

**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 PROTEÍNA RBP42 DO PARASITO *Trypanosoma cruzi*
EM CONDIÇÕES NORMAIS E DE ESTRESSE CELULAR INDUZIDO PELA
RADIÇÃO GAMA**

Belo Horizonte
Agosto, 2023

Daniela de Laet Souza

**CARACTERIZAÇÃO DA PROTEÍNA RBP42 DO PARASITO *Trypanosoma cruzi*
EM CONDIÇÕES NORMAIS E DE ESTRESSE CELULAR INDUZIDO PELA
RADIAÇÃO GAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientadora: Professora Glória Regina Franco

Coorientadora: Dra. Daniela Ferreira Chame

Belo Horizonte
Agosto, 2023

043

Souza, Daniela de Laet.

Caracterização da proteína RBP42 do parasito *Trypanosoma cruzi* em condições normais e de estresse celular induzido pela radiação gama [manuscrito] / Daniela de Laet Souza. – 2023.

158 f. : il. ; 29,5 cm.

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

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

1. Bioquímica e Imunologia. 2. Ribonucleoproteínas. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Raios gama. 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

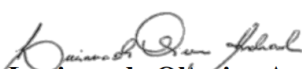


ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE DANIELA DE LAET SOUZA. Aos vinte e dois dias do mês de agosto de 2023 às 13:00 horas, reuniu-se de forma “on line” utilizando a plataforma “Zoom”, no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a Comissão Examinadora da tese de Doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado "Caracterização da proteína RBP42 do parasito Trypanosoma cruzi em condições normais e de estresse celular induzido pela radiação gama ", requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Biologia Molecular. 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: Dra. Luciana de Oliveira Andrade (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dr. João Luís Reis Cunha (University of York - Reino Unido), aprovada; Dra. Andréa Rodrigues Ávila (Instituto Carlos Chagas - Fiocruz - PR), aprovada; Dra. Daniela Ferreira Chame - Coorientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada; Dra. Glória Regina Franco - Orientadora (Universidade Federal de Minas Gerais), aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada:

☒ **APROVADA**

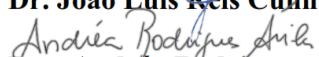
☐ **REPROVADA**

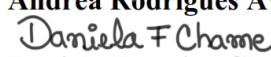
O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 22 de agosto de 2023.

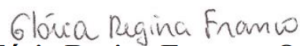

 Dra. Luciana de Oliveira Andrade (UFMG)

Dra. Mariana Torquato Quezado de Magalhães (UFMG)


 Dr. João Luís Reis Cunha (University of York)


 Dra. Andréa Rodrigues Ávila (Fiocruz - PR)


 Dra. Daniela Ferreira Chame - Coorientadora (UFMG)


 Dra. Glória Regina Franco - Orientadora (UFMG)

Documento assinado digitalmente



MARIANA TORQUATO QUEZADO DE MAGALHAE
 Data: 23/08/2023 18:23:55-0300
 Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora Glória Regina Franco pela oportunidade de fazer parte do seu grupo de pesquisa durante todos esses anos. Os seus ensinamentos foram muito importantes para o meu crescimento acadêmico e científico. Agradeço a confiança e o suporte durante a execução desse projeto de tese. Obrigada pela sua generosidade e acolhimento nos momentos de dificuldade.

À minha coorientadora Daniela Ferreira Chame agradeço pela amizade e pela enorme colaboração nessa tese. Você também contribuiu muito para a minha formação científica. Obrigada pela sua disponibilidade de ajudar sempre que necessário. Também agradeço as suas revisões cuidadosas e o incentivo de fazer sempre o melhor possível.

Ao meu amigo e colaborador Wesley Roger Rodrigues Ferreira agradeço a ajuda na execução de vários experimentos. A sua contribuição foi essencial para a esse projeto.

À Doutora Helaine Grazielle Santos Vieira deixo o meu agradecimento pela construção dos vetores de expressão utilizados nesta tese.

Aos Professores Carlos Renato Machado, Andrea Mara Macedo e Erich Birelli Tahara agradeço o suporte científico e todas as sugestões feitas durante as reuniões de laboratório.

Aos Gloriosos e a todos os membros do Laboratório de Genética Bioquímica da UFMG deixo o meu agradecimento pela amizade e pela colaboração durante esse projeto. Obrigada por todas as nossas discussões científicas.

À Professora Daniella Castanheira Bartholomeu agradeço o acesso a versão mais recente e ainda não publicada do genoma produzido para o *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener. O meu muito obrigado ao aluno de doutorado Anderson Coqueiro dos Santos que auxiliou na consulta ao genoma.

À Professora Santuza Maria Ribeiro Teixeira e ao seu grupo de pesquisa agradeço pelo fornecimento da enzima SaCas9 purificada e dos plasmídeos necessários para a edição do genoma do *T. cruzi* utilizando-se a tecnologia de CRISPR/Cas9.

Ao Professor Gustavo Batista de Menezes agradeço a colaboração nos experimentos de Microscopia de Fluorescência Confocal. Agradeço também aos membros de sua equipe envolvidos diretamente nesses experimentos, a pesquisadora Máisa Mota Antunes e o aluno de iniciação científica Pedro Sérgio Corradi da Silva.

Ao CAPI, Centro de Microscopia da UFMG e CDTN agradeço o apoio técnico.

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

À minha família agradeço de coração todo o carinho e apoio durante essa longa caminhada acadêmica. Vocês compartilharam comigo o meu sonho e fizeram todo o possível para ajudar. Saibam que vocês são os meus maiores exemplos de dedicação, força e coragem. O meu sucesso também é o sucesso de vocês.

RESUMO

Proteínas ligantes de RNA (RBPs) são elementos essenciais para a regulação da expressão gênica, especialmente nos tripanosomatídeos nos quais esse controle acontece majoritariamente por mecanismos pós-transcricionais. Nesse trabalho, caracterizamos a Proteína ligante de RNA 42 do *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener (TcRBP42), que segue sendo a cepa de referência para a espécie. Essa proteína foi estudada nas condições normais de cultivo e no contexto do estresse celular induzido pela exposição a 1000 Gy de radiação gama. Esse organismo é extremamente resistente a esse tipo de radiação ionizante, empregando mecanismos ainda pouco conhecidos, mas que podem envolver RBPs. Nesse sentido, a análise do transcriptoma de epimastigotas irradiadas revelou aumentos na expressão dos transcritos de TcRBP42 em resposta à radiação gama. Nesse trabalho, a caracterização funcional dessa proteína foi iniciada pela análise computacional de sua estrutura. Na versão mais recente do genoma do CL Brener, essa proteína é codificada por um gene de cópia única contendo dois alelos. Além disso, TcRBP42 possui dois domínios conservados, NTF2-like e RRM, interligados por uma longa região central intrinsecamente desordenada. Essa organização modular é compartilhada com outros ortólogos de RBP42. Para os estudos *in vitro* foram geradas linhagens de epimastigotas Superexpressoras e Nocautes de TcRBP42. Enquanto a superexpressão foi bem tolerada pelo *T. cruzi*, o nocaute desse gene causou o aparecimento de epimastigotas de corpo arredondado, flagelo encurtado e mobilidade reduzida. Defeitos moderados na proliferação foram observados apenas nas fases mais tardias do crescimento em cultura. Esse resultado contrasta com o observado no *Trypanosoma brucei*, para o qual o nocaute de RBP42 é letal. Quanto a localização de TcRBP42, esta foi determinada pela detecção de uma cópia marcada com uma *tag* de histidina. Nas condições normais de cultivo, essa proteína se distribui por todo o citoplasma das epimastigotas. Em contraste, o tratamento com radiação gama leva a realocação parcial dessa proteína para o núcleo dos parasitos. Isso sugere a importância de TcRBP42 para uma resposta ao estresse baseada no controle traducional pela compartimentalização de transcritos. No que se refere a proliferação das epimastigotas, a irradiação não gerou diferenças significativas no crescimento de nenhuma das linhagens avaliadas (*Wild type*, GFP, Superexpressor e Nocaute). Experimentos de PCR em tempo real também foram realizados para a condição normal e irradiada utilizando-se como alvos transcritos do metabolismo energético identificados previamente como alvos da RBP42 do *T. brucei*. Nossos resultados sugerem que TcRBP42 contribui para a estabilização de seus transcritos alvos apenas na condição normal de cultivo. Os estudos da expressão gênica no estresse por radiação gama também expuseram pela primeira vez na literatura uma possível conexão entre o metabolismo da prolina e os mecanismos de radiorresistência do *T. cruzi*. Esse aminoácido também foi ligado à resistência desse organismo ao estresse oxidativo e nutricional. Em suma, esse trabalho foi o primeiro a gerar e caracterizar epimastigotas Nocautes para TcRBP42, expandindo assim a literatura disponível para as RBPs do *T. cruzi*.

Palavras-chave: Proteína ligante de RNA 42; *Trypanosoma cruzi*; Radiação gama

ABSTRACT

RNA-binding proteins (RBPs) are essential factors for gene expression regulation in trypanosomatids, which occurs mostly at the post-transcriptional level. In this work, we studied the RNA-binding protein 42 from the *T. cruzi* CL Brener reference strain (TcRBP42) by characterizing it under both normal and stress conditions induced by 1000 Gy of gamma radiation. This species can withstand high doses of ionizing radiation by employing largely unknown mechanisms that may involve RBPs. In this sense, a transcriptome analysis of irradiated epimastigotes detected increased mRNA levels for TcRBP42 in response to gamma radiation. We started the functional characterization of this protein by analyzing its structure computationally. In the most recent CL Brener genome, this protein is coded by a single-copy gene with two alleles. Furthermore, this protein contains two conserved domains, NTF2-like and RRM, interconnected by a long and unstructured region. This modular organization is also shared with other RBP42 orthologs. For the in vitro experiments, parasites overexpressing or lacking TcRBP42 gene expression were generated. While the overexpression was well tolerated by *T. cruzi*, this gene knockout caused the appearance of round-shaped epimastigotes with a shortened flagellum and reduced mobility. Mild proliferation defects were only observed in late culture growth. The knockout parasite's viability contrasts with the lethal phenotype observed in *Trypanosoma brucei*. Concerning protein localization, it was determined by detecting a TcRBP42 His-tagged version inserted into epimastigotes overexpressing this gene. At normal conditions, TcRBP42 was found distributed throughout the whole parasite's cytoplasm. However, exposure to gamma radiation produced a partial relocalization of this protein to the nucleus. It suggests the importance of TcRBP42 for a stress response based on the translation control exerted by transcript compartmentalization. Regarding epimastigotes proliferation, gamma irradiation did not produce significant differences in the growth of the assayed parasite lines (Wild type, GFP, Overexpressor and Knockout). Real-time PCR experiments were carried out to evaluate the expression of energy metabolism transcripts bound by the *T. brucei* RBP42. Our results suggest TcRBP42 contributes to target transcript stabilization only under normal conditions. Studying gene expression after gamma radiation exposure also exposed for the first time a possible connection between the proline metabolism and the radioresistance of *T. cruzi*. This amino acid has also been linked to the parasite's resistance to nutritional and oxidative stress. In summary, this work was the first to generate and characterize TcRBP42 knockout epimastigotes, thus expanding the literature for the *T. cruzi* RBPs.

Keywords: RNA-binding protein 42; *Trypanosoma cruzi*; Gamma radiation

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 — Distribuição geográfica mundial da doença de Chagas	17
Figura 2 — Ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	19
Figura 3 — Micrografias dos principais estágios de desenvolvimento do <i>T. cruzi</i>	20
Figura 4 — Metabolismo do mRNA nos tripanosomatídeos	28
Figura 5 — Grânulos de RNA descritos nos tripanosomatídeos.....	29
Figura 6 — Níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 mensurados em epimastigotas WT por <i>RNA-seq</i>	37
Figura 7 — Estratégia de clonagem utilizada na construção dos vetores de expressão pRock_SPB/6x-His_RBP42 e pRock_SPB/6x-His_GFP	44
Quadro 1 — Oligonucleotídeos utilizados na edição do genoma do <i>T. cruzi</i> da cepa CL Brener e nos experimentos de PCR em tempo real	45
Figura 8 — Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes de TcRBP42	55
Figura 9 — Características das sequências de aminoácidos de TcRBP42.....	58
Figura 10 — TcRBP42 e suas proteínas ortólogas estudadas em outras espécies de tripanosomatídeos.....	59
Figura 11 — Expressão de proteínas recombinantes no <i>T. cruzi</i> da cepa CL Brener	62
Figura 12 — Produção de epimastigotas Heminocautes e Nocautes para TcRBP42 utilizando-se a tecnologia de CRISPR/Cas9	65
Figura 13 — Sequenciamento pelo método de Sanger de epimastigotas Heminocautes e Nocautes para os genes codificadores de TcRBP42.....	66
Figura 14 — Curvas de crescimento de culturas de epimastigotas em condições normais de cultivo	69
Figura 15 — Morfologias das epimastigotas WT, Heminocautes e Nocautes para TcRBP42 observadas por Microscopia óptica convencional	70
Figura 16 — Morfologias observadas por Microscopia de fluorescência confocal.....	71
Figura 17 — Expressão de transcritos do metabolismo energético em condições normais de cultivo	73

Figura 18 — Curvas de crescimento de epimastigotas irradiadas.....	75
Figura 19 — Teste de autofluorescência e marcação inespecífica.....	77
Figura 20 — Localização subcelular de rTcRBP42 e GFP	78
Figura 21 — Expressão dos transcritos de TcRBP42 e do metabolismo energético em epimastigotas WT expostas à radiação gama	82
Figura 22 — Efeito da radiação gama na expressão dos transcritos de TcRBP42 em epimastigotas WT e Superexpressoras	83
Figura 23 — Expressão de transcritos do metabolismo energético em resposta à radiação gama	84
Figura 24 — Efeito da metaciclogênese <i>in vitro</i> na expressão dos transcritos do Citocromo B, da TcRBP42 e da Prolina desidrogenase	87

LISTA DE ABREVIATURAS

ARE: Elemento rico em adeninas e uracilas

BSA: Albumina sérica bovina

CAPI: Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB-UFMG

CDTN: Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear

CTNBio: Comissão Técnica Nacional de Biossegurança

DTU (s): Unidade (s) discreta (s) de tipagem

FISH: Hibridização fluorescente *in situ*

G3BP1: *Ras GTPase-activating protein-binding protein 1*

G3BP2: *Ras GTPase-activating protein-binding protein 2*

GFP: Proteína verde fluorescente

ICB: Instituto de Ciências Biológicas

IDR (s): Região (ões) predita (s) como intrinsecamente desordenada (s)

LbRBP42: Proteína RBP42 da *Leishmania braziliensis*

LGB: Laboratório de Genética Bioquímica

mRNP (s): Complexo (s) ribonucleoproteicos (s)

NTF2: Fator de transporte nuclear 2

NTF2-like: Fator de transporte nuclear 2-like

PAM: *Protospacer adjacent motif*

P-bodies: Corpos de processamento

PBS: Tampão fosfato-salino

PCR: Reação em cadeia da polimerase

PVDF: Fluoreto de polivinilideno

PxxP (s): Motivo (s) rico (s) em prolina

RBP (s): Proteína (s) ligante (s) de RNA

RBP42: Proteína ligante de RNA 42

RNAi: RNA de interferência

RNA-seq: Sequenciamento de RNA

RNP1: Motivo ligante de RNA 1

RNP2: Motivo ligante de RNA 2

RRM (s): *RNA recognition motif domain (s)*

rTcRBP42: Versão recombinante da RBP42 do *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener

RT-qPCR: *Quantitative reverse transcription PCR*

SDS: Dodecil sulfato de sódio

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

SG (s): Grânulo (s) de estresse

SNP (s): Polimorfismo (s) de nucleotídeo único

TbRBP42: Proteína RBP42 do *Trypanosoma brucei*

TBST: Solução salina tamponada com Tris e suplementada com o detergente Tween 20

TcRBP42: Proteína RBP42 do *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener

TcYRBP42: Proteína RBP42 do *Trypanosoma cruzi* da cepa Y

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais

UTR: Região não traduzida

WT: *Wild type*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 Doença de Chagas	15
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> e o seu ciclo de vida	18
1.3 Genoma de referência.....	21
1.4 Metabolismo do mRNA, RBPs e a regulação da expressão gênica	22
1.5 Proteína Ligante de RNA 42	30
1.6 Manipulação genética do <i>T. cruzi</i>	32
1.7 Efeitos da Radiação Gama	34
2 JUSTIFICATIVA	38
3 OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral.....	39
3.2 Objetivos específicos.....	39
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Caracterização das sequências gênicas e proteicas de TcRBP42.....	40
4.2 Cultivo e manipulação genética do <i>T. cruzi</i>	40
4.3 <i>Western blot</i> e imunoprecipitação dos complexos ribonucleoproteicos	49
4.4 PCR em tempo real.....	50
4.5 Indução do estresse por radiação gama e da metaciclogênese <i>in vitro</i>	51
4.6 Microscopia de fluorescência confocal	51
5 RESULTADOS	53
5.1 Caracterização das sequências gênicas e proteicas de TcRBP42.....	53
5.2 Expressão de proteínas recombinantes no <i>T. cruzi</i>	60
5.3 Produção de epimastigotas Nocautes para TcRBP42.....	63
5.4 Avaliação fenotípica das epimastigotas manipuladas geneticamente	67
5.5 Avaliação da expressão de transcritos preditos como alvos de TcRBP42	72
5.6 Indução de estresse celular pela exposição à radiação gama	74
5.6.1 Crescimento das epimastigotas irradiadas	74
5.6.2 Localização subcelular de TcRBP42	76
5.6.3 Expressão de transcritos no estresse por radiação gama.....	80
5.7 Metaciclogênese <i>in vitro</i>	86

6 DISCUSSÃO	88
7 CONCLUSÕES.....	105
8 PERSPECTIVAS.....	107
REFERÊNCIAS	108
APÊNDICES	122
APÊNDICE A — Estrutura tridimensional completa para a proteína TcRBP42	122
APÊNDICE B — Avaliação da contaminação por <i>Mycoplasma sp.</i>	124
APÊNDICE C — Imunoprecipitação de rTcRBP42.....	125
APÊNDICE D — Localização subcelular de rTcRBP42 e dos RNA recém-sintetizados em condições normais e de estresse induzido pela radiação gama	126
APÊNDICE F — Artigo científico em preparação	129

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também denominada Tripanossomíase Americana, é uma doença parasitária causada pelo *Trypanosoma cruzi*. A enfermidade foi descoberta no ano de 1909 pelo pesquisador e médico brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas. Na ocasião da descoberta, Carlos Chagas descreveu o agente etiológico da nova doença, identificou os insetos vetores e algumas espécies de mamíferos também infectadas pelo parasito, estudou a morfologia de diferentes estágios do desenvolvimento e ainda iniciou a caracterização sintomatológica da doença (CHAGAS, 1909). Segundo dados oficiais, a doença de Chagas é endêmica em 21 países da América Latina. Em virtude dos movimentos populacionais, casos da doença também são registrados em países não endêmicos (**Figura 1**). Na América Latina, estima-se que 6 milhões de indivíduos estejam infectados pelo *T. cruzi* e que outros 70 milhões estejam sob o risco de infecção. Além disso, uma média de 30 mil novos casos e de 12 mil mortes são registradas anualmente (PAHO, 2023). No Brasil, estima-se que de 1,9 a 4,6 milhões de pessoas estejam infectadas pelo parasito (BRASIL, 2023).

Apesar da sua importância médica, a doença de Chagas é considerada conjuntamente com outras 19 doenças uma doença tropical negligenciada desde 2005 (WHO, 2020; 2023). Sendo uma doença negligenciada, os recursos financeiros destinados às pesquisas científicas são em geral muito limitados. Em um período de 10 anos (2009 a 2018), apenas 236,31 milhões de dólares americanos foram investidos na doença de Chagas, priorizando principalmente a pesquisa básica e o desenvolvimento de novas drogas. Essa soma representa apenas 0,67% do total investido em todas as doenças tropicais negligenciadas (SANGENITO; BRANQUINHA; SANTOS, 2020). Visando melhorar o suporte financeiro para esse conjunto de doenças, a Organização Mundial da Saúde lançou em 2021 um plano de ação com metas para a prevenção, controle, eliminação ou erradicação das doenças tropicais negligenciadas a serem atingidas até o ano de 2030. Em 2019 também foi instituído o dia 14 de abril como o Dia Mundial da Doença de Chagas (WHO, 2023).

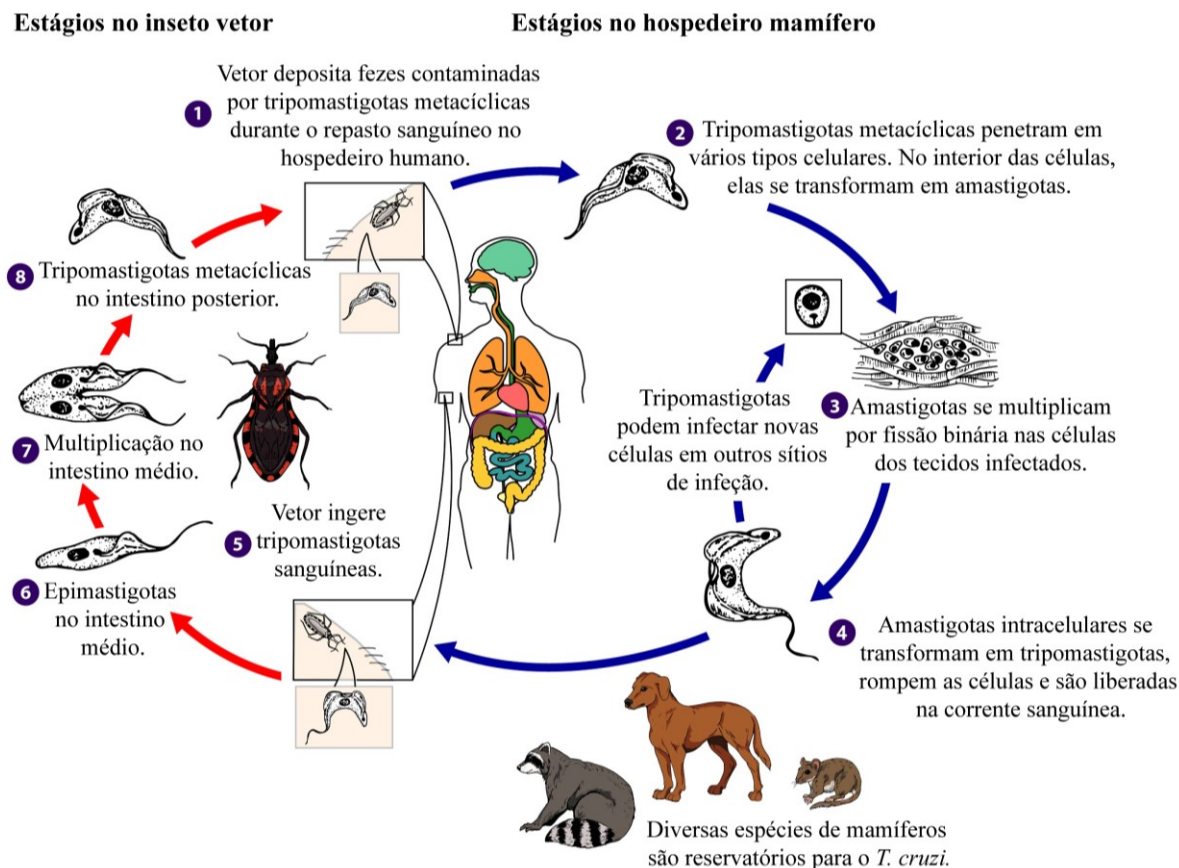
A transmissão do *T. cruzi* ao ser humano ocorre principalmente pela via vetorial nas áreas endêmicas (**Figura 2**). Nessa via, a transmissão acontece quando as fezes contaminadas do inseto vetor são depositadas durante o repasto sanguíneo e entram em contato com o local da picada, lesões pré-existentes na pele ou mucosas íntegras. O parasito também pode ser transmitido por outras rotas: (i) de mãe para filho durante a gestação ou parto; (ii) recebimento

de sangue ou órgãos de doadores infectados; (iii) consumo de alimentos contaminados; e (iv) acidentes de laboratório envolvendo a manipulação do parasito (WHO, 2023). Após a transmissão, a doença de Chagas se desenvolve nas fases aguda e crônica. A fase aguda se caracteriza pela alta parasitemia sanguínea e pode se estender por até 8 semanas. A maioria dos casos são assintomáticos ou apresentam sintomas inespecíficos como dor de cabeça e febre. Em alguns pacientes pode ocorrer o aparecimento de edema no local da inoculação do parasito, sendo esses denominados de sinal de Romaña (pálpebra) e de Chagoma de inoculação (outras regiões da pele). Na fase crônica, os parasitos são encontrados principalmente no interior de células. A maioria dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos por toda a vida. Entretanto, um percentual de 30 a 40% destes desenvolve complicações no decorrer de anos ou décadas. Entre as complicações estão megaesôfago, megacólon, cardiomiopatias e problemas neurológicos. Vacinas ainda não estão disponíveis para o tratamento ou prevenção da doença de Chagas, o que limita o tratamento dos pacientes a administração de Nifurtimox ou Benznidazol. Essas drogas são eficazes na fase aguda da doença, porém a eficiência dessas diminui com o tempo de infecção. Além disso, a administração prolongada e os efeitos adversos das medicações levam muitos pacientes a descontinuarem a terapia (LIDANI *et al.*, 2019). No Brasil, a droga de primeira linha para o tratamento da doença de Chagas é o Benznidazol, sendo o Nifurtimox utilizado apenas nos casos de falha terapêutica ou intolerância do paciente ao Benznidazol (BRASIL, 2023).

1.2 *Trypanosoma cruzi* e o seu ciclo de vida

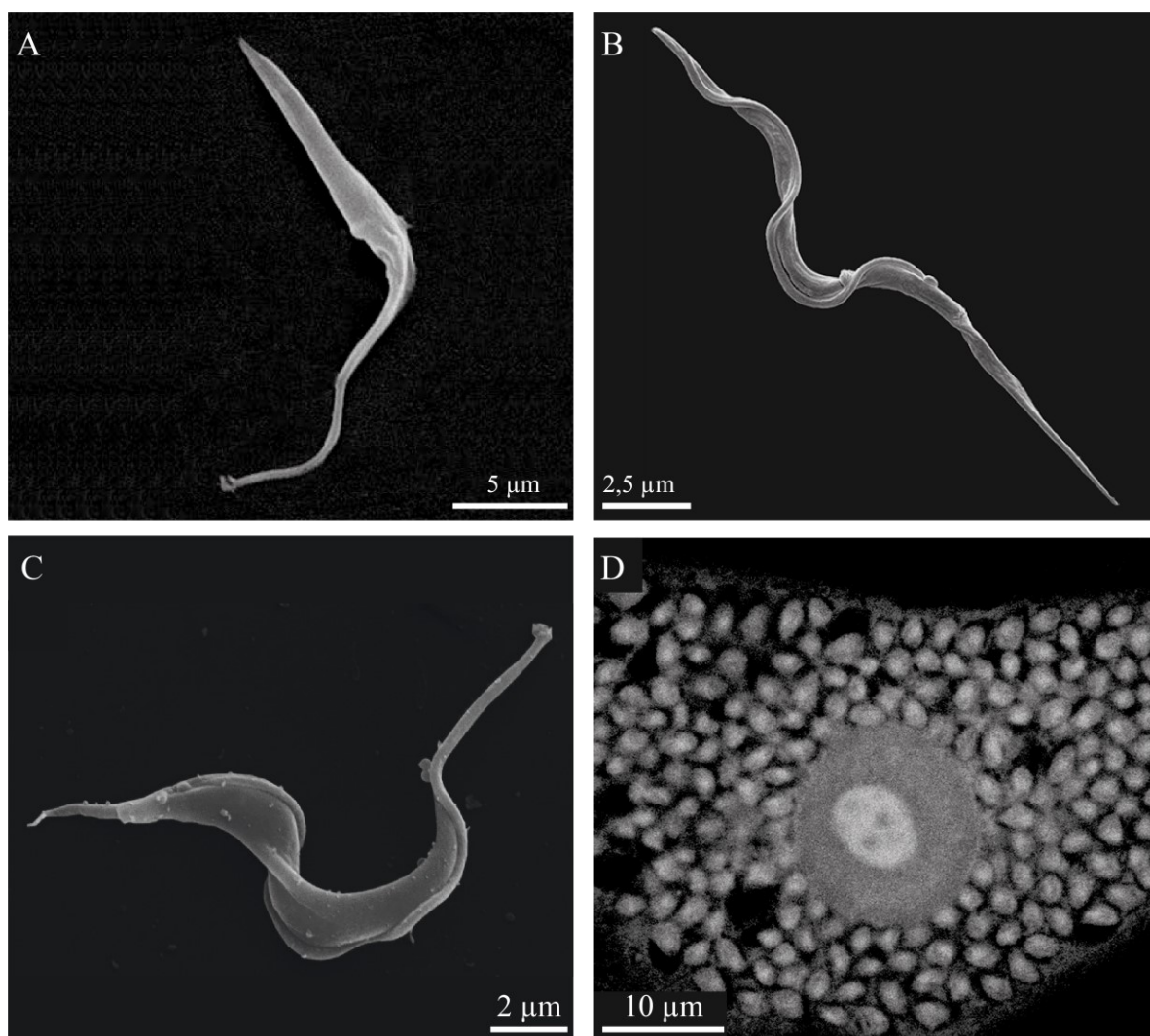
O parasito *T. cruzi* é um protozoário uniflagelado e unicelular classificado na família Tripanosomatidae da classe Kinetoplastea. Os organismos pertencentes a essa classe possuem uma estrutura única entre os eucariotos: o cinetoplasto. Essa estrutura em forma de disco contém o genoma da única mitocôndria presente nesses organismos. O genoma mitocondrial (kDNA) é constituído por milhares de moléculas de DNA circulares concatenadas entre si (minicírculos e maxicírculos). Esses DNAs circulares codificam os genes mitocondriais e os RNAs moldes necessários para a extensa edição dos transcritos desses genes durante o processo de maturação pela adição e deleção de uridinas. Na família dos tripanosomatídeos também estão incluídas as espécies de relevância médica *Trypanosoma brucei* e *Leishmania sp.* que causam a doença do Sono e as Leishmanioses, respectivamente (D'AVILA-LEVY *et al.*, 2015; MASLOV *et al.*, 2019; WHO, 2020). Como espécie, o *T. cruzi* apresenta uma estrutura populacional complexa e com grande heterogeneidade genética. As diferentes linhagens que compõem o táxon são divididas em sete unidades discretas de tipagem (DTUs) denominadas de TcI a TcVI e TcBat (linhagem associada a morcegos) (LIMA *et al.*, 2015; ZINGALES *et al.*, 2009). Em 2016, foi proposta uma classificação alternativa na qual as diferentes linhagens do *T. cruzi* foram colocadas nos clados mtTcI a mtTcIII e TcBat (BARNABÉ *et al.*, 2016).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é considerado complexo em razão da presença de diferentes estágios de desenvolvimento e da alternância entre insetos vetores e hospedeiros mamíferos. A **Figura 2** descreve em detalhes o ciclo de vida do parasito. Com relação aos vetores, estes são insetos hematófagos reduvídeos da subfamília Triatominae. Na América Latina, os principais vetores são *Triatoma infestans*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus* e *Rhodnius pallescens*. Nos insetos, os parasitos se multiplicam como epimastigotas e se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas na sessão posterior do intestino (**Figura 3 A e B**). Durante a metaciclogênese do *T. cruzi* são encontradas pelo menos três formas intermediárias antes da transformação final em tripomastigotas metacíclicas. Em relação aos hospedeiros vertebrados, estes incluem centenas de espécies de mamíferos silvestres e domesticados. Muitas dessas espécies funcionam ainda como reservatórios para o *T. cruzi*. Nesses hospedeiros, os parasitos existem como tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares (**Figura C e D**) (CDC, 2021; GONÇALVES *et al.*, 2018; JANSEN; XAVIER; ROQUE, 2018; PAHO, 2023).

Figura 2 — Ciclo de vida do *T. cruzi*

O ciclo de vida do parasito inclui insetos vetores, hospedeiros mamíferos e diferentes morfologias. O ciclo se inicia quando o inseto vetor triatomíneo, popularmente conhecido como barbeiro, realiza o repasto sanguíneo no hospedeiro mamífero e deposita fezes contaminadas com tripomastigotas metacíclicas (formas não replicativas) próximo ao local da picada (1). As tripomastigotas metacíclicas em seguida entram no novo hospedeiro através do local da picada, lesões preexistentes na pele ou mucosas íntegras como a conjuntiva (2). Após invadirem células nucleadas, as tripomastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas intracelulares, que realizam vários ciclos replicativos por fissão binária (3). As amastigotas então se diferenciam em tripomastigotas sanguíneas (formas não replicativas) que são liberadas pelo rompimento da célula hospedeira. Nesse momento, novos ciclos de infecção podem ocorrer em células adjacentes ou as tripomastigotas podem ganhar a corrente sanguínea e infectar células localizadas em outros tecidos (4). Os parasitos circulantes podem ser ingeridos por insetos vetores durante um novo repasto sanguíneo em humanos ou em outras espécies de mamíferos. Várias dessas espécies também funcionam como reservatórios para o *T. cruzi* (5). No intestino médio do inseto vetor, as tripomastigotas sanguíneas se diferenciam em epimastigotas (6). Essas formas também se replicam nessa porção do trato digestivo (7). No intestino posterior do inseto, ocorre a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas que são as formas infectivas responsáveis pelo reinício do ciclo de transmissão do *T. cruzi* (8) (BERN, 2015; CDC, 2021; WHO, 2023). Fonte: Adaptado de CDC, 2021.

Figura 3 — Micrografias dos principais estágios de desenvolvimento do *T. cruzi*



O *T. cruzi* apresenta quatro estágios principais de desenvolvimento quando o seu ciclo de vida se inicia pela transmissão vetorial. Esses estágios possuem morfologias distintas entre si, sendo chamados de epimastigota (**A**), tripomastigota metacíclica (**B**), tripomastigota sanguínea (**C**) e amastigota intracelular (**D**). Fonte: Adaptado de ALMEIDA *et al.* (2021); GONÇALVES *et al.* (2018); TAKAGI *et al.* (2022); ZUMA ; SOUZA (2022).

1.3 Genoma de referência

O genoma de referência do *T. cruzi* foi publicado no ano de 2005, o que permitiu muitos avanços no conhecimento da biologia do parasito. Primeiramente, foi constatado que o clone CL Brener (TcVI), sequenciado por sua extensa caracterização experimental, é um híbrido resultante da fusão das DTUs TcII e TcIII. Dessa forma, o genoma é composto pelos haplótipos Esmeraldo-like e Não Esmeraldo-like. Além disso, o genoma diplóide que contém cerca de 110,7 Mb é altamente repetitivo, sendo que metade deste corresponde principalmente a repetições subteloméricas, *retrotransposons* e famílias multigênicas como as trans-sialidases. A organização do genoma também foi revelada pelo sequenciamento. Nesse organismo, genes codificadores de proteínas não relacionadas em função são organizados em longos *clusters* gênicos localizados na mesma fita de DNA. No genoma diploide, o número de genes codificadores de proteínas foi estimado em 22 570 (EL-SAYED *et al.*, 2005).

Em 2009, uma revisão do genoma foi realizada visando organizar as sequências em cromossomos. Nesse trabalho, os genes foram distribuídos em 41 pares de cromossomos modelo. Entretanto, a nova organização do genoma ainda apresenta inúmeros *gaps* e sequências que não podem ser assinaladas a nenhum dos cromossomos preditos (WEATHERLY; BOEHLKE; TARLETON, 2009). Atualmente, genomas para diferentes cepas do *T. cruzi* estão disponíveis para consulta nos bancos de dados. No entanto, a dificuldade de se produzir genomas completos e de boa qualidade para esse organismo permanece em função da natureza repetitiva do genoma. Com o surgimento das tecnologias de sequenciamento de *reads* longas, os pesquisadores continuam a aprimorar os genomas disponíveis para a espécie, agora combinando dados produzidos por técnicas de sequenciamento que geram *reads* curtas ou longas (HERREROS-CABELLO *et al.*, 2020). Um dos primeiros benefícios da disponibilidade de genomas melhores para uma espécie é a manipulação genética mais eficiente dos organismos para se estudar a função dos genes. Isso é especialmente importante para o *T. cruzi*, um organismo em que aproximadamente 50% dos genes preditos como codificadores de proteínas não possuem funções conhecidas (BERNÁ *et al.*, 2018; CALLEJAS-HERNÁNDEZ *et al.*, 2018).

1.4 Metabolismo do mRNA, RBPs e a regulação da expressão gênica

Nos tripanosomatídeos, a transcrição dos *clusters* gênicos codificadores de proteínas é realizada pela RNA polimerase II a partir de regiões promotoras enriquecidas em variantes de histonas e marcas epigenéticas (MARTINEZ-CALVILLO *et al.*, 2018). Em virtude da organização genômica, o processo de transcrição resulta na geração de longos pré-RNAs policistrônicos que são praticamente desprovidos de íntrons. Esses RNAs são então individualizados em RNAs monocistrônicos pelos mecanismos de *Spliced Leader trans-splicing* e poliadenilação que ocorrem simultaneamente. Na reação de *trans-splicing* um mini-éxon capeado de 39 nucleotídeos (SL) proveniente da clivagem do RNA *Spliced leader* é adicionado a extremidade 5' de cada um dos transcritos incluídos em um mesmo policístron. O gene do RNA *Spliced Leader* é transcrito independentemente dos outros genes a partir de um dos promotores mais bem caracterizados nos tripanosomatídeos (CLAYTON, 2019; MARTÍNEZ-CALVILLO *et al.*, 2010). Com relação ao início da transcrição pela RNA polimerase II, evidências experimentais demonstram que este processo não é regulado nesse grupo de organismos. Dessa forma, os genes pertencentes aos diferentes policístrons possuem aproximadamente as mesmas taxas de transcrição, embora os níveis de expressão dos mRNAs maduros variem enormemente entre si (CLAYTON, 2019; SMIRCICH *et al.*, 2015). Todas essas características fazem com que a regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos ocorra quase que exclusivamente por mecanismos pós-transcricionais. Um dos mecanismos de regulação gênica pós-transcricional é o processamento alternativo dos mRNAs policistrônicos. A entrada alternativa do SL e da cauda de poli-A pode gerar mRNAs com diferentes elementos regulatórios nas suas regiões não traduzidas ou que não possuam códons de início para a tradução. Os outros mecanismos de regulação gênica dos tripanosomatídeos incluem a localização, a tradução e o decaimento dos transcritos. Dados sugerem a regulação da tradução como um mecanismo chave para a expressão gênica diferencial nesse grupo de organismos (CLAYTON, 2019; KRAMER, 2012; SMIRCICH *et al.*, 2015; TEIXEIRA *et al.*, 2012).

No contexto da regulação gênica pós-transcricional, proteínas ligantes de RNA (RBPs) são componentes essenciais. Essas proteínas frequentemente contêm mais de um domínio proteico, podendo interagir simultaneamente com diferentes regiões das moléculas de RNA, como a cauda poli-A e as regiões não traduzidas (interações RNA-proteína), e ainda com outras proteínas (interações proteína-proteína). Essas interações levam a formação dos chamados complexos ribonucleoproteicos (mRNPs), cuja composição de RBPs define se os transcritos alvos serão processados, exportados do núcleo para o citoplasma, estabilizados para sucessivas

rodadas de tradução, reprimidos traducionalmente ou degradados (**Figura 4**) (CLAYTON, 2019; KRAMER; CARRINGTON, 2011; LUNDE; MOORE; VARANI, 2007; SINGH *et al.*, 2015). Em adição as RBPs e mRNAs, esses complexos também contêm RNAs não codificadores, íons e pequenas moléculas orgânicas (GEHRING; WAHLE; FISCHER, 2017). Além de determinar o destino de transcritos individuais, os mRNPs também possuem a função de organizar os mRNAs nascentes em grupos de transcritos funcionalmente relacionados, os quais são processados e regulados conjuntamente. Esse fenômeno foi denominado de *Regulons* de RNA (KEENE, 2007). Nos tripanosomatídeos, resultados coletados anteriormente sugerem que esse fenômeno também existe nesse grupo de espécies. Dessa forma, foi reportado que transcritos cujos produtos fazem parte de uma mesma via bioquímica ou de um mesmo processo como a biogênese ribossomal e flagelar são coregulados. Muitos dos transcritos relacionados em função até compartilham sítios de ligação para as mesmas RBPs (NAJAFABADI *et al.*, 2013; NOÉ; DE GAUDENZI; FRASCH, 2008; QUEIROZ *et al.*, 2009).

Em consonância com a grande dependência dos mecanismos de regulação gênica pós-transcricionais, o genoma dos tripanosomatídeos contém um grande número de RBPs preditas. Embora a maioria dessas sequências não possua ortólogos em outros eucariotos, as RBPs dos tripanosomatídeos possuem muitos dos domínios de ligação a RNA já conhecidos e extensamente caracterizados em outras espécies, como os domínios RRM e os dedos de Zinco (KRAMER; CARRINGTON, 2011; ROMAGNOLI *et al.*, 2020). No genoma do *T. cruzi* da cepa CL Brener, um trabalho recente identificou 297 genes codificadores para 175 RBPs diferentes. Cada uma das RBPs é codificada por um ou dois alelos correspondentes aos haplótipos Esmeraldo-like e Não Esmeraldo-like. A maioria das sequências identificadas contém domínios RRM e dedos de zinco, mas também foram encontradas sequências contendo domínios PUF, Alba, KH, SAM, S1 e PIWI. Adicionalmente, inúmeras RBPs seguem anotadas como proteínas hipotéticas, reforçando a grande importância da realização de estudos funcionais (TAVARES *et al.*, 2020). Considerando-se a existência de RBPs que não possuem nenhum dos domínios clássicos de interação com a molécula de RNA (RBPs não convencionais), esse número pode ser ainda muito maior no *T. cruzi*. Em outros tripanosomatídeos, dados de captura do interactoma mostraram a presença de ambas as classes de RBPs. No *T. brucei* e *Leishmania donovani* esses experimentos identificaram, respectivamente, 155 e 79 RBPs diferentes. Com relação aos estudos funcionais, pelo menos 30 RBPs já foram caracterizadas no *T. cruzi* (HENTZE *et al.*, 2018; LUEONG *et al.*, 2016; NANDAN *et al.*, 2017; OLIVEIRA *et al.*, 2021; ROMAGNOLI *et al.*, 2020; TAVARES *et al.*, 2020). Alterações nos níveis de expressão de algumas dessas RBPs geraram vários efeitos

adversos nos parasitos, como problemas na metaciclologênese, alterações morfológicas e modificações no ciclo celular. Esse é o caso, por exemplo, das proteínas TcZC3H39, TcZC3H29, TcZC3HTTP, TcZH3H12, TcUBP1 e TcSgn1 (OLIVEIRA *et al.*, 2021; ROMAGNOLI *et al.*, 2020; ROMANIUK; FRASCH; CASSOLA, 2018; TAVARES *et al.*, 2020). Em concordância com esses resultados, o estudo do transcriptoma de parasitos nocautes para TcZH3H12 mostrou que a ausência de uma única RBP pode causar mudanças generalizadas na abundância dos transcritos. Além disso, esse mesmo estudo reportou que os transcritos de pelo menos 20 RBPs, incluindo a TcRBP42, são regulados diferencialmente durante o desenvolvimento do *T. cruzi* principalmente entre epimastigotas e tripomastigotas (TAVARES *et al.*, 2020).

As RBPs dos tripanosomatídeos também são frequentemente estudadas em condições de estresse celular induzidos, por exemplo, pelo tratamento com drogas, privação nutricional e choque térmico. A exposição dos parasitos a diferentes tipos de estresse pode causar diversos efeitos nas RBPs como a realocização dessas proteínas para diferentes compartimentos celulares, condensação em grânulos de RNA, modificações no repertório dos transcritos alvos e até alterações na composição proteica dos mRNPs (ALVES *et al.*, 2014; CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007; FERNÁNDEZ-MOYA *et al.*, 2012; KRAMER, 2014; KRÜGER; HOFWEBER; KRAMER, 2013). No Laboratório de Genética Bioquímica da UFMG, o grupo de pesquisa coordenado pela Professora Glória Regina Franco vem trabalhando na caracterização de RBPs do *T. cruzi* da cepa CL Brener. Estão sendo estudadas tanto em condições normais quanto de estresse as proteínas RBP42 (presente trabalho), DRBD3 (CHAME, 2018) e Alba30 (CHAME, 2018; CHAME *et al.*, 2020).

Os mRNPs também podem ser recrutados e/ou se condensarem em estruturas citoplasmáticas granulares desprovidas de membranas chamadas de grânulos de RNA. Essas estruturas microscopicamente visíveis são formadas pelo processo de transição de fases líquidas mediado por regiões intrinsecamente desordenadas caracteristicamente encontradas em RBPs e em outras proteínas presentes em grânulos de RNA. Evidências recentes também sugerem que os RNAs são componentes essenciais para a formação dessas estruturas, um processo que poderia ser regulado por essas moléculas. Essa última possibilidade é exemplificada pela proteína G3BP1 que em conjunto com G3BP2 é um fator essencial para a formação dos chamados grânulos de estresse (descrição mais adiante). Em condições normais, essa proteína é autoinibida pela interação de duas das suas regiões intrinsecamente desordenadas: um motivo RGG que contém cargas positivas e uma região enriquecida em aminoácidos ácidos. Durante o estresse, os mRNAs são liberados dos polissomos e competem com a região ácida pela interação

com o motivo RGG. Tal competição leva a disponibilização da proteína G3BP1 para o início da formação dos grânulos de estresse (CAMPOS-MELO *et al.*, 2021; GUILLÉN-BOIXET *et al.*, 2020; KEDERSHA *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2015; UVERSKY, 2017). O recrutamento de mRNPs para grânulos é um processo dinâmico e reversível que leva à compartimentalização e a repressão traducional dos transcritos. A formação dos grânulos pode ocorrer constitutivamente no caso dos *P-bodies* ou ser estimulada por condições que levem a uma parada súbita da tradução como acontece no caso dos grânulos de estresse (IVANOV; KEDERSHA; ANDERSON, 2018).

Os *P-bodies* e os grânulos de estresse foram extensamente estudados nos eucariotos. No interior dos *P-bodies* estão presentes proteínas repressoras da tradução como DDX6, proteínas associadas ao decaimento de transcritos como Lsm1-7, Xrn1, DHH1 e DCP1/2 e componentes da via de RNA de interferência como as proteínas AGO 1-4. A composição proteica dessas estruturas segue sendo expandida e já conta com pelo menos 125 proteínas diferentes. Estudos sugerem que a principal função desses grânulos seja o armazenamento e a repressão traducional de mRNPs codificadores de proteínas com funções regulatórias como a metilação de histonas (HUBSTENBERGER *et al.*, 2017; LUO; NA; SLAVOFF, 2018; PARKER; SHETH, 2007; STANDART; WEIL, 2018). No caso dos grânulos de estresse, estes abrigam fatores de início da tradução como o eIF3, a subunidade ribossomal 40S e proteínas como G3BP1/2, eIF2 α , PABP1 e FMRP. Cerca de 464 proteínas já foram identificadas como componentes desses grânulos. Desse montante, aproximadamente metade é classificado como RBPs. As funções dessas estruturas continuam sendo investigadas, mas essas incluem a repressão traducional e a triagem de transcritos, o armazenamento de proteínas e mRNAs, e a inibição da replicação viral. Adicionalmente, os grânulos de estresse também podem ser importantes para a sinalização celular ao sequestrarem fatores como aqueles promotores da apoptose (BUCHAN; PARKER, 2009; IVANOV; KEDERSHA; ANDERSON, 2018; MARCELO *et al.*, 2021). Nos eucariotos, os transcritos ativos traducionalmente presentes na fração polissomal estão em equilíbrio dinâmico com os grânulos de estresse e os *P-bodies*. Esses dois tipos de grânulos de RNA também podem ser acoplados, o que permite que várias proteínas sejam comuns a ambas as estruturas. Essas observações levaram a proposição da existência de um ciclo citoplasmático dos mRNA, durante o qual os mRNPs vão sendo remodelados pela adição/remoção de RBPs e de outras proteínas. Dessa forma, os transcritos podem ser encaminhados para a degradação ou alternarem entre os estados reprimido e ativo traducionalmente ao realizarem o intercâmbio entre a fração polissomal, grânulos de estresse e *P-bodies* (**Figura 4**) (BALAGOPAL; PARKER, 2009; DECKER; PARKER, 2012).

Nos tripanosomatídeos, a formação de grânulos de RNA também acontece, tendo sido reportada inúmeras vezes na literatura. Foram caracterizados até o momento um repertório de pelo menos seis tipos de grânulos de RNA, todos estudados no contexto do estresse celular nos parasitos *T. cruzi* e *T. brucei*. Diferentes tipos de estresse ocorrem naturalmente durante o ciclo de vida desses organismos que alternam entre insetos vetores e hospedeiros vertebrados. Essa alternância de hospedeiros já implica, por exemplo, em alterações de temperatura, disponibilidade de nutrientes e pH. Os grânulos identificados foram nomeados de grânulos *P-body like*, grânulos de estresse nutricional e de choque térmico, grânulos do polo posterior e da periferia nuclear, e grânulos contendo metades de tRNA (**Figura 5**). O estudo da composição proteica dessas estruturas mostrou que estas compartilham várias proteínas como DHH1, XRNA, SCD6 e eIF4E1. As funções desses grânulos ainda precisam ser elucidadas nos tripanosomatídeos, mas estas podem ser especialmente importantes para regular a expressão dos genes em resposta ao estresse. Isso porque esses organismos praticamente não controlam o início da transcrição de seus genes (ALVES; GOLDENBERG, 2016; KRAMER, 2012; 2014).

Os grânulos *P-body like* assim como ocorre em outros eucariotos possuem expressão constitutiva no *T. cruzi* e no *T. brucei*, aumentando em número e tamanho em resposta a condições de estresse que causem a repressão traducional. Na composição dessas estruturas estão incluídas as proteínas DHH1, CAF1, XRNA e o eIF4E1 (**Figura 5**). No entanto, marcadores clássicos de *P-bodies* como as proteínas do complexo de decapeamento DCP1/2 e Lsm 1-7 não foram encontrados nesses grânulos. Os tripanosomatídeos não possuem ortólogos para essas proteínas, mas as funções atribuídas a elas podem ser desempenhadas por outras proteínas como a SCD6 e ALPH1. No *T. brucei*, a SCD6 foi descrita como um fator essencial para a formação dos grânulos *P-body-like*. Já a proteína ALPH1 é a principal proteína associada ao decapeamento nesse organismo (HOLETZ *et al.*, 2010; HOLETZ *et al.*, 2007; KRAMER, 2014; KRAMER, 2017; KRAMER *et al.*, 2008; KRÜGER; HOFWEBER; KRAMER, 2013).

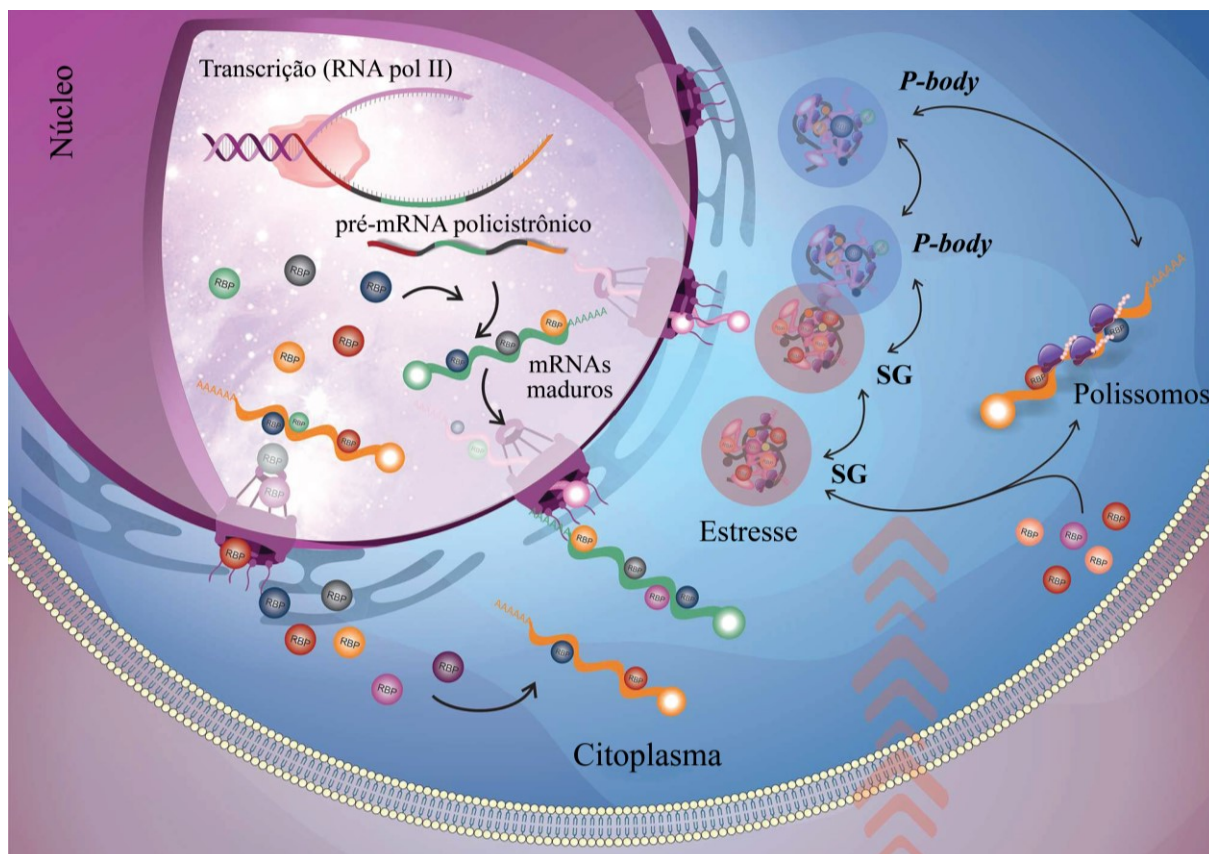
Os grânulos de estresse nutricional estão entre aqueles mais estudados nos tripanosomatídeos. Estes são formados em resposta à escassez de fontes de carbono. A função desses grânulos ainda não foi esclarecida, mas experimentos mostram que estes podem funcionar como centros de triagem de transcritos. Dessa forma, grupos de mRNAs importantes para a recuperação celular dos parasitos poderiam ser armazenados nessas estruturas e direcionados novamente para o reinício da tradução durante a recuperação pós-estresse. Essas estruturas, que parecem não possuir subunidades ribossomais, contêm proteínas como DRBD3, ALBA 1-4, DHH1, SCD6, PABP1 e XRNA (**Figura 5**) (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007; FERNÁNDEZ-MOYA *et al.*, 2012; KRAMER, 2014).

Os grânulos de estresse de choque térmico e do polo posterior foram ambos identificados no *T. brucei* submetido ao estresse por temperatura. Esses grânulos são formados na ausência de fosforilação do fator eIF2 α , contrastando com o que ocorre comumente nos eucariotos. Essas estruturas se localizam na periferia dos parasitos, abrigam marcadores típicos de grânulos de estresse como as proteínas PABP1 e eIF3B, e possuem RNAs provenientes da dissociação dos polissomos. Embora o choque térmico também induza o aumento do número de grânulos *P-body-like*, estes permanecem em sua maioria independentes dos grânulos de estresse de choque térmico. No mesmo trabalho, os autores também identificaram o grânulo do polo posterior. Esse grânulo ocorre de forma única na região posterior dos parasitos e possui como marcador a proteína XRNA (**Figura 5**) (KRAMER *et al.*, 2008).

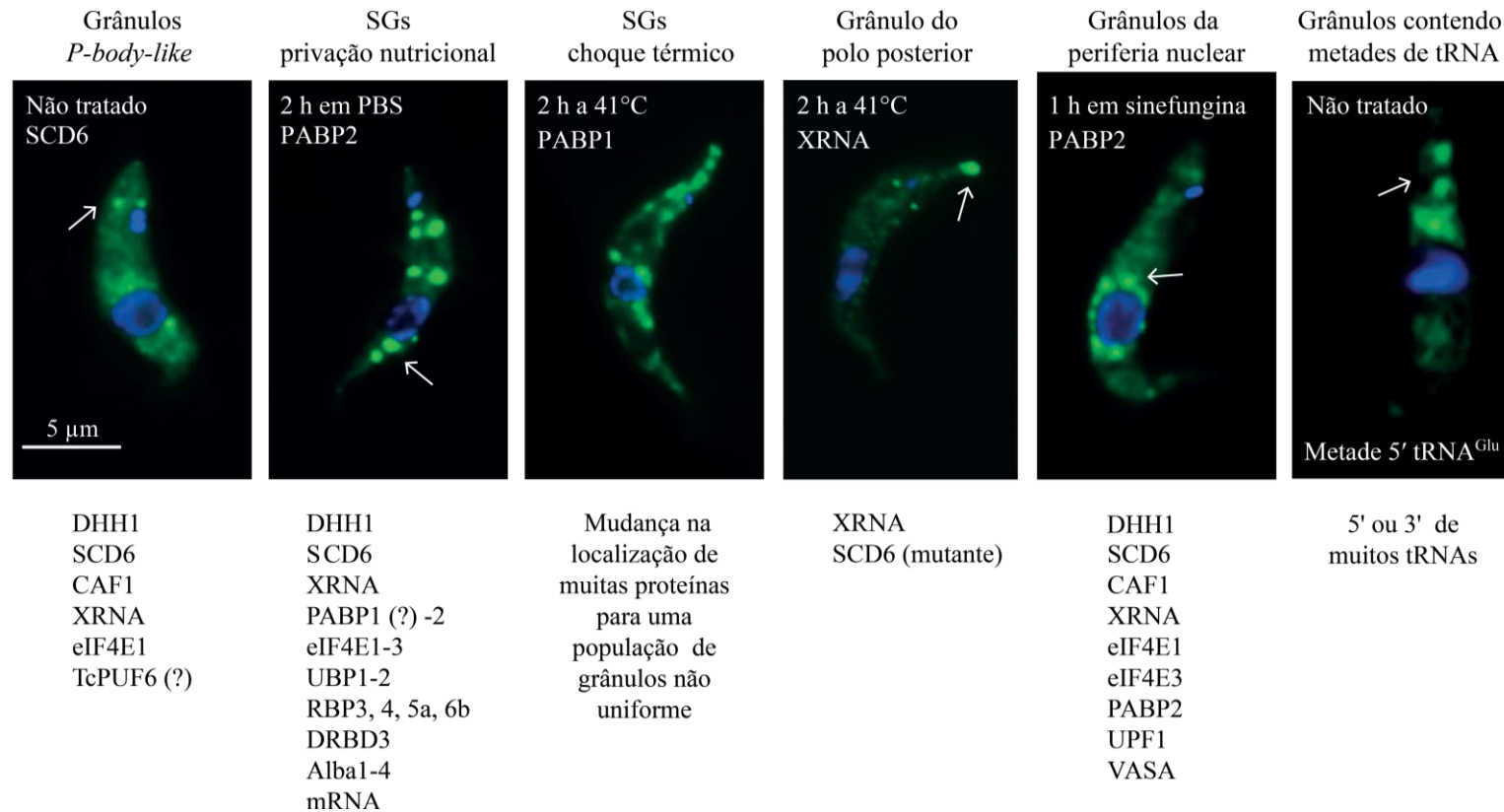
Os grânulos da periferia nuclear se formam em resposta a inibição da maturação dos transcritos policistrônicos pelo processo de *Spliced Leader trans-splicing*. Essa inibição causa o acúmulo de transcritos parcialmente processados em grânulos localizados na face citoplasmática da periferia nuclear. Especula-se que a imobilização dos transcritos defeituosos nessas estruturas impeça o acesso desses à maquinaria de tradução, servindo dessa forma como um ponto adicional no controle de qualidade dos mRNAs. Dessa forma, a formação desses grânulos requer uma estrutura nuclear íntegra, transcrição ativa e problemas no *trans splicing* dos transcritos. A composição proteica desses grânulos se sobrepõe àquela dos *P-bodies*, contendo proteínas como DHH1 e SCD6 (**Figura 5**). Entretanto, a formação dessas estruturas é independente de SCD6. Além disso, a proteína VASA foi encontrada exclusivamente nessas estruturas. Esses grânulos também foram identificados no *T. brucei* (KRAMER *et al.*, 2012).

Os grânulos de tRNAs contêm pequenos fragmentos derivados da clivagem de tRNAs. Esses fragmentos se originam principalmente da região 5' dessas moléculas e se concentram em grânulos localizados na região posterior do *T. cruzi* (**Figura 5**). A função dessas estruturas ainda não foi definida, mas estas aumentam em número durante o estresse nutricional (GARCIA-SILVA *et al.*, 2010). Uma vez que a produção desses pequenos fragmentos de RNA ocorre ativamente nos parasitos, suspeita-se que estes possam desempenhar algum papel na regulação da expressão gênica, uma vez que a via de RNA de interferência (RNAi) não ocorre naturalmente no *T. cruzi* (DAROCHA *et al.*, 2004a).

Figura 4 — Metabolismo do mRNA nos tripanosomatídeos



As proteínas ligantes de RNA são componentes essenciais para o metabolismo do RNA. Estas se ligam aos seus transcritos alvos assim que a transcrição destes é iniciada pela RNA polimerase II (RNA pol II). Essa interação regula a maturação dos pré-mRNAs polistrônicos (*Spliced Leader trans-splicing* e poliadenilação) e a exportação dos transcritos individualizados para o citoplasma dos parasitos. No novo compartimento celular, o destino dos mRNAs maduros é definido pela nova composição dos complexos ribonucleoproteicos remodelados pela adição de RBPs citoplasmáticas e daquelas exportadas do núcleo. Dependendo das condições celulares, os mRNAs podem ser encaminhados para a tradução nos polissomos, repressão traducional reversível no interior de grânulos de RNA ou decaimento. Esses grânulos podem ser de expressão constitutiva (*P-bodies* – corpos de processamento) ou induzidos por condições de estresse como a privação nutricional e choque térmico (SG – grânulos de estresse). Um ciclo dinâmico do mRNA existe entre a fração polissomal, os grânulos de estresse e os *P-bodies*. Esses grânulos de RNA, por sua vez, também podem ser acoplados. RBP: Proteína ligante de RNA. Fonte: Adaptado de ROMAGNOLI *et al.* (2020).

Figura 5 — Grânulos de RNA descritos nos tripanosomatídeos

Os grânulos de RNA dos tripanosomatídeos foram identificados em condições normais de cultivo e após a indução do estresse celular pela privação nutricional, aumento de temperatura e tratamento com a droga sinefungina. Com exceção dos grânulos contendo as metades de tRNA que foram identificados no *T. cruzi*, todos os outros grânulos foram estudados no *T. brucei*. As proteínas identificadas em cada grânulo estão relacionadas abaixo das imagens correspondentes e mostram que uma mesma proteína pode estar presente em várias dessas estruturas. Todas as imagens foram adquiridas por Microscopia de fluorescência. Setas indicam grânulos específicos. Barra de magnificação: 5 μ m. O DNA foi corado em azul e as proteínas e tRNA foram marcadas em verde. SGs: grânulos de estresse e PBS: tampão fosfato-salino. Fonte: Adaptado de KRAMER (2014).

1.5 Proteína Ligante de RNA 42

A proteína ligante de RNA 42 da cepa de referência para o *T. cruzi* (TcRBP42) é o objeto de estudo dessa tese, que visa expandir os conhecimentos sobre essa proteína tanto em condições normais quanto de estresse. Atualmente, a literatura disponível para a RBP42 da espécie se limita a uma única publicação científica que utilizou o *T. cruzi* da cepa Y (TcYRBP42). Nesse trabalho, os autores mostraram que TcYRBP42 é uma proteína citoplasmática expressa em epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas (WEISBARTH *et al.*, 2018). Embora esse trabalho não tenha investigado a expressão dessa proteína durante a metaciclogênese, uma análise proteômica realizada para identificar as proteínas reguladas durante a diferenciação do *T. cruzi* (cepa Dm28c) mostrou que nesses parasitos a proteína RBP42 também é expressa em tripomastigotas metacíclicas (AMORIM *et al.*, 2017). Assim como acontece frequentemente nos tripanosomatídeos, a proteína RBP42 foi primeiramente estudada no *T. brucei* (TbRBP42) (DAS *et al.*, 2012). Nesse organismo, a existência de uma via de RNAi funcional somada a disponibilidade de sistemas induzíveis facilitou enormemente o estudo de novos genes (NGÔ *et al.*, 1998; WIRTZ; CLAYTON, 1995). Nesse organismo, TbRBP42 foi identificada pela primeira vez como uma proteína hipotética purificada conjuntamente com a subunidade RBP4 da RNA polimerase II. Posteriormente, essa proteína foi nomeada pelos autores de RBP42 para refletir o fato desta ter sido a quadragésima segunda RBP identificada na família dos tripanosomatídeos (DAS *et al.*, 2006; DAS *et al.*, 2012). Além das espécies *T. cruzi* e *T. brucei*, a proteína RBP42 também foi estudada em *L. braziliensis* (LbRBP42) (NOCUA *et al.*, 2017; NOCUA; REQUENA; PUERTA, 2021).

Com relação à estrutura da proteína RBP42 esta foi caracterizada utilizando métodos computacionais. Para todos os ortólogos estudados, foi identificada uma estrutura modular composta por dois domínios conservados, NTF2-like e RRM, interligados por uma longa região central predita como intrinsecamente desordenada. Essa região também contém motivos ricos no aminoácido prolina com o consenso PxxP (P: prolina e x: qualquer outro aminoácido). Os pesquisadores também detectaram a similaridade estrutural entre TbRBP42 e a proteína humana G3BP1. Apesar da baixa similaridade de sequência, essas proteínas possuem basicamente a mesma composição de domínios e motivos, com exceção do motivo RGG e de uma região enriquecida em aminoácidos ácidos (40%) que estão presentes exclusivamente em G3BP1. Adicionalmente, o domínio RRM de todos os ortólogos de RBP42 estudados até o momento apresentam apenas um dos dois motivos de ligação ao RNA característicos desse domínio, o RNP1 (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018). A função desses

domínios e motivos ainda não foi definida experimentalmente para nenhum dos ortólogos de RBP42. No entanto, em outras proteínas já caracterizadas funcionalmente, o domínio NTF2-like (Fator de transporte nuclear 2-like) e os motivos ricos em prolina estão associados com interações entre proteínas (EBERHARDT *et al.*, 2013; ZARRINPAR; BHATTACHARYYA; LIM, 2003), enquanto os RRM são domínios clássicos de interação com a molécula de RNA (CORLEY; BURNS; YEO, 2020). Quando um domínio NTF2-like é combinado com um RRM, este também pode contribuir para a interação com o RNA. Esse fenômeno foi descrito anteriormente para o complexo de exportação de RNA Mex67:Mtr2 da espécie *Saccharomyces cerevisiae* (AIBARA *et al.*, 2015).

No que se refere ao primeiro estudo funcional de RBP42, este foi realizado no *T. brucei*. Nesse organismo, TbRBP42 é uma proteína citoplasmática essencial para a viabilidade dos parasitos. Em concordância com esse resultado, não foi possível obter parasitos nocautes para o gene de TbRBP42. Utilizando-se a técnica de RNAi, foi demonstrado que o *knockdown* dos níveis de expressão desse gene causa vários efeitos nas formas procíclicas, que são as formas replicativas presentes no inseto vetor. Após a indução do sistema de RNAi, foram detectados defeitos de citocinese, alterações morfológicas e problemas no crescimento das culturas. Esse último efeito foi acompanhado de uma baixa taxa de síntese proteica. Em um segundo estudo concebido para identificar genes essenciais no *T. brucei*, os pesquisadores associaram a depleção dos transcritos de TbRBP42 com defeitos no crescimento das formas sanguíneas e das formas procíclicas, além de problemas no processo de diferenciação dos parasitos (ALSFORD *et al.*, 2011; DAS *et al.*, 2012). No trabalho conduzido por Das e colaboradores (2012), também foram realizados experimentos de fracionamento do conteúdo celular seguidos pela digestão dos polissomos com RNase. Os resultados mostraram que nas formas procíclicas TbRBP42 está associada diretamente aos transcritos presentes na fração polissomal. Adicionalmente, o *crosslinking* seguido da imunoprecipitação dos complexos de TbRBP42 mostrou que essa proteína se liga majoritariamente a região codificadora de transcritos do metabolismo energético. Esses mRNAs codificam, por exemplo, enzimas da via glicolítica, do ciclo do ácido cítrico e do metabolismo do aminoácido prolina. Por fim, um artigo disponibilizado apenas no formato *preprint* mostrou que as funções de TbRBP42 também são conservadas nas formas sanguíneas. Utilizando-se uma estratégia de *knockdown* condicional dos níveis da proteína TbRBP42 foi mostrado que sua depleção causa apenas pequenas alterações na abundância dos transcritos do metabolismo energético. No entanto, os níveis das enzimas codificadas por esses mRNAs são em sua maioria reduzidos. Como esperado, essa redução também resulta na diminuição dos intermediários da via glicolítica, ciclo do ácido cítrico e oxidação de

aminoácidos. Todos os resultados indicam que TbRBP42 regula a tradução dos transcritos (DAS *et al.*, 2021).

Em *L. braziliensis*, a proteína ortóloga LbRBP42 foi inicialmente identificada como uma das proteínas hipotéticas associadas à região 3' UTR do transcrito de HSP70-II (RAMÍREZ *et al.*, 2013). Nesse organismo, os autores mostraram por meio de ensaios de desvio da mobilidade eletroforética que LbRBP42 interage com grande afinidade com um elemento rico em adeninas e uracilas (ARE) presente na região 3' UTR desse transcrito. Essa proteína também foi estudada no estresse por temperatura, o qual não alterou os níveis proteicos de LbRBP42. No entanto, o estresse modifica a localização dessa proteína. Após o choque térmico, a proteína antes distribuída por todo o citoplasma das promastigotas (forma presente no inseto vetor) é relocada e concentrada na periferia nuclear (NOCUA *et al.*, 2017). O mesmo grupo de pesquisa também identificou as proteínas presentes no interactoma de LbRBP42 por Espectrometria de Massas. Essa análise identificou um total de 173 proteínas, das quais um grande número está relacionado a maquinaria de tradução como fatores de início da tradução e proteínas estruturais dos ribossomos. Também foram encontradas inúmeras proteínas com funções no metabolismo de RNA e na regulação da estabilidade e tradução dos transcritos. É interessante comentar que várias proteínas presentes no interactoma de LbRBP42 foram associadas anteriormente aos grânulos de RNA dos tripanosomatídeos. Entre estas então Alba3, PABP2, DBD2 e SCD6 (NOCUA; REQUENA; PUERTA, 2021).

1.6 Manipulação genética do *T. cruzi*

A manipulação do genoma dos organismos é frequentemente utilizada no estudo da função dos genes. No *T. cruzi*, as primeiras tentativas realizadas para gerar parasitos expressores de genes exógenos remontam a década de 1990. Em um dos trabalhos publicados na época, os parasitos foram eletroporados com um vetor contendo o gene bacteriano cloranfenicol acetiltransferase sob controle do promotor do gene *Spliced Leader* (LU; BUCK, 1991). No entanto, o conhecimento limitado sobre os elementos necessários para o correto processamento e expressão dos genes do *T. cruzi* levava a expressão transiente de baixos níveis dos genes repórteres. Com o avanço dos conhecimentos sobre a expressão gênica do *T. cruzi* foram construídos vetores cada vez mais eficientes para a expressão de genes exógenos nesse parasito (TEIXEIRA; EL-SAYED; ARAÚJO, 2011). A melhora dos protocolos de eletroporação somada a inclusão de novos elementos regulatórios nos vetores (promotor de RNA ribossomal, regiões aceptoras do *Spliced Leader* e da cauda poli-A, e ainda regiões não

traduzidas de diferentes genes) aumentaram enormemente os níveis de expressão dos genes repórteres (BARTHOLOMEU *et al.*, 2002; DAROCHA *et al.*, 2004b; TEIXEIRA; KIRCHHOFF; DONELSON, 1995; VAZQUEZ; LEVIN, 1999). Atualmente, vários vetores plasmidiais estão disponíveis para uso no *T. cruzi*. Entre esses está o vetor pROCKGFP_NEO, o qual é frequentemente utilizado para a expressão estável dos genes de interesse nesse organismo (BURLE-CALDAS *et al.*, 2015; DAROCHA *et al.*, 2004b). Nesse trabalho, variações desse vetor são utilizadas para expressar proteínas marcadas com *tags* de afinidade no *T. cruzi*. Além da expressão de genes exógenos, a outra dificuldade encontrada no estudo de genes no *T. cruzi* foi a produção de parasitos nocautes para os genes de interesse. A estratégia tradicional é laboriosa, requer longos períodos para a sua execução e muitas vezes apenas um dos alelos é deletado. Essa estratégia se baseia na integração de cassetes de deleção ao genoma dos parasitos. A técnica de RNAi chegou a ser testada como alternativa para estudar os genes através do *knockdown* dos seus níveis de expressão. Entretanto, foi descoberto que a via de RNAi não está naturalmente presente no *T. cruzi*. Atualmente, vários protocolos estão disponíveis para o estudo das funções dos genes. Podem ser empregados, por exemplo, sistemas que permitem a superexpressão de genes e/ou a adição de *tags* de afinidade, a expressão induzível ou o nocaute condicional de genes e de proteínas. Recentemente, também foram desenvolvidos protocolos de manipulação genética baseados no sistema de CRISPR/Cas9 (BURLE-CALDAS *et al.*, 2015; DAROCHA *et al.*, 2004a).

A tecnologia de edição gênica pelo sistema de CRISPR/Cas9 começou a ser desenvolvida no ano de 2012 e vem promovendo uma revolução na maneira como os cientistas manipulam o genoma de seus organismos de interesse. Nesse sistema, uma molécula de RNA denominada de *single guide* direciona a endonuclease Cas9 para uma região específica do genoma. A complementaridade de bases entre a sequência guia (*protospacer*) e a região genômica de interesse adjacente a um motivo PAM (*protospacer adjacent motif*) induz a clivagem da fita dupla de DNA pela Cas9. O reparo de DNA é então estimulado e pode ser guiado por uma molécula de DNA doadora desenhada para inserir as modificações pretendidas. Esse sistema pode ser facilmente reprogramado pela alteração da sequência guia utilizada (DOUDNA; CHARPENTIER, 2014; JINEK *et al.*, 2012). A nova tecnologia logo começou a ser aplicada na manipulação genética do *T. cruzi* e diversos protocolos já estão disponíveis para uso nos tripanosomatídeos (LANDER; CHIURILLO, 2019). Nesse trabalho, epimastigotas Nocautes para TcRBP42 foram produzidas utilizando-se uma versão do sistema de CRISPR/Cas9 baseada na eletroporação dos parasitos com complexos ribonucleoproteicos produzidos *in vitro*. Apesar de sua relativa baixa eficiência, essa abordagem apresenta como

vantagens a ausência de marcadores de resistência que inserem grandes modificações no genoma, a agilidade na produção dos oligonucleotídeos doadores a serem utilizados no reparo de DNA por recombinação homóloga e a expressão não constitutiva dos componentes do sistema. Enquanto a utilização de marcadores de seleção limita o número de genes que podem ser editados em uma mesma linhagem de *T. cruzi*, a expressão constitutiva dos componentes do sistema é frequentemente indesejável. Esta última consideração é especialmente importante quando se leva em conta a ocorrência de eventos *off target*. Embora essa estratégia não elimine a ocorrência desses eventos, esta limita o tempo de ação do sistema no genoma dos parasitos (BURLE-CALDAS *et al.*, 2018; SOARES-MEDEIROS *et al.*, 2017). Vale destacar que a utilização da tecnologia de edição gênica por CRISPR/Cas9 tem o potencial para acelerar os estudos sobre as funções das RBPs no *T. cruzi*. Utilizando-se a estratégia tradicional, apenas um grupo de pesquisa obteve sucesso na geração de parasitos nocautes para uma RBP (ROMAGNOLI *et al.*, 2020).

1.7 Efeitos da Radiação Gama

Os raios gama são um tipo de radiação eletromagnética altamente penetrante que gera a ionização de átomos e moléculas. Esse efeito acontece direta ou indiretamente pela geração de radicais livres, o que pode causar o estresse oxidativo. Nos sistemas biológicos, a exposição a esse tipo de radiação pode levar a morte dos organismos pela indução de vários tipos de lesões na molécula de DNA como as quebras de fita simples e de fita dupla. A letalidade da radiação gama para células e microrganismos motivou a grande aplicação desse tipo de radiação na medicina. Nesse campo do conhecimento, as aplicações utilizando raios gama vão desde a esterilização de materiais até o tratamento de pacientes previamente a realização de transplantes de medula óssea (HARRELL *et al.*, 2018; RHEE *et al.*, 2012; SABLOFF *et al.*, 2021; SAGE; SHIKAZONO, 2017).

No *T. cruzi*, a radiação gama foi utilizada pela primeira vez sem sucesso para a produção de uma vacina atenuada contra a doença de Chagas na década de 1960 (CHIARI; MANSUR NETO; BRENER, 1968). Em 1969, uma segunda publicação investigou os efeitos da radiação no crescimento e na infectividade dos parasitos (MARTÍNEZ-SILVA *et al.*, 1969). Estudos seguiram sendo realizados e a radiação gama chegou a ser testada como um método alternativo para a eliminação do parasito do sangue destinado à hemoterapia (TAKEDA *et al.*, 1986). Entretanto, as doses utilizadas com essa finalidade são consideradas extremamente altas para os padrões de segurança atuais. No Brasil, por exemplo, o Ministério da Saúde recomenda a

irradiação de sangue e/ou hemocomponentes com apenas 25 Gy de radiação gama (BRASIL, 2016). Desde os primeiros estudos publicados ficou evidente para a comunidade científica que o *T. cruzi* é extremamente resistente aos raios gama. Experimentos realizados no Laboratório de Genética Bioquímica (LGB) da UFMG mostraram que a dose de radiação letal para esse parasito se aproxima dos 3000 Gy (ASSIS, 2019). A título de comparação, a exposição do corpo humano a uma dose de apenas 10 Gy de radiação gama já é suficiente para causar a morte da maioria dos indivíduos (CDC, 2018).

Os mecanismos moleculares que conferem ao *T. cruzi* a sua grande resistência à radiação gama vem sendo investigados pelo LGB por pelo menos duas décadas. Apesar do grande esforço e tempo investido na elucidação desses mecanismos, estes ainda não são inteiramente conhecidos. Até o momento, os principais resultados coletados sugerem mecanismos relacionados a um reparo de DNA muito eficiente, regulação diferencial da expressão dos genes e alterações no proteoma.

Os primeiros resultados referentes ao reparo de DNA mostraram que uma dose de 500 Gy de radiação gama leva a uma extensa fragmentação do genoma do *T. cruzi*. Surpreendentemente, esse genoma é reparado em até 48 h e as culturas retomam o seu crescimento em aproximadamente 144 h. Esse reparo eficiente do genoma está provavelmente relacionado a enzima Rad51, que faz parte da via de reparo de DNA por recombinação homóloga. Além desse tipo de radiação ionizante causar o aumento nos níveis da expressão dos transcritos desse gene, os parasitos superexpressores dessa enzima reparam o genoma e retomam o crescimento mais rapidamente que os controles (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Em concordância com esse resultado, o reparo do genoma de parasitos com expressão reduzida desse gene leva muito mais tempo (SILVA *et al.*, 2018). Uma segunda enzima da via de reparo por recombinação homóloga, a Topo3 α , também foi estudada no contexto da radiação gama e mostrou que parasitos nocautes para essa proteína não retomam o crescimento após o tratamento com a mesma dose de radiação (COSTA-SILVA *et al.*, 2021).

A análise da expressão dos genes após o tratamento com radiação gama foi realizada por meio de experimentos de microarranjo de RNA. Ao contrário do que acontece com o DNA, a integridade dos RNAs não parece ser significativamente afetada por esse tipo de radiação ionizante. Nos parasitos irradiados, o RNA ribossomal aparece íntegro na análise eletroforética em gel de agarose. O estresse por radiação gama causa tanto a superexpressão quanto a subexpressão de genes. Os genes superexpressos pertencem à família dos *Retrotransposons hot spots* ou codificam proteínas hipotéticas. Já os genes subexpressos possuem em sua maioria funções conhecidas como a tradução de proteínas (GRYNBERG *et al.*, 2012). A localização

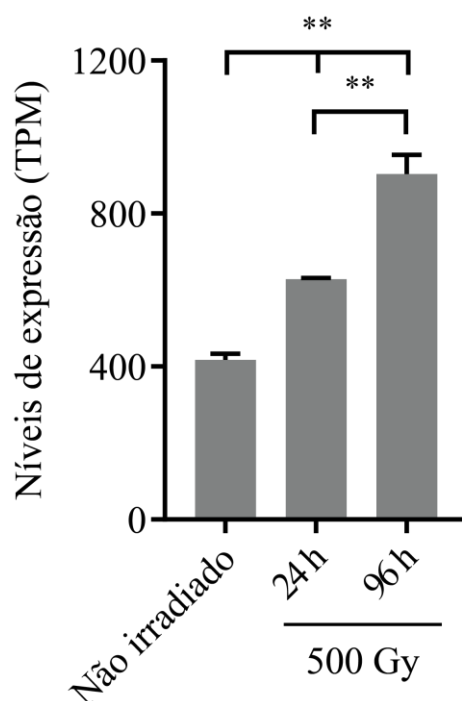
dos RNAs também foi analisada por Microscopia de fluorescência. Através da realização de pulsos de marcação com um análogo de uridina, foi detectada a transcrição de novos RNAs 24 h após a irradiação dos parasitos. Isso, porém, não aconteceu no tempo de 48 h (**APÊNDICE D**). Cabe ressaltar que no tempo de 24 h após a irradiação, o genoma dos parasitos ainda se encontra fragmentado. A importância dessa resposta transcricional inicial para a radiorresistência do *T. cruzi* ainda não foi determinada. Dessa forma, outros experimentos serão necessários para interpretar esses achados (CHAME, 2018; LAET-SOUZA, 2019).

Por fim, foi analisado o proteoma dos parasitos irradiados. Nesse trabalho foi verificado que a síntese *de novo* de proteínas é essencial para a resposta do *T. cruzi* à radiação gama. Nesse sentido, muitas proteínas envolvidas na síntese proteica são superexpressas em resposta a irradiação. Adicionalmente, inúmeras enzimas são subexpressas, estando entre elas algumas enzimas da via glicolítica como a Enolase citoplasmática. Outro efeito identificado no proteoma foi a indução da expressão de isoformas mais curtas das mesmas proteínas, o que não resultou da degradação proteica. Esse fenômeno sugere que a resposta dos parasitos à radiação gama inclui alterações pós-transcricionais como o *Splicing* alternativo e/ou alterações pós-traducionais como o processamento proteico (VIEIRA *et al.*, 2014).

Outro efeito da radiação gama que foi detectado recentemente no *T. cruzi* é o aumento da frequência de epimastigotas dormentes nas culturas (RESENDE *et al.*, 2020). Os parasitos dormentes se replicam muito lentamente e ocorrem em baixa frequência na população. Nos últimos anos, esse fenômeno vem sendo relacionado às falhas terapêuticas observadas regularmente no tratamento da doença de Chagas. Durante a administração da terapia, os parasitos com maior taxa proliferativa são eliminados, mas aqueles que estão dormentes permanecem viáveis e podem restabelecer a infecção (SÁNCHEZ-VALDÉZ *et al.*, 2018). Dessa forma, a radiação gama pode vir a ser testada futuramente como um método para a indução de maiores taxas de dormência no *T. cruzi* a ser utilizado na triagem de novos compostos contra a doença de Chagas. Todos os resultados aqui apresentados evidenciam o quão complexos são os mecanismos de radiorresistência do *T. cruzi*.

Considerando-se que a regulação da expressão gênica está possivelmente relacionada aos mecanismos de resistência do *T. cruzi* à radiação gama, um projeto foi proposto e aprovado para o estudo de proteínas ligantes de RNA no contexto do estresse induzido por esse tipo de radiação ionizante. Nesse sentido, a proteína TcRBP42, que na época ainda estava anotada como hipotética, foi uma das proteínas escolhidas para a caracterização após um experimento de *RNA-seq* (dados não publicados) detectar aumentos significativos nos níveis dos transcritos dos genes de TcRBP42 em resposta a irradiação dos parasitos (**Figura 6**).

Figura 6 — Níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 mensurados em epimastigotas WT por *RNA-seq*



A expressão dos transcritos de TcRBP42 foi mensurada em epimastigotas WT do *T. cruzi* da cepa CL Brener a partir de dados de *RNA-seq*. Nesse experimento, os parasitos foram tratados ou não com 500 Gy de radiação gama e analisados nos tempos de 24 e 96 h após a indução do estresse. Para tanto, os RNAs totais dos parasitos foram extraídos com os reagentes *TRIzol*TM (Thermo Fischer Scientific) e *RNeasy Mini kit* (Qiagen) e utilizados na construção de bibliotecas *paired end* com o kit *TruSeq Stranded mRNA* (Illumina). O sequenciamento foi realizado com o equipamento *HiSeq 2500* (Illumina). As *reads* foram mapeadas no genoma de referência para o *T. cruzi* com o *software* STAR (DOBIN *et al.*, 2012), sendo que apenas as *reads* com mapeamento único foram utilizadas no cálculo dos níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42. As diferenças estatísticas foram avaliadas com o teste *One-Way* ANOVA corrigido pelo método de Tukey (** p-valor < 0,01). Os dados da condição normal foram depositados no *Sequence Read Archive* (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) sob o número de acesso SRP072756. TPM: transcritos por milhão. Fonte: Elaborado pelo autor.

2 JUSTIFICATIVA

Proteínas ligantes de RNA (RBPs) são elementos essenciais para o metabolismo de mRNA no *T. cruzi*, um organismo que realiza a regulação de sua expressão gênica quase que exclusivamente por mecanismos pós-transcricionais (KRAMER, 2012). Nesse trabalho, a caracterização da proteína ligante de RNA 42 da cepa de referência para o *T. cruzi* (TcRBP42) foi proposta. Poucas informações estão disponíveis sobre a proteína da espécie, sendo os dados limitados a uma única publicação científica (WEISBARTH *et al.*, 2018). Dessa forma, visamos com este trabalho contribuir para o entendimento das funções dessa proteína tanto em condições normais quanto de estresse. Para isso, serão estudados os efeitos da superexpressão e nocaute de seus genes codificadores em vários aspectos da biologia do parasito, como a viabilidade celular, crescimento das culturas e expressão de alguns genes. Experimentos realizados anteriormente no *T. brucei* mostraram que a proteína RBP42 é essencial para a sua viabilidade (DAS *et al.*, 2012). Nesse organismo, essa proteína interage principalmente com transcritos do metabolismo energético. Com relação ao estresse, o estudo da proteína TcRBP42 no contexto da radiação gama, que foi iniciado no meu Mestrado, é inédito na literatura dos tripanosomatídeos e visa contribuir para a ampliação do conhecimento acerca dos mecanismos de radiorresistência do *T. cruzi*. Trabalhos realizados previamente no LGB mostraram que o *T. cruzi* pode resistir a doses superiores a 1,5 kGy de radiação gama (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). As RBPs podem desempenhar um papel essencial na resposta desse organismo ao estresse por radiação ionizante ao se agregarem em grânulos de RNA e/ou regularem a abundância de transcritos que sejam importantes para essa resposta. Resultados anteriores sugerem que a condensação das RBPs e os seus RNAs associados em grânulos citoplasmáticos podem funcionar no armazenamento de transcritos importantes para a recuperação pós-estresse do *T. cruzi* (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar a proteína RBP42 do parasito *Trypanosoma cruzi* da cepa CL Brener (TcRBP42) em condições normais e de estresse celular induzido pela exposição a uma dose de 1000 Gy de radiação gama.

3.2 Objetivos específicos

Como objetivos específicos visamos responder as seguintes perguntas:

- 1) Quais são as características da sequência e da estrutura de TcRBP42?
- 2) A superexpressão de TcRBP42 produz mudanças na morfologia e no crescimento do *T. cruzi* em condições normais e de estresse? Essa alteração genética modifica a suscetibilidade dos parasitos à radiação gama?
- 3) A proteína RBP42 é essencial para a viabilidade do *T. cruzi*? O nocaute dos genes codificadores dessa proteína produz mudanças na morfologia, crescimento e suscetibilidade dos parasitos à radiação gama?
- 4) Qual é o efeito da superexpressão e do nocaute de TcRBP42 na expressão de alguns genes do metabolismo energético? O que acontece com a expressão desses genes após a exposição dos parasitos à radiação gama?
- 5) Qual é a localização subcelular de TcRBP42? Essa proteína se acumula em focos citoplasmáticos em resposta ao estresse?
- 6) A superexpressão e o nocaute de TcRBP42 afetam a diferenciação do *T. cruzi* durante o processo de metaciclogênese *in vitro*?

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Caracterização das sequências gênicas e proteicas de TcRBP42

A sequência dos genes codificadores de TcRBP42 e suas regiões intergênicas nas extremidades 5' e 3' foram recuperadas a partir da versão mais recente do genoma do *T. cruzi* da cepa CL Brener produzida pelo grupo de pesquisa coordenado pela Professora Daniella Castanheira Bartholomeu da UFMG (dados ainda não publicados). Essa versão do genoma foi produzida utilizando-se as tecnologias de sequenciamento de DNA desenvolvidas pelas empresas Illumina (sequenciamento de *reads* curtas) e Pacific Biosciences (sequenciamento de *reads* longas). As sequências recuperadas e identificadas nesse trabalho com os códigos TcCLB.509167.140 e TcCLB.485683.10, os quais são os mesmos utilizados no banco de dados *TriTrypDB Kinetoplastid Genomics Resource* (ASLETT *et al.*, 2010) para identificar as sequências gênicas de TcRBP42 presentes na cepa CL Brener, foram alinhadas com a ferramenta online *MAFFT* versão 7 utilizando-se a estratégia FFT-NS-i (KATO; STANDLEY, 2013). A identidade e similaridade de sequência da região codificadora dos genes codificadores de TcRBP42 foram calculadas com a ferramenta online *EMBOSS Needle* (MCWILLIAM *et al.*, 2013). Adicionalmente, as sequências gênicas de TcRBP42 foram traduzidas com a ferramenta *Translate* disponível no portal *Expasy* (DUVAUD *et al.*, 2021) e utilizadas para a identificação dos domínios conservados, predição de estrutura secundária e análise de desordem dos resíduos utilizando-se, respectivamente, as ferramentas online *InterProScan*, *RaptorX-Property* e *DISOPRED3* (PSIPRED Workbench) (BUCHAN *et al.*, 2013; JONES *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2016). Essas análises também foram realizadas para as sequências do *T. brucei* (Tb927.6.4440), *L. braziliensis* (LbrM.30.3080) e *T. cruzi* cepa Y (WEISBARTH *et al.*, 2018). A similaridade de sequência entre TcRBP42 e a proteína humana G3BP1 (UniProt ID: Q13283) também foi calculada. A estrutura tridimensional para TcRBP42 foi predita pelo *software* de inteligência artificial *AlphaFold2* e recuperada pela consulta ao banco de dados *AlphaFold DB* (JUMPER *et al.*, 2021; VARADI *et al.*, 2021).

4.2 Cultivo e manipulação genética do *T. cruzi*

Epimastigotas do clone CL Brener do *T. cruzi* foram cultivadas a temperatura de 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptone*) (CAMARGO, 1964) esterilizado por filtração e suplementado com soro fetal bovino inativado (10%) (Gibco TM) e os antibióticos penicilina

(100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™). O antibiótico de seleção G418 (200 µg/ml) (Gibco™) também foi adicionado ao meio de parasitos resistentes para a manutenção da pressão seletiva, sendo retirado apenas 48 h antes da exposição à radiação gama. As culturas foram repicadas semanalmente, sendo o número de parasitos determinados manualmente por contagem em câmaras de Neubauer na presença do corante vital eritrosina. Essa mesma metodologia de contagem foi empregada para a produção de curvas de crescimento. Cada curva de crescimento foi produzida em triplicata técnica, utilizando-se placas de 24 poços e contou com três réplicas biológicas. Posteriormente, estas foram analisadas estatisticamente com o teste *One-away* ANOVA. Foi utilizado o *software* de análise *GraphPad Prism* versão 9.4.0. Além disso, as culturas foram monitoradas para a contaminação com *Mycoplasma sp.* pela técnica de PCR convencional (TIMENETSKY et al., 2006).

Para a produção de parasitos Superexpressores de TcRBP42 e Expressores de GFP foram utilizados os vetores de expressão pRock_SPB/6x-His_RBP42 e pRock_SPB/6x-His_GFP. Esses vetores são variações do vetor pRockGFP_Neo (DAROCHA *et al.*, 2004b) e foram construídos previamente pela Doutora Helaine Graziele Santos Vieira (Garvan Institute of Medical Research) para permitir a expressão de proteínas recombinantes marcadas com as *tags* do Peptídeo ligador de estreptavidina (SBP) e 6x-His no *T. cruzi*. A estratégia de clonagem utilizada está descrita na **Figura 7 A e B**. Para a obtenção de quantidades suficientes desses vetores, esses foram primeiramente empregados na transformação de bactérias da cepa DH5α eletrocompetentes. Parte das colônias obtidas foram genotipadas por PCR de colônia e uma colônia positiva para cada vetor foi expandida pelo cultivo em meio LB (Luria Bertani) sob agitação. Após incubação *overnight* a 37 °C, os vetores foram purificados pelo protocolo de Miniprep utilizando-se o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega). Para aumentar o rendimento do processo, o protocolo foi modificado conforme descrito anteriormente por PRONOBIS; DEUITCH ; PEIFER (2016). Uma quantidade de 10 µg de cada um dos vetores foi então linearizada com a enzima de restrição NotI (Cellco Biotec) e utilizada para a eletroporação de 4×10^7 epimastigotas em fase exponencial de crescimento (*T. cruzi* da cepa CL Brener). Para tanto, os parasitos foram lavados e ressuspensos em um volume final de 100 µL do tampão Tb-BSF (50 mM HEPES, 90 mM de fosfato de sódio, 5 mM de cloreto de potássio, 0,15 mM de cloreto de cálcio, pH 7,3) (BURKARD; FRAGOSO; RODITI, 2007), transferidos para uma cubeta de 0,2 cm (Bio-Rad) e eletroporados com o programa U-033 do eletroporador *Amaza Nucleofector* (Lonza Cologne AG). Após 30 dias de seleção com 200 µg/mL do antibiótico G418, as populações de epimastigotas eletroporadas foram clonadas com o protocolo de diluição limitante utilizando-se placas de 96 poços e uma câmara úmida

para reduzir a evaporação das placas. Ao fim do processo, que levou aproximadamente 25 dias, a expressão das proteínas recombinantes foi confirmada em alguns clones pela técnica de *Western Blot*. Os procedimentos envolvidos na manipulação do *T. cruzi* geneticamente modificado foram aprovados pela Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) sob o número de processo 01250.026820/2017-07.

Parasitas Nocautes para TcRBP42 foram produzidos utilizando-se uma versão do sistema de CRISPR/Cas9 adaptada para a edição do genoma dos tripanosomatídeos (BURLE-CALDAS *et al.*, 2018; SOARES-MEDEIROS *et al.*, 2017). A estratégia empregada foi a inserção de stop códons prematuros e de uma deleção no início das sequências codificadoras dos genes de TcRBP42 (alelos Esmeraldo-Like e Não Esmeraldo-like). Na primeira etapa do processo, foram selecionadas duas sequências guias próximas ao ATG inicial de TcRBP42 utilizando-se a ferramenta online *EuPaGDT* (PENG; TARLETON, 2015). As sequências guias selecionadas foram então inseridas em oligonucleotídeos e estes foram utilizados em conjunto com o plasmídeo pTZSaCasScaffold em uma reação de PCR. Essa amplificação foi realizada com a Taq DNA Polimerase Pht e o seu tampão de alta fidelidade (Phoneutria Biotecnologia e Serviços), o que permitiu a produção do *scaffold* completo do RNA guia utilizado pela proteína SaCas9 (Cas9 do *Staphylococcus aureus*), além da inserção de um promotor T7 para a transcrição *in vitro* desses RNAs. Os produtos de PCR foram purificados com o kit *NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up* (MACHEREY-NAGEL) e 2 µg foram utilizados como molde para a transcrição *in vitro* dos RNAs guias sgRBP42.UTR-1 e sgRBP42.CDS+73. A transcrição *in vitro* foi realizada *overnight* utilizando-se o *MEGAscript™ T7 Transcription Kit* (Invitrogen™) e os RNAs produzidos foram purificados com o reagente TRIzol™ (Invitrogen™). A qualidade desses RNAs foi avaliada seguindo-se o protocolo do *Bleach gel* (ARANDA; LAJOIE; JORCYK, 2012). Além dos RNAs guias, o protocolo de edição também empregou um oligonucleotídeo doador de fita simples que foi sintetizado com duas ligações fosforotioato em cada uma de suas extremidades. Esse oligonucleotídeo contém braços de homologia flanqueadores de 55 nucleotídeos, três stop códons nas três fases de leitura, uma *tag* de M13 e sítios de restrição para as enzimas EcoRI e XhoI.

Na segunda etapa do processo de edição, 25 µg de cada um dos sgRNAs purificados foram associados *in vitro* com 40 µg da SaCas9 purificada para a formação dos complexos ribonucleoproteicos. A produção e purificação da SaCas9 foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Professora Santuza Maria Ribeiro Teixeira (UFMG). Após a formação dos complexos, estes foram combinados com 10 µl de uma solução de 100 µM do oligonucleotídeo doador e 5×10^6 epimastigotas em fase exponencial de crescimento. A eletroporação das

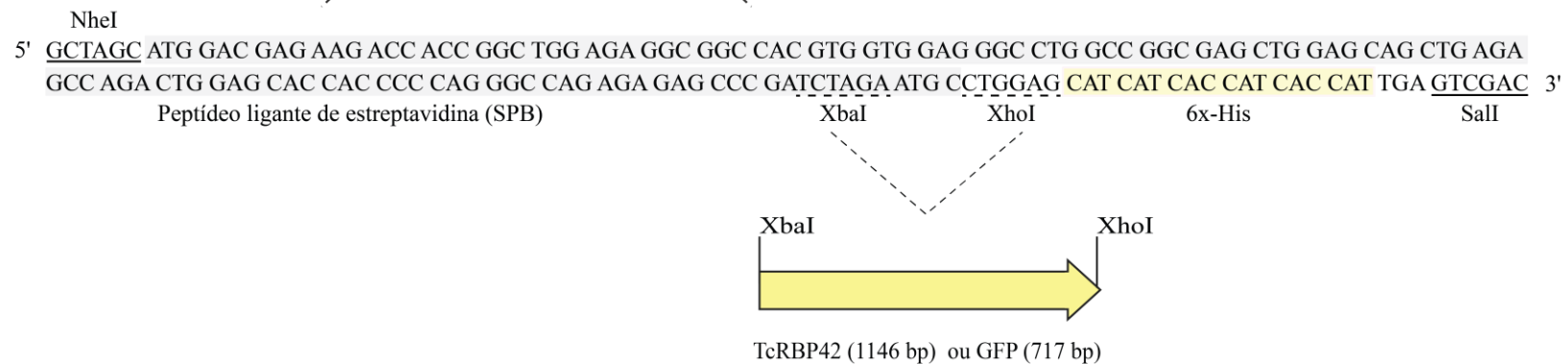
epimastigotas foi realizada conforme já descrito anteriormente nessa seção. Após uma semana de recuperação, os parasitos eletroporados foram clonados por diluição limitante. Ao fim de aproximadamente 40 dias de cultivo, os clones obtidos foram genotipados por PCR de colônia para a detecção da *tag* de M13 e um clone Heminocaute foi confirmado por sequenciamento pelo método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977) realizado pela empresa ACTGene Análises Moleculares. O sequenciamento foi realizado a partir de produtos de PCR produzidos pela enzima de alta fidelidade *KAPA LongRange Taq HotStart* (Sigma). As sequências obtidas foram analisadas utilizando-se o pacote *Sanger Sequence Assembly* disponível no *software DNASTAR Lasergene* (DNASStar Incorporated). Na terceira etapa do processo, o clone Heminocaute confirmado pelo sequenciamento foi novamente submetido ao protocolo de edição para a obtenção de parasitos Nocaute para esse gene. Esses parasitos também foram confirmados por sequenciamento pelo método de Sanger. Também foram produzidos vídeos dos parasitos editados na presença do corante vital eritrosina. Estes foram gravados a partir da ocular de um microscópio óptico convencional equipado com uma objetiva de 40X. As sequências de todos os oligonucleotídeos utilizados neste trabalho assim como as suas aplicações estão descritas na **Quadro 1**.

Figura 7 — Estratégia de clonagem utilizada na construção dos vetores de expressão pRock_SPB/6x-His_RBP42 e pRock_SPB/6x-His_GFP

A)



B)



O vetor pRockGFP_NEO (**A**) foi desenvolvido para a expressão estável de proteínas recombinantes no *T. cruzi* por meio da integração ao locus do gene da β -tubulina. O mapa do vetor pRockGFP_NEO foi adaptado de DAROCHA *et al.* (2004b). Para construir os vetores de expressão utilizados nesse trabalho (**B**), uma sequência de 173 bp flanqueada pelos sítios de restrição para as enzimas NheI e SalI foi primeiramente clonada no vetor pRockGFP_NEO em substituição ao gene de GFP. Essa sequência introduziu no vetor original novos sítios de restrição para as enzimas XbaI e XhoI, o peptídeo ligante de estreptavidina (SBP) e uma cauda de histidina (6x-His). Os genes de TcRBP42 e GFP foram em seguida clonados nos novos sítios de restrição inseridos. Os vetores gerados, pRock_SPB/6x-His_RBP42 (contém o alelo Esmeraldo-like de TcRBP42) e pRock_SPB/6x-His_GFP permitem a expressão de proteínas marcadas com as *tags* SBP e 6x-His no N e C-terminal, respectivamente. Os esquemas não foram representados em escala. IR: região intergênica, UTR: regiões não traduzidas e Neo^R: gene de resistência ao antibiótico neomicina. Fonte: Elaborado pelo autor.

Quadro 1 — Oligonucleotídeos utilizados na edição do genoma do *T. cruzi* da cepa CL Brener e nos experimentos de PCR em tempo real

Nome	Sequência	Aplicação
XbaI -TcRBP42-F	ATGCTCTAGAGATGCTAACGTCTCAAGAGGT	Clonagem dos genes de TcRBP42 no vetor de expressão.
XhoI -TcRBP42-R	TTCGCTCGAGGTGAGTCCTATTTTCGTTGTTCTC	
XbaI -GFP-F	CTGCTCTAGATATGAGTAAAGGAGAA	Clonagem do gene GFP no vetor de expressão.
XhoI -GFP-R	ATCGCTCGAGTTTGTATAGTTCATCCA	
Seq-F	TGTGGATGCCAAGTCTGTGC	Sequenciamento dos vetores de expressão pRock_SPB/6x-His_RBP42 e pRock_SPB/6x-His_GFP pelo método de Sanger.
Seq-R	TCCTTCGGCAGGTTGTTCTG	
SBP-F	GCCAGAGAGAGCCCGATCTA	Combinado com XhoI-TcRBP42-R e XhoI-GFP-R para confirmar a presença dos genes exógenos nas colônias bacterianas. Anelamento na <i>tag</i> do peptídeo ligante de estreptavidina
SaCas9-sgRBP42.UTR-1-F	AAGCTAATACGACTCACTATAGGTCTTGAGACGTT AGCATGACTGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATC	Amplificação do <i>scaffold</i> completo do RNA da SaCas9 e inserção de um promotor T7 para a transcrição <i>in vitro</i> do RNA guia sgRBP42.UTR-1.
SaCas9-scaffold-R	AAAAAAATCTCGCCAACAAGTTGAC	

Continua na próxima página...

SaCas9-sg.RBP42.CDS+73-F	AAGCTAATACGACTCACTATAGGGCGTACATTTCCGC GAGCTCCGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATC	Combinado com SaCas9-scaffold-R para a amplificação do <i>scaffold</i> completo do RNA da SaCas9 e inserção de um promotor T7 para a transcrição <i>in vitro</i> do RNA guia sgRBP42.CDS+73.
ssORBP42-3xStop	T*G*TAGGTACGCTAATCTCCTCGCCAAGCAACAACCC GAAGTCATGTAGATAGATAGTGTAACGACGGCCAG TGAATTCCTCGAGAGCTCGCGGAAATGTACGGCCCGA ACTCGTCCTTAACAATCGT*A*G	Oligonucleotídeo doador de fita simples protegido por ligações fosforotioato (*) utilizado no protocolo de edição pelo sistema de CRISPR/Cas9 de ambos os alelos de TcRBP42.
RBP42/ATG-F	ATGCTAACGTCTCAAGAGGTTG	Amplificação da CDS completa de ambos os alelos de TcRBP42 para genotipagem dos clones selecionados após protocolo de edição pelo sistema de CRISPR/Cas9.
RBP42/STOP-R	TCAGTGAGTCCTATTTTCGTTGTTC	
M13-F	TGTAAAACGACGGCCAGT	Combinado com RBP42/Stop-R para genotipagem dos clones selecionados após o protocolo de edição pelo sistema de CRISPR/Cas9.
Seq.RBP42.Esm-F	ATTTAGGTGACACTATAGACGTGCGTATGGATG TGTC	Combinado com RBP42.Seq-R para amplificar o alelo Esmeraldo-like de TcRBP42 e inserir uma <i>tag</i> de SP6 para o sequenciamento pelo método de Sanger.

Continua na próxima página...

Seq.RBP42.NEsm-F	ATTTAGGTGACACTATAGTCACGTGTGTATGGATGT GTT	Combinado com RBP42.Seq-R para amplificar o alelo Não Esmeraldo-like de TcRBP42 e inserir uma <i>tag</i> de SP6 para o sequenciamento pelo método de Sanger.
SP6-F	ATTTAGGTGACACTATAG	Sequenciamento pelo método de Sanger dos alelos Esmeraldo-like e Não Esmeraldo-like de TcRBP42.
RBP42.Seq-R	CGTATGCCTCAAGAATGTTGAC	
RT-qPCR-RBP42-R	CGATTGTTAAGGACGAGTTCGG	Combinado com RBP42/ATG-F para a quantificação por RT-qPCR dos níveis de expressão dos alelos não editados de TcRBP42. Concentração por reação: 200 nM.
RT-qPCR-M13-R	GTTTCGGACTTCTGTTGTGC	Combinado com M13-F para amplificar os alelos de RBP42 editados para conter uma <i>tag</i> de M13. Concentração por reação: 200 nM.
RT-qPCR-Enol-F	AAGGGATTTGACACGACGCT	Avaliação dos níveis de expressão do gene da Enolase citoplasmática. Concentração por reação: 300 nM.
RT-qPCR-Enol-R	GAATGGAGGAACACCGAGCA	
RT-qPCR-Succ-F	ACTGGTGGAACCGTGAACAA	Avaliação dos níveis de expressão do gene da Succinato desidrogenase. Concentração por reação: 400 nM.
RT-qPCR-Succ-R	CTTGACGCGGCTATCGTAGT	
RT-qPCR-Citr-F	TCTGGGAGTATGCCCTGGAA	Avaliação dos níveis de expressão do gene da Citrato sintase. Concentração por reação: 400 nM.
RT-qPCR-Citr-R	CCAGTTGTGAGGCGGTTGTA	

Continua na próxima página...

RT-qPCR-Prol-F	TATCGAGGAATGCCGTGTCG	Avaliação dos níveis de expressão do gene da Prolina desidrogenase. Concentração por reação: 400 nM.
RT-qPCR-Prol-R	TGCCTTAATGACAGCCTCCG	
RT-qPCR-CYb-e-F	TGTCTTCTAATGTCAGGTTGCTT	Avaliação dos níveis de expressão do transcrito editado do gene mitocondrial Citocromo B (Metaciclologênese <i>in vitro</i>). Concentração por reação: 400 nM.
RT-qPCR-CYb-e-R	TCACGCTAAACAGACACCAC	
RT-qPCR-RPL9-F	ACCGTTGTGAAGGACGAACT	Gene da Proteína ribossomal L9 (60 S) utilizado como referência na RT-qPCR. Concentração por reação: 400 nM.
RT-qPCR-RPL9-R	TTCACCAGGCAGAGCTGATG	
RT-qPCR-GAPDH-F	CGGTGGACGGTGTGTCGGTG	Gene da Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase utilizado como referência na RT-qPCR. Concentração por reação: 400 nM.
RT-qPCR-GAPDH-R	CCGTCAGCTTGCCCTGGGTG	
RT-qPCR-TERT-F	GTCGCATAAACACGAAGACCC	Gene da Telomerase transcriptase reversa utilizado como referência na RT-qPCR. Concentração por reação: 300 nM.
RT-qPCR-TERT-R	TCTGATAAACATGGCGTTCTGC	
GPO3	GGGAGCAAACACGATAGATACCCT	Monitoramento da contaminação das culturas de <i>T. cruzi</i> por <i>Mycoplasma sp.</i>
MGSO	TGCACCATCTGTCACTCTGTTAACCTC	

Os oligonucleotídeos foram sintetizados pelas empresas Exxtend Solução em Oligos, Thermo Fisher Scientific e Integrated DNA Technologies. RT-qPCR: PCR em tempo real, F: oligonucleotídeo *forward* e R: oligonucleotídeo *reverse*. Fonte: Elaborado pelo autor.

4.3 *Western blot* e imunoprecipitação dos complexos ribonucleoproteicos

Para a realização dos experimentos de *Western Blot* extratos proteicos totais foram produzidos a partir de 1×10^8 epimastigotas em fase exponencial de crescimento. As células foram lisadas em tampão SDS 2X (4% SDS, 10% 2-Mercaptoetanol, 20% glicerol, 125 mM Tris-HCL, pH 6,8) na presença do *Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free* (Thermo Fisher Scientific). Os extratos proteicos totais foram sonicados a 30% da amplitude máxima no equipamento *Fisher Scientific™ Model 505 Sonic Dismembrator*. Foram realizados 5 ciclos de 20 segundos com intervalos de 20 segundos entre cada ciclo. Os extratos proteicos foram então dosados por fluorometria utilizando-se o kit *Qubit™ Protein Broad Range (BR) Assay* (Invitrogen™). Depois de 5 minutos de fervura na presença do corante Bromofenol Blue, 30 µg de proteínas totais foram fracionadas pela técnica de SDS-PAGE em gel de poliacrilamida a 12% empregando-se o tampão de corrida Tris-Glicina-SDS. A integridade dos extratos foi confirmada pela coloração do gel por Coomassie Blue e seguiu-se a transferência do conteúdo de um segundo gel não corado para uma membrana de PVDF utilizando-se o sistema *Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell* (Bio-Rad) (60 minutos a 300 mA). O sucesso da transferência foi confirmado pela coloração da membrana com Ponceau S. A membrana foi bloqueada durante duas horas sob agitação em solução de TBST (20 mM Tris base, 150 mM cloreto de sódio, 0,1% Tween 20, pH 7,5) contendo 5% de leite em pó desnatado. Após três lavagens em TBST, a membrana foi incubada *overnight* a 4 °C com uma diluição de 1:1000 do anticorpo primário Anti-His-Tag (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology) diluído em uma solução de TBST suplementada com 3% de albumina sérica bovina (BSA). Novas lavagens foram realizadas e a membrana foi incubada por 90 minutos à temperatura ambiente com o anticorpo secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab) e diluído na proporção de 1:5000 em TBST contendo 3% de leite em pó desnatado. Em seguida, a membrana foi lavada em TBST e revelada utilizando-se o *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) e os equipamentos *ImageQuant LAS 4000* (Cytiva Life Science) ou *ImageQuant™ LAS 500* (Cytiva Life Science). Para a detecção da proteína tubulina, que foi utilizada como controle de carregamento, a membrana foi fervida por cinco minutos em água ultrapura (*stripping*) e submetida novamente a todo o protocolo de detecção. O anticorpo primário Anti- α -tubulina produzido em camundongo (Sigma) foi utilizado na diluição de 1:5000 em tampão TBST complementado com 5% de leite em pó desnatado.

Para a imunoprecipitação dos complexos ribonucleoproteicos formados por TcRBP42 em condições normais e após exposição à radiação gama foram testados protocolos baseados na detecção das *tags* de afinidade presentes na versão recombinante dessa proteína (rTcRBP42). Foram testados os produtos *Dynabeads™ Protein G* (Thermo Fisher Scientific), *Pierce™ RIPA lysis and extraction buffer* (Thermo Fisher Scientific), *Streptavidin sepharose beads* (Cytiva Life Science) e *Pierce™ PolyHis™ Protein Interaction Pull-Down Kit* (Thermo Fisher Scientific) seguindo-se os protocolos descritos pelos respectivos fabricantes. Nos experimentos utilizando-se os dois primeiros produtos listados também foi empregado o anticorpo Anti-His-Tag (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology). Para a produção dos extratos proteicos totais, 5×10^8 epimastigotas em fase exponencial do crescimento foram lisadas no tampão recomendado para cada um dos produtos testados na presença do inibidor de protease *Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free* (Thermo Fisher Scientific). O sucesso da imunoprecipitação de rTcRBP42 foi determinado pela técnica de *Western Blot*. A imunoprecipitação dos complexos será seguida pelo sequenciamento de seus transcritos associados (*RNA-seq*).

4.4 PCR em tempo real

Nos experimentos de PCR em tempo real foram analisadas três condições: condição normal, tratamento com 1000 Gy de radiação gama e metaciclogênese *in vitro*. Para tanto, o RNA total de pelo menos 1×10^7 epimastigotas por condição foi isolado combinando-se os protocolos do reagente *TRIzol™* (Thermo Fisher Scientific) e da purificação com colunas de sílica. Após a confirmação da integridade das amostras de RNA por eletroforese, estas foram tratadas com o *TURBO DNA-free™ Kit* (Thermo Fisher Scientific) para remoção do DNA contaminante e quantificadas por fluorometria utilizando-se o *Qubit™ RNA BR Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific). Em seguida, 2 µg de RNA total foram convertidos em cDNA com o kit *GoScript™ Reverse Transcription System* (Promega). As eficiências dos ensaios de PCR foram calculadas e apenas aqueles com eficiências no intervalo de 90 a 110% foram utilizados nos experimentos posteriores. As reações de PCR em tempo real foram realizadas em um volume total de 10 µl utilizando-se 10 ng de cDNA molde, o *Master mix qPCR Green Master HighROX with UNG 2X* (Cellco Biotec), o sistema *CFX96™ Real-Time System* (Biorad) e placas de PCR de 96 poços *UltraCruz®* (Santa Cruz Biotechnology). Os valores de fold-change dos genes de interesse foram calculados pelo método do $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK; SCHMITTGEN,

2001). Os dados produzidos foram analisados com *software GraphPad Prism* versão 9.4.0 utilizando-se o teste t não pareado ou o teste *One-away* ANOVA corrigido pelo método de Tukey.

4.5 Indução do estresse por radiação gama e da metaciclogênese *in vitro*

Para induzir o estresse por radiação ionizante, culturas em fase exponencial do crescimento e contendo 1×10^7 epimastigotas/ml foram irradiadas com 1000 Gy (taxa dose: 1560 Gy/h) de radiação gama provenientes de uma fonte de cobalto Co^{60} localizada no Laboratório de Irradiação Gama do Centro de Desenvolvimento da Tecnologia Nuclear (CDTN). Após a irradiação, os crescimentos dos parasitos irradiados e dos controles não tratados foram avaliados diariamente por meio de contagens manuais em câmaras de Neubauer. As curvas de crescimento foram produzidas e analisadas conforme o descrito anteriormente na seção 4.2 dessa tese.

A metaciclogênese foi induzida *in vitro* pelo cultivo de epimastigotas em meio de cultura RPMI 1640 (Sigma) não complementado com soro fetal bovino (SHAW; KALEM; ZIMMER, 2016). Para tanto, 2×10^7 epimastigotas foram transferidas para um volume final de 20 ml de meio de cultura suplementado com os antibióticos penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) (Gibco™). Os frascos de cultivo de 75 cm² foram colocados em posição horizontal e incubados de forma estática durante 8 dias a temperatura de 28 °C. Ao final desse período, as garrafas foram cuidadosamente colocadas em posição vertical e divididas em duas frações: uma camada superior de 14 ml e uma inferior de 6 ml. Esse procedimento permitiu a obtenção de uma camada superior enriquecida em formas intermediárias e tripomastigotas metacíclicas. O RNA da fração superior foi extraído e utilizado em experimentos de PCR em tempo real conforme o descrito na seção anterior.

4.6 Microscopia de fluorescência confocal

Para os ensaios de imunofluorescência, 1×10^7 epimastigotas irradiadas e não irradiadas foram coletadas, fixadas *overnight* a 4 °C (4% formaldeído em PBS) e aderidas a lâminas de 12 poços (Tekdon® Incorporated) revestidas previamente com Poly-L-Lisina (Sigma). As epimastigotas foram em seguida permeabilizadas e bloqueadas simultaneamente durante 60 minutos com uma solução contendo 0,5% do detergente Triton X-100 e 5% de BSA diluídos

em PBS. Após várias lavagens com PBS, os parasitos foram incubados *overnight* a 4 °C com o anticorpo primário Anti-His-Tag (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology) diluído na proporção de 1:80 em PBS contendo 2% de BSA. Após novas lavagens, os parasitos foram bloqueados com soro de cabra a 10% durante 30 minutos e em seguida incubados à temperatura ambiente durante 90 minutos com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 (ab150113, Abcam) diluído na proporção de 1:400 em PBS contendo 5% de soro de cabra (Sigma). As membranas celulares foram então marcadas durante 15 minutos com uma diluição de 1:1000 do *CellMask™ Plasma Membrane Stain* (Thermo Fisher Scientific) em PBS (cor *deep red*). O DNA genômico e o kDNA foram corados com uma diluição de 1:10 de DAPI (Sigma) em PBS durante 10 minutos. Após novas lavagens, as lâminas foram montadas utilizando-se o *ProLong® Diamond Antifade Mountant* (Thermo Fisher Scientific). As imagens foram adquiridas com a objetiva de 100X (imersão em óleo) do microscópio confocal Nikon Eclipse Ti localizado no *Center for Gastrointestinal Biology* (UFMG). Utilizando-se esse mesmo microscópio também foram adquiridas séries de imagens ao longo do eixo Z (12 sessões ópticas coletadas em um intervalo de 11 µm). Essas séries foram combinadas pelo *software Velocity®* versão 6.3 e utilizadas para gerar vídeos tridimensionais da localização subcelular das proteínas rTcRBP42 e GFP. Todos os vídeos suplementares produzidos nesse trabalho estão disponíveis no repositório online Figshare no endereço web <https://doi.org/10.6084/m9.figshare.24424468.v2>.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização das sequências gênicas e proteicas de TcRBP42

Para a caracterização *in silico* de TcRBP42, a sequência dos genes codificadores para essa proteína foram recuperadas a partir da consulta à versão mais recente e ainda não publicada do genoma do *T. cruzi* da cepa CL Brener. Nessa versão, que foi produzida pelo grupo de pesquisa coordenado pela Professora Daniella Castanheira Bartholomeu (UFMG), a proteína TcRBP42 é codificada por alelos de cópia única, sendo uma cópia presente no haplótipo Esmeraldo-like (TcCLB.509167.140) e a outra no Não Esmeraldo-like (TcCLB.485683.10). Além disso, nessa nova montagem do genoma, as regiões intergênicas que separam os genes de TcRBP42 de seus genes vizinhos foram mais bem resolvidas e possuem uma média de 257 nucleotídeos na extremidade 5' e de 1431 na extremidade 3'. Essas regiões também possuem longas repetições de nucleotídeos. A informação de sequência das regiões intergênicas foi extremamente importante no planejamento dos experimentos de edição gênica utilizando-se o sistema de CRISPR/Cas9. Vale destacar que nesse trabalho os alelos de TcRBP42 foram identificados utilizando-se os mesmos códigos adotados pelo *TriTrypDB Kinetoplastid Genomics Resource* para a identificação das sequências gênicas da RBP42 do *T. cruzi* da cepa CL Brener.

O alinhamento das sequências de ambos os alelos de TcRBP42 mostrou que as sequências nucleotídicas desses genes são conservadas entre si. Na região codificadora são encontrados 13 polimorfismos de nucleotídeo único, dos quais apenas 6 resultaram em substituições de aminoácidos. Além disso, ocorreu a inserção de um único códon de treonina na sequência do haplótipo Não Esmeraldo-like. As maiores diferenças encontradas entre os alelos se concentram nas regiões intergênicas. Na **Figura 8**, as regiões codificadoras e uma pequena porção das regiões intergênicas de ambos os alelos de TcRBP42 são mostradas. Nessa figura também foram representados os oligonucleotídeos que se anelam nas sequências de TcRBP42 (**Quadro 1**) e a estratégia utilizada para gerar parasitos Nocautes para TcRBP42.

Com relação à estrutura das proteínas TcRBP42, estas possuem uma disposição modular composta por dois domínios estruturais conservados, NTF2-like e RRM, interligados por uma longa região central predita como intrinsecamente desordenada. Nessa região também se encontram três motivos ricos no aminoácido prolina com o consenso PxxP (P: prolina e x: qualquer outro aminoácido). Uma região intrinsecamente desordenada adicional também está presente após o domínio RRM (**Figura 9 A**). O alinhamento das sequências de aminoácidos de

TcRBP42 mostra a distribuição dos motivos PxxP na região central desordenada, assim como as substituições de aminoácidos citadas anteriormente. Além disso, é mostrado que o RRM de TcRBP42 possui apenas um dos motivos de reconhecimento de RNA que são tipicamente conservados nesse domínio, o RNP1. Esse motivo apresenta a sequência NGHVFLLDF em TcRBP42 (**Figura 9 B**). A identidade entre as sequências codificadoras de cada alelo atinge os 98,6%. A estrutura tridimensional de TcRBP42 foi predita pelo *software* de inteligência artificial *AlphaFold2* e recuperada a partir de consulta ao banco de dados *AlphaFold Protein Structure Database* com o número de acesso Q4DQQ3 (alelo Esmeraldo-like). No modelo 3D construído pela ferramenta, os dois domínios conservados de TcRBP42 foram modelados com níveis de confiança alto ou muito alto para a maioria dos resíduos (**Figura 10 A e B**). Conforme esperado, as regiões preditas como intrinsecamente desordenadas pela ferramenta *DISOPRED3* também apareceram dessa forma no modelo gerado. A maioria dos resíduos presentes nessas regiões não apresentaram estruturas secundárias definidas ou se organizaram em estruturas preditas com valores de confiança baixos ou muito baixos. As regiões desordenadas assumiram uma distribuição aleatória ao redor dos domínios conservados, sendo omitidas para conferir maior clareza à representação. O domínio NTF2-like (**Figura 10 A**) e RRM (**Figura 10 B**) possuem as seguintes coleções de elementos de estrutura secundária: $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\beta$ para o domínio NTF2-like e $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ para o domínio RRM. Uma folha beta antiparalela está presente em cada um dos domínios. O modelo completo de TcRBP42, assim como um gráfico mostrando o erro de posicionamento predito para cada resíduo na estrutura é mostrado no **APÊNDICE A**.

As sequências de aminoácidos de TcRBP42 também foram comparadas com aquelas de outras proteínas RBP42 estudadas no *T. cruzi* da cepa Y, *T. brucei* e *L. braziliensis*. As análises mostraram que essas proteínas compartilham a mesma estrutura modular, embora a extensão da região intrinsecamente desordenada que liga os domínios NTF2-like e RRM varie entre as espécies. Adicionalmente, apenas as proteínas RBP42 do *T. cruzi* possuem uma segunda região intrinsecamente desordenada após o domínio RRM (**Figura 10 C**). As proteínas RBP42 possuem uma organização estrutural similar àquela de G3BP1, embora essa proteína também contenha uma região enriquecida em aminoácidos ácidos e um domínio RGG. A similaridade de sequência entre TcRBP42 e G3BP1 não ultrapassa os 30% (**Figura 10 C**).

Figura 8 — Alinhamento das sequências de nucleotídeos dos genes de TcRBP42

		Seq.RBP42.Esm-F		
<i>T.c_E</i>	- - a c g t g c g t a t g g a t g t g t c c t t t - - - - t t a t t t t t t c t t c t t g t t t t t c t t g t g			51
<i>T.c_NE</i>	t c a c g t g t g t a t g g a t g t g t t c t t t t a a a a t t t t t t t t t c t t c t t g t t t t t c t t g t g			58
		Seq.RBP42.NEsm-F		
			HRI	
<i>T.c_E</i>	g c g c c g g a a g t g t a g g t a c g c t a a t c t c c t c g c c a a g c a a c a c c c g a a g t c a t g c t a			109
<i>T.c_NE</i>	g c g c c g g a a g t g t a g g t a c g c t a a t c t c c t c g c c a a g c a a c a c c c g a a g t c a t g c t a			116
			M13-F	
		T A G A T A G A T A G t g t a a a c g a c g g c c a g t g a a t t c c t c g a g		
<i>T.c_E</i>	a c g t c t c a a g a g g t t g c c t g t c a a t t c a t c c c c g c g t t c t t t g a a c g c c t c g c g t c c a			167
<i>T.c_NE</i>	a c g t c t c a a g a g g t t g c c t g c c a a t t c a t c c c c g c g t t c t t t g a a c g c c t c g c g t c c a			174
		RBP42/ATG-F		
			HRII	
<i>T.c_E</i>	a c c c c g c g g a g c t c g c g g a a a t g t a c g g c c c g a a c t c g t c c t t a a c a a t c g t a g a c t t			225
<i>T.c_NE</i>	a c c c c g c g g a g c t c g c g g a a a t g t a c g g c c c g a a c t c g t c c t t a a c a a t c g t a g a c t t			232
			RT-qPCR-RBP42-R	
<i>T.c_E</i>	t g t a t a c g g c a c a a c a g a a g t c c g a a a c g a g g a c g t c c c t c g g g c t g t a g a g c a a t g g			283
<i>T.c_NE</i>	c g t a t a c g g c a c a a c a g a a g t c c g a a a c g a g g a c g t c c c t c g g g c t g t a g a g c a a t g g			290
			RT-qPCR-M13-R	
<i>T.c_E</i>	g c t c a g a t t c t t c a g g g g t g c g a g c t c t g c g t g g a g a g c t a c t c c g c c g t c c c c t t g t			341
<i>T.c_NE</i>	g c t c a g a t t c t t c a g g g g t g c g a g c t c t g c g t g g a g a g c t a c t c c g c c g t c c c c t t g t			348
<i>T.c_E</i>	a c g g t g g a g t g a g c g t g t a c g t g a c a a t g t t c g c t g a g t c t a a g a c g a c a c g t c a c t a			399
<i>T.c_NE</i>	a c g g t g g a g t g a g c g t g t a c g t g a c a a t g t t t g c t g a g t c t a a g a c g a c a c g t c a c t a			406
		RBP42.Seq-R		
<i>T.c_E</i>	c t t t c a g t t t g t c a a c a t t c t t g a g g c a t a c g g c g c g g g g g c c t a c g g c t c g g a g g c g			457
<i>T.c_NE</i>	c t t t c a g t t t g t c a a c a t t c t t g a g g c a t a c g g c g c g g g g g c c t a c g g c t c g g a g g c g			464

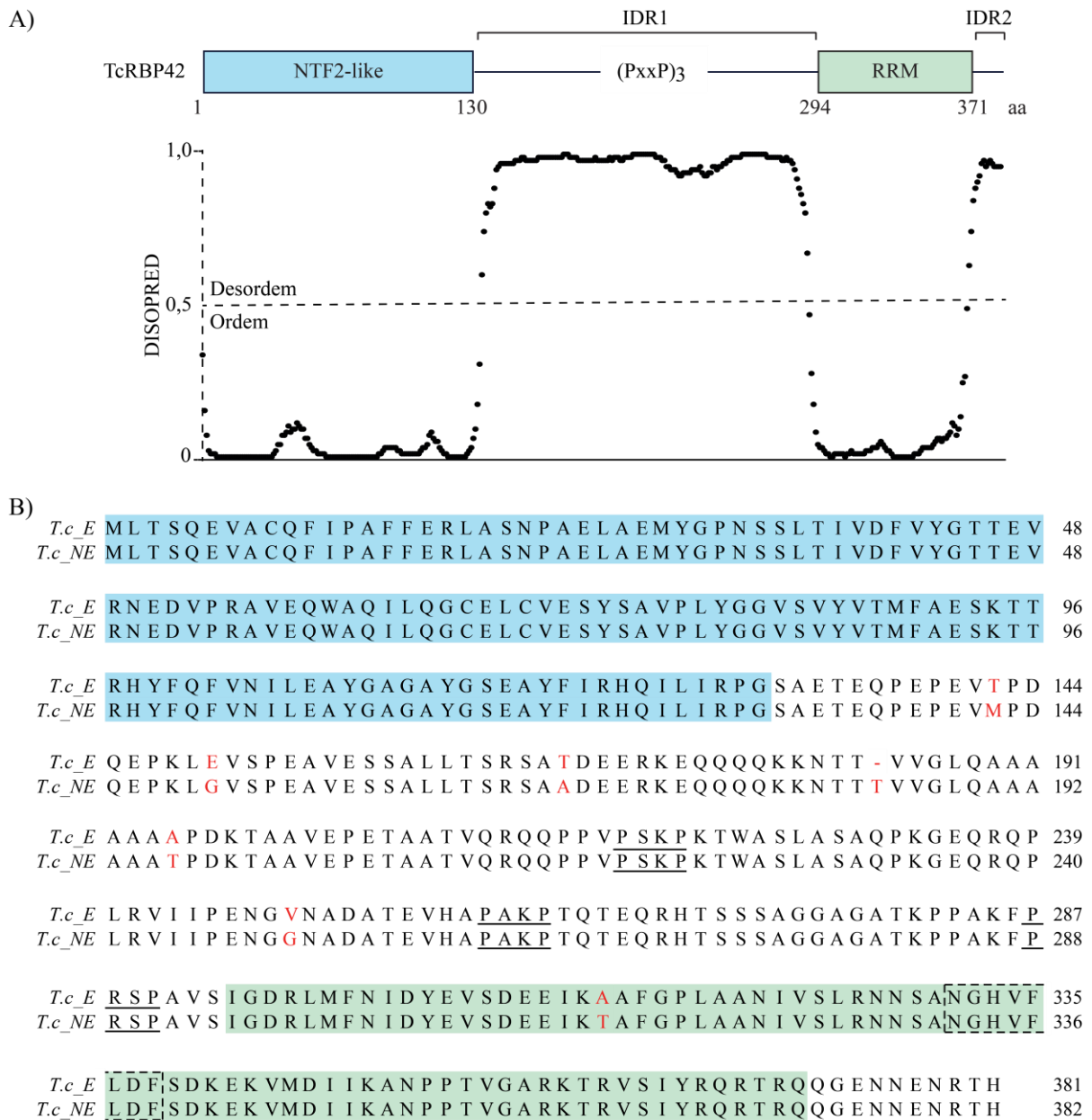
Continua na próxima página...

<i>T.c_E</i>	t a c t t t a t c c g t c a c c a g a t t c t g a t a c g c c c t g g a t c c g c t g a g a c g g a a c a g c c g g	515
<i>T.c_NE</i>	t a c t t t a t c c g t c a c c a g a t t c t g a t a c g c c c t g g a t c c g c t g a g a c g g a a c a g c c g g	522
<i>T.c_E</i>	a g c c a g a g g t c a c g c c c g a c c a a g a g c c a a a a t t a g a a g t t t c t c c c g a g g c a g t g g a	573
<i>T.c_NE</i>	a g c c g g a g g t c a t g c c c g a c c a a g a g c c a a a a t t a g g a g t t t c t c c c g a g g c a g t g g a	580
<i>T.c_E</i>	a a g t t c a g c a t t a c t c a c a t c c c g g t c a g c g a c a g a c g a a g a a a g g a a a g a a c a g c a g	631
<i>T.c_NE</i>	a a g t t c a g c a t t a c t c a c a t c c c g g t c a g c g g c a g a c g a a g a a a g g a a a g a a c a g c a g	638
<i>T.c_E</i>	c a a c a g a a g a a g a a - - - t a c t a c c g t t g t t g g t c t t c a g g c a g c t g c a g c t g c a g c a g	686
<i>T.c_NE</i>	c a a c a g a a g a a g a a t a c t a c c g t t g t t g g t c t t c a g g c a g c t g c a g c t g c a g c a a	696
<i>T.c_E</i>	c g c c a g a t a a g a c a g c t g c g t t g a g c c a g a g a c c g c a g c t a c c g t g c a g c g a c a a c a	744
<i>T.c_NE</i>	c g c c a g a t a a g a c a g c t g c t g t t g a g c c a g a g a c c g c a g c t a c c g t g c a g c g a c a a c a	754
<i>T.c_E</i>	g c c a c c g g t g c c a t c g a a g c c a a a g a c a t g g g c t a g c c t t g c c a g c g c t c a g c c g a a g	802
<i>T.c_NE</i>	g c c a c c g g t g c c a t c g a a g c c a a a g a c a t g g g c t a g c c t t g c c a g c g c t c a g c c g a a g	812
<i>T.c_E</i>	g g g g a g c a g c g c c a g c c a c t g a g a g t g a t t a t c c c c g a g a a t g g c g t g a a t g c c g a t g	860
<i>T.c_NE</i>	g g g g a g c a g c g c c a g c c a c t g a g a g t g a t t a t c c c c g a g a a t g g c g g g a a t g c c g a t g	870
<i>T.c_E</i>	c c a c t g a g g t c c a t g c c c c g g c a a a g c c g a c c c a g a c a g a g c a a c g g c a t a c a t c a t c	918
<i>T.c_NE</i>	c c a c t g a g g t c c a t g c c c c g g c a a a g c c g a c c c a g a c a g a g c a a c g g c a t a c a t c a t c	928

Continua na próxima página...

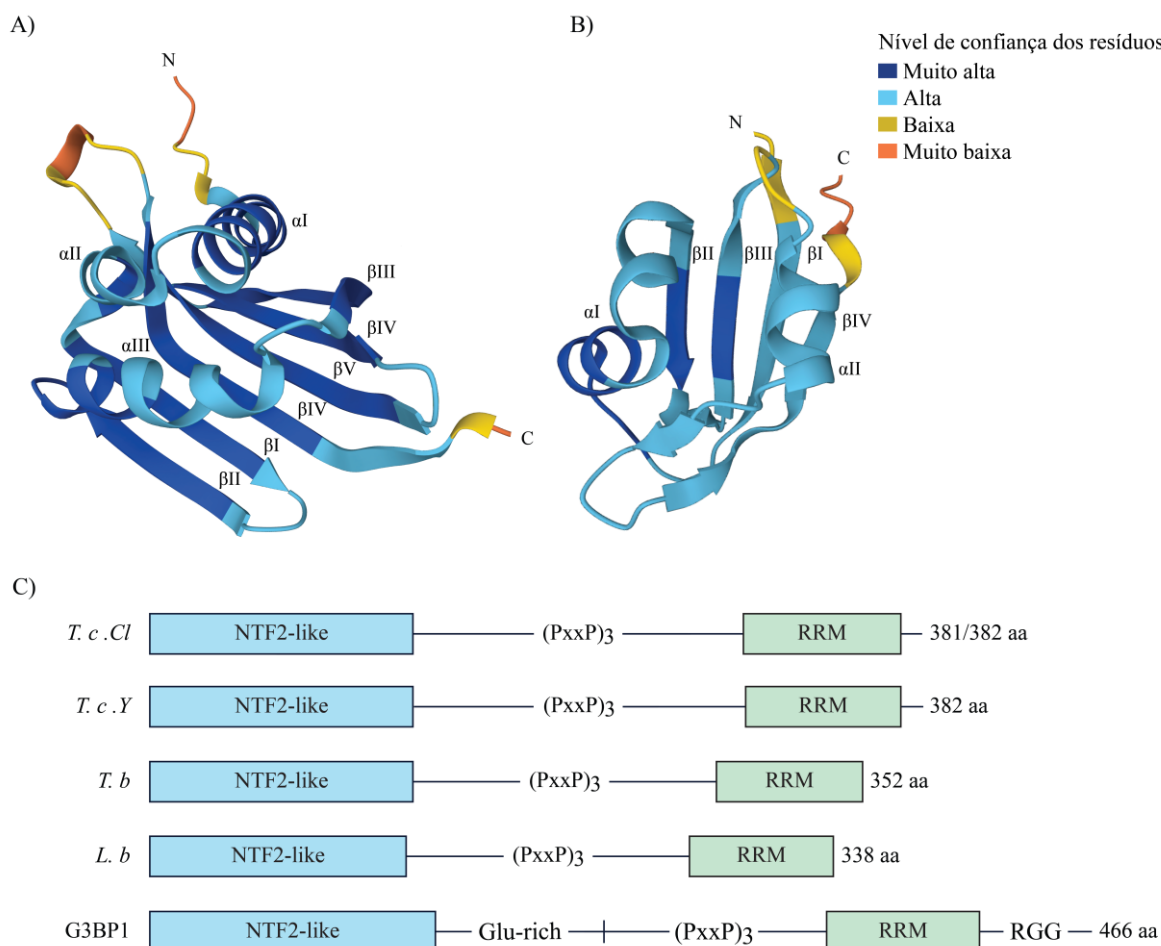
<i>T.c_E</i>	a t c t g c g g g a g g t g c a g g g g c c a c a a a g c c c c c t g c c a a g t t t c c t c g c t c c c c t g c t	976
<i>T.c_NE</i>	a t c t g c g g g a g g t g c a g g g g c c a c a a a g c c c c c t g c c a a g t t t c c t c g t t c c c c t g c t	986
<i>T.c_E</i>	g t t t c t a t t g g t g a t c g c c t c a t g t t c a a c a t t g a t t a t g a g g t t t c a g a t g a g g a g a	1034
<i>T.c_NE</i>	g t t t c t a t t g g t g a t c g c c t c a t g t t c a a c a t t g a t t a t g a g g t t t c a g a t g a g g a g a	1044
<i>T.c_E</i>	t t a a g g c g g c c t t t g g t c c a c t g g c a g c t a a c a t t g t c t c c c t t c g c a a c a a c t c t g c	1092
<i>T.c_NE</i>	t t a a g a c g g c c t t t g g t c c a c t g g c a g c t a a c a t t g t c t c c c t c c g c a a c a a c t c t g c	1102
<i>T.c_E</i>	c a a t g g c c a c g t c t t c c t t g a c t t t t c g g a t a a a g a a a a g g t t a t g g a c a t a a t t a a g	1150
<i>T.c_NE</i>	c a a t g g c c a c g t c t t c c t t g a c t t t t c g g a t a a a g a a a a g g t t a t g g a c a t a a t t a a g	1160
<i>T.c_E</i>	g c c a a t c c a c c g a c a g t c g g g g c c c g c a a g a c t c g t g t g a g c a t c t a c c g c c a g a g g a	1208
<i>T.c_NE</i>	g c c a a t c c a c c g a c a g t c g g g g c c c g c a a g a c t c g t g t g a g c a t c t a c c g c c a g a g g a	1218
RBP42/STOP-R		
<i>T.c_E</i>	c g a g g c a g c a a g g a g a g a a c a a c g a a a a t a g g a c t c a c t g a	1249
<i>T.c_NE</i>	c g a g g c a g c a a g g a g a g a a c a a c g a a a a t a g g a c t c a c t g a	1259

O alinhamento mostra a alta identidade entre as sequências analisadas. Foram alinhadas a região codificadora (sombreado em cinza) dos alelos Esmeraldo-like [*T.c_E*] (TcCLB.509167.140) e Não Esmeraldo-like de TcRBP42 [*T.c_NE*] (TcCLB.485683.10), e uma pequena porção da região intergênica localizada na extremidade 5' desses genes. Os nucleotídeos e traços realçados em vermelho representam as diferenças encontradas entre as sequências comparadas. Na figura também foram representados os oligonucleotídeos que se anelam nas sequências de TcRBP42 (**Quadro 1**) e a estratégia utilizada para gerar epimastigotas Nocautes para esses genes. A estratégia de edição emprega dois RNAs guias que direcionam a enzima Cas9 da espécie *Staphylococcus aureus* para regiões próximas ao códon de início de ambos os alelos de TcRBP42. Após o corte duplo (triângulos), a região central é perdida (deleção de 72 nucleotídeos) e um oligonucleotídeo doador de fita simples guia o reparo de DNA por recombinação homóloga. Nesse oligonucleotídeo doador estão presentes dois braços de homologia flanqueadores (HRI e HRII – linhas tracejadas em rosa) e uma região central (realçada em verde) contendo 3 stop códons nas três fases de leitura (letras maiúsculas), uma *tag* de M13 (letras minúsculas em negrito) e sítios de restrição para as enzimas XhoI e EcoRI (letras minúsculas em itálico). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 9 — Características das sequências de aminoácidos de TcRBP42

As proteínas RBP42 do *T. cruzi* da cepa CL Brener apresentam uma disposição modular. São dois domínios conservados, NTF2-like e RRM, interligados por uma longa região central predita como intrinsecamente desordenada (IDR1). Nessa região ainda são encontrados motivos ricos em prolina com o consenso PxxP. Uma região intrinsecamente desordenada adicional está presente após o domínio RRM (IDR2) (A). O alinhamento das sequências de aminoácidos mostra que as proteínas TcRBP42 codificadas pelos alelos de cópia única nos haplótipos Esmeraldo-like (*T.c_E*) e Não Esmeraldo-like (*T.c_NE*) são altamente conservadas entre si, diferindo apenas em sete aminoácidos (marcados em vermelho) localizados principalmente na IDR1. Os domínios NTF2-like e RRM foram sombreados em azul e verde, respectivamente. Os motivos PxxP aparecem sublinhados. O domínio RRM possui apenas um dos motivos de reconhecimento de RNA conservado nesses domínios, o RPN1, o qual é delimitado pela caixa pontilhada (B). aa: aminoácidos. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 10 — TcRBP42 e suas proteínas ortólogas estudadas em outras espécies de tripanosomatídeos



A estrutura tridimensional para TcRBP42 foi predita pelo *software* de inteligência artificial *AlphaFold2* e recuperada do *AlphaFoldDB* com o identificador Q4DQQ3. Os modelos para os domínios NTF2-like (A) e RRM (B) foram preditos com valores de confiança alto ou muito alto para a grande maioria dos resíduos. As regiões desordenadas foram omitidas para conferir maior clareza a representação. Apenas os elementos de estrutura secundária com uma extensão mínima de quatro resíduos foram considerados. Ambos os domínios preditos possuem topologia compatível com aquelas já conhecidas para esses domínios. As regiões N e C terminal também estão indicadas. A comparação entre TcRBP42 [*T.c.CL*] e as proteínas ortólogas estudadas no *T. cruzi* da cepa Y [*T.c.Y*], *T. brucei* [*T.b*] e *L. braziliensis* [*L.b*] mostra que todas essas proteínas compartilham a mesma organização estrutural, mas diferem na extensão da região central intrinsecamente desordenada. Além disso, as proteínas RBP42 das diferentes cepas do *T. cruzi* contêm uma região intrinsecamente desordenada adicional após o domínio RRM. As proteínas RBP42 dos tripanosomatídeos também foram comparadas a G3BP1 (*Homo sapiens*). Todas essas proteínas apresentam basicamente a mesma organização estrutural, com exceção da região rica em glutamatos (Glu-rich) e do domínio RGG presentes exclusivamente na proteína humana (C). Identificadores no *TriTrypDB* e no *UniprotKB*: TcCLB.509167.140, TcCLB.485683.10, Tb927.6.4440, LbrM.30.3080 e Q13283. A sequência da proteína *T.c.Y* está disponível em WEISBARTH *et al.*, 2018. aa: aminoácidos, α : α -hélice e β : segmento em conformação β . Fonte: Elaborado pelo autor.

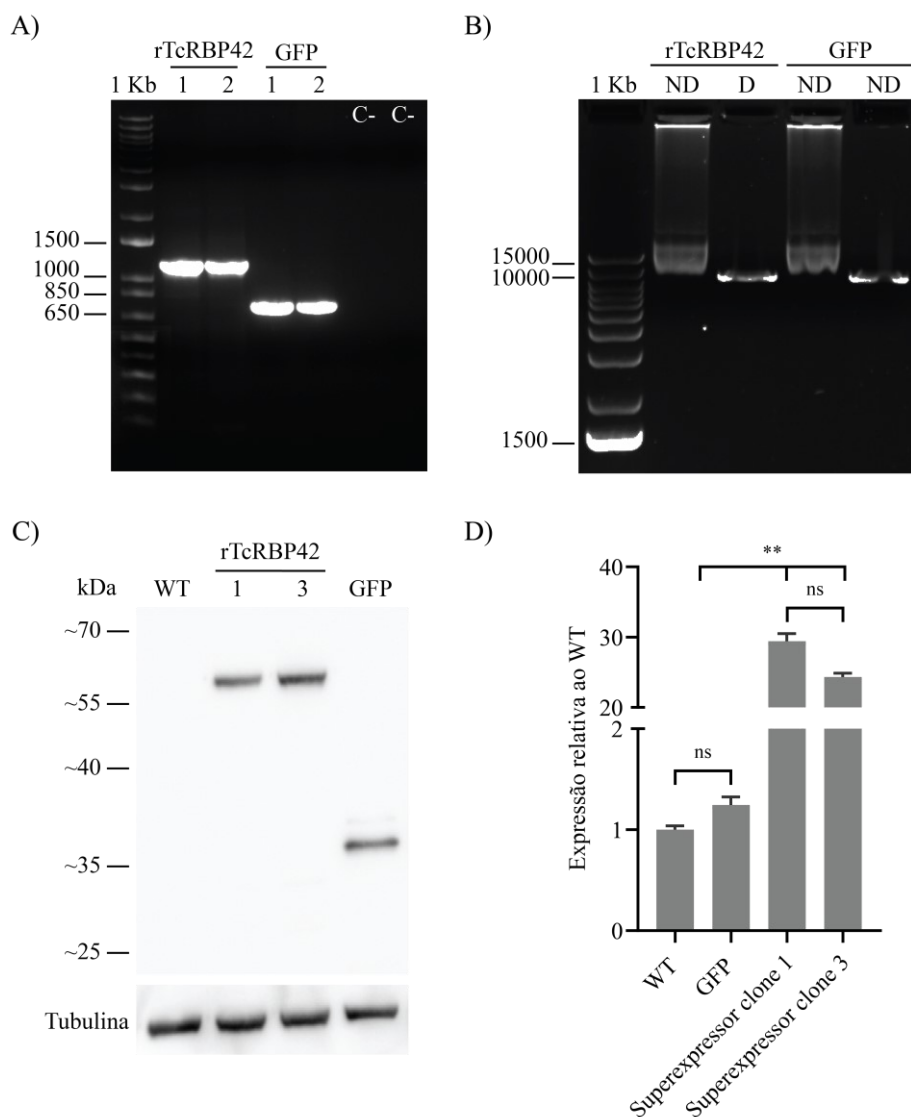
5.2 Expressão de proteínas recombinantes no *T. cruzi*

A primeira etapa na obtenção das linhagens de epimastigotas expressoras de uma cópia recombinante de TcRBP42 (rTcRBP42) e de GFP foi a produção de quantidades suficientes dos vetores de expressão destinados à eletroporação do *T. cruzi*. Esse processo começou pela transformação de bactérias eletrocompetentes, o que foi seguido pela expansão em meio líquido de uma colônia PCR positiva para cada vetor (**Figura 11 A**) e purificação por Miniprep. Os vetores foram então linearizados com a enzima de restrição NotI (**Figura 11 B**) e empregados na eletroporação de epimastigotas WT. A linearização dos vetores favorece a integração destes ao locus do gene da β -tubulina por recombinação homóloga (DAROCHA *et al.*, 2004b). Após a seleção dos parasitos com o antibiótico neomicina e a clonagem por diluição limitante, a expressão das proteínas recombinantes foi confirmada em alguns dos clones obtidos por *Western Blot*. Nesse experimento, as proteínas rTcRBP42 e GFP foram detectadas eficientemente nos extratos proteicos totais pelo anticorpo Anti-His-Tag, que reconhece a cauda de histidina presentes nessas proteínas. A ausência de detecção de proteínas nas epimastigotas WT (controle) demonstrou a alta especificidade de reconhecimento da cauda de histidina pelo anticorpo utilizado (**Figura 11 C**).

Nesse trabalho não foi possível quantificar a expressão total da proteína TcRBP42 (versão recombinante + proteína nativa) nos clones selecionados devido à indisponibilidade de um anticorpo que também reconheça a proteína nativa. Como alternativa, o nível dos transcritos de TcRBP42 provenientes da cópia recombinante e dos alelos Esmeraldo-like e Não Esmeraldo-like foram quantificados por PCR em tempo real nos clones obtidos (**Figura 11 D**). Os experimentos de PCR em tempo real mostraram que os clones Superexpressores de TcRBP42 possuem níveis significativamente aumentados (p -valor $< 0,01$) dos transcritos de TcRBP42 em comparação com o controle WT (média de 29X de aumento para o Superexpressor clone 1 e 24X para o Superexpressor clone 3). Esse resultado é compatível com o fato de a cópia recombinante do gene de TcRBP42 estar sob o controle de um promotor forte e de expressão constitutiva (RNA ribossomal). A comparação entre o Superexpressor clone 1 e clone 3 não mostrou diferenças significativas entre eles. Como esperado, os níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 nas epimastigotas WT e Expressoras de GFP também não são significativamente diferentes (**Figura 11 D**). Em conjunto, os dados mostram que as linhagens de epimastigotas Superexpressoras de TcRBP42 e Expressoras de GFP foram estabelecidas com sucesso. As linhagens de epimastigotas geradas foram monitoradas e permaneceram PCR negativas para a contaminação por *Micoplasma sp.* durante todo o projeto. Um resultado

representativo é apresentado no **APÊNDICE B**. Os oligonucleotídeos utilizados para a construção e sequenciamento dos vetores de expressão, genotipagem das colônias bacterianas, PCR em tempo real e teste da contaminação por *Micoplasma sp.* estão descritos no **Quadro 1**.

Vale ressaltar que o controle Expressor de GFP utilizado nesse trabalho não constitui um controle de vetor vazio. A escolha pela expressão da proteína GFP nas epimastigotas foi motivada pela necessidade da inclusão desse controle nos experimentos de Microscopia de fluorescência confocal descritos posteriormente e também nos experimentos de imunoprecipitação dos complexos formados por rTcRBP42. No planejamento original do projeto, a imunoprecipitação de rTcRBP42 seria seguida pelo sequenciamento dos transcritos associados a essa proteína em condições normais de cultivo e após a exposição à radiação gama. Inúmeros protocolos já foram testados sem sucesso para a imunoprecipitação de rTcRBP42. O resultado de um dos protocolos testados é apresentado no **APÊNDICE C**. Nesse experimento, rTcRBP42 foi detectada no extrato proteico total (*input*), porém esta não foi imunoprecipitada. Diante das enormes dificuldades encontradas para se imunoprecipitar rTcRBP42 e estudar os seus transcritos alvos por meio de uma abordagem ômica (*RNA-seq*), a técnica de PCR em tempo real foi utilizada como alternativa. Embora essa técnica não substitua o *RNA-seq*, esta permitiu o estudo da expressão de alguns dos genes descritos anteriormente como alvos da proteína RBP42 do parasito *T. brucei* (DAS *et al.*, 2012). Os resultados desses experimentos serão apresentados mais adiante.

Figura 11 — Expressão de proteínas recombinantes no *T. cruzi* da cepa CL Brener

Quantidades suficientes dos vetores pRock_SPB/6x-His_RBP42 e pRock_SPB/6x-His_GFP foram produzidas a partir de colônias bacterianas PCR positivas para os genes recombinantes. Os amplicons dos genes rTcRBP42 e GFP contêm 1176 e 746 pares de bases, respectivamente (**A**). As epimastigotas foram então eletroporadas com os vetores linearizados (**B**). Após seleção e clonagem, a expressão das proteínas recombinantes foi confirmada por *Western Blot*. Os tamanhos preditos computacionalmente para rTcRBP42 e GFP foram de 47,20 e 32,54 kDa, respectivamente. A proteína tubulina foi utilizada como controle de carregamento (**C**). Os níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 nas epimastigotas WT, Expressoras de GFP e Superexpressoras de TcRBP42 (Clones 1 e 3) foram quantificados por RT-qPCR utilizando-se como referência os genes TERT e RPL9 (**D**). As diferenças estatísticas foram avaliadas com o teste *One-Way* ANOVA corrigido pelo método de Tukey (** p-valor < 0,01). As barras representam o erro padrão das médias (SEM). Foram utilizados os padrões de peso molecular 1 Kb *Plus DNA Ladder* (Invitrogen™) e *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa* (Thermo Scientific™). C-: controle negativo, D: vetor digerido, ND: vetor não digerido e ns: p-valor não significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.3 Produção de epimastigotas Nocautes para TcRBP42

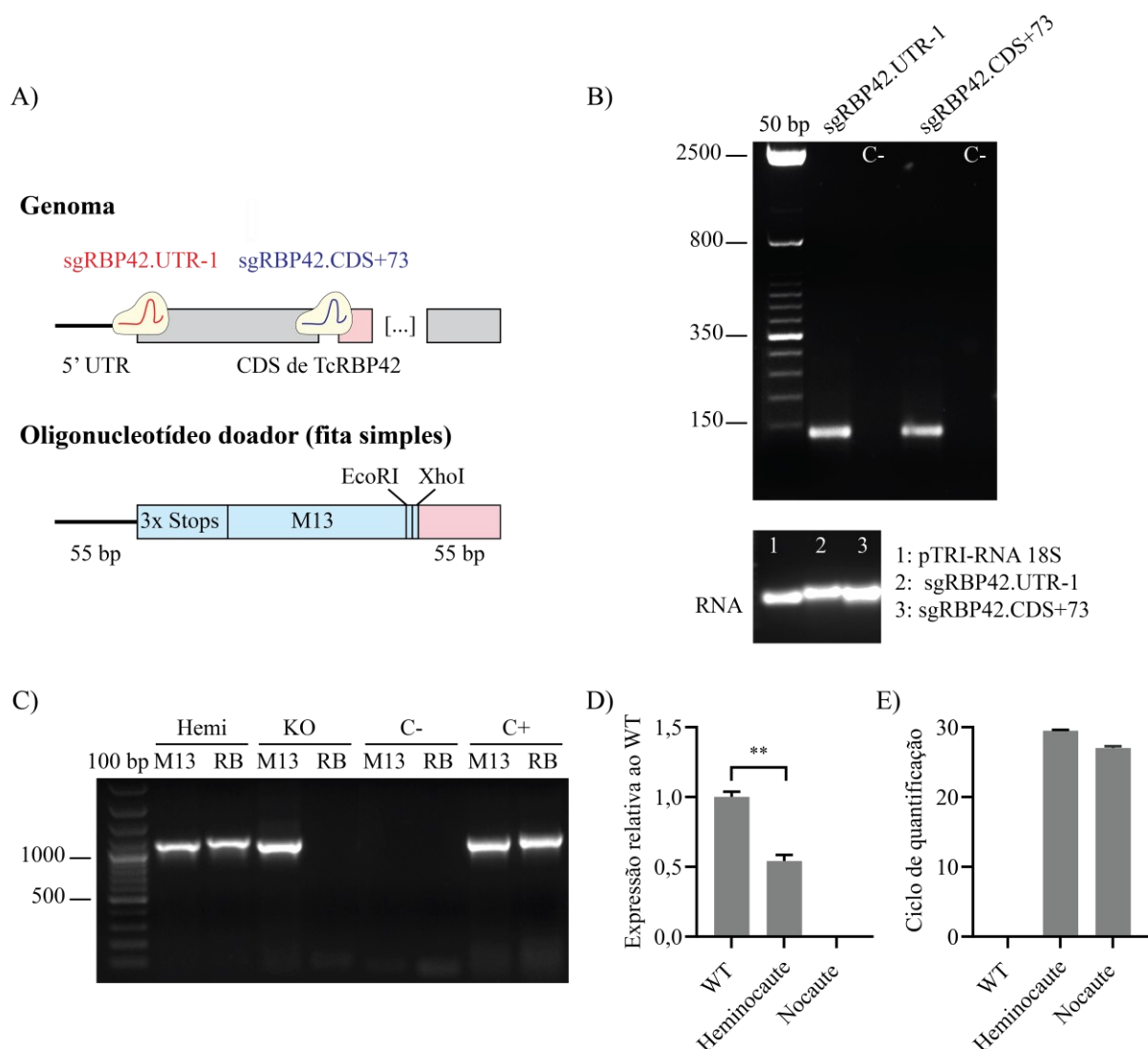
Para gerar os parasitos Nocautes para TcRBP42, o genoma de epimastigotas WT foi editado com uma versão do sistema de CRISPR/Cas9 adaptada para a edição gênica nos tripanosomatídeos (BURLE-CALDAS *et al.*, 2018; SOARES-MEDEIROS *et al.*, 2017). Nesse trabalho ambos os alelos de TcRBP42 foram interrompidos pela inserção de 3 stop códons nas três fases de leitura e uma deleção de 72 nucleotídeos logo no início da região codificadora. Para tanto, foi utilizado um oligonucleotídeo doador de fita simples contendo braços de homologia flanqueadores de 55 nucleotídeos de extensão. Uma *tag* de M13 e sítios de restrição para as enzimas EcoRI e XhoI também foram adicionados para fornecer estratégias distintas para a genotipagem dos parasitos editados. Além dos 3 stop códons iniciais, vários stop códons adicionais são gerados ao longo das sequências dos genes editados. Na **Figura 12 A**, a estratégia de edição utilizada é apresentada de forma esquemática. Esta mesma estratégia pode ser visualizada na **Figura 8** que utiliza como base o alinhamento das sequências dos genes de TcRBP42. Os oligonucleotídeos que se anelam na região analisada também são mostrados.

Para a edição dos genes de interesse, duas sequências guias próximas ao ATG inicial foram selecionadas. Estas foram então inseridas no *scaffold* completo do RNA guia da SaCas9 por PCR (**Figura 12 B, painel superior**). Os produtos amplificados foram purificados e utilizados para a transcrição *in vitro* dos RNAs guias sgRBP42.UTR-1 e sgRBP42.CDS+73. A integridade dos RNAs produzidos foi analisada por eletroforese em gel de agarose (**Figura 12 B, painel inferior**). Subsequentemente, os RNAs guias foram combinados *in vitro* com a enzima SaCas9 purificada para a formação dos complexos ribonucleoproteicos. Em conjunto com o oligonucleotídeo doador, esses complexos foram utilizados para a eletroporação de epimastigotas WT PCR negativas para a contaminação por *Mycoplasma sp.* Após uma semana de recuperação, os parasitos foram clonados por diluição limitante e os clones obtidos foram genotipados por PCR convencional (**Figura 12 C**). Os oligonucleotídeos utilizados podem discriminar o alelo editado do não editado ao se anelarem especificamente na *tag* de M13 ou no início dos alelos *wild type* de TcRBP42. Foram necessárias duas rodadas de edição para modificar ambos os alelos codificadores da proteína TcRBP42. Dessa forma, foram obtidos primeiro os parasitos Heminocautes (apenas um alelo editado) e depois os Nocautes (ambos os alelos editados) para TcRBP42. No entanto, a maioria dos clones Heminocautes obtidos perderam a *tag* de M13 após alguns meses em cultura (resultado não mostrado). A edição dos genes de TcRBP42 foi desafiadora. Vários experimentos falharam até a obtenção dos resultados pretendidos. A edição dos genes de interesse foi confirmada através do sequenciamento pelo

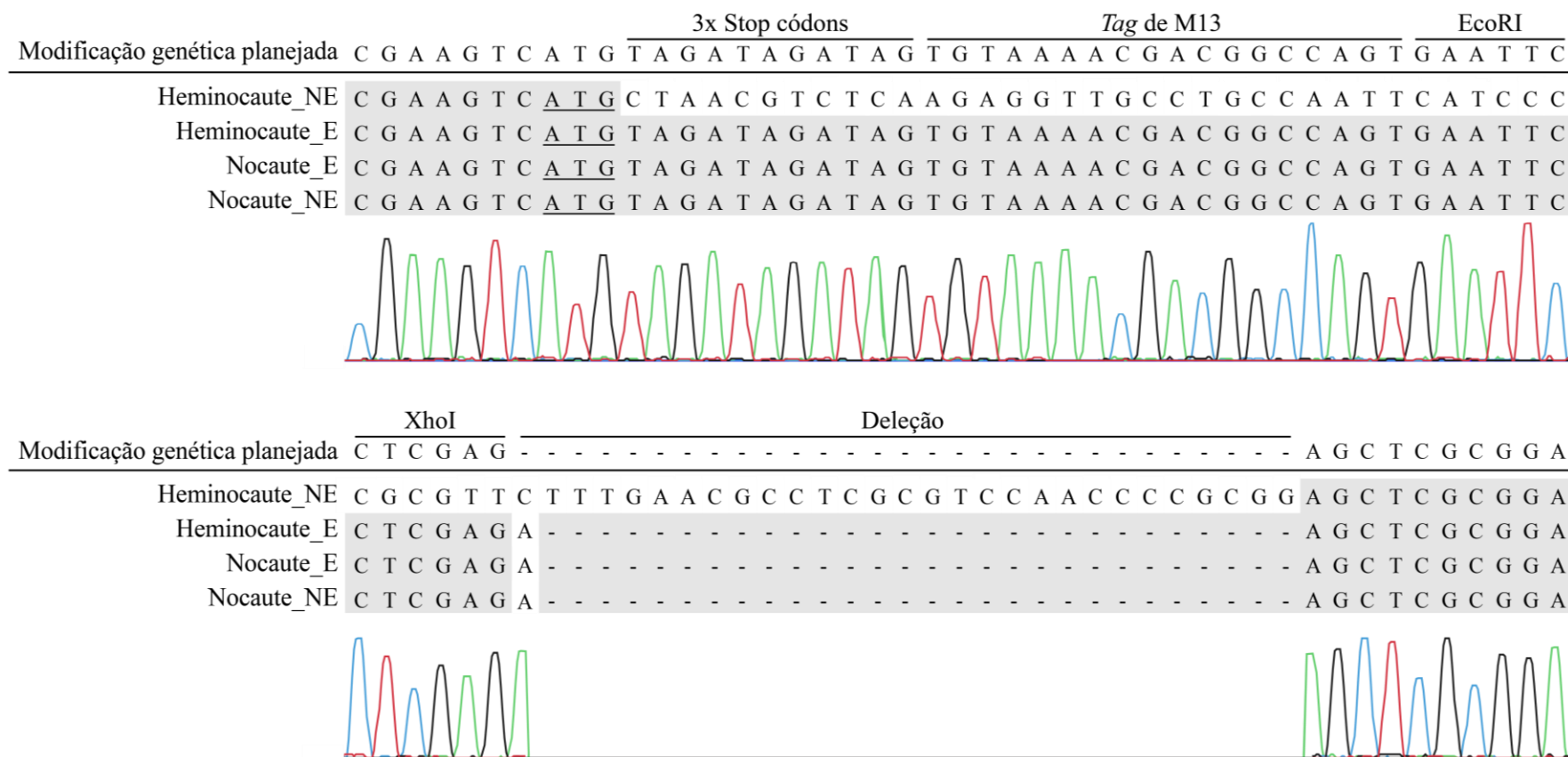
método de Sanger. Foram sequenciados produtos de PCR gerados a partir de oligonucleotídeos que se anelam especificamente nos alelos Esmeraldo-like ou Não Esmeraldo-like de TcRBP42. Esses oligonucleotídeos também inseriram nos produtos de PCR uma *tag* de SP6 que foi utilizada no sequenciamento (**Figura 13**).

Para verificar a expressão dos transcritos selvagens de TcRBP42 nos parasitos editados foi utilizada a técnica de PCR em tempo real. Como esperado, transcritos selvagens de TcRBP42 não foram detectados em parasitos Nocautes. Adicionalmente, os parasitos Heminocautes possuem aproximadamente metade dos níveis de expressão mensurados para as epimastigotas WT ($p\text{-valor} < 0,01$) (**Figura 12 D**). A expressão dos alelos editados também foi verificada pela mesma técnica. Os resultados mostraram que apesar da presença de vários stop códons prematuros, os transcritos oriundos dos genes editados existem no *pool* de RNAs totais das epimastigotas em quantidades suficientes para detecção por PCR (**Figura 12 E**). Todos os experimentos mostram que os genes de TcRBP42 foram editados com sucesso utilizando-se a tecnologia de CRISPR/Cas9. Essas culturas também foram monitoradas e permaneceram PCR negativas para a contaminação por *Mycoplasma sp.* durante todo o estudo. As sequências de todos os oligonucleotídeos utilizados estão descritas no **Quadro 1**.

Figura 12 — Produção de epimastigotas Heminocautes e Nocautes para TcRBP42 utilizando-se a tecnologia de CRISPR/Cas9



As epimastigotas WT foram eletroporadas com um oligonucleotídeo doador em conjunto com a enzima SaCas9 já complexada com seus RNAs guias. Após o corte duplo próximo ao início de ambos os alelos de TcRBP42, a região central foi deletada e substituída por uma *tag* de M13, 3 stop códons nas três fases de leitura e sítios de restrição para as enzimas EcoRI e XhoI (A). Para a produção dos RNAs guias, as sequências completas destes foram primeiro amplificadas por PCR e então transcritas *in vitro*. O RNA pTRI-RNA 18S foi utilizado como controle positivo e como referência de tamanho. A integridade dos RNAs também é mostrada (B). Os clones de parasitos editados foram genotipados por PCR utilizando-se oligonucleotídeos que discriminam os alelos editados (M13) e não editados (RB) (C). A expressão dos transcritos selvagens de TcRBP42 foi avaliada em parasitos WT, Heminocaute (Hemi) e Nocaute (KO) por RT-qPCR utilizando-se como referência os genes TERT e RPL9. As diferenças estatísticas entre parasitos WT e Heminocautes foram avaliadas com o teste t não pareado (** p-valor < 0,01) (D). A expressão dos alelos editados também foi confirmada pela técnica de PCR em tempo real (E). As barras representam o erro padrão das médias (SEM). Foram utilizados os padrões de peso molecular de 50 e 100 bp (Invitrogen™). C-: controle negativo e C+: controle positivo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 13 — Sequenciamento pelo método de Sanger de epimastigotas Heminocautes e Nocautes para os genes codificadores de TcRBP42

O sequenciamento pelo método de Sanger foi realizado a partir de produtos de PCR produzidos com oligonucleotídeos que discriminam os alelos Esmeraldo-like (E) e Não Esmeraldo-like (NE) de TcRBP42. Apenas as regiões próximas ao sítio da edição genética planejada são mostradas. Nos parasitos Heminocautes, o alelo editado foi o Esmeraldo-like. Em relação aos alelos selvagens, uma região de 72 nucleotídeos foi deletada em adição a inserção dos stop códons, tag de M13 e sítios de restrição. Fonte: Elaborado pelo autor.

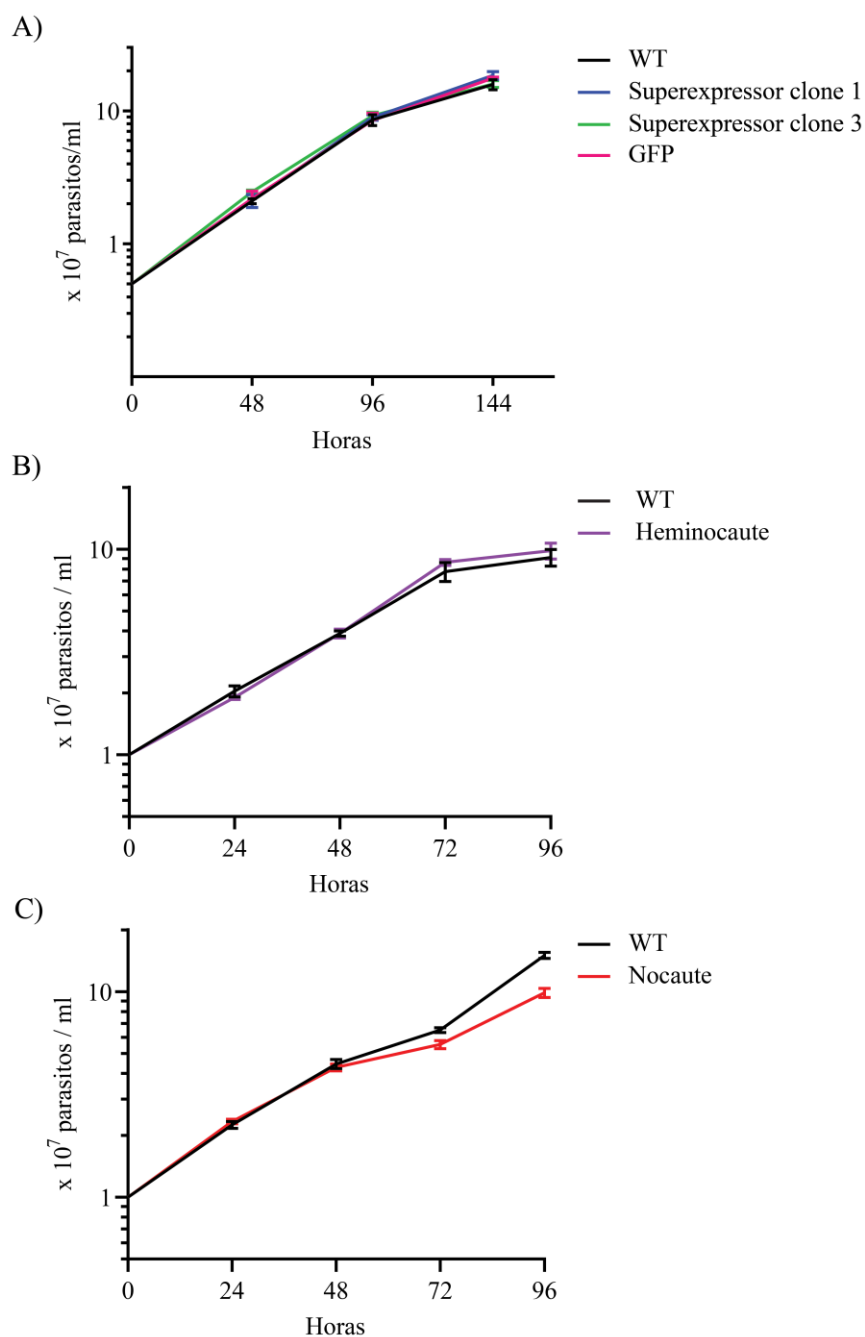
5.4 Avaliação fenotípica das epimastigotas manipuladas geneticamente

Após o estabelecimento das culturas de epimastigotas manipuladas geneticamente, os efeitos dessas modificações foram primeiramente avaliados no crescimento dos parasitos. As curvas de crescimento das culturas Superexpressoras de TcRBP42 mostraram que esses parasitos apresentam crescimento muito similar àquele de parasitos WT (**Figura 14 A**). O mesmo comportamento foi observado para epimastigotas Expressoras de GFP (**Figura 14 A**) e Heminocautes para TcRBP42 (**Figura 14 B**). Em contraste, as epimastigotas Nocautes apresentaram defeitos moderados na proliferação apenas em densidades próximas àquelas observadas na fase estacionária do crescimento (**Figura 14 C**). Quanto a viabilidade, todas as modificações genéticas realizadas geraram culturas de epimastigotas viáveis.

Com relação à morfologia das epimastigotas, a superexpressão de TcRBP42 ou a expressão da proteína GFP não causaram mudanças aparentes na morfologia das epimastigotas (**Figura 20 A**). Entretanto, o nocaute de TcRBP42 causou grandes alterações morfológicas. Nessas culturas foram observadas tanto epimastigotas com morfologias aparentemente normais quanto alteradas. Os parasitos alterados morfolologicamente possuem corpo arredondado, flagelo encurtado e formam agregados, nos quais é possível observar os limites dos parasitos individuais. A observação na presença do corante vital eritrosina mostrou que as alterações morfológicas não resultam da morte imediata dos parasitos (**Figura 15**). Adicionalmente, esses apresentam mobilidade ausente ou bastante reduzida conforme observação realizada por meio de um Microscópio óptico convencional (**Vídeo suplementar 1**). Com relação aos parasitos Heminocautes para TcRBP42, estes apresentam morfologias e mobilidades semelhantes às dos parasitos WT (**Figuras 15 e Vídeo suplementar 1**). As morfologias das epimastigotas WT, Heminocautes e Nocautes para TcRBP42 também foram avaliadas em maior resolução utilizando-se a Microscopia de fluorescência confocal. Essa técnica também foi utilizada para verificar a existência de problemas de divisão celular evidenciados pela presença de vários núcleos e/ou cinetoplastos. As imagens adquiridas confirmaram os achados morfológicos anteriores e mostraram que os parasitos pertencentes às linhagens Heminocaute e Nocaute para TcRBP42 possuem apenas um núcleo e um cinetoplasto (**Figura 16**). Os parasitos Superexpressores de TcRBP42 (clone 1) e Expressores de GFP também apresentaram um único núcleo e cinetoplasto (**Figura 20 A**). Os resultados obtidos para os parasitos Nocautes mostram que esta alteração genética é viável no *T. cruzi* e aparentemente não causa problemas de divisão celular.

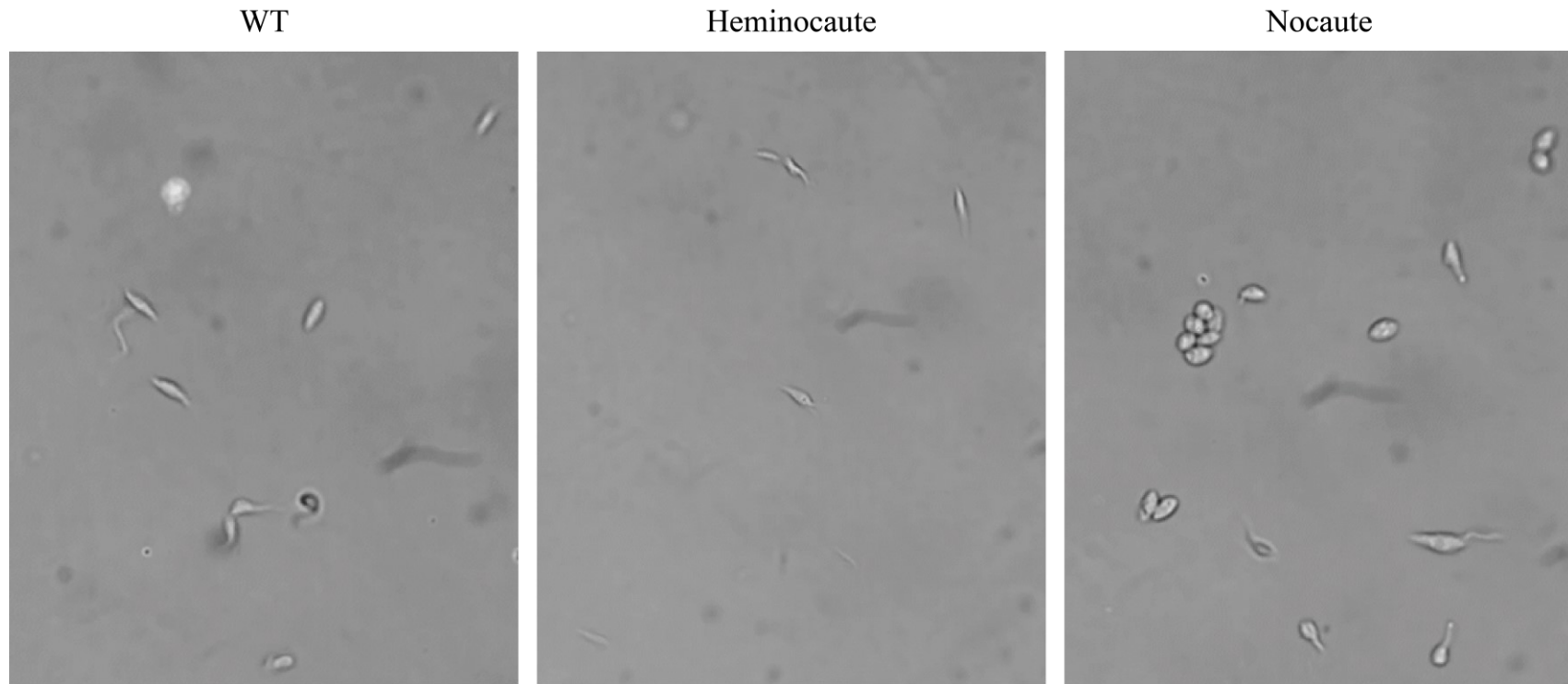
Considerando-se os resultados obtidos até aqui, decidiu-se pela continuidade das análises apenas para as epimastigotas WT, GFP, Superexpressor clone 1 e Nocaute para TcRBP42. O Superexpressor clone 3 e Heminocaute não apresentaram diferenças significativas em relação aos seus respectivos controles e por isso não seguiram nas análises. Em todos os experimentos posteriores, o Superexpressor clone 1 de TcRBP42 é referido apenas como Superexpressor.

Figura 14 — Curvas de crescimento de culturas de epimastigotas em condições normais de cultivo



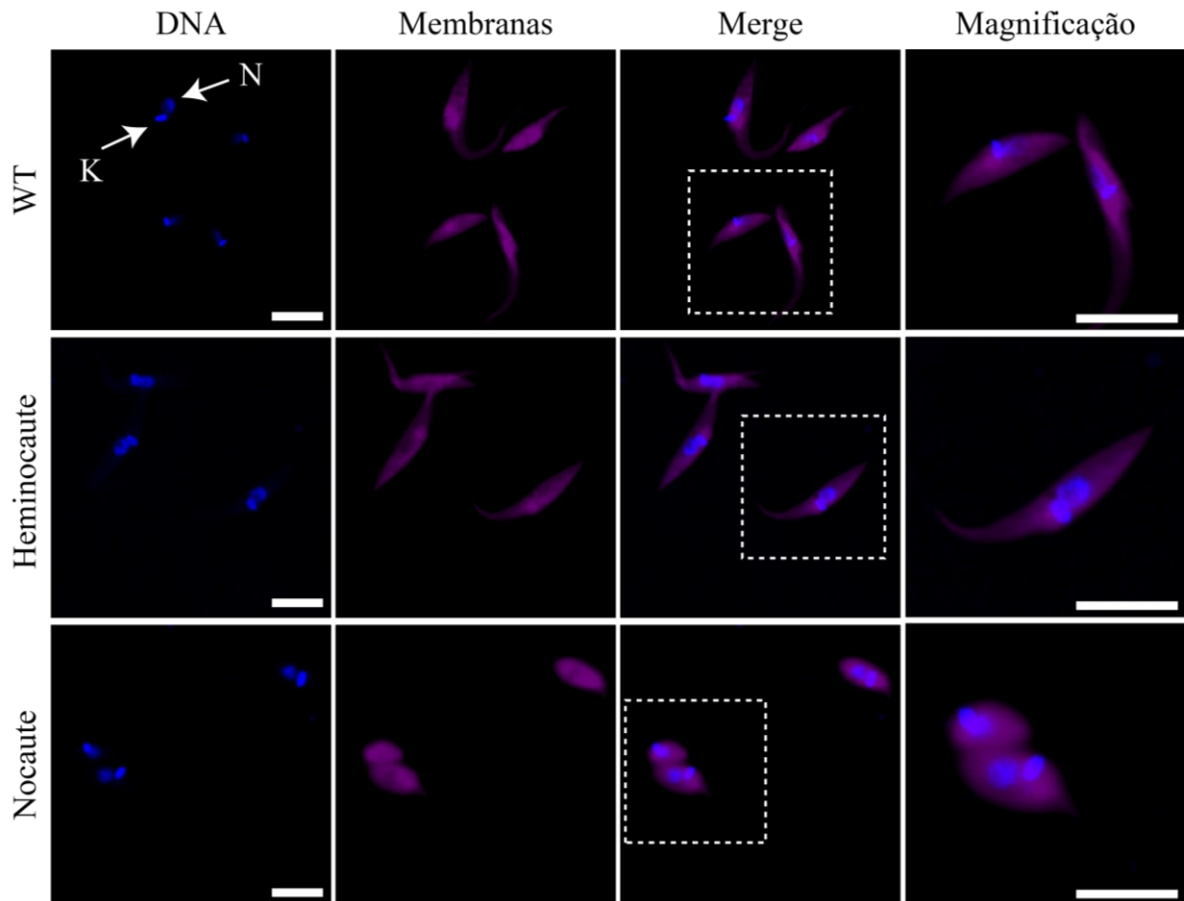
O crescimento das epimastigotas WT foi comparado àquele de epimastigotas Superexpressoras de TcRBP42 e Expressoras de GFP (A). Essa comparação também foi realizada para os parasitos Heminocautes (B) e Nocautes para TcRBP42 (C). Os valores representados nos gráficos correspondem às médias de três réplicas técnicas de um experimento representativo realizado nas condições normais de cultivo. O desvio padrão também é mostrado. As diferenças no crescimento dos parasitos foram avaliadas com o teste *One-way* ANOVA. Os valores representados no eixo y estão em escala logarítmica. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 15 — Morfologias das epimastigotas WT, Heminocautes e Nocautes para TcRBP42 observadas por Microscopia óptica convencional



A interrupção de ambos os alelos de TcRBP42 (nocaute) com stop códons prematuros levou ao aparecimento de epimastigotas alteradas morfológicamente em comparação ao observado para os parasitos WT e Heminocautes. Nas culturas Nocautes estão presentes tanto parasitos com morfologias aparentemente típicas quanto alteradas. Esses parasitos apresentam corpo circular, flagelo encurtado e mobilidade reduzida, além de formarem agregados. As epimastigotas foram observadas na presença do corante vital eritrosina a partir da ocular de um microscópio óptico equipado com uma objetiva de 40X. O **Vídeo suplementar 1** mostra a mobilidade dos parasitos em cultura. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 16 — Morfologias observadas por Microscopia de fluorescência confocal

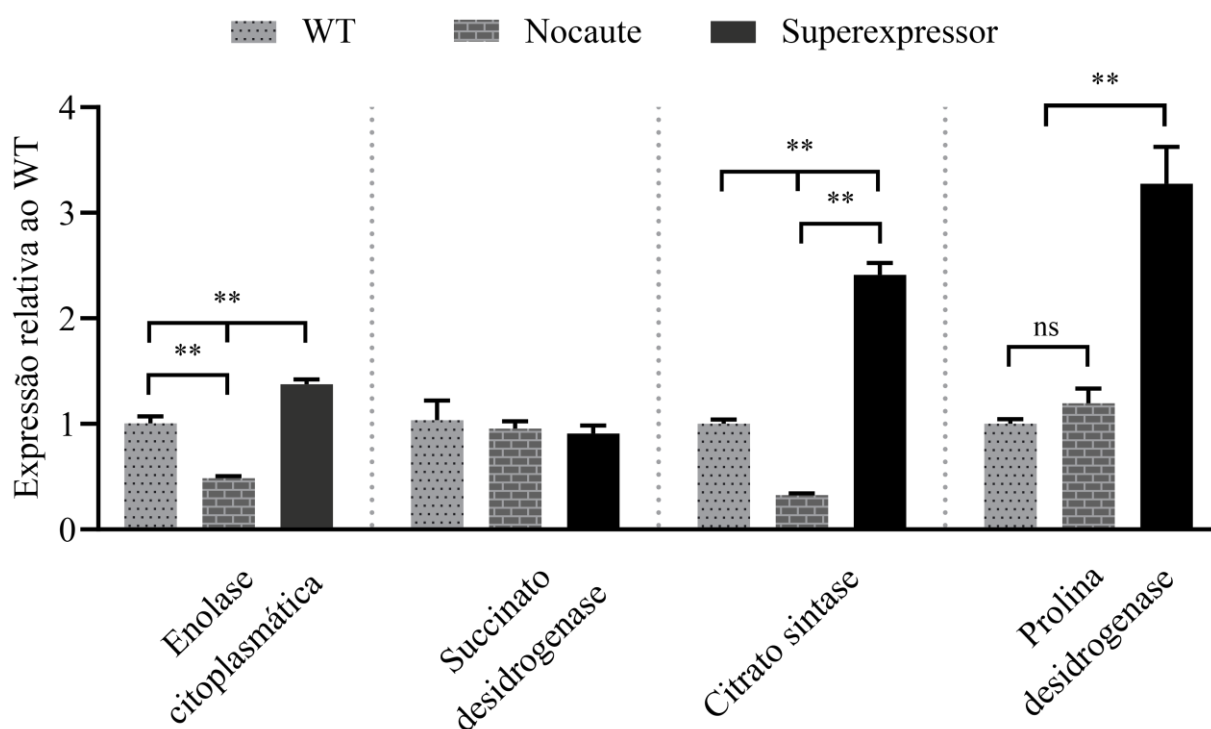


As imagens foram adquiridas a partir de epimastigotas WT, Heminocautes e Nocautes para TcRBP42 nas condições normais de cultivo. O contorno dos parasitos foi delimitado pelo corante *CellMask™ Plasma Membrane Stain (deep red)*. O DNA genômico (N) e kDNA (K) foram marcados com Dapi. Barra de magnificação: 10 μ m. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5 Avaliação da expressão de transcritos preditos como alvos de TcRBP42

Os níveis de expressão dos transcritos de alguns genes preditos como alvos para TcRBP42 foram avaliados por PCR em tempo real na condição normal de cultivo. Os alvos foram escolhidos baseando-se na análise realizada previamente para a proteína RBP42 do *T. brucei*. Nesse organismo, essa proteína se liga principalmente a transcritos do metabolismo energético (DAS et al., 2012). Nesse sentido, foram escolhidos para análise os genes codificadores das enzimas Enolase citoplasmática (citoplasma – Glicólise), Citrato sintase (mitocôndria – Ciclo do ácido cítrico), Succinato desidrogenase (mitocôndria – Ciclo do ácido cítrico) e Prolina desidrogenase (mitocôndria – metabolismo de Prolina). O primeiro gene pertencente ao ciclo do ácido cítrico foi escolhido em razão do produto deste ser um ponto de regulação e o segundo foi escolhido por codificar uma enzima que também faz parte da cadeia transportadora de elétrons (Complexo II). A expressão desses genes foi avaliada nos parasitos WT, Superexpressores e Nocautes para TcRBP42 com o intuito de se obter evidências sobre a função de TcRBP42 nas condições normais de cultivo. O gráfico de expressão relativa apresentado na **Figura 17** sugere que TcRBP42 interage direta ou indiretamente de formas distintas com os transcritos analisados. Os transcritos dos genes da Enolase citoplasmática e da Citrato sintase são possivelmente associados a TcRBP42 e estabilizados pela proteína TcRBP42. Nos parasitos Nocautes, os níveis desses transcritos são significativamente menores do que em parasitos WT (p -valor $< 0,01$). Em contraste, a superexpressão de TcRBP42 aumenta os níveis de expressão desses mesmos transcritos, o que ocorre de forma muito acentuada para o gene da Citrato sintase. Com relação aos transcritos da Succinato desidrogenase, os níveis destes não são alterados pelo nocaute ou superexpressão de TcRBP42. Esse resultado sugere que TcRBP42 não interage com esse transcrito nas condições normais de cultivo. Para os transcritos da Prolina desidrogenase, o nocaute de TcRBP42 não afeta os seus níveis de expressão. Entretanto, a superexpressão de TcRBP42 aumenta significativamente a abundância desses transcritos. Provavelmente, a superexpressão de TcRBP42 leva a maior estabilização dos mRNAs da Prolina desidrogenase (p -valor $< 0,01$).

Figura 17 — Expressão de transcritos do metabolismo energético em condições normais de cultivo



Os níveis de expressão dos transcritos foram mensurados pela técnica de PCR em tempo real em parasitos WT, Superexpressores e Nocautes para TcRBP42. Foram avaliados os genes codificadores das enzimas do metabolismo energético: Enolase citoplasmática (glicólise), Succinato desidrogenase (ciclo do ácido cítrico), Citrato sintase (ciclo do ácido cítrico) e Prolina desidrogenase (metabolismo da prolina). As expressões foram normalizadas com os genes TERT e RPL9. O teste estatístico utilizado foi o *One-way* ANOVA com correção pelo método de Tukey (** p-valor < 0,01). As barras representam o erro padrão das médias (SEM). ns: p-valor não significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

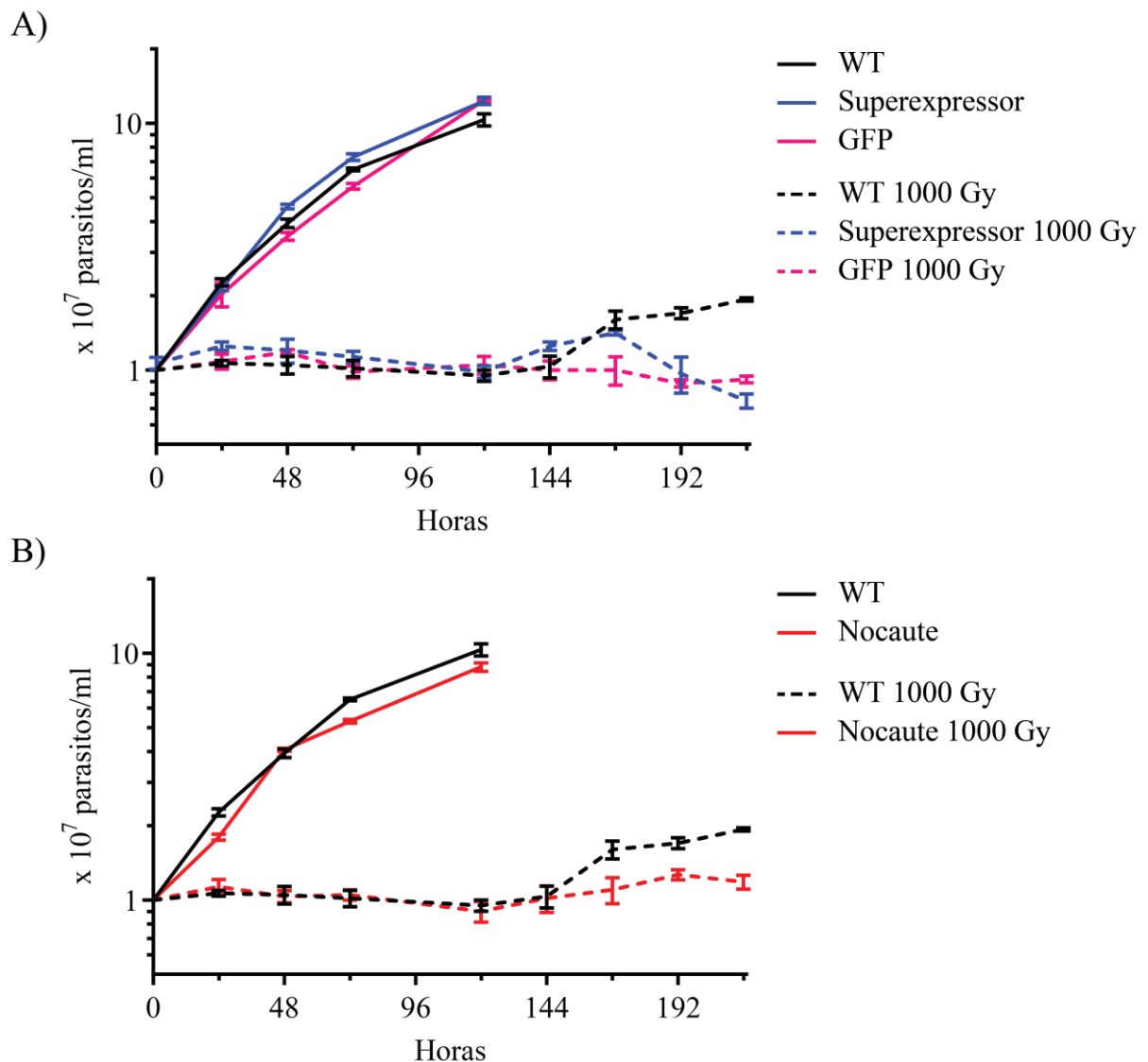
5.6 Indução de estresse celular pela exposição à radiação gama

Para estudar os efeitos da radiação gama, epimastigotas em fase exponencial do crescimento foram irradiadas com uma dose de 1000 Gy de radiação gama (taxa dose de 1560 Gy/hora). Após a irradiação, foram avaliados o crescimento, a localização subcelular de TcRBP42 e os níveis de expressão de alguns dos transcritos preditos como alvos para essa proteína. Foram analisados os parasitos WT, GFP, Superexpressores e Nocautes para TcRBP42.

5.6.1 Crescimento das epimastigotas irradiadas

Após a irradiação, a proliferação das epimastigotas foi avaliada por meio de contagens diárias em câmeras de Neubauer. Nas condições normais de cultivo, novamente não foram observadas diferenças significativas nos padrões de crescimento das epimastigotas Superexpressoras de TcRBP42 em comparação aos controles WT e GFP (**Figura 18 A – linhas contínuas**). Após o tratamento com radiação gama, o mesmo comportamento foi observado (**Figura 18 A – linhas tracejadas**). A irradiação afetou de forma semelhante as diferentes linhagens de epimastigotas testadas, levando a uma longa parada no crescimento celular. Após aproximadamente 144 h, o crescimento começou a ser retomado lentamente pelos parasitos WT e Superexpressores de TcRBP42. A mortalidade dos parasitos Superexpressores começou a ser observada no final da curva de crescimento. A retomada do crescimento dos parasitos Expressores de GFP não foi observada em um intervalo de 216 h de análise. A aplicação de 1000 Gy de radiação gama também não causou alterações na morfologia típica das epimastigotas do *T. cruzi* da cepa CL Brener (**Figura 20 B e C**).

Em relação à comparação entre parasitos WT e Nocautes para TcRBP42 também não foram detectadas diferenças de crescimento significativas na condição normal (**Figura 18 B – linhas contínuas**) e irradiada (**Figura 18 B – linhas tracejadas**). Para ambas as linhagens analisadas, um aumento no número de parasitos começou a ser detectado a partir de 144 h após a indução do estresse por radiação gama. Após a retomada de crescimento, as culturas WT atingiram densidades superiores àquelas das culturas Nocautes no tempo analisado. À semelhança do que acontece na condição normal de cultivo, as mesmas alterações morfológicas foram observadas nos parasitos Nocautes durante toda a curva de crescimento das culturas irradiadas.

Figura 18 — Curvas de crescimento de epimastigotas irradiadas

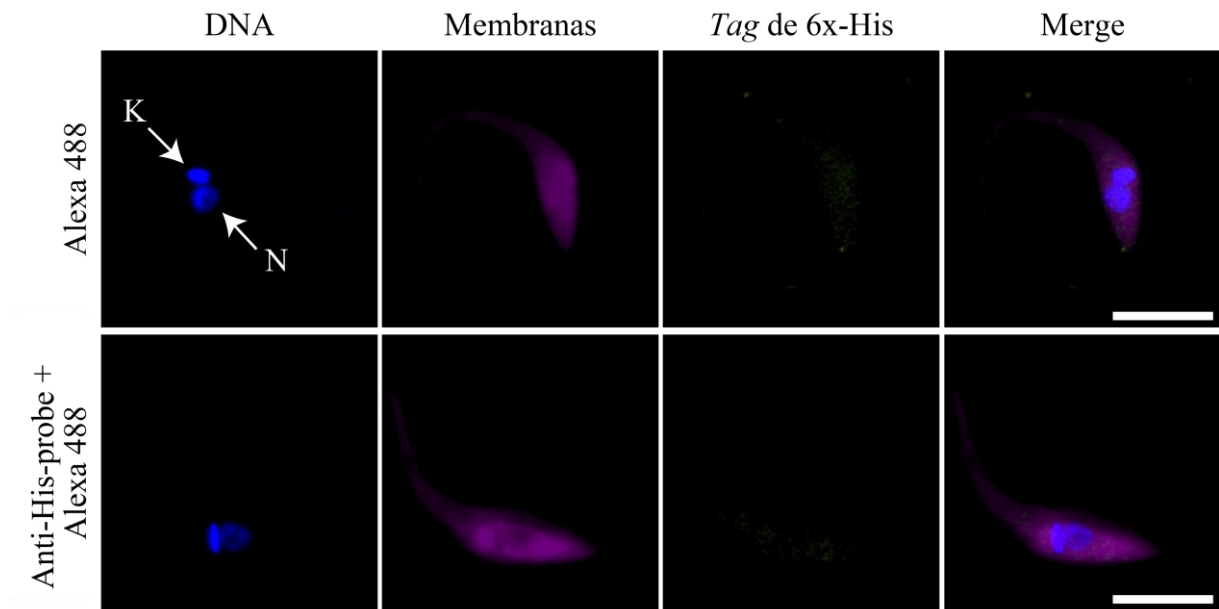
O crescimento das epimastigotas Superexpressoras de TcRBP42 foi comparado àquele de epimastigotas WT e Expressoras de GFP tanto em condições normais de cultivo quanto após a exposição a 1000 Gy de radiação gama (**A**). Essa comparação também foi realizada para os parasitos WT e Nocautes para TcRBP42 (**B**). Os valores representados nos gráficos correspondem às médias de três réplicas técnicas de um experimento representativo. O desvio padrão também é mostrado. As diferenças no crescimento das epimastigotas foram avaliadas pelo teste *One-way* ANOVA. Os valores representados no eixo y estão em escala logarítmica. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.2 Localização subcelular de TcRBP42

A localização subcelular de TcRBP42 também foi avaliada utilizando-se a técnica de Microscopia de fluorescência confocal e parasitos Superexpressores de uma cópia recombinante dessa proteína marcada com uma *tag* de 6x-His (rTcRBP42). Antes da realização desse experimento, a especificidade da marcação e a presença de autofluorescência foram avaliadas em epimastigotas WT. Conforme esperado, nenhuma estrutura foi marcada nos parasitos WT, os quais não possuem proteínas contendo *tags* de 6x-His. Também não foi detectada nenhuma autofluorescência nas condições de aquisição de imagem padronizadas para o experimento (**Figura 19**). Passando-se ao estudo da localização subcelular de rTcRBP42, este foi realizado em condições normais de cultivo e após a exposição a 1000 Gy de radiação gama. Nas condições normais de cultivo, rTcRBP42 se distribui difusamente por todo o citoplasma dos parasitos (**Figura 20 A**). Uma reconstrução 3D foi realizada e confirmou a localização citoplasmática de rTcRBP42 (**Vídeo complementar 2**). Nesse vídeo, também foi possível observar a exclusão de rTcRBP42 do núcleo dos parasitos. Com relação à condição de estresse, rTcRBP42 foi detectada distribuída pelo citoplasma e núcleo das epimastigotas nos tempos de 24 e 48 h após a irradiação. Essa observação indica que a indução do estresse promoveu uma realocação parcial para essa proteína, que passou a ocupar também o núcleo dos parasitos (**Figura 20 B**). Esse fenômeno muito provavelmente não resulta do rompimento da membrana nuclear das epimastigotas. Experimentos de Microscopia eletrônica mostraram que a carioteca permanece íntegra após a exposição a doses subletais de radiação gama (**APÊNDICE E**). Em relação ao controle GFP, essa proteína foi encontrada distribuída por todo o citoplasma e núcleo dos parasitos tanto na condição normal quanto irradiada (**Figura 20 A e C**). Uma reconstrução 3D também foi produzida e confirmou a localização de GFP observada na condição normal (**Vídeo complementar 3**).

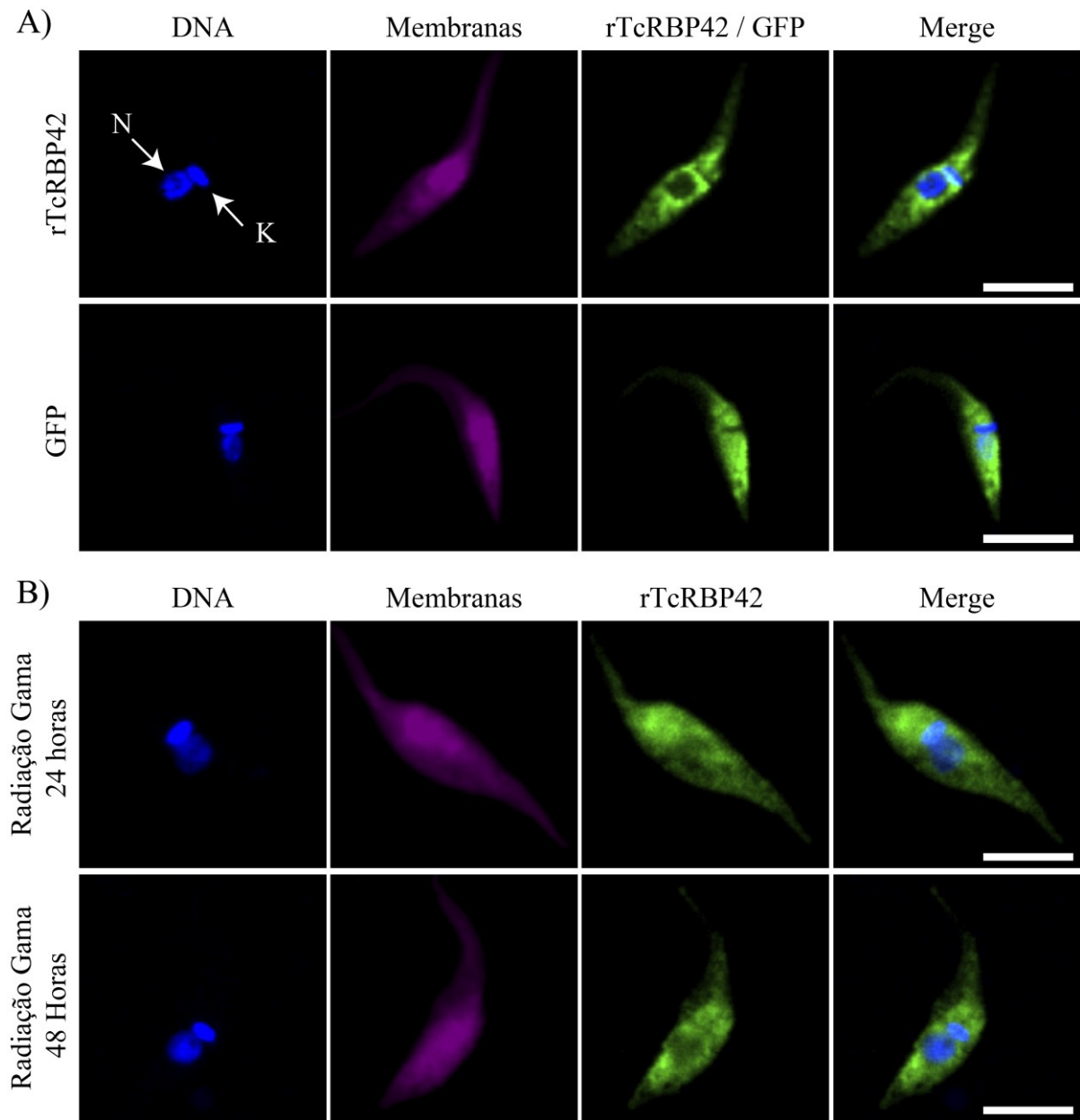
A localização subcelular de rTcRBP42 no estresse por radiação gama não confirmou os resultados obtidos previamente no meu Mestrado. Estes indicavam a capacidade de agregação de rTcRBP42 em focos citoplasmáticos em resposta à exposição a 500 Gy de radiação gama (**APÊNDICE D**). Apesar de rTcRBP42 não ter sido observada em focos nessa tese, resultados obtidos por Microscopia eletrônica mostram que a irradiação pode causar um aparente aumento na ocorrência dessas estruturas no citoplasma das epimastigotas (**APÊNDICE E**).

Figura 19 — Teste de autofluorescência e marcação inespecífica

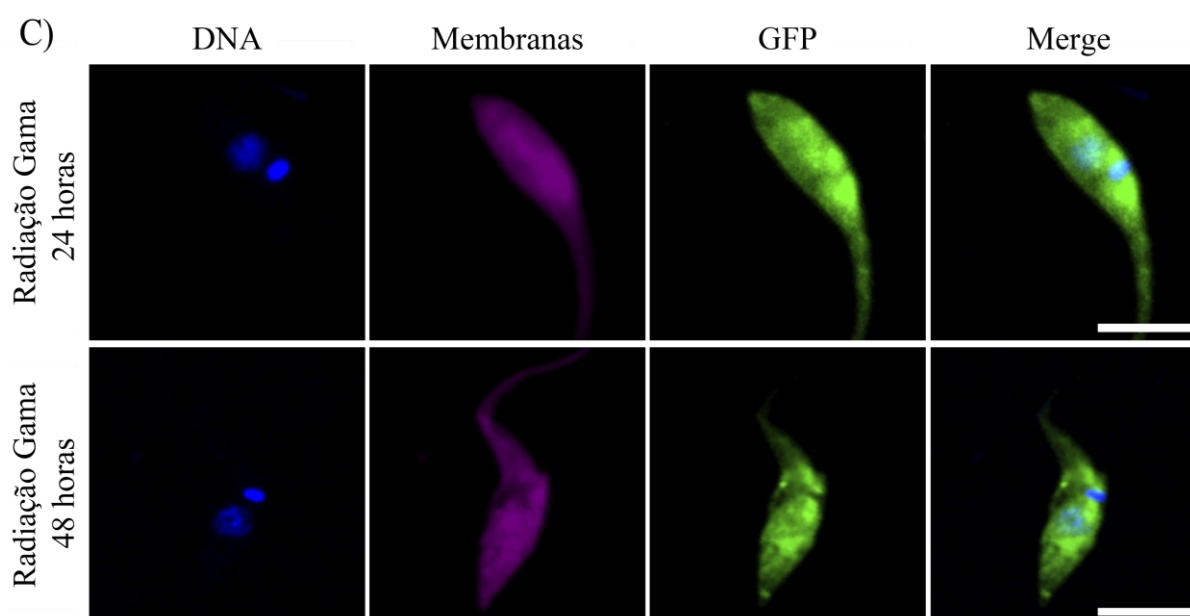


A marcação das epimastigotas com o anticorpo secundário Alexa Fluor® 488 e a combinação deste com o anticorpo primário Anti-His-Tag não revelou a marcação inespecífica de nenhuma estrutura em epimastigotas WT. Esses parasitos não possuem proteínas marcadas com uma *tag* de 6x-His. Adicionalmente, não foi detectada a ocorrência de autofluorescência nas condições de aquisição de imagens utilizadas. O contorno dos parasitos foi delimitado pelo corante *CellMask™ Plasma Membrane Stain (deep red)*. O DNA genômico (N) e kDNA (K) foram corados com Dapi. Barra de magnificação: 10 μ m. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 20 — Localização subcelular de rTcRBP42 e GFP



Continua na próxima página...



Imagens de Microscopia de fluorescência confocal de epimastigotas Superexpresoras de rTcbRBP42 e Expressoras de GFP em condições normais de cultivo (**A**) e 24 e 48 h após a exposição a 1000 Gy de radiação gama (**B e C**). As proteínas foram detectadas por meio de uma *tag* de 6x-His utilizando-se os anticorpos primário Anti-His-Tag e secundário Alexa Fluor® 488. O contorno dos parasitos foi delimitado pelo corante *CellMask™ Plasma Membrane Stain (deep red)*. O DNA genômico (N) e o kDNA (K) foram marcados com o corante Dapi. Barra de magnificação: 10 μ m. Fonte: Elaborado pelo autor.

5.6.3 Expressão de transcritos no estresse por radiação gama

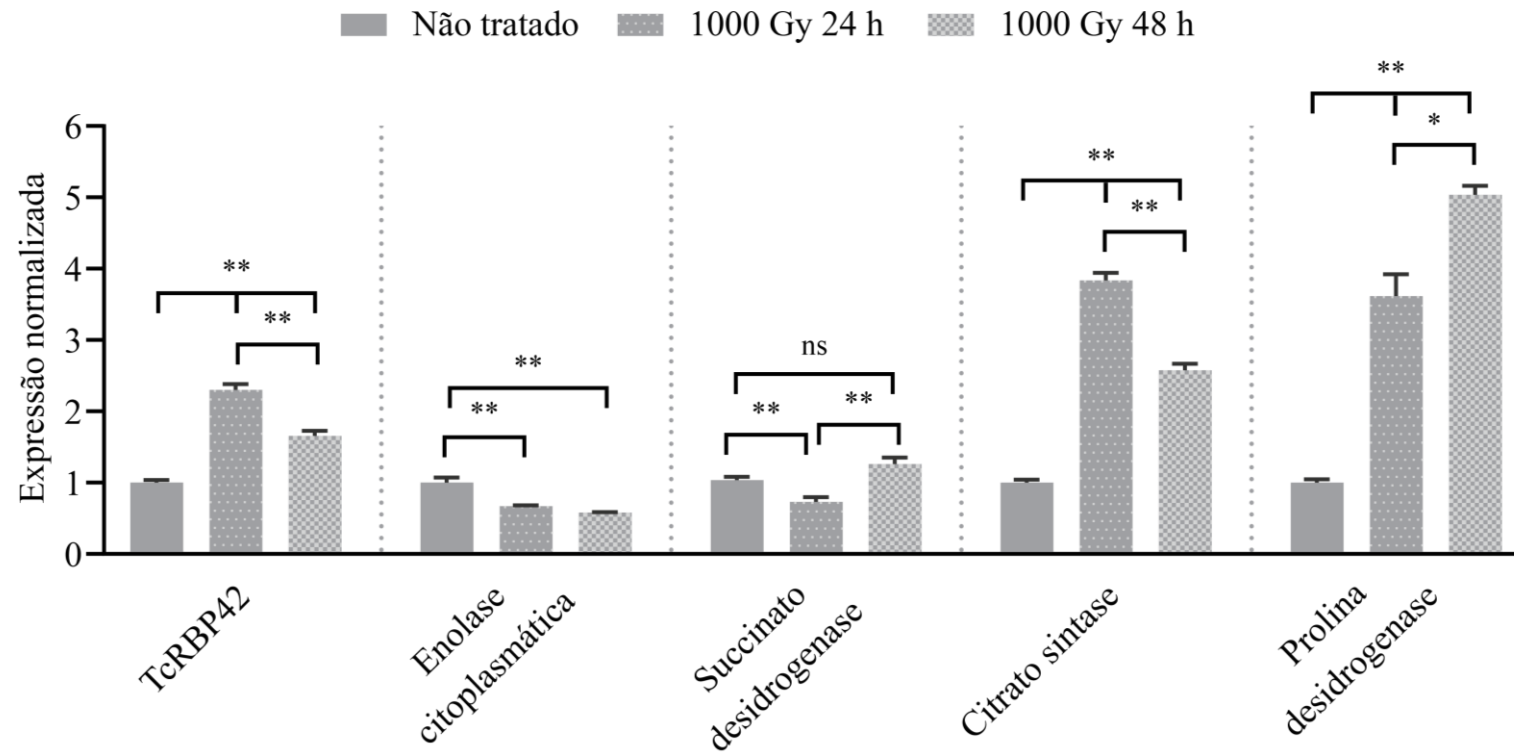
Para avaliar o efeito da radiação gama na expressão de alguns genes foram realizados experimentos de PCR em tempo real. Os níveis de expressão foram mensurados para os genes de TcRBP42 e para os genes do metabolismo energético analisados anteriormente na condição normal. Inicialmente, os experimentos foram realizados apenas para as epimastigotas WT nos tempos de 24 e 48 h após a exposição a 1000 Gy de radiação gama. Os resultados dessa análise são mostrados na **Figura 21**. Primeiramente, foram analisados os níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42. Estes aumentaram significativamente em resposta à radiação gama (p -valor $< 0,01$). Embora tenha ocorrido uma redução desses níveis no tempo de 48 h após a indução do estresse, esses permaneceram maiores do que aqueles observados na condição não tratada. Esse resultado concorda com aquele obtido anteriormente através da contagem de *reads* produzidas pela técnica de *RNA-seq* (**Figura 6**). Nesse experimento, o número de transcritos de TcRBP42 também aumentou em resposta à radiação gama. Para o gene da Enolase citoplasmática, a radiação gama levou a uma redução significativa dos níveis de seus transcritos (p -valor $< 0,01$). O mesmo aconteceu para os transcritos do gene da Succinato desidrogenase no tempo de 24 h (p -valor $< 0,01$). No tempo de 48 h, os transcritos deste gene já haviam retornado aos níveis encontrados na condição normal. Com relação aos transcritos da Citrato sintase, ocorreu um grande aumento de expressão no tempo de 24 h e uma queda no tempo de 48 horas (p -valor $< 0,01$). Mesmo com essa redução, a abundância desses transcritos seguiu maior do que aquela observada na condição não tratada. Por fim, os níveis de expressão dos transcritos da Prolina desidrogenase aumentaram significativamente em resposta ao estresse tanto no tempo de 24 h (p -valor $< 0,01$) quanto no de 48 h (p -valor $< 0,05$) após a irradiação.

Na segunda parte dos experimentos de PCR em tempo real, o efeito da radiação na expressão dos genes foi analisado em epimastigotas Nocautes e Superexpressoras de TcRBP42 para se coletar evidências sobre as funções dessa proteína no estresse por radiação gama. Essa análise foi realizada apenas para o tempo de 24 h após a indução do estresse. Conforme o observado anteriormente, a irradiação dos parasitos levou ao aumento dos níveis de expressão de TcRBP42 nos parasitos WT e isso também aconteceu nos Superexpressores de TcRBP42 (p -valor $< 0,01$) (**Figura 22**). Estes parasitos, que já possuem níveis aumentados para os transcritos de TcRBP42 (~29X de aumento em relação ao WT), responderam à radiação gama com um aumento adicional na expressão desses (~132X de aumento em relação ao WT não tratado). Cabe ressaltar que nos parasitos Superexpressores esses níveis de expressão representam a soma da expressão dos genes endógenos e recombinantes de TcRBP42, cuja

expressão é controlada por um promotor de RNA ribossomal. Em conjunto, esses resultados apontam para uma estabilização mais eficiente dos transcritos de TcRBP42 no estresse. Na **Figura 23 A** estão mostrados os níveis de expressão dos transcritos das enzimas Enolase citoplasmática e Succinato desidrogenase. Embora os parasitos WT, Superexpressores e Nocautes para TcRBP42 possuam níveis diferentes para esses transcritos na condição normal, o tratamento com a radiação gama levou a redução significativa na expressão desses para níveis muito semelhantes em todas as linhagens de epimastigotas analisadas (p-valor < 0,01 e p-valor < 0,05). Esses resultados indicam que esses transcritos são provavelmente desestabilizados no estresse e isso acontece independentemente do *background* genético das epimastigotas. Os resultados obtidos para a Enolase citoplasmática sugerem que esses transcritos são estabilizados por TcRBP42 apenas na condição normal de cultivo. Com relação aos genes da Citrato sintase e Prolina desidrogenase, a radiação levou a uma elevação significativa na abundância desses transcritos e mais uma vez isso ocorreu em todas as linhagens de epimastigotas avaliadas (p-valor < 0,01 e p-valor < 0,05) (**Figura 23 B**). Para os transcritos da Citrato sintase, o menor aumento de expressão aconteceu nos parasitos Nocautes, que já possuem níveis de expressão menores para esse gene. Esse resultado também sugere que os transcritos da Citrato sintase sejam estabilizados por TcRBP42 apenas na condição normal de cultivo. Para os transcritos da Prolina desidrogenase, o maior nível de expressão foi observado para os parasitos Superexpressores de TcRBP42. Todos os resultados obtidos mostram que a expressão dos genes analisados (estabilização ou desestabilização) é regulada diferencialmente entre a condição normal e irradiada. Essa regulação é provavelmente independente da expressão de TcRBP42 no estresse.

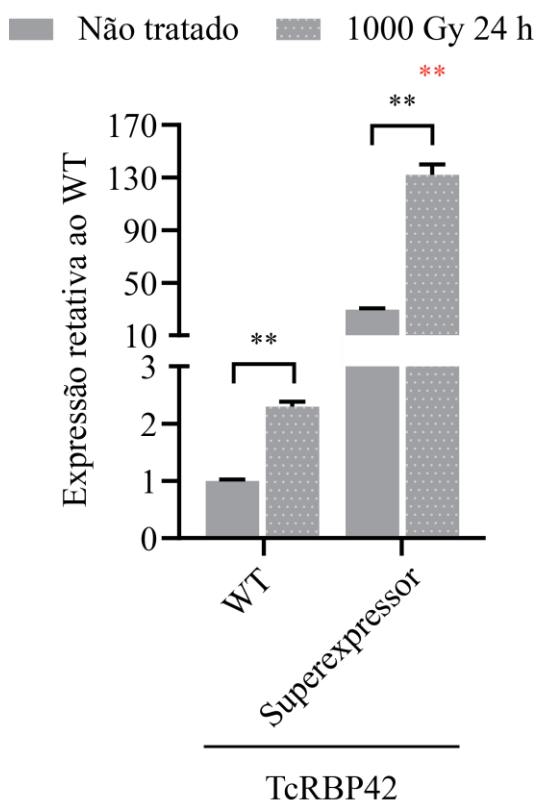
Os resultados obtidos na caracterização *in silico* de TcRBP42 assim como nas condições normais de cultivo das epimastigotas foram compilados no artigo científico em preparação apresentado no **APÊNDICE F**.

Figura 21 — Expressão dos transcritos de TcRBP42 e do metabolismo energético em epimastigotas WT expostas à radiação gama



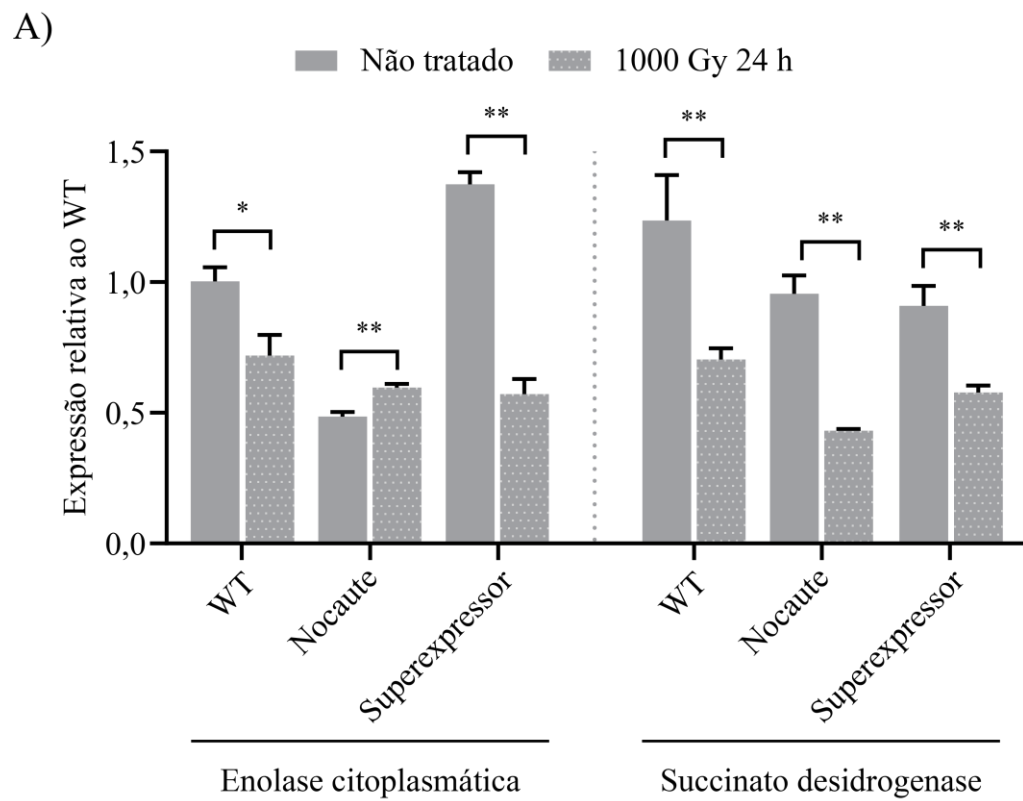
Os níveis de expressão dos transcritos foram mensurados pela técnica de PCR em tempo real em parasitos WT em condições normais de cultivo (não tratado) e após decorridas 24 (1000 Gy 24 h) e 48 horas (1000 Gy 48 h) da exposição a 1000 Gy de radiação gama. Foram avaliados os genes codificadores de TcRBP42 e das enzimas do metabolismo energético: Enolase citoplasmática (glicólise), Succinato desidrogenase (ciclo do ácido cítrico), Citrato sintase (ciclo do ácido cítrico) e Prolina desidrogenase (metabolismo de Prolina). As expressões foram normalizadas em relação ao WT na condição não tratada utilizando-se os genes de referência TERT e RPL9. O teste estatístico utilizado foi o *One-way* ANOVA com correção pelo método de Tukey (* p-valor < 0,05 e ** p-valor < 0,01). As barras representam o erro padrão das médias (SEM). ns: p-valor não significativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 22 — Efeito da radiação gama na expressão dos transcritos de TcRBP42 em epimastigotas WT e Superexpressoras

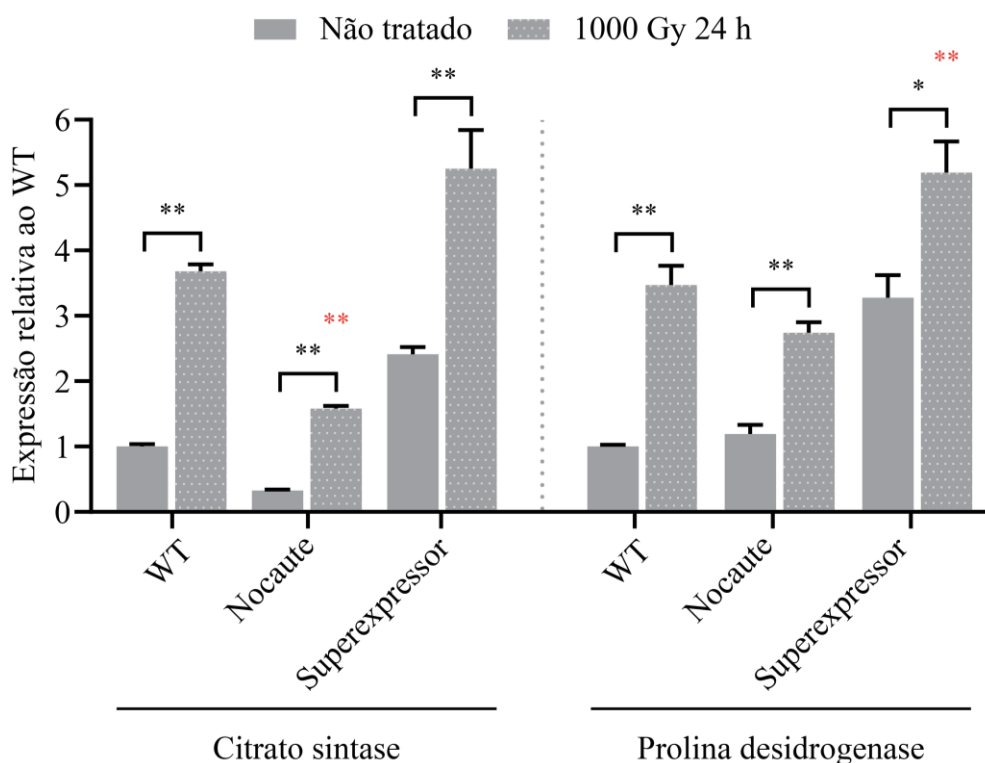


Os níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 foram mensurados pela técnica de PCR em tempo real em parasitos WT e Superexpressores de TcRBP42 em condições normais de cultivo (não tratado) e após decorridas 24 h da exposição a 1000 Gy de radiação gama (1000 Gy 24 h). As expressões foram normalizadas em relação ao WT na condição não tratada utilizando-se os genes de referência TERT e RPL9. Nos parasitos Superexpressores, os transcritos de TcRBP42 são provenientes dos genes endógenos e recombinantes. A expressão do gene recombinante é controlada por um promotor de RNA ribossomal. As comparações foram realizadas par a par utilizando-se o teste t não pareado (** p-valor < 0,01). O p-valor mostrado em vermelho se refere à comparação entre os parasitos WT e Superexpressores de TcRBP42 expostos à radiação gama. As barras representam o erro padrão das médias (SEM). Fonte: Elaborado pelo autor.

Figura 23 — Expressão de transcritos do metabolismo energético em resposta à radiação gama



B)



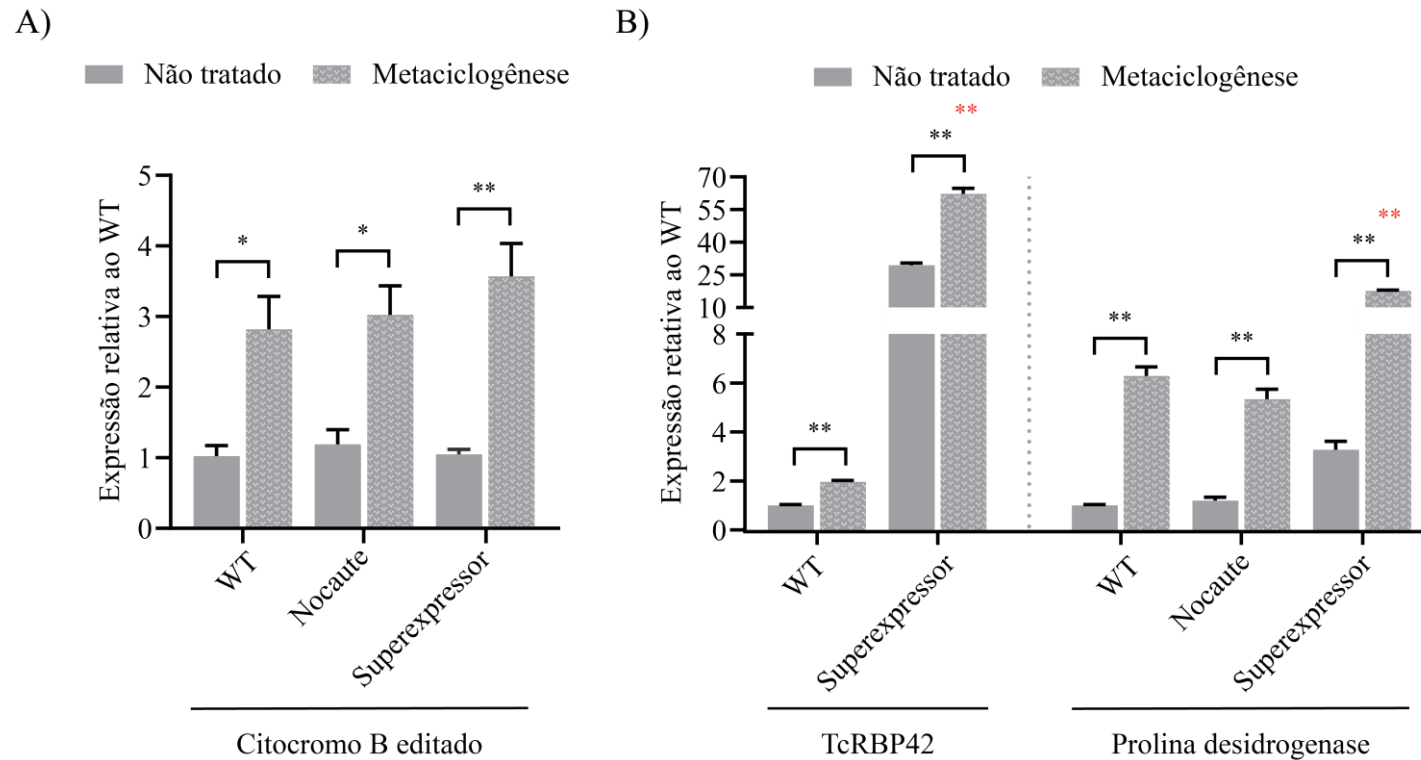
Os níveis de expressão dos transcritos foram mensurados pela técnica de PCR em tempo real em epimastigotas WT, Nocautes e Superexpressoras de TcRBP42 em condições normais de cultivo (não tratado) e após decorridas 24 h da exposição a 1000 Gy de radiação gama (1000 Gy 24 h). Foram avaliadas a expressão dos genes das enzimas do metabolismo energético Enolase citoplasmática (glicólise) e Succinato desidrogenase (ciclo do ácido cítrico) (A), além da Citrato sintase (ciclo do ácido cítrico) e Prolina desidrogenase (metabolismo de Prolina) (B). As expressões foram normalizadas em relação ao WT na condição não tratada utilizando-se os genes de referência TERT e RPL9. As comparações foram realizadas par a par utilizando o teste t teste não pareado (* p-valor < 0,05 e ** p-valor < 0,01). Os p-valores mostrados em vermelho se referem à comparação entre o WT e as outras linhagens de epimastigotas tratadas com radiação gama (teste *One-way* ANOVA com correção pelo método de Tukey). As barras representam o erro padrão das médias (SEM). Fonte: Elaborado pelo autor.

5.7 Metaciclogênese *in vitro*

Os efeitos da superexpressão e nocaute de TcRBP42 também foram avaliados no processo de metaciclogênese do *T. cruzi*. Esse experimento foi realizado por duas razões principais: os transcritos de TcRBP42 são regulados diferencialmente durante o ciclo de vida do *T. cruzi* (TAVARES *et al.*, 2020) e os parasitos Superexpressores de TcRBP42 possuem níveis elevados dos transcritos da Prolina desidrogenase. A superexpressão desse gene, foi relacionada anteriormente ao aumento da diferenciação das epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas tanto *in vitro* quanto no inseto vetor (MANTILLA *et al.*, 2021).

Nesse trabalho, a metaciclogênese foi induzida *in vitro* pela incubação dos parasitos em meio RPMI. Após 8 dias de incubação, as culturas foram fracionadas para o enriquecimento em formas intermediárias e tripomastigotas metacíclicas. O RNA total dessas frações foi então extraído e a diferenciação das culturas foi avaliada por PCR em tempo real utilizando-se como alvo os transcritos editados do gene mitocondrial Citocromo B (CYb-e). O aumento na abundância desses transcritos foi utilizado anteriormente como um marcador para a metaciclogênese do *T. cruzi* (SHAW; KALEM; ZIMMER, 2016). A expressão de CYb-e foi avaliada em culturas WT, Superexpressoras e Nocautes para TcRBP42. Embora os níveis de expressão desses transcritos tenham aumentado em todas as linhagens de epimastigotas estudadas (p-valor < 0,01 e p-valor < 0,05), não foram encontradas diferenças significativas entre elas (**Figura 24 A**). Esse resultado sugere que TcRBP42 não influencia significativamente a diferenciação do *T. cruzi* nas condições experimentais utilizadas. Uma vez que o protocolo de metaciclogênese *in vitro* também induz o estresse nutricional, os níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 e da Prolina desidrogenase também foram analisados. Para ambos os genes avaliados foram detectados aumentos significativos na abundância dos transcritos na comparação par a par realizada entre a condição tratada e a não tratada (p-valor < 0,01) (**Figura 24 B**). Nos parasitos Superexpressores de TcRBP42, que já possuem níveis maiores para os transcritos de TcRBP42, foi detectado um aumento adicional na expressão desses em resposta ao protocolo de diferenciação. Para o gene da Prolina desidrogenase, o aumento de expressão de seus transcritos foi significativamente maior nas epimastigotas Superexpressoras de TcRBP42 em relação às outras linhagens analisadas (p-valor < 0,01).

Figura 24 — Efeito da metaciclologênese *in vitro* na expressão dos transcritos do Citocromo B, da TcRBP42 e da Prolina desidrogenase



Os níveis de expressão dos transcritos foram mensurados pela técnica de PCR em tempo real em condições normais de cultivo e após a indução da metaciclologênese *in vitro*. Foram avaliadas a expressão do transcrito editado do gene mitocondrial Citocromo B (**A**) e a expressão dos genes da TcRBP42 e da Prolina desidrogenase (**B**). As expressões foram normalizadas em relação ao WT na condição não tratada utilizando-se os genes de referência TERT e GAPDH. As comparações foram realizadas par a par utilizando o teste t teste não pareado (* p-valor < 0,05 e ** p-valor < 0,01). Os p-valores mostrados em vermelho se referem à comparação entre o WT e as outras linhagens de epimastigotas submetidas ao protocolo de diferenciação. Foram utilizados o teste t teste não pareado (comparação de duas linhagens) ou o teste *One-way* ANOVA com correção pelo método de Tukey (comparação das três linhagens). As barras representam o erro padrão das médias (SEM). Fonte: Elaborado pelo autor.

6 DISCUSSÃO

As proteínas ligantes de RNA (RBPs) são fatores essenciais para a regulação da expressão gênica por mecanismos pós-transcricionais. Essas proteínas se associam ao mRNA assim que esses começam a ser transcritos pela RNA polimerase II, formando os chamados complexos ribonucleoproteicos (mRNPs). O efeito combinatório dos diferentes componentes que integram os mRNPs determina o destino dos transcritos individuais e também de grupos de transcritos relacionados funcionalmente que são processados e regulados conjuntamente (CLAYTON, 2019; KEENE, 2007). O papel central dos mRNPs para o controle da expressão gênica no nível pós-transcricional levou a proposição da existência de um código mRNP, cuja complexidade ainda representa um grande desafio para a pesquisa científica (GEHRING; WAHLE; FISCHER, 2017).

As RBPs também são elementos cruciais para a regulação da expressão gênica nos tripanosomatídeos, nos quais essa acontece majoritariamente através de mecanismos pós-transcricionais. Nesses organismos, genes não correlacionados em função são transcritos em longos pré-mRNA policistrônicos, cujo início da transcrição não é regulado (CLAYTON, 2019). Apesar da grande importância funcional das RBPs para o *T. cruzi*, um número relativamente pequeno dessas proteínas foi estudado funcionalmente nesse organismo (ROMAGNOLI *et al.*, 2020). Esses estudos já mostram, por exemplo, que o nocaute de uma única RBP pode causar alterações generalizadas na abundância de seus transcritos alvos (TAVARES *et al.*, 2020). Nessa tese, foi estudada a proteína RBP42 do *T. cruzi* da cepa CL Brener (TcRBP42), a cepa de referência para a espécie. Na literatura, a proteína RBP42 do *T. cruzi* foi investigada uma única vez na cepa Y (WEISBARTH *et al.*, 2018). Dessa forma, visou-se expandir os conhecimentos acerca da proteína TcRBP42 ao estudá-la tanto *in silico* quanto *in vitro* nas condições normais de cultivo das epimastigotas e no contexto do estresse celular induzido pela radiação gama. A caracterização de TcRBP42 no contexto do estresse genotóxico é inédita na literatura dos tripanosomatídeos.

Nesse trabalho, a caracterização computacional realizada para TcRBP42 durante o meu Mestrado (LAET-SOUZA, 2019) foi refeita para incorporar novas ferramentas de análise *in silico* e/ou os aprimoramentos implementados nos *softwares* previamente utilizados. No período, uma versão mais atualizada do genoma do *T. cruzi* também foi produzida, sendo esta consultada e utilizada nessa tese. No novo genoma, gerado pelo grupo de pesquisa coordenado pela Professora Daniella Castanheira Bartholomeu da UFMG (dados não publicados), a proteína TcRBP42 é codificada por alelos de cópia única nos haplótipos Esmeraldo-like e Não

Esmeraldo-like. Essa divisão em haplótipos foi adotada desde o primeiro genoma publicado para o *T. cruzi* em razão da natureza híbrida do clone CL Brener (EL-SAYED *et al.*, 2005). Esse resultado concorda com o reportado anteriormente por TAVARES *et al.* (2020). Nesse trabalho, os autores mostraram que TcRBP42 assim como todas as outras RBPs com domínios clássicos de interação com o RNA são codificadas por genes de cópia única. Essa informação é relevante quando se considera que a presença de genes em multicópia é uma característica típica do genoma do *T. cruzi*. As trans-sialidases, por exemplo, são proteínas de superfície codificadas por aproximadamente 1430 genes (EL-SAYED *et al.*, 2005).

As sequências de ambos os alelos de TcRBP42 também foram comparadas e revelaram que a região codificadora desses alelos são conservadas entre si, diferindo em poucos nucleotídeos. Essas diferenças resultaram na substituição/inserção de apenas sete aminoácidos nas sequências proteicas. As maiores diferenças entre ambos os alelos de TcRBP42 se concentram nas regiões intergênicas que os separam dos genes vizinhos. Divergências nas sequências alélicas de um mesmo gene não são incomuns no genoma híbrido do clone CL Brener. As regiões intergênicas de TcRBP42 contêm longas repetições de um mesmo nucleotídeo, cuja melhor resolução no novo genoma foi extremamente importante para a geração dos parasitos Nocautes para TcRBP42 pela tecnologia de CRISPR/Cas9. Esse genoma foi produzido combinando-se as tecnologias de sequenciamento de *reads* curtas e longas, o que tem se mostrado uma estratégia eficiente para gerar genomas mais completos e bem anotados para o *T. cruzi*. Nesse organismo, o genoma altamente repetitivo segue sendo um grande desafio para a comunidade científica (EL-SAYED *et al.*, 2005; HERREROS-CABELLO *et al.*, 2020).

A estrutura de TcRBP42 foi analisada utilizando-se métodos computacionais. A proteína TcRBP42 apresenta uma estrutura modular composta por dois domínios conservados, NTF2-like e RRM, interligados por uma longa região central intrinsecamente desordenada, que contém motivos ricos no aminoácido prolina. Estruturas modulares conectadas por *linkers* flexíveis são tipicamente encontradas nas RBPs. A presença de mais de um domínio conservado permite que as RBPs interajam simultaneamente com o RNA e com outras proteínas. Essa interação também pode acontecer com transcritos diferentes ou com duas regiões distintas de um mesmo mRNA. Esse *design* também pode possibilitar a organização topológica dessas moléculas (LUNDE; MOORE; VARANI, 2007). A mesma organização estrutural de TcRBP42 foi reportada para os seus ortólogos estudados nas espécies *T. brucei*, *L. braziliensis* e *T. cruzi* da cepa Y (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018). A comparação dos diferentes ortólogos identificou uma menor similaridade de sequência e variações na

extensão das regiões centrais preditas como intrinsecamente desordenadas. Nas proteínas do *T. cruzi* também foram observadas uma segunda região não estruturada após o domínio RRM. Essas características são comuns às proteínas RBP42 de outros cinetoplastídeos, cuja filogenia pode ser reconstruída utilizando-se as sequências de aminoácidos das proteínas RBP42 (LAET-SOUZA, 2019; WEISBARTH *et al.*, 2018). Esse resultado pode indicar a conservação de algumas das funções dessas proteínas, cuja evolução provavelmente enfrentou menores restrições funcionais em suas regiões centrais. Em um estudo sobre a evolução de proteínas, os autores mostraram que a conservação da função molecular restringe o quanto as proteínas ortólogas podem divergir ao longo do tempo (KONATÉ *et al.*, 2019).

No que se refere aos domínios e motivos de TcRBP42, a função destes ainda não foram definidas para nenhum de seus ortólogos. No entanto, esses domínios e motivos já foram caracterizados em outras proteínas como a proteína G3BP1 que conjuntamente com a G3BP2 inicia a nucleação dos grânulos de estresse (MATSUKI *et al.*, 2013). Apesar da baixa similaridade de sequência, a proteína G3BP1 possui basicamente a mesma organização estrutural de TcRBP42 com exceção da região enriquecida em aminoácidos ácidos e do motivo RGG. Em G3BP1, os domínios NTF2-like e motivos PxxP são necessários para interações do tipo proteína-proteína. O domínio NTF2-like, por exemplo, é responsável pela dimerização de G3BP1 e pela sua interação com as proteínas USP10 e Caprin-1. A proteína G3BP1 também exemplifica a função clássica dos domínios RRM que é a interação com a molécula de RNA. O estudo dessa proteína também revelou informações importantes sobre as funções das regiões intrinsecamente desordenadas, que em G3BP1 regulam a transição entre os estados ativo e autoinibido. Quando os dímeros de G3BP1 estão em sua conformação ativa no contexto do estresse celular, estes se ligam ao RNA e iniciam o processo de condensação das fases líquidas. Esse processo é dependente do RNA e dos domínios NTF2-like e RRM. Além disso, G3BP1 pode funcionar como uma chaperona de RNA ao organizar topologicamente os transcritos no interior dos grânulos de estresse (GUILLÉN-BOIXET *et al.*, 2020; KEDERSHA *et al.*, 2016; MATSUKI *et al.*, 2013; YANG *et al.*, 2020).

A estrutura tridimensional de TcRBP42 foi predita computacionalmente utilizando o *software* de inteligência artificial *AlphaFold2*. Esse software é capaz de prever a estrutura 3D das proteínas a partir de suas sequências de aminoácidos com elevada acurácia (JUMPER *et al.*, 2021). Embora essas previsões não substituam a determinação experimental das estruturas proteicas, essas podem ser muito importantes para a caracterização inicial das proteínas do *T. cruzi* para as quais ainda não existam dados disponíveis no *Protein Data Bank*. A previsão

realizada pelo *AlphaFold2* mostrou que ambos os domínios de TcRBP42 possuem estruturas tridimensionais similares aquelas já determinadas experimentalmente para os domínios NTF2-like e RRM das proteínas G3BP1 (humanos) e TcUBP1 (*T. cruzi*), respectivamente (VOGENSEN; MØLLER; KRISTENSEN, 2013; VOLPON *et al.*, 2005). Adicionalmente, apenas um dos motivos RNP que são característicos dos domínios RRM, o RNP1, está presente em TcRBP42. A ausência do RNP2 sugere que o reconhecimento do RNA por essa estrutura possa depender de regiões acessórias, a exemplo do que acontece no complexo de exportação de RNA Mex67:Mtr2 do *Saccharomyces cerevisiae*. Nesse complexo, o domínio NTF2-like também contribuiu para o reconhecimento da molécula de RNA (AIBARA *et al.*, 2015). Na predição realizada pelo *AlphaFold2*, as regiões preditas como intrinsecamente desordenadas por outras ferramentas também aparecem dessa forma, assumindo uma distribuição aleatória ao redor dos domínios.

Para estudar as funções de TcRBP42 nas condições padrões de cultivo e no estresse induzido pela radiação gama foram utilizadas as estratégias de superexpressão e nocaute dos genes de TcRBP42. Esses dois sistemas são comumente empregados nos estudos funcionais dos genes do *T. cruzi* (BURLE-CALDAS *et al.*, 2015). Os parasitos Superexpressores foram gerados pela eletroporação das epimastigotas com vetores que permitem a expressão estável e constitutiva de TcRBP42 fusionada com *tags* de afinidade (rTcRBP42). A proteína GFP foi expressa da mesma forma para ser utilizada como controle nos experimentos. Após o estabelecimento das culturas, a expressão das proteínas recombinantes foi confirmada pela técnica *Western blot*. Entretanto, a expressão total de TcRBP42 nos parasitos Superexpressores não pode ser quantificada em razão da indisponibilidade de anticorpos que também reconheçam a proteína nativa. Como alternativa, os níveis de expressão dos genes nativos e recombinantes de TcRBP42 foram quantificados por PCR em tempo real. Nos dois clones Superexpressores foi detectado um grande e similar aumento na abundância dos transcritos de TcRBP42. Conforme esperado, a expressão desses mRNAs não foi alterada no controle GFP, o que confirma que os níveis aumentados dos transcritos de TcRBP42 nos parasitos Superexpressores constituem um resultado específico da modificação genética inserida.

Após o estabelecimento com sucesso das linhagens de epimastigotas expressoras das proteínas recombinantes, passou-se a avaliação fenotípica dos parasitos por meio de curvas de crescimento e experimentos de Microscopia óptica. Na ausência de qualquer estresse, as expressões de rTcRBP42 e GFP não causaram alterações morfológicas aparentes ou problemas de crescimento nas epimastigotas. Vários trabalhos realizados no LGB e em outros laboratórios

mostram que o *T. cruzi* frequentemente tolera muito bem a superexpressão de genes, mesmo daqueles que codificam RBPs (CHAME *et al.*, 2020; MANTILLA *et al.*, 2021; TAVARES *et al.*, 2020). Com relação à localização de rTcRBP42, experimentos de Microscopia de fluorescência confocal mostraram que essa proteína se distribui por todo o citoplasma dos parasitos. Uma reconstrução 3D demonstrou que rTcRBP42 não está presente no núcleo das epimastigotas, embora isso não exclua a possibilidade dessa proteína se translocar para esse compartimento celular em alguma fase do ciclo celular ou em resposta a algum tipo de estímulo. A localização de GFP também foi documentada. Essa proteína se distribui por todo o citoplasma e núcleo dos parasitos. A localização nuclear de GFP já foi documentada anteriormente e resulta do fato dessa proteína ser pequena o suficiente para se difundir através do poro nuclear (LUTHER *et al.*, 2021; SEIBEL *et al.*, 2007). A diferença na localização das proteínas estudadas confirma que a distribuição celular de rTcRBP42 é específica e não um produto do sistema de expressão utilizado. Uma localização citoplasmática também foi reportada para as proteínas RBP42 estudadas em outros tripanosomatídeos (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018).

Nesse trabalho, as funções de TcRBP42 também foram investigadas utilizando-se epimastigotas Heminocautes e Nocautes para TcRBP42. Essas linhagens foram geradas com uma versão do sistema de CRISPR/Cas9 adaptada para a edição gênica nos tripanosomatídeos (BURLE-CALDAS *et al.*, 2018; SOARES-MEDEIROS *et al.*, 2017). A remoção da expressão de um ou de ambos os alelos de TcRBP42 foi desafiadora, o que reflete as grandes dificuldades ainda encontradas na manipulação genética do *T. cruzi*. Após várias tentativas sem sucesso, a edição dos alelos de TcRBP42 foi obtida pela inserção de stop códons prematuros logo após o ATG inicial de ambos os alelos. Além disso, stop códons adicionais foram gerados pela inserção de uma *tag* de M13, dois sítios de restrição e uma deleção de 72 nucleotídeos. Todos esses elementos *backups* visaram garantir que as proteínas TcRBP42 sejam mesmo truncadas, o que foi especialmente importante para a edição gênica de TcRBP42. Mesmo contendo stop códons prematuros, os transcritos dos alelos editados não são degradados imediatamente e permanecem no *pool* de mRNAs dos parasitos. A modificação de ambos os alelos de TcRBP42 necessitou de duas rodadas de edição. Primeiro foram gerados os clones Heminocautes e então os Nocautes. Vários clones Heminocautes perderam a *tag* de M13 após poucos meses em cultura. Em concordância com a presença de apenas um alelo *wild type*, esses clones possuem apenas metade dos níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 observados no WT.

O fenótipo das epimastigotas Heminocautes e Nocautes também foi avaliado. Nos parasitos Heminocautes apenas um alelo funcional de TcRBP42 já é suficiente para a manutenção da morfologia e do padrão de crescimento normal para as epimastigotas do *T. cruzi*. Quanto aos Nocautes, a interrupção de ambos os alelos de TcRBP42 com stop códons causou o aparecimento de epimastigotas com corpo circular, flagelo encurtado e mobilidade ausente ou bastante reduzida. Nas culturas, essas formas também são encontradas em grandes complexos, nos quais é possível identificar o limite dos parasitos individuais. Esses agregados sugerem a ocorrência de alterações na expressão de proteínas de superfície, cujos genes são organizados em famílias multigênicas no *T. cruzi*. A expressão dessas proteínas é regulada diferencialmente durante o ciclo de vida desse organismo e medeiam a adesão do parasito a outras células (PECH-CANUL; MONTEÓN; SOLÍS-OVIEDO, 2017). A investigação dos impactos do nocaute de TcRBP42 na expressão dos genes codificadores das proteínas de superfície será avaliada por meio da geração do transcriptoma dessas epimastigotas, o que já está em andamento. Nas culturas Nocautes também são encontradas epimastigotas com morfologias aparentemente normais. O crescimento dos parasitos Nocautes não é significativamente diferente do controle WT. No entanto, as culturas começam a apresentar defeitos moderados de proliferação quando estas estão próximas de atingirem a fase estacionária do crescimento. A viabilidade dos Nocautes de TcRBP42 contrasta com os resultados obtidos no *T. brucei*. Nesse organismo, a expressão de TbRBP42 é essencial para a viabilidade celular. O *knockdown* condicional tanto dos mRNAs quanto da proteína TbRBP42 resulta na morte dos parasitos poucos dias após a indução desses sistemas (DAS *et al.*, 2012; DAS *et al.*, 2021). Em concordância com o que acontece no *T. brucei*, a remoção da expressão de TcRBP42 gera alterações morfológicas. Entretanto, essas não são acompanhadas por problemas de citocinese como acontece no *T. brucei*. As diferenças encontradas entre esses dois organismos indicam que as proteínas RBP42 podem desempenhar algumas funções diferentes em cada espécie. Outra explicação para esses resultados contrastantes seria a redundância de algumas das funções de TcRBP42 com a de outras RBPs. Nesse sentido, o repertório atual de RBPs do *T. brucei* é menor do que aquele reportado para o *T. cruzi* (LUEONG *et al.*, 2016; TAVARES *et al.*, 2020). A ocorrência de alterações morfológicas, principalmente a presença de um segundo flagelo, também foi observada em parasitos nocautes para as RBPs portadoras de domínios dedos de zinco TcZC3H39, TcZC3H29 e TcZC3HTTP (ROMAGNOLI *et al.*, 2020). Todos esses resultados sugerem a grande importância da proteína TcRBP42 para a biologia do *T. cruzi*.

Após a caracterização inicial dos parasitos Superexpressores e Nocautes para TcRBP42, o efeito dessas modificações genéticas foi avaliado na expressão de alguns genes utilizando-se mais uma vez a técnica de PCR em tempo real. A escolha dos genes a serem analisados foi baseada nos alvos descritos para TbRBP42, que se liga principalmente a transcritos do metabolismo energético (DAS *et al.*, 2012). Os genes selecionados codificam as enzimas Enolase citoplasmática, Citrato sintase, Succinato desidrogenase e Prolina desidrogenase. O primeiro gene escolhido faz parte da via glicolítica e codifica a enzima catalisadora da reação de conversão do 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato. Nos tripanosomatídeos, a Enolase citoplasmática está fisicamente separada das enzimas glicolíticas que convertem a glicose a 3-fosfoglicerato pela compartimentalização dessas em organelas chamadas de glicossomos (ACOSTA *et al.*, 2019; TAYLOR; GUTTERIDGE, 1987). O segundo gene analisado foi o da Citrato sintase, uma enzima mitocondrial que constitui um importante ponto regulatório do ciclo do ácido cítrico ao catalisar a condensação irreversível da acetil-CoA e oxaloacetato em citrato. O gene da Succinato desidrogenase foi selecionado por codificar uma enzima comum ao ciclo do ácido cítrico e a cadeia transportadora de elétrons (Complexo II). Essa enzima catalisa a oxidação do succinato a fumarato (NELSON; COX, 2014). O último gene analisado foi o da Prolina desidrogenase, uma enzima mitocondrial responsável pela primeira reação do catabolismo da prolina, a qual é convertida em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato. Após várias outras reações, esse intermediário entra no ciclo do ácido cítrico como α -cetoglutarato. A prolina é uma importante fonte energética para o *T. cruzi*, estando disponível em abundância na hemolinfa do inseto vetor (BARRETT; FRIEND, 1975; PAES *et al.*, 2013).

Os resultados obtidos nos experimentos de RT-qPCR referentes à condição normal de cultivo sugerem que a proteína TcRBP42 estabiliza os seus transcritos alvos. Provavelmente, esse é o caso dos transcritos da Enolase citoplasmática e da Citrato sintase. Os transcritos desse último gene são estabilizados mais eficientemente quando a proteína TcRBP42 é superexpressa. Embora os dados coletados também indiquem que os transcritos da Prolina desidrogenase sejam estabilizados por TcRBP42, isso foi observado apenas nos parasitos Superexpressores. Por fim, TcRBP42 parece não interagir com os transcritos da Succinato desidrogenase. Em todas as linhagens de epimastigotas testadas, a abundância desses mRNAs é semelhante. Todos esses resultados indicam que os ortólogos TcRBP42 e TbRBP42 não compartilham exatamente os mesmos alvos na condição normal de cultivo. Quanto a estabilização dos transcritos, esses resultados contrastam com aqueles reportados por DAS *et al.* (2021). Nesse trabalho, disponível apenas no formato *preprint*, o *knockdown* de TbRBP42 não afetou significativamente os níveis

de expressão de nenhum dos transcritos analisados nessa tese. Em contrapartida, a análise proteômica desses parasitos mostrou que os níveis das enzimas codificadas por esses genes são significativamente reduzidos em comparação aos controles, sugerindo que TbRBP42 funcione principalmente como um regulador positivo da tradução no *T. brucei*. Em concordância com essa observação, o interactoma da RBP42 da *L. brasilienses* contém um elevado número de proteínas que integram a maquinaria de tradução e a estrutura dos ribossomos. A divergência dos efeitos do *knockdown* de TbRBP42 e do nocaute de TcRBP42 na abundância dos transcritos do mesmo conjunto de genes pode ser o resultado de duas possibilidades distintas. No primeiro cenário, essas diferenças podem significar a existência de divergências funcionais entre os ortólogos de RBP42 no *T. brucei* e no *T. cruzi*. Embora as duas espécies pertençam ao mesmo gênero, estas apresentam ciclos de vida distintos (KRAMER, 2012). A segunda possibilidade que explicaria a razão pela qual a depleção de TbRBP42 não afeta significativamente os níveis de expressão de seus transcritos alvos é a estratégia utilizada pelos autores. Sendo TbRBP42 essencial para a viabilidade do *T. brucei*, os pesquisadores optaram pela realização de um *knockdown* condicional (DAS *et al.*, 2021). Embora os níveis da expressão proteica de TbRBP42 tenham sido drasticamente reduzidos, estes ainda poderiam ser suficientes para manter a estabilidade normal dos transcritos, mas insuficientes para garantir a eficiência traducional dos mesmos. Nessa tese, os níveis das proteínas codificadas pelos genes analisados não foram quantificados. Dessa forma, uma análise proteômica das diferentes linhagens de epimastigotas poderia ser realizada futuramente como um desdobramento dessa tese. Uma informação interessante é que o *knockdown* de TbRBP42 também afeta os níveis proteicos de outras RBPs como DRBD3 e PUF1 (DAS *et al.*, 2021).

A proteína TcRBP42 também foi avaliada no contexto do estresse celular induzido pela exposição das epimastigotas a uma dose subletal de 1000 Gy de radiação gama. O *T. cruzi* é extremamente resistente a esse tipo de radiação ionizante, sendo a letalidade do tratamento observada apenas após o tratamento das epimastigotas com doses próximas a 3000 Gy de radiação gama (ASSIS, 2019). Essa dose é cerca de 300 vezes maior do que aquelas suportadas pelo corpo humano (CDC, 2018). No *T. cruzi*, a exposição a 500 Gy de radiação gama causa a fragmentação de todo o genoma, o qual é reparado em apenas 48 h (REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Em razão dos extensos danos causados pela radiação gama ao genoma das epimastigotas, os estudos visando elucidar os mecanismos de radiorresistência do *T. cruzi* se concentraram tradicionalmente no reparo de DNA mediado principalmente pela enzima TcRad51. Essa proteína é crucial para a via de reparo de DNA por recombinação homóloga (REGIS-DA-

SILVA *et al.*, 2006; SILVA *et al.*, 2018). Ainda que a contribuição das RBPs para o reparo de DNA não tenha sido investigada no *T. cruzi*, essas podem estar intimamente relacionadas aos mecanismos de radiorresistência do parasito. Nesse sentido, as RBPs poderiam regular direta ou indiretamente a expressão de proteínas envolvidas no reparo de DNA e/ou na proteção dos parasitos contra o estresse oxidativo. A geração de espécies reativas de oxigênio também é induzida pela radiação gama (RHEE *et al.*, 2012). Experimentos realizados com a RBP humana HuR, superexpressa em várias linhagens de câncer de mama triplo negativo, exemplificam essas possibilidades. O silenciamento desse gene aumenta a sensibilidade das células cancerosas à radiação gama ao reduzir os níveis de expressão de proteínas de reparo de DNA, como Rad51 e ATM, e a atividade de tioredoxina redutase (MEHTA *et al.*, 2016).

Primeiramente, o efeito da radiação gama foi avaliado no crescimento e morfologia das epimastigotas WT, Superexpressoras e Nocaute para TcRBP42, além do controle GFP. Para todas as linhagens analisadas, a exposição à radiação gama não alterou as morfologias dos parasitos observadas na condição normal. Por outro lado, o tratamento causou uma longa parada de crescimento que perdurou por pelo menos 144 horas em todas as linhagens avaliadas. Esse resultado concorda com o descrito anteriormente, embora a dose utilizada por esses autores seja apenas metade daquela aplicada nessa tese (LAET-SOUZA, 2019; REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). Esses dados sugerem que a resposta ao estresse desenvolvida após o tratamento das epimastigotas com doses subletais de radiação gama são semelhantes. A superexpressão ou nocaute de TcRBP42 não afetou a sensibilidade natural do *T. cruzi* à radiação gama. Alterações na suscetibilidade das epimastigotas ao tratamento com radiação ionizante foram hipotetizadas por dois motivos principais. O primeiro deles foi a observação de que as epimastigotas Nocaute apresentam problemas morfológicos já na condição normal de cultivo. A segunda razão foi a estabilização diferencial de uma pequena amostra de transcritos nos parasitos Superexpressores e Nocaute para TcRBP42. Considerando-se que esses efeitos possam ser amplificados em grande escala pelo estresse, estes poderiam ocasionar uma maior ou menor resistência das epimastigotas à radiação gama. Conjuntamente, os resultados obtidos sugerem que TcRBP42 não é essencial para a sobrevivência dos parasitos a esse tipo de radiação ionizante. Apesar de não terem sido observadas diferenças significativas no crescimento de nenhuma das linhagens testadas, alguns pontos despertaram o interesse para a realização de análises adicionais. A primeira observação foi a de que os parasitos WT continuaram crescendo após o tempo de 144 h, enquanto a mortalidade dos parasitos Superexpressores começou a ocorrer no final da curva de crescimento. No caso dos parasitos GFP, esses não retornaram o crescimento, o que

sugere que a expressão constitutiva de uma proteína que não possui nenhuma função biológica no *T. cruzi* atrapalha de algum modo a retomada do crescimento das culturas irradiadas. Dessa forma, novas curvas de crescimento e ensaios de viabilidade ainda precisarão ser realizados.

A localização subcelular de rTcRBP42 também foi investigada após a irradiação das epimastigotas. Em resposta à radiação gama, rTcRBP42 foi observada distribuída tanto no núcleo quanto no citoplasma dos parasitos. Essa marcação nuclear não foi detectada na condição normal de cultivo. Considerando-se que a radiação gama não causa o rompimento da carioteca, isso pode indicar que o tratamento com esse agente genotóxico induz uma realocização parcial de TcRBP42 para o núcleo dos parasitos. Um efeito semelhante foi documentado para a proteína DRBD3 após o tratamento das culturas com arsenito de sódio. Essa RBP faz parte do interactoma da proteína RBP42 da *L. braziliensis* (FERNÁNDEZ-MOYA *et al.*, 2012; NOCUA; REQUENA; PUERTA, 2021). A realocização de RBPs do citoplasma para o núcleo dos parasitos no estresse pode servir para compartimentalizar e assim impedir o acesso dos transcritos alvos à maquinaria de tradução. No *T. cruzi* esse mecanismo contribui para a regulação diferencial de genes expressos em estágios específicos do ciclo de vida (PASTRO *et al.*, 2017). Outro efeito comum do estresse na localização das RBPs dos tripanosomatídeos é a condensação dessas proteínas em grânulos citoplasmáticos (CASSOLA; DE GAUDENZI; FRASCH, 2007; FERNÁNDEZ-MOYA *et al.*, 2012; KRAMER, 2014; KRÜGER; HOFWEBER; KRAMER, 2013; LAET-SOUZA, 2019; OLIVEIRA *et al.*, 2021). Nesse trabalho, a agregação de TcRBP42 em focos citoplasmáticos não foi observada após o tratamento com radiação gama. Isso diverge das evidências anteriores que apontavam o potencial agregativo de TcRBP42 em resposta ao estresse induzido por esse agente (LAET-SOUZA, 2019). Vários fatores podem interferir na formação de grânulos, sendo um deles a intensidade do estímulo. No caso da radiação gama, mudanças nos resultados experimentais não são incomuns após a troca da fonte de Cobalto-60 utilizada no irradiador. Durante a execução dos experimentos que compõem essa tese, essa fonte foi substituída duas vezes. A capacidade agregativa de TcRBP42 em focos poderá ser novamente investigada no contexto de outros tipos de estresse. Mesmo que TcRBP42 não faça parte de focos citoplasmáticos no contexto do estresse induzido pela radiação gama, experimentos de Microscopia eletrônica detectaram que estruturas desse tipo apresentam um aumento aparente nos parasitos irradiados (LAET-SOUZA, 2019). Se esses focos citoplasmáticos forem realmente grânulos de RNA, estes podem desempenhar algum papel na resistência do *T. cruzi* à radiação gama ao capturarem fatores indutores da morte celular ou funcionarem como centros de armazenamento de

transcritos que sejam importantes para a recuperação pós-estresse. Essa última função atribuída aos grânulos de RNA dos tripanosomatídeos foi investigada anteriormente por CASSOLA; DE GAUDENZI ; FRASCH (2007) em um trabalho no qual o estresse nutricional foi utilizado para induzir o aparecimento dessas estruturas. Nesse mesmo trabalho, a remoção do estresse reverteu esse fenótipo, o que foi atribuído a mobilização dos mRNAs para o reinício da tradução.

A expressão de genes no contexto da radiação gama foi avaliada em pequena escala utilizando-se o mesmo conjunto de genes analisados na condição normal. Ao contrário do que acontece com o genoma, a radiação gama parece não afetar significativamente a integridade dos RNAs (GRYNBERG *et al.*, 2012). Outra evidência experimental surpreendente é que novos RNAs podem ser produzidos nas primeiras 24 h após a irradiação. Nesse momento, o genoma dos parasitos ainda não foi completamente reparado (CHAME, 2018; LAET-SOUZA, 2019; REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006). A significância funcional desse fenômeno ainda não foi caracterizada, mas este pode estar relacionado ao reparo de DNA. Novos experimentos realizados no LGB sugerem que no *T. cruzi* a formação de híbridos de DNA/RNA pode constituir um mecanismo de sinalização eficiente para o recrutamento da maquinaria de reparo de DNA para os sítios de lesão (JUNIOR, 2023). Inicialmente, as análises de PCR em tempo real foram realizadas apenas para epimastigotas WT nos tempos de 24 e 48 h após a irradiação. Buscou-se dessa forma isolar os efeitos gerados pelo estresse apenas daqueles que representam a soma entre a irradiação e a superexpressão ou nocaute de TcRBP42. Conforme esperado, a irradiação causou o aumento na abundância dos transcritos de TcRBP42 mensurados por PCR em tempo real. Mesmo com uma pequena redução nesses níveis após 48 h, esses seguiram superiores àqueles da condição não tratada. Esses resultados confirmam os dados obtidos anteriormente pelo transcriptoma produzido pelo nosso grupo de pesquisa. Vale lembrar que na época, os genes de TcRBP42 ainda estavam anotados como hipotéticos. Esses resultados indicam que os transcritos de TcRBP42 são estabilizados mais eficientemente no estresse.

Quanto a expressão dos outros genes analisados, esses também são regulados diferencialmente no estresse, podendo ser estabilizados ou desestabilizados em resposta à radiação gama. A irradiação das epimastigotas causou a diminuição dos níveis de expressão do gene da Enolase citoplasmática e da Succinato desidrogenase. No tempo de 48 h, no entanto, a expressão dos transcritos da Succinato desidrogenase já haviam retornado aos seus níveis de expressão normais. A subexpressão de alguns genes envolvidos na glicólise e no ciclo do ácido cítrico já havia sido detectada por meio de experimentos de microarranjo de RNA. Globalmente, esses experimentos mostraram que a radiação gama causa principalmente a

subexpressão de genes cujas funções são conhecidas e a superexpressão de genes cujas funções ainda permanecem em sua maioria desconhecidas (GRYNBERG *et al.*, 2012). A subexpressão da Enolase citoplasmática também foi detectada no proteoma dos parasitos irradiados, indicando uma correlação entre os níveis de expressão dos transcritos analisados e das proteínas codificadas por eles (VIEIRA, 2014).

Para os genes da Citrato sintase e Prolina desidrogenase, a radiação levou a um grande aumento na expressão desses genes. Embora os transcritos da Citrato sintase tenham diminuído em expressão no tempo de 48 h, esses seguiram aumentados em relação ao controle não tratado. Aumentos na expressão desses genes não foram identificados anteriormente nos experimentos de microarranjo de RNA. Isso pode ter acontecido simplesmente por esses genes não terem sido representados suficientemente nos *chips* ou por dificuldades na hibridização entre esses e suas sondas. Em conjunto, a expressão desses genes sugere que o metabolismo das epimastigotas é alterado pela radiação gama. É possível que esse tipo de estresse estimule a utilização de aminoácidos como fontes de carbono preferenciais tanto para a geração de energia quanto para a ativação de mecanismos de resistência baseados no acúmulo de prolina. Esse *switch* metabólico pode ser um mecanismo essencial para a resistência do *T. cruzi* a vários tipos de estresse. Nesse sentido, o acúmulo e metabolização desse aminoácido foi detectado na transição das epimastigotas da fase exponencial do crescimento para a fase estacionária. Nesta última, as epimastigotas se encontram em estresse nutricional, um estímulo muito importante para a transformação dessas em tripomastigotas metacíclicas. Nessas formas, a oxidação da prolina como fonte de elétrons para a síntese de ATP é essencial para a invasão das células hospedeiras (BARISÓN *et al.*, 2017; GONÇALVES *et al.*, 2018; MARTINS *et al.*, 2009). Um maior transporte e acúmulo de prolina livre também pode ser produzido experimentalmente pela superexpressão de um transportador de prolina. Essa manipulação genética aumenta a resistência do *T. cruzi* ao estresse oxidativo (tratamento com H₂O₂ e NO) e aos tratamentos com Benznidazol e Nifurtimox, as únicas drogas aprovadas atualmente para o tratamento da doença de Chagas. Coletivamente, todos esses dados sugerem que a função mitocondrial na oxidação de aminoácidos é muito importante para a resistência do *T. cruzi* a vários tipos de estresse celular (MAGDALENO *et al.*, 2009; SAYÉ *et al.*, 2014; WHO, 2023).

No estresse por radiação gama, a prolina pode ser uma fonte de energia crucial para a produção de ATP na mitocôndria. Mesmo com a parada de crescimento ocasionada pela irradiação, os parasitos apresentam um aumento significativo dos níveis de ATP (VIEIRA, 2014). Isso provavelmente reflete a grande demanda energética necessária para o reparo de

DNA e para a síntese proteica *de novo* que são essenciais para a sobrevivência dos parasitos à radiação gama (COSTA-SILVA *et al.*, 2021; REGIS-DA-SILVA *et al.*, 2006; VIEIRA *et al.*, 2014). Outra informação importante é que a irradiação dos parasitos gera um descontrole no acoplamento entre a síntese de ATP e o fluxo de elétrons na cadeia transportadora. O grande fluxo de elétrons mensurado pelo alto consumo de oxigênio mostra que o ciclo do ácido cítrico está provavelmente acontecendo em uma velocidade muito maior nos parasitos irradiados (VIEIRA, 2014). Dessa forma, o aumento da expressão do gene da Citrato sintase, que é um importante ponto regulatório do ciclo do ácido cítrico, pode refletir a necessidade de melhorar o controle sob esse ciclo. Outra possibilidade plausível seria a maior produção de citrato para suprir demandas regulatórias como o controle do metabolismo geral dos parasitos e/ou outros mecanismos de resistência ao estresse que ainda não são conhecidos para a radiação gama (IACOBAZZI; INFANTINO, 2014). Nesse sentido, vale lembrar que a radiação gama induz a superexpressão de genes com funções ainda desconhecidas (GRYNBERG *et al.*, 2012).

Em relação ao maior nível de expressão do gene da Prolina desidrogenase após a irradiação, este sugere que a prolina está sendo metabolizada para produzir energia. Essa enzima, que está associada a membrana mitocondrial interna, doa elétrons diretamente a cadeia transportadora de elétrons por meio de seu cofator FAD. Isso poderia contornar os efeitos negativos dos menores níveis de expressão do gene da Succinato desidrogenase 24 h após a irradiação. Os resultados coletados até o momento sugerem que os elétrons que entram na cadeia transportadora ao nível da Prolina desidrogenase seguem o mesmo caminho daqueles doados pela Succinato desidrogenase. Outra possível função da prolina no estresse por radiação gama seria a proteção contra o estresse oxidativo. Experimentos realizados anteriormente demonstraram que a prolina livre pode funcionar como uma molécula antioxidante (KAUL; SHARMA; MEHTA, 2008). Conforme mencionado previamente, o acúmulo de altos níveis de prolina em parasitos submetidos ao estresse pode constituir um mecanismo acessório essencial para resistência do *T. cruzi* ao estresse oxidativo (BARISÓN *et al.*, 2017; MAGDALENO *et al.*, 2009; PAES *et al.*, 2013; SAYÉ *et al.*, 2014). Nos parasitos irradiados, espécies reativas de oxigênio podem ser geradas pelo próprio tratamento e/ou pelo alto fluxo de elétrons na cadeia transportadora desencadeado pela radiação gama. Nesse sentido, altos níveis de H₂O₂ também são esperados após a irradiação. No entanto, esses níveis são menores nos parasitos tratados em comparação aos controles. Isso pode indicar a ativação de um sistema de defesa antioxidante mais eficiente em resposta a radiação gama (VIEIRA, 2014). Vale destacar que o *T. cruzi* é exposto naturalmente ao estresse oxidativo causado pela liberação de grupos hemes durante a

digestão do sangue ingerido pelo inseto vetor. Em um exemplo de coevolução entre o parasito e seu vetor, o estresse causado por esse agente estimula a proliferação das epimastigotas (NOGUEIRA *et al.*, 2011). No contexto do estresse induzido pela radiação gama, o acúmulo de altos níveis de prolina poderia constituir um dos mecanismos de radiorresistência do *T. cruzi*, ao conferir uma proteção extra contra a oxidação de biomoléculas, principalmente das proteínas. A principal função desse mecanismo seria garantir a manutenção de um proteoma funcional para o reparo dos danos causados pela radiação. A validade dessa suposição encontra certo suporte no que foi observado previamente para a bactéria *Deinococcus radiodurans*. Essa espécie extremófila, que é ainda mais resistente à radiação gama do que o *T. cruzi*, apresenta um robusto sistema de proteção oxidante. Alguns experimentos sugerem que o *pool* de aminoácidos e pequenos peptídeos fazem parte dos mecanismos de neutralização das espécies reativas de oxigênio. A função principal desse sistema seria a proteção da integridade do proteoma, garantindo assim o reparo do genoma (DALY *et al.*, 2010; KRISKO; RADMAN, 2013). A utilização preferencial da prolina no estresse por radiação gama atenderia simultaneamente duas necessidades: a produção de energia e a proteção antioxidante. O balanço entre o consumo de prolina como fonte de energia e a manutenção da prolina livre em níveis adequados para a função antioxidante poderia ser proporcionado pela atividade da Prolina racemase. Essa enzima catalisa a interconversão entre L e D-prolina. Dessa forma, a L-prolina, seria oxidada para a produção de energia e a D-prolina funcionaria como um antioxidante (PAES *et al.*, 2013; REINA-SAN-MARTÍN *et al.*, 2000). Vale ressaltar que todas as possibilidades aqui discutidas ainda necessitam de extensa validação experimental.

Uma vez determinados os efeitos da radiação gama na expressão dos genes selecionados em parasitos WT, a mesma análise foi realizada nos parasitos Nocautes e Superexpressores de TcRBP42. Embora as diferentes linhagens avaliadas tenham níveis de expressão diferentes para os genes da Enolase citoplasmática e Succinato desidrogenase na condição normal, a radiação fez com que estes atingissem patamares semelhantes em todas as linhagens tratadas. Esses resultados sugerem que a radiação gama induz a redução e a manutenção da expressão desses genes nos níveis mínimos necessários para a sobrevivência dos parasitos. Embora a abundância dos transcritos de TcRBP42 aumente em resposta a radiação gama, os transcritos da Enolase citoplasmática, provavelmente estabilizados por essa RBP na condição normal, diminuem. Tal observação indica que a expressão dos genes analisados possa ser controlada por mecanismos independentes da expressão de TcRBP42. Esses podem atuar mediando a desestabilização de transcritos, o que é compatível com a presença de proteínas relacionadas ao decaimento dessas

moléculas no interactoma da proteína RBP42 de *L. braziliensis* (NOCUA; REQUENA; PUERTA, 2021). Para os genes da Citrato sintase e da Prolina desidrogenase, a irradiação dos parasitos levou ao aumento da expressão desses genes em todas as linhagens estudadas. Isso também aconteceu nas epimastigotas Nocautes para TcRBP42, nas quais níveis reduzidos desse transcrito são observados na condição normal. Dessa forma, outros fatores são provavelmente responsáveis pela estabilização desses no estresse. Mais uma vez, os dados de expressão gênica referentes a condição irradiada sugerem que mecanismos independentes de TcRBP42 controlem a expressão dos genes estudados. É possível que esse controle aconteça pelo remodelamento de mRNPs, o que já foi documentado para outros tipos de estresse nos tripanosomatídeos (FERNÁNDEZ-MOYA *et al.*, 2012; ROMAGNOLI *et al.*, 2020). Por fim, a radiação gama proporcionou a estabilização dos níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 mesmo nos parasitos Superexpressores, nos quais níveis altíssimos desses mRNAs foram quantificados após a irradiação das epimastigotas. A mortalidade dos Superexpressores no final da curva de crescimento na condição irradiada pode estar ligada a essa observação. Talvez os parasitos não consigam reduzir a expressão desse gene o suficiente para torná-la compatível com esse momento da resposta ao estresse. Dessa forma, o excesso de TcRBP42 se tornaria prejudicial às epimastigotas. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que a radiação gama afeta da mesma forma os níveis de expressão dos genes analisados em todas as linhagens de epimastigotas estudadas. Portanto, as evidências experimentais coletas até o momento sugerem que TcRBP42 não seja um fator determinante e/ou essencial para o controle da expressão dos genes analisados no estresse causado pela radiação ionizante.

A metaciclogênese também foi avaliada *in vitro* para todas as linhagens estudadas nessa tese. Esse experimento foi realizado por três motivos principais: TcRBP42 foi incluída na lista de RBPs reguladas durante o desenvolvimento do *T. cruzi*, o nocaute de RBPs pode afetar a metaciclogênese dos parasitos (TAVARES *et al.*, 2020) e uma maior expressão dos transcritos da Prolina desidrogenase foi detectada nos parasitos Superexpressores. Nesta tese, a atividade dessa enzima não foi mensurada nos parasitos Superexpressores. No entanto, PAES *et al.* (2013) mostraram que no *T. cruzi* os níveis de expressão do gene da Prolina desidrogenase se correlacionam aos níveis proteicos dessa enzima. Adicionalmente, a superexpressão da Prolina desidrogenase aumenta a diferenciação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas tanto *in vitro* quanto no inseto vetor (MANTILLA *et al.*, 2021). Os resultados dos experimentos de metaciclogênese *in vitro* realizados nessa tese foram acessados pela quantificação da expressão dos transcritos editados do Citocromo B, cujo aumento de expressão ocorre nos parasitos em

diferenciação (SHAW; KALEM; ZIMMER, 2016). Esses experimentos mostraram que a superexpressão ou nocaute de TcRBP42 não afetam significativamente a metaciclogênese dos parasitos nas condições experimentais utilizadas. Durante o protocolo de metaciclogênese, o estresse nutricional também é induzido. Conforme esperado para essa situação, os níveis de expressão dos transcritos da Prolina desidrogenase aumentaram em todas as culturas avaliadas (BARISÓN *et al.*, 2017; SHAW; KALEM; ZIMMER, 2016). Para testar a hipótese de que os níveis de expressão de TcRBP42 respondem a um segundo tipo de estresse, estes foram quantificados nas culturas que estão simultaneamente em diferenciação e em estresse nutricional (SHAW; KALEM; ZIMMER, 2016). Mais uma vez foi detectado o aumento na abundância dos mRNAs de TcRBP42 em parasitos WT e Superexpressores. Essa é, portanto, a segunda situação de estresse na qual se detecta um aumento de expressão para os genes de TcRBP42. Isso sugere que essa RBP está envolvida de algum modo nos mecanismos de resistência do *T. cruzi* que podem ser comuns a diferentes tipos de estresse.

Em resumo, a caracterização de TcRBP42 realizada nesse trabalho revelou várias informações ainda desconhecidas para a proteína da cepa de referência para o *T. cruzi*. Os nossos achados mostraram principalmente que o nocaute dessa RBP é viável nesse organismo, apesar das grandes dificuldades encontradas na geração dessa linhagem de epimastigotas. Em contraste, o nocaute do ortólogo de RBP42 no *T. brucei* é letal (DAS *et al.*, 2012; DAS *et al.*, 2021). Alterações morfológicas são evidentes nas epimastigotas Nocautes, que apresentam defeitos moderados na proliferação apenas em fases mais tardias do crescimento em cultura. Adicionalmente, os resultados de PCR em tempo real referentes a epimastigotas Superexpressoras e Nocautes de TcRBP42 na condição normal de cultivo apontam o funcionamento dessa RBP na estabilização de seus transcritos alvos. Quanto a localização dessa RBP, foi mostrado que TcRBP42 é uma proteína citoplasmática. Essa localização, no entanto, é parcialmente alterada pelo estresse causado pela radiação gama. Após a irradiação, TcRBP42 também foi detectada no núcleo dos parasitos. Esse comportamento sugere que TcRBP42 possa auxiliar no controle traducional ao compartimentalizar parte de seus transcritos associados. Esse mecanismo contribui para a regulação de mRNAs cujas expressões são restritas a um determinado estágio do desenvolvimento (PASTRO *et al.*, 2017). Adicionalmente, TcRBP42 não é essencial para a sobrevivência das epimastigotas irradiadas. Embora os resultados obtidos até aqui indiquem que TcRBP42 não atue diretamente no controle da expressão gênica no estresse, aumentos na abundância de seus transcritos foram observados após a exposição das epimastigotas à radiação gama e a privação nutricional. Isso sugere algum papel dessa RBP nos

mecanismos de resistência ao estresse do *T. cruzi* a esses dois tipos de estresse, o que ainda precisa ser validado experimentalmente. Essa tese também contribuiu para o estudo da radiorresistência desse organismo ao identificar o aumento da expressão dos transcritos da Prolina desidrogenase após o tratamento com radiação gama. Essa é a primeira vez na literatura dos tripanosomatídeos que o metabolismo da prolina é sugerido como parte dos mecanismos de resistência do *T. cruzi* a esse tipo de radiação ionizante, que também causa o estresse oxidativo (RHEE *et al.*, 2012). Um maior transporte e acúmulo de prolina foi implicado na resistência do *T. cruzi* a diferentes tipos de estresse, como aqueles causados por espécies reativas de oxigênio, privação nutricional e tratamento com as únicas drogas aprovadas para o tratamento da doença de Chagas (BARISÓN *et al.*, 2017; MAGDALENO *et al.*, 2009; SAYÉ *et al.*, 2014; WHO, 2023).

7 CONCLUSÕES

Nessa tese foi realizada a caracterização da proteína RBP42 da cepa de referência para o *T. cruzi* nas condições normais de cultivo e no estresse pela radiação gama. O estudo de TcRBP42 no contexto do estresse induzido pela radiação ionizante é inédito na literatura dos tripanosomatídeos. No *T. cruzi* os conhecimentos sobre a proteína RBP42 se limita a uma única publicação científica, reforçando a importância dessa tese. Nesse sentido, os principais resultados obtidos nesse trabalho estão resumidos abaixo.

- i) Na versão mais recente do genoma do *T. cruzi* da cepa CL Brener, a proteína TcRBP42 é codificada por um gene de cópia única contendo dois alelos. Esses estão presentes nos haplótipos Esmeraldo-like e Não Esmeraldo-like e compartilham uma alta identidade de sequência.
- ii) As proteínas RBP42 são conservadas nos tripanosomatídeos. Os ortólogos analisados possuem dois domínios conservados, NTF2-like e RRM, interligados por uma longa região central intrinsecamente desordenada e cuja extensão varia conforme a espécie. Essa região também contém três motivos ricos no aminoácido prolina. Apenas as proteínas RBP42 do *T. cruzi* possuem uma segunda região não estruturada após o domínio RRM. Os domínios de TcRBP42 são similares estruturalmente com os mesmos domínios determinados experimentalmente para outras proteínas.
- iii) Em comparação com os parasitos WT, a superexpressão de TcRBP42 não causa alterações aparentes na morfologia, divisão celular, padrão de crescimento e viabilidade das culturas de epimastigotas tanto em condições normais de cultivo quanto de estresse causado pela exposição a 1000 Gy de radiação gama.
- iv) Epimastigotas Heminocautes e Nocautes para TcRBP42 foram geradas com a tecnologia de CRISPR/Cas9. Os Nocautes foram produzidos a partir de uma segunda rodada de edição gênica de um clone Heminocaute. Em ambas as linhagens não foram observadas perdas de viabilidade, grandes problemas de crescimento e alterações na divisão celular. No entanto, o nocaute de TcRBP42 causou o aparecimento de epimastigotas com corpo arredondado, flagelo encurtado e mobilidade reduzida. Essas formas também formam agregados em cultura. Quanto o estresse por radiação gama, a remoção da expressão de TcRBP42 não aumentou a sensibilidade a esse agente.

- v) A localização subcelular de rTcRBP42 foi determinada pela detecção de sua *tag* de histidina. Na condição normal, rTcRBP42 se distribui difusamente pelo citoplasma das epimastigotas, não estando presente no núcleo. A exposição à radiação gama causa a realocização parcial dessa RBP para esse compartimento celular. Essa observação provavelmente não resulta do rompimento da carioteca das epimastigotas, que permaneceu íntegra nos experimentos de Microscopia eletrônica realizados anteriormente a esse trabalho.
- vi) A superexpressão e nocaute de TcRBP42 alteram de formas diferentes a expressão de genes do metabolismo energético avaliadas em condições normais. Os transcritos dos genes da Enolase e da Citrato sintase são provavelmente estabilizados pela proteína TcRBP42. Em contraste, os níveis de expressão dos transcritos da Succinato desidrogenase não são afetados pelo *background* genético dos parasitos. Para a Prolina desidrogenase, o nocaute de TcRBP42 não afetou os níveis de seus transcritos. Entretanto, estes são muito aumentados pela superexpressão de TcRBP42, sugerindo que essa proteína confere uma estabilização adicional a esses transcritos.
- vii) A irradiação dos parasitos WT promoveu o aumento dos níveis de expressão dos genes codificadores das proteínas TcRBP42, Citrato sintase e Prolina desidrogenase. Os níveis de expressão dos transcritos da Enolase citoplasmática e Succinato desidrogenase sofreram reduções após a indução do estresse. Nos parasitos Nocaute e Superexpressores de TcRBP42 são observados os mesmos efeitos da radiação nos genes analisados, sugerindo que a resposta ao estresse é independente do *background* genético dos parasitos. No estresse celular, a expressão desses genes é provavelmente controlada por outras RBPs.
- viii) O aumento da expressão do gene da Prolina desidrogenase sugere que a exposição à radiação gama altera o metabolismo das epimastigotas para a utilização preferencial de aminoácidos. A prolina também pode integrar os mecanismos de resistência a esse tipo de radiação ao contribuir para a neutralização de espécies reativas de oxigênio. Esse trabalho expôs pela primeira vez na literatura um possível *link* entre a radiorresistência do *T. cruzi* e o metabolismo da prolina.
- ix) O protocolo de metaciclogênese *in vitro* mostrou que a superexpressão ou nocaute de TcRBP42 não altera as taxas de diferenciação do *T. cruzi* em formas intermediárias e/ou tripomastigotas metacíclicas. Esse protocolo, que também induz o estresse nutricional, também promoveu o aumento nos níveis de expressão dos genes da TcRBP42 e da Prolina desidrogenase em todas as linhagens de parasitos analisadas.

8 PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos na caracterização de TcRBP42 realizada nesta tese cria inúmeras possibilidades para a continuidade futura desse trabalho. Um dos primeiros desdobramentos possíveis e que já está em andamento é a produção do transcriptoma das epimastigotas WT, Nocautes e Superexpressoras de TcRBP42 (condições normais de cultivo). Uma vez analisados, esses dados gerarão muitas informações sobre os processos biológicos nos quais a proteína RBP42 do *T. cruzi* está envolvida. Uma segunda possibilidade a ser explorada seria a geração de epimastigotas contendo as proteínas TcRBP42 endógenas marcadas com *tags* de afinidade. Isso permitiria estudar a localização celular e os efeitos da radiação gama nos níveis das proteínas nativas. Uma vez que existe a possibilidade do estresse por radiação gama causar a captura de transcritos em grânulos de RNA, a localização desses poderia ser determinada por meio de corantes específicos para essa molécula ou pela realização de experimentos de hibridização fluorescente *in situ* (FISH). Esta última técnica permite o estudo de transcritos específicos ou de uma classe inteira de transcritos, como aqueles contendo caudas de poli-A. Em relação à localização de TcRBP42, essa poderia ser estudada em altíssima resolução utilizando-se a técnica de Microscopia imunoeletrônica. Embora planejado para essa tese, este experimento não pode ser realizado em decorrência dos grandes atrasos ocasionados pelo isolamento social imposto pela Pandemia de COVID-19. A Microscopia eletrônica de transmissão também poderia ser utilizada para estudar com grande detalhamento as alterações morfológicas presentes nos parasitos Nocautes para TcRBP42. A análise de ciclo celular também poderia ser realizada para esses parasitos. Uma vez que os níveis de expressão dos transcritos de TcRBP42 responderam ao estresse celular induzido pela radiação gama e pela metaciclogênese, a proteína TcRBP42 poderia ser ainda estudada no contexto de outros tipos de estresse como aqueles induzidos pela privação nutricional e pelo aumento de temperatura. Os últimos desdobramentos possíveis que serão descritos para o presente projeto são o estudo dos transcritos alvos de TcRBP42 e das proteínas que fazem parte do interactoma dessa proteína pelas respectivas técnicas de *RNA-seq* e de Espectrometria de Massas. Para tanto, TcRBP42 seria fusionada com a proteína GFP e imunoprecipitada empregando-se *nanobodies* anti-GFP. Um estudo recente mostra o sucesso dessa abordagem na imunoprecipitação de diversas proteínas do *T. cruzi* (INOUE et al., 2022).

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, H. *et al.* Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 229, p. 62-74, April 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2019.02.008>.
- 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, February 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv030>.
- ALMEIDA, J. M. D. *et al.* Synergistic effect and ultrastructural changes in *Trypanosoma cruzi* caused by isobutylsilactone A in short exposure of time. **PLOS ONE**, v. 16, n. 1, Article e0245882, January 2021. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0245882>.
- ALSFORD, S. *et al.* High-throughput phenotyping using parallel sequencing of RNA interference targets in the African trypanosome. **Genome Research**, v. 21, n. 6, p. 915-924, June 2011. DOI: <https://doi.org/10.1101/gr.115089.110>.
- 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, February 2016. DOI: <https://doi.org/10.4331/wjbc.v7.i1.78>.
- ALVES, L. R. *et al.* The mRNAs associated to a zinc finger protein from *Trypanosoma cruzi* shift during stress conditions. **RNA Biology**, v. 11, n. 7, p. 921-933, July 2014. DOI: <https://doi.org/10.4161/rna.29622>.
- AMORIM, J. C. *et al.* Quantitative proteome and phosphoproteome analyses highlight the adherent population during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, Article 9899, August 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10292-3>.
- ARANDA, P. S.; LAJOIE, D. M.; JORCYK, C. L. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. **Electrophoresis**, v. 33, n. 2, p. 366-369, January 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>.
- ASLETT, M. *et al.* TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, Suppl_1, v. 38, p. D457-D462, January 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>.
- ASSIS, A. V. D. **Lesões no DNA nuclear e mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* sinalizam para diferentes tipos de morte**. Orientador: MACHADO, C. R. 2019. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- 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>.

BARNABÉ, C. *et al.* Reconsideration of the seven discrete typing units within the species *Trypanosoma cruzi*, a new proposal of three reliable mitochondrial clades. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, n. 2016, p. 176-186, April 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.029>.

BARRETT, F. M.; FRIEND, W. G. Differences in the concentration of free amino acids in the haemolymph of adult male and female *Rhodnius prolixus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 52, n. 3, p. 427-431, November 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(75\)90156-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(75)90156-X).

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, November 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0014-4894\(03\)00034-1](https://doi.org/10.1016/S0014-4894(03)00034-1).

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>.

BERNÁ, L. *et al.* Expanding an expanded genome: long-read sequencing of *Trypanosoma cruzi*. **Microbial Genomics**, v. 4, n. 5, Article e000177, April 2018. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000177>.

BRASIL. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro. **Portaria Nº 158, De 4 de Fevereiro de 2016**, Brasília, 2016. Available at: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2016/prt0158_04_02_2016.html. Accessed: 26 May 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Doença de Chagas**, Brasília, 2023. Available at: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/d/doenca-de-chagas>. Accessed: 28 April 2023.

BUCHAN, D. W. A. *et al.* Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W349-W357, June 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt381>.

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

BURKARD, G.; FRAGOSO, C. M.; RODITI, I. Highly efficient stable transformation of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 153, n. 2, p. 220-223, June 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2007.02.008>.

BURLE-CALDAS, G. A. *et al.* Expanding the tool box for genetic manipulation of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 25-33, September/October 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2015.10.004>.

BURLE-CALDAS, G. A. *et al.* Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 8, p. 591-596, July 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.02.002>.

CALLEJAS-HERNÁNDEZ, F. *et al.* Genomic assemblies of newly sequenced *Trypanosoma cruzi* strains reveal new genomic expansion and greater complexity. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, Article 14631, October 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32877-2>.

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.

CAMPOS-MELO, D. *et al.* The integral role of RNA in stress granule formation and function. v. 9, Article 621779, May 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.621779>.

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, August 2007. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05833.x>.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **Acute Radiation Syndrome: a fact sheet for clinicians**, June 2018. Available at: https://web.archive.org/web/20190518165919/https://www.cdc.gov/nceh/radiation/emergencies/arsphysicianfactsheet.htm?CDC_AA_refVal=https%3A%2F%2Femergency.cdc.gov%2Fradiation%2Farsphysicianfactsheet.asp#4. Accessed: 26 May 2023.

CDC (Centers for Disease Control and Prevention). **American Trypanosomiasis**, June 2021. Available at: <https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html#print>. Accessed: 24 April 2023.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, August 1909. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0074-02761909000200008>.

CHAME, D. F. **Caracterização das ribonucleoproteínas DRBD3 e ALBA30 de *Trypanosoma cruzi* e seus envoltimentos na resposta ao estresse**. Orientador: FRANCO, G. R. 2018. 202 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CHAME, D. F. *et al.* *Trypanosoma cruzi* RNA-binding protein ALBA30 aggregates into cytoplasmic foci under nutritional stress. **Parasitology Research**, v. 119, n. 2, p. 749-753, February 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06554-w>.

CHIARI, E.; MANSUR NETO, E.; BRENER, Z. Some effects of gamma-radiation on *Trypanosoma cruzi*, culture and blood forms. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 10, n. 3, p. 131-137, May-June 1968.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, Article 190072, June 2019. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.190072>.

CORLEY, M.; BURNS, M. C.; YEO, G. W. How RNA-binding proteins interact with RNA: molecules and mechanisms. **Molecular Cell**, v. 78, n. 1, p. 9-29, April 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2020.03.011>.

COSTA-SILVA, H. M. *et al.* DNA Topoisomerase 3 α is involved in homologous recombination repair and replication stress response in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 9, p. 633195w, May 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.633195>.

D'AVILA-LEVY, C. M. *et al.* Exploring the environmental diversity of kinetoplastid flagellates in the high-throughput DNA sequencing era. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 956-965, December 2015. DOI: <https://doi.org/10.1590/0074-02760150253>.

DALY, M. J. *et al.* Small-molecule antioxidant proteome-shields in *Deinococcus radiodurans*. **PLOS ONE**, v. 5, n. 9, Article e12570, September 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012570>.

DAROCHA, W. D. *et al.* Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 133, n. 2, p. 175-186, February 2004a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2003.10.005>.

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, January 2004b. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-003-1004-5>.

DAS, A. *et al.* Biochemical characterization of *Trypanosoma brucei* RNA polymerase II. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 150, n. 2, p. 201-210, December 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, November 2012. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.033829.112>.

DAS, A. *et al.* The RNA-binding protein RBP42 regulates cellular energy metabolism in mammalian-infective *Trypanosoma brucei*. **bioRxiv**, April 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.04.14.439849>.

DECKER, C. J.; PARKER, R. P-bodies and stress granules: possible roles in the control of translation and mRNA degradation. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 4, n. 9, Article a012286, September 2012. DOI: <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a012286>.

DOBIN, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. **Bioinformatics**, v. 29, n. 1, p. 15-21, January 2012. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>.

DOUDNA, J. A.; CHARPENTIER, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. **Science**, v. 346, n. 6213, Article 1258096, November 2014. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1258096>.

DUVAUD, S. *et al.* Expasy, the Swiss Bioinformatics Resource Portal, as designed by its users. **Nucleic Acids Research**, v. 49, n. W1, p. W216-W227, July 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab225>.

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

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>.

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, November 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048870>.

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>.

GONÇALVES, C. S. *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites and Vectors**, v. 11, Article 83, February 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2664-4>.

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

GUILLÉN-BOIXET, J. *et al.* RNA-induced conformational switching and clustering of G3BP drive stress granule assembly by condensation. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 346-361.e317, April 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.049>.

HARRELL, C. R. *et al.* Risks of using sterilization by gamma radiation: the other side of the coin. **International Journal of Medical Sciences**, v. 15, n. 3, p. 274-279, January 2018. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijms.22644>.

HENTZE, M. W. *et al.* A brave new world of RNA-binding proteins. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 19, n. 5, p. 327-341, January 2018. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.130>.

HERREROS-CABELLO, A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* genome: organization, multi-gene families, transcription, and biological implications. **Genes**, v. 11, n. 10, Article 1196, October 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes11101196>.

HOLETZ, F. B. *et al.* Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. **The FEBS Journal**, v. 277, n. 16, p. 3415-3426, August 2010. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07747.x>.

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>.

HUBSTENBERGER, A. *et al.* P-body purification reveals the condensation of repressed mRNA regulons. **Molecular Cell**, v. 68, n. 1, p. 144-157.e145, October 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.003>.

IACOBAZZI, V.; INFANTINO, V. Citrate – new functions for an old metabolite. **Biological Chemistry**, v. 395, n. 4, p. 387-399, April 2014. DOI: <https://doi.org/10.1515/hsz-2013-0271>.

INOUE, A. H. *et al.* Proteomics uncovers novel components of an interactive protein network supporting RNA export in trypanosomes. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 21, n. 3, Article 100208, March 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mcpro.2022.100208>.

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>.

JANSEN, A. M.; XAVIER, S. C. d. C.; ROQUE, A. L. R. *Trypanosoma cruzi* transmission in the wild and its most important reservoir hosts in Brazil. **Parasites & vectors**, v. 11, n. 1, Article 502, September 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3067-2>.

JINEK, M. *et al.* A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. **Science**, v. 337, n. 6096, p. 816-821, June 2012. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.

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>.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, August 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

JUNIOR, A. S. M. **Estudo do papel dos genes RNaseH1 e RNaseH2A na resposta aos danos no DNA em *Trypanosoma cruzi***. Orientador: MACHADO, C. R. 2023. 181 f. Dissertação (Mestre) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

KATOH, 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>.

KAUL, S.; SHARMA, S. S.; MEHTA, I. K. Free radical scavenging potential of L-proline: evidence from in vitro assays. **Amino Acids**, v. 34, n. 2, p. 315-320, November 2008. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00726-006-0407-x>.

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, March 2016. DOI: <https://doi.org/10.1083/jcb.201508028>.

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>.

KONATÉ, M. M. *et al.* Molecular function limits divergent protein evolution on planetary timescales. **eLife**, v. 8, Article e39705, September 2019. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.39705>.

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, February 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, March/April 2014. DOI: <https://doi.org/10.1002/wrna.1207>.

KRAMER, S. The ApaH-like phosphatase TbALPH1 is the major mRNA decapping enzyme of trypanosomes. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 6, Article e1006456, June 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006456>.

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, January 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, September 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>.

LAET-SOUZA, D. d. **Caracterização da ribonucleoproteína RBP42 no parasito *Trypanosoma cruzi* sob condições de estresse**. Orientador: FRANCO, G. R. Coorientador: CHAME, D. F. 2019. 130 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

LANDER, N.; CHIURILLO, M. A. State-of-the-art CRISPR/Cas9 technology for genome editing in trypanosomatids. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 981-991, July 2019. DOI: <https://doi.org/10.1111/jeu.12747>.

LIDANI, K. C. F. *et al.* Chagas disease: from discovery to a worldwide health problem. **Frontiers in Public Health**, v. 7, Article 166, July 2019. DOI: <https://doi.org/10.3389/fpubh.2019.00166>.

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, November 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.07.015>.

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, December 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, January 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>.

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>.

LUO, Y.; NA, Z.; SLAVOFF, S. A. P-bodies: composition, properties, and functions. **Biochemistry**, v. 57, n. 17, p. 2424-2431, January 2018. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.7b01162>.

LUTHER, D. C. *et al.* Protein delivery: if your GFP (or other small protein) is in the cytosol, it will also be in the nucleus. **Bioconjugate Chemistry**, v. 32, n. 5, p. 891-896, May 2021. DOI: <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.1c00103>.

MAGDALENO, A. *et al.* Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **PLOS ONE**, v. 4, n. 2, Article e4534, February 2009. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004534>.

MANTILLA, B. S. *et al.* Higher expression of proline dehydrogenase altered mitochondrial function and increased *Trypanosoma cruzi* differentiation in vitro and in the insect vector. **Biochemical Journal**, v. 478, n. 21, p. 3891-3903, November 2021. DOI: <https://doi.org/10.1042/BCJ20210428>.

MARCELO, A. *et al.* Stress granules, RNA-binding proteins and polyglutamine diseases: too much aggregation? **Cell Death and Disease**, v. 12, n. 6, Article 592, June 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03873-8>.

MARTINEZ-CALVILLO, S. *et al.* Epigenetic regulation of transcription in trypanosomatid protozoa. **Current Genomics**, v. 19, n. 2, p. 140-149, February 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, February 2010. DOI: <https://doi.org/10.1155/2010/525241>.

MARTÍNEZ-SILVA, R. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: effects of gamma radiation on growth and infectivity. **Experimental Parasitology**, v. 25, p. 162-170, September 1969. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(69\)90062-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(69)90062-9).

MARTINS, R. M. *et al.* Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 3023-3032, July 2009. DOI: <https://doi.org/10.1128/iai.00138-09>.

MASLOV, D. A. *et al.* Recent advances in trypanosomatid research: genome organization, expression, metabolism, taxonomy and evolution. **Parasitology**, v. 146, n. 1, p. 1-27, June 2019. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182018000951>.

MATSUKI, H. *et al.* Both G3BP1 and G3BP2 contribute to stress granule formation. **Genes to Cells**, v. 18, n. 2, p. 135-146, February 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>.

MEHTA, M. *et al.* HuR silencing elicits oxidative stress and DNA damage and sensitizes human triple-negative breast cancer cells to radiotherapy. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 64820-64835, October 2016. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.11706>.

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, October 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt647>.

NANDAN, D. *et al.* Comprehensive identification of mRNA-binding proteins of *Leishmania donovani* by interactome capture. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, Article e0170068, January 2017. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170068>.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. ISBN 978-85-8271-073-9.

NGÔ, H. *et al.* Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 25, p. 14687-14692, December 1998. DOI: <https://doi.org/doi:10.1073/pnas.95.25.14687>.

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

NOCUA, P. A.; REQUENA, J. M.; PUERTA, C. J. Identification of the interactomes associated with SCD6 and RBP42 proteins in *Leishmania braziliensis*. **Journal of Proteomics**, v. 233, Article 104066, February 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104066>.

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, December 2008. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2199-9-107>.

NOGUEIRA, N. P. *et al.* Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. **PLOS ONE**, v. 6, n. 10, Article e25935, October 2011. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025935>.

OLIVEIRA, C. *et al.* Characterization of the RNA-binding protein TcSgn1 in *Trypanosoma cruzi*. **Microorganisms**, v. 9, n. 5, Article 986, 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050986>.

PAES, L. S. *et al.* Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, Article e69419, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069419>.

PAHO (Pan American Health Organization). **Chagas disease**, 2023. Available at: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease#:~:text=Chagas%20disease%20is%20endemic%20in,newborns%20become%20infected%20during%20gestation>. Accessed: 27 April 2023.

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

PASTRO, L. *et al.* Nuclear compartmentalization contributes to stage-specific gene expression control in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 5, Article 8, February 2017. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcell.2017.00008>.

PECH-CANUL, Á., C.; MONTEÓN, V.; SOLÍS-OVIEDO, R. L. A brief view of the surface membrane proteins from *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2017, Article 3751403, June 2017. DOI: <https://doi.org/10.1155/2017/3751403>.

PENG, D.; TARLETON, R. EuPaGDT: a web tool tailored to design CRISPR guide RNAs for eukaryotic pathogens. **Microbial Genomics**, v. 1, n. 4, Article e000033., October 2015. DOI: <https://doi.org/10.1099/mgen.0.000033>.

PRONOBIS, M. I.; DEUITCH, N.; PEIFER, M. The Miraprep: a protocol that uses a miniprep kit and provides maxiprep yields. **PLOS ONE**, v. 11, n. 8, p. e0160509, August 2016. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160509>.

QUEIROZ, R. *et al.* Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, Article 495, October 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-495>.

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

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, October 2006. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2006.05.012>.

REINA-SAN-MARTÍN, B. *et al.* A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. **Nature Medicine**, v. 6, n. 8, p. 890-897, August 2000. DOI: <https://doi.org/10.1038/78651>.

RESENDE, B. C. *et al.* The influence of recombinational processes to induce dormancy in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, Article 5, January 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00005>.

RHEE, J. S. *et al.* Gamma irradiation-induced oxidative stress and developmental impairment in the hermaphroditic fish, *Kryptolebias marmoratus* embryo. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 31, n. 8, p. 1745-1753, August 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/etc.1873>.

ROMAGNOLI, B. A. A. *et al.* RNA binding proteins and gene expression regulation in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, Article 56, February 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00056>.

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>.

SABLOFF, M. *et al.* Total body irradiation for hematopoietic stem cell transplantation: what can we agree on? **Current Oncology**, v. 28, n. 1, p. 903-917, February 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/curroncol28010089>.

SAGE, E.; SHIKAZONO, N. Radiation-induced clustered DNA lesions: repair and mutagenesis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 107, p. 125-135, June 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2016.12.008>.

SÁNCHEZ-VALDÉZ, F. J. *et al.* Spontaneous dormancy protects *Trypanosoma cruzi* during extended drug exposure. **eLife**, v. 7, Article e34039, March 2018. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.34039>.

SANGENITO, L. S.; BRANQUINHA, M. H.; SANTOS, A. L. S. Funding for Chagas Disease: a 10-Year (2009-2018) survey. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 5, n. 2, Article 88, June 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed5020088>.

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, December 1977. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.74.12.5463>.

SAYÉ, M. *et al.* Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. **PLOS ONE**, v. 9, n. 3, Article e92028, March 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092028>.

SEIBEL, N. M. *et al.* Nuclear localization of enhanced green fluorescent protein homomultimers. **Analytical Biochemistry**, v. 368, n. 1, p. 95-99, September 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ab.2007.05.025>.

SHAW, A. K.; KALEM, M. C.; ZIMMER, S. L. Mitochondrial gene expression is responsive to starvation stress and developmental transition in *Trypanosoma cruzi*. **mSphere**, v. 1, n. 2, p. e00051-00016, April 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00051-16>.

SILVA, D. G. P. *et al.* The in vivo and in vitro roles of *Trypanosoma cruzi* Rad51 in the repair of DNA double strand breaks and oxidative lesions. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 11, Article e0006875, November 2018. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006875>.

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>.

SOARES-MEDEIROS, L. C. *et al.* Rapid, selection-free, high-efficiency genome editing in protozoan parasites using CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. **mBio**, v. 8, n. 6, p. e01788-01717, Article e01788-17, November/December 2017. DOI: <https://doi.org/10.1128/mBio.01788-17>.

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

TAKAGI, Y. *et al.* Differentiating *Trypanosoma cruzi* in a host mammalian cell imaged in aqueous liquid by Atmospheric Scanning Electron Microscopy. **Microbiology Spectrum**, v. 10, n. 1, Article e0141321, February 2022. DOI: <https://doi.org/10.1128/spectrum.01413-21>.

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, February 1986. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0036-46651986000100004>.

TAVARES, T. S. *et al.* A *Trypanosoma cruzi* zinc finger protein that is implicated in the control of epimastigote-specific gene expression and metacyclogenesis. **Parasitology**, p. 1-15, September 2020. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182020002176>.

TAYLOR, M. B.; GUTTERIDGE, W. E. *Trypanosoma cruzi* subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 63, n. 1, p. 84-97, February 1987. DOI: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(87\)90081-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(87)90081-6).

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, September 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, January/March 2012. DOI: <https://doi.org/10.1590/S1415-47572012005000008>

TIMENETSKY, J. *et al.* Detection of multiple mycoplasma infection in cell cultures by PCR. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 39, n. 7, p. 907-914, July 2006. DOI: <https://doi.org/10.1590/s0100-879x2006000700009>.

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>.

VARADI, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D439-D444, November 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.

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, November 1999. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(99\)00386-8](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(99)00386-8).

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>.

VIEIRA, H. G. S. V. **Caracterização do perfil proteico e da atividade mitocondrial de *Trypanosoma cruzi* sob o estresse de radiação gama**. Orientador: FRANCO, G. R. Coorientador: Machado, C. R. 2014. 178 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

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, December 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080947>.

VOLPON, L. *et al.* NMR structural study of TcUBP1, a single RRM domain protein from *Trypanosoma cruzi*: contribution of a beta hairpin to RNA binding. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3708-3717, March 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi047450e>.

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>.

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, April 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5787-9>.

WHO (World Health Organization). **Ending the neglect to attain the sustainable development goals: a road map for neglected tropical diseases 2021–2030**. Geneva WHO, 2020. 196 p. ISBN 978-92-4-001035-2.

WHO (World Health Organization). **Chagas disease (also known as American trypanosomiasis)**, April 2023. Available at: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)). Accessed: 27 April 2023.

WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1179-1183, May 1995. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.7761835>.

YANG, P. *et al.* G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 325-345, April 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.046>.

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, April 2003. DOI: <https://doi.org/10.1126/stke.2003.179.re8>.

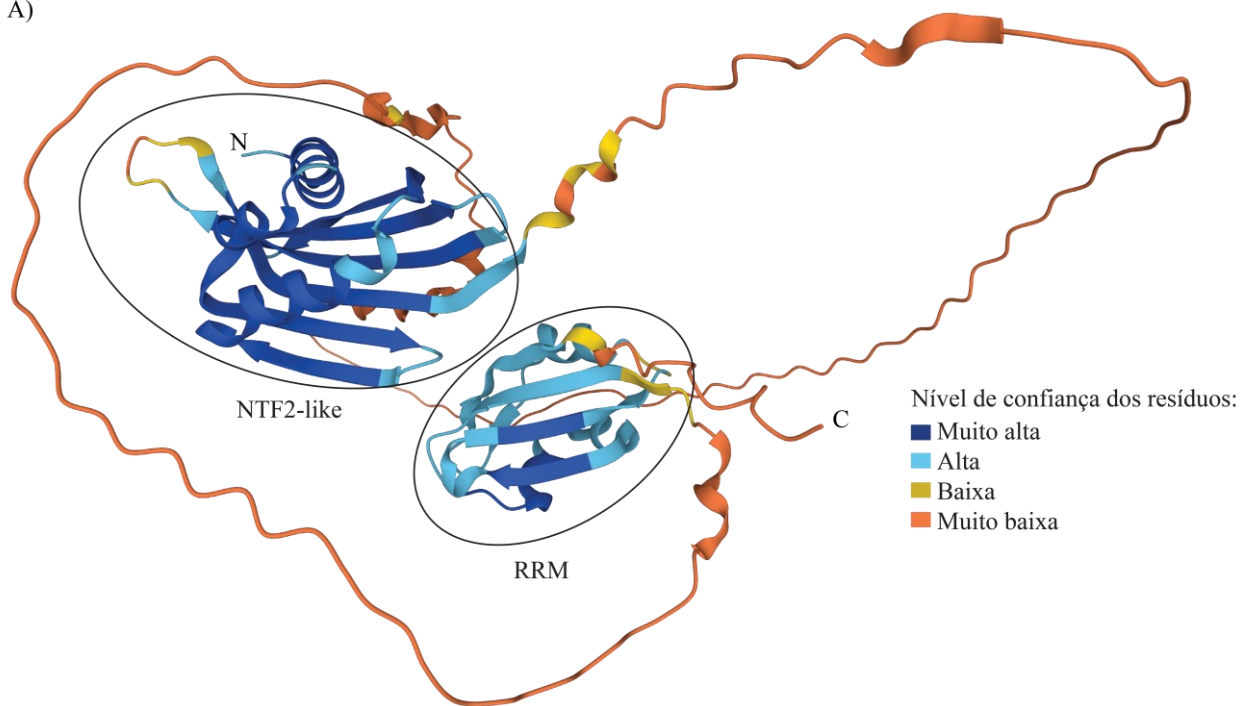
ZINGALES, B. *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, November 2009. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0074-02762009000700021>

ZUMA, A. A.; SOUZA, W. D. Fexinidazole interferes with the growth and structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, Article 20388, November 2022. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-23941-z>.

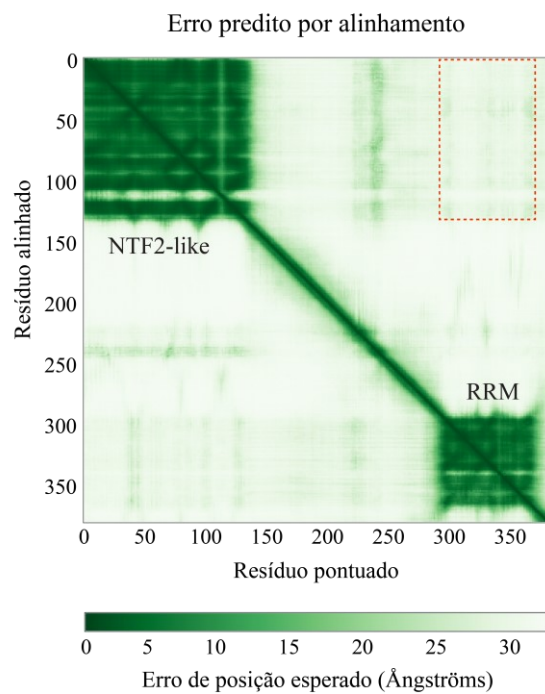
APÊNDICES

APÊNDICE A — Estrutura tridimensional completa para a proteína TcRBP42

A)

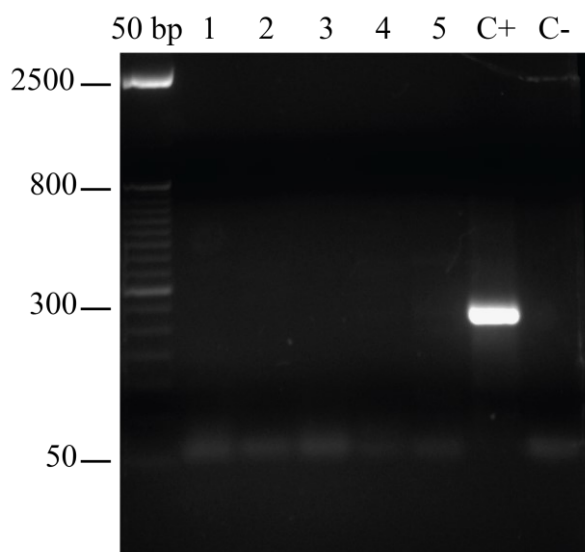


B)



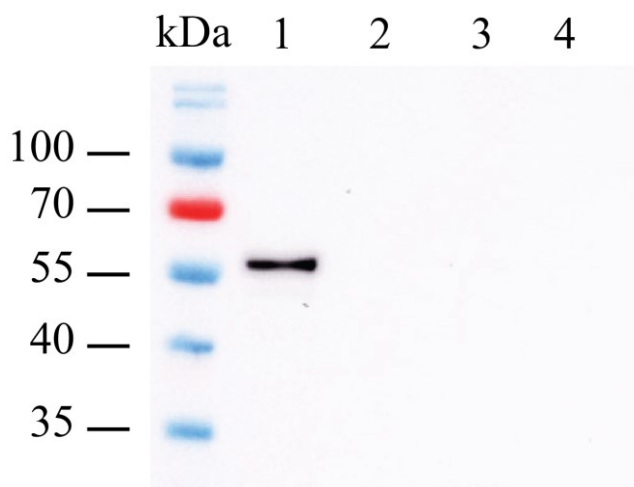
Legenda na próxima página...

A estrutura tridimensional para a proteína TcRBP42 codificada pelo alelo Esmeraldo-like (TcCLB.509167.140) do *T. cruzi* da Cepa CL Brener foi predita pelo *software* de inteligência artificial *AlphaFold2* e recuperada do *AlphaFoldDB* com o identificador Q4DQQ3. Essa proteína possui dois domínios conservados, NTF2-like e RRM, interligados por uma longa região central predita como intrinsecamente desordenada. As regiões correspondentes aos domínios estão delimitadas por elipses. Os terminais amino (N) e carboxi (C) também estão indicados. Ambos os domínios de TcRBP42 foram preditos com valores de confiança alto ou muito alto para a grande maioria dos resíduos. Adicionalmente, esses possuem topologias compatíveis com aquelas já conhecidas para esses domínios. O domínio NTF2-like e RRM contêm as seguintes coleções de elementos de estrutura secundária: $\alpha\beta\beta\alpha\beta\beta\beta$ para o domínio NTF2-like e $\beta\alpha\beta\beta\alpha\beta$ para o domínio RRM. Apenas os elementos de estrutura secundária com uma extensão mínima de quatro resíduos foram considerados. Os segmentos em conformação β de cada domínio estão organizados em uma folha beta antiparalela. Em contraste, as estruturas formadas pelos resíduos presentes nas regiões preditas como intrinsecamente desordenadas possuem valores de confiança baixos ou muito baixos. No modelo predito, essas regiões assumiram uma distribuição aleatória ao redor dos domínios conservados de TcRBP42 (**A**). O erro predito por alinhamento foi calculado pelo *AlphaFold2* e mostra que os resíduos que compõem os domínios NTF2-like e RRM possuem um bom posicionamento relativo (pequeno erro predito = verde-escuro). Em contrapartida, a região que conecta os dois domínios de TcRBP42, delimitada por uma caixa vermelha pontilhada, possui um grande erro associado a posição relativa de cada resíduo (verde-claro). Isso indica que a ferramenta não pode determinar com confiança o posicionamento de um domínio em relação ao outro (**B**). α : α -hélice e β : segmento em conformação β . Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE B — Avaliação da contaminação por *Mycoplasma sp.*

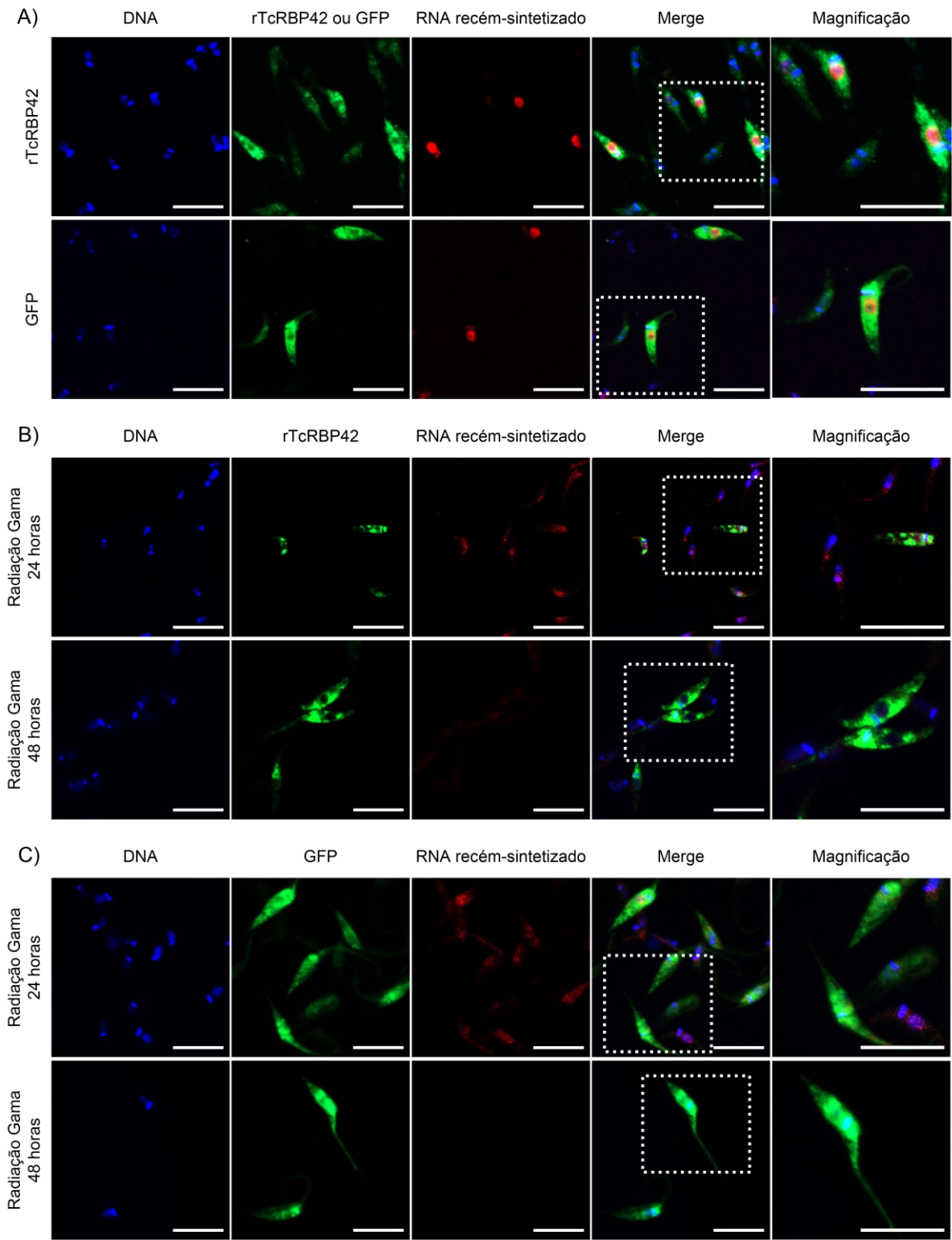
A contaminação por *Mycoplasma sp.* foi monitorada por PCR convencional. A reação foi realizada com a Taq DNA Polimerase Pht (Phoneutria Biotecnologia e Serviços) em combinação com o tampão da GoTaq® Flex (Promega). Os produtos amplificados foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 2,5%. Foram analisadas as seguintes linhagens de epimastigotas: WT (canaleta 1), Superexpressor de TcRBP42 clone 1 e 3 (canaletas 2 e 3), Heminocaute e Nocaute de TcRBP42 (canaletas 4 e 5). Foi utilizado o padrão de peso molecular de 50 bp (Invitrogen™). C+: controle positivo e C-: controle negativo. Fonte: Elaborado pelo autor.

APÊNDICE C — Imunoprecipitação de rTcRBP42



Inúmeros protocolos para a imunoprecipitação dos complexos de rTcRBP42 foram testados sem sucesso no decorrer deste trabalho. Foram utilizadas estratégias de imunoprecipitação empregando as *tags* de afinidade do Peptídeo ligador de estreptavidina e 6x-His presentes na cópia recombinante de TcRBP42 (rTcRBP42). A imunoprecipitação dos complexos seria seguida pelo sequenciamento de RNA para se estudar os transcritos alvos de TcRBP42 nas condições normais de cultivo e após a indução do estresse pela radiação gama. A última tentativa de imunoprecipitação foi realizada com o *Pierce™ PolyHis™ Protein Interaction Pull-Down Kit* (Thermo Fisher Scientific) que utiliza *beads* de cobalto para a captura dos complexos proteicos contendo *tags* de 6x-His. Após a realização do protocolo recomendado pelo fabricante, as amostras foram fracionadas por SDS-PAGE e analisadas pela técnica de *Western blot*. Foram utilizados o anticorpo primário Anti-His-Tag (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology) e o secundário Anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Amersham ECL Mouse IgG, HRP-linked whole Ab). Nesse experimento, a proteína rTcRBP42 foi detectada no extrato proteico total denominado de *input* (canaleta 1), mas nenhum sinal foi detectado na fração eluída (canaleta 2), não ligada (canaleta 3) e ainda contendo as *beads* (canaleta 4). Nessa última canaleta, o eluato + *beads* foram analisados. Foram utilizados os padrões de peso molecular *PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa* (Thermo Fisher Scientific). A membrana de PVDF foi revelada com o equipamento *ImageQuant™ LAS 500* (Cytiva Life Science) na presença do substrato *Pierce™ ECL Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific). Fonte: Elaborado pelo autor.

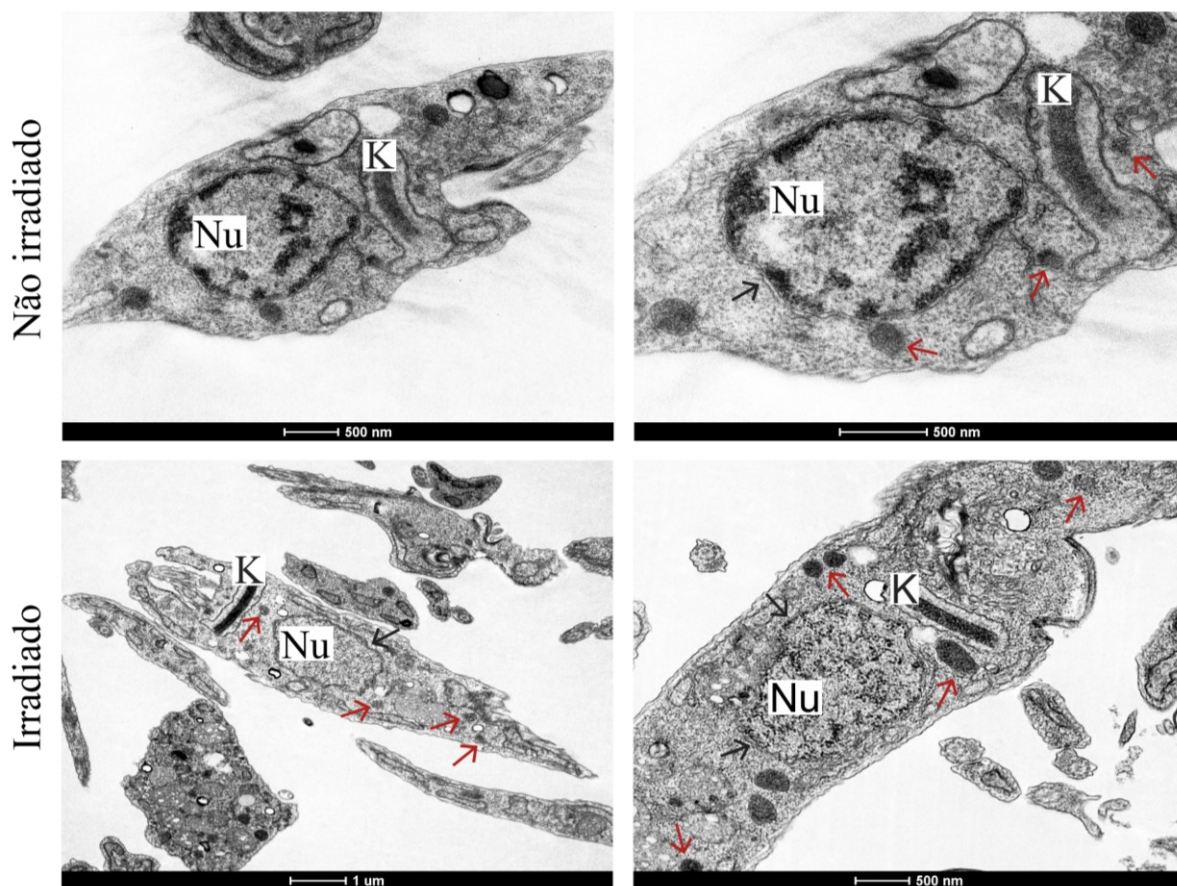
APÊNDICE D — Localização subcelular de rTcRBP42 e dos RNA recém-sintetizados em condições normais e de estresse induzido pela radiação gama



Legenda na próxima página...

Imagens de Microscopia de fluorescência convencional de epimastigotas expressoras de rTcRBP42 e GFP em condições normais de cultivo **(A)** e nos tempos de 24 e 48 h **(B e C)** após exposição a 500 Gy de radiação gama. As proteínas foram detectadas através de suas *tags* de 6x-His pelos anticorpos Anti-His-Tag (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology) e Alexa Fluor® 488 (ab150113, Abcam). Os RNAs recém-sintetizados foram marcados com pulsos de 24 horas do análogo 5-etiniluridina após a indução do estresse. Esses RNAs foram detectados com o *Click-iT™ RNA Alexa Fluor™ 594 Imaging Ki* (Invitrogen™). O DNA nuclear e o kDNA foram corados com *Hoechst 33342* (Invitrogen™). As imagens foram adquiridas na objetiva de imersão em óleo de 63X do microscópio de fluorescência Apotome.2 Zeiss disponível no Centro de Aquisição e Processamento de Imagens do ICB-UFMG (CAPI). Barra de magnificação: 10 µm. Fonte: Retirado de LAET-SOUZA (2019).

APÊNDICE E — Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas WT



As epimastigotas em fase exponencial do crescimento foram expostas a 500 Gy de radiação gama. A irradiação causou o desaparecimento da heterocromatina, mas não o rompimento da membrana nuclear. Esta permaneceu íntegra mesmo após decorridas 24 h do tratamento (setas pretas). As setas vermelhas indicam estruturas granulares desprovidas de membranas. As imagens foram adquiridas com o Microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12—SpiritBiotwin FEI—120 kV disponível no Centro de Microscopia da UFMG. Nu: Núcleo e K: cinetoplasto. Barras de magnificação: 1 µm ou 500 nm. Fonte: Adaptado de LAET-SOUZA (2019).

APÊNDICE F — Artigo científico em preparação

Characterization of the RNA-binding protein 42 from the *Trypanosoma cruzi* reference strain

Running title: RBP42 gene knockout is viable in *Trypanosoma cruzi*.

Daniela de Laet Souza¹, Daniela Ferreira Chame¹, Wesley Roger Rodrigues¹, Helaine Grazielle Santos Vieira², Máisa Mota Antunes³, Pedro Sérgio Corradi da Silva³, Gustavo Batista de Menezes³, Erich Birelli Tahara¹, Andrea Mara Macedo¹, Carlos Renato Machado¹, Glória Regina Franco^{1*}

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ² Garvan Institute of Medical Research, Darlinghurst, NSW, Australia;

³Departamento de Morfologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

*Corresponding author: Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte 30161-970, MG, Brazil. Tel.: +55 31 34092537; fax: +55 31 34092984. E-mail address: gfranco@icb.ufmg.br (Gloria R. Franco).

ABSTRACT

RNA-binding proteins are key elements controlling transcript fate, especially in trypanosomatids which rely mainly on post-transcriptional mechanisms to regulate gene expression. In this work, we characterized for the first time the RNA-binding protein 42 from the *T. cruzi* reference strain (TcRBP42). As for other orthologs, this protein has a modular structure containing two conserved domains, NTF2-like and RRM, interconnected by a long central region predicted to be intrinsically disordered. While TcRBP42 overexpression was well tolerated by *T. cruzi*, knocking out this gene adversely affected epimastigotes morphology. These cultures contain both normal and round-shaped epimastigotes with a shortened flagellum and reduced mobility. Yet, only mild proliferation defects were observed. Furthermore, these epimastigotes aggregate into large complexes and do not present abnormal numbers of nuclei and kinetoplasts. The knockouts' viability first reported by us deviates from the lethal phenotype observed in *Trypanosma brucei*, a closely related species. Concerning protein localization, the detection of a polyhistidine-tagged version of TcRBP42 showed an exclusively cytoplasmic distribution for this protein. Lastly, the data collected using epimastigotes overexpressing or lacking TcRBP42 suggests a role for this protein in the stabilization of transcripts encoding the energy metabolism enzymes Enolase and Citrate synthase.

Keywords: RNA-binding proteins, RBP42, *Trypanosoma cruzi*

INTRODUCTION

Trypanosoma cruzi is the etiological agent of Chagas disease, a neglected tropical illness affecting about 6 million people in the Americas (PAHO, 2023). Together with other species in the trypanosomatidae family, this parasite presents unique characteristics concerning gene expression regulation. The lack of transcriptional control and the organization of functionally unrelated genes into long polycistronic units transfer almost all gene expression regulation to the post-transcriptional level (CLAYTON, 2019; EL-SAYED *et al.*, 2005; KRAMER, 2012). RNA-binding proteins (RBPs) are essential players in this kind of regulation. These proteins arrange their mRNA targets into functional groups that are co-regulated, a phenomenon termed RNA regulon. The combinatorial control exerted by different RBPs determines transcript maturation, localization, translation, and decay (KEENE, 2007; QUEIROZ *et al.*, 2009).

Numerous RBPs containing typical RNA-binding domains were identified in the *T. cruzi* genome (TAVARES *et al.*, 2020). However, a relatively small number of these proteins were characterized in this organism (ROMAGNOLI *et al.*, 2020). According to the essential roles played by RBPs, the removal of a single protein can dramatically impact gene expression, resulting in alterations in morphology, culture growth, and differentiation (ROMAGNOLI *et al.*, 2020; ROMANIUK; FRASCH; CASSOLA, 2018; TAVARES *et al.*, 2020). In this work, we characterize the RNA-binding protein 42 (TcRBP42) from the *T. cruzi* reference strain, the CL Brener clone. In addition to computational analysis, we studied protein function by overexpressing or knocking out its coding genes. The RBP42 protein was first investigated in *Trypanosoma brucei*. In this species, this is an essential RBP associated with the translational control of energy metabolism transcripts (DAS *et al.*, 2012; DAS *et al.*, 2021). To date, RBP42 has only been studied once in the *T. cruzi* Y strain. These authors showed this protein is expressed in the cytoplasm of all the main life cycle stages (WEISBARTH *et al.*, 2018).

Our experiments identified two coding genes for TcRBP42 in the most recent CL Brener genome. This protein contains two conserved domains, NTF2-like and RRM, interconnected by a long and unstructured region. This modular organization is also shared with other RBP42 orthologs (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018). Although difficult to obtain, the TcRBP42 gene knockouts are viable, causing the appearance of round-shaped epimastigotes with a shortened flagellum, reduced mobility, and mild defects in proliferation. Metacyclogenesis problems were not observed. Real-time PCR data suggested a role for TcRBP42 in target transcript stabilization. This work was the first to generate and

characterize *T. cruzi* RBP42 knockout parasites, thus expanding the current RBP literature for the species.

RESULTS AND DISCUSSION

T. cruzi RBP42 computational analysis

In the most recent Cl Brener strain genome, TcRBP42 is coded by a single-copy gene with one allele per haplotype. Thus far, all RBPs are coded by one to two alleles in *T. cruzi* (TAVARES *et al.*, 2020). The division into Esmeraldo-like and Non-Esmeraldo-like haplotypes has been adopted to reflect this strain's hybrid nature since the first published genome (EL-SAYED *et al.*, 2005). Both TcRBP42 alleles are highly similar in sequence, diverging only in a few amino acids (**Supplementary Figure 2A**). These sequences contain two conserved domains, NTF2-like and RRM, interconnected by a long central region predicted to be intrinsically disordered. In this region, there are three proline-rich motifs (PxxP). A second unstructured region is present only on the RBP42 from *T. cruzi*. All RBP42 orthologs present basically the same structure, with length variations in the central link (**Figure 1A**) (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018). Probably, that region faced smaller functional restrictions during protein evolution (KONATÉ *et al.*, 2019). Kinetoplastid RBP42 amino acid sequences are conserved mainly at the domain regions (**Supplementary Figure 2B**), allowing them to be used to reconstruct the accepted group phylogenetic relationships (**Figure 1C**) (LUKEŠ *et al.*, 2014).

Experimental structures are not available for TcRBP42. As an alternative, we consulted the 3D structure constructed by AlphaFold (JUMPER *et al.*, 2021; VARADI *et al.*, 2021). In this model, both TcRBP42 domains were predicted with elevated confidence levels and presented similar topologies to the NTF2-like and RRM domains determined for G3BP1 and TcUBP1, respectively (**Figure 1B**) (VOGENSEN; MØLLER; KRISTENSEN, 2013; VOLPON *et al.*, 2005). RBP42 orthologs share basically the same protein organization as the human G3BP1 protein, except for an acid region and a RGG domain (YANG *et al.*, 2020). The roles played individually by each RBP42 region remain unknown, but some information may be borrowed from G3BP1. In this protein, the NTF2-like domain mediates protein dimerization and interaction with USP10 and Caprin-1. In addition, the RRM domain is responsible for RNA binding. The intrinsically disordered regions control the G3BP1 phase transition in response to cellular stress. In normal conditions, the acid region interacts with the positively charged RGG

repeats to keep G3BP1 inhibited (MATSUKI et al., 2013; YANG et al., 2020). The RBP42 RRM lacks one of the RNP motifs, suggesting that accessory regions are necessary for RNA recognition (**Supplementary Figure 2A and B**). In the presence of a RRM, a NTF2-like domain may contribute to RNA interaction, as observed for the Mex67:Mtr2 RNA exportation complex (AIBARA et al., 2015).

T. cruzi RBP42 gene overexpression and knockout phenotypic effects

To functionally study TcRBP42, we genetically manipulated *T. cruzi*. To generate knockout epimastigotes, we electroporated them with SaCas9 ribonucleoprotein complexes. Although relatively less efficient than other systems in trypanosomatids, this strategy contributes to fewer off-target events by limiting the Cas9 action time over the genome (BURLE-CALDAS et al., 2015; SOARES-MEDEIROS et al., 2017). In our working strategy (**Figure 2A**), both TcRBP42 sequences were interrupted with stop codons and a 72-nucleotide deletion at the beginning of the coding region, which rendered this approach selection-free. The lack of antibiotic markers allows for smaller genome modifications and faster protocol execution (SOARES-MEDEIROS et al., 2017). Parasite knockouts were only obtained after subjecting a Hemi-knockout clone to a second round of gene editing. Clone genotyping and Sanger sequencing are shown in **Supplementary Figure 3A and B**, respectively. To ensure the absence of wild-type TcRBP42 transcripts in knockout epimastigotes, real-time PCR experiments were performed (**Figure 2B**). The same technique revealed the expression of the M13-tagged genes (**Figure 2C**), which reinforces the importance of implementing backup elements to guarantee gene truncation. In our construction, several extra stop codons are generated by a short gene deletion and the insertion of an M13 tag and restriction sites. Hemi-knockouts express both normal and tagged TcRBP42 transcripts (**Supplementary Figure 4A and B**).

The phenotypic characterization of CRISPR/Cas9-edited epimastigotes demonstrated that knocking out TcRBP42 causes mild proliferation defects only in later growth phases (**Figure 2G**). This viability in culture deviates from the lethal phenotype observed in *T. brucei* just a few days after induction of a RBP42 gene knockdown (DAS et al., 2012). Morphological alterations are evident in *T. cruzi* knockout cultures that contain both normal and rounded-shaped epimastigotes with a shortened flagellum and reduced mobility (**Supplementary Video 1**). In contrast to *T. brucei*, altered parasites do not present cytokinesis problems associated with abnormal numbers of nuclei and kinetoplasts (**Figure 3B**) (DAS et al., 2012). The round-shaped

parasites also aggregate into complexes, in which individual epimastigotes limits are preserved during the exponential growth phase (**Supplementary Video 1**). This points to a dysregulation of surface protein genes controlling the parasite adhesion function (PECH-CANUL; MONTEÓN; SOLÍS-OVIEDO, 2017). Taking together, the contrasting results between *T. cruzi* and *T. brucei*, especially related to the former's knockout viability, may be caused by differences in orthologous protein function or the redundancy of TcRBP42 with other RBPs. While both species present distinct life cycles, a higher number of RBPs are present on *T. cruzi* (KRAMER, 2012; LUEONG et al., 2016; TAVARES et al., 2020). Concerning Hemi-knockouts, only half of the normal TcRBP42 transcript expression is sufficient to maintain normal growth and parasite morphology (**Supplementary Figure 4 A, C and D**), besides the typical motility in culture (**Supplementary Video 1**).

By employing plasmid expression vectors, we successfully produced epimastigotes expressing 6x-His-tagged versions of TcRBP42 and GFP (**Supplementary Figure 1**). Exogenous protein expression was confirmed by Western blot (**Figure 2D**). However, total TcRBP42 protein levels could not be determined due to the unavailability of an antibody against the native protein. To circumvent this difficulty, gene transcript levels were used as a proxy for total protein expression. Overexpressing clones contain similarly higher TcRBP42 transcript levels in comparison to controls (**Figure 2E**). Normal TcRBP42 expression levels in GFP epimastigotes indicate the specificity of the genetic modification. Regarding parasite growth, the constitutive expression of recombinant TcRBP42 (rTcRBP42) and GFP proteins did not adversely affect culture proliferation (**Figure 2F**). This result agrees with previous data reporting the high tolerance of *T. cruzi* to gene overexpression even when they encode RBPs (CHAME et al., 2020; MANTILLA et al., 2021; TAVARES et al., 2020). Because no significant differences were detected between the two TcRBP42 overexpressing clones, only the clone one was further characterized. rTcRBP42 protein localization was documented by detecting its polyhistidine tag. In normal culturing conditions, this protein is distributed throughout the whole epimastigotes cytoplasm (**Figure 3A**). A 3D reconstruction using a Z-stacking series confirms this localization and the absence of this protein in the nucleus (**Supplementary Video 2**). Yet, it does exclude the possibility of protein translocation to this cellular compartment in response to some stimulus. This was documented for another RBP named DRBD3 that happens to integrate the RBP42 interactome in *Leishmania braziliensis*. The exposure to sodium arsenite induces a partial nuclear relocalization for this protein (FERNÁNDEZ-MOYA et al., 2012; NOCUA; REQUENA; PUERTA, 2021). A cytoplasmic

localization was also detected for orthogous TcRBP42 proteins (DAS *et al.*, 2012; NOCUA *et al.*, 2017; WEISBARTH *et al.*, 2018). Concerning GFP, this protein was detected distributed in both the cytoplasm and nucleus, indicating that the rTcRBP42 localization does not result from the expression system used (**Figure 3A and Supplementary Video 3**). Additionally, autofluorescence or antibody-unspecific binding is below the detection threshold standardized for image acquisition (**Supplementary Figure 5**).

Gene expression studies and in vitro metacyclogenesis

To study the effects of TcRBP42 knockout or overexpression on gene expression on a small scale, we tested four genes associated with energy metabolism. These gene transcripts are bound by RBP42 in *T. brucei* and participate in key metabolic pathways such as glycolysis, the citric acid cycle, and the proline metabolism (DAS *et al.*, 2012). For Enolase and Citrate synthase, significantly smaller transcript levels were detected in knockout epimastigotes. In contrast, the same transcripts are present in greater abundance in the Overexpressor clone (**Figure 4A**). Together, these results point to a TcRBP42 role in transcript stabilization. The same effect was observed for the Proline dehydrogenase transcripts, but only when TcRBP42 is overexpressed (**Figure 4A**). Higher levels of TcRBP42 proteins could occur during nutritional stress. In that sense, increased transcript levels were measured for TcRBP42 and Proline dehydrogenase in both WT and Overexpressor parasites subjected to nutritional deprivation during the metacyclogenesis protocol (**Figure 4C**) (SHAW; KALEM; ZIMMER, 2016). Regarding Succinate dehydrogenase transcripts, the similar levels measured in all epimastigotes lines assayed suggest that TcRBP42 may not regulate their expression. Globally, our small gene sample already indicates that RBP42 orthologs do not share all their targets or the exact mechanism of transcript regulation. On that account, the *T. brucei* RBP42 protein was associated with transcript translation efficiency (DAS *et al.*, 2021).

Two pieces of evidence also prompted us to assay parasite metacyclogenesis. First, the TcRBP42 transcripts were reported to be differentially regulated according to the life cycle stage (TAVARES *et al.*, 2020) and second, elevated Proline dehydrogenase transcript levels were detected in TcRBP42 overexpressing parasites (**Figure 4A**). Experimentally, *T. cruzi* metacyclogenesis rates can be increased by overexpressing this enzyme (MANTILLA *et al.*, 2021). Even though we did not quantify protein abundance, previous work reported a good correlation between transcript and protein quantities (PAES *et al.*, 2013). Culture differentiation was induced as described by SHAW; KALEM ; ZIMMER (2016) and quantified by measuring

abundance increases for the edited Cytochrome B transcript (CyB-e). As expected, all epimastigotes cultures have greater CyB-e levels. However, no significant differences were detected among them (**Figure 4B**). Normal Knockout differentiation rates suggest TcRBP42 as a non-essential factor for parasite differentiation, at least in our test conditions. In accordance with the data presented by MANTILLA *et al.* (2021), increased Proline dehydrogenase transcript levels were observed in response to the differentiation protocol (**Figure 4C**). Again, the TcRBP42 protein appears to stabilize these transcripts more efficiently only when artificially overexpressed. Proline dehydrogenase catalyzes the first enzymatic reaction in the proline catabolism, an amino acid accumulated in epimastigotes transitioning from the exponential to the stationary growth phase (BARISÓN *et al.*, 2017; PAES *et al.*, 2013). The nutritional stress occurring during this phase is a vital stimulus for parasite metacyclogenesis (GONÇALVES *et al.*, 2018). Moreover, proline is a readily available energy source present in large amounts in the insect vector, even during extended starvation periods between blood meals (MICHAEL BARRETT; FRIEND, 1975).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

RBP42 computational analysis

Gene sequences for TcRBP42 were retrieved from the most recent genome available for the *T. cruzi* Cl Brener strain. It was produced by Professor Daniella Castanheira Bartholomeu and her research group from the Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brazil (unpublished data). Other kinetoplastid RBP42 amino acid sequences came from the TriTrypDB Kinetoplastid Genomics Resource database (ASLETT *et al.*, 2010) and WEISBARTH *et al.* (2018). Sequences were aligned with MAFFT version 7 (FFT-NS-i strategy) (KATO; STANDLEY, 2013) and used by WebLogo version 2.8.2 (CROOKS *et al.*, 2004) to generate sequence logos. Conserved domains and motifs were identified both manually and with InterProScan (JONES *et al.*, 2014). RaptorX-Property and DISOPRED3 predicted residue's disorder (BUCHAN *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2016). TcRBP42 3D structures were generated by AlphaFold (JUMPER *et al.*, 2021; VARADI *et al.*, 2021).

Phylogenetic relationships were inferred with the Bayesian method using MrBayes version 3.2.6 implemented at the CIPRES Science Gateway version 3 (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010; RONQUIST *et al.*, 2012). The best-fit model of evolution was determined by ProtTest version 3.4.2 (DARRIBA *et al.*, 2011) using the Bayesian information criterion. It

was used the Jones-Taylor-Thornton amino acid substitution matrix (JTT) (JONES; TAYLOR; THORNTON, 1992), discrete gamma-distributed substitution rate among sites (+G) (YANG, 1996) and data-estimated empirical amino acid frequencies (+F). The probability distribution on branch lengths was calculated under the uniform strict clock model. Three heated and one cold MCMC chains (Markov chain Monte Carlo) were computed simultaneously. Four independent repeats were run for four million generations, sampling every 500. Convergence was assessed using Tracer version 1.7 (<http://beast.community/tracer>) and 25% of sampled trees on each run were discarded as burn-in before Bayesian posterior probabilities' calculation. iTOL version 3 was used to visualize and annotate the 50% majority rule consensus tree obtained (LETUNIC; BORK, 2016).

Parasite growth and in vitro metacyclogenesis

T. cruzi Cl Brener epimastigotes were subcultured weekly and cultivated at 28 °C in filter-sterilized LIT medium (CAMARGO, 1964), supplemented with penicillin (100 units mL⁻¹) / streptomycin sulfate (100 µg mL⁻¹) (Gibco™) and 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (Gibco™). G418 sulfate (Gibco™) was also added to neomycin-resistant epimastigotes. To evaluate parasite growth, three independent experiments with technical replicates were carried out. Cultures were counted daily with erythrosine vital staining in Neubauer chambers. Results were analyzed with one-way ANOVA and reported as growth curves. Values were shown as mean ± SD. In vitro metacyclogenesis was induced as described previously (SHAW; KALEM; ZIMMER, 2016). Briefly, epimastigotes were transferred to RPMI without FBS and incubated undisturbed for 8 days. Top culture fractions enriched in metacyclic trypomastigotes were collected, and culture differentiation was accessed by the relative expression of the edited Cytochrome B transcript (sequence available in **Supplementary Table 1**).

T. cruzi genetic manipulation

Variations of the pROCKGFP_Neo plasmid (DAROCHA *et al.*, 2004) were constructed to express constitutive-tagged versions of TcRBP42 and GFP in epimastigotes. Initially, a 173-bp DNA fragment was synthesized to contain a streptavidin-binding peptide (SBP) and a polyhistidine-tag (6x-His) plus restriction sites: flanking 5' NheI and 3' SalI, and internal XbaI and XhoI (Epoch Life Science). Fragment digestion with NheI and SalI restriction enzymes generated compatible cohesive ends for cloning into pROCKGFP_Neo XbaI and XhoI sites, creating the pRock_SPB/6x-His vector. Subsequently, PCR-amplified TcRBP42

(TcCLB.509167.140) (genomic DNA) and GFP (pROCKGFP_Neo) genes were cloned into the newly inserted XbaI and Xho sites, generating the vectors pRock_SPB/6x-His_RBP42 and pRock_SPB/6x-His_GFP. A pROCKGFP_Neo map and cloning scheme are depicted in **Supplementary Figure 1**. All vectors constructed were confirmed by Sanger sequencing. Exponentially growing epimastigotes were electroporated with 10 µg of linearized vectors using the Amaxa Nucleofector Electroporator (Lonza Cologne AG) as described previously (BURKARD; JUTZI; RODITI, 2011). Electroporated epimastigotes were selected with 200 mg mL⁻¹ of G418 sulfate (Gibco™) and cloned by serial dilution.

For knocking out the TcRBP42 coding genes, epimastigotes were electroporated with the *Staphylococcus aureus* Cas9 protein already complexed with two in vitro transcribed single-guide RNAs (BURLE-CALDAS *et al.*, 2018). Briefly, two guide sequences near the start codon were PCR-inserted into the complete Cas9 RNA scaffold. In vitro transcription reactions were carried out with MEGAshortscript™ T7 Transcription Kit (Invitrogen™). To guide DNA homology repair, a single-stranded oligonucleotide protected by two phosphorothioate bonds at both 5' and 3' ends was provided. This DNA donor was designed to insert three stop codons in all three open read frames, an M13 tag, XbaI and EcoRI restriction sites, and a 72-nucleotide deletion. Epimastigotes were electroporated and cloned as described earlier. The clones were PCR genotyped and confirmed by Sanger sequencing. To obtain parasite knockouts, a hemi-knockout clone was subjected to a second round of gene editing. All primers used for genetic manipulation are described in **Supplementary Table 1**.

Western blot analysis

Epimastigotes were harvested by centrifugation, PBS washed, and lysed with Laemmli sample buffer in the presence of Halt™ Protease Inhibitor Cocktail, EDTA-free (Thermo Fisher Scientific). Total protein extracts were sonicated and quantified with the Qubit™ Protein Broad Range (BR) Assay (Invitrogen™). After boiling, 30 µg of total proteins were fractionated by SDS-PAGE in a 12% polyacrylamide gel. Proteins were transferred into a polyvinylidene fluoride membrane, followed by a two-hour blocking in TBST (Tris-buffered saline plus 0.1% Tween 20) supplemented with 5% skim milk. The blocked membrane was incubated overnight at 4 °C with a His-Tag antibody (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:1000 in TBST supplemented with 3% BSA. The membrane was washed three times in TBST and incubated for 1.5 hours at room temperature with anti-mouse IgG conjugated with horseradish peroxidase (Amersham™ ECL™, GE Healthcare Life Sciences). The secondary antibody was diluted

1:5000 in TBST supplemented with 5% skim milk. The membrane was rinsed, developed with Pierce™ ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher Scientific), and photographed with ImageQuant LAS 4000 (Cytiva Life Science). After boiling for 5 minutes in ultrapure water, the membrane was reprobed with anti-mouse α -tubulin (Sigma) diluted 1:5000 in TBST supplemented with 5% skim milk.

Real-time PCR

Total RNA was isolated from exponentially growing or differentiating epimastigote cultures by combining the TRIzol reagent (Thermo Fisher Scientific) with silica column purification. RNA samples were treated with TURBO™ DNase (Thermo Fisher Scientific) and quantified with Qubit™ RNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). After checking total RNA quality in 2% agarose gels, 2 μ g were reverse transcribed with GoScript™ Reverse Transcription System (Promega). PCR reactions were carried out in a 10 μ l total volume using primer sets with efficiencies higher than 90% and the Master Mix qPCR Green Master HighROX with UNG 2X (Cellco Biotec). The CFX96™ Real-Time System (Biorad) and UltraCruz® 96-well PCR plates were used (Santa Cruz Biotechnology). Relative quantification was normalized using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 9.4.0 software for Windows (www.graphpad.com). The unpaired t-test or one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test was used. All primer sequences and target genes are listed in **Supplementary Table 1**.

Conventional and confocal fluorescence microscopy

Confocal fluorescence microscopy was used to study both epimastigote morphology and TcRBP42 protein localization. Parasites were fixed overnight in a 4% formaldehyde solution in PBS. After adherence on poly-L-lysine-coated slides for 30 minutes, parasites were simultaneously blocked and permeabilized for an hour with 2% BSA and 0.5% Triton X-100 in PBS. Samples were incubated overnight at 4 °C with a His-Tag antibody (AD1.1.10, Santa Cruz Biotechnology) diluted 1:80 in PBS containing 2% BSA. After rinsing, parasites were blocked for 30 minutes with 10% goat serum, followed by staining with Alexa Fluor® 488 (ab150113, Abcam) for 1.5 hours. The secondary antibody was diluted 1:600 in PBS supplemented with 5% normal goat serum (Thermo Fisher Scientific). Cell membranes were colored for 10 minutes with a 1:1000 dilution of CellMask™ Plasma Membrane Stain (deep

red) (Thermo Fisher Scientific). Genomic and Kinetoplast DNA were stained for 10 minutes with a 1:10 dilution of DAPI (Sigma). Slides were mounted with ProLong® Diamond Antifade Mountant (Thermo Fisher Scientific), and images were acquired with a Nikon Eclipse Ti confocal microscope (100x oil immersion objective) located at the Center for Gastrointestinal Biology (UFMG). Z-stack images (12 optical sections at 11 μm intervals) were collected and used to produce 3D videos with Volocity® version 6.3 software. Parasite mobility was recorded through the eyepiece of a conventional microscope equipped with a 40x objective.

FIGURES

Figure 1 — Sequence and structure characteristics of the *T. cruzi* RBP42 protein

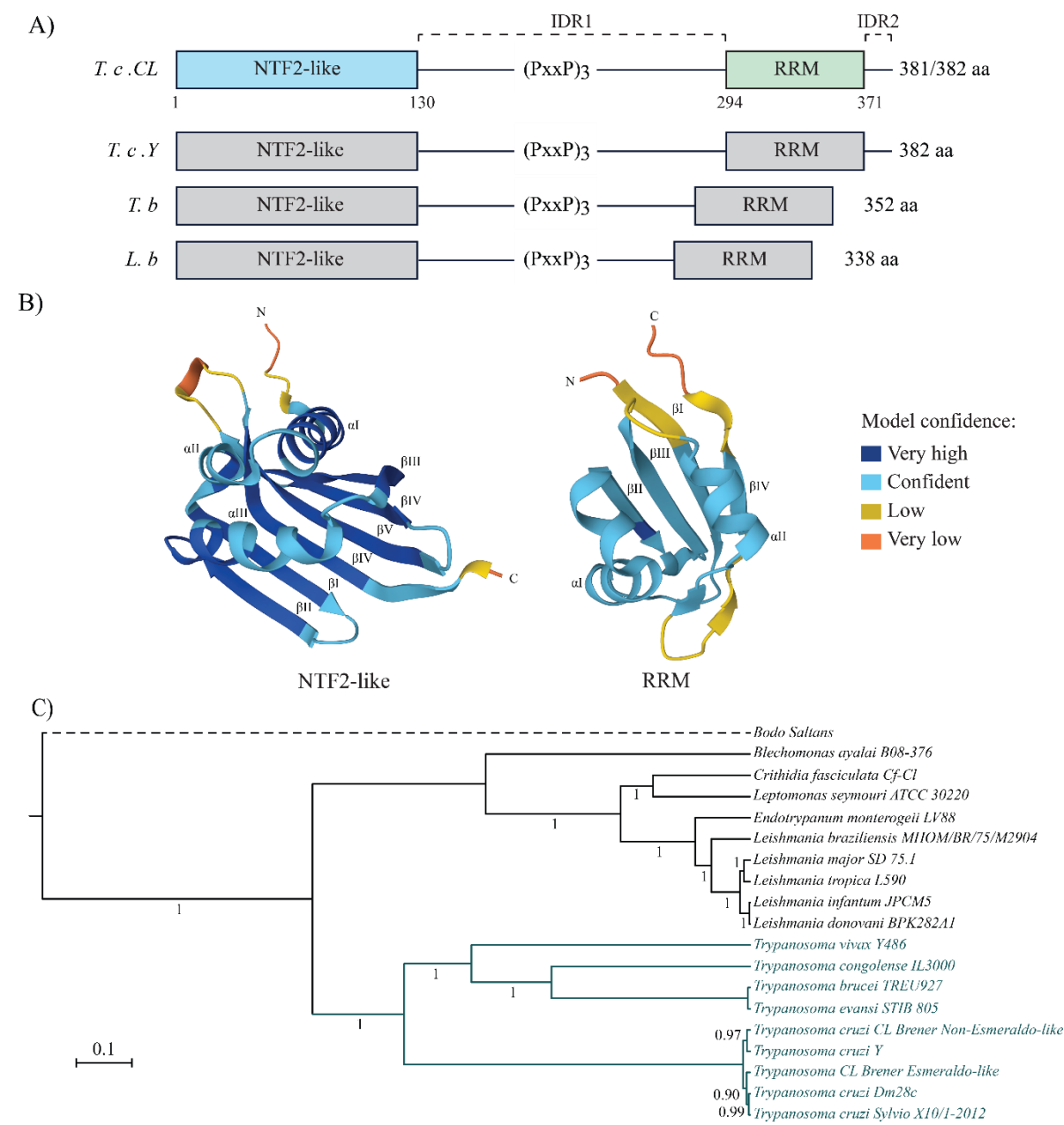


Figure 2 — *T. cruzi* epimastigotes genetic manipulation

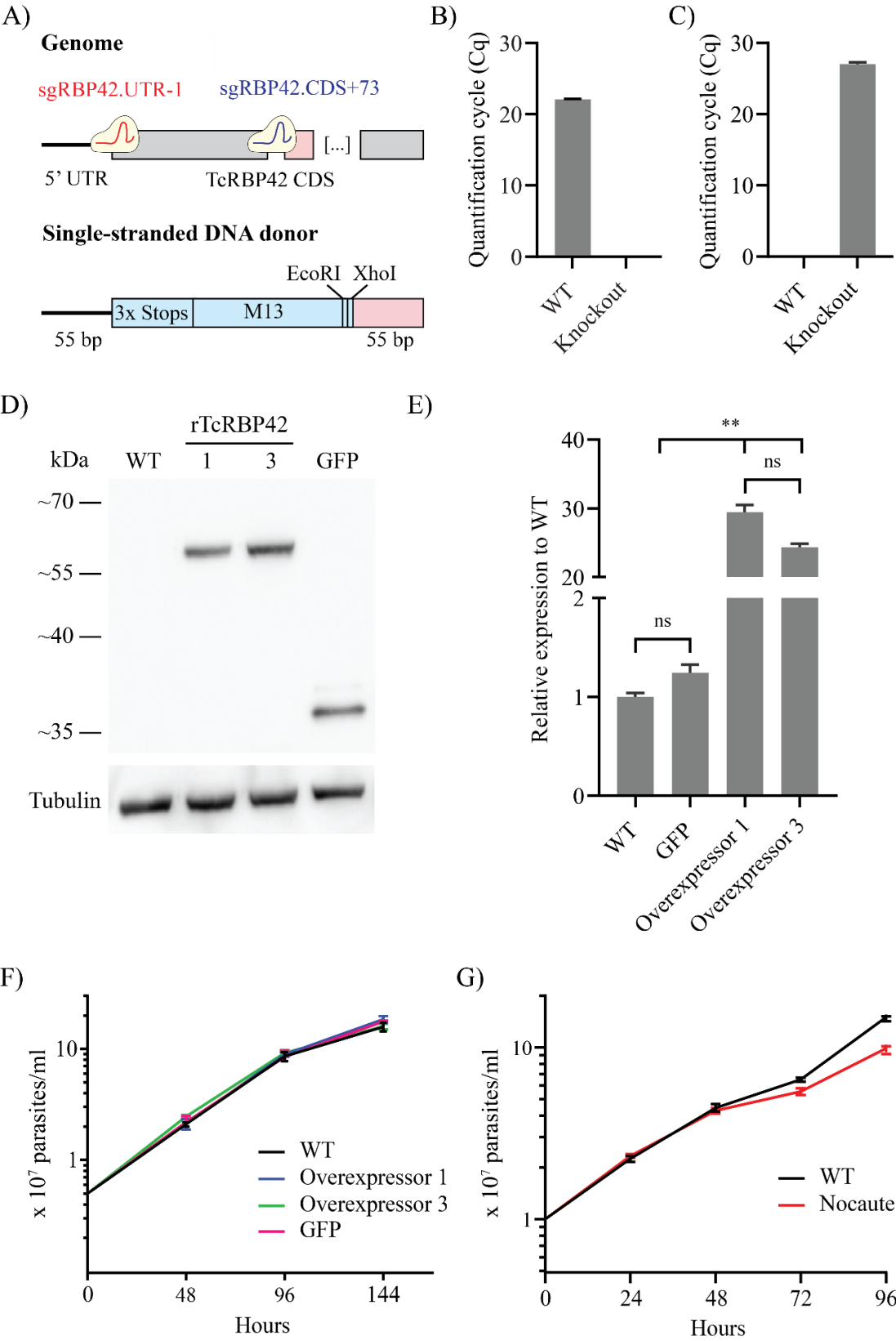


Figure 3 — Protein subcellular localization and epimastigotes morphology

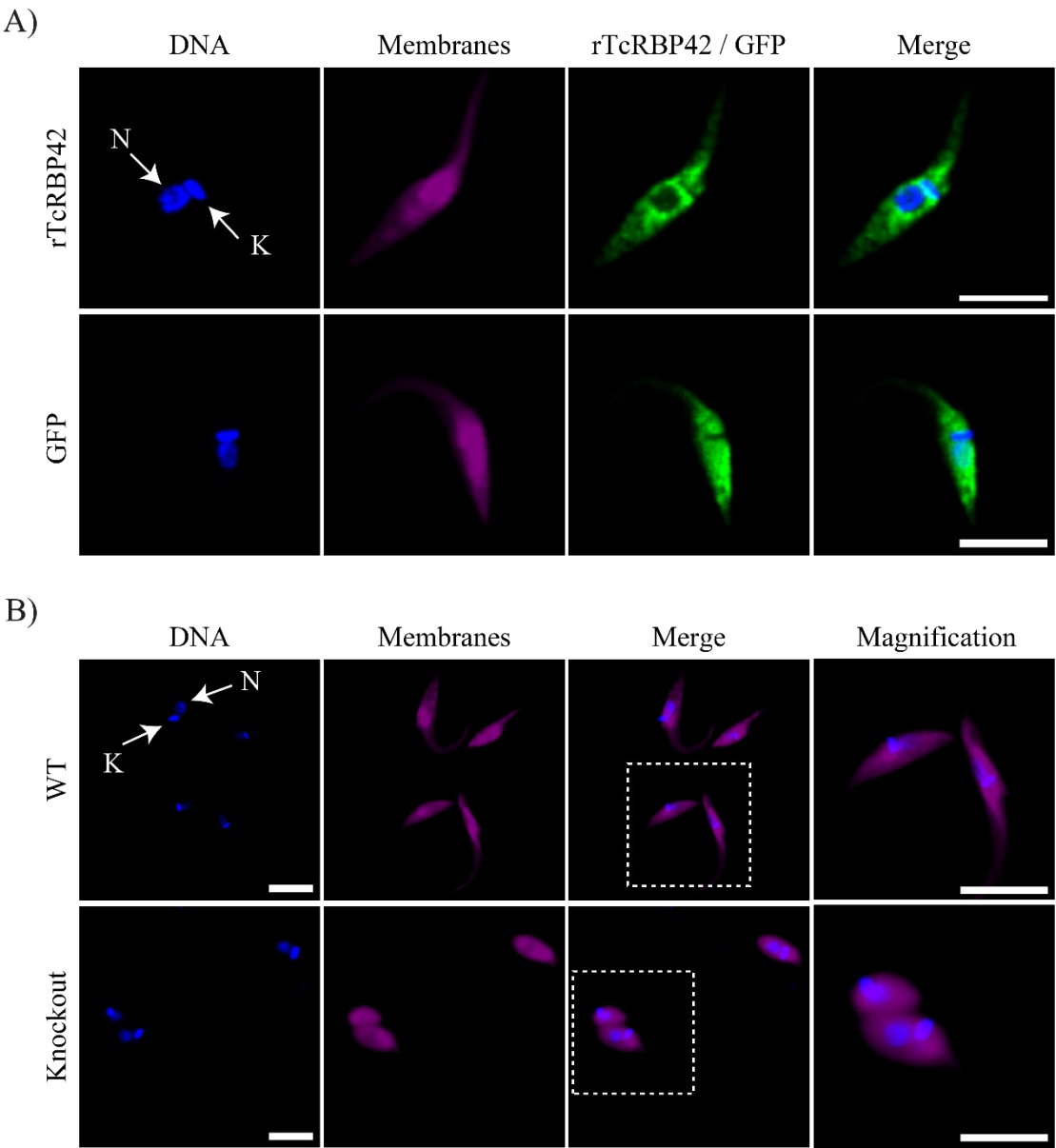
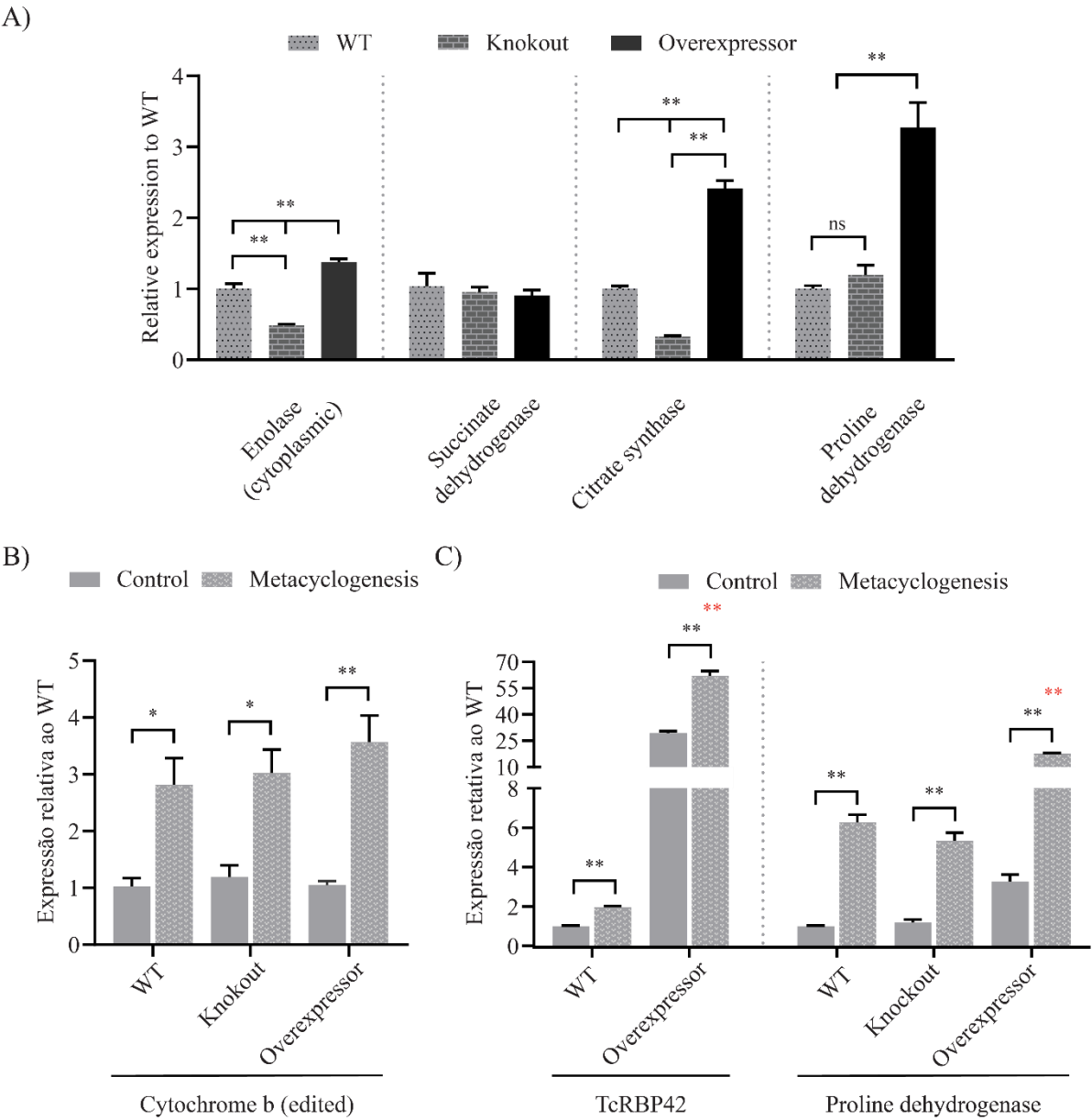
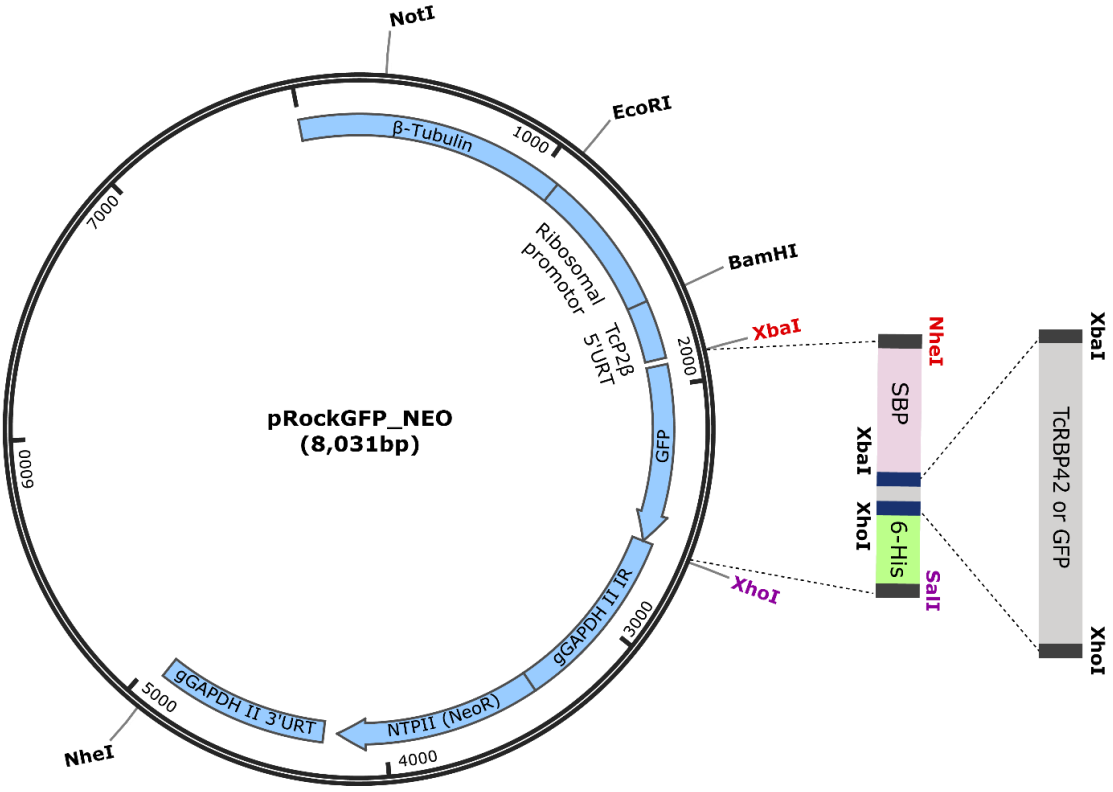


Figure 4 — Gene expression evaluation in normal conditions and after metacyclogenesis induction.



Supplementary Figure 1 — pRock_SPB/6x-His RBP42 or GFP vector construction scheme

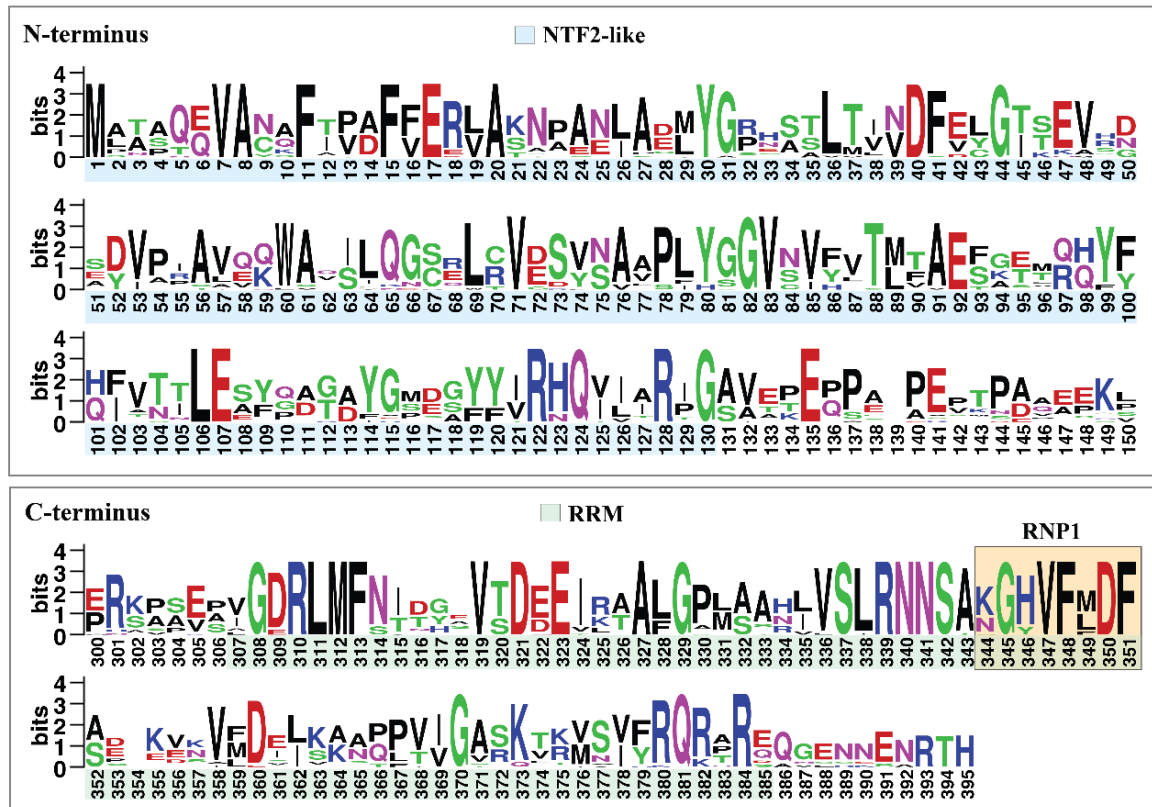


Supplementary Figure 2 — RBP42 amino acid sequence alignments

A)

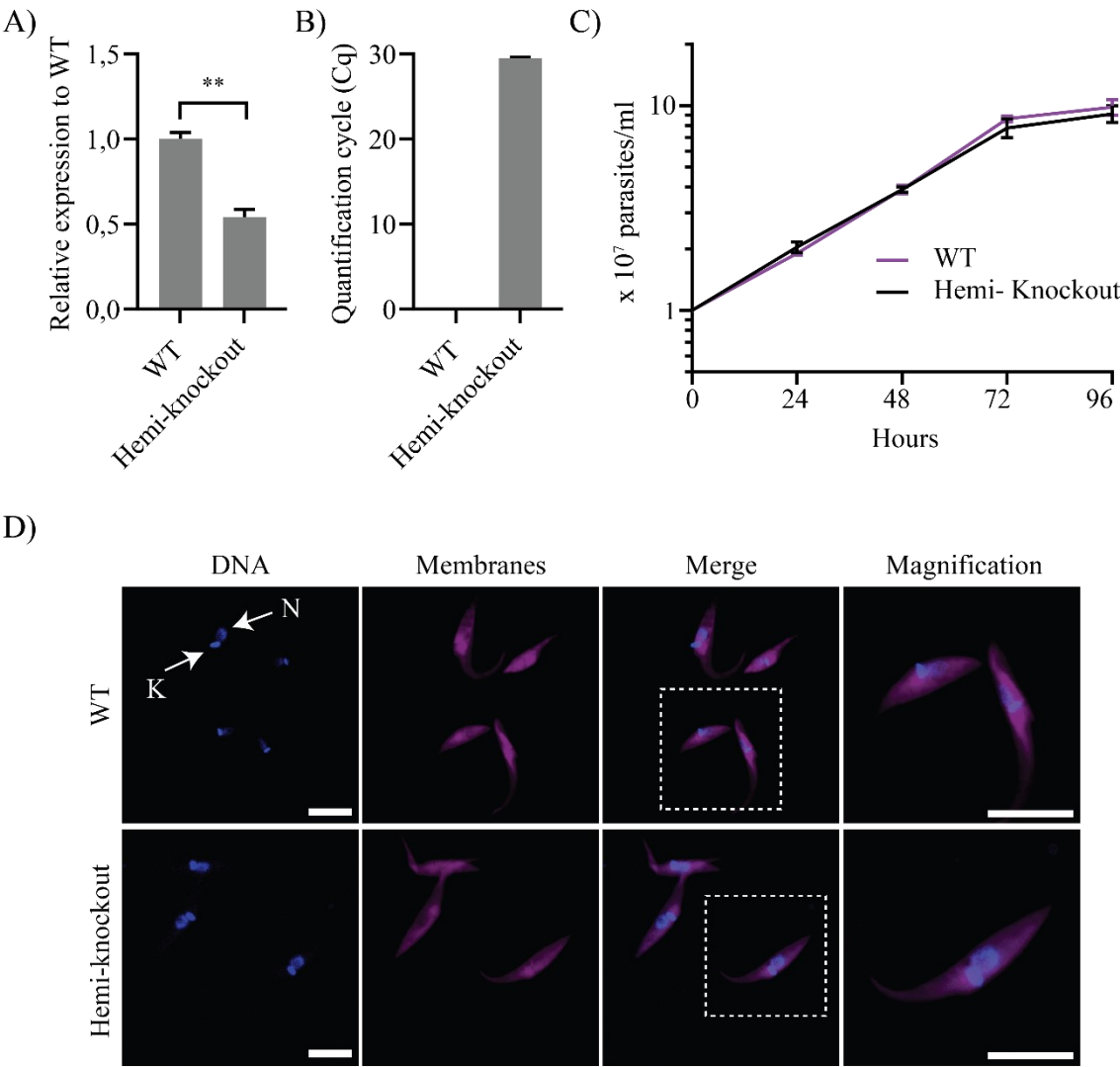
<i>T.c_E</i>	MLTSQEVACQFI PAFFERLASNP AELAEMYGPNSSLTIVDFVYGTTEV	48
<i>T.c_NE</i>	MLTSQEVACQFI PAFFERLASNP AELAEMYGPNSSLTIVDFVYGTTEV	48
<i>T.c_E</i>	RNEDVPRAVEQWAQILQGCELCVESYS AVPLYGGVSVYVTMF AESKTT	96
<i>T.c_NE</i>	RNEDVPRAVEQWAQILQGCELCVESYS AVPLYGGVSVYVTMF AESKTT	96
<i>T.c_E</i>	RHYFQFVNILEAYGAGAYGSEAYFIRHQILIRPGSAETE QPEPEVTPD	144
<i>T.c_NE</i>	RHYFQFVNILEAYGAGAYGSEAYFIRHQILIRPGSAETE QPEPEVMPD	144
<i>T.c_E</i>	QEPKLEVSPEAVESSALLTSRSA TDEERKEQQQKKNTT -VVGLQAAA	191
<i>T.c_NE</i>	QEPKLGVSPEAVESSALLTSRSA ADEERKEQQQKKNTT TVVGLQAAA	192
<i>T.c_E</i>	AAAAPDKTAAVEPETAAATVQRQQPPVP SKPKTWA SLASAQPKGEQRQP	239
<i>T.c_NE</i>	AAATPDKTAAVEPETAAATVQRQQPPVP SKPKTWA SLASAQPKGEQRQP	240
<i>T.c_E</i>	LRV IIPENG VNADATEVHAPAKPTQT EQRHTSSSAGGAGATKPPAKFP	287
<i>T.c_NE</i>	LRV IIPENG GNADATEVHAPAKPTQT EQRHTSSSAGGAGATKPPAKFP	288
<i>T.c_E</i>	RSPAVS IGDRLMFNIDYEVSDEEIK AAFGPLAANI VSLRNNSA NGHV	335
<i>T.c_NE</i>	RSPAVS IGDRLMFNIDYEVSDEEIK TAFGPLAANI VSLRNNSA NGHV	336
<i>T.c_E</i>	LDFSDKEKVMD I IKANPPTVGARKTRVSIYRQRT RQ QGENNENRTH	381
<i>T.c_NE</i>	LDFSDKEKVMD I IKANPPTVGARKTRVSIYRQRT RQ QGENNENRTH	382

B)

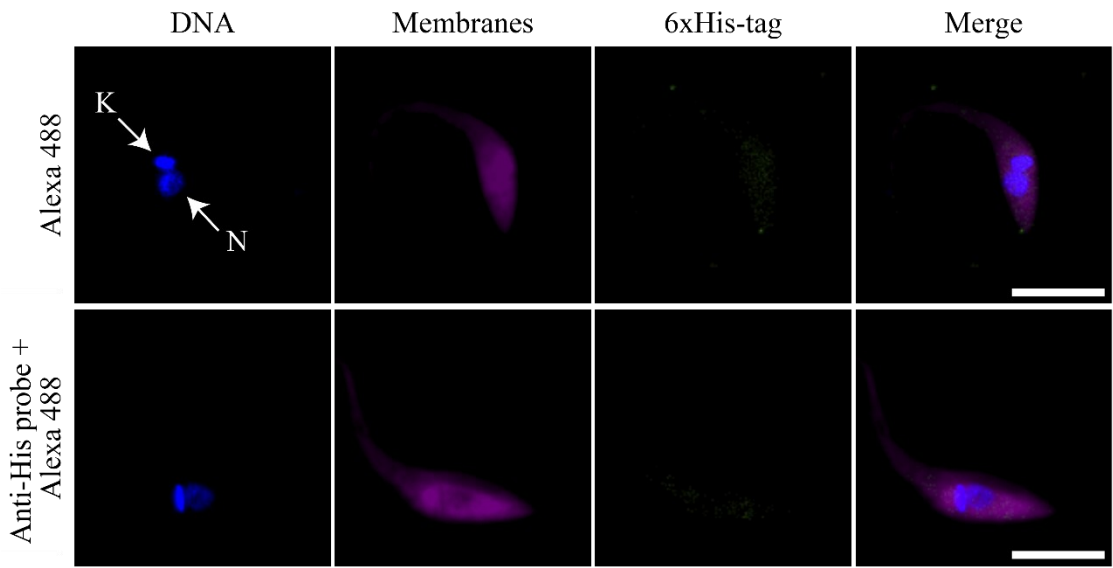


Supplementary Figure 3 — Genotyping and Sanger sequencing confirmation for *T. cruzi* clones edited with the CRISPR/Cas9 technology

Supplementary Figure 4 — Phenotypic characterization of TcRBP42 Hemi-knockout epimastigotes



Supplementary Figure 5 — Autofluorescence and unspecific staining testing for Confocal fluorescence microscopy



Supplementary Table 1 — Oligonucleotide sequences used for *Trypanosoma cruzi* genetic manipulation and Real-time PCR

Name	Sequence	Application
XbaI-TcRBP42-F	ATGCTCTAGAGATGCTAACGTCTCAAGAGGT	TcRBP42 gene amplification for cloning into the pRock_SPB/6x-His expression vector.
XhoI-TcRBP42-R	TTCGCTCGAGGTGAGTCCTATTTTCGTTGTTCTC	
XbaI-GFP-F	CTGCTCTAGATATGAGTAAAGGAGAA	GFP gene amplification for cloning into the pRock_SPB/6x-His expression vector.
XhoI-GFP-R	ATCGCTCGAGTTTGTATAGTTCATCCA	
Seq-F	TGTGGATGCCAAGTCTGTGC	Plasmid Sanger sequencing.
Seq-R	TCCTTCGGCAGGTTGTTCTG	
SBP-F	GCCAGAGAGAGCCCGATCTA	Combined with XhoI-TcRBP42-R and XhoI-GFP-R for colony PCR. Annealing to the Streptavidin-binding peptide (SBP)
SaCas9-sgRBP42. UTR-1-F	AAGCTAATACGACTCACTATAGGTCTTGAGACGTT AGCATGACTGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATC	Insertion of the guide sequence into the complete <i>Staphylococcus aureus</i> Cas9 RNA scaffold and template production for in vitro transcription.
SaCas9-scaffold-R	AAAAAAATCTCGCCAACAAGTTGAC	
SaCas9-sgRBP42. CDS+73-F	AAGCTAATACGACTCACTATAGGGCGTACATTTCC GCGAGCTCCGGTTTTAGTACTCTGGAAACAGAATC	Combined with SaCas9-scaffold-R for insertion of the guide sequence into the complete <i>S. aureus</i> Cas9 RNA scaffold and template production for in vitro transcription.
ssORBP42-3xStop	T*G*TAGGTACGCTAATCTCCTCGCCAAGCAACAAC CCGAAGTCATGTAGATAGATAGTGTAACGACGG CCAGTGAATTCCTCGAGAGCTCGCGGAAATGTACG GCCCCGAAGTCGTCTTAACAATCGT*A*G	Single-stranded DNA donor protected by phosphorothioate bonds (*).

RBP42/ATG-F	ATGCTAACGTCTCAAGAGGTTG	<i>T. cruzi</i> clone genotyping after CRISPR/Cas9 gene editing. Amplification of the wild-type TcRBP42 coding sequence.
RBP42/STOP-R	TCAGTGAGTCCTATTTTCGTTGTTT	
M13-F	TGTAACGACGCGCCAGT	Paired with RBP42/STOP-R for <i>T. cruzi</i> clone genotyping after CRISPR/Cas9 gene editing. Amplification of the M13-tagged alleles.
Seq.RBP42.Esm-F	ATTTAGGTGACACTATAGACGTGCGTATGGATGTGTC	Paired with RBP42.Seq-R to amplify the TcRBP42 Esmeraldo-like allele and insert a SP6 tag for Sanger sequencing.
Seq.RBP42.NEsm-F	ATTTAGGTGACACTATAGTCACGTGTGTATGGATGTGTT	Paired with RBP42.Seq-R to amplify the TcRBP42 Non-Esmeraldo-like allele and insert a SP6 tag for Sanger sequencing.
SP6-F	ATTTAGGTGACACTATAG	Sanger sequencing of PCR products to confirm the TcRBP42 gene edition by CRISPR/Cas9.
RBP42.Seq-R	CGTATGCCTCAAGAATGTTGAC	
RT-qPCR-RBP42-R	CGATTGTAAAGGACGAGTTCGG	Combined with RBP42/ATG-F to quantify the wild-type TcRBP42 gene expression. Working concentration: 200 nM.
RT-qPCR-M13-R	GTTTCGGACTTCTGTTGTGC	Combined with M13-F to verify the M13-tagged gene expression. Working concentration: 200 nM.
RT-qPCR-Enol-F	AAGGGATTTGACACGACGCT	Gene expression quantification for the cytoplasmic Enolase gene. Working concentration: 300 nM.
RT-qPCR-Enol-R	GAATGGAGGAACACCGAGCA	
RT-qPCR-Succ-F	ACTGGTGGAACCGTGAACAA	Gene expression quantification for the Succinate dehydrogenase. Working concentration: 400 nM.
RT-qPCR-Succ-R	CTTGACGCGGCTATCGTAGT	

RT-qPCR-Citr-F	TCTGGGAGTATGCCCTGGAA	Gene expression quantification for the Citrate synthase. Working concentration: 400 nM.
RT-qPCR-Citr-R	CCAGTTGTGAGGCGGTTGTA	
RT-qPCR-Prol-F	TATCGAGGAATGCCGTGTCG	Gene expression quantification for the Proline dehydrogenase. Working concentration: 400 nM.
RT-qPCR-Prol-R	TGCCTTAATGACAGCCTCCG	
RT-qPCR-CYb-e-F	TGTCTTCTAATGTCAGGTTGCTT	Gene expression quantification for the Cytochrome b (edited transcript). Working concentration: 400 nM.
RT-qPCR-CYb-e-R	TCACGCTAAACAGACACCAC	
RT-qPCR-RPL9-F	ACCGTTGTGAAGGACGAACT	Amplification of the ribosomal protein L9 transcripts used as a reference for Real-time PCR. Working concentration: 400 nM.
RT-qPCR-RPL9-R	TTCACCAGGCAGAGCTGATG	
RT-qPCR-GAPDH-F	CGGTGGACGGTGTGTCGGTG	Amplification of the Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase transcripts used as a reference for Real-time PCR. Working concentration: 400 nM.
RT-qPCR-GAPDH-R	CCGTCAGCTTGCCCTGGGTG	
RT-qPCR-TERT-F	GTCGCATAAACACGAAGACCC	Amplification of the Telomerase reverse transcriptase transcripts used as a reference for Real-time PCR. Working concentration: 300 nM.
RT-qPCR-TERT-R	TCTGATAAACATGGCGTTCTGC	

Oligonucleotides were synthesized by Exxtend Solução em Oligos, Thermo Fisher Scientific, and Integrated DNA Technologies. RT-qPCR: Real-time PCR. F: forward, and R: reverse.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Sequence and structure characteristics of the *T. cruzi* RBP42 protein. CL Brener RBP42 proteins (*T.c.CL*) contain two conserved domains, NTF2-like and RRM, separated by an intrinsically disordered region (IDR1). Proline-rich motifs are also present in IDR1 (PxxP). A second disordered region (IDR2) follows the RRM. All RBP42 orthologs studied in the *T. cruzi* Y strain (*T.c.Y*), *T. brucei* (*T.b*) and *Leishmania braziliensis* (*L. b*) share the same general protein organization (A). AlphaFold2 3D models are shown for domain regions only (AlphaFoldDB ID: Q4DQQ3). Unstructured regions assumed a random distribution and were omitted for clarity (B). A phylogenetic tree for Kinetoplastids was generated using RBP42 amino acid sequences. A Bayesian phylogenetic inference was computed using the JTT+G+F model. Branch lengths were calculated under the uniform strict clock model. Bayesian posterior probabilities are reported as percentages along the branches. The *Trypanosoma* genus is highlighted in green. Scale bar: number of residue substitutions per site. Gene IDs: TvY486_0603830, TcIL3000_6_3860, Tb927.6.4440, TcvSTIB805.6.4570, TcCLB.485683.10, TcCLB.509167.140, BCY84_01141, TCSYLVIO_003340, LbrM.30.3080, LMJSD75_300038300, LinJ.30.3130, LdBPK_303130.1, LTRL590_300039500, EMOLV88_300036900, Baya_060_0150, CFAC1_260055900, Lsey_0105_0110 and BSAL_33520. The *T. cruzi* Y sequence was recovered from WEISBARTH *et al.* (2018).

Figure 2: *T. cruzi* epimastigotes genetic manipulation. For knocking out TcRBP42 alleles, the CRISPR/Cas9 technology was used to produce two adjacent DNA cuts near their start codons. A 72-nucleotide region between cleavage sites was lost and replaced by stop codons in all three open reading frames, followed by an M13 tag and restriction sites for XhoI and EcoRI enzymes. Besides providing several strategies for clone genotyping, this sequence construction contributes additional stop codons (A). Real-time PCR experiments were performed to verify the expression of both wild-type (B) and M13-tagged transcripts (C). Electroporating with expression vectors generated the overexpression of TcRBP42 or GFP genes. Production of exogenous proteins was confirmed by Western blot, in which Tubulin was used as a loading control (D). The relative expression of wild-type TcRBP42 genes showed that epimastigotes overexpressing these genes have similar and increased transcript levels compared to WT and GFP controls. Normalization was performed with the RPL9 and TERT reference genes (E). Parasite growth was assayed, and only mild proliferation defects were detected for knockout epimastigotes (F and G). Statistical significance was evaluated with the one-way ANOVA followed or not by Tukey's multiple comparisons test. ** p-value < 0,01 (Real-time PCR and Growth curves, respectively). ns: non-significant p-value.

Figure 3: Protein subcellular localization and epimastigotes morphology. Exogenous proteins were imaged using their 6x-His tags. The TcRBP42 protein was detected in the whole parasite cytoplasm. In contrast, the GFP control was also found in the nucleus (A). Deviations from the typical morphology were observed for TcRBP42 gene knockouts. In these cultures, round-shaped epimastigotes with a shortened flagellum are common (B). Cell membranes were colored with CellMask deep red. Genomic (N) and kinetoplast (K) DNA were stained with Dapi. Magnification bar: 10 μ m.

Figure 4: Gene expression evaluation in normal conditions and after metacyclogenesis induction. Except for Succinate dehydrogenase, TcRBP42 may stabilize the transcripts of all energy metabolism genes tested in normal conditions. Expressions were normalized with the RPL9 and TERT genes (**A**). In all differentiating cultures, the abundance of Cytochrome B-edited transcripts increased similarly. Higher expression levels were also observed for TcRBP42 and Proline dehydrogenase genes (**B and C**). GAPDH and TERT were used as reference genes. Statistical significance was tested with a one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparisons test (comparison of all three lines simultaneously) or an unpaired t-test (comparison of two lines at a time). *p-value < 0,05 and ** p-value < 0,01.

Supplementary Figure 1: pRock_SPB/6x-His RBP42 or GFP vector construction scheme.

First, a 173 bp sequence containing affinity tags (Streptavidin-binding peptide [SBP] and 6x-His) and restriction sites (NheI, XbaI, XhoI, and SalI) was cloned into pRockGFP_NEO. Next, TcRBP42 and GFP gene sequences were cloned into the newly inserted XbaI and XhoI restriction sites. Recombinant proteins contain a Streptavidin-binding peptide and a 6-His tag in their N and C-termini, respectively.

Supplementary Figure 2: RBP42 amino acid sequence alignments. The TcRBP42 Esmeraldo-like (T.c_E) and Non-Esmeraldo-like (T.c_NE) sequences are highly conserved, diverging in a few amino acids colored in red. Pxxp motifs are underlined, and the RNP1 signatures are delimited by a dashed box. The domains NTF2-like and RNA are highlighted in blue and green, respectively (**A**). RBP42 proteins are also conserved among Kinetoplastids mainly in the domain regions. Alignment sequence logos are represented for N and C protein terminals only (**B**). Gene IDs: TvY486_0603830, TcIL3000_6_3860, Tb927.6.4440, TevSTIB805.6.4570, TcCLB.485683.10, TcCLB.509167.140, BCY84_01141, TCSYLVIO_003340, LbrM.30.3080, LMJSD75_300038300, LTRL590_300039500, LinJ.30.3130), LdBPK_303130.1, EMOLV88_300036900, Baya_060_0150, CFAC1_260055900, Lsey_0105_0110 and BSAL_33520. The *T. cruzi* Y sequence was recovered from WEISBARTH et al. (2018).

Supplementary Figure 3: Genotyping and Sanger sequencing confirmation for *T. cruzi* clones edited with the CRISPR/Cas9 technology. The edited clones were PCR genotyped with primer pairs discriminating between TcRBP42 wild-type (RB) and M13-tagged alleles (M13). Hemi-Knockout clones (Hemi) have both PCR bands, while Knockouts contain only the M13 amplification product (KO) (**A**). The Hemi 5 and KO 5 clones were Sanger-sequenced to confirm the planned genetic edition (**B**). E: Esmeraldo-like allele, and NE: Non-Esmeraldo-like allele. C+ and C-: positive and negative control, respectively.

Supplementary Figure 4: Phenotypic characterization of TcRBP42 Hemi-knockout epimastigotes. The TcRBP42 wild-type allele expression was quantified by Real-time PCR. Hemi-knockout cultures express about half of the transcript levels measured in WT cultures. Relative expression was normalized with the RPL9 and TERT reference genes (**A**). The same technique detected the expression of the truncated TcRBP42 allele (**B**). Growth curves and microscopy images show that one functional TcRBP42 copy is sufficient for normal parasite proliferation and morphology (**C and D**). Statistical significance was tested with an unpaired t-test (Real-time PCR)

or one-way ANOVA (growth curve). ** p-value < 0,01). Cell membranes were colored with CellMask deep red. Genomic (N) and kinetoplast (K) DNA were stained with Dapi. Magnification bar: 10 μ m.

Supplementary Figure 5: Autofluorescence and unspecific staining testing for Confocal fluorescence microscopy. Image acquisition conditions and the staining protocol for 6x-His-tagged protein detection in WT epimastigotes did not cause significant autofluorescence or unspecific antibody binding to their proteins. WT parasites do not contain marked proteins. Cell membranes were colored with CellMask deep red. Genomic (N) and kinetoplast (K) DNA were stained with Dapi. Magnification bar: 10 μ m.

Supplementary Video 1: Epimastigotes mobility and morphology in culture. Epimastigotes WT, Hemi-knockout and Knockout for TcRBP42 were colored with the erythrosine vital stain and recorded through the eyepiece of a conventional microscope equipped with a 40x objective. The interruption of both TcRBP42 gene alleles caused the appearance of rounded-shaped epimastigotes with a shortened flagellum and reduced mobility. Parasite aggregates were also observed in culture.

Supplementary Video 2: Three-dimensional localization for the TcRBP42-tagged protein. The 3D videos were produced by combining twelve Z-stacking images collected at 11 μ m intervals. TcRBP42-tagged proteins were detected with Anti-His-Tag and Alexa Fluor® 488 antibodies. Genomic and kinetoplast DNA were stained with Dapi. Magnification bar: 10 μ m.

Supplementary Video 3: Three-dimensional localization for the GFP control protein. The 3D videos were produced by combining twelve Z-stacking images collected at 11 μ m intervals. GFP proteins were detected with Anti-His-Tag and Alexa Fluor® 488 antibodies. Genomic and kinetoplast DNA were stained with Dapi. Magnification bar: 10 μ m.

ACKNOWLEDGMENTS

We are thankful to Professor Daniella Castanheira Bartholomeu and Santuza Maria Ribeiro Teixeira research groups from the Universidade Federal de Minas Gerais for providing access to the most recent *T. cruzi* CL Brener genome and the necessary components for CRISPR/Cas9 gene editing (purified SaCas9 protein and pTZSaCasScaffold plasmid), respectively. We also acknowledge the financial support from the Brazilian funding agencies CNPq, Capes and FAPEMIG.

REFERENCES

- 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, February 2015. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv030>.
- ASLETT, M. *et al.* TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, Suppl_1, v. 38, p. D457-D462, January 2010. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkp851>.
- 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>.
- BARRETT, F. M.; FRIEND, W. G. Differences in the concentration of free amino acids in the haemolymph of adult male and female *Rhodnius prolixus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 52, n. 3, p. 427-431, November 1975. DOI: [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(75\)90156-X](https://doi.org/10.1016/0305-0491(75)90156-X).
- BUCHAN, D. W. A. *et al.* Scalable web services for the PSIPRED Protein Analysis Workbench. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. W1, p. W349-W357, June 2013. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkt381>.
- 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>.
- BURLE-CALDAS, G. A. *et al.* Assessment of two CRISPR-Cas9 genome editing protocols for rapid generation of *Trypanosoma cruzi* gene knockout mutants. **International Journal for Parasitology**, v. 48, n. 8, p. 591-596, July 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2018.02.002>.
- 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.
- CHAME, D. F. *et al.* *Trypanosoma cruzi* RNA-binding protein ALBA30 aggregates into cytoplasmic foci under nutritional stress. **Parasitology Research**, v. 119, n. 2, p. 749-753, February 2020. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06554-w>.
- CLAYTON, C. Regulation of gene expression in trypanosomatids: living with polycistronic transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, Article 190072, June 2019. DOI: <https://doi.org/10.1098/rsob.190072>.
- 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>.

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, January 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, April 2011. DOI: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr088>.

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, November 2012. DOI: <https://doi.org/10.1261/rna.033829.112>.

DAS, A. *et al.* The RNA-binding protein RBP42 regulates cellular energy metabolism in mammalian-infective *Trypanosoma brucei*. **bioRxiv**, April 2021. DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.04.14.439849>.

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>.

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, November 2012. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048870>.

GONÇALVES, C. S. *et al.* Revisiting the *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: morphological and ultrastructural analyses during cell differentiation. **Parasites and Vectors**, v. 11, Article 83, February 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2664-4>.

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>.

JUMPER, J. *et al.* Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. **Nature**, v. 596, n. 7873, p. 583-589, August 2021. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2>.

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>.

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>.

KONATÉ, M. M. *et al.* Molecular function limits divergent protein evolution on planetary timescales. **eLife**, v. 8, Article e39705, September 2019. DOI: <https://doi.org/10.7554/eLife.39705>.

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, February 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2011.10.002>.

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>.

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, December 2001. DOI: <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>.

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>.

MANTILLA, B. S. *et al.* Higher expression of proline dehydrogenase altered mitochondrial function and increased *Trypanosoma cruzi* differentiation in vitro and in the insect vector. **Biochemical Journal**, v. 478, n. 21, p. 3891-3903, November 2021. DOI: <https://doi.org/10.1042/BCJ20210428>.

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

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>.

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

NOCUA, P. A.; REQUENA, J. M.; PUERTA, C. J. Identification of the interactomes associated with SCD6 and RBP42 proteins in *Leishmania braziliensis*. **Journal of Proteomics**, v. 233, Article 104066, February 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2020.104066>.

PAES, L. S. *et al.* Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS ONE**, v. 8, n. 7, Article e69419, July 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069419>.

PAHO (Pan American Health Organization). **Chagas disease**, 2023. Available at: <https://www.paho.org/en/topics/chagas-disease#:~:text=Chagas%20disease%20is%20endemic%20in,newborns%20become%20infected%20during%20gestation>. Accessed: 27 April 2023.

QUEIROZ, R. *et al.* Transcriptome analysis of differentiating trypanosomes reveals the existence of multiple post-transcriptional regulons. **BMC genomics**, v. 10, n. 1, Article 495, October 2009. DOI: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-495>.

ROMAGNOLI, B. A. A. *et al.* RNA binding proteins and gene expression regulation in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, Article 56, February 2020. DOI: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00056>.

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>.

SHAW, A. K.; KALEM, M. C.; ZIMMER, S. L. Mitochondrial gene expression is responsive to starvation stress and developmental transition in *Trypanosoma cruzi*. **mSphere**, v. 1, n. 2, p. e00051-00016, April 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/mSphere.00051-16>.

TAVARES, T. S. *et al.* A *Trypanosoma cruzi* zinc finger protein that is implicated in the control of epimastigote-specific gene expression and metacyclogenesis. **Parasitology**, p. 1-15, September 2020. DOI: <https://doi.org/10.1017/S0031182020002176>.

VARADI, M. *et al.* AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. D1, p. D439-D444, November 2021. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1061>.

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, December 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080947>.

VOLPON, L. *et al.* NMR structural study of TcUBP1, a single RRM domain protein from *Trypanosoma cruzi*: contribution of a beta hairpin to RNA binding. **Biochemistry**, v. 44, n. 10, p. 3708-3717, March 2005. DOI: <https://doi.org/10.1021/bi047450e>.

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>.

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, April 2018. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00436-018-5787-9>.

YANG, P. *et al.* G3BP1 is a tunable switch that triggers phase separation to assemble stress granules. **Cell**, v. 181, n. 2, p. 325-345, April 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.046>.

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