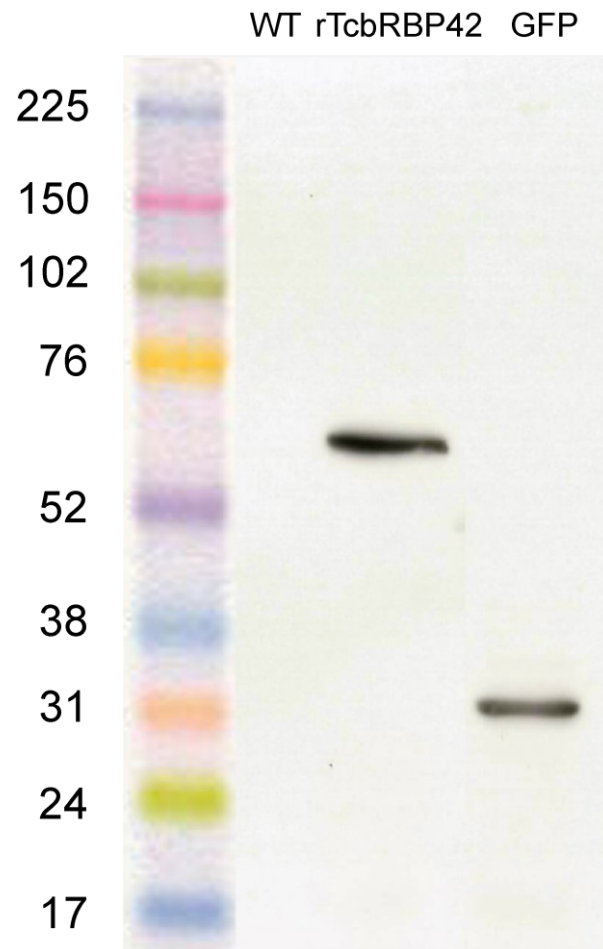


Figura 24: Confirmação da expressão de rTcbRBP42 e GFP por *Western blot*.

As proteínas recombinantes foram detectadas através de suas *tags* de histidina (6His). Para isso, os extratos de proteínas totais (20 μ g) de culturas transfectadas e WT foram fracionados por eletroforese SDS-PAGE, transferidos para uma membrana de PVDF e incubados com o anticorpo primário Anti-His (1/1000). O tempo de exposição da membrana foi de 2 min. Pesos moleculares: rTcbRBP42: 47,20 kDa e GFP: 32,54 kDa. O padrão de peso molecular utilizado foi o *Full range rainbow* (GE).

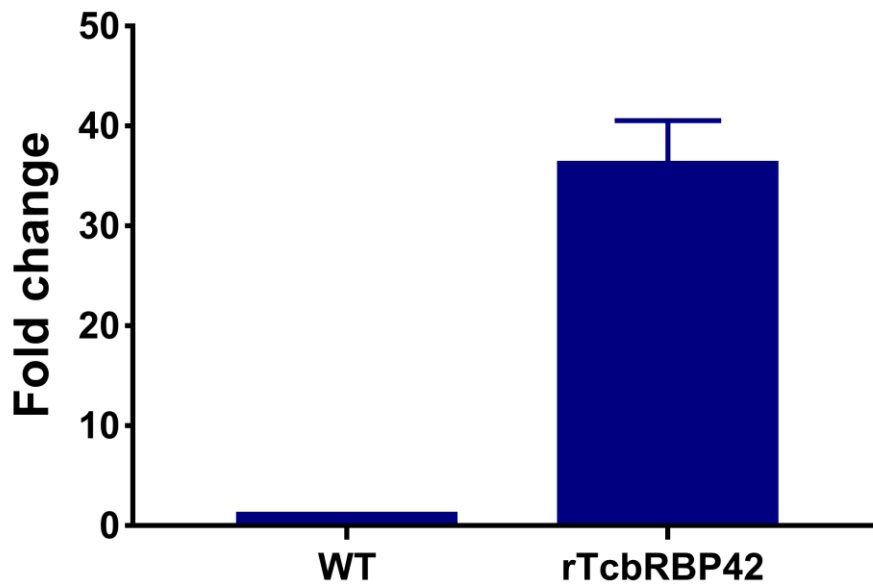


Figura 25: Expressão relativa dos transcritos de TcbRBP42.

Os níveis de expressão dos transcritos dos genes de TcbRBP42 foram quantificados por PCR em tempo real em amostras de cDNA provenientes de epimastigotas WT e expressoras de rTcbRBP42. As expressões foram normalizadas com o gene de referência GAPDH e os valores de *fold change* em relação às epimastigotas WT foram calculados com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$. Os *primers* utilizados detectam os transcritos dos genes nativos e recombinante da proteína TcbRBP42. O valor reportado corresponde à média de duas réplicas do experimento. A barra de erro indica o desvio padrão.

5.7 Avaliação fenotípica das epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e GFP em condições normais e de estresse

O efeito da expressão das proteínas rTcbRBP42 (Esmeraldo-like) e GFP no crescimento das epimastigotas foi avaliado nas condições normais e de estresse por meio da construção de curvas de crescimento. Para tanto, as epimastigotas transfectadas e WT (controle não transfectado) foram expostas à 500 Gy de radiação gama e a duas doses de benzonidazol (120 e 240 μM), sendo contadas diariamente em câmaras de Neubauer com o corante vital eritrosina. Diferentemente da radiação, o benzonidazol permaneceu em contato com os parasitos continuamente durante os experimentos.

Na condição normal, a expressão das proteínas recombinantes não alterou o crescimento dos parasitos. O número de parasitos em função do tempo nas culturas de epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 foi muito semelhante ao das culturas WT (**Figura 26 A**, linhas contínuas), sendo o mesmo comportamento observado para as culturas expressoras de GFP (**Figura 26 B**, linhas contínuas). Quanto ao tratamento com radiação gama, este causou a parada de crescimento de todas as linhagens de epimastigotas testadas. Nesse sentido, não foram observadas diferenças de crescimento entre as epimastigotas WT, expressoras de rTcbRBP42 (**Figura 26 A**, linhas pontilhadas) e expressoras de GFP (**Figura 26 B**, linhas pontilhadas). Após a irradiação, o crescimento dos parasitos foi retomado em aproximadamente 140 h. Com relação ao tratamento com benzonidazol, a dose de 120 μM também causou a parada de crescimento de todas as culturas testadas. O crescimento das epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 na presença da droga foi muito semelhante ao dos parasitos WT e transfectados com GFP (**Figura 26 C**, linhas pontilhadas). Em contrapartida, o tratamento com a dose de 240 μM de benzonidazol causou uma parada de crescimento das culturas seguida pela morte de parasitos após aproximadamente 72 horas de tratamento. Esse comportamento foi observado para todas as linhagens de epimastigotas testadas (rTcbRBP42, GFP e WT), não sendo detectadas diferenças entre elas (**Figura 26 D**).

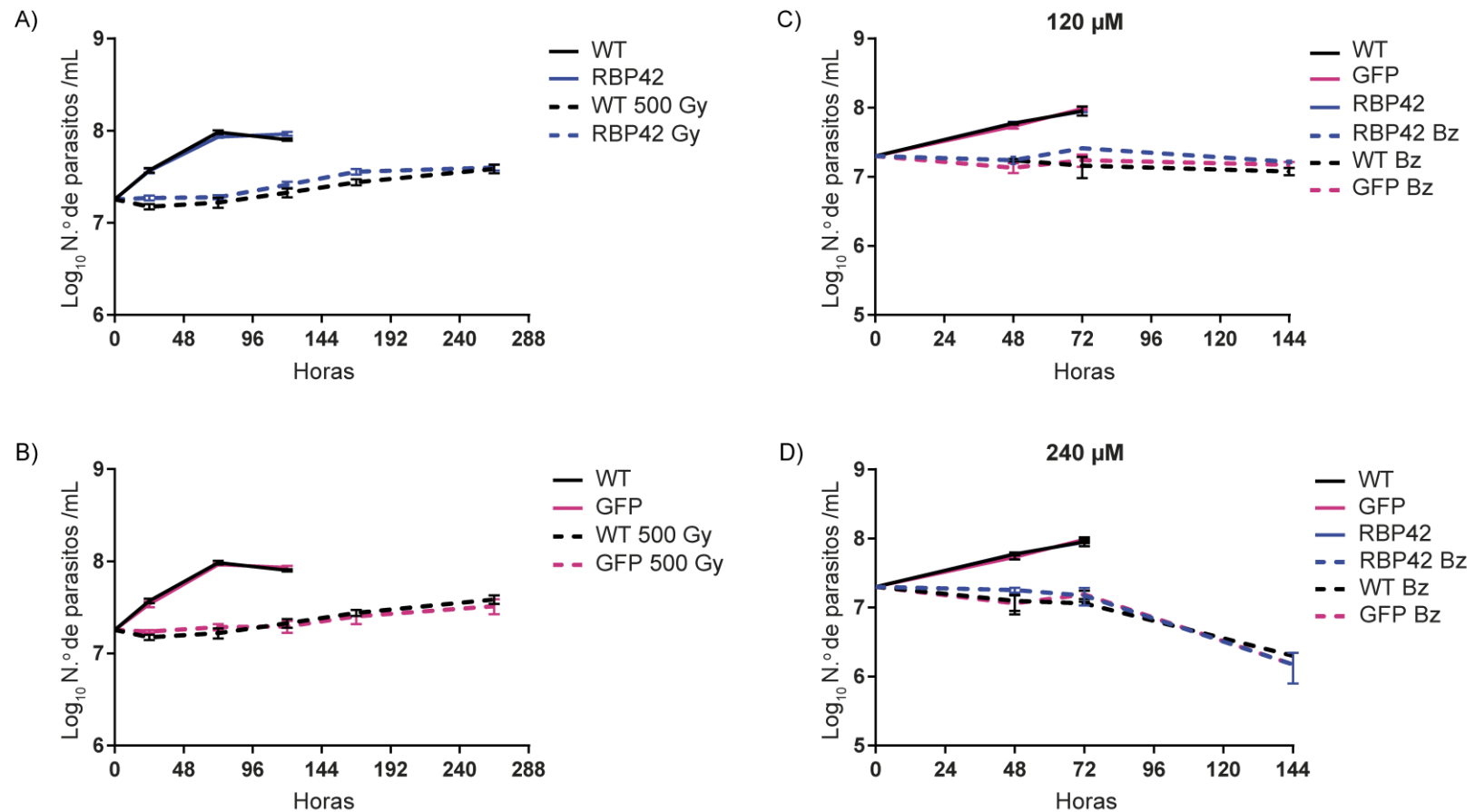


Figura 26: Avaliação do crescimento de epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e GFP nas condições normais e de estresse.

Culturas de epimastigotas expressoras de proteínas recombinantes (rTcbRBP42 e GFP) e WT foram expostas à 500 Gy de radiação gama (A e B) ou tratadas com as doses de 120 µM (C) e 240 µM (D) de benzonidazol (Bz). As culturas foram contadas diariamente em câmaras de Neubauer com o corante vital eritrosina. Linhas contínuas e pontilhadas representam as condições normais e de estresse, respectivamente. O benzonidazol permaneceu em contato com as epimastigotas durante todo o período de experimento. Os valores reportados correspondem às médias de duas réplicas de um experimento representativo. Barras de erro representam o desvio padrão.

5.8 Avaliação da localização celular de rTcbRBP42 e GFP por microscopia de fluorescência

Ensaio de imunofluorescência foram realizados com o intuito de avaliar a localização celular das proteínas rTcbRBP42 e GFP na condição normal e investigar se ocorre uma distribuição diferencial destas na condição de estresse. Para tanto, as proteínas recombinantes foram detectadas através de suas caudas de 6His nos parasitos transfectados mantidos em condições normais ou expostos à 500 Gy de radiação gama ou a 120 μ M de benzonidazol.

5.8.1 Estresse induzido por radiação gama

Os efeitos da radiação gama na localização celular de rTcbRBP42 e GFP foram determinados por meio de ensaios de imunofluorescência realizados na condição normal e nos tempos de 24 e 48 h após a irradiação dos parasitos. Nas condições normais de cultivo, as proteínas rTcbRBP42 e GFP apresentaram uma localização citoplasmática, se distribuindo de forma difusa por todo o citoplasma dos parasitos (**Figura 27 A**). No tempo de 24 h após a irradiação foi detectada uma mudança na distribuição de rTcbRBP42 que se acumulou em focos citoplasmáticos. Essa mesma distribuição também foi observada no tempo de 48 h (**Figura 27 B**). A localização de GFP não foi alterada pelo estresse em nenhum dos tempos analisados, sendo que a proteína se manteve distribuída por todo o citoplasma do parasito de forma muito semelhante ao observado na condição normal (**Figura 27 C**). Adicionalmente, os parasitos transfectados apresentaram a morfologia típica conhecida para epimastigotas e essa não foi alterada de forma evidente após a irradiação (**Figura 27 B e C**).

Para investigar a resposta transcricional desenvolvida nos tempos de 24 e 48 h após o estresse por radiação gama, os RNAs recém-sintetizados foram marcados por meio da incorporação e detecção do análogo 5-etiniluridina (EU), o qual permaneceu em contato com os parasitos durante as 24 h que antecederam a coleta das amostras. Na condição normal de cultivo, os RNAs recém-sintetizados se localizaram majoritariamente no núcleo dos parasitos expressores de rTcbRBP42 e GFP (**Figura 28 A**). No tempo de 24 h após a irradiação, o RNA recém-sintetizado foi observado distribuído por todo o citoplasma dos parasitos expressores de rTcbRBP42, não sendo mais detectados no tempo de 48 h após a indução do estresse (**Figura 28 B**). Esse mesmo comportamento foi observado para as células expressoras de GFP (**Figura 28 C**). As localizações celulares das proteínas rTcbRBP42 e GFP nas condições normais e de estresse foram muito semelhantes ao descrito anteriormente nessa seção.

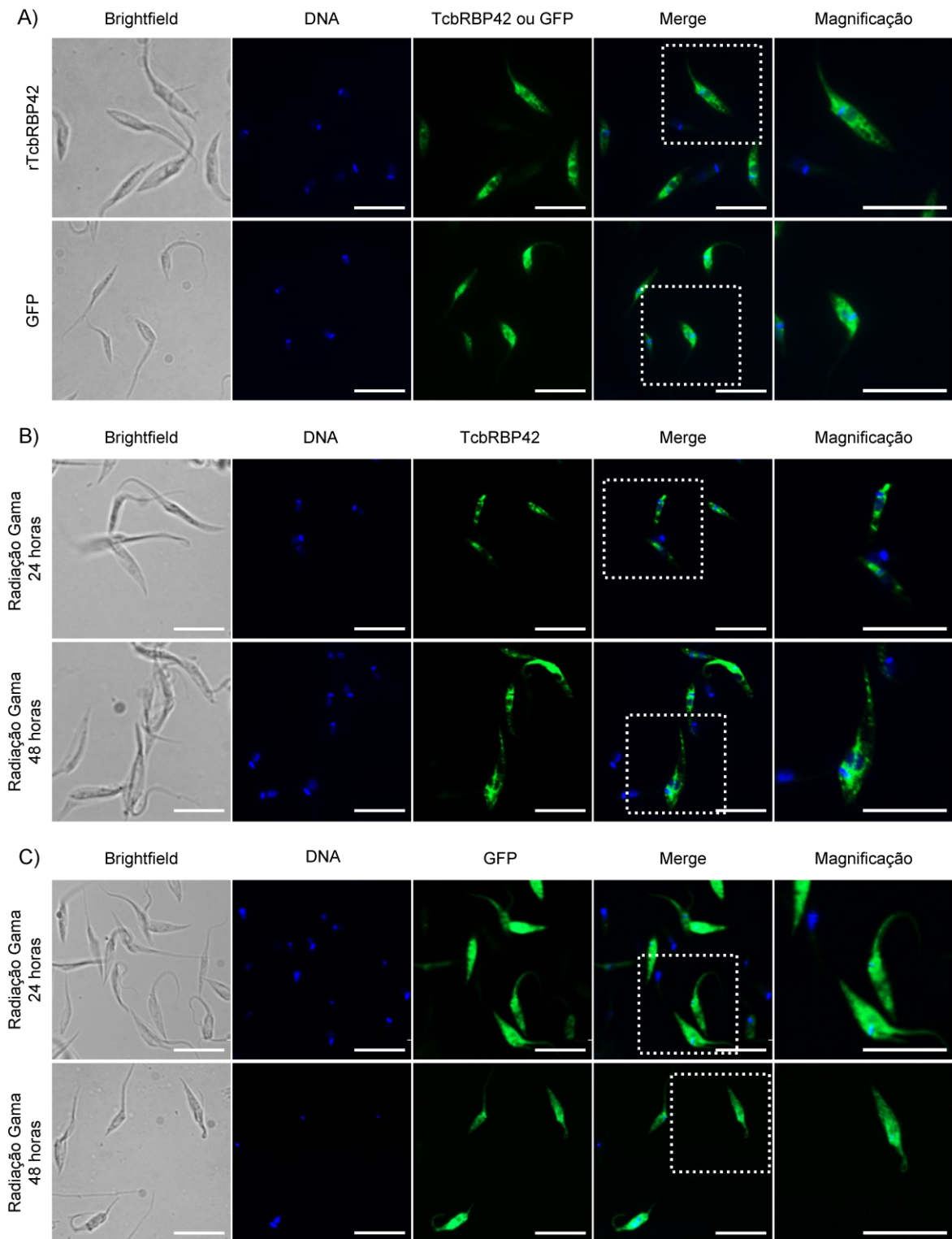


Figura 27: Localização celular de rTcbRBP42 e GFP na condição normal e irradiada.

Imagens de imunofluorescência de epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e GFP em condições normais de cultivo (A) e nos tempos de 24 e 48 h após exposição à radiação gama (B e C). As proteínas recombinantes foram detectadas por meio de suas *tags* de 6His utilizando-se os anticorpos *Anti-His probe* e *Alexa Fluor 488*. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram corados com o *Hoechst 33342*. Barra de magnificação: 10 μm.

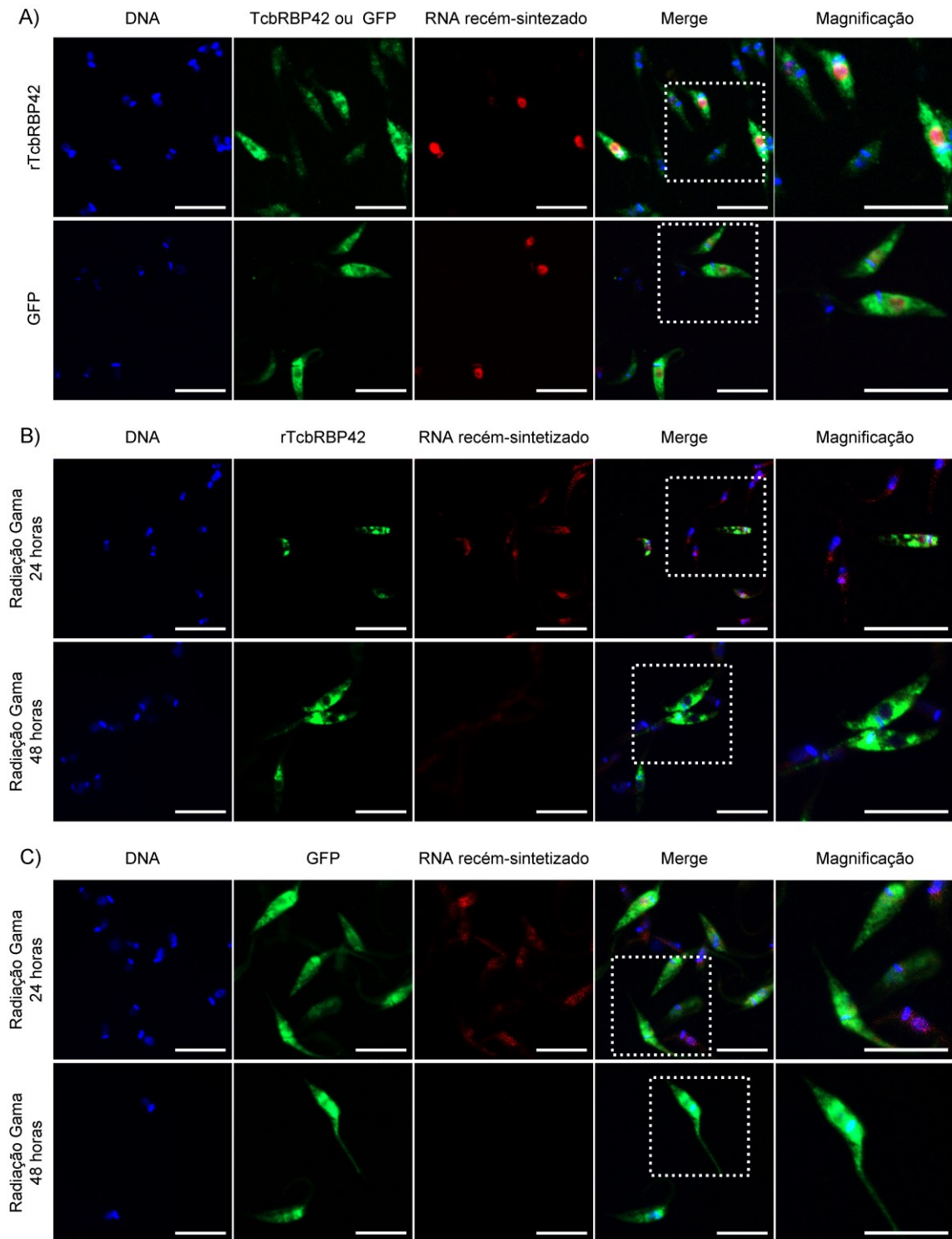


Figura 28: Localização do RNA recém-sintetizado na condição normal e irradiada.

A localização do RNA recém-sintetizado foi avaliada em epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e GFP em condições normais de cultivo (A) e nos tempos de 24 e 48 h após exposição à radiação gama (B e C). As proteínas recombinantes foram detectadas por meio de suas *tags* de 6His com os anticorpos *Anti-His probe* e *Alexa Fluor 488*. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram corados com o *Hoechst 33342*. O RNA recém-sintetizado foi detectado com o *Click-iT RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit*. Barra de magnificação: 10 μm .

Com o intuito de investigar se o espalhamento citoplasmático dos RNAs recém-sintetizados detectado nos parasitos 24 h após a irradiação foi o resultado do rompimento da membrana nuclear, foram realizados ensaios de microscopia eletrônica de transmissão. Na condição normal, os parasitos expressores de rTcbRBP42 e WT apresentaram a morfologia típica conhecida para epimastigotas. A membrana nuclear dos parasitos se encontrava íntegra, sendo observadas a presença de heterocromatina no núcleo celular e de estruturas citoplasmáticas desprovidas de membranas semelhantes a grânulos (**Figura 29**, não irradiado). Vinte e quatro horas após a irradiação, as membranas nucleares dos parasitos de ambas as linhagens testadas ainda se encontravam íntegras. Observou-se também o desaparecimento da heterocromatina no núcleo celular e um aparente aumento no número das estruturas citoplasmáticas sem membranas (**Figura 29**, irradiado). Com relação à estrutura celular dos parasitos, não foram detectadas diferenças evidentes entre os parasitos WT e expressores de rTcbRBP42 em ambas as condições testadas.

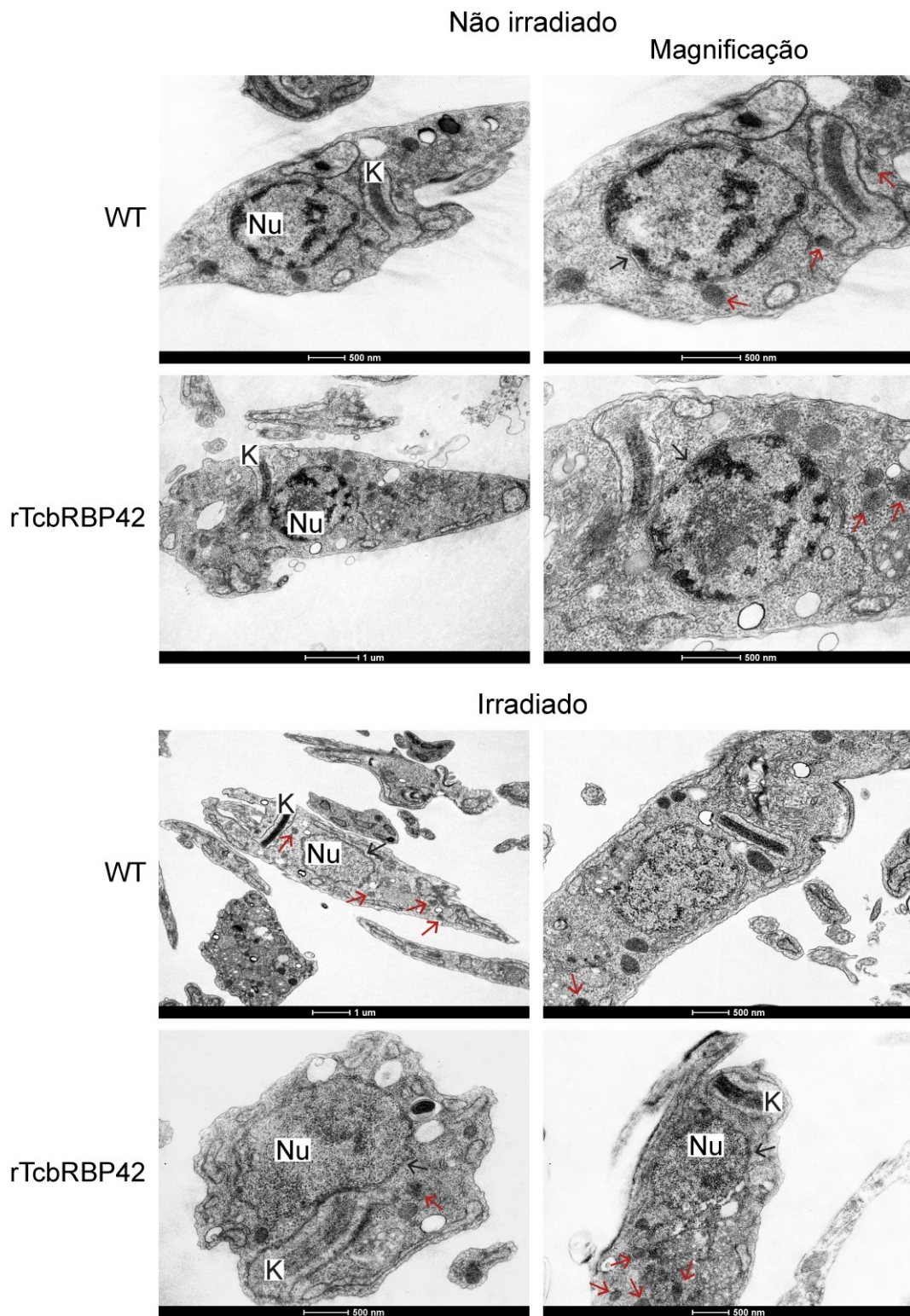


Figura 29: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas irradiadas e não irradiadas. Epimastigotas WT e expressoras de rTcbRBP42 nas condições normais de cultivo ou 24 h após a exposição à 500 Gy de radiação gama. Nu: Núcleo e K: cinetoplasto. As setas pretas indicam a membrana nuclear intacta e as setas vermelhas indicam a presença de estruturas citoplasmáticas desprovidas de membrana. Barras de magnificação: 1 μ m ou 500 nm.

Buscando-se testar a especificidade de marcação e detecção dos RNAs recém-sintetizados foi realizado um controle com a actinomicina D. Essa droga se intercala no DNA em regiões ricas em GC e estabiliza os complexos covalentes entre o DNA e a topoisomerase I, o que inibe a transcrição por meio do bloqueio da progressão da RNA polimerase (BENSAUDE, 2011). Em condições normais, o tratamento dos parasitos com a droga não alterou a distribuição das proteínas rTcbRBP42 e GFP que permaneceram distribuídas difusamente por todo o citoplasma dos parasitos. Com relação à síntese de RNA, essa não foi detectada, o que concorda com o resultado esperado (**Figura 30 A**). No tempo de 24 h após a irradiação, o acúmulo de rTcbRBP42 em focos citoplasmáticos foi novamente observado, enquanto que GFP permaneceu distribuída por todo o citoplasma dos parasitos. No que diz respeito a síntese de RNA, esta foi drasticamente reduzida (**Figura 30 B**).

Para investigar o acúmulo de rTcbRBP42 em focos citoplasmáticos após a indução de estresse pela radiação gama, os parasitos irradiados e não irradiados foram tratados com o antibiótico puromicina. Esse antibiótico causa a terminação precoce da tradução pela liberação dos mRNAs dos polissomos, o que estimula a formação de grânulos de RNA nas condições de estresse celular (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007; KEDERSHA *et al.*, 2000). Em parasitos mantidos em condições normais de cultivo, o tratamento com puromicina não foi suficiente para estimular o acúmulo de rTcbRBP42 ou GFP em focos citoplasmáticos (**Figura 31 A**). Adicionalmente, a distribuição do RNA recém-sintetizado observada em parasitos não irradiados (**Figura 28 A**) não foi alterada pelo tratamento com a puromicina e estes se mantiveram concentrados majoritariamente no núcleo dos parasitos (**Figura 31 A**). Nos parasitos irradiados (24 h pós-irradiação) e tratados com puromicina, rTcbRBP42 foi observada novamente concentrada em focos citoplasmáticos, o que não ocorreu para GFP (**Figura 31 B**). Também não foi observado um aumento aparente no número dos focos citoplasmáticos de rTcbRBP42 causados pela puromicina (**Figura 31 B**). Em relação ao RNA recém-sintetizado, este foi novamente observado espalhado por todo o citoplasma dos parasitos de forma muito semelhante ao observado anteriormente em parasitos irradiados (**Figura 31 B**). Dessa forma, o tratamento com puromicina não foi capaz de alterar a distribuição dos RNAs recém-sintetizados após a irradiação.

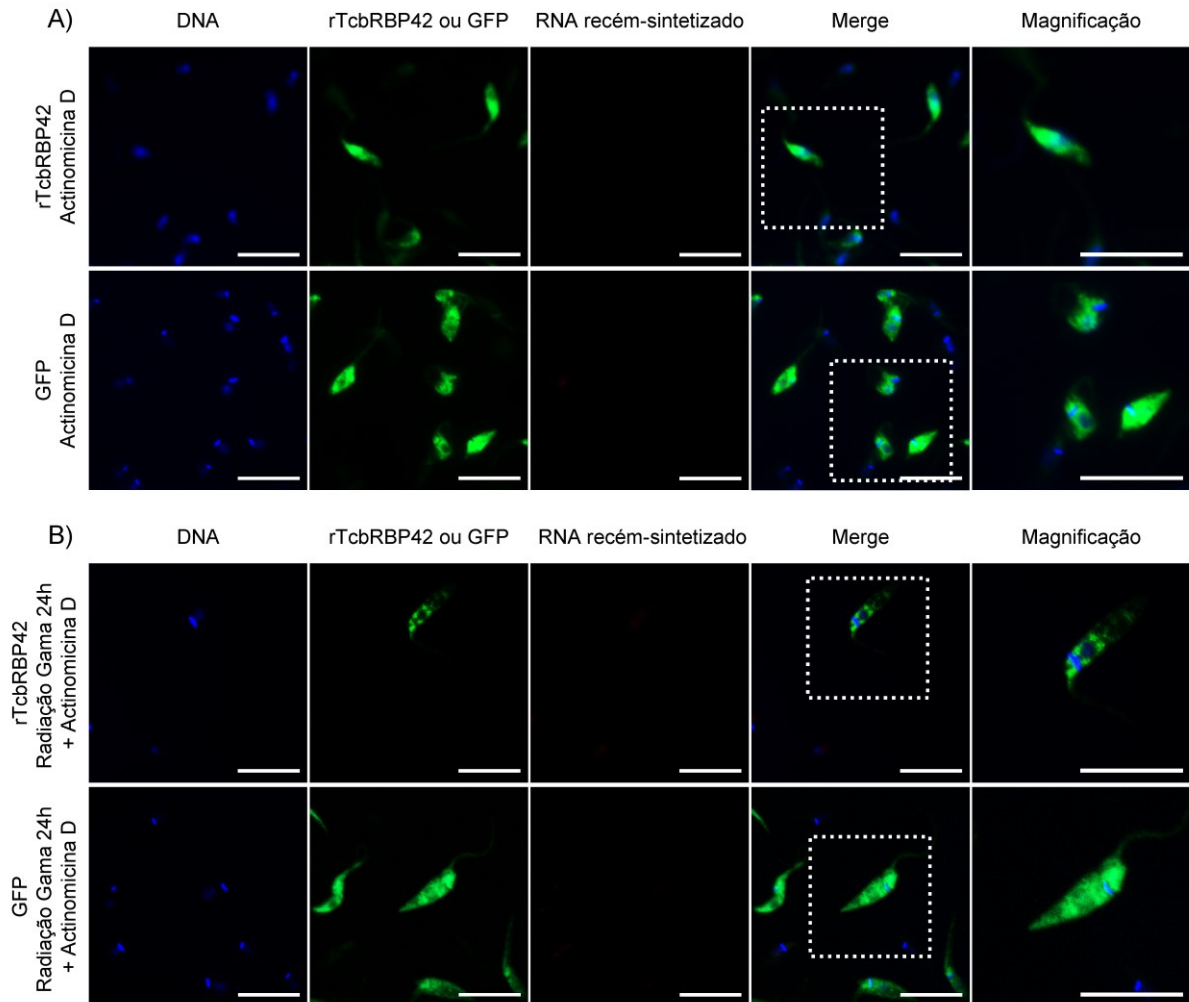


Figura 30: Efeito da actinomicina D na condição normal e irradiada.

Epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 ou GFP em condições normais de cultivo **(A)** ou 24 h após exposição à radiação gama **(B)** foram tratadas com 10 μg/mL de actinomicina D. As proteínas recombinantes foram detectadas por meio de suas *tags* de 6His com os anticorpos *Anti-His probe* e *Alexa Fluor 488*. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram corados com o *Hoechst 33342*. O RNA recém-sintetizado foi detectado com o *Click-iT RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit*. Barra de magnificação: 10 μm.

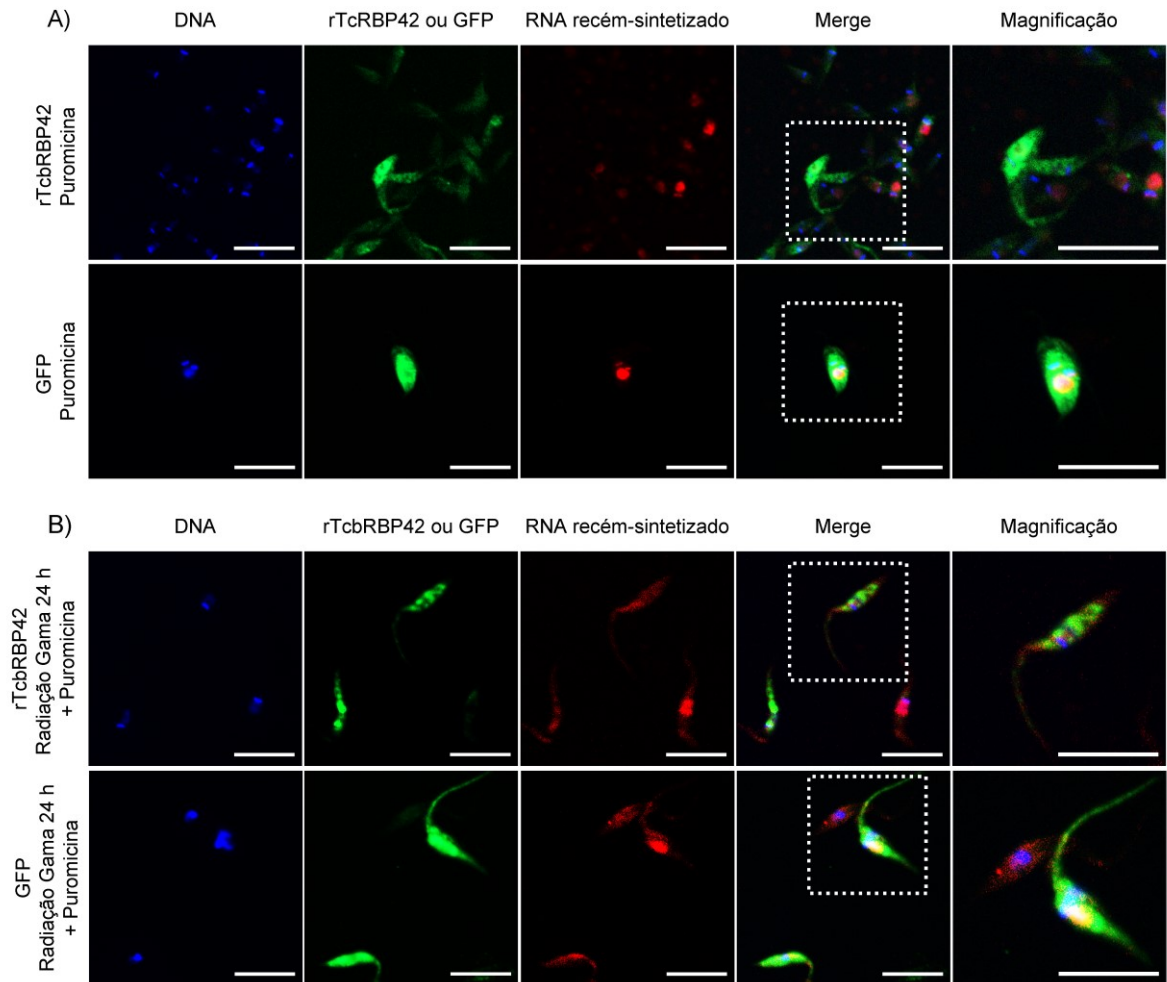


Figura 31: Efeito da puromicina na condição normal e irradiada.

Epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 ou GFP em condições normais de cultivo (A) ou 24 h após exposição à radiação gama (B) foram tratadas com 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de puromicina. As proteínas recombinantes foram detectadas por meio de suas *tags* de 6His com os anticorpos *Anti-His probe* e *Alexa Fluor 488*. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram corados com o *Hoechst 33342*. O RNA recém-sintetizado foi detectado com o *Click-iT RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit*. Barra de magnificação: 10 μm .

Uma vez detectada uma resposta transcricional desenvolvida no tempo de 24 horas após a exposição à radiação gama, surgiu o questionamento sobre o que ocorre com os níveis de expressão dos genes TcbRBP42 e de seus genes vizinhos nessa situação. Para elucidar a questão, foram utilizados dados de *RNA-seq* de espimastigotas WT em condições normais de cultivo e 24 h após a irradiação gerados previamente no Laboratório de Genética Bioquímica. O alinhamento das *reads* contra o genoma de referência mostrou que os genes de TcbRBP42 de ambos os haplótipos do *T. cruzi* CL Brener são os mais expressos em suas regiões genômicas tanto nas condições normais quanto na irradiação (**Figura 32 e 33**).

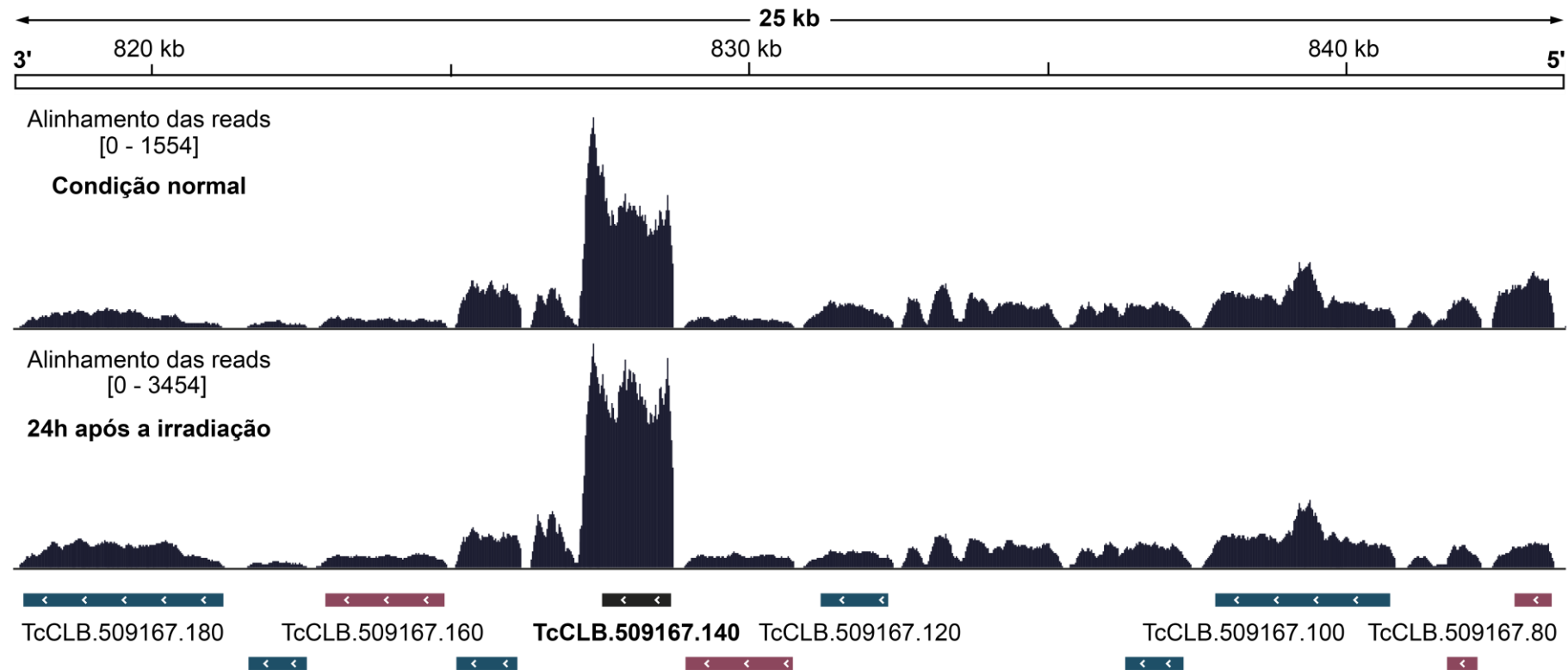


Figura 32: Expressão do gene TcbRBP42 (Esmeraldo-like) e de seus genes vizinhos em condições normais e 24 h após exposição à radiação gama. O alinhamento das *reads* contra o genoma mostra que em ambas as situações analisadas o gene TcbRBP42 (destacado em preto) é o mais expresso em seu contexto genômico (dados de *RNA-seq* de epimastigotas WT em condições normais e 24 h após a irradiação). Números entre colchetes: amplitude do número de *reads* alinhadas. Genes em azul codificam proteínas de funções conhecidas e os em rosa codificam proteínas hipotéticas. Proteínas da esquerda para a direita: Cinesina, tRNA (Guanina-1) metiltransferase, Hipotética, Homoserina cinase, RBP42, Hipotética conservada, S-adenosilmetionina descarboxilase-proenzima (2 genes), Valil-tRNA sintetase e Hipotética conservada (2 genes).

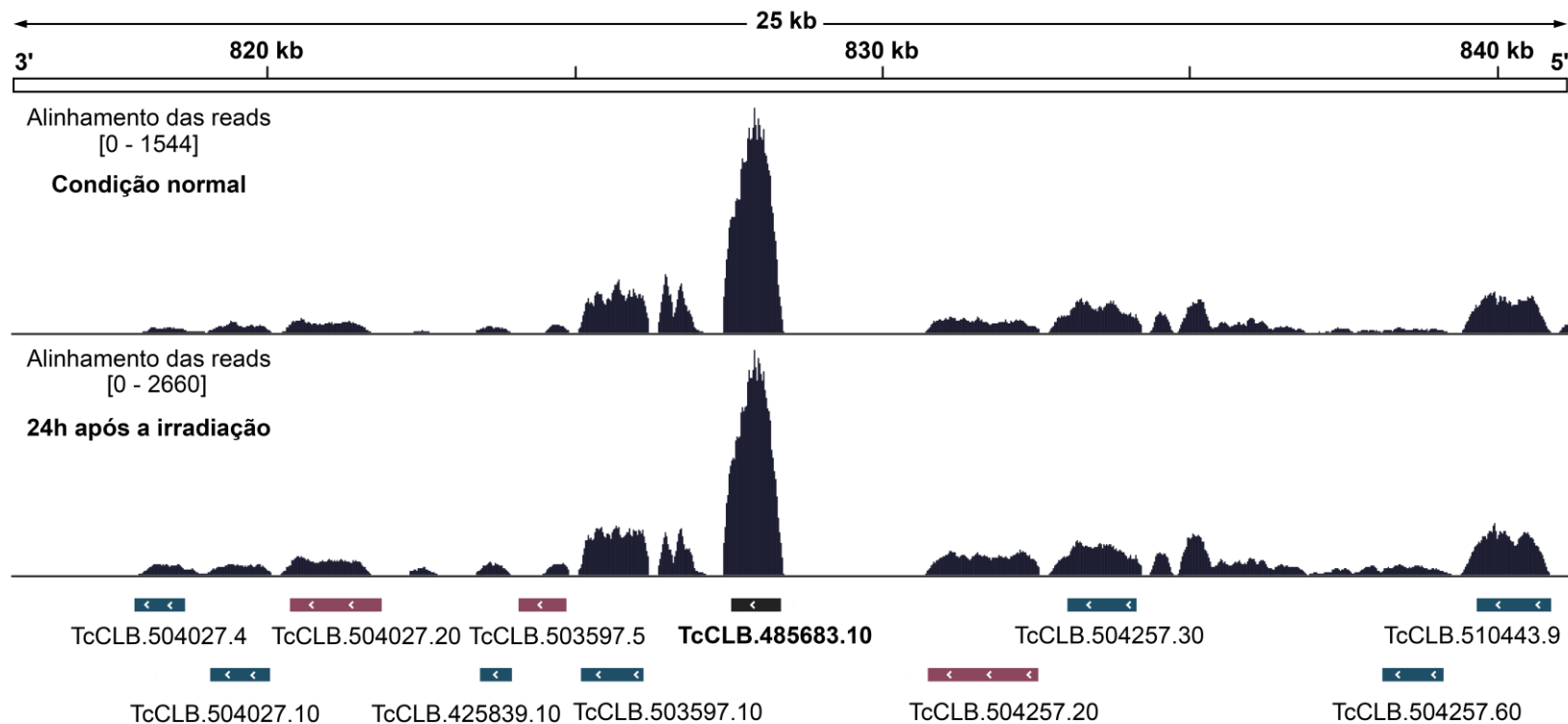


Figura 33: Expressão do gene TcbRBP42 (Não Esmeraldo-like) e de seus genes vizinhos em condições normais e 24 h após exposição à radiação gama.

O alinhamento das *reads* contra o genoma mostra que em ambas as situações analisadas o gene TcbRBP42 (destacado em preto) é o mais expresso em seu contexto genômico (dados de *RNA-seq* de epimastigotas WT em condições normais e 24 h após irradiação). Números entre colchetes: amplitude do número de *reads* alinhadas. Genes em azul codificam proteínas de funções conhecidas e os em rosa codificam proteínas hipotéticas. Proteínas da esquerda para a direita: Cinesina (fragmento), tRNA (Guanina-1) metiltransferase, Hipotética, Cinesina (fragmento), Hipotética (fragmento), Homoserina cinase, RBP42, Hipotética conservada, S-adenosilmetionina descarboxilase-proenzima (2 genes) e Valil-tRNA sintetase.

5.8.2 Estresse induzido por benzonidazol

Para avaliar os efeitos do benzonidazol na localização celular de rTcbRBP42 e GFP, foram realizados ensaios de imunofluorescência na condição normal e nos tempos de 24 e 48 h após o início do tratamento com a droga. O tratamento das epimastigotas foi realizado com 120 μ M de benzonidazol, que permaneceu em contato com as células continuamente durante os experimentos. Na condição normal, foi novamente observada uma distribuição citoplasmática difusa para as proteínas rTcbRBP42 e GFP (**Figura 34 A**). No tempo de 24 h de tratamento, rTcbRBP42 se acumulou em focos citoplasmáticos. Em contrapartida, essa mesma distribuição foi pouco evidente no tempo de 48 h de tratamento, em que se observou que rTcbRBP42 estava distribuída por todo o citoplasma da maioria dos parasitos analisados de forma muito semelhante ao que acontece na condição normal (**Figura 34 B**). Para GFP, o tratamento não alterou a distribuição da proteína em comparação à condição normal em nenhum dos tempos analisados (**Figura 34 C**).

Além de provocar uma mudança na distribuição celular de rTcbRBP42 no tempo de 24 h, o tratamento com benzonidazol provocou grandes mudanças na morfologia típica das epimastigotas que é observada em condições normais (**Figura 34 A**). Para ambas as culturas de parasitos tratadas (expressores de rTcbRBP42 e GFP) detectou-se o aparecimento de células de formato circular acompanhado de grande redução do comprimento celular (**Figura 34 B e C**). Esse resultado contrasta significativamente com aqueles obtidos no estresse por radiação gama que não promoveu mudanças morfológicas evidentes nas células (**Figura 27 B e C**).

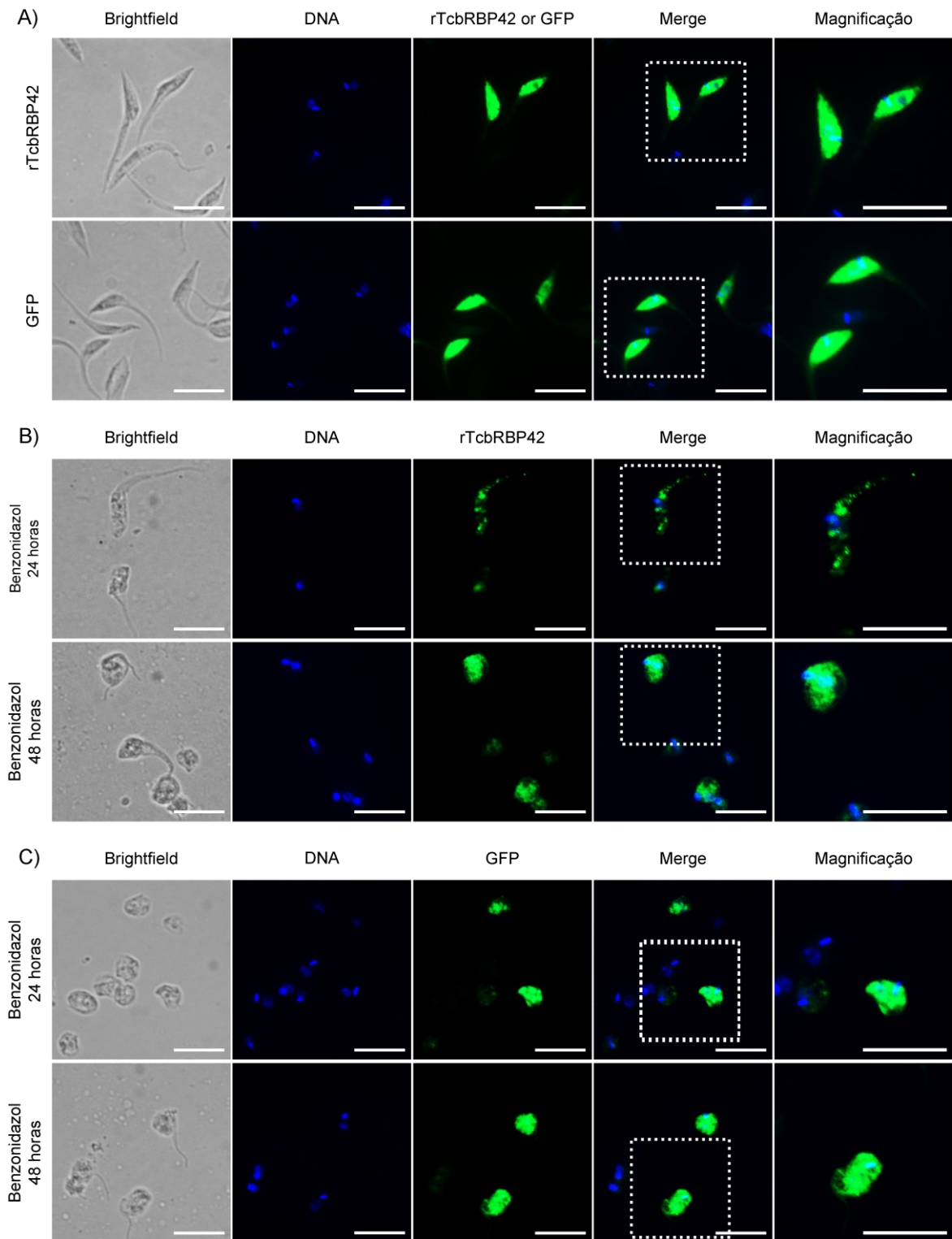


Figura 34: Localização celular de rTcbRBP42 e GFP no estresse induzido por benzimidazol. Imagens de imunofluorescência de epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e GFP em condições normais de cultivo (A) e nos tempos de 24 e 48 h após o tratamento com 120 μ M de benzimidazol (B e C). As proteínas recombinantes foram detectadas por meio de suas *tags* de 6His utilizando-se os anticorpos *Anti-His probe* e *Alexa Fluor 488*. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram corados com o *Hoechst 33342*. Barra de magnificação: 10 μ m.

Com o intuito de investigar a síntese de RNA após 24 e 48 h de tratamento com benzonidazol, os RNAs recém-sintetizados foram marcados por meio da incorporação e detecção do análogo 5-etiniluridina (EU), o qual permaneceu em contato com os parasitos durante às 24 h que antecederam a coleta das amostras. Na condição normal, os RNAs recém-sintetizados foram novamente detectados majoritariamente no núcleo das epimastigotas (**Figura 35 A**). Após 24 h de tratamento, os RNAs recém-sintetizados se acumularam em estruturas citoplasmáticas granulares, o que também foi observado no tempo de 48 h. Essa distribuição ocorreu tanto em parasitos expressores de rTcbRBP42 quanto nos expressores de GFP (**Figura 35 B e C**). Foi observado também que as estruturas granulares de RNA detectadas estavam localizadas nas proximidades da periferia nuclear das células. No entanto não foi possível colocalizar estas estruturas com os focos citoplasmáticos de rTcbRBP42 observados após 24 h de tratamento com benzonidazol (**Figura 35 B**).

O efeito da puromicina também foi estudado nos parasitos sob estresse por benzonidazol. Na ausência do estresse, o tratamento com a puromicina não foi suficiente para alterar as distribuições celulares de rTcbRBP42, GFP e do RNA recém-sintetizado vistas em condições normais (**Figura 36 A**). Quando o estresse foi induzido na presença de puromicina, se observou novamente o acúmulo de rTcbRBP42 em focos citoplasmáticos após 24 h de tratamento e uma distribuição semelhante àquela da condição normal após 48 h de tratamento. Nesse tempo de 48 h, a presença da proteína em focos citoplasmáticos ocorreu em um número reduzido de parasitos (**Figura 36 B**). No caso da proteína GFP, esta apresentou localização muito semelhante àquela da condição normal nos dois tempos de tratamento analisados (**Figura 36 C**). No que se refere ao RNA recém-sintetizado, este novamente se apresentou concentrado em estruturas citoplasmáticas granulares localizadas próximas ao núcleo das células (**Figura 36 B e C**). Novamente não foi possível colocalizar os focos citoplasmáticos de rTcbRBP42 com aqueles formados pelo RNA recém-sintetizado (**Figura 36 B**). Foi observado também que muitos dos focos de rTcbRBP42, observados no tempo de 24 h após o início do tratamento com o benzonidazol, estão localizados próximos ao núcleo celular em um grande número de parasitos (**Figura 34 B, 35 B e 36 B**).

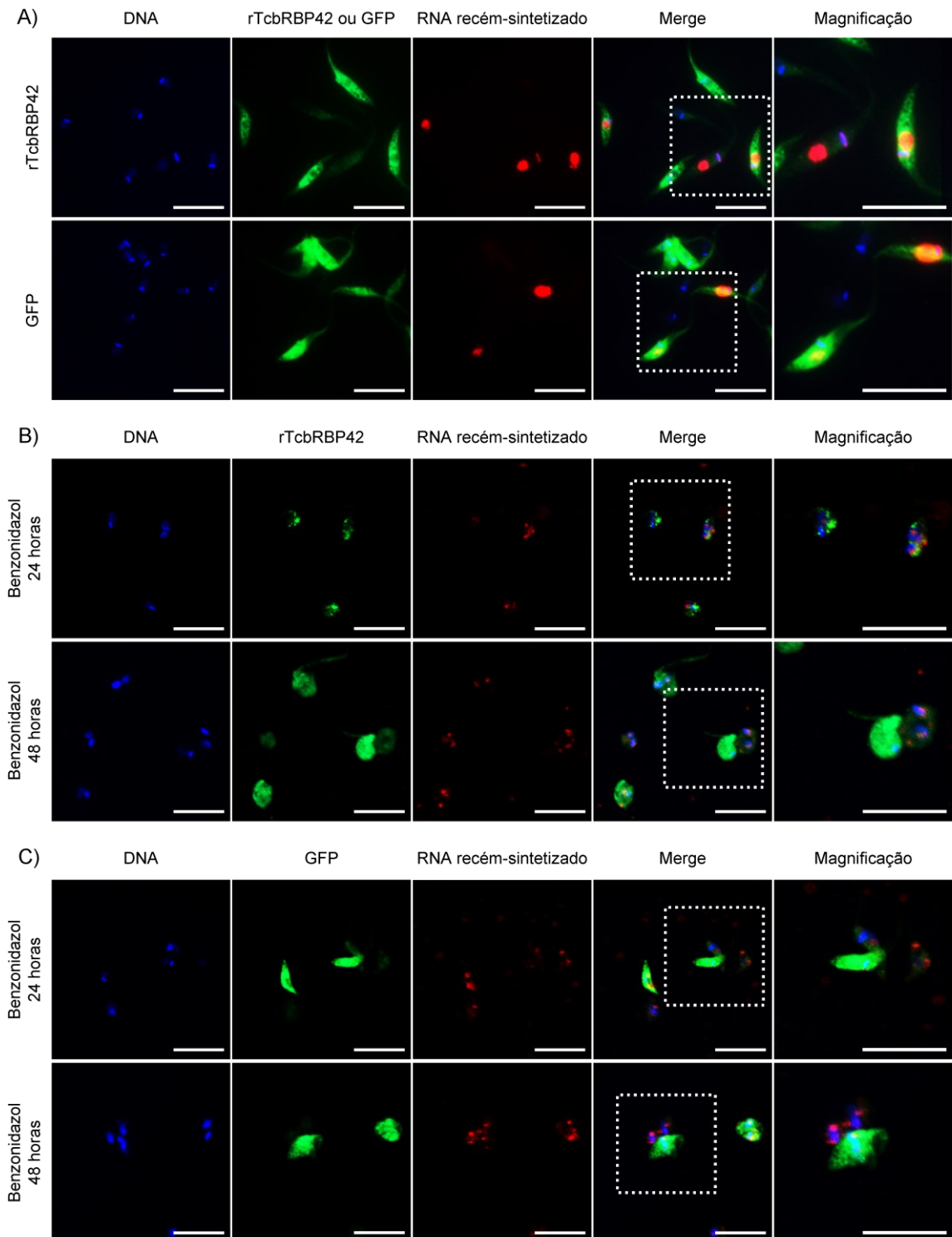


Figura 35: Localização do RNA recém-sintetizado no estresse induzido por benzonidazol.

A localização do RNA recém-sintetizado foi acessada em epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 e GFP em condições normais de cultivo (A) e nos tempos de 24 e 48 h após o tratamento com 120 μ M de benzonidazol (B e C). As proteínas recombinantes foram detectadas por meio de suas *tags* de 6His com os anticorpos *Anti-His probe* e *Alexa Fluor 488*. O DNA nuclear e o cinetoplasto foram corados com o *Hoechst 33342*. O RNA recém-sintetizado foi detectado com o *Click-iT RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit*. Barra de magnificação: 10 μ m.

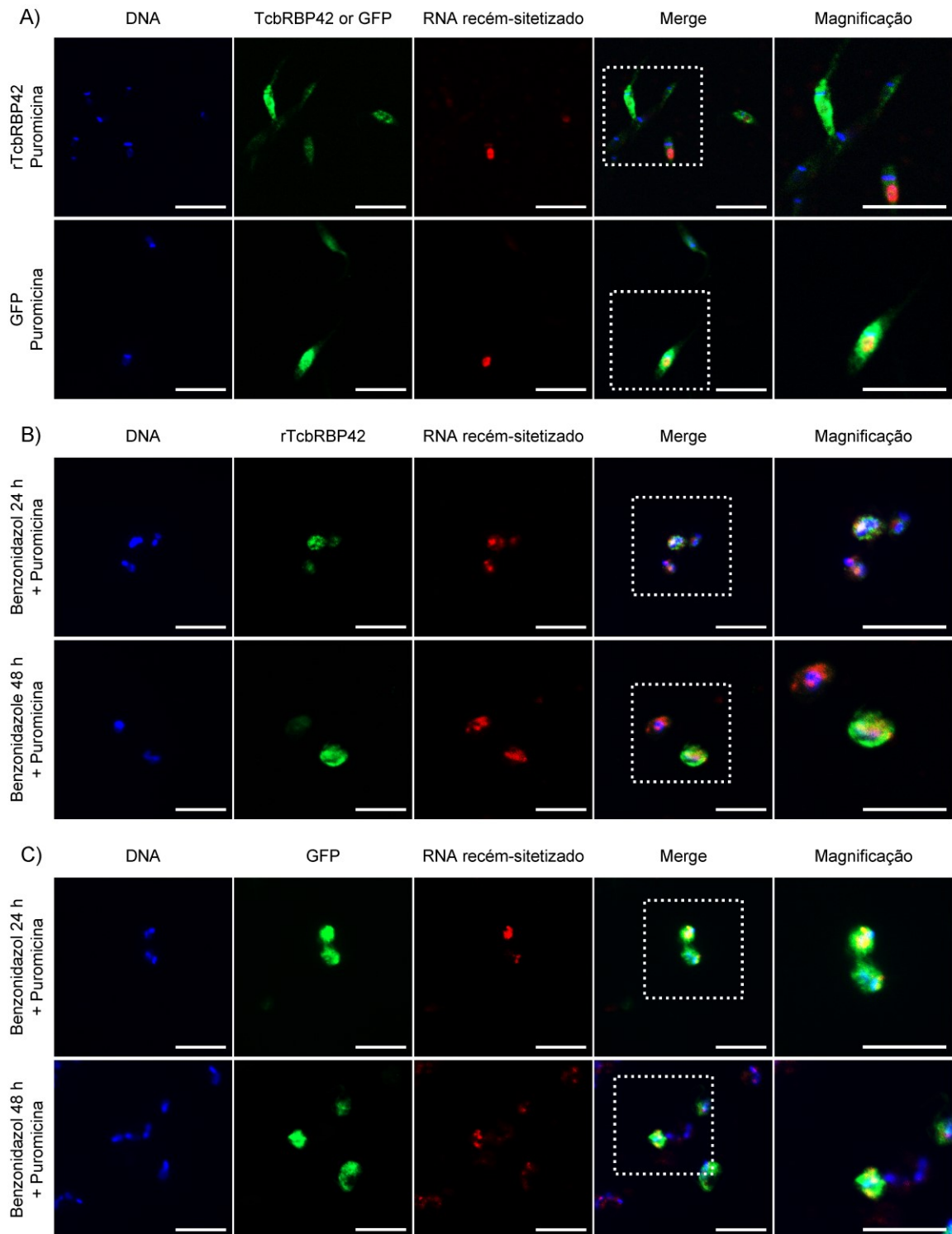


Figura 36: Efeito da puromicina no estresse induzido por benznidazol.

Epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 ou GFP em condições normais de cultivo (A) ou 24 e 48 h após tratamento com 120 μM benznidazol (B e C) foram tratadas com 200 $\mu\text{g/mL}$ de puromicina. As proteínas recombinantes foram detectadas por meio de suas *tags* de 6His com os anticorpos *Anti-His probe* e *Alexa Fluor 488*. O DNA nuclear e cinetoplasto foram corados com o *Hoechst 33342*. O RNA recém-sintetizado foi detectado com o *Click-iT RNA Alexa Fluor 594 Imaging Kit*. Barra de magnificação: 10 μm .

6. DISCUSSÃO

As proteínas ligantes de RNA são componentes essenciais para a regulação da expressão gênica, particularmente nos tripanosomatídeos. Nesses organismos, a organização do genoma em grandes unidades policistrônicas, em que genes não relacionados em função são transcritos conjuntamente, faz com que a regulação da expressão gênica ocorra quase que exclusivamente por mecanismos pós-transcricionais. Devido ao protagonismo das RBPs, que estão presentes em grande número no genoma dos tripanosomatídeos, essa classe de proteínas vem sendo frequentemente estudada nesses parasitos (CLAYTON, 2013; KRAMER; CARRINGTON, 2011; SINGH *et al.*, 2015). Nesse trabalho realizamos o estudo da proteína RBP42 do parasito *T. cruzi* CL Brener. Para isso, estudamos as características dos genes e da proteína TcbRBP42 *in silico*, e também investigamos o comportamento dessa proteína nas condições de estresse causadas pelos tratamentos com radiação gama e benzonidazol. O estudo de TcbRBP42 em condições de estresse teve como intuito caracterizar inicialmente o possível envolvimento dessa proteína na resposta ao estresse desenvolvida pelo parasito. Apesar da proteína RBP42 já ter sido estudada em outros tripanosomatídeos (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018), a sua caracterização no contexto do estresse genotóxico não possui precedentes na literatura.

O genoma do *T. cruzi* CL Brener possui dois alelos codificadores para a proteína TcbRBP42, um para cada um de seus haplótipos (Esmeraldo-like e Não Esmeraldo-like). A representação do genoma desse parasito em haplótipos reflete a natureza híbrida do clone CL Brener, que resulta da fusão entre as DTUs II e III. (EL-SAYED *et al.*, 2005). No início deste trabalho os alelos de TcbRBP42 estavam anotados como hipotéticos, mas essa anotação foi atualizada posteriormente no banco de dados *TriTrypDB* (ASLETT *et al.*, 2010). Durante as análises iniciais da sequência desses genes foi detectada a anotação errônea do códon AUG inicial do gene TcbRBP42 do haplótipo Não Esmeraldo-like, que foi corrigida utilizando-se dados de *RNA-seq* de epimastigotas do Clone CL Brener (SRA: SRP072756). Corrigida a anotação, os alelos apresentaram uma alta identidade de sequência entre si, alcançando os 98,2%. Com relação ao contexto genômico desses alelos, estão presentes genes codificadores de proteínas de funções muito diversas como a Valil-tRNA sintetase e Cinesina. A presença de genes não relacionados em função em um mesmo policístron está entre as características mais marcantes do genoma dos tripanosomatídeos (KRAMER, 2012). Adicionalmente, os genes vizinhos aos alelos de TcbRBP42 também codificam proteínas hipotéticas, o que reflete o fato

de que uma grande parte das proteínas anotadas no genoma do *T. cruzi* não possuem funções definidas (EL-SAYED *et al.*, 2005). Ainda analisando o contexto genômico dos alelos de TcbRBP42, os dados de *RNA-seq* foram utilizados novamente para inferir os níveis de expressão dos genes. A análise desses dados revelou que ambos os alelos de TcbRBP42 são os mais expressos em suas regiões genômicas, o que pode indicar que TcbRBP42 seja uma proteína de grande importância para o parasito. De fato, essa proteína foi descrita como sendo essencial para a viabilidade celular do *T. brucei*, organismo em que a sua depleção causa defeitos de citocinese, crescimento lento das culturas, aparecimento de morfologias aberrantes e menor taxa de tradução. Todos esses efeitos da depleção de TbRBP42 sugerem o envolvimento desta em diversos processos celulares. O fato de TbRBP42 interagir majoritariamente com transcritos de proteínas do metabolismo energético, que possivelmente são estabilizados ou traduzidos mais eficientemente pela interação com essa proteína, também levou os autores a sugerirem um possível papel de TbRBP42 na regulação do metabolismo em resposta à diferentes fontes nutricionais (DAS *et al.*, 2012; ERBEN *et al.*, 2014; LUEONG *et al.*, 2016). Nesse sentido, foi demonstrado recentemente que epimastigotas do *T. cruzi* adaptam o seu metabolismo de acordo com as fases de crescimento, realizando a transição de um metabolismo baseado em glicose na fase exponencial para aquele baseado em aminoácidos na fase estacionária, em que esses últimos são mais abundantes no meio de cultura (BARISÓN *et al.*, 2017).

Em relação à estrutura das proteínas TcbRBP42, a busca por domínios/motivos conservados somada à predição da estrutura secundária identificou a presença de dois domínios estruturados, NTF2-like e RRM, ligados entre si por uma região central cuja estrutura secundária foi predita como *coil*. Essa estrutura modular identificada nas proteínas TcbRBP42 é compartilhada com as suas proteínas ortólogas já estudadas no *T. brucei*, *L. braziliensis* e *T. cruzi* Y (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018). A similaridade de sequência entre as proteínas RBP42 estudadas nos tripanosomatídeos é maior na região dos domínios conservados e menor na região central em *coil*. Esse mesmo padrão foi observado em diversas espécies de cinetoplastídeos, nos quais a organização modular dessa proteína foi mantida. Adicionalmente, a árvore filogenética produzida a partir de diferentes sequências de RBP42 possui topologia consistente com as relações filogenéticas já conhecidas para a ordem Kinetoplastida (LUKEŠ *et al.*, 2014), o que demonstra que as sequências de RBP42 utilizadas na inferência filogenética, que em algumas espécies de cinetoplastídeos se encontram anotadas como hipotéticas, são de fato sequências ortólogas. A conservação de sequência entre as

proteínas RBP42 de diferentes cinetoplastídeos também pode indicar uma conservação de função. Dessa maneira, RBP42 é provavelmente essencial para todos esses organismos, assim como o é para o *T. brucei* (DAS *et al.*, 2012).

A análise da estrutura dos domínios conservados nas proteínas TcbRBP42 foi realizada por meio da produção de modelos tridimensionais por modelagem comparativa para a proteína do haplótipo Esmeraldo-like. Apesar da baixa similaridade de sequência entre os domínios de TcbRBP42 (Esmeraldo-like) e suas estruturas moldes, a proteína NTF2 do *Cryptosporidium parvum* (VEDADI *et al.*, 2007) e o segundo domínio RRM da proteína humana RBP19, os modelos produzidos foram considerados de excelente qualidade em todos os critérios de validação utilizados. Os modelos gerados para os domínios NTF2-like e RRM de TcbRBP42 (Esmeraldo-like), mostraram que estes adotam as topologias já conhecidas para esses domínios (CLÉRY; BLATTER; ALLAIN, 2008; VEDADI *et al.*, 2007; VOGNSEN; MØLLER; KRISTENSEN, 2013). No entanto, as regiões em *loop* conectando os elementos de estrutura secundária que compõem o domínio NTF2-like são em alguns casos maiores no *T. cruzi* CL Brener em comparação com a estrutura utilizada como molde. A extensão dessas regiões observadas no domínio NTF2-like de TcbRBP42 (Esmeraldo-like) poderia contribuir para a expansão das superfícies disponíveis para a interação com ligantes e para o aumento de flexibilidade da estrutura, no sentido em que os *loops* são geralmente regiões flexíveis importantes para a interação com ligantes, principalmente quando localizadas na superfície das proteínas (PAPALEO *et al.*, 2016). Considerando-se que as predições de estrutura secundária mostraram que tanto as proteínas RBP42 do *T. cruzi* CL Brener quanto aquelas estudadas em outros tripanosomatídeos possuem a mesma estrutura secundária é provável que os domínios conservados de todas essas proteínas adotem estruturas tridimensionais similares.

As proteínas RBP42 dos cinetoplastídeos também apresentam similaridade com a proteína G3BP1 de mamíferos, o que foi detectado pela primeira vez na proteína RBP42 do *T. brucei* (DAS *et al.*, 2012). G3BP1 desempenha várias funções nas células de mamíferos, sendo uma delas a formação de grânulos de estresse, para a qual é um fator essencial (IRVINE *et al.*, 2004; KEDERSHA *et al.*, 2016). Com exceção do domínio RGG, que ocorre apenas em G3BP1, essas proteínas possuem basicamente a mesma organização estrutural. As funções de cada um dos domínios de RBP42 ainda não foram demonstradas experimentalmente, mas a ocorrência destes em outras proteínas fornecem algumas informações. Proteínas portadoras de domínios NTF2-like possuem funções variadas nas células (EBERHARDT *et al.*, 2013). A presença desse domínio foi associada, por exemplo, as funções de transporte

nucleocitoplasmático de mRNAs (KATAHIRA *et al.*, 2015) e as interações do tipo proteína-proteína, como as que ocorrem na formação de dímeros de G3BP1 (TOURRIÈRE *et al.*, 2003). Nesse sentido, esses fenômenos também poderiam ocorrer em RBP42. Entretanto, a formação de dímeros ainda não foi investigada e as proteínas RBP42 dos tripanosomatídeos nunca foram observadas no núcleo das células (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018). Com relação ao domínio RRM, a sua presença sugere a capacidade de interação com o RNA, embora esses domínios possam, em alguns casos, interagir com proteínas e com o DNA (CLÉRY; BLATTER; ALLAIN, 2008). Em *L. brasiliensis*, a interação de RBP42 com o RNA foi de fato demonstrada experimentalmente por meio de ensaios de desvio da mobilidade eletroforética utilizando-se a região 3' UTR do transcrito de HSP70-II. No entanto, o modo de interação de LbRBP42 com o RNA não foi investigado (NOCUA *et al.*, 2017). Uma característica marcante do domínio RRM da proteína TcbRBP42 e de seus ortólogos nos cinetoplastídeos analisados neste trabalho é a aparente ausência do motivo RNP2, cuja sequência canônica não foi identificada nessas proteínas. As assinaturas RNP1 e RNP2 são características dos domínios RRM, sendo importantes para a interação com o RNA (CLÉRY; BLATTER; ALLAIN, 2008). A aparente ausência da assinatura RNP2 nas proteínas RBP42 sugere que o reconhecimento das moléculas de RNA aconteça de forma não canônica, o que já foi reportado para outras proteínas (CLÉRY; BLATTER; ALLAIN, 2008). Nesse sentido, o domínio NTF2-like também poderia contribuir para o reconhecimento do RNA, como foi demonstrado para os complexos Mex67:Mtr2 e TAP:p15 (fatores de exportação de mRNA) de levedura e mamíferos, respectivamente (AIBARA *et al.*, 2015; KATAHIRA *et al.*, 2015).

Outra característica marcante das proteínas TcbRBP42 e de seus ortólogos estudados em outros tripanosomatídeos é a presença de uma longa região central, predita como desordenada ou *coil*, conectando os domínios NTF2-like e RRM. A presença dessas regiões desordenadas, também denominadas de *linkers*, ligando módulos adjacentes em uma mesma proteína é uma característica comumente encontrada nas RBPs, que tipicamente possuem dois domínios. A combinação de vários domínios em uma única RBP expande a superfície de interação com os seus RNAs alvos, que são reconhecidos com maior especificidade e afinidade. O tamanho e a flexibilidade dos *linkers* também são importantes para esse reconhecimento, podendo determinar se a interação ocorre com um ou vários RNAs alvos. Dessa forma, longos *linkers* podem permitir que os domínios de uma RBP interajam com diferentes sítios localizados na mesma molécula de RNA, mas distantes um do outro, ou em moléculas de RNA distintas (LUNDE; MOORE; VARANI, 2007). Os longos *linkers* presentes nas proteínas RBP42 dos

tripanosomatídeos possuem tamanhos superiores a 130 aminoácidos e são enriquecidos em alaninas, prolinas e aminoácidos polares. Esses aminoácidos são ditos promotores de desordem e ocorrem com maior frequência em regiões intrinsecamente desordenadas. Essas regiões são detectadas frequentemente em proteínas eucarióticas, sendo consideradas biologicamente muito importantes por fornecerem, por exemplo, flexibilidade estrutural e sítios acessíveis para modificações pós-traducionais como fosforilações (UVERSKY; DUNKER, 2010). No caso das proteínas RBP42, estudos das modificações do proteoma do *T. cruzi* e *T. brucei* detectaram diversas serinas e treoninas fosforiladas nos *linkers* dessas proteínas (MARCHINI *et al.*, 2011; URBANIAK; MARTIN; FERGUSON, 2013). A fosforilação ou a desfosforilação de resíduos nessa região poderia possivelmente modular o funcionamento das proteínas RBP42, a exemplo do que ocorre na proteína G3BP1 de humanos. Nessa proteína a desfosforilação da serina 149, localizada também em uma região de *linker*, é necessária para a formação de grânulos de estresse e para a sua oligomerização (TOURRIÈRE *et al.*, 2003).

Uma propriedade notável dos segmentos intrinsecamente desordenados das RBPs (IDRs) é o enriquecimento em sequências de aminoácidos de baixa complexidade (pequena diversidade na composição de aminoácidos) e repetitivas, cuja importância para a interação com o RNA e outras proteínas vem sendo reconhecida nos últimos anos (CASTELLO *et al.*, 2012; JÄRVELIN *et al.*, 2016). Nesse contexto, nos *linkers* das proteínas RBP42 dos tripanosomatídeos analisados estão presentes uma região rica em glutamatos e três motivos PxxP, além de pequenos segmentos de poli-alaninas e poli-glutaminas identificados apenas nas proteínas do *T. cruzi* Y e CL Brener. Regiões ricas em glutamatos/aspartatos são encontradas em proteínas envolvidas em diversos processos celulares como o remodelamento da cromatina e metabolismo do RNA (CHOU; WANG, 2015). Nas RBPs essas regiões podem ser locais de interação com outras proteínas como foi reportado para G3BP2, na qual uma região rica em glutamatos é suficiente para a interação com o fator I κ B α (inibi a atividade do fator de transcrição NF- κ B), que fica retido no citoplasma das células (PRIGENT *et al.*, 2000). Em relação aos motivos PxxP, estes variam de uma a três repetições nas proteínas RBP42 dos cinetoplastídeos, sendo que essa variação no número de ocorrências também é observada na família das proteínas G3BP (IRVINE *et al.*, 2004). Motivos ricos em prolinas são um dos motivos mais abundantes no proteoma de vários organismos como a *Drosophila melanogaster*, sendo associados principalmente a interações do tipo proteína-proteína. As regiões ricas em prolinas são propensas a assumirem a conformação de uma hélice estendida de sentido anti-horário denominada de hélice de poliprolina II (PPII), que é frequentemente classificada

errôneamente como *coil*. Essa conformação estendida somada à presença de prolina, o único aminoácido cuja cadeia lateral é cíclica, fornece uma plataforma de interação que possui alta especificidade de sequência e baixa afinidade de ligação, o que favorece a ocorrência de interações rápidas e reversíveis (ADZHUBEI; STERNBERG; MAKAROV, 2013; ZARRINPAR; BHATTACHARYYA; LIM, 2003). Os motivos ricos em prolina são reconhecidos por domínios como o domínio de homologia a SRC3 (SH3), que se liga a motivos PxxP na conformação helicoidal (ADZHUBEI; STERNBERG; MAKAROV, 2013). Com relação às repetições de alaninas e glutaminas das proteínas RBP42 do *T. cruzi*, estas foram descritas previamente em proteínas que fazem parte de complexos proteicos, estando associadas com interações entre proteínas. Regiões contendo repetições de aminoácidos também possuem potencial para a agregação como acontece com os segmentos enriquecidos em glutaminas/asparaginas que estão presentes, por exemplo, em proteínas que fazem parte de *P-bodies* (BJÖRKLUND; EKMAN; ELOFSSON, 2006; FAUX *et al.*, 2005; VAN DER LEE *et al.*, 2014).

As RBPs também podem ser recrutadas para estruturas citoplasmáticas desprovidas de membrana chamadas de grânulos de RNA, que são formados por um processo denominado de transição de fases líquido-líquido. Diversos estudos apontam que a transição de fases líquidas é dependente de características das RBPs como a presença de domínios de interação com o RNA e de regiões desordenadas de baixa complexidade, que são essenciais para o processo (MOLLIEUX *et al.*, 2015; UVERSKY, 2017). A presença dessas características nas proteínas RBP42, além do fato de que um de seus ortólogos, a proteína G3BP1, é um fator crucial para a formação de grânulos de estresse (KEDERSHA *et al.*, 2016), sugere que estas proteínas têm potencial para se agregarem em grânulos ou serem recrutadas para estes.

Nesse trabalho, a proteína TcbRBP42 (Esmeraldo-like) foi estudada *in vitro* em condições normais de cultivo e de estresse induzido pela radiação gama e pelo benzonidazol. Para tanto, foram produzidas linhagens de epimastigotas do *T. cruzi* CL Brener expressoras de uma versão recombinante dessa proteína, que possui as *tags* de SBP e 6His para fins de detecção. A *tag* de 6His foi a utilizada para avaliar a localização celular da proteína recombinante. A expressão de rTcbRBP42 nas culturas transfectadas foi confirmada por *Western Blot*, entretanto a ausência de um anticorpo que reconheça a proteína nativa impossibilitou a quantificação dos níveis de TcbRBP42 nessas células. Alternativamente, os níveis de expressão relativa dos genes de TcbRBP42 foram quantificados por PCR em tempo real e mostraram que nas células transfectadas os transcritos dos genes de TcbRBP42 são

aproximadamente 36 vezes mais abundantes do que em células WT. Em conjunto esses dados demonstram que a geração da linhagem de epimastigotas expressoras de rTcbRBP42 foi bem-sucedida. Adicionalmente, em condições normais de cultivo, a expressão de rTcbRBP42 não foi suficiente para alterar o crescimento e morfologia típica das epimastigotas, mostrando que a transfecção por si só não provoca alterações fenotípicas aparentes na ausência de qualquer estresse. Nessa condição, a proteína rTcbRBP42 foi detectada distribuída por todo o citoplasma das epimastigotas, o que é coerente com a localização celular reportada para as proteínas RBP42 ortólogas estudadas em outros tripanosomatídeos (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018). Essa localização citoplasmática de TcbRBP42 é provavelmente mantida durante o ciclo de vida do *T. cruzi* CL Brener, assim como foi descrito para a cepa Y desse parasito (WEISBARTH *et al.*, 2018). No entanto, essa possibilidade não foi investigada nesse trabalho.

O envolvimento de TcbRBP42 na resposta ao estresse por radiação gama foi avaliado por meio da exposição de células expressoras da versão recombinante dessa proteína a 500 Gy de radiação gama. O *T. cruzi* é extremamente resistente a esse tipo de radiação ionizante podendo resistir a doses tão altas quanto 3000 Gy (dados obtidos no Laboratório de Genética Bioquímica da UFMG, mas ainda não publicados). Nesse sentido, a dose de 500 Gy é considerada subletal para o parasito, apesar de causar uma extensa fragmentação do genoma (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). De forma surpreendente, o genoma extensamente fragmentado é completamente reconstituído e o padrão normal de bandas cromossômicas é restabelecido em até 48 h, o que é acompanhado da retomada do crescimento celular em até 144 h. Tendo-se em vista os danos causados pela radiação gama ao DNA, o estudo da resposta do parasito a esse tipo de estresse, que ainda não foi esclarecida, se concentra principalmente em componentes da resposta ao dano no DNA como a proteína TcRad51, cuja função é essencial para o reparo por recombinação homóloga das quebras de fita dupla (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Nesse cenário, o estudo de uma RBP no contexto da radiação ionizante não tem precedentes nesse parasito.

Nesse trabalho, as células expressoras de rTcbRBP42 foram igualmente sensíveis à radiação ionizante em comparação com as células WT e expressoras de GFP. Em todas as células analisadas, a exposição à radiação causou a parada do crescimento celular que foi retomado em aproximadamente 140 h, de forma coerente com o que já foi observado anteriormente (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). No que se refere à localização celular de rTcbRBP42, esta foi alterada em comparação à condição normal. A irradiação causou a

agregação dessa proteína em estruturas citoplasmáticas granulares semelhantes a grânulos de RNA, o que não foi modificado pelo tratamento adicional com puromicina. A ausência da distribuição granular da proteína GFP após a irradiação evidencia que a distribuição alterada de rTcbRBP42 não é produzida pelo sistema de expressão utilizado. Nos tripanosomatídeos existe um grande repertório de grânulos, sendo que o aparecimento dessas estruturas foi reportado inúmeras vezes em parasitos submetidos a condições de estresse celular (KRAMER, 2014). Dados obtidos no contexto do estresse nutricional sugerem que os grânulos formados nessa condição possam funcionar como locais de armazenamento de transcritos, em que estes são protegidos da degradação e podem ser utilizados pelo parasito na retomada de crescimento uma vez superado o estresse (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007). Adicionalmente, um estudo recente em células tumorais mostrou que RBPs também podem ter um papel na resposta celular à radiação ionizante ao modular o destino dos transcritos aos quais elas se ligam. Nesse contexto, a proteína humana Hur, cuja abundância é aumentada em vários tipos de câncer, aumenta a resistência das células tumorais à radiação ionizante ao estabilizar ou aumentar a eficiência de tradução de transcritos de proteínas anti-apoptóticas e reprimir a tradução do transcrito do fator pró-apoptótico caspase-2 (BADAWI *et al.*, 2017). Dessa forma, a agregação de TcbRBP42 em grânulos citoplasmáticos e a modulação do destino de transcritos alvos podem integrar os mecanismos que permitem a recuperação do *T. cruzi* após exposição à radiação gama.

Em relação a avaliação da resposta transcricional após a indução do estresse pela radiação gama, nossos resultados mostraram que a distribuição dos RNAs recém-sintetizados é completamente modificada em comparação com a condição normal e isso acontece igualmente nas células expressoras de rTcbRBP42 e GFP. Na ausência de estresse, os RNAs recém-sintetizados estão concentrados no núcleo das células. No entanto, 24 h após a indução do estresse, esses RNAs se espalham por todo o citoplasma dos parasitos, mostrando que os RNAs recém-sintetizados não se acumulam em grânulos citoplasmáticos. De forma contrastante, a síntese de RNA não é mais detectada no tempo de 48 h após a irradiação. Esse resultado é semelhante ao que acontece em células tratadas actinomicina D (inibidor de transcrição), em que a detecção da síntese de RNA é drasticamente reduzida. Em conjunto esses dados sugerem que essa resposta transcricional desenvolvida nas primeiras 24 h após exposição à radiação ionizante integre os mecanismos de recuperação pós-estresse do parasito. Nesse sentido, estes RNAs poderiam ser traduzidos em proteínas ou corresponder a RNAs não codificantes. Estudos recentes apontam os RNAs não codificantes como componentes cruciais para a ativação da

resposta ao dano no DNA e consequente reparo das quebras na dupla fita. A transcrição não canônica desses RNAs é estimulada nos sítios de lesão, enquanto que a transcrição de genes codificadores de proteínas é inibida (D'ALESSANDRO; DI FAGAGNA, 2017). Além disso, transcritos também podem ser utilizados como moldes no reparo das lesões por recombinação homóloga (YANG; QI, 2015). Embora os focos citoplasmáticos de TcbRBP42 não tenham sido colocalizados com os RNA recém-sintetizados, estes ainda podem possivelmente contribuir para a recuperação pós-estresse dos parasitos ao se ligarem a transcritos já existentes nas células previamente à indução do estresse. Extraordinariamente, o RNA das epimastigotas não tem sua estrutura danificada pela radiação gama e permanece íntegro (GRYNBERG *et al.*, 2012).

O espalhamento citoplasmático dos RNAs recém-sintetizados no citoplasma das epimastigotas no tempo de 24 h após a irradiação também poderia ser o resultado de um possível rompimento da membrana nuclear ocasionado pela irradiação. Para investigar essa possibilidade, células WT e expressoras de TcbRBP42 foram submetidas à microscopia eletrônica de transmissão. As imagens de microscopia eletrônica mostraram que a irradiação não promove a ruptura da membrana nuclear, que permanece íntegra nos parasitos irradiados. Além disso, a irradiação também não gera grandes alterações morfológicas nessas células, que mantém a morfologia típica de epimastigotas com exceção da heterocromatina nuclear. A heterocromatina é evidente em parasitos não tratados, mas desaparece após a irradiação. Esse fenômeno também foi observado por outros pesquisadores (NARDELLI *et al.*, 2009), sendo consistente com uma desorganização da cromatina causada pela fragmentação do genoma após a irradiação. A presença de uma membrana nuclear intacta após a indução do estresse descarta a possibilidade de que o extravasamento do RNA recém-sintetizado para o citoplasma aconteça em decorrência do rompimento da carioteca, o que reforça a possibilidade desses RNAs serem transportados ativamente para esse compartimento celular. As imagens de microscopia também mostraram um aparente aumento no número de estruturas citoplasmáticas desprovidas de membranas no citoplasma das epimastigotas WT e expressoras de rTcbRBP42 irradiadas, o que é consistente com a formação de grânulos observada para a proteína rTcbRBP42 por microscopia de fluorescência.

Considerando que os genes TcbRBP42 de ambos os haplótipos são os mais expressos em suas regiões genômicas em condições normais, também foi investigado o que acontece com esses na irradiação. Utilizando-se dados de *RNA-seq* de epimastigotas WT (Clone CL Brener) no tempo de 24 h após a irradiação, foi constatado que a irradiação não alterou o perfil do contexto genômico desses genes que continuaram a ser os mais expressos em suas regiões

genômicas. Além disso, foi notado um aumento na cobertura de *reads* nos genes TcbRBP42 após a irradiação, mas ainda não foi avaliado se esse aumento indica uma mudança significativa na expressão desses genes. A radiação gama tem efeito diferencial na expressão dos genes, que pode ser aumentada ou diminuída. Ensaios de microarranjos mostraram que os genes cuja expressão é diminuída pela irradiação englobam principalmente genes de funções conhecidas, envolvidos principalmente na tradução de proteínas (fatores das fases de início e alongação da tradução). Genes envolvidos em outros processos metabólicos básicos como a produção de energia e metabolismo de lipídeos também são afetados. Em contrapartida, os genes de expressão aumentada codificam principalmente proteínas hipotéticas e pertencem a família dos *Retrotransposons hot spots*. De forma contrária ao que seria esperado após um tratamento que induz danos extensivos ao genoma, os níveis de expressão dos genes envolvidos no reparo de DNA como TcRad51 não foram significativamente afetados (GRYNBERG *et al.*, 2012).

Um outro fator que é provavelmente determinante para a resistência do *T. cruzi* à radiação ionizante é a manutenção de um proteoma funcional. Estudos realizados com a bactéria *Deinococcus radiodurans*, um organismo extremamente resistente à radiação ionizante, mostraram que os mecanismos de reparo de DNA desta são semelhantes ao de outras espécies. Entretanto, essas bactérias apresentam um sistema robusto de proteção do proteoma contra os danos oxidativos provocados pela radiação. Dessa forma, o proteoma permanece preservado e em condições de reparar o DNA extensamente fragmentado mesmo após a exposição a altas doses de radiação ionizante. Dessa maneira, a toxicidade da radiação ionizante está mais relacionada aos danos que esta causa às proteínas do que ao DNA (KRISKO; RADMAN, 2013). No *T. cruzi* estudos do proteoma após a irradiação mostraram o aparecimento de isoformas de uma mesma proteína com pesos moleculares menores do que o predito, o que sugere a ocorrência de processamento proteico e/ou modificações pós-traducionais estimuladas pela radiação ionizante (VIEIRA *et al.*, 2014). Isso somado ao fato de transcritos pertencentes a proteínas de funções ainda desconhecidas serem superexpressos após a exposição à radiação gama (GRYNBERG *et al.*, 2012) adiciona mais uma camada de complexidade aos mecanismos de resistência ao estresse ionizante do *T. cruzi*.

Para avaliar o envolvimento de TcbRBP42 na resposta ao estresse por benzonidazol, epimastigotas expressoras da versão recombinante desta proteína foram expostas a duas doses de benzonidazol, o qual permaneceu em contato com os parasitos continuamente ao longo dos experimentos. A ação tripanomicida do benzonidazol, uma pró-droga derivada do nitroimidazol, ainda não é completamente compreendida, mas incluem o dano às

macromoléculas do parasito (DNA, lipídeos e proteínas), a indução de estresse oxidativo tempo-dependente, a oxidação de nucleotídeos e possivelmente a depleção de tióis de baixo peso molecular como a tripanotona e cisteína (RAJÃO *et al.*, 2014; DE TORANZO *et al.*, 1988; TROCHINE *et al.*, 2014; WILKINSON *et al.*, 2011). O *T. cruzi* também apresenta resistência ao benzonidazol. Assim como acontece na resistência à radiação gama, diversos fatores provavelmente contribuem para as diferenças na susceptibilidade das diferentes cepas do parasito a essa droga. No entanto, esses fatores ainda permanecem em grande parte desconhecidos (FILARDI; BRENER, 1987; MEJIA *et al.*, 2012). Nesse contexto, alguns estudos *in vitro* demonstraram, por exemplo, que essa resistência pode ser adquirida pela remoção da atividade enzimática da nitroredutase mitocondrial (enzima ativadora do benzonidazol), além de poder ser aumentada pela superexpressão de proteínas envolvidas na resposta ao dano de DNA como TcRad51 e as polimerases TcPol η , β e κ , que atuam no reparo do DNA mitocondrial (MEJIA *et al.*, 2012; RAJÃO *et al.*, 2014). O envolvimento de proteínas que atuam no reparo de DNA na resistência ao benzonidazol reforça o efeito deletério que essa droga possui sob essa molécula, podendo causar o acúmulo de mutações por todo o genoma e levar à ocorrência de quebras de fita dupla pela incorporação de nucleotídeos oxidados durante a síntese de DNA (CAMPOS *et al.*, 2017; RAJÃO *et al.*, 2014).

A expressão da versão recombinante de TcbRBP42 não modificou a susceptibilidade dos parasitos ao benzonidazol, que foi comparável àquela das epimastigotas WT e expressoras de GFP. O tratamento causou a parada do crescimento das culturas, que foi acompanhada por morte celular na maior dose testada nesse trabalho (240 μ M). Ao contrário do que acontece no estresse por radiação gama, a exposição à droga causou grandes alterações na morfologia dos parasitos, que assumiram um formato circular acompanhado de uma grande redução do comprimento das epimastigotas. Estas alterações sugerem o comprometimento da integridade do citoesqueleto e da membrana citoplasmática, o que é compatível com o dano a proteínas e fosfolipídeos promovido pelos compostos reativos derivados da ativação do benzonidazol (DE TORANZO *et al.*, 1988). Análises da morfologia das células tratadas por microscopia eletrônica mostram ainda que o benzonidazol promove a descompactação da heterocromatina nuclear, inchaço da mitocôndria e o aparecimento de estruturas citoplasmáticas grânulares sem membrana, que os autores denominaram de vesículas eletro-densas de função desconhecida. Na maior dose de benzonidazol utilizada (240 μ M), também ocorre a ruptura da membrana nuclear e o aumento no inchaço mitocondrial (RAJÃO *et al.*, 2014). Todos esses

danos à estrutura celular potencialmente contribuíram para a grande mortalidade de parasitos observada na dose de 240 μ M de benzonidazol.

A localização celular de rTcbRBP42, difusamente distribuída por todo o citoplasma dos parasitos em condições normais, também foi modificada pelo tratamento com o benzonidazol, que induziu o seu acúmulo em estruturas citoplasmáticas granulares. Essa localização foi compatível com o aparecimento das vesículas eletro-densas detectadas anteriormente no citoplasma de parasitos tratados (RAJÃO *et al.*, 2014). Porém, essa localização granular de rTcbRBP42 foi pouco evidente no tempo de 48 h. Além disso, o tratamento adicional com puromicina não modificou o recrutamento de rTcbRBP42 para focos citoplasmáticos. Assim como observado no estresse por radiação gama, GFP não assumiu uma distribuição granular, mostrando que esse comportamento não resulta do sistema de expressão utilizado. Como a droga permaneceu em contato com os parasitos continuamente durante os experimentos, a grande redução no número de focos citoplasmáticos de rTcbRBP42 detectadas nos parasitos após 48 h pode resultar do comprometimento estrutural das células promovido pelo benzonidazol. Alternativamente, os focos citoplasmáticos de rTcbRBP42 podem apresentar maior dinâmica e serem desmontados mais rapidamente do que o tempo analisado. Em um grande número de parasitos, essas estruturas granulares estavam localizadas nas proximidades do núcleo dos parasitos. Nos tripanosomatídeos, foram descritos anteriormente grânulos localizados na periferia nuclear que se formam em resposta a estímulos capazes de inibir a maturação dos mRNAs pelo processo de *trans-splicing*. Dessa forma são gerados transcritos contendo mais de uma fase aberta de leitura, cujo transporte ao citoplasma é potencialmente prejudicial aos parasitos em virtude da presença de elementos regulatórios mistos. Nesse sentido, esses grânulos, que necessitam de transcrição ativa para serem formados, foram considerados locais de armazenamento de transcritos recém-sintetizados parcialmente processados (KRAMER *et al.*, 2012). O choque térmico também é capaz de inibir o *trans-splicing* no *T. brucei* (MUHICHT; BOOTHROYD, 1988). Nesse contexto, foi detectada a formação de focos de RBP42 na periferia nuclear de parasitos da espécie *L. brazilienses* submetidos ao choque térmico (NOCUA *et al.*, 2017). Entretanto, mais estudos são necessários para elucidar se esses focos de LbRBP42 correspondem de fato a grânulos da periferia nuclear. Também foram observados focos de rTcbRBP42 mais distantes da periferia nuclear, que assim como no estresse nutricional poderiam desempenhar uma função protetora dos transcritos importantes para a recuperação do parasito após o término do estresse celular (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007). A coexistência de populações de grânulos com características

distintas já foi reportada no *T. brucei*. Nesse organismo a proteína SCD6 pode estar presente em grânulos localizados na periferia nuclear ou mais distantes no citoplasma do parasito. Esses grânulos diferem entre outras características em componentes proteicos e na sensibilidade ao bloqueio da transcrição (KRÜGER; HOFWEBER; KRAMER, 2013).

A avaliação da resposta transcricional induzida após indução do estresse por benzonidazol mostrou que a distribuição dos RNAs recém-sintetizados diverge drasticamente daquela observada no estresse por radiação ionizante. Em todas as linhagens de epimastigotas analisadas, os RNAs sintetizados após a indução do estresse por benzonidazol assumiram uma distribuição citoplasmática granular. Essa distribuição se manteve nos tempos de 24 e 48 h após o início do tratamento com a droga e não foi modificada pela puomicina. De forma semelhante ao observado para muitos dos focos de rTcbRBP42, os focos de RNA recém-sintetizado estavam localizados nas proximidades do núcleo em um grande número de parasitos. Isso indica a possibilidade destes serem formados a partir da inibição da maturação dos mRNAs por *trans-splicing*. Nesse sentido, esses grânulos possivelmente imobilizariam os mRNAs defeituosos e evitariam os possíveis impactos negativos da tradução desses na sobrevivência dos parasitos (KRAMER *et al.*, 2012). De forma coerente com a visualização desses focos de RNA recém-sintetizado, as vesículas eletro-densas reportadas anteriormente em parasitos tratados com 120 μ M de benzonidazol também foram detectadas na periferia nuclear de parasitos (RAJÃO *et al.*, 2014). No presente trabalho não foi possível colocalizar os focos de RNAs-recém sintetizados com aqueles de rTcbRBP42, sugerindo que esses RNAs recém-sintetizados após a indução do estresse são provavelmente uma população composta por moléculas com as quais rTcbRBP42 não interage. Experimentos de imunoprecipitação serão necessários para elucidar quais são os alvos de TcbRBP42 no estresse induzido pelo benzonidazol.

Diversas condições de estresse estão naturalmente presentes no ciclo de vida do *T. cruzi* que encontra condições extracelulares distintas ao alternar entre seus diferentes hospedeiros (KRAMER, 2012). Coerentemente, esse parasito é reportadamente capaz de sobreviver a diferentes tipos de estresse celular induzidos em condições como as de baixo pH, alta temperatura e deprivação nutricional, além da exposição à radiação gama e ao benzonidazol (PÉREZ-MORALES *et al.*, 2017; RAJÃO *et al.*, 2014; REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Os resultados aqui obtidos demonstram que a resposta ao estresse desenvolvida pelo parasito é complexa e portadora de inúmeros componentes que provavelmente atuam conjuntamente para promover a sobrevivência dos parasitos. Nesse sentido, os principais efeitos dos tipos de estresse aqui investigados foram o recrutamento de rTcbRBP42 para focos citoplasmáticos e a

distribuição diferencial dos RNAs recém-sintetizados. Embora, a agregação de rTcBRBP42 em focos citoplasmáticos tenha sido observada em ambos os contextos de estresse analisados é provável que esses focos desempenhem funções diferentes em cada tipo de estresse. Isso concorda com o fato de que nos tripanosomatídeos os grânulos que se formam em resposta a diferentes tipos de estresse celular possuem composições diversas (KRAMER, 2014), mostrando que o tipo de resposta desenvolvida pelo parasito é dependente da natureza do estresse aplicado. As duas distribuições encontradas para os RNAs recém-sintetizados mostra que cada estresse afeta diferentemente os RNAs. Na irradiação esses provavelmente são utilizados no reparo do genoma fragmentado, enquanto que no tratamento com benzonidazol estes são provavelmente defeituosos e por isso imobilizados em focos. O estudo dos RNAs alvos de TcbRBP42 nas condições normais e de estresse contribuirão para o melhor entendimento de seu envolvimento na resposta ao estresse.

Trabalhos anteriores envolvendo os agentes indutores de estresse utilizados nesse trabalho concentraram seus esforços no entendimento da participação de proteínas envolvidas na resposta ao dano de DNA na resposta ao estresse (RAJÃO *et al.*, 2014; REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Nesse sentido, o estudo de TcbRBP42 no contexto dos estresses por radiação gama e benzonidazol é inédito na literatura. Além disso, esse trabalho propôs a caracterização da proteína RBP42 no organismo cujo genoma é utilizado como aquele de referência para o *T. cruzi*. Uma contribuição importante desse trabalho foi demonstrar a capacidade de agregação de TcbRBP42 em estruturas granulares em diferentes condições de estresse. As análises estruturais *in silico* demonstram que TcbRBP42 possui de fato as características necessárias para a formação de grânulos. Sua semelhança com G3BP1, um fator essencial para a formação de grânulos de estresse (KEDERSHA *et al.*, 2016), sugere a possibilidade desta ser um fator importante para a formação de grânulos nesse parasito. Nesse sentido, RBP42 além de ser uma proteína essencial para a viabilidade celular (DAS *et al.*, 2012), pode desempenhar um papel importante na resposta ao estresse do parasito através da mediação da formação de grânulos, que parecem ser elementos cruciais para os tripanosomatídeos, nos quais existe um grande repertório dessas estruturas (KRAMER, 2014).

7. CONCLUSÕES

Nesse trabalho foi realizada a caracterização da proteína RBP42 do parasito *T. cruzi* CL Brener. Além de estudar as características dos genes e da proteína TcbRBP42, também investigamos o comportamento dessa proteína nas condições de estresse induzidas pelos tratamentos com radiação gama e benzonidazol. No *T. cruzi*, o estudo de uma RBP no contexto do estresse genotóxico não tem precedentes na literatura. Tendo-se em vista os dados obtidos nesse trabalho, os nossos principais achados foram:

- i. O parasito *T. cruzi* CL Brener possui dois genes codificadores para a proteína RBP42 em seu genoma. Esses genes são os mais expressos em seus contextos genômicos tanto em condições normais quanto após exposição à radiação gama.
- ii. As proteínas TcbRBP42 possuem dois domínios estruturados, NTF2-like e RRM, ligados entre si por uma longa região desordenada enriquecida em sequências de baixa complexidade. Essa organização estrutural é compartilhada com as proteínas RBP42 estudadas em outros tripanosomatídeos, que apresentam maior semelhança entre si nas regiões dos domínios. O mesmo é observado em proteínas RBP42 de outros cinetoplastídeos.
- iii. A modelagem comparativa dos domínios de TcbRBP42 mostrou que esses adotam as topologias típicas para esses domínios. Porém, algumas regiões em *loop* são mais longas no domínio NTF2-like da proteína do *T. cruzi* em comparação com as estruturas utilizadas como molde na modelagem.
- iv. A expressão de uma versão recombinante de TcbRBP42 (estratégia para detecção) não alterou o padrão de crescimento das epimastigotas mantidas em condições normais de cultivo ou submetidas aos tratamentos genotóxicos, que causaram a parada no crescimento dos parasitos. A maior dose de benzonidazol testada também causou a morte de parasitos.
- v. A exposição à radiação gama não alterou visivelmente a morfologia típica dos parasitos. Entretanto, o tratamento com o benzonidazol causou o aparecimento de uma morfologia circular acompanhada de uma grande redução no comprimento celular.
- vi. A proteína rTcbRBP42 apresenta localização diferencial na condição de estresse. Essa proteína alterna de uma distribuição difusa por todo o citoplasma dos parasitos na condição normal para uma distribuição em focos citoplasmáticos nas condições de estresse induzidos por radiação gama e benzonidazol. Provavelmente, os focos de rTcbRBP42 formados em ambas as

condições testadas divergem em composição e em função nas respostas ao estresse desenvolvidas pelo *T. cruzi*.

- vii. Os RNAs recém-sintetizados nos parasitos também apresentam distribuição diferencial no estresse. Após exposição à radiação gama, os RNAs são sintetizados apenas nas primeiras 24 h após a indução do estresse e se distribuem por todo o citoplasma dos parasitos, o que não resultada do rompimento da carioteca. É possível que esses RNAs desempenhem alguma função na reconstituição do genoma fragmentado pela radiação. Em contraste, os RNAs sintetizados após o início do tratamento com benzonidazol se concentram em focos citoplasmáticos localizados nas proximidades do núcleo dos parasitos. Esses RNAs são provavelmente defeituosos devido a inibição do *trans-splicing*. Nesse trabalho não foi possível colocalizar os focos de TcbRBP42 com os focos formados pelos RNAs recém-sintetizados, o que sugere que esses RNAs correspondem a um grupo de moléculas com as quais TcbRBP42 não interage.
- viii. A distribuição diferencial de rTcbRBP42 e dos RNAs recém-sintetizados em ambas as condições de estresse analisadas sugerem que o *T. cruzi* responde diferencialmente aos estresses causados pela radiação gama e pelo benzonidazol. O estudo dos transcritos alvos de TcbRBP42 nas condições normais e de estresse genotóxico contribuirão para o melhor entendimento do possível envolvimento de TcbRBP42 nos mecanismos de recuperação pós-estresse do *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

ADZHUBEI, A. A.; STERNBERG, M. J.; MAKAROV, A. A. Polyproline-II helix in proteins: structure and function. **Journal of Molecular Biology**, v. 425, n. 12, p. 2100-2132, June 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.03.018>.

AIBARA, S. *et al.* Domain organization within the nuclear export factor Mex67:Mtr2 generates an extended mRNA binding surface. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 3, p. 1927-1936, Feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv030>.

ALVES, L. R.; GOLDENBERG, S. RNA-binding proteins related to stress response and differentiation in protozoa. **World Journal of Biological Chemistry**, v. 7, n. 1, p. 78-87, Feb. 2016. DOI: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.78>.

ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010. Disponível em: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>. Acesso em: 2 nov. 2018.

ASLETT, M. *et al.* TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, Suppl_1, v. 38, p. D457-D462, Jan. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>.

BADAWI, A. *et al.* Silencing of the mRNA-binding protein HuR increases the sensitivity of colorectal cancer cells to ionizing radiation through upregulation of caspase-2. **Cancer Letters**, v. 393, p. 103-112, May 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.02.010>.

BALAGOPAL, V.; PARKER, R. Polysomes, P bodies and stress granules: states and fates of eukaryotic mRNAs. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 21, n. 3, p. 403-408, June 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2009.03.005>.

BARISÓN, M. J. *et al.* Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8964-8977, May 2017. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778522>.

BARTHOLOMEU, D. C. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: RNA structure and post-transcriptional control of tubulin gene expression. **Experimental Parasitology**, v. 102, n. 3-4, p. 123-133, Nov. 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00034-1).

BENSAUDE, O. Inhibiting eukaryotic transcription. Which compound to choose? How to evaluate its activity? **Transcription**, v. 2, n. 3, p. 103-108, May/June 2011. DOI: <https://doi.org/10.4161/trns.2.3.16172>.

BERN, C. Chagas' Disease. **The New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 5, p. 456-466, July 2015. DOI: <https://doi.org/10.1056/NEJMra1410150>.

BERTHIER, D. *et al.* Tolerance to trypanosomatids: a threat, or a key for disease elimination? **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 2, p. 157-168, Nov. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2015.11.001>.

BITAR, M. *et al.* The spliced leader trans-splicing mechanism in different organisms: molecular details and possible biological roles. **Frontiers in Genetics**, v. 4, Article 199, Oct. 2013. DOI: <https://doi.org/10.3389/fgene.2013.00199>.

BJÖRKLUND, Å. K.; EKMAN, D.; ELOFSSON, A. Expansion of protein domain repeats. **PLoS Computational Biology**, v. 2, n. 8, p. 0959-0970, Article e114, Aug. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0020114>.

BUCHAN, J. R.; PARKER, R. Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. **Molecular Cell**, v. 36, n. 6, p. 932-941, Dec. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2009.11.020>.

BURKARD, G. S.; JUTZI, P.; RODITI, I. Genome-wide RNAi screens in bloodstream form trypanosomes identify drug transporters. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 175, n. 1, p. 91-94, Jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.09.002>.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, n. 3, p. 93-100, May/June 1964.

CAMPBELL, D. A.; THOMAS, S.; STURM, N. R. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? **Microbes and Infection**, v. 5, n. 13, p. 1231-1240, Nov. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2003.09.005>.

CAMPOS, M. C. *et al.* Genome-wide mutagenesis and multi-drug resistance in American trypanosomes induced by the front-line drug benznidazole. **Scientific Reports**, v. 7, Article 14407, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14986-6>.

CAO, Y. *et al.* Phylogenetic relationships among eutherian orders estimated from inferred sequences of mitochondrial proteins: Instability of a tree based on a single gene. **Journal of Molecular Evolution**, v. 39, p. 519-527, Nov. 1994. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF00173421>.

CASSOLA, A.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Recruitment of mRNAs to cytoplasmic ribonucleoprotein granules in trypanosomes. **Molecular Microbiology**, v. 65, n. 3, p. 655-670, Aug. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05833.x>.

CASTELLO, A. *et al.* Insights into RNA Biology from an atlas of mammalian mRNA-binding proteins. **Cell**, v. 149, n. 6, p. 1393-1406, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.04.031>.

CHOU, C. C.; WANG, A. H. J. Structural D/E-rich repeats play multiple roles especially in gene regulation through DNA/RNA mimicry. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 8, p. 2105-2384, Aug. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1039/c5mb00206k>.

CLAYTON, C. The regulation of trypanosome gene expression by RNA-binding proteins. **PLoS Pathogens**, v. 9, n. 11, Article e1003680, Nov. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003680>.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 8, p. 1881-1888, Apr. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1093/emboj/21.8.1881>.

CLÉRY, A.; BLATTER, M.; ALLAIN, F. H. T. RNA recognition motifs: boring? Not quite. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 18, n. 3, p. 290-298, June 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2008.04.002>.

CROOKS, G. *et al.* WebLogo: a sequence logo generator. **Genome Research**, v. 14, n. 6, p. 1188-1190, June 2004. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.849004>.

D'ALESSANDRO, G.; DI FAGAGNA, F. D. A. Transcription and DNA damage: Holding hands or crossing swords? **Journal of Molecular Biology**, v. 429, n. 21, p. 3215-3229, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.11.002>.

D'ORSO, I.; FRASCH, A. C. C. TcUBP-1, a developmentally regulated U-rich RNA-binding protein involved in selective mRNA destabilization in trypanosomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 37, p. 34801-34809, Sep. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.M102120200>.

DAROCHA, W. D. *et al.* Expression of exogenous genes in *Trypanosoma cruzi*: improving vectors and electroporation protocols. **Parasitology Research**, v. 92, n. 2, p. 113-120, Jan. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1004-5>.

DARRIBA, D. *et al.* ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. **Bioinformatics**, v. 27, n. 8, p. 1164-1165, Apr. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088>.

DAS, A. *et al.* Biochemical characterization of *Trypanosoma brucei* RNA polymerase II. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 201-210, Dec. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.08.002>.

DAS, A. *et al.* The essential polysome-associated RNA-binding protein RBP42 targets mRNAs involved in *Trypanosoma brucei* energy metabolism. **RNA**, v. 18, n. 11, p. 1968-1983, Nov. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.033829.112>.

DE TORANZO, E. G. D. *et al.* Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 44, n. 10, p. 880-881, Oct. 1988. DOI: <https://doi.org/10.1007/BF01941187>.

DIAS, J. C. P. Evolution of Chagas disease screening programs and control programs historical perspective. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 193-202, Sep. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.gheart.2015.06.003>.

DOBIN, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15-21, Jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.

DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251-261, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrmicro1097>.

EBERHARDT, R. Y. *et al.* Filling out the structural map of the NTF2-like superfamily. **BMC Bioinformatics**, v. 14, Article 327, Nov. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-327>.

EISENBERG, D.; LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Methods in Enzymology**, v. 277, p. 396-404, 1997. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(97\)77022-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(97)77022-8).

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409-415, July 2005. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1112631>.

ERBEN, E. D. *et al.* A genome-wide tethering screen reveals novel potential post-transcriptional regulators in *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 6, Article e1004178, June 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004178>.

FAUX, N. G. *et al.* Functional insights from the distribution and role of homopeptide repeat-containing proteins. **Genome Research**, v. 15, n. 4, p. 537-551, Apr. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.3096505>.

FERNÁNDEZ-MOYA, S. M. *et al.* Alterations in DRBD3 ribonucleoprotein complexes in response to stress in *Trypanosoma brucei*. **PLoS One**, v. 7, n. 11, Article e48870, Nov. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048870>.

FERNÁNDEZ-MOYA, S. M.; ESTÉVEZ, A. M. Posttranscriptional control and the role of RNA-binding proteins in gene regulation in trypanosomatid protozoan parasites. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 1, n. 1, p. 34-46, July/Aug. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1002/wrna.6>.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755-759, Sep./Oct. 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(87\)90020-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(87)90020-4).

FLORENTINO, P. T. *et al.* An historical perspective on how advances in microscopic imaging contributed to understanding the *Leishmania spp.* and *Trypanosoma cruzi* host-parasite relationship. **Biomed Research International** v. 2014, Article 565291, Apr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1155/2014/565291>.

GARCIA-SILVA, M. R. *et al.* A population of tRNA-derived small RNAs is actively produced in *Trypanosoma cruzi* and recruited to specific cytoplasmic granules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 171, n. 2, p. 64-73, June 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2010.02.003>.

GEHRING, N. H.; WAHLE, E.; FISCHER, U. Deciphering the mRNP Code: RNA-bound determinants of post-transcriptional gene regulation. **Trends in Biochemical Science**, v. 42, n. 5, p. 369-382, May 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.004>.

GRYNBERG, P. *et al.* *Trypanosoma cruzi* gene expression in response to gamma radiation. **PLoS One**, v. 7, n. 1, Article e29596, Jan. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029596>.

HAHNE, F.; IVANEK, R. Visualizing genomic data using Gviz and Bioconductor. *In*: MATHÉ, E.; DAVIS, S. (Eds.). **Statistical Genomics**. New York: Humana Press, 2016. v. 1418, p. 335-351. (Methods in Molecular Biology). DOI: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3578-9_16.

HILTON, N. A. *et al.* Identification of TOEFAZ1-interacting proteins reveals key regulators of *Trypanosoma brucei* cytokinesis. **Molecular Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 306-326, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.13986>.

HOLETZ, F. B. *et al.* Evidence of P-body-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 356, n. 4, p. 1062-1067, May 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.03.104>.

IRVINE, K. *et al.* Rasputin, more promiscuous than ever: a review of G3BP. **The International Journal of Developmental Biology**, v. 48, n. 10, p. 1065-1077, Dec. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1387/ijdb.041893ki>.

IVANOV, P.; KEDERSHA, N.; ANDERSON, P. Stress granules and processing bodies in translational control. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 11, n. 5, Article a032813, May 2018. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a032813>.

JÄRVELIN, A. I. *et al.* The new (dis)order in RNA regulation. **Cell Communication and Signaling**, v. 14, Article 9, Apr. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12964-016-0132-3>.

JONES, D. T.; TAYLOR, W. R.; THORNTON, J. M. The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. **Bioinformatics**, v. 8, n. 3, p. 275-282, June 1992. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/8.3.275>

JONES, P. *et al.* InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236-1240, May 2014. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu031>.

KATAHIRA, J. *et al.* NTF2-like domain of Tap plays a critical role in cargo mRNA recognition and export. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 3, p. 1894-1904, Feb. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv039>.

KATO, K.; STANDLEY, D. M. MAFFT Multiple Sequence Alignment Software version 7: improvements in performance and usability. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 4, p. 772-780, April 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.

KEDERSHA, N. *et al.* Dynamic shuttling of TIA-1 accompanies the recruitment of mRNA to mammalian stress granules. **The Journal of Cell Biology**, v. 151, n. 6, p. 1257-1268, Dec. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.151.6.1257>.

KEDERSHA, N. *et al.* G3BP–Caprin1–USP10 complexes mediate stress granule condensation and associate with 40S subunits. **The Journal of Cell Biology**, v. 212, n. 7, p. 845-860, Article e201508028, Mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201508028>.

KEDERSHA, N. *et al.* Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. **The Journal of Cell Biology**, v. 169, n. 6, p. 871-884, June 2005. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200502088>.

KEENE, J. D. RNA regulons: coordination of post-transcriptional events. **Nature Reviews Genetics**, v. 8, n. 7, p. 533-543, July 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrg2111>.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature Protocols**, v. 10, n. 6, p. 845-858, May 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.053>.

KELLEY, L. A.; SUTCLIFFE, M. J. OLDERADO: on-line database of ensemble representatives and domains. **Protein Science**, v. 6, n. 12, p. 2628-2630, Dec. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.5560061215>.

KRAMER, S. Developmental regulation of gene expression in the absence of transcriptional control: the case of kinetoplastids. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 181, n. 2, p. 61-72, Feb. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.10.002>.

KRAMER, S. RNA in development: how ribonucleoprotein granules regulate the life cycles of pathogenic protozoa. **Wiley Interdisciplinary Reviews RNA** v. 5, n. 2, p. 263-284, Mar./Apr. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/wrna.1207>.

KRAMER, S.; CARRINGTON, M. Trans-acting proteins regulating mRNA maturation, stability and translation in trypanosomatids. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 1, p. 23-30, Jan. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.06.011>.

KRAMER, S. *et al.* Inhibition of mRNA maturation in trypanosomes causes the formation of novel foci at the nuclear periphery containing cytoplasmic regulators of mRNA fate. **Journal of Cell Science**, v. 125, n. 12, p. 2896-2909, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.099275>.

KRAMER, S. *et al.* Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2 phosphorylation at Thr169. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. 18, p. 3002-3014, Sep. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1242/jcs.031823>.

KRISKO, A.; RADMAN, M. Biology of extreme radiation resistance: the way of *Deinococcus radiodurans*. **Cold Spring Harb Perspectives in Biology**, v. 5, n. 7, Article a012765, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012765>.

KRÜGER, T.; HOFWEBER, M.; KRAMER, S. SCD6 induces ribonucleoprotein granule formation in trypanosomes in a translation-independent manner, regulated by its Lsm and RGG domains. **Molecular Biology of the Cell**, v. 24, n. 13, p. 2098-2111, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-01-0068>.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Aug. 1970. DOI: <https://doi.org/10.1038/227680a0>.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PDBsum: structural summaries of PDB entries. **Protein Science**, v. 27, n. 1, p. 129-134, Jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1002/pro.3289>.

LASKOWSKI, R. A. *et al.* PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283-291, Apr. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1107/S0021889892009944>.

LETUNIC, I.; BORK, P. Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W242-W245, July 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw290>.

LIMA, L. *et al.* Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). **Acta Tropica**, v. 151, p. 166-177, Nov. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>.

LIU, W. *et al.* IBS: an illustrator for the presentation and visualization of biological sequences. **Bioinformatics**, v. 31, n. 20, p. 3359-3361, Oct. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv362>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-408, Dec. 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

LU, H. Y.; BUCK, G. A. Expression of an exogenous gene in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 109-114, Jan. 1991. DOI: [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(91\)90226-V](https://doi.org/10.1016/0166-6851(91)90226-V).

LUEONG, S. *et al.* Gene expression regulatory networks in *Trypanosoma brucei*: insights into the role of the mRNA-binding proteome. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 3, p. 457-471, May 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/mmi.13328>.

LUKEŠ, J. *et al.* Evolution of parasitism in kinetoplastid flagellates. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 195, n. 2, p. 115-122, July 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2014.05.007>

LUNDE, B. M.; MOORE, C.; VARANI, G. RNA-binding proteins: modular design for efficient function. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 8, n. 6, p. 479-490, June 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm2178>.

MARCHINI, F. K. *et al.* Profiling the *Trypanosoma cruzi* phosphoproteome. **PLoS One**, v. 6, n. 9, Article e25381, Sep. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025381>.

MARIS, C.; DOMINGUEZ, C.; ALLAIN, F. H. T. The RNA recognition motif, a plastic RNA-binding platform to regulate post-transcriptional gene expression. **FEBS Journal**, v. 272, n. 9, p. 2118-2131, May 2005. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04653.x>.

MARTINEZ-CALVILLO, S. *et al.* Epigenetic regulation of transcription in trypanosomatid protozoa. **Current Genomics**, v. 19, n. 2, p. 140-149, Feb. 2018. DOI: <https://doi.org/10.2174/1389202918666170911163517>.

MARTÍNEZ-CALVILLO, S. *et al.* Gene expression in trypanosomatid parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2010, Article 525241, Feb. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/525241>.

MATSUKI, H. *et al.* Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. **Genes to Cells**, v. 18, n. 2, p. 135-146, Feb. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1111/gtc.12023>.

MCWILLIAM, H. *et al.* Analysis tool web services from the EMBL-EBI. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W597-W600, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt376>.

MEJIA, A. M. *et al.* Benzimidazole-resistance in *Trypanosoma cruzi* is a readily acquired trait that can arise independently in a single population. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 206, n. 2, p. 220-228, July 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/infdis/jis331>.

MENNA-BARRETO, R. F. S. *et al.* Effect of a β -lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 56, n. 6, p. 1034-1041, Dec. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1093/jac/dki403>.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *In*: 2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010, New Orleans. Piscataway: IEEE, p. 1-8. DOI: <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>.

MOLLIEX, A. *et al.* Phase separation by low complexity domains promotes stress granule assembly and drives pathological fibrillization. **Cell**, v. 163, n. 1, p. 123-133, Sep. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.015>.

MUHICH, M. L.; BOOTHROYD, J. C. Polycistronic transcripts in trypanosomes and their accumulation during heat shock: evidence for a precursor role in mRNA synthesis. **Molecular and Cellular Biology**, v. 8, n. 9, p. 3837-3846, Sep. 1988. DOI: <https://doi.org/10.1128/MCB.8.9.3837>.

NAJAFABADI, H. S. *et al.* Global identification of conserved post-transcriptional regulatory programs in trypanosomatids. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 18, p. 8591-8600, Oct. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt647>.

NARDELLI, S. C. *et al.* Distinct acetylation of *Trypanosoma cruzi* histone H4 during cell cycle, parasite differentiation, and after DNA damage. **Chromosoma**, v. 118, n. 4, p. 487-499, Aug. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00412-009-0213-9>.

NILSSON, D. *et al.* Spliced Leader trapping reveals widespread alternative splicing patterns in the highly dynamic transcriptome of *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathogens**, v. 6, n. 8, Article e1001037, Aug. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001037>.

NOCUA, P. A. *et al.* *Leishmania braziliensis* SCD6 and RBP42 proteins, two factors with RNA binding capacity. **Parasites and Vectors**, v. 10, Article 610, Dec. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2557-y>.

NOÉ, G.; DE GAUDENZI, J. G.; FRASCH, A. C. Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. **BMC Molecular Biology**, v. 9, Article 107, Dec. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-107>.

NOIREAU, F.; DIOSQUE, P.; JANSEN, A. M. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. **Veterinary Research**, v. 40, n. 2, Article 26, Mar./Apr. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres/2009009>.

PAIVA, R. M. C. d. *et al.* Amastin knockdown in *Leishmania braziliensis* affects parasite-macrophage interaction and results in impaired viability of intracellular amastigotes. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 12, Article e1005296, Dec. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005296>.

PAPALEO, E. *et al.* The role of protein loops and linkers in conformational dynamics and allostery. **Chemical Reviews**, v. 116, n. 11, p. 6391-6423, June 2016. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.5b00623>.

PARKER, R.; SHETH, U. P Bodies and the control of mRNA translation and degradation. **Molecular Cell**, v. 25, n. 5, p. 635-646, Mar. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.02.011>.

PEDROSA, R. C. *et al.* Time-dependent oxidative stress caused by benzimidazole. **Redox Report**, v. 6, n. 4, p. 265-270, July 2001. DOI: <https://doi.org/10.1179/135100001101536328>.

PEI, J.; KIM, B.-H.; GRISHIN, N. V. PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 7, p. 2295-2300, Apr. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkn072>.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82-94, Jan. 2018. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).

PÉREZ-MORALES, D. *et al.* Ultrastructural and physiological changes induced by different stress conditions on the human parasite *Trypanosoma cruzi*. **Cell Stress and Chaperones**, v. 22, n. 1, p. 15-27, Jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12192-016-0736-y>.

PETTERSEN, E. F. *et al.* UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605-1612, Oct. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1002/jcc.20084>.

PFEIFFER, P.; GOEDECKE, W.; OBE, G. Mechanisms of DNA double-strand break repair and their potential to induce chromosomal aberrations. **Mutagenesis**, v. 15, n. 4, p. 289-302, July 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/mutage/15.4.289>.

PRIGENT, M. *et al.* I κ B α and I κ B α /NF- κ B complexes are retained in the cytoplasm through interaction with a novel partner, RasGAP SH3-binding protein 2. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 46, p. 36441-36449, Nov. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.m004751200>.

RAJÃO, M. A. *et al.* Unveiling Benznidazole's mechanism of action through overexpression of DNA repair proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 55, n. 4, p. 309-321, May 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/em.21839>.

RAMÍREZ, C. A. *et al.* Identification of proteins interacting with HSP70 mRNAs in *Leishmania braziliensis*. **Journal of Proteomics**, v. 94, p. 124-137, Dec. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2013.09.008>.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr. 2010. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60061-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60061-X).

READ, L. K.; LUKEŠ, J.; HASHIMI, H. Trypanosome RNA editing: the complexity of getting U in and taking U out. **Wiley Interdisciplinary Reviews. RNA**, v. 7, n. 1, p. 33-51, Jan./Feb. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1002/wrna.1313>.

REGIS-DA-SILVA, C. G. *et al.* Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Rad51 gene and its role in recombination events associated with the parasite resistance to ionizing radiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 2, p. 191-200, Oct. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.012>.

ROMANIUK, M. A.; FRASCH, A. C.; CASSOLA, A. Translational repression by an RNA-binding protein promotes differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 14, n. 6, Article e1007059, June 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007059>.

RONQUIST, F. *et al.* MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology**, v. 61, n. 3, p. 539-542, May 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.

ŠALI, A.; BLUNDELL, T. L. Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints. **Journal of Molecular Biology**, v. 234, n. 3, p. 779-815, Dec. 1993. DOI: <https://doi.org/10.1006/jmbi.1993.1626>.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec. 1977. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKEŠ, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168-174, Apr. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.02.006>.

SINGH, G. *et al.* The clothes make the mRNA: past and present trends in mRNP fashion. **Annual Review of Biochemistry**, v. 84, p. 325-354, June 2015. DOI: <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-080111-092106>.

SMIRCICH, P. *et al.* Ribosome profiling reveals translation control as a key mechanism generating differential gene expression in *Trypanosoma cruzi*. **BMC genomics**, v. 16, Article 443, June 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1563-8>.

STANAWAY, J. D.; ROTH, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. **Global Heart**, v. 10, n. 3, p. 139-144, Sep. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ghart.2015.06.001>.

STANDART, N.; WEIL, D. P-Bodies: cytosolic droplets for coordinated mRNA storage. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 8, p. 612-626, Aug. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.005>.

TAKEDA, G. K. *et al.* Ação de raios gama sobre formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi*. Estudo experimental em camundongos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28, n. 1, p. 15-18, 1986. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651986000100004>.

TEIXEIRA, S. M.; EL-SAYED, N. M.; ARAÚJO, P. R. The genome and its implications. In: WEISS, L. M.; TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V. (Eds.). **Advances in Parasitology**. Burlington: Elsevier, 2011. v. 75, cap. 10, p. 209-230. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-385863-4.00010-1>.

TEIXEIRA, S. M.; KIRCHHOFF, L. V.; DONELSON, J. E. Post-transcriptional elements regulating expression of mRNAs from the Amastin/Tuzin gene cluster of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 270, n. 38, p. 22586-22594, Sep. 1995. DOI: <https://doi.org/10.1074/jbc.270.38.22586>.

TEIXEIRA, S. M. *et al.* Trypanosomatid comparative genomics: contributions to the study of parasite biology and different parasitic diseases. **Genetics and Molecular Biology**, v. 35, n. 1, p. 1-17, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000008>

THORVALDSDÓTTIR, H.; ROBINSON, J. T.; MESIROV, J. P. Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. **Briefings in Bioinformatics**, v. 14, n. 2, p. 178-192, Mar. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/bib/bbs017>.

TOURRIÈRE, H. *et al.* The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. **Journal of Cell Biology**, v. 160, n. 6, p. 823-831, Mar. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.200212128>.

TROCHINE, A. *et al.* Benznidazole biotransformation and multiple targets in *Trypanosoma cruzi* revealed by metabolomics. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, Article e2844, May 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002844>.

URBANIÁK, 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**, v. 12, n. 5, p. 2233-2244, May 2013. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr400086y>.

UVERSKY, V. N. Intrinsically disordered proteins in overcrowded milieu: Membrane-less organelles, phase separation, and intrinsic disorder. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 44, p. 18-30, June 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2016.10.015>.

UVERSKY, V. N.; DUNKER, A. K. Understanding protein non-folding. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1804, n. 6, p. 1231-1264, June 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.01.017>.

VAN DER LEE, R. *et al.* Classification of intrinsically disordered regions and proteins. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 13, p. 6589-6631, July 2014. DOI: <https://doi.org/10.1021/cr400525m>.

VAZQUEZ, M. P.; LEVIN, M. J. Functional analysis of the intergenic regions of TcP2 β gene loci allowed the construction of an improved *Trypanosoma cruzi* expression vector. **Genes** v. 239, n. 2, p. 217-225, Nov. 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00386-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00386-8).

VEDADI, M. *et al.* Genome-scale protein expression and structural biology of *Plasmodium falciparum* and related apicomplexan organisms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 151, n. 1, p. 100-110, Jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.10.011>.

VIEIRA, H. G. S. *et al.* Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* response to ionizing radiation stress. **PLoS ONE**, v. 9, n. 5, Article e97526, May 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097526>.

VOGENSEN, T.; MØLLER, I. R.; KRISTENSEN, O. Crystal structures of the human G3BP1 NTF2-like domain visualize FxFG Nup repeat specificity. **PLoS One**, v. 8, n. 12, Article e80947, Dec. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080947>.

WANG, D. *et al.* Acetylation-regulated interaction between p53 and SET reveals a widespread regulatory mode. **Nature**, v. 538, n. 7623, p. 118-122, Oct. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature19759>.

WANG, S. *et al.* RaptorX-Property: a web server for protein structure property prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 44, n. W1, p. W430-W435, July 2016. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw306>.

WATERHOUSE, A. M. *et al.* Jalview version 2 - A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1189-1191, May 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp033>.

WEATHERLY, D. B.; BOEHLKE, C.; TARLETON, R. L. Chromosome level assembly of the hybrid *Trypanosoma cruzi* genome. **BMC genomics**, v. 10, Article 255, June 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-255>.

WEISBARTH, R. T. *et al.* The *Trypanosoma cruzi* RNA-binding protein RBP42 is expressed in the cytoplasm throughout the life cycle of the parasite. **Parasitology Research**, v. 117, n. 4, p. 1095-1104, Apr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5787-9>.

WHO - World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet.** Geneva, March 2016. Disponível em: [http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Acesso em: 2 nov. 2018.

WHO - World Health Organization. **Integrating neglected tropical diseases into global health and development. Fourth WHO report on neglected tropical diseases.** Geneva: WHO, 2017. 267 p. ISBN 978 92 4 156544 8.

WHO - World Health Organization. **Neglected tropical diseases**. Geneva, 2018. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acesso em: 2 nov. 2018.

WIEDERSTEIN, M.; SIPPL, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. W407-W410, July 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkm290>.

WILKINSON, S. R. *et al.* Trypanocidal activity of nitroaromatic prodrugs: current treatments and future perspectives. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 16, p. 2072-2084, 2011. DOI: <https://doi.org/10.2174/156802611796575894>.

YANG, Y. G.; QI, Y. RNA-directed repair of DNA double-strand breaks. **DNA Repair**, v. 32, p. 80-85, Aug. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.dnarep.2015.04.017>.

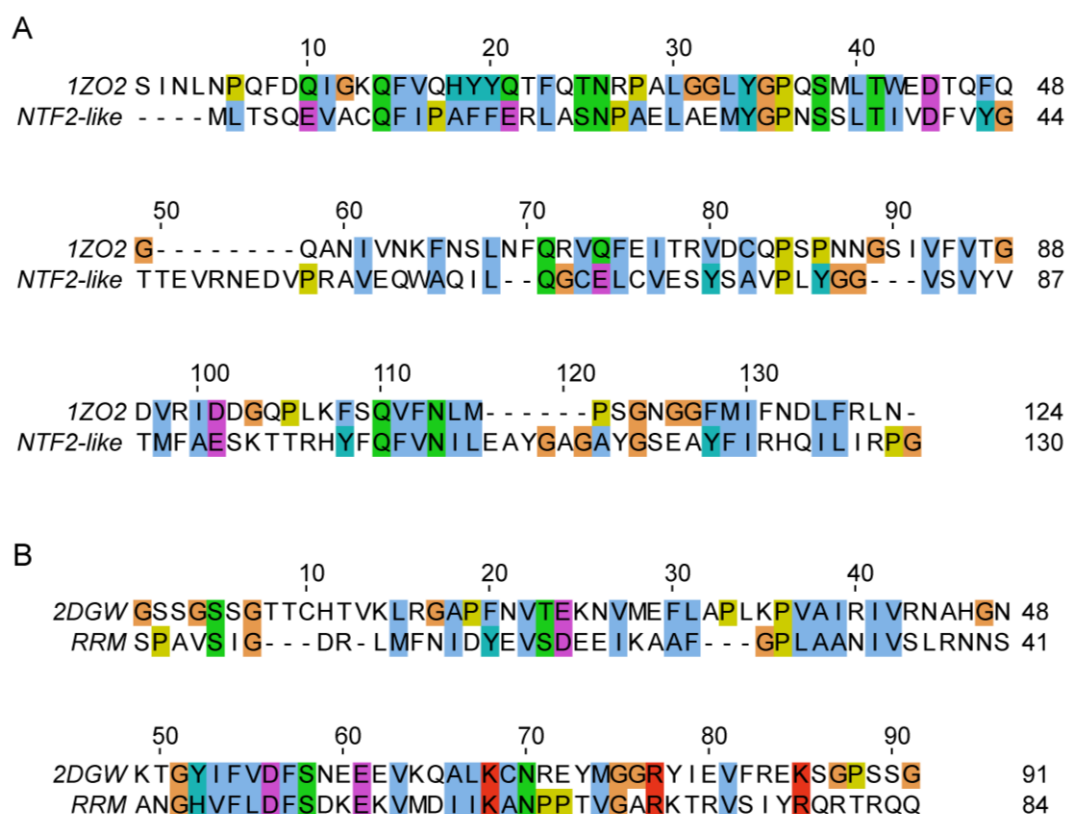
YANG, Z. Among-site rate variation and its impact on phylogenetic analyses. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 11, n. 9, p. 367-372, Sep. 1996. DOI: [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(96\)10041-0](https://doi.org/10.1016/0169-5347(96)10041-0).

ZARRINPAR, A.; BHATTACHARYYA, R. P.; LIM, W. A. The structure and function of proline recognition domains. **Science's STKE** v. 2003, n. 179, Article RE8, Apr. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1126/stke.2003.179.re8>.

ZHANG, C. H. *et al.* The roles and mechanisms of G3BP1 in tumour promotion. **Journal of Drug Targeting**, v. 27, n. 3, p. 300-305, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1080/1061186X.2018.1523415>.

ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, Nov. 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>.

APÊNDICE A – Alinhamentos para a modelagem dos domínios de TcbRBP42



Alinhamentos das sequências utilizados na produção dos modelos tridimensionais para os domínios de TcbRBP42 do haplótipo Esmeraldo-like.

As sequências de aminoácidos dos domínios NTF2-like (A) e RRM (B) de TcbRBP42 foram alinhadas contra aquelas das estruturas proteicas utilizadas como molde no processo de modelagem comparativa. Foram utilizadas como moldes as estruturas do Fator de Transporte Nuclear 2 de *Cryptosporidium parvum* (código do PDB: 1ZO2) e o segundo domínio RRM da proteína humana RBP19 (código do PDB: 2DGW) que compartilham 30 e 33% de similaridade de sequência com os domínios NTF2-like e RRM de TcbRBP42, respectivamente. Os alinhamentos foram coloridos de acordo com o esquema de cores do Clustal X disponível no software *Jalview* versão 2 (WATERHOUSE *et al.*, 2009). Cores – amarelo: prolinas; azul: aminoácidos hidrofóbicos; verde: aminoácidos polares; magenta: aminoácidos carregados negativamente; laranja: glicinas; vermelho: aminoácidos carregados positivamente; ciano: aminoácidos aromáticos; rosa: cisteínas; branco: aminoácidos não conservados.

APÊNDICE B – Alinhamento múltiplo de sequências de RBP42

| | | Domínio NTF2-like | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--|-------------------|--------------|----------|---------|----------|------------|-----------|---------|----------|---------|---------|------|-------|-------|-------|-------|-------|-----|-----|-------|-------|-------|-----|----|-----|-----|---|-----|---|---|-----|
| | | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Es</i> | | MLTSQEVACQF | IPAFFERLASNP | AELAE | MYGNSS | LTIVDFVY | CTTEVRNED | VPRAVEQ | WAQIL | LQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.N-Es</i> | | MLTSQEVACQF | IPAFFERLASNP | AELAE | MYGNSS | LTIVDFVY | CTTEVRNED | VPRAVEQ | WAQIL | LQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Y</i> | | MLTSQEVACQF | IPAFFERLASNP | AELAE | MYGNSS | LTIVDFVY | CTTEVRNED | VPRAVEQ | WAQIL | LQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Dm</i> | | MLTSQEVACQF | IPAFFERLASNP | AELAE | MYGNSS | LTIVDFVY | CTTEVRNED | VPRAVEQ | WAQIL | LQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Sy</i> | | MLTSQEVACQF | IPAFFERLASNP | AELAE | MYGNSS | LTIVDFVY | CTTEVRNED | VPRAVEQ | WAQIL | LQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.bruc</i> | | MPTPTEVAYK | FAPAFFEEL | ATAPENL | AGMYG | SESA | MLVDFEC | CTKKVYGAD | IAPALVQ | WANIIQN | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.evan</i> | | MPTPTEVAYK | FAPAFFEEL | ATAPENL | AGMYG | SESA | MLVDFEC | CTKKVYGAD | IAPALVQ | WANIIQN | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.cong</i> | | MSSTPTEVACK | FIPAFFED | LATNPENL | SKMYG | TESTVM | FVDFDC | CTKQVSGSD | ISPSLVQ | WASHILKD | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.viva</i> | | MPNPNEVACS | FIPAFFER | LASGPSEL | ASMYA | PQSS | LVVVSD | SDCCTTE | ASGADV | VPTILN | LATIFNG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.braz</i> | | MAAAQVANAF | TVDFFERV | AKNTANI | ADLYGR | HATL | TVNDFEL | GISEV | CDDYVP | I | AVQKWV | SLQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.majo</i> | | MAAAQVANAF | TVDFFERV | AKNAANI | ADLYGR | HATL | TVNDFEL | GISEV | HDSYVP | I | AVQKWV | SLQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.infa</i> | | MAAAQVANAF | TVDFFERV | AKNAANI | ADLYGR | HATL | TVNDFEL | GISEV | HDSYVP | I | AVQKWV | SLQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.dono</i> | | MAAAQVANAF | TVDFFERV | AKNAANI | ADLYGR | HATL | TVNDFEL | GISEV | HDSYVP | I | AVQKWV | SLQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.tropi</i> | | MAAAQVANAF | TVDFFERV | AKNAANI | ADLYGR | HATL | TVNDFEL | GISEV | HDSYVP | I | AVQKWV | SLQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>B.ayal</i> | | MSVYVQVANS | FVTEFFER | LAKNPADL | ADLYGR | HATL | INDFEL | CTTE | AQDSV | GKAAQ | WATIVQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C.fasc</i> | | MANAQVANAF | TVDFFERV | AKNQANL | AELYGR | SATL | INDFEL | GISEV | SADAV | MAAAQ | WAASLQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>Lp.sey</i> | | MAAAQVANAF | TVDFFERV | AKSSANL | AEVYGR | RRTL | INDFEL | GISEM | SDDSV | PLAVQ | WAASLQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>E.mont</i> | | MAAAQVANAF | TVDFFERV | AKNAANI | IPDL | LYGPHC | LTVNDFEL | GISEV | HDTYVP | I | AVQKWV | SLQG | 66 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 70 | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Es</i> | | CELCVESYS | AVPLYGGV | SVYVTMF | AESKTRR | HYFQFVN | ILEAYGAGAY | GSEAYF | IRHQIL | IRPGSA | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.N-Es</i> | | CELCVESYS | AVPLYGGV | SVYVTMF | AESKTRR | HYFQFVN | ILEAYGAGAY | GSEAYF | IRHQIL | IRPGSA | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Y</i> | | CELCVESYS | AVPLYGGV | SVYVTMF | AESKTRR | HYFQFVN | ILEAYGAGAY | GSEAYF | IRHQIL | IRPGSA | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Dm</i> | | CELCVESYS | AVPLYGGV | SVYVTMF | AESKTRR | HYFQFVN | ILEAYGAGAY | GSEAYF | IRHQIL | IRPGSA | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Sy</i> | | CELCVESYS | AVPLYGGV | SVYVTMF | AESKTRR | HYFQFVN | ILEAYGAGAY | GSEAYF | IRHQIL | IRPGSA | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.bruc</i> | | CQLTVGDV | SVLPFHSG | VCIHLTL | VAESAS | VRHFFQ | FVTNLE | EYPAGD | YGSSFY | IRNQIV | TRTGAV | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.evan</i> | | CQLTVGDV | SVLPFHSG | VCIHLTL | VAESAS | VRHFFQ | FVTNLE | EYPAGD | YGSSFY | IRNQIV | TRTGAV | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.cong</i> | | CDLCVESYS | AVPLYGGV | SVYATL | VAEAT | TRRHYF | QFITILE | QCPTGD | YRPM | SFYIR | NQVIM | RP | GAV | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.viva</i> | | REWCVER | FSAASL | YSGVC | IHTSL | VESAT | ARHYF | HFTVLE | EIPARD | YEP | SSYIR | HQTI | IR | QGAV | 132 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.braz</i> | | SRRLR | VDSVNA | AAPLYGGV | NV | VFVTMTA | -FGEM | QYH | I | VTTLES | FQDT | -YG | ID | GYV | VRHQV | IA | RIGAV | 130 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.majo</i> | | SRRLR | VDSVNA | AAPLYGGV | NV | VFVTMTA | -FGEM | QYH | I | VTTLES | FQDT | -YG | MD | GYV | VRHQV | IA | RIGAV | 130 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.infa</i> | | SRRLR | VDSVNA | AAPLYGGV | NV | VFVTMTA | -FGEM | QYH | I | VTTLES | FQDT | -YG | MD | GYV | VRHQV | IA | RIGAV | 130 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.dono</i> | | SRRLR | VDSVNA | AAPLYGGV | NV | VFVTMTA | -FGEM | QYH | I | VTTLES | FQDT | -YG | MD | GYV | VRHQV | IA | RIGAV | 130 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.tropi</i> | | SRRLR | VDSVNA | AAPLYGGV | NV | VFVTMTA | -FGEM | QYH | I | VTTLES | FQDT | -YG | MD | GYV | VRHQV | IA | RIGAV | 130 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>B.ayal</i> | | SQRLC | VESVNA | ASPLYGGV | NV | VFVTLTA | -TSE | I | QQY | FQIT | STLES | YSSG | -FA | VE | GYV | IRHQI | IS | RIGSI | 130 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>C.fasc</i> | | SRRLR | VDSVNA | AAPLYGGV | NV | VFVTLTA | -FGD | L | QQY | FH | I | ATTL | LES | Y | PGT | -I | C | MD | GF | V | VRHQV | IA | RIGAV | 130 | | | | | | | | |
| <i>Lp.sey</i> | | SHRLR | VDSVNA | AAPLYGGV | NV | VFVTLTA | -FGE | L | QQY | FH | I | ATTL | LES | Y | QDT | -F | C | MD | GF | V | VRHQV | IA | RIGAV | 130 | | | | | | | | |
| <i>E.mont</i> | | SRRLR | VDSVNA | AASLYGGV | NV | VFVTLTA | -FGEM | QYH | I | TTTLES | FQDT | -YG | MD | GYV | IRHQV | IA | RIGAV | 130 | | | | | | | | | | | | | | |
| | | 140 | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Es</i> | | ETEQPE | -PEVTP | DQEPK | LEV | SPEAVE | SALL | TSRSAT | DEERKE | QQQK | KNT | -TVVGL | QAA | -AAAA | 194 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.N-Es</i> | | ETEQPE | -PEVMP | DQEPK | LGV | SPEAVE | SALL | TSRSAA | DEERKE | QQQK | KNT | TTTVVGL | QAA | -AAAA | 195 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Y</i> | | ETEQPE | -PEVMP | DQEPK | LGV | SPEAVE | SALL | TSRSAA | DEERKE | QQQK | KNT | TTTVVGL | QAA | -AAAA | 195 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Dm</i> | | ETEQPE | -PEVTP | DQEPK | LEV | SPEAVE | SALL | TSRSAT | DEERKE | QQQK | KNT | -TVVGL | QAA | AVAAA | 196 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.c.Sy</i> | | ETEQPE | -PEVTP | DQEPK | LEV | SPEAVE | SALL | TSRSAT | DEERKE | QQQK | KNT | -TVVGL | QAA | -AAAA | 194 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.bruc</i> | | EK | -PSC | -AEG | KNE | PEGK | VEE | EEEP | -LPEP | -ET | TGTP | VEE | KK | EDS | -RR | -AP | NK | 178 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.evan</i> | | EK | -PSC | -AEG | KNE | PEGK | VEE | EEEP | -LPEP | -ET | TGTP | VEE | KK | EDS | -RR | -AP | NK | 178 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.cong</i> | | EK | -QAS | -AG | NLS | ASGDK | VEE | EEHP | -QP | -E | VAE | VPA | A | EDT | -RC | -SP | AG | 174 | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>T.viva</i> | | EK | -QPS | -E | KKV | DDV | EAR | LADH | -QR | SE | DG | -P | A | ST | 162 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.braz</i> | | AP | -RPV | -PE | PTS | ALAE | QPEAA | -KKS | KPAT | PEP | DAV | PA | AQ | E | KPE | VTE | EP | -AS | AA | 181 | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.majo</i> | | TP | -PPA | -PE | PT | AAAE | KSEAP | -KKS | KPPT | PEPE | AA | PA | AQ | P | KPE | AA | EP | -AS | AA | 181 | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.infa</i> | | TP | -PPA | -PE | PT | AAAE | -KKS | KPT | PEPE | AA | PA | AQ | P | KPE | AA | EP | -AS | AA | 175 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.dono</i> | | TP | -PPA | -PE | PT | AAAE | -KKS | KPT | PEPE | AA | PA | AQ | P | KPE | AA | EP | -AS | AA | 175 | | | | | | | | | | | | | |
| <i>L.tropi</i> | | TP | -PPA | -PE | PT | AAAE | KSEAP | -KKS | KPPT | PEPE | AA | PA | AQ | P | KPE | AA | EP | -AS | AA | 181 | | | | | | | | | | | | |
| <i>B.ayal</i> | | PV | -QSA | -AA | EKP | AATES | PVEA | APV | VEA | AVS | ES | AP | -MNA | E | AV | P | V | K | E | TAK | DA | -PAN | V | 182 | | | | | | | | |
| <i>C.fasc</i> | | VP | -PPA | -PE | PT | AAAE | EPAA | AKT | P | PE | AA | AT | PEP | -Q | E | AV | P | E | A | E | T | -AAAA | 180 | | | | | | | | | |
| <i>Lp.sey</i> | | AP | -P | AV | PE | AT | P | AVEE | K | PA | AE | -P | VEE | K | PK | K | I | TP | -E | P | E | P | T | E | TA | DEP | -VA | S | 179 | | | |
| <i>E.mont</i> | | AP | -PPA | -PE | P | IP | AV | VEE | K | SD | VA | -KRA | K | S | A | T | PEP | -Q | P | E | S | Q | P | E | AV | E | G | P | -A | A | T | 176 |

Continua na próxima página.

| | | | | | | | | |
|-----------------|--------------|-------------------------|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------------------|-------------------------|
| | | 208 | 218 | 228 | 238 | 248 | 258 | |
| <i>T.c.Es</i> | APDKTA | AAVEPET | AAT - - - | VQRQQPPVP - - - | SKPKT | WASLASAQP - K - | GEQRQPLRVI | IPENGVNAD 252 |
| <i>T.c.N-Es</i> | TPDKTA | AAVEPET | AAT - - - | VQRQQPPVP - - - | SKPKT | WASLASAQP - K - | GEQRQPLRVI | IPENGNAD 253 |
| <i>T.c.Y</i> | TPDKTA | AAVEPET | AAT - - - | VQRQQPPVP - - - | SKPKT | WASLASAQP - K - | GEQRQPLRVI | IPENGNAD 253 |
| <i>T.c.Dm</i> | TPDKTA | AAVESET | AAT - - - | VQRQQPPVP - - - | SKPKT | WASLASAQP - K - | GEQRQPLRVI | IPENGVNAD 254 |
| <i>T.c.Sy</i> | TPDKTA | AAVESET | AAT - - - | VQRQQPPVP - - - | SKPKT | WASLASAQP - K - | GEQRQPLRVI | IPENGVNAD 252 |
| <i>T.bruc</i> | KPDGKGRVSPST | AAP - - - | AVTEAAVDAP - - - | TGPKT | WASLASIAT - K - | GEQRPSIKVVAN | ESTANKV 237 | |
| <i>T.evan</i> | KPDGKGRVSPST | AAP - - - | AVTEAAVDAP - - - | TGPKT | WASLASIAT - K - | GEQRPSIKVVAN | ESTANKV 237 | |
| <i>T.cong</i> | KSESRDRTSPDA | AST - - - | IPDDKPSAG - - - | ARPKT | WASLAGAAL - K - | GEQR - P | IKVISHQGPVKA 231 | |
| <i>T.viva</i> | NATEKSRARA | EGLAAGGVAAAVGTS | VTNGNS | SKPKS | WATMASAAL - K - | GEPRSSIKVTS | ESVPGRG 226 | |
| <i>L.braz</i> | TPAELEAGE | AKPA - - - - - - - - - | SAPVS - | SKPKS | WASLVSRAPVK - | IAEHKPV | RVVAHEGGKK - - 232 | |
| <i>L.majo</i> | APAELEDEEE | EKPA - - - - - - - - - | PAPVS - | SKPKS | WASLVSRAPVK - | TVEHKPMR | VAHEGGKK - - 232 | |
| <i>L.infa</i> | APAELEDEEE | EKPA - - - - - - - - - | PAPVS - | SKPKS | WASLVSRAPVK - | TAEHKPMR | VAHEGGKK - - 226 | |
| <i>L.dono</i> | APAELEDEEE | EKPA - - - - - - - - - | PAPVS - | SKPKS | WASLVSRAPVK - | TAEHKPMR | VAHEGGKK - - 226 | |
| <i>L.tropi</i> | APAELEDEEE | EKPA - - - - - - - - - | PAPVS - | SKPKS | WASLVSCAPVK - | TVEHKPMR | VAHEGGKK - - 232 | |
| <i>B.ayal</i> | AAAKET | TL | SAPPAR - - - - - - - - - | AAPDT - | GKPKS | WASLASSAPT - | K - PAEHKAI | RVIAYNGPKKEE 236 |
| <i>C.fasc</i> | PAAE | APHA | AEEPQQA - - - | EESA | APAA | AAPAKPKS | WALVSSAPS | AAAAHRPVRVSRAGEKKE 243 |
| <i>Lp.sey</i> | GAAE | VEKHEE | EAQQ - - - | PAAA | APSS - | GKPKS | WALLAHAPAK - | VAEHRPVRVAHEAGDKK - 239 |
| <i>E.mont</i> | ASAEV - - - | EEKSA - - - - - - - - - | PSPVS - | GKPKS | WASLVSSAPVK - | TAEHKPLR | VAHEGGKK - - 224 | |

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------|-----------------|--------------|---------|----------|----------|----------|------------------|--------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 268 | 278 | 288 | 298 | 308 | 318 | 328 | | | | | |
| <i>T.c.Es</i> | ATEVHA - | PAKPTQTEQRHTSSS | AGGAGAT | KPPAKFP | RSPAVS | IGDRLMFN | IDYEVSD | EETKAAFCP 317 | | | | | |
| <i>T.c.N-Es</i> | ATEVHA - | PAKPTQTEQRHTSSS | AGGAGAT | KPPAKFP | RSPAVS | IGDRLMFN | IDYEVSD | EETKTAFCP 318 | | | | | |
| <i>T.c.Y</i> | ATEVHA - | PAKPTQTEQRHTSSS | AGGAGAT | KPPAKFP | RSPAVS | IGDRLMFN | VDYEVSD | EETKTAFCP 318 | | | | | |
| <i>T.c.Dm</i> | ATEVHA - | PAKPTQTEQRHTSSS | AGGAGAT | KPPAKFP | RSPAVS | IGDRLMFN | IDYEVSD | EETKTAFCP 319 | | | | | |
| <i>T.c.Sy</i> | ATEVHA - | PAKPTQTEQRHTSSS | AGGAGAT | KPPAKFP | RSPAVS | IGDRLMFN | IDYEVSD | EETKTAFCP 317 | | | | | |
| <i>T.bruc</i> | APK - - - - | PASPTTKQA - - | PQSDSRKQVSP | KRAAKAP | RAPSEP | VGERLMFS | IDHA | VTDEEILTALCP 297 | | | | | |
| <i>T.evan</i> | APK - - - - | PASPTTKQA - - | PQSDSRKQVSP | KRAAKAP | RAPSEP | VGERLMFS | IDHA | VTDEEILTALCP 297 | | | | | |
| <i>T.cong</i> | ANK - - - - | PVSP | PSKVP - - | AQD | DARKQVSP | KRGTKA | ANSSSEPL | IGDRLMFSIKKQ | VTDQEI | MAALCQ 291 | | | |
| <i>T.viva</i> | AAKSYS | APST | KTAQ - - - - | NSEQ | RASTQQRN | PRTPHNS | AKPAGDR | LMFNIRHQ | VSDEE | VLAALCP 287 | | | |
| <i>L.braz</i> | - - - - - | PTPEP - - - - - | SAPA | AATTPAS | KRPP | PREKASE | TVGDR | LMFN | TTG | VTDEE | IRAALCP 284 | | |
| <i>L.majo</i> | - - - - - | PTTEP - - - - - | AAT | AAAPAS | KRLP | PREKASE | AVGDR | LMFN | TTGT | VTDEE | IRAALCP 284 | | |
| <i>L.infa</i> | - - - - - | PTTEP - - - - - | AAT | AAAAPAS | KRLP | PREKASE | AVGDR | LMFN | TTG | VTDEE | IRAALCP 278 | | |
| <i>L.dono</i> | - - - - - | PTTEP - - - - - | AAT | AAAAPAS | KRLP | PREKASE | AVGDR | LMFN | TTG | VTDEE | IRAALCP 278 | | |
| <i>L.tropi</i> | - - - - - | PTTEP - - - - - | AAT | AAAAPAS | KRLP | PREKASE | AVGDR | LMFN | TTG | VTDEE | IRAALCP 284 | | |
| <i>B.ayal</i> | E - - - - - | PSKV | PTQ - - - - | MNAS | ATGLST | KQPR | REKPV | - VGDR | LMFN | IDHP | VTDEE | VREALCA 290 | |
| <i>C.fasc</i> | A - - - - - | PAAA | AKK - - - - | EAV | APKEAAA | KRP | APREK | KAPEP | VGDR | LMFN | INGA | VTDEE | IRGALCA 298 |
| <i>Lp.sey</i> | - - - - - | ETAS | PKK - - - - | GAP | APKEAAV | KRP | APREK | KAPEP | AGDR | LMFN | INGT | VTDEE | IRTALCS 293 |
| <i>E.mont</i> | - - - - - | PTPEP - - - - - | VAP | AAGAPAS | KRPP | PREKAP | EAL | IGDR | LMFN | TTGA | VTDEE | IRAALCP 276 | |

Domínio RRM

| | | | | | | | | | | | | | |
|-----------------|--------|---------|-----------------|------|-------|-----------|----------------------|---------|-----------------|------|----------------|------------------|-----|
| | | 338 | 348 | 358 | 368 | 378 | 388 | | | | | | |
| <i>T.c.Es</i> | LAANI | VSLRNNS | ANGHVFLDFSD - | KEK | VM | DIKANP | PTVGARKTRVS | IYRQRTR | QQGENNENRTH 381 | | | | |
| <i>T.c.N-Es</i> | LAANI | VSLRNNS | ANGHVFLDFSD - | KEK | VM | DIKANP | PTVGARKTRVS | IYRQRTR | QQGENNENRTH 382 | | | | |
| <i>T.c.Y</i> | LAANI | VSLRNNS | ANGHVFLDFSD - | KEK | VM | DIKANP | PTVGARKTRVS | IYRQRTR | QQGENNENRTH 382 | | | | |
| <i>T.c.Dm</i> | LAANI | VSLRNNS | ANGHVFLDFSD - | KEK | VM | DIKANP | PTVGARKTRVS | IYRQRTR | QQGENNENRTH 383 | | | | |
| <i>T.c.Sy</i> | LAANI | VSLRNNS | ANGHVFLDFSD - | KEK | VM | DIKANP | PTVGARKTRVS | IYRQRTR | QQGENNENRTH 381 | | | | |
| <i>T.bruc</i> | LAARI | VSLRNNS | AKGYVFFDFSPGEDS | VMDS | IKAAP | FVVGASQTT | VNVFRCKQRS - - - - - | | 352 | | | | |
| <i>T.evan</i> | LAARI | VSLRNNS | TKGYVFFDFSPGEDS | VMDS | IKAAP | FVVGASQTT | VNVFRCKQRS - - - - - | | 352 | | | | |
| <i>T.cong</i> | YSSRV | VSLRNNS | ANGHVFLDFSGNEGD | I | LEGL | KSNTLI | I | GAG | NRVS | IYRQ | KPRE - - - - - | 346 | |
| <i>T.viva</i> | LNRVVS | IRNNS | ASGHVFLDFAG - | EDS | VL | DV | LKAELVI | GSS | KTRVN | IYQR | PREQN | LRESA - - - | 348 |
| <i>L.braz</i> | MSAHL | VSLRNNS | AKGHVFMDFAE - | KVN | VF | DEL | VKAQLVI | GAS | KVKMS | VFRQ | RARE - - - - - | 338 | |
| <i>L.majo</i> | MSAHL | VSLRNNS | AKGHVFMDFAE - | KVN | VF | DEL | SKAQLVI | GTS | KMKMS | VFRQ | RARE - - - - - | 338 | |
| <i>L.infa</i> | MSAHL | VSLRNNS | AKGHVFMDFAE - | KVN | VF | DEL | SKAQPVI | GVS | KVKMS | VFRQ | RARE - - - - - | 332 | |
| <i>L.dono</i> | MSAHL | VSLRNNS | AKGHVFMDFAE - | KVN | VF | DEL | SKAQPVI | GVS | KVKMS | VFRQ | RARE - - - - - | 332 | |
| <i>L.tropi</i> | MSAHL | VSLRNNS | AKGHVFMDFAE - | KVN | VF | DEL | SKTQPVI | GAS | KVKMS | VFRQ | RARE - - - - - | 338 | |
| <i>B.ayal</i> | VASSL | VSLRNNS | AKGYVFMDFAP - | RAK | VF | DVI | KMSTPVI | GVR | KTS | IVIH | RQRP | REAVGGKE - - - - | 350 |
| <i>C.fasc</i> | MAPHL | VSLRNNS | AKGHVFMDFAA - | NVE | VL | DEL | VKAQPVI | GAA | LKMA | VFRQ | RPD - - - - - | 352 | |
| <i>Lp.sey</i> | MATHL | LSLRNNS | AKGHVFMDFSD - | SVA | AF | DEL | SKAQPVI | GAS | LKMS | VFRQ | RPD - - - - - | 347 | |
| <i>E.mont</i> | MSAHL | VSLRNNS | AKGHVFMDFAE - | KVN | VL | DEL | LAKSQPVI | GAS | KVKMS | VFRQ | RARE - - - - - | 330 | |

RNP1

Legenda na próxima página.

Alinhamento múltiplo das sequências de proteínas RBP42 de diferentes espécies de cinetoplastídeos.

O alinhamento múltiplo de sequências foi produzido com as sequências de aminoácidos de RBP42 provenientes de diferentes espécies de cinetoplastídeos. A conservação entre as sequências alinhadas é maior na região dos domínios NTF2-like (Fator de transporte nuclear 2-like) e RRM (Motivo de reconhecimento de RNA). Os resíduos estão coloridos por identidade de sequência e conservação entre as sequências comparadas. Os domínios NTF2-like e RRM estão marcados em laranja e verde, respectivamente. O motivo RNP1 (Motivo ligante de RNA 1) também é destacado (caixa rosa) e ocorre com a sequência consenso (N/K)G(H/Y)VF(L/F/M)DF. As regiões ricas em glutamatos estão sublinhadas e os motivos PxxP (Motivos ricos em prolinas) são mostrados no interior de caixas vermelhas. Espécies analisadas: *Trypanosoma cruzi* CL Brener Esmeraldo-like [*T.c.Es*] (TcCLB.509167.140), *Trypanosoma cruzi* CL Brener Não Esmeraldo-like [*T.c.N-Es*] (TcCLB.485683.10), *Trypanosoma cruzi* Y [*T.c.Y*] (WEISBARTH *et al.*, 2018), *Trypanosoma cruzi* Dm28c [*T.c.Dm*] (BCY84_01141), *Trypanosoma cruzi* Sylvio X10/1-2012 [*T.c.Sy*] (TCSYLVIO_003340), *Trypanosoma brucei* TREU927 [*T.bruc*] (Tb927.6.4440), *Trypanosoma evansi* STIB 805 [*T.evan*] (TevSTIB805.6.4570), *Trypanosoma congolense* IL3000 [*T.cong*] (TcIL3000_6_3860), *Trypanosoma vivax* Y486 [*T.viva*] (TvY486_0603830), *Leishmania braziliensis* MHOM/BR/75/M2904 [*L.braz*] (LbrM.30.3080), *Leishmania major* SD 75.1 [*L.majo*] (LMJSD75_300038300), *Leishmania infantum* JPCM5 [*L.infa*] (LinJ.30.3130), *Leishmania donovani* BPK282A1 [*L.dono*] (LdBPK_303130.1), *Leishmania tropica* L590 [*L.tropi*] (LTRL590_300039500), *Blechnomonas ayalai* B08-376 [*B.ayal*] (Baya_060_0150), *Crithidia fasciculata* Cf-C1 [*C.fasc*] (CFAC1_260055900), *Leptomonas seymouri* ATCC 30220 [*Lp.sey*] (Lsey_0105_0110) e *Endotrypanum monterogeei* LV88 [*E.mont*] (EMOLV88_300036900). O Logo desse alinhamento é mostrado na Figura 19.