



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA
E BIOLOGIA MOLECULAR

GUILHERME ALBUQUERQUE DE FRANÇA MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE RNA HELICASES DO TIPO *DEAD-BOX*
COM PROTEÍNAS PARCEIRAS E COMPLEXOS DO TIPO eIF4F DE INICIAÇÃO
DA TRADUÇÃO EM *TRYPANOSOMA BRUCEI***

Recife

2025

GUILHERME ALBUQUERQUE DE FRANÇA MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE RNA HELICASES DO TIPO *DEAD-BOX*
COM PROTEÍNAS PARCEIRAS E COMPLEXOS DO TIPO eIF4F DE INICIAÇÃO
DA TRADUÇÃO EM *TRYPANOSOMA BRUCEI***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

Coorientadoras: Dra. Danielle Maria Nascimento Moura e Dra. Ludmila Arruda de Assis Aussourd

Recife

2025

Catálogo de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Monteiro, Guilherme Albuquerque de França.

Caracterização da interação de RNA helicases do tipo DEAD-box com proteínas parceiras e complexos do tipo eIF4F de iniciação da tradução em *Trypanosoma brucei* / Guilherme Albuquerque de França Monteiro. - Recife, 2025.

114f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, 2025.

Orientação: Osvaldo Pompílio de Melo Neto.

Coorientação: Danielle Maria Nascimento Moura.

Coorientação: Ludmila Arruda de Assis Aussourd.

Inclui referências.

1. Tripanosomatídeos; 2. Regulação gênica; 3. Interação proteína-proteína; 4. DHH1; 5. DED1; 6. DBP2B. I. Melo Neto, Osvaldo Pompílio de. II. Moura, Danielle Maria Nascimento. III. Aussourd, Ludmila Arruda de Assis. IV. Título.

UFPE-Biblioteca Central

GUILHERME ALBUQUERQUE DE FRANÇA MONTEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DA INTERAÇÃO DE RNA HELICASES DO TIPO *DEAD-BOX*
COM PROTEÍNAS PARCEIRAS E COMPLEXOS DO TIPO eIF4F DE INICIAÇÃO
DA TRADUÇÃO EM *TRYPANOSOMA BRUCEI***

Área de Concentração: Biologia Molecular e Bioinformática

Aprovado em ____/____/____

Banca Examinadora

Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz - PE

Dr^a. Isabelle Freire Tabosa Viana
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz - PE

Dr^a. Anna Jessica Duarte Silva
Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

Dr^a. Maria Helena Neves Lobo Silva Filha
Instituto Aggeu Magalhães/Fiocruz - PE

Recife

2025

Dedico este trabalho aos meus pais e irmã,
bem como aos amigos que sempre confiaram em
mim.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me guiar e me trazer a espaços que sempre sonhei, mas que nunca antes foram cogitados por mim de se tornarem realidade.

À minha família, em especial a minha irmã por também ser a minha guia e principal conselheira durante toda a minha vida, e aos meus pais, Eliane e Gilvan, por esforço na minha criação e compreensão ao longo desta jornada.

A meu orientador Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto e às minhas co-orientadoras, Dra. Ludmila Arruda de Assis Aussourd e Dra. Danielle Maria Nascimento Moura, agradeço pela oportunidade de participar desse projeto, pela confiança depositada em mim e por todos os conselhos no decorrer deste mestrado.

À Universidade Federal de Pernambuco, por mostrar que a educação acadêmica vai muito além das salas de aula e por me proporcionar conhecer e fazer amizades com pessoas incríveis como Gutem, Angela, Gabriel. Vocês são a minha base de resiliência no mundo acadêmico.

Ao Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ-PE), incluindo pesquisadores, colaboradores, técnicos de laboratório, técnicos de manutenção de equipamentos e funcionários da limpeza. Sem o apoio de vocês, este trabalho não teria sido possível.

A todo o grupo do laboratório de Microbiologia, em especial ao grupo BioMolTryp, por todo apoio. Principalmente de Pamella, Eduarda, Rafaella, Sávio, João, Mayara, Penelopy, Yallen, Rafaella, Gustavo e em especial a Renata, por me aconselhar, auxiliar e instruir em diversos experimentos no laboratório desde a minha iniciação científica.

Ao Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, coordenadoras e funcionários.

Ao órgão de fomento Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

“Cada um alcança a verdade que é capaz de suportar”.

Jacques Lacan

RESUMO

Em eucariotos, as RNA helicases do tipo *DEAD-box* desempenham diversos papéis ligados ao metabolismo dos RNAs, atuando desde o núcleo até o citoplasma, sendo fundamentais na tradução dos mRNAs, onde podem atuar na sua iniciação junto aos complexos do tipo eIF4F. Nos tripanosomatídeos, como *Trypanosoma brucei*, diversos destes complexos podem interagir com diferentes RNA helicases, o que pode levar a diferentes padrões de tradução. Nesses organismos, estudos identificaram que o complexo baseado nas subunidades EIF4E4/EIF4G3 interage especificamente com uma única RNA helicase, chamada EIF4A1, típico parceiro de complexos eIF4F em outros eucariotos. Resultados preliminares mostraram que outro complexo de tripanosomatídeos, o EIF4E3/EIF4G4, parece coprecipitar com as RNA helicases DED1-2 e DBP2B, enquanto o complexo EIF4E6/EIF4G5, pode ter interação com a helicase DHH1. Para confirmar essa hipótese, este trabalho buscou analisar as associações das três helicases citadas acima de *T. brucei* com complexos do tipo eIF4F, a partir de ensaios de imunoprecipitação, além de identificar outros possíveis parceiros funcionais que possam esclarecer o modo de ação destas proteínas. Para isso, genes codificadores destas helicases foram clonados em sistema induzível por tetraciclina e em seguida transfectados em células procíclicas de *T. brucei*. A expressão das respectivas proteínas, todas marcadas com o epítipo HA, foi avaliada com anticorpo anti-HA, seguida de preparação de lisados celulares para imunoprecipitação e identificação das proteínas coprecipitadas por espectrometria de massas. Os resultados mostram que estas RNA helicases são expressas durante a fase exponencial de crescimento do parasita e estão presentes em fração citoplasmática solúvel dos lisados. A identificação de polipeptídeos coprecipitados evidenciaram proteínas tais como subunidades de complexos do tipo eIF4F e outros fatores de iniciação da tradução. Entre esses fatores, as subunidades do complexo eIF3 mostram-se associadas as três RNA helicases investigadas. A DED1-2 coprecipitou com o EIF4E4/EIF4G3 e, adicionalmente apresentou um perfil de polipeptídeos associados com a regulação do metabolismo energético, sugerindo uma possível conexão com vias metabólicas do parasita. Por outro lado, a DHH1 não apenas coprecipitou com o EIF4E4/EIF4G3, mas também com o EIF4G4 e subunidades do complexo NOT de deadenilação, indicando um papel mais proeminente da DHH1 na regulação da tradução geral do parasita, principalmente através do controle de meia-vida de mRNAs. Em contrapartida, a DBP2B também coprecipitou o EIF4G4, mas também o EIF4E5 e EIF4E6, juntamente com proteínas parceiras como PARN-1, MTR4 e RBG2, sendo a primeira envolvida em processos de deadenilação de mRNAs, enquanto a segunda e a terceira com a maturação de rRNAs e montagem de ribossomo, respectivamente. Com isso, é possível que a DBP2B apresente função *moonlighting*, atuando tanto na tradução de mRNAs como em processos de degradação/maturação de mRNAs e rRNAs. Esses achados destacam as funções distintas dessas helicases, atuando na tradução e no metabolismo de RNAs, fornecendo novas informações e estabelecendo uma base para futuras pesquisas que busquem identificar alvos específicos na tradução do *T. brucei*, com intuito de utilizar como estratégia de combate a patologias causadas por esses e outros parasitas.

Palavras-chave: Tripanosomatídeos; Regulação gênica; Interação proteína-proteína; DHH1; DED1; DBP2B

ABSTRACT

In eukaryotes, DEAD-box RNA helicases play diverse roles associated with RNA metabolism, acting from the nucleus to the cytoplasm, and are fundamental to mRNA translation, where they may participate in initiation processes alongside eIF4F-like complexes. In *Trypanosomatids*, such as *Trypanosoma brucei*, several of these complexes can interact with different RNA helicases, potentially leading to distinct patterns of translation. In these organisms, studies have identified that the complex based on the EIF4E4/EIF4G3 subunits interacts specifically with a single RNA helicase, named EIF4A1, a typical eIF4F partner in other eukaryotes. Preliminary results indicated that another *Trypanosomatid* complex, EIF4E3/EIF4G4, appears to co-precipitate with the RNA helicases DED1-2 and DBP2B, while the EIF4E6/EIF4G5 complex may interact with the DHH1 helicase. To confirm this hypothesis, this study aimed to analyze the associations of the three aforementioned *T. brucei* RNA helicases with specific eIF4F-like complexes through immunoprecipitation assays, as well as to identify other potential functional partners that could help elucidate the mode of action of these proteins. To this end, genes encoding these helicases were cloned into a tetracycline-inducible system and subsequently transfected into procyclic *T. brucei* cells. The expression of the respective proteins, all tagged with the HA epitope, was assessed using an anti-HA antibody, followed by the preparation of cell lysates for immunoprecipitation and identification of co-precipitated proteins by mass spectrometry. The results show that these RNA helicases are expressed during the parasite's exponential growth phase and are present in the soluble cytoplasmic fraction of the lysates. The identification of co-precipitated polypeptides revealed proteins such as subunits of eIF4F-like complexes and other translation initiation factors. Among these factors, subunits of the eIF3 complex were found to be associated with all three investigated RNA helicases. DED1-2 co-precipitated with the EIF4E4/EIF4G3 complex and additionally displayed a profile of associated polypeptides related to the regulation of energy metabolism, suggesting a possible connection to the parasite's metabolic pathways. On the other hand, DHH1 not only co-precipitated with EIF4E4/EIF4G3 but also with EIF4G4 and subunits of the NOT deadenylation complex, indicating a more prominent role for DHH1 in the general regulation of translation in the parasite, primarily through control of mRNA stability. Conversely, DBP2B co-precipitated with EIF4G4 as well as EIF4E5 and EIF4E6, along with partner proteins such as PARN-1, MTR4, and RBG2. PARN-1 is involved in mRNA deadenylation processes, while MTR4 and RBG2 are associated with rRNA maturation and ribosome assembly, respectively. Thus, DBP2B may exhibit a moonlighting function, participating both in mRNA translation and in mRNA and rRNA degradation/maturation processes. These findings highlight the distinct roles of these helicases in translation and RNA metabolism, providing new insights and establishing a foundation for future research aiming to identify specific translational targets in *T. brucei*, with the goal of developing strategies to combat diseases caused by this and other parasitic organisms.

Keywords: *Trypanosomatids*; Gene Regulation; Protein-Protein Interaction; DHH1; DED1; DBP2B

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Principais morfotipos dos tripanosomatídeos	21
Figura 2: Ciclo biológico revisado do <i>Trypanosoma brucei</i>	26
Figura 3: Representação do processo de <i>trans-splicing</i> e poliadenilação do mRNA.....	29
Figura 4: Domínios e motivos conservados de uma RNA helicase <i>DEAD-box</i>	32
Figura 5: Representação do complexo eIF4F e parceiros.....	33
Figura 6: Resumo gráfico da duplicação de gene da DED1 em tripanosomatídeos.....	40
Figura 7: Diagrama esquemático dos procedimentos metodológicos	44
Figura 8: Representação esquemática do plasmídeo (vetor) p2477	50
Figura 9: Amplificação dos genes das RNA helicases de <i>Trypanosoma brucei</i>	56
Figura 10: Digestões enzimática em pequena escala para confirmação das clonagens dos genes das RNA helicases de <i>Trypanosoma brucei</i>	57
Figura 11: Digestões em larga escala de <i>DED1-2</i> e <i>HEL67</i> em vetor pGEM®-T Easy para subclonagem no vetor p2477	58
Figura 12: Digestões em larga escala da <i>DBP2B</i> e <i>DHH1</i> em vetor pGEM®-T Easy	59
Figura 13: Digestões enzimáticas em pequena escala para confirmação de subclonagem.....	61
Figura 14: Teste de expressão da linhagem TbDBP2B-HA e TbDHH1-HA....	63
Figura 15: Teste de expressão da linhagem TbDED1-2-HA.....	64
Figura 16: Avaliação do perfil de expressão e curva de crescimento da linhagem TbDBP2B-HA	65
Figura 17: Avaliação do perfil de expressão e curva de crescimento da linhagem TbDHH1-HA	66
Figura 18: Avaliação do perfil de expressão e curva de crescimento da linhagem TbDED1-2-HA	67
Figura 19: Ensaio de <i>Western blot</i> dos lisados em triplicata das linhagens TbDHH1, TbDBP2B e TbDED1-2, todas marcadas com HA.....	68

Figura 20: Ensaio de <i>Western blot</i> das frações sedimentares e citoplasmáticas das linhagens <i>TbDBP2B</i> , <i>TbDHH1</i> e <i>TbDED1-2</i> , todas marcadas com HA	70
Figura 21: Ensaio de <i>Western blot</i> dos lisados e imunoprecipitações das linhagens <i>TbDHH1</i> , <i>TbDBP2B</i> e <i>TbDED1-2</i> , todas marcadas com HA	71
Figura 22: Diagrama de Venn comparando os polipeptídeos que coprecipitam com as helicases DHH1, DED1-2 e DBP2B, todas marcadas com HA.....	79
Figura 23: Diagrama de Venn comparando as proteínas do complexo tipo eIF4F que coprecipitam com as helicases DHH1, DED1-2 e DBP2B marcadas com HA, com razão $\geq 1,5$ em relação ao controle.	83
Figura 24: Localização subcelular de proteínas que coprecipitam com a DED1-2, DHH1 e DBP2B marcadas com HA	85
Figura 25: Modelos propostos de interação entre as RNA helicases-alvo DHH1, DED1-2 e DPB2B complexos do tipo eIF4F de <i>Trypanosoma brucei</i>	90

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes de <i>T. brucei</i>	46
Tabela 2: Antibióticos e suas concentrações para manutenção e seleção das culturas de <i>T. brucei</i>	51
Tabela 3: Polipeptídeos detectados no imunoprecipitado da proteína recombinante DED1-2-HA por espectrometria de massas.....	74
Tabela 4: Polipeptídeos detectados no imunoprecipitado da proteína recombinante DHH1-HA por espectrometria de massas.....	75
Tabela 5: Polipeptídeos detectados no imunoprecipitado da proteína recombinante DBP2B-HA por espectrometria de massas.....	76
Tabela 6: Fatores de tradução detectados na espectrometria de massas das proteínas DBP2B, DED1-2 e DHH1, marcadas com HA.....	80
Tabela 7: Razão de enriquecimento entre os fatores de tradução que coprecipitam com a DBP2B, DED1-2 e DHH1, marcadas com HA.....	82

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Item	Definição
µg	Micrograma.
µL	Microlitro
4E-BPs	Proteínas de ligação ao eIF4E
ATP	Adenosina trifosfato
BHE	Barreira Hematoencefálica
Cap	Estrutura presente na extremidade 5' do mRNA
DEAD	Ácido Aspártico (D) Ácido Glutâmico (E), Alanina (A), Ácido aspártico (D)
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dsRNA	RNA de fita dupla
DTU	<i>Discrete typing unit</i> - Unidades discretas de tipagem
eIF	Fator de Iniciação Eucariótico
EJC	Complexo de junção exônica
FAZ	Zona de Fixação do Flagelo
HA	Hemaglutinina
HAT	Tripanossomíase Africana Humana
IgG	Imunoglobulina G
IP	Imunoprecipitação
IPTG	Isopropil-tio-β-D-galactopiranosídeo
kDa	kilodalton
LB	Luria Bertani
lncRNAs	RNAs longos não codificantes
mL	Mililitro
mM	milimolar
mRNA	RNA mensageiro
ng	Nanograma
NTD	<i>Neglected Tropical Diseases</i> - Doenças Tropicais Negligenciadas
NTP	Nucleotídeo trifosfatado
OMS	Organização Mundial da Saúde
ORF	Open reading frames - Quadros de leitura abertos

PABP	Proteína de ligação ao Poli-A
PAD1	Proteína associada à diferenciação 1
PAP1	Poli(A) polimerase
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PVDF	<i>Polyvinylidene difluoride</i> - Polifluoreto de vinilideno
RBP	Proteína ligadora de RNA
RNA	Ácido ribonucléico
RNP	Ribonucleoproteínas
RPM	Rotação por minuto
SDS-PAGE	Eletoforese em gel de poliacrilamida – Dodecil Sulfato de Sódio
SF2	Superfamília de helicase 2
SFB	Soro fetal bovino
SIF	Fator de indução Stumpy
SL-RNA	Sequência líder de RNA
snRNPs	Pequenas ribonucleoproteínas nucleares
T7RNAP	T7 RNA polimerase
<i>Tb</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>
<i>TBS</i>	Tampão salino de Tris
TET	Tetraciclina
TetR	Proteína bacteriana repressora de tetraciclina
tRNA	RNA transportador
UTR	Região não traduzida
VSG	Glicoproteína de superfície variante
WT	Wild-type - Linhagem do tipo selvagem

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
1.1	PERGUNTA CONDUTORA	18
1.2	HIPÓTESE	18
1.3	OBJETIVOS	19
1.3.1	Objetivo geral	19
1.3.2	Objetivos específicos	19
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1	CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS TRIPANOSOMATÍDEOS.....	20
2.2	TRIPANOSOMATÍDEOS E SUAS PATOLOGIAS	22
2.2.1	<i>Leishmania</i> sp. e leishmanioses	22
2.2.2	<i>Trypanosoma cruzi</i> e doença de Chagas.....	23
2.2.3	<i>Trypanosoma brucei</i> e Tripanossomíase Humana Africana	23
2.3	CICLO BIOLÓGICO DO <i>Trypanosoma brucei</i>	24
2.4	<i>Trypanosoma brucei</i> COMO ORGANISMO MODELO EM ENGENHARIA GENÉTICA	27
2.5	ASPECTOS MOLECULARES DOS TRIPANOSOMATÍDEOS	28
2.5.1	Transcrição policistrônica e processamento do mRNA.....	28
2.6	RNA HELICASES E SEU PAPEL NO PROCESSAMENTO DO RNA MESSAGEIRO EM EUCARIOTOS	30
2.7	CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS RNA HELICASES E DOMÍNIO DEAD-BOX.....	31
2.8	INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO E COMPLEXO eIF4F EM EUCARIOTOS.....	32
2.8.1	eIF4G	33
2.8.2	eIF4E	34
2.8.3	eIF4A	34
2.8.4	RNA helicases associadas a iniciação da tradução em eucariotos.....	35
2.9	INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO E COMPLEXOS DO TIPO eIF4F EM TRIPANOSOMATÍDEOS.....	36
2.9.1	Homólogos do eIF4G	37
2.9.2	Homólogos do eIF4E	37

2.9.3	Homólogos do eIF4A	38
2.9.4	RNA helicases da família <i>DEAD-box</i> envolvidas na iniciação da tradução em tripanosomatídeos	39
2.9.5	RNA helicases e complexos tipo eIF4F de tripanosomatídeos	42
3	MATERIAIS E MÉTODOS	44
3.1	OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO E EXTRAÇÃO DE RNA DE <i>T. brucei</i> PARA SÍNTESE DE CDNA	44
3.2	REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	45
3.3	CLONAGEM EM PGEM®-T EASY	46
3.3.1	Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial	47
3.4	SEQUENCIAMENTO DE DNA	47
3.5	SUBCLONAGEM DOS GENES EM VETOR DE EXPRESSÃO DE <i>Trypanosoma brucei</i>	48
3.6	TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS PROCÍCLICAS DE <i>Trypanosoma brucei</i>	50
3.7	OBTENÇÃO DE EXTRATOS PROTEICOS	52
3.8	WESTERN BLOT	52
3.9	LISADOS E IMUNOPRECIPITAÇÕES	53
3.10	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS	54
4	RESULTADOS	56
4.1	AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE	56
4.2	OBTENÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS DE INTERESSE	56
4.3	SUBCLONAGEM	57
4.3.1	<i>DED1-2</i> e <i>HEL67</i>	58
4.3.2	<i>DBP2B</i> e <i>DHH1</i>	59
4.3.3	Confirmação da subclonagem	60
4.4	AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO EPÍTOPO HA	62
4.5	CURVAS DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE <i>T. brucei</i> RECOMBINANTES	64
4.6	DETECÇÃO DAS HELICASES NOS LISADOS E IMUNOPRECIPITAÇÕES	68

4.7	IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARCEIRAS DAS HELICASES.....	72
4.7.1	Proteínas sem atuação conhecida na tradução que coprecipitaram com as RNA helicases-alvo	72
4.7.2	Fatores de tradução que coprecipitaram com as RNA helicases- alvo.....	80
4.7.3	Localização subcelular dos polipeptídeos que coprecipitaram com as RNA helicases-alvo.....	84
5	DISCUSSÃO.....	86
6	CONCLUSÕES.....	91
7	REFERÊNCIAS	92
	CURRICULUM VITAE (LATTES).....	107

1 INTRODUÇÃO

A família *Trypanosomatidae* abriga protozoários flagelados unicelulares exclusivamente parasitas de animais e plantas. Dentro dessa família, destacam-se dois gêneros de interesse médico: *Leishmania* e *Trypanosoma*. Ambos causam doenças em humanos, como a doença de Chagas e a doença do sono (causadas pelo *Trypanosoma cruzi* e *T. brucei*, respectivamente), e as leishmanioses (causadas por *Leishmania* spp.). Essas doenças afetam milhões de pessoas no mundo, principalmente em países em desenvolvimento, causando elevado impacto na estrutura socioeconômica e na saúde pública.

Os tripanosomatídeos são conhecidos por sua complexidade no que diz respeito ao seu ciclo celular e regulação gênica. Apresentam diversas formas evolutivas, além de peculiaridades moleculares, como a ausência de promotores clássicos para a RNA polimerase II, realização de transcrição policistrônica e *trans-splicing*. Essas peculiaridades resultam em uma regulação gênica majoritariamente pós-transcricional, envolvendo o processamento de RNA, transporte, degradação, controle da estabilidade e direcionamento final do mRNA.

Em eucariotos, os mRNAs quando processados são destinados à tradução. Esse evento é caracterizado por possuir quatro fases, sendo: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem. A iniciação é a fase com maior propensão de regulação, pois é quando se forma o complexo de iniciação 43S, formado por diferentes fatores de iniciação eucarióticos (eIFs) e pela subunidade ribossomal 40S. Dentre os eIFs, destaca-se o complexo eIF4F, formado por três subunidades: eIF4E, responsável por reconhecer a estrutura *cap* na extremidade 5' do mRNA; eIF4A, uma RNA helicase da família *DEAD-box*, responsável por remover estruturas secundárias no mRNA; e o eIF4G, que apresenta sítios de ligação para fatores como eIF3 e eIF4A. O eIF4F promove a interação do mRNA com a subunidade 40S e outros fatores que auxiliam na tradução.

A tradução em tripanosomatídeos é marcada pelo número elevado de homólogos de subunidades do complexo eIF4F. A literatura descreve a presença de diversos homólogos da subunidade eIF4G (EIF4G1 ao 5) e eIF4E (EIF4E1 ao 6), com dois homólogos de eIF4A (eIF4AI e eIF4AIII). Dentre esses, as interações entre homólogos de eIF4G e eIF4E se destacam, sendo os complexos EIF4E4/EIF4G3 e EIF4E3/EIF4G4 com mais indícios de atuação na tradução. Além disso, estudos

identificaram que o complexo EIF4E4/EIF4G3 interage especificamente com a helicase EIF4AI, sendo até o momento a única RNA helicase encontrada com esse complexo. Em contraste, os complexos EIF4E3/EIF4G4 e EIF4E6/EIF4G5 mostraram-se associados a diferentes RNA helicases, como HEL67, DED1-2, DBP2B e DHH1, todas contendo o domínio *DEAD-box*.

A interação preferencial das RNA helicases supracitadas com complexos eIF4F específicos em tripanosomatídeos indica aspectos diferenciados de sua função na tradução que necessitam de maior esclarecimento. Além disso, esses complexos têm sido associados a diferentes populações de mRNAs, o que sugere que a presença das diferentes helicases nos complexos pode determinar padrões distintos de ação e regulação. Compreender de forma mais precisa como essas RNA helicases atuam em conjunto com os complexos associados não apenas esclarece pontos importantes sobre a tradução desses protozoários, mas também fornece informações relevantes sobre potenciais novos mecanismos associados à tradução em diferentes eucariotos e no homem.

1.1 PERGUNTA CONDUTORA

Com quais complexos do tipo eIF4F as RNA helicases HEL67, DED1-2, DBP2B e DHH1 se associam em *Trypanosoma brucei*, e essas associações indicam papéis funcionais distintos nos processos de tradução?

1.2 HIPÓTESE

As RNA helicases HEL67, DED1-2 e DBP2B se associam preferencialmente ao complexo EIF4E3/EIF4G4, enquanto a helicase DHH1 interage predominantemente com o complexo EIF4E6/EIF4G5, refletindo possíveis aspectos funcionais distintos desses complexos em *T. brucei*.

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Objetivo geral

Avaliar, de forma comparativa, a associação das helicases DED1-1 (HEL67), DED1-2, DBP2B e DHH1 com complexos do tipo eIF4F e demais proteínas de *Trypanosoma brucei*.

1.3.2 Objetivos específicos

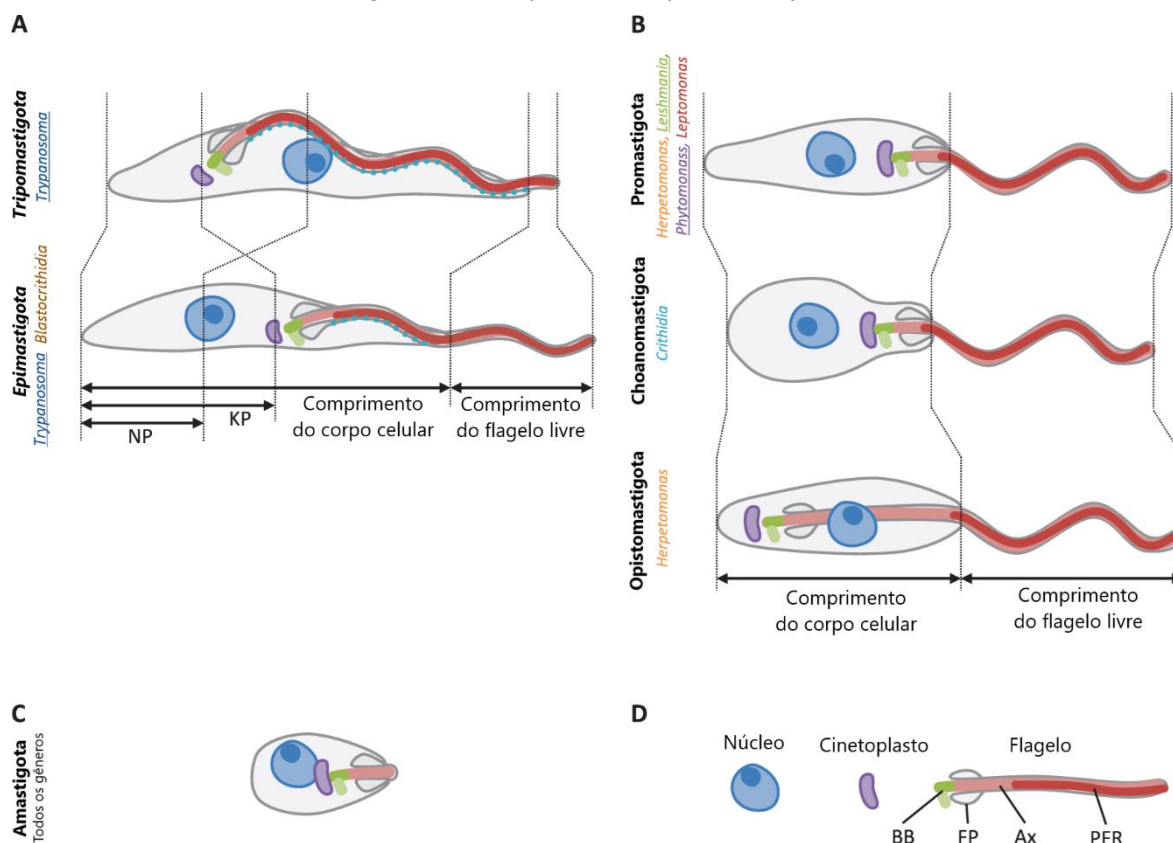
- Avaliar a expressão das RNA helicases DED1-1 (HEL67), DED1-2, DBP2B e DHH1, fusionadas a epítipo específico, em células transgênicas da forma evolutiva procíclica de *T. brucei*.
- Definir o perfil de proteínas parceiras associadas às helicases-alvo, em fase exponencial de crescimento da forma evolutiva procíclica do parasita.
- Identificar possíveis associações das helicases-alvo com os complexos EIF4E3/EIF4G4 e EIF4E6/EIF4G5, ou com demais fatores de tradução.
- Determinar os compartimentos celulares das proteínas associadas às RNA helicases-alvo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS TRIPANOSOMATÍDEOS

Os tripanosomatídeos são seres do reino Protista, unicelulares e flagelados pertencentes à classe Kinetoplastea, diferenciados devido à presença de uma estrutura chamada “cinetoplasto”, onde abriga o DNA mitocondrial, sendo assim classificados como cinetoplastídeos (Kostygov *et al.*, 2021). Esses organismos englobam a ordem *Trypanosomatida*, onde se encontra a família *Trypanosomatidae*, formada por gêneros predominantemente monoxênicos, classificados quanto a sua morfologia, ciclo de vida e relação com o hospedeiro. No entanto, dentre os gêneros, os que mais se destacam são os gêneros *Trypanosoma* e a *Leishmania*, ambos dixênicos e capazes de causar doenças em humanos, sendo transmitidos através da picada de insetos hematófagos (Kaufer *et al.*, 2017).

Os tripanosomatídeos são organismos exclusivamente parasitas e que por serem dixênicos possuem a habilidade de migrar entre hospedeiros distintos, como invertebrados e vertebrados (incluindo humanos), desencadeando diversas fases evolutivas que auxiliam na sobrevivência do parasita. No caso de homem, essas diferentes fases evolutivas contribuem para que o parasita possa se desenvolver dentro de células, na circulação sanguínea ou no sistema linfático (de Castro Neto *et al.*, 2022; Machado *et al.*, 2023). A diferenciação das fases evolutivas é tradicionalmente baseada na preferência pelo tipo de hospedeiro, caracterizando a presença ou ausência de determinados morfotipos. Dentre os principais morfotipos dos tripanosomatídeos, destacam-se a tripomastigota, amastigota, epimastigota, opistomastigota, coanomastigota e promastigota (Figura 1) (Simpson *et al.*, 2006; Kaufer *et al.*, 2017).

Figura 1: Principais morfotipos dos tripanosomatídeos

Legenda: Apresentação dos seis morfotipos dos tripanosomatídeos. (A) Morfotipo com flagelo fixado lateralmente no corpo celular. (B) Morfotipo com flagelo livre, com ausência de fixação lateral no corpo celular. (C) Morfotipo amastigota, não apresenta flagelo longo e móvel. (D) Estão indicados núcleo, cinetoplasto e estruturas associadas ao flagelo, como o corpo basal/corpo pró-basal (BB), bolsa flagelar (FP), axonema (Ax) e haste paraflagelar (PFR). As medidas usadas para indicar o morfo tipo celular são indicadas como: distância núcleo-posterior (NP), comprimento do corpo celular, comprimento do flagelo e distância cinetoplasto-posterior (KP).

Fonte: Adaptado de Wheeler *et al.*, 2013

A biologia celular dos tripanosomatídeos difere em alguns aspectos de outros seres eucariotos e inclui, como por exemplo, a presença de uma única mitocôndria ramificada, que se estende por toda a célula do protozoário e abriga DNA mitocondrial localizado na região denominada de cinetoplasto (Stuart *et al.*, 2008). O cinetoplasto fica próximo a dois macrodomínios da membrana plasmática do parasita: o corpo basal e a bolsa flagelar (Rodrigues *et al.*, 2014). Do corpo basal origina-se o flagelo, o qual é aderido a uma região denominada Zona de Fixação do Flagelo (FAZ), por meio de estruturas densas, possivelmente compostas por proteínas com múltiplos domínios. É na FAZ que ocorre a formação da bolsa flagelar, através da invaginação da membrana celular (Rocha *et al.*, 2006; Höög *et al.*, 2012).

No que diz respeito à membrana plasmática dos tripanosomatídeos, esta é estruturada principalmente por microtúbulos subpeculiares e pelo glicocálice. O último

é constituído por diversas glicoproteínas que garantem a interação entre os diferentes estágios evolutivos do parasita com as células hospedeiras de mamíferos, assim como com as células intestinais do inseto vetor (McConville *et al.*, 2002; Gull 2003; Overath *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2007).

2.2 TRIPANOSOMATÍDEOS E SUAS PATOLOGIAS

2.2.1 *Leishmania* sp. e leishmanioses

O gênero *Leishmania* engloba cerca de 50 espécies, sendo 20 delas causadoras de doenças em humanos (leishmanioses). Esses parasitas são transmitidos aos hospedeiros vertebrados através da picada de flebotomíneos fêmeas, dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, que estejam infectadas por espécies patogênicas de *Leishmania* (Santarém *et al.*, 2023; Akhoundi *et al.*, 2016). As leishmanioses afetam mais de 100 países nos continentes da América, África, Ásia e Europa, sendo mais prevalentes em áreas tropicais e subtropicais (Steverding 2017; Santarém *et al.*, 2023). Dependendo da espécie do agente etiológico, a leishmaniose pode se manifestar em três formas clínicas: leishmaniose visceral (LV), leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose mucocutânea (LCM). A LC tende a apresentar sintomas mais leves, com pápulas isoladas e circunscritas nos locais de inoculação do parasita, com possibilidade de formação de placas e úlceras. Esta forma geralmente é causada por espécies como *Leishmania amazonensis*, *Leishmania major* e *Leishmania mexicana* (Kevric *et al.*, 2015). Já a LCM, causada por *Leishmania braziliensis*, apresenta sintomas que afetam regiões de mucosas, como nariz e boca, causando congestão nasal, úlceras e destruição da mucosa (Handler *et al.*, 2015). A forma mais grave é a leishmaniose visceral, causada por espécies de *Leishmania infantum*, oriunda do Mediterrâneo, e *Leishmania donovani*, oriunda do Velho Mundo (Paquistão, África, China e Índia) (McGwire; Satoskar, 2013). Após a infecção, essa forma clínica se desenvolve lentamente ao longo dos anos, causando sintomas como febre, tosse, anorexia e hepatomegalia e esplenomegalia, assim como linfadenopatias (Kevric *et al.*, 2015).

2.2.2 *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas

Os parasitas patogênicos do gênero *Trypanosoma* são representados pelas espécies *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, e *Trypanosoma brucei*, causador da Tripanossomíase Humana Africana (HAT) (Rojas-Pirela *et al.*, 2023). A espécie *T. cruzi* foi descoberta há mais de 100 anos, e desde então atinge cerca de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo, sendo o continente da América Latina o mais afetado (Chagas, 1909; WHO, 2022). Desde a descoberta do *T. cruzi*, tem sido observada uma significativa heterogeneidade nos aspectos biológicos, bioquímicos e moleculares dessa espécie (Oswaldo Cruz 1999; Malheiros *et al.*, 2024). Em razão disso, atualmente foi definida uma classificação que propõe seis grupos genéticos, também chamados de Unidades Discretas de Tipagem (DTU), denominados TcI até o TcVI (Zingales *et al.*, 2009). No Brasil, a TcII e TcVI são as DTUs mais predominantes, principalmente na região central e sudeste. Os estudos têm observado que as diferenças entre os grupos de *T. cruzi* afetam diretamente o tipo de manifestações clínicas que o portador da doença de Chagas poderá desenvolver, pois a DTU do *T. cruzi* é capaz de influenciar na resposta imune e na progressão da doença no paciente (Malheiros *et al.*, 2024). Contudo, de modo geral, os aspectos clínicos variam de assintomáticos para grave comprometimento cardiovascular e/ou gastrointestinal crônico. A fase aguda da doença geralmente dura de 4 a 8 semanas, podendo apresentar sintomas leves ou ser assintomática. Cerca de 60 a 70% dos infectados por *T. cruzi* não apresentarão sintomas da doença de Chagas crônica, representando a forma crônica indeterminada da doença, sendo detectada apenas por sorologia reativa (IgG). Contudo, de 30 a 40% dos infectados não tratados podem evoluir para formas graves da doença, com comprometimentos cardíacos, neurológicos e digestivos, que podem ser fatais. (de Sousa *et al.*, 2024; Prata 2001; Rassi *et al.*, 2012).

2.2.3 *Trypanosoma brucei* e Tripanossomíase Humana Africana

Na espécie *Trypanosoma brucei* destacam-se as subespécies *Trypanosoma brucei gambiense* e *Trypanosoma brucei rhodesiense* como causadoras da HAT. Assim como as demais doenças provocadas por tripanossomatídeos, a HAT faz parte do grupo de doenças tropicais negligenciadas – NTDs (do inglês, *Neglected Tropical Diseases*), afetando de forma significativa principalmente a África Ocidental, Central e Oriental, em comunidades rurais com poucos recursos (Dowling; Doig, 2023;

Álvarez-Rodríguez *et al.*, 2022; Fèvre *et al.*, 2005). Essa doença é transmitida ao hospedeiro vertebrado através da picada da mosca tsé-tsé, um inseto hematófago do gênero *Glossina* (Kennedy, 2013; Büscher *et al.*, 2017).

Dependendo da subespécie do agente etiológico transmitido ao humano pela mosca tsé-tsé, o tempo de infecção pode ser diferente, sendo a subespécie *T. b. gambiense* responsável por causar a forma crônica da doença, que dura meses a anos, enquanto a *T. b. rhodesiense* causa a forma aguda, que dura algumas semanas, mas que tende a evoluir clinicamente mais rápido (Brun *et al.*, 2010; Kennedy, 2019). Caso não tratada, a evolução gradativa da HAT pode se tornar fatal, devido ao comprometimento do organismo como um todo, resultando em falência múltipla de órgãos (Jamonneau *et al.*, 2012).

Na clínica a HAT evolui em duas fases: estágio inicial (hemolinfático) e estágio tardio (meningoencefálico). O estágio hemolinfático (primeira fase) é caracterizado pela presença dos parasitas na corrente sanguínea e no sistema linfático, enquanto que, no estágio tardio (segunda fase) se iniciam os danos neurológicos, causados pela passagem dos tripanosomatídeos pela barreira hematoencefálica (BHE), atingindo o sistema nervoso central (Brun *et al.*, 2010; WHO, 2013). Na segunda fase, devido ao comprometimento do sistema nervoso central, o paciente tende a sofrer fortes dores de cabeça, tontura, desorientação e alterações de humor e no ciclo do sono, sendo o distúrbio do sono o principal sintoma da fase tardia. Para ambas as formas da doença, crônica ou aguda, os sinais clínicos são inespecíficos, com sintomas característicos para cada indivíduo afetado. Entretanto, de modo geral, a sintomatologia mais comum são: cefaleia, febre intermitente, dores musculares, alterações dermatológicas, linfadenopatias, anemia, hepatoesplenomegalia e distúrbios cardíacos (WHO, 2013).

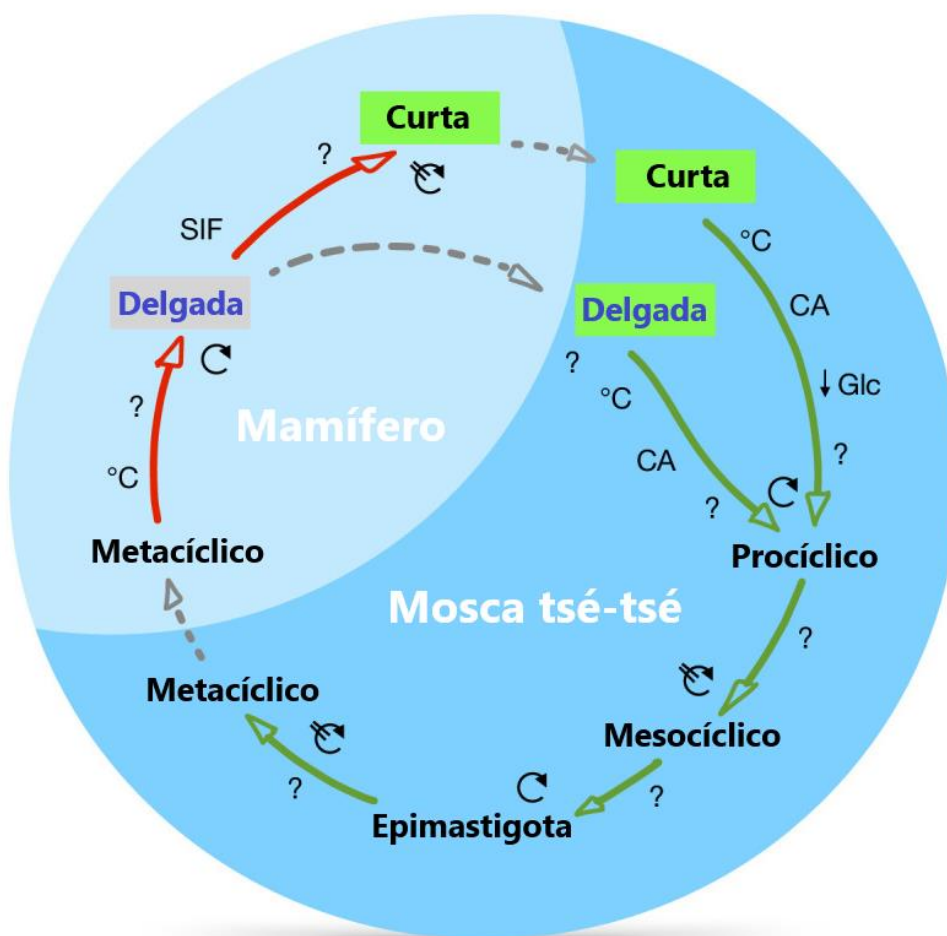
2.3 CICLO BIOLÓGICO DO *TRYPANOSOMA BRUCEI*

O ciclo biológico do *Trypanosoma brucei* se inicia quando a mosca tsé-tsé pica o hospedeiro infectado com o *T. brucei*, ingerindo os parasitas na forma tripomastigota proliferativa (forma delgada) e não proliferativa (forma curta) junto com o sangue (Schuster *et al.*, 2021). O sangue infectado entra pela probóscide do tsé-tsé e se direciona até o intestino médio do inseto. Neste local, os tripanossomas se diferenciam no estágio procíclico proliferativo e logo após podem migrar para o proventrículo e

colonizar ainda mais o intestino médio, se diferenciando em formas mesocíclicas e epimastigotas proliferativos, que se multiplicam e migram para a glândula salivar da mosca (Schuster *et al.*, 2021; Rose *et al.*, 2020; Matthews, 2005).

Os epimastigotas se diferenciam em células metacíclicas que são transferidas para o hospedeiro vertebrado após o repasto sanguíneo do inseto. Em seguida, na corrente sanguínea, essas células se diferenciam em tripomastigotas proliferativas (forma delgada), elevando a parasitemia (Silvester *et al.*, 2017; Langousis; Hill 2014). Quando a densidade de tripanossomas atinge determinado nível, ocorre o acúmulo do Fator de Indução *Stumpy* (SIF), o qual está associado à expressão da proteína associada à diferenciação (PAD1), ocasionando a diferenciação dos parasitas para a forma *stumpy* (curta), que são incapazes de proliferar e mais resistentes ao sistema imunológico inato e adaptativo do hospedeiro vertebrado (Fenn; Matthews, 2007). Esse escape imunológico se torna efetivo devido a um processo denominado variação antigênica, que consiste na capacidade da célula do parasita em mudar a composição da superfície de membrana, através da expressão de Glicoproteínas de Superfície Variante (VSG), evitando assim o reconhecimento do parasita pelo sistema imune (Figura 2) (Vickerman, 1978).

Figura 2: Ciclo biológico revisado do *Trypanosoma brucei*



Legenda: a mosca tsé-tsé infecta humanos durante o repasto sanguíneo quando inocula os tripanosomas metacíclicos na corrente sanguínea. No sangue os parasitas se diferenciam em tripomastigotas proliferativos (forma delgada) $\circlearrowright$, invadindo o interstício de diversos tecidos como cérebro e tecido adiposo. O fator de indução da forma Stumpy (SIF) inicia a via de diferenciação dependente da proteína associada à diferenciação 1 (PAD1) (caixas verde) para a forma de tripomastigotas não proliferativos (forma curta) $\circlearrowright$. O trabalho de Schuster *et al.*, (2021) sugere que tanto parasitas na forma curta, como de forma delgada, podem iniciar infecção na mosca tsé-tsé quando ingeridos no repasto sanguíneo sendo um único parasita capaz de se dividir continuamente e se diferenciar na forma procíclica de inseto, e posteriormente mesocíclica, epimastigota e metacíclico, reiniciando o ciclo. Temperatura ($^{\circ}\text{C}$), cis-aconitato (CA) e e privação de glicose ($\downarrow \text{Glc}$) são desencadeadores de transições na forma evolutiva do parasita.

Fonte: Adaptado de Schuster *et al.*, 2021

2.4 *TRYPANOSOMA BRUCEI* COMO ORGANISMO MODELO EM ENGENHARIA GENÉTICA

Na engenharia genética, especificamente no campo da genética reversa, o *Trypanosoma brucei* tornou-se um modelo para o estudo da regulação gênica de protozoários cinetoplastídeos, com a utilização de sistemas baseado em plasmídeos com expressão induzível de transgenes (Niemirowicz *et al.*, 2018). A possibilidade de incorporar esses sistemas em loci genômicos específicos de *T. brucei*, através de recombinação homologa, proporcionou diversas ferramentas para análises de genética reversa (Kelly *et al.*, 2007). Através do sucesso desse sistema neste organismo foi possível o desenvolvimento de ferramentas análogas em outros cinetoplastídeos (Yan *et al.*, 2001; Yan *et al.*, 2002; Taylor; Kelly, 2006; Yao *et al.*, 2007).

O sistema de expressão induzível é baseado no uso de RNA polimerases de bacteriófagos, principalmente a RNA polimerase do bacteriófago T7 (T7RNAP), em razão da descoberta de sua elevada capacidade transcricional e confiabilidade em tripanosomas (Wirtz *et al.*, 1994; Wirtz *et al.*, 1999). Além disso, o controle da transcrição é realizado pela inserção de operadores bacterianos nos sistemas, que se ligam diretamente a repressores bacterianos (Niemirowicz *et al.*, 2018; Wirtz; Clayton 1995). Para a funcionalidade desse sistema, foram desenvolvidas linhagens celulares tripanosômicas que expressam constitutivamente a proteína bacteriana repressora de tetraciclina (TetR) e a T7RNAP, possibilitando que, na presença da tetraciclina, ocorra a transcrição dos transgenes em altos níveis (Wirtz *et al.*, 1999; Bringaud *et al.*, 2000; Kelly *et al.*, 2007; Sunter *et al.*, 2012). Na maioria dos casos, esses sistemas são dotados de genes de resistência a antibióticos, conferindo um modo de seleção das linhagens que apresentam o plasmídeo integrado ao genoma. Para isso, é realizada a transfecção de DNA linearizado, contendo o transgene alvo e as modificações plasmidiais coerentes à linhagem geneticamente modificada (Kelly *et al.*, 2007).

O uso de ferramentas de expressão regulada possibilita ainda a modificação dos transgenes para codificação de proteínas marcadas por epítomos ou fragmentos proteicos, que podem, por exemplo, fornecer evidências sobre a localização subcelular da proteína alvo (no caso de marcação com proteína fluorescente) (Engstler 2004; Mayho *et al.*, 2006). Proteínas marcadas com determinados epítomos auxiliam ainda processos de purificação de complexos proteicos, e quando integrados a análise por espectrometria, com o conhecimento da sequência genômica do

organismo utilizado, pode fornecer a identificação de parceiros proteicos que podem interagir diretamente com a proteína alvo (Rigaut *et al.*, 1999; Zachariae 1998; Estevez 2001; Schimanski *et al.*, 2005).

Por muitos anos o *Trypanosoma brucei* tem sido então utilizado como organismo modelo para o estudo da regulação gênica em tripanosomatídeos, em grande parte devido a facilidade de manipulação genética e devido a disponibilidade de ferramentas para genética direta e reversa (Djikeng *et al.*, 2001; Dean *et al.*, 2017; Rico *et al.*, 2018).

2.5 ASPECTOS MOLECULARES DOS TRIPANOSOMATÍDEOS

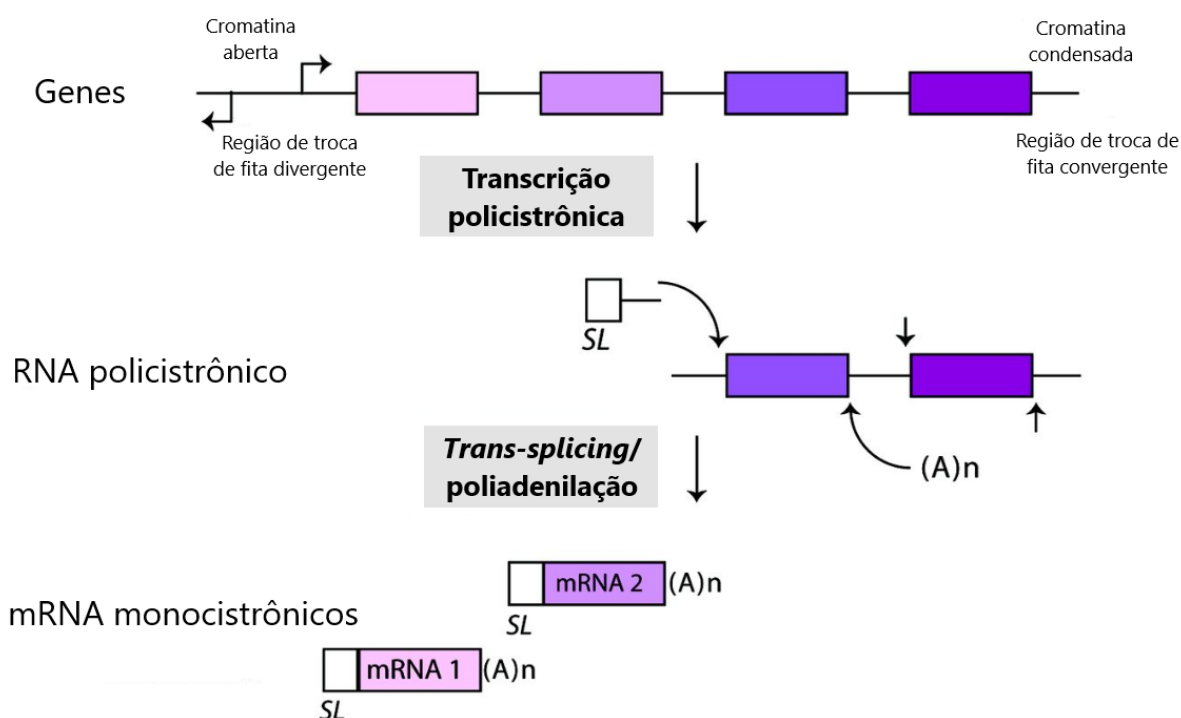
2.5.1 Transcrição policistrônica e processamento do mRNA

A linhagem dos tripanosomatídeos divergiu precocemente da linhagem evolutiva comum dos eucariotos, o que resultou na presença de características moleculares únicas em sua biologia (Lukeš *et al.*, 2018; Kaufer *et al.*, 2017). Entre os principais desvios dos mecanismos moleculares canônicos de eucariotos estão a transcrição policistrônica e o *trans-splicing* dos mRNAs associado a poliadenilação (Clayton 2016; Palenchar; Bellofatto 2006). De acordo com a literatura, acredita-se que os quadros de leitura abertos (ORFs – do inglês *open reading frames*) dos RNAs policistrônicos são transcritos simultaneamente, resultando, consequentemente, em um controle transcricional menos eficaz e predominância de uma regulação gênica pós-transcricional (Kramer, 2012; Günzl *et al.*, 2003).

Uma das etapas fundamentais e únicas da expressão gênica nos tripanosomatídeos é o *trans-splicing* ou processamento em *trans* do mRNA. Diferentemente da maioria dos eucariotos, que realizam principalmente o *cis-splicing*, esses organismos realizam o processamento do mRNA predominantemente por *trans-splicing*. Análises genômicas mostram que apenas três genes nos tripanosomatídeos são submetidos a *cis-splicing* (LeBowitz *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1994; Ivens 2005). Em tripanosomatídeos o *trans-splicing* promove duas reações de clivagem no mRNA policistrônico, gerando unidades de mRNAs individuais, com posterior adição de uma sequência líder de 39 nucleotídeos (SL-RNA) e de uma estrutura *cap* (7-metil guanosina). Esta, é modificada com quatro nucleotídeos metilados (*cap4*), na extremidade 5' do mRNA, enquanto que na extremidade 3' ocorre a poliadenilação, gerando o mRNA maduro (Figura 3) (Preusser *et al.*, 2012; Liang *et al.*, 2003).

O *trans-splicing* do mRNA imaturo (pré-mRNA) é catalisado por um complexo chamado spliceossomo, composto por um grande número de proteínas e de pequenas ribonucleoproteínas nucleares (snRNPs) (Liu; Cheng, 2015). Em eucariotos, durante o processo de *splicing* cinco snRNPs (U1, U2, U4, U5 e U6) se ligam ao pré-mRNA para mediar a montagem do spliceossomo e reconhecimento dos sítios de *splicing* no transcrito imaturo. Além disso, oito RNA helicases DExD/H box dependentes de ATP são essenciais neste processo, são elas: Sub2, Prp5, Prp28, Brr2, Prp2, Prp16, Prp22 e Prp43, atuando nas transições conformacionais do spliceossomo e na ativação, catálise, liberação do produto *lariat* (ou laço) e reciclagem das snRNPs (Cordin *et al.*, 2012).

Figura 3: Representação do processo de *trans-splicing* e poliadenilação do mRNA



Legenda: O processo transcricional é iniciado na região de troca de fita divergentes (cromatina aberta), e finalizado na região de troca de fita convergente (cromatina condensada). Um conjunto de genes que codificam proteínas com funções diferentes são inicialmente transcritos como policistrônicos, e em seguida, processados pelo mecanismo acoplado de *trans-splicing* e poliadenilação, resultando em mRNAs monocistrônicos maduros. Os retângulos indicam quatro sequências que codificam diferentes proteínas. (A) n, significa cauda poli (A)

Fonte: Adaptado de De Gaudenzi *et al.*, 2011

Em tripanosomas as snRNPs são menores e com ausência de domínios que são essenciais em outros eucariotos (Mottram *et al.*, 1989; Tschudi *et al.*, 1990). Além

disso, as RNAs helicase Prp31 e Prp43 demonstraram ser conservadas no sistema de *trans-splicing* em *T. brucei*, desempenhando as mesmas funções que no *cis-splicing* (Liang *et al.*, 2006). No entanto, apesar do progresso no conhecimento sobre a maquinaria do spliceossomo em tripanosomatídeos, ainda são necessários outros estudos para estabelecer de fato o papel de outras RNA helicases nesses organismos (Michaeli, 2011).

2.6 RNA HELICASES E SEU PAPEL NO PROCESSAMENTO DO RNA MENSAGEIRO EM EUCARIOTOS

As RNA helicases são enzimas fundamentais, conservadas desde leveduras até humanos, e muitas são indispensáveis para as diversas funções celulares (Fairman-Williams *et al.*, 2010). São caracterizadas pela presença de motivos conservados e pela dependência de um nucleotídeo trifosfatado (NTP), geralmente a adenosina trifosfato (ATP), para catalisar as reações bioquímicas (Sloan; Bohnsack, 2018). Apresentam uma ampla gama de atividades relacionadas ao metabolismo do RNA, incluindo processos como transcrição, *splicing*, exportação de mRNA, tradução e degradação do RNA, desempenhando um papel crucial na modulação da expressão gênica a fim de garantir a precisão e eficiência dos processos associados ao RNA (Cordin; Beggs, 2013; Hardwick; Luisi, 2013; Marintchev 2013; Martin *et al.*, 2013).

A maquinaria do processamento do mRNA envolve diversas proteínas e ribonucleoproteínas (RNP), responsáveis por formar o complexo spliceossomo. Esse complexo é montado através de interações RNA-RNA, RNA-proteína e proteína-proteína de forma ordenada, e regulado por mudanças conformacionais e composicionais nos elementos que o integram. As RNAs helicases desempenham papéis essenciais na remodelação desse complexo, desenovelando moléculas de RNA de fita dupla (dsRNA) e modulando as interações RNA-proteína. Nesse cenário, são capazes de atuar tanto como chaperonas de RNA, com o intuito de mediar as interações entre as moléculas do complexo, ou como catalizadores, dependentes da energia liberada através da hidrólise do ATP, para promover as interações do complexo até a conclusão do processamento do mRNA (De Bortoli *et al.*, 2021; Liu; Cheng, 2015; Tanner; Linder, 2001).

É interessante destacar que muitas RNA helicases que apresentam regiões estruturalmente conservadas abrigam domínios como *DEAD-box*, RecA e motivos

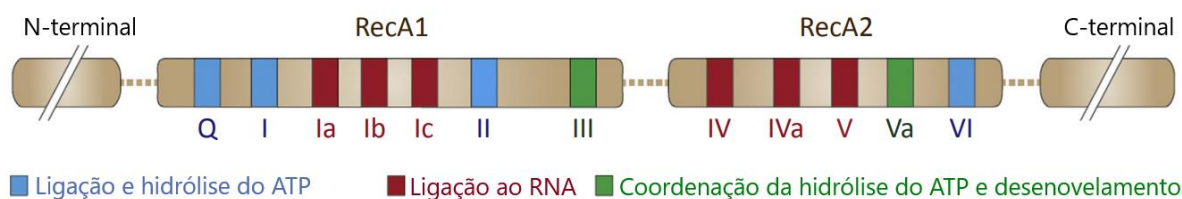
específicos, responsáveis por regular a interação com o RNA, proteínas e com o ATP, sendo este fundamental para fornecer a energia necessária e, por conseguinte, proporcionar a atividade catalítica da helicase (Sloan; Bohnsack, 2018).

2.7 CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DAS RNA HELICASES E DOMÍNIO *DEAD-BOX*

Em termos de estrutura, como dito no tópico anterior, as RNA helicases apresentam regiões com um elevado grau de conservação, principalmente no domínio central, que engloba domínios do tipo RecA (RecA1 e RecA2). Esses domínios contêm até 12 motivos conservados, associados à interação da RNA helicase com o ATP e com RNA. A maioria das RNA helicases pertence à superfamília de helicase 2 (SF2), agrupando-se em subfamílias como DEAD/DExD-box e DEAH/DExH-box (Sloan; Bohnsack 2018; Jarmoskaite; Russell 2014; Linder; Jankowsky 2011). Essas subfamílias apresentam um motivo conservado de aminoácidos (Asp-Glu-Ala-Asp/His), formando a palavra DEAD ou DEAH ou ainda, com a ausência da alanina e troca do último aspartato pela histidina, DExH-box, todas compartilhando semelhanças estruturais, como melhor definidas para a subfamília *DEAD-box* (também conhecida como DDX) (Cordin *et al.*, 2012; Cargill *et al.*, 2021). O domínio RecA1, por exemplo, apresenta quatro motivos de ligação ao ATP (motivo Q, motivo I, motivo II e motivo III), sendo o motivo “Q” ausente na DEAH-box, e dois de ligação ao RNA (motivo Ia e Ib). Já o domínio RecA2 consiste em um motivo VI, que regula a ação da ATPase para a reação de desenrolamento de dsRNA, e dois motivos de ligação ao RNA (IV e V) (Figura 4) (Jarmoskaite; Russell, 2010; Owttrim, 2013). Apesar das semelhanças estruturais entre as RNA helicases, diferenças na função bioquímica podem surgir, uma vez que exibem domínios auxiliares variáveis nas extremidades N e C-terminais, atribuindo especificidade à helicase em interações com RNAs específicos ou cofatores proteicos. Contudo, os papéis das RNA helicases ainda não foram totalmente elucidados no que diz respeito à compreensão total dos mecanismos moleculares em que desempenham suas funções, como na sua participação durante a iniciação da tradução do mRNA (Cargill *et al.*, 2021; Zhang; Li 2021). Dentre as RNA helicases, o eIF4A, associada ao início da tradução e interação com o complexo de iniciação de tradução eIF4F, é uma das RNA helicases da subfamílias *DEAD-box*

melhor caracterizada e responsável por desempenhar um papel essencial na tradução geral (Rogers *et al.*, 2002; Andreou; Klostermeier, 2013).

Figura 4: Domínios e motivos conservados de uma RNA helicase *DEAD-box*



Legenda: O núcleo da helicase apresenta dois domínios do tipo RecA, que ao todo contém 12 motivos de sequência conservados. Os motivos estão coloridos em azul, vermelho e verde, caracterizando suas funções primárias durante o ciclo da RNA helicase. As extremidades N e C terminais variam de forma significativa a depender do tipo de RNA helicase.

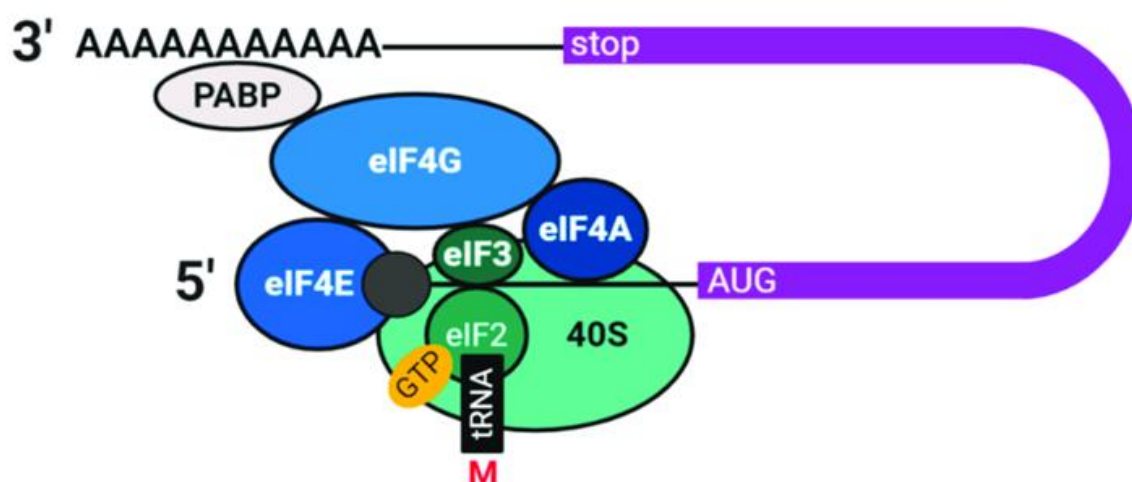
Fonte: Adaptado de Sloan; Bohnsack, 2018

2.8 INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO E COMPLEXO EIF4F EM EUCARIOTOS

A tradução desempenha um papel crucial na regulação gênica, concentrando-se na decodificação da informação contida no mRNA e levando à síntese da proteína correspondente. Esse processo se divide em quatro fases principais: iniciação, alongamento, terminação e reciclagem do ribossomo, cada uma contribuindo para a eficiência e precisão na síntese de proteínas (Blanchet; Ranjan, 2022). O início da tradução é formado por complexo ternário composto por um fator de iniciação eucariótico 2 (eIF2), uma molécula de GTP e uma metionina associada a um RNA transportador iniciador (eIF2-GTP-Met-tRNA_i). Esse complexo é acoplado na subunidade ribossomal menor (40S), formando o complexo de pré-iniciação 43S (PIC) (Wang *et al.*, 2022). O PIC 43S é recrutado para a extremidade *cap* (7-metilguanossina) 5' do mRNA, associado a um complexo de iniciação eucariótico 4F (eIF4F), que consiste na participação de três subunidades: o fator de iniciação eucariótico eIF4G, eIF4E e o eIF4A (Figura 5) (Wells *et al.*, 1998; Aitken; Lorsch, 2012). O eIF4G atua como uma proteína âncora, ligando-se diretamente ao eIF4A, uma RNA helicase ATP-dependente do tipo *DEAD-box*, ao eIF4E, a primeira subunidade do complexo a ser descoberta e responsável por se ligar na região *cap* 5' do mRNA, e ao eIF3, responsável por mediar o recrutamento do complexo para a subunidade ribossomal 40S (Jackson; Hellen; Pestova, 2010; Gradi *et al.*, 1998). Com a estruturação do complexo, a helicase eIF4A, junto com uma proteína acessória chamada eIF4B, tem

o papel de desenovelar as estruturas secundárias na região 5' não traduzida (5' UTR) do mRNA, enquanto a região 3' se associa a uma proteína de ligação a poli (PABP), que se liga ao eIF4G, promovendo a circularização do mRNA (Aitken; Lorsch, 2012; Tarun; Sachs, 1996). O complexo formado pelo PIC 43S/eIF4F e demais proteínas acessórias percorrem a região 5' UTR até encontrar o códon de iniciação AUG. Com o reconhecimento deste é formado o complexo 48S, com adição do eIF5 e eIF5B, responsáveis por estimular a hidrólise do GTP ligado ao eIF2, promovendo o deslocamento do complexo e união com a subunidade 60S, resultando na formação do ribossomo 80S (Aitken; Lorsch, 2012; Jackson; Hellen; Pestova, 2010). Ao final da iniciação ocorre a dissociação dos fatores e início da fase de alongamento, com posterior terminação e reciclagem da tradução, que por sua vez possibilita novas rodadas de iniciação no mesmo mRNA (Uchida *et al.*, 2002).

Figura 5: Representação do complexo eIF4F e parceiros.



Legenda: Esquema do processo de iniciação a tradução dependente de *cap* 5', em circuito fechado. As proteínas em verde formam o complexo 43S e as azuis o complexo eIF4F; eIF: fator de iniciação da tradução eucariótica, M: metionina, GTP: guanosina-5'-trifosfato, PABP: proteína de ligação a poli (A).
Fonte: Adaptado de Christou-Kent *et al.*, 2020

2.8.1 eIF4G

Esta é uma das maiores proteínas do complexo eIF4F, atuando como uma proteína adaptadora que se liga ao eIF4E, eIF4A, eIF3 e a PABP. A região N-terminal do eIF4G apresenta o motivo de ligação 4E-BP, responsável por interagir com o eIF4E, sendo indispensável para uma tradução dependente *do cap*. Nessa mesma região, em mamíferos e leveduras, está também o sítio PAM1 de ligação a PABP, imprescindível para circularização do mRNA no complexo (Jackson *et al.*, 2010).

Na sua região central, o eIF4G apresenta domínios como HEAT-1 (também chamado de MIF4G), onde ocorre a ligação com o eIF3 e com a helicase eIF4A, através da atividade de alinhamento com os motivos do domínio *DEAD-box* e de modulação quando também se liga ao motivo HEAT-2 (conhecido como MA3, localizado na região C-terminal do eIF4G). O eIF4G possui ainda um terceiro domínio HEAT, conhecido como W2, que interage com uma quinase, denominada Mnk (Schutz *et al.*, 2008; Marintchev *et al.*, 2009).

2.8.2 eIF4E

O fator de iniciação eucariótico eIF4E é uma proteína de ligação ao *cap* de 7-metilguanosina (7-m-GTP) presente na extremidade 5' da maioria dos mRNAs eucarióticos e fundamental para a tradução. Juntamente com outros fatores, o eIF4E auxilia no transporte do mRNA para a subunidade ribossomal 40S (Rhoads, 2009). Este é um dos fatores menos abundantes do complexo eIF4F representando um fator limitante na regulação das taxas de iniciação da tradução dependente de *cap* (Hiremath *et al.*, 1985; Duncan *et al.*, 1987). Uma das formas de sua regulação é através das proteínas de ligação ao eIF4E (4E-BPs), que competem pelo mesmo sítio de ligação do eIF4E com o eIF4G, podendo causar efeito inibitório na tradução (Piserà *et al.*, 2018).

A regulação da disponibilidade do eIF4E pode ocorrer a nível transcricional, pós-transcricional e pós-traducional. Com a descoberta da localização nuclear do eIF4E, e também nos corpos de processamento de ribonucleoproteínas citoplasmáticas (conhecido como corpos P), foi possível identificar diversas funções bioquímicas, incluindo seu envolvimento na exportação de mRNAs específicos para o citoplasma e no equilíbrio da retenção/degradação desses mRNAs (Romagnoli *et al.*, 2021; Piserà *et al.*, 2018).

2.8.3 eIF4A

O fator de iniciação eucariótico eIF4A é típico parceiro dos complexos eIF4F em eucariotos e uma das menores proteínas da família de RNA helicases do tipo *DEAD-box*, encontrada associada ao complexo mencionado (Schutz *et al.*, 2008). Em mamíferos, foram identificados duas isoformas do eIF4A: o eIF4AI (DDX2A) e seu

parálogo eIF4AII (DDX2B), que atuam na resolução de estruturas secundárias na região 5' UTR dos mRNAs (Schutz *et al.*, 2008).

Assim como todas as RNA helicases *DEAD-box*, o eIF4A é regulado por cofatores proteicos, dentre os quais inclui o eIF4B e eIF4G. A interação dos domínios RecA1 e RecA2 do eIF4A com as repetições HEAT do domínio MIF4G do eIF4G promove e estabiliza o eIF4A em uma conformação semiaberta, estimulando seu sítio ATPase e favorecendo a ligação com o mRNA. Com isso, esse contato do MIF4G com os domínios RecA1 e RecA2 do eIF4A, induz uma rápida troca entre o estado aberto e fechado da helicase, aumentando assim a ação catalítica sobre o mRNA (Ponting 2000; Bohnsack *et al.*, 2023).

2.8.4 RNA helicases associadas a iniciação da tradução em eucariotos

O fator eIF4A não é a única RNA helicase associada à iniciação da tradução e com ação ligada a do complexo eIF4F. A descoberta da helicase DHX29, também conhecida como DExH-box 29, ampliou os conhecimentos sobre as regiões 5' UTRs do mRNA durante a iniciação da tradução (Parsyan *et al.*, 2009). Esta helicase tem a função de desenrolar grampos de RNA estáveis na região 5' UTR, promovendo o correto posicionamento do mRNA no ribossomo e de inspeção base por base. Já outra RNA helicase *DEAD-box* chamada DDX6 em humanos e Dhh1 de levedura, atua sobre o mecanismo de repressão da tradução e a renovação dos mRNAs, iniciado pela interação com o complexo chamado Ccr4-Not, responsável por mediar o decaimento do mRNA através da remoção da cauda poli (A) (deadenilação) e, em seguida, pelo decapeamento da extremidade 5' do mRNA (Parker; Sheth 2007; Pisareva *et al.*, 2008; Fischer 2002; Mathys *et al.*, 2014; Buschauer *et al.*, 2020). Além disso, também é conhecida por fazer parte da família chamada DHH1/RCKp54/DDX6, sendo comumente encontrada nos corpos P e grânulos de estresse (Thanin Chantarachot *et al.*, 2019; Minshall *et al.*, 2009; Parker; Sheth 2007).

Outras helicases, como as Ded1/DDX3, Vasa/DDX4 e RNA helicase A (RHA/DHX9) desempenham papéis na iniciação da tradução, parecendo também ter atividades em eventos como transcrição, *splicing* e transporte de pré-mRNA, embora tais papéis ainda estão em processo de elucidação (Hilal Yeter-Alat *et al.*, 2023; Adashev *et al.*, 2023; Gulliver *et al.*, 2021; Young Tae Lee *et al.*, 2023). A Ded1/DDX3, por exemplo, atua estimulando ou reprimindo a tradução, assim como parece realizar

transporte núcleo-citoplasma e participar de eventos como segregação cromossômica na mitose, associação de EJC (complexo de junção exônica) e spliceossomo (Iost *et al.*, 1999; Cruz *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2008; Shih *et al.*, 2007; Yedavalli *et al.*, 2004; Pek; Kai 2011; Topisirović *et al.*, 2009).

A RNA helicase DDX3X, derivada da subfamília da DDX3, é uma helicase de humanos que se associa com o eIF4E e eIF3 (Shih *et al.*, 2011, Gulay *et al.*, 2020; Sen *et al.*, 2019). Em levedura, a DDX3X, denominada Ded1p, tende a se acoplar na forma inativa do complexo de iniciação à tradução eIF4F/mRNA. A partir de sua interação com eIF4G, Ded1p promove a hidrólise do ATP, tornando o complexo tradicionalmente ativo e promovendo a varredura da subunidade ribossomal 43S até o complexo eIF4F, atuando no desenovelamento de trechos de fita dupla longas e estruturadas em regiões 5' UTR do mRNA, mostrando-se mais eficiente que a própria eIF4A nesse processo (Cruz *et al.*, 1997; Lai *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2008; Hilliker *et al.*, 2011; Berthelot *et al.*, 2003; Marsden *et al.*, 2006). Esta subfamília Ded1/DDX3 se caracteriza através de motivos específicos em domínios amino e carboxil-terminal, como o NES (sinal de exportação nuclear) e o domínio de ligação ao eIF4E, ambos na região N-terminal (Mokdadi *et al.*, 2021; Mo *et al.*, 2021).

Em relação a Vasa/DDX4 e a RNA helicase A (RHA/DHX9), ambas estimulam o início da tradução. A Vasa se liga ao eIF5B, que por sua vez pode regular a tradução de mRNAs específicos, assim como a RHA/DHX9 atua seletivamente em mRNAs celulares e retrovirais complexos, entretanto, a base molecular de como essas proteínas atuam na tradução ainda não é totalmente caracterizada (Liu *et al.*, 2009; Johnstone, 2004; Bolinger *et al.*, 2010; Ranji *et al.*, 2011).

2.9 INICIAÇÃO DA TRADUÇÃO E COMPLEXOS DO TIPO EIF4F EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Em tripanosomatídeos, a etapa da iniciação da tradução envolve mecanismos regulatórios que ainda não são totalmente elucidados (Penteado *et al.*, 2024). Nesses parasitas, foram descobertos diversos homólogos das subunidades do complexo eIF4F, sendo cinco do eIF4G (EIF4G1 a EIF4G5), seis do eIF4E (EIF4E1 a EIF4E6) e dois do eIF4A (EIF4AI e EIF4AIII) (Freire *et al.*, 2014b; Freire *et al.*, 2014a; Dhalia *et al.*, 2005). Além destes, foram descobertos homólogos das proteínas acessórias que integram o complexo, como a PABP, das quais três homólogos (PABP1, PABP2 e

PABP3) foram identificados, sendo a PABP3 ausente de espécies de *Trypanosoma* (de Melo Neto *et al.*, 2018; da Costa Lima *et al.*, 2010). Os homólogos identificados de *L. major* e *T. brucei* têm a capacidade de formar cinco tipos diferentes de complexos semelhantes ao eIF4F, nos quais ocorre a associação confirmada das seguintes subunidades: EIF4E3/EIF4G4, EIF4E4/EIF4G3/EIF4A1, EIF4E5/EIF4G1, EIF4E5/EIF4G2 e EIF4E6/EIF4G5, (Freire *et al.*, 2014b; Yoffe *et al.*, 2009; Freire *et al.*, 2017). Dentre todos os complexos do tipo eIF4F identificados, aqueles que envolvem as subunidades EIF4E3/EIF4G4 e EIF4E4/EIF4G3/EIF4A1 são os mais bem caracterizados até o momento (Freire *et al.*, 2017).

2.9.1 Homólogos do eIF4G

Os cinco homólogos de eIF4G (EIF4G1 até EIF4G5) em tripanosomatídeos foram descobertos em *Leishmania major* e *Trypanosoma brucei* (Yoffe *et al.*, 2006; Freire *et al.*, 2011). O estudo desses homólogos identificou a presença e conservação do domínio MIF4G, com repetições HEAT em *tandem*, sendo um domínio crítico para a montagem do aparato de tradução (Dhalia *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2019). Além disso, fora do domínio MIF4G, certos homólogos como EIF4G3 e EIF4G4, compartilham uma região N-terminal curta e com algumas sequências conservadas, característica que não está presente nos demais homólogos (Moura *et al.*, 2015).

A interação do homólogo EIF4G3 com o EIF4A1 e EIF4E4 é essencial para a tradução geral nesses parasitas, enquanto a depleção do EIF4G4 parece não afetar de forma significativa a síntese proteica (Moura *et al.*, 2015). No que diz respeito aos demais homólogos do eIF4G, os papéis da interação do EIF4G1 e EIF4G2 com EIF4E5, e do EIF4G5 com EIF4E6 na tradução, ainda não estão totalmente caracterizados (Freire *et al.*, 2014b; Freire *et al.*, 2014a).

2.9.2 Homólogos do eIF4E

Em tripanosomatídeos, os seis homólogos do eIF4E (EIF4E1 até EIF4E6) apresentam peculiaridades notáveis, com variações em termos de morfologia. Essas variações são descritas em relação ao tamanho de cada homólogo, à sua capacidade de interação com os eIF4Gs e à afinidade de ligação à estrutura *cap4* dos mRNA. Logo, os diferentes tipos de eIF4E podem não se restringir a iniciação da tradução

(Freire *et al.*, 2017; Yoffee *et al.*, 2009; Das, 2020). Estes eIF4Es foram separados em grupos, onde o grupo 1 é composto pelo EIF4E1 e EIF4E2, que apresentam localização nuclear e citoplasmática, com baixa abundância, e incapazes de formar complexos semelhantes ao eIF4F. No grupo 2, formado pelo EIF4E3 e EIF4E4, se encontram eIF4Es citoplasmáticos, com maior abundância e com N-terminais maiores, capazes de formar complexos semelhantes ao eIF4F, sendo identificados como essenciais na tradução geral e sobrevivência celular. Já o grupo 3 é formado pelo EIF4E5 e EIF4E6, proteínas pequenas, mas com capacidade de se ligar a homólogos do eIF4G, resultando em complexos eIF4F típicos mas que podem não estar envolvidos na tradução geral (de Melo Neto *et al.*, 2015; Freire *et al.*, 2017; Das, 2020).

2.9.3 Homólogos do eIF4A

Em tripanosomatídeos, o primeiro homólogo do eIF4A (denominado LeIF), atualmente conhecido como EIF4AI, foi primeiramente identificado em *Leishmania major* e *Leishmania braziliensis* (Yasir A. W. Skeiky *et al.*, 1995; Skeiky *et al.*, 1998). Posteriormente, um segundo homólogo foi identificado em *L. major*, inicialmente denominado EIF4A2 e atualmente chamado EIF4AIII, por ser o ortólogo funcional do EIF4AIII de mamíferos (Dhalia *et al.*, 2006). Tanto o EIF4AI como o EIF4AIII são conservados em *T. brucei* (Dhalia *et al.*, 2005). Em uma análise de sequência dessas proteínas em *T. brucei*, identidades de 88% para a EIF4AI e 82% para EIF4AIII foram observadas em comparação com seus respectivos ortólogos em *L. major*. Nas bases de dados ambas são as mais próximas do eIF4A de humanos, com identidade >50% e presença dos mesmos motivos típicos das RNA helicases *DEAD-box* (Dhalia *et al.*, 2006).

Além do EIF4AI e EIF4AIII apresentarem uma correspondência de sequência maior do que 50% com o eIF4A humano, também apresentam semelhanças na abundância, localização celular e participação na iniciação da tradução, sendo o EIF4AI mais abundante, com localização citoplasmática e capacidade de se ligar ao domínio HEAT do EIF4G3 e EIF4G4, enquanto que o EIF4AIII é menos abundante e possui localização nuclear, indicando um papel relacionado ao metabolismo de RNA à nível nuclear e ausência de participação na iniciação da tradução (Dhalia *et al.*, 2005; Dhalia *et al.*, 2006). No entanto, assim como o complexo eIF4F de humanos não se

limita a ação de apenas uma RNA helicase (eIF4A), homólogos de subunidades de complexos do tipo eIF4F selecionados de tripanosomatídeos mostraram-se associados a diferentes RNA helicases com presença do domínio *DEAD-box* (Bezerra *et al.*, 2022).

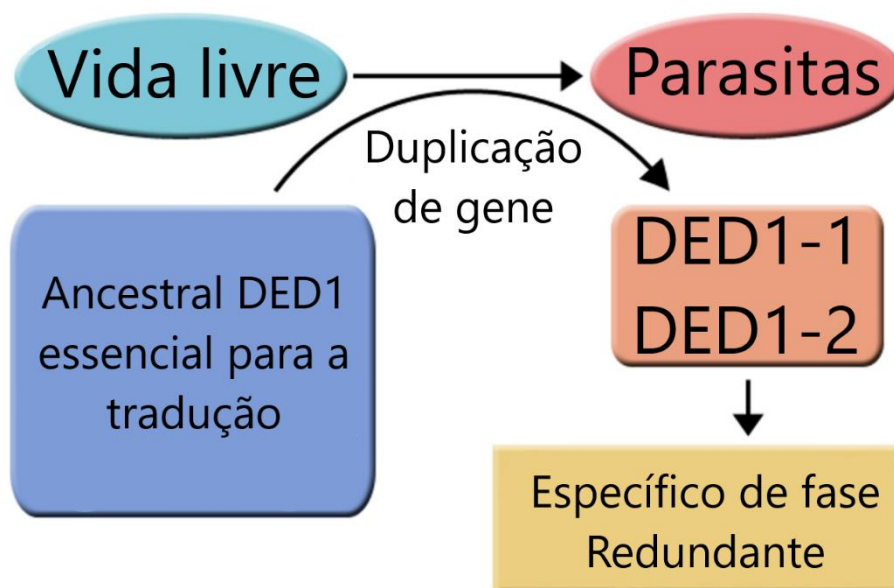
2.9.4 RNA helicases da família *DEAD-box* envolvidas na iniciação da tradução em tripanosomatídeos

O fator eIF4A, como dito anteriormente, é uma RNA helicase *DEAD-box* bem caracterizada e amplamente estudada em diversos organismos, incluindo humanos e tripanosomatídeos (Casacuberta-Serra *et al.*, 2023; Brito Querido *et al.*, 2024; Abdelkrim *et al.*, 2018; Moura *et al.*, 2015). Outras RNA helicases da família *DEAD-box* que podem ter um papel tão fundamental quanto o EIF4A na iniciação da tradução em tripanosomatídeos, e em associação com complexos do tipo eIF4F, foram menos exploradas.

2.9.4.1 DED1-2, DED1-1, DBP2B

Com o avanço das pesquisas em bancos de dados genômicos de *Leishmania* e *Trypanosoma*, foi possível identificar duas proteínas parálogas da proteína Ded1/DDX3, relacionadas a subfamília de RNA helicases *DEAD-box* e com 67% de similaridade de sequência, sendo provavelmente oriundas de duplicação gênica de um único gene ancestral (Figura 6). Inicialmente a DED1-1 (também denominada de HEL67 em *T. brucei*) e DED1-2 (também denominada de DED1), foram identificadas em *Leishmania*, onde foi possível avaliar a sua abundância em diferentes fases de vida do parasita, evidenciando que a DED1-1 é mais abundante em promastigota, enquanto a DED1-2 é dominante na fase amastigota (Zinoviev *et al.*, 2012a). Posteriormente, estudos experimentais em iniciação da tradução nesses parasitas identificaram a presença destes dois parálogos associados ao complexo de ligação ao *cap* (Zinoviev *et al.*, 2011; Hilliker *et al.*, 2011).

Figura 6: Resumo gráfico da duplicação de gene da DED1 em tripanosomatídeos



Legenda: Tripanosomatídeos codificam dois ortólogos da DED1, que apresentam funções redundantes e expressão específica a depender do estágio evolutivo.

Fonte: Adaptado de Zinoviev *et al.*, 2012a.

A partir de análise de bioinformática da sequência consenso de um subconjunto da subfamília Ded1/DDX3, foi possível identificar que a DED1-2 e a HEL67 de *T. brucei* e *L. infantum* compartilham parcialmente as mesmas características (Floor *et al.*, 2016; Mokdadi *et al.*, 2021). No que diz respeito especificamente a HEL67, ela é uma proteína essencial para o metabolismo do RNA e para a infectividade e diferenciação celular em *L. infantum* e *L. major*. Um estudo em *L. infantum* evidenciou que a deleção genômica da HEL67 foi capaz de reduzir consideravelmente o crescimento das formas promastigotas e afetou a diferenciação para amastigotas (Satish Chandra Pandey *et al.*, 2020; Padmanabhan *et al.*, 2012; Padmanabhan *et al.*, 2016). Em *L. donovani*, uma vacina candidata contra leishmaniose visceral foi proposta baseada na mutação nula da HEL67 (*LdHel67^{-/-}*), que impediu a diferenciação em amastigotas axênicos, com o parasita tornando-se incapaz de infectar os hamsters do estudo, e induzindo imunidade protetora (*L. infantum*) (Satish Chandra Pandey; Pande; Samant, 2020).

Em tripanossomas, a DED1-2 parece ser essencial durante todo o ciclo de vida do parasita, enquanto a HEL67 parece desempenhar um papel menor. Esse dado foi confirmado através de experimentos de silenciamento mediados por RNA de interferência (RNAi) na HEL67 (*Tb927.10.14550*), a qual demonstrou ter um mínimo

impacto na viabilidade celular, enquanto o silenciamento da DED1-2 (*Tb09.211.3510*) foi capaz de interromper o crescimento celular. Quando ambos os genes foram silenciados, foram identificados níveis muito baixos de tradução global, com morte celular ocorrendo 48h após a indução com RNAi (Zinoviev *et al.*, 2012a).

Ainda em *T. brucei*, ensaios de espectrometria de massas identificaram a HEL67 e outra RNA helicase *DEAD-box* chamada DBP2B (*Tb927.8.1510*) coprecipitadas e significativamente enriquecidas com os EIF4E3 e EIF4G4, respectivamente (Bezerra *et al.*, 2022). A descoberta da associação da DBP2B com complexos citoplasmáticos chama a atenção, considerando que essa proteína parece ter funções predominantemente nucleares, sendo essa característica semelhante a de seus possíveis homólogos, Dbp2 em leveduras e a DDX5 em humanos, ambos associados à terminação da transcrição, regulação de RNAs não codificantes longos (lncRNAs) e interação com proteínas de ligação ao RNA (RBPs) durante a exportação nuclear de mRNAs (Xing *et al.*, 2018; Bohnsack *et al.*, 2023; Wai Kit Ma e Tran, 2014). Sendo assim, esses achados sugerem que a DBP2B também pode desempenhar funções similares, incluindo um possível papel no transporte de mRNAs para complexos do tipo eIF4F.

Além disso, a DBP2B, juntamente com a poli(A) polimerase – PAP1 (*Tb927.3.3160*), são os únicos genes conhecidos contendo íntrons no genoma total de *T. brucei* (Billington *et al.*, 2023; Mair *et al.*, 2000; Berriman *et al.*, 2005; Siegel *et al.*, 2010). Contudo, para ambos os genes mencionados, podem existir possíveis parceiros funcionais com ausência de íntrons, como a *Tb927.7.3780* (PAP1) e *Tb927.10.6630* (DBP2A ou também chamada de HEL64) (Preusser *et al.*, 2014; Missel *et al.*, 1995).

Posteriormente, os ensaios em *T. brucei* foram repetidos em *L. infantum* e *L. amazonensis*, confirmando a presença da HEL67 assim como da DED1-2 e DBP2B associadas ao complexo EIF4E3/EIF4G4 de ambas as espécies de *Leishmania* (Brito 2023). Esse dado é possivelmente indicativo de conservação de função e associação com um dos complexos semelhantes a eIF4F mais bem caracterizados de tripanosomatídeos. No entanto, investigações adicionais são necessárias para confirmar essa hipótese e elucidar os mecanismos envolvidos.

2.9.4.2 DHH1

O estudo da DHH1 na forma procíclica de *T. brucei* identificou que esta é uma proteína que interage de forma seletiva com mRNAs associados a regulação do desenvolvimento do parasita, mas sua associação com complexos eIF4F ainda permanece incerta (Kramer *et al.*, 2010). Esta proteína também foi implicada em diversos processos associado ao metabolismo do RNA, principalmente relacionados ao seu acúmulo em grânulos de estresse e corpos P. Em *T. cruzi*, a DHH1 participa de complexos independentes de polissomos, distribuída difusamente no citoplasma e associada a grânulos citoplasmáticos, cujos tamanhos variam conforme o parasita é exposto a estresse nutricional ou agentes que interferem na tradução (Kramer *et al.*, 2008; Holetz *et al.*, 2007; Kramer *et al.*, 2010; Holetz *et al.*, 2010).

Ainda em *T. cruzi*, através de experimentos de imunoprecipitação (IP), foi evidenciada a interação da DHH1 com componentes dos grânulos de estresse, incluindo fatores de iniciação da tradução como o complexo eIF3 e o EIF4AI (Holetz *et al.*, 2010). Os corpos P e os grânulos de estresse nos quais a DHH1 está presente são estruturas dinâmicas que contêm mRNA, podendo aumentar de número ou tamanho a depender das condições de estresse na célula (Holetz *et al.*, 2010). Durante essas condições, a maioria dos mRNAs se comportam em um estado de repressão da tradução, sendo direcionado para: armazenamento; decaimento mediado por enzimas de decapeamento (Dcp1 e Dcp2) e exonucleases hidrolíticas 5'-3' (Xrn1); ou reciclagem para posterior retorno à maquinaria de tradução (Balagopal; Parker, 2009; Teixeira, 2005). Em *T. brucei*, resultados recentes ainda não publicados, obtidos por ensaios de IP seguidos de espectrometria de massas na forma sanguínea do parasita, identificaram a associação da DHH1 (*Tb927.10.3990*) com o complexo EIF4E6/EIF4G5 (Silva, 2024), algo não esperado, mas que pode ser relevante do ponto de vista da funcionalidade deste complexo.

2.9.5 RNA helicases e complexos tipo eIF4F de tripanosomatídeos

Considerando os pontos abordados nesta revisão, é notável a necessidade de elucidação dos papéis das RNA helicases citadas com envolvimento na iniciação da tradução em tripanosomatídeos. Isso pois, ainda não está claro o seu papel na regulação gênica, logo, entender como essas helicases se relacionam com os parceiros funcionais dos complexos tipo eIF4F pode contribuir significativamente,

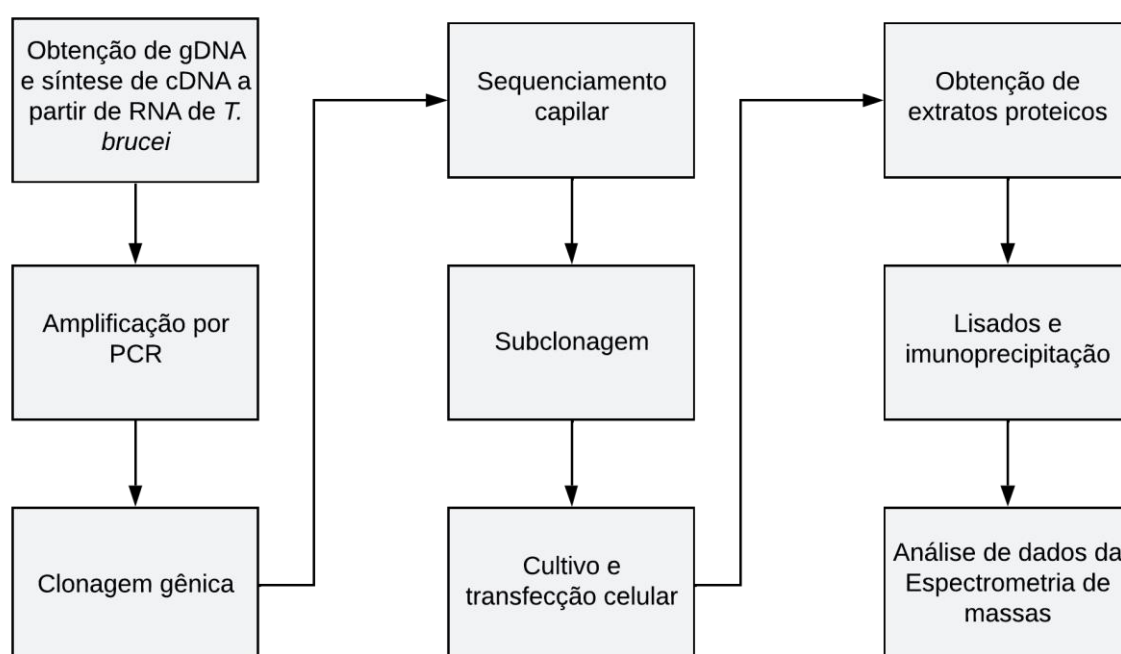
através de novas informações sobre a estruturação desses complexos, assim como no seu papel na tradução, com possibilidade de destacar aspectos diferenciados de suas funções.

Esses aspectos podem ser elucidados através da integração de dados já estabelecidos na literatura, juntamente com a descoberta de quais proteínas conhecidas se associam com essas helicases, indicando possíveis interações diretas que podem ser imprescindíveis para a tradução.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

A figura 7 apresenta um diagrama esquemático das estratégias metodológicas utilizadas para atingir os objetivos deste estudo, que consistem na caracterização das possíveis interações proteína-proteína das RNA helicases DED1-2, HEL67, DBP2B e DHH1, em associação com parceiros funcionais dos complexos tipo eIF4F.

Figura 7: Diagrama esquemático dos procedimentos metodológicos



Fonte: O autor (2025)

3.1 OBTENÇÃO DE DNA GENÔMICO E EXTRAÇÃO DE RNA DE *T. BRUCEI* PARA SÍNTESE DE CDNA

Ao iniciar o estudo, o laboratório já dispunha de DNA genômico (gDNA) total de *T. brucei* da linhagem transgênica 29-13. No entanto, para a obtenção do DNA complementar (cDNA), foi necessário realizar a extração do mRNA total de *T. brucei* 29-13 em sua fase procíclica, seguida pela síntese de cDNA. Essa etapa foi imprescindível para amplificação apenas do gene *DBP2B* (número de acesso no *TritypDB* - Tb427.08.1510), devido à presença de um íntron contendo 1324 pb neste gene, situado entre a região de 1225-1226 pb do total codificante de 1710 pb.

Para a extração de RNA, foram cultivadas células de *T. brucei* de linhagem transgênica 29-13 (oriundas da cepa selvagem 427) (WIRTZ et al.,1999). Em seguida, uma concentração total de 1×10^7 células da cultura foi centrifugada a $1690 \times g$ por 10 minutos. O sedimento resultante foi ressuspensionado com o tampão *Phosphate-buffered saline* 1X (PBS) para a lise celular e extração do RNA com uso do *kit* de extração “*RNeasy Mini Kit (Qiagen)*”. Após o procedimento, foram separadas alíquotas para análise da integridade do RNA através do perfil de bandamento em corrida eletroforética, enquanto o restante da amostra foi armazenado a -80°C . No dia seguinte, foi realizada a síntese de cDNA utilizando o *Kit GoScript™ Reverse Transcriptase System (Promega)*, seguindo as instruções do fabricante.

3.2 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Com o intuito de obter os amplicons dos genes codificantes das referidas RNA helicases *TbHEL67*, *TbDED1-2*, *TbDHH1* e *TbDBP2B* (números de acesso no banco de dados *TritypDB* - <https://tritrypdb.org/tritrypdb/app> - *Tb427_100153800*, *Tb427_090072800*, *Tb427.10.3990* e *Tb427.08.1510*, respectivamente), foi realizado a reação em cadeia da polimerase (PCR). A amplificação via PCR seguiu conforme as instruções do fabricante do *Kit AccuPrime™ Pfx DNA Polymerase (Invitrogen™)*, o que incluiu os seguintes componentes: 150 ng de cDNA ou DNA total do *T. brucei* 427 (gDNA) como molde, ressaltando que o cDNA foi utilizado apenas para o gene *TbDBP2B*; 0,3 μM (concentração final) de oligonucleotídeos *forward* e *reverse* desenhados a partir de sequências dos genes das helicases identificadas no genoma do parasita (Tabela 1); 1 (U) da enzima *DNA polimerase AccuPrime™ Pfx (New England Biolabs)*; 5 μL do *Mix de reação AccuPrime™ Pfx 10X* contendo tampão apropriado, MgSO_2 e dNTPS para concentração final de 1 mM e 0,3 mM, respectivamente em um volume final de 50 μL completado com água destilada. As condições das PCRs incluíram uma etapa inicial de desnaturação de 95°C por 2 min, seguido de outra desnaturação de 15s a 95°C , anelamento dos primers em *touchdown* ($60-50^\circ\text{C}$ por 30s para a *DHH1*, *DBP2B* e *DED1-2* e $65-55^\circ\text{C}$ para *HEL67*) e extensão dos fragmentos a 68°C por 5 min.

Tabela 1: Sequências dos primers utilizados para amplificação dos genes de *T. brucei*

Primer	Sequência 5' – 3'	Tamanho do amplicon (pb)
DED1-2 F	<u>AAGCTT</u> CCCGCCACCATGAGTTTATCCCGC	2220
DED1-2 R	<u>AGATCT</u> GAAGCCTCCGTCATC	
HEL67 F	<u>AAGCTT</u> CCCGCCACCATGCACGGCATGAAT	1851
HEL67 R	<u>GGATCC</u> CATGGTGAGGCCTCCTCCTC	
DBP2B F	<u>AAGCTT</u> CCCGCCACCATGTATGGGATGAAC	1710
DBP2B R	<u>AGATCT</u> ATAAGAACCACCCGT	
DHH1 F	<u>AAGCTT</u> CCCGCCACCATGGTAACCGATGAT	1221
DHH1 R	<u>GGATCC</u> CGCGGTGTACAGCTC	

Legenda: Sequências sublinhadas correspondem ao sítio da enzima de restrição; AAGCTT – *HindIII* (vermelho), AGATCT – *BglII* (verde), GGATCC – *BamHI* (azul).

Fonte: O autor (2025)

Os fragmentos gerados pela amplificação foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 1%, acompanhados do padrão de peso molecular (*1 Kb plus DNA Ladder*, *Invitrogen*) e corados com *Syber® Safe DNA gel stain* (*ThermoFischer Scientific*). Após a corrida eletroforética, os géis foram expostos em transiluminador para confirmação da amplificação correspondente ao tamanho molecular de cada gene. Em seguida, os fragmentos de interesse foram excisados do gel e purificados com o sistema *GFX™ PCR DNA Gel Band Purification Kit* (*Cytiva*), conforme as instruções do fabricante e quantificados utilizando o *NanoDrop™ 2000 Spectrophotometer* (*ThermoFischer Scientific*).

3.3 CLONAGEM EM PGEM®-T EASY

Para a clonagem, os fragmentos gênicos purificados foram tratados (adenilados) para inserção de adeninas nas extremidades 5' e 3' dos fragmentos, para que dessa forma ocorra o pareamento com o vetor pGEM – T Easy. Para isso, foi utilizado o kit *Platinum™ Taq DNA Polymerase* (*Invitrogen™*), utilizando do DNA purificado (30-40 ng/μL), 5 unidades (U) da enzima *Platinum™ Taq DNA Polymerase*, 2mM de dATP, 50 mM MgSO₄, 1 μL do tampão 10x proveniente do kit da enzima, seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida, a reação foi completada com água destilada para um volume final de 10 μL e incubada em termociclador a 72 °C por 30 min. Logo após, os fragmentos adenilados foram clonados em vetor pGEM®-

T Easy, utilizando o *kit* pGEM®-T Easy® Vector System (Promega®) e as instruções do fabricante, com uso de 2 µL do produto da adenilação, 1 Unidade (U) da enzima T4 DNA Ligase, 5 µL do tampão 2X *Rapid Ligation Buffer*, 50 ng do vetor pGEM®-T Easy Vector e adição de água destilada para um volume final de 10 µL. Em seguida, a reação foi incubada por cerca de 16 h (durante a noite) a 4 °C.

3.3.1 Transformação bacteriana e extração de DNA plasmidial

Para inserção do DNA recombinante formado pelo vetor pGEM®-T Easy ligado ao gene de interesse, foi utilizado o protocolo de choque térmico em células competentes de *Escherichia coli* linhagem Top10. Para isso, cerca de 50 µL das células de *E. coli* foram transformadas em 5 µL da ligação contendo o DNA recombinante, submetendo a amostra a uma incubação inicial por 30 minutos em gelo, seguida de 45 segundos em 42°C e 2 minutos em gelo. As transformações foram então semeadas em placa de Petri contendo meio Ágar LB (Luria Bertani) sólido, com adição de ampicilina (100 µL/mL) e previamente suplementado com X-GAL (50 mg/mL) e IPTG (Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosídeo - 1 M) em proporção molar 1:2. As placas foram incubadas em estufa a 37 °C por cerca de 16h. Após o crescimento das colônias, foram selecionadas apenas as colônias brancas (presença do vetor com o inserto de interesse) e inoculadas em meio LB líquido com adição de ampicilina (100 µL/mL) e incubadas novamente a 37 °C em agitador, à 200 RPM, por 16h. Após a incubação, as bactérias crescidas foram submetidas a extração de DNA plasmidial utilizando o *kit Quick-DNA™ Miniprep Kit - Zymo Research*, de acordo com as orientações do fabricante. Posteriormente, para confirmar a extração e a clonagem, os plasmídeos foram submetidos à digestão enzimática com a enzima de restrição *EcoRI* (*New England Biolabs*), com sítios de corte no vetor (próximo das extremidades de gene de interesse).

3.4 SEQUENCIAMENTO DE DNA

Após a confirmação do padrão de digestão característico de cada gene alvo desse estudo, as amostras de DNA recombinante oriundas da clonagem foram enviadas para sequenciamento capilar de Sanger *ABI Prism 3100 (Applied Biosystems®)* disponível no Núcleo de Plataforma Tecnológica do Instituto Aggeu Magalhães - Fiocruz, Pernambuco. Com o retorno dos dados dessas amostras, a

identidade das sequências foram validadas através de comparação com o gene de referência correspondente ao gene clonado. Essa comparação foi realizada através do alinhamento a partir do *download* da sequência de referência de cada RNA helicase no website *TritrypDB* (<https://TritrypDB.org/TritrypDB/app>) juntamente com os clones sequenciados em programas como Seqman e SeqBuilder (DNASTAR®).

3.5 SUBCLONAGEM DOS GENES EM VETOR DE EXPRESSÃO DE *TRYPANOSOMA BRUCEI*

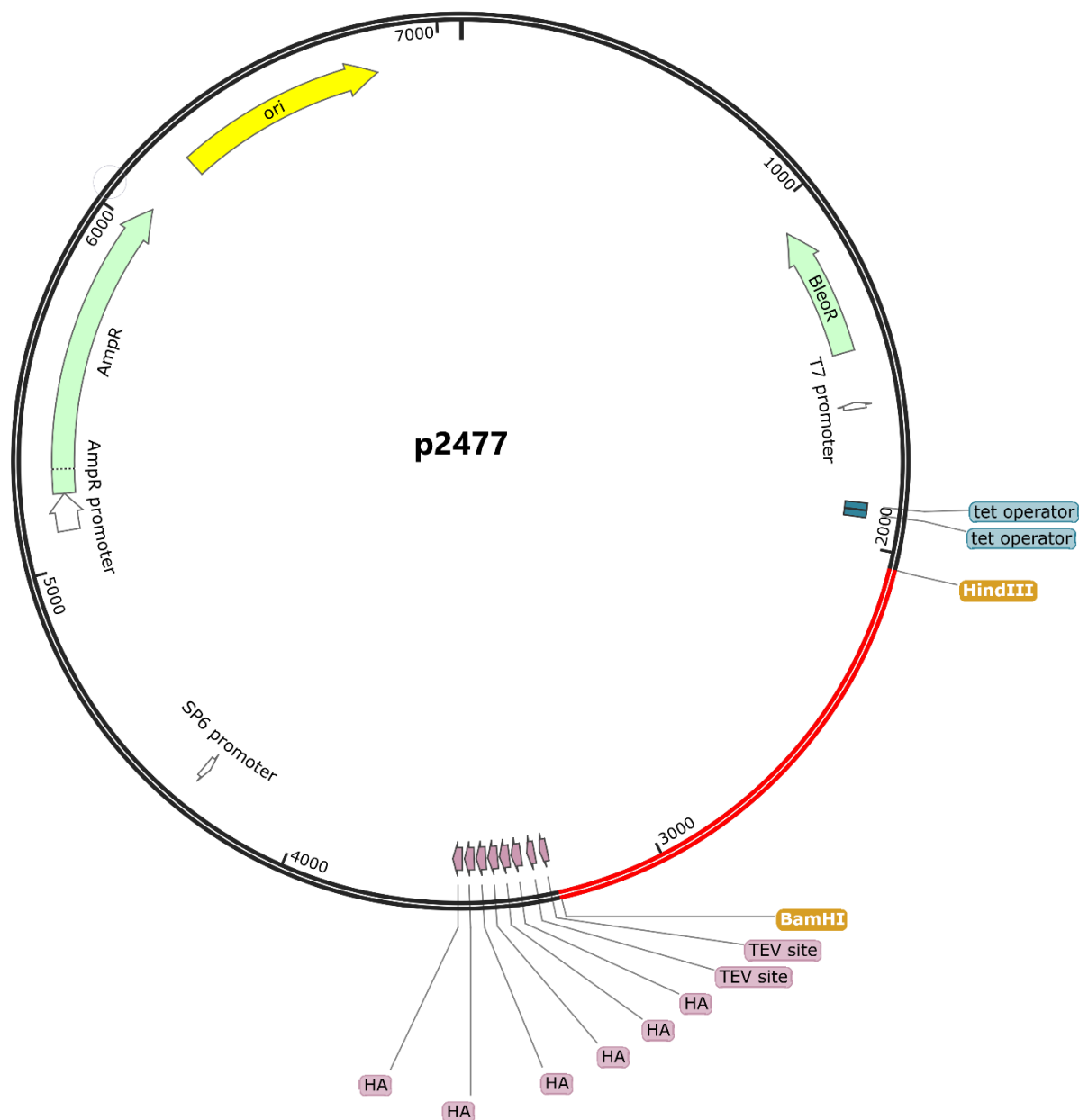
Com a confirmação da integridade das sequências, foi realizada a recuperação dos insertos clonados no vetor pGEM®-T Easy para sua subclonagem no vetor de expressão p2477. Este vetor permite expressão da proteína de interesse fusionada a 6 cópias do epítipo HA (Y-P-Y-D-V-P-D-Y-A), tendo sido proveniente de uma construção de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa. Além disso, o p2477 contém um gene de resistência à fleomicina, que permite a seleção das células de *T. brucei* linhagem 29-13 que incorporaram o plasmídeo, pois o mesmo foi projetado para se integrar ao genoma do parasita, especificamente em uma região de DNA ribossômico (rDNA) (Kelly *et al.*, 2007; Moura, 2011).

A obtenção dos insertos no vetor de clonagem foi obtida a través dos seguintes procedimentos. Para a construção pGEM®-T Easy/*DHH1* foi feita uma dupla digestão com as enzimas *HindIII* e *BamHI*. Para as construções pGEM®-T Easy/*DBP2B*, pGEM®-T Easy/*HEL67* e pGEM®-T Easy/*DED1-2*, inicialmente foi necessário a linearização e precipitação do DNA. A primeira construção devido a incompatibilidade de tampões com a segunda enzima, e as duas últimas construções, em razão da necessidade de digestão parcial. Logo, para a pGEM®-T Easy/*HEL67* foi realizada a linearização com a enzima *BamHI*, enquanto para as pGEM®-T Easy/*DED1-2* e pGEM®-T Easy/*DBP2B* foi utilizada a enzima *BglII*. Com os DNAs linearizados e precipitados com NaCl 0,3 M (concentração final) com adição de etanol absoluto em volume 1/1, foram submetidos a digestão parcial por 3 a 4 minutos a 37°C (*DED1-2* e *HEL67*) e total (*DBP2B*), todos com a enzima *HindIII* High-Fidelity (HF). De forma paralela também foi realizada, através de dupla digestão com *HindIII* e *BamHI*, a recuperação vetor eucariótico p2477 (Figura 8).

O plasmídeo p2477 e os fragmentos de DNA resultantes das digestões citadas a partir das construções no vetor pGEM®-T Easy (com os genes *DHH1*, *HEL67*,

DED1-2 e *DBP2B*) foram purificados utilizando o *GFX™ PCR DNA; Gel Band Purification Kit*, conforme as orientações do fabricante. Além disso, o plasmídeo p2477 purificado foi submetido a reação de desfosforilação com a enzima *Antarctic Phosphatase* (*New England Biolabs®*) seguindo as instruções do fabricante. Após as purificações, os fragmentos dos genes alvos foram ligados nos sítios *HindIII* e *BamHI* (também complementar do sítio *BglII*) do vetor p2477, utilizando 0,5 µL da enzima T4 DNA Ligase (*New England Biolabs®*) e 1 µL do seu respectivo tampão para um volume final de 10 µL e posterior incubação por cerca de 16h à 16°C. Para a subclonagem propriamente dita, 5 µL do produto da ligação foi transformado em 50 µL de células *E. coli* Top10, semeado em placa com meio LB sólido com ampicilina (100 µL/mL) a 37°C por cerca de 16h. Em seguida as colônias foram inoculadas em meio líquido LB com ampicilina e realizado a extração do DNA plasmidial, com posterior confirmação da subclonagem através de digestões enzimáticas em pequena escala com *HindIII*, *BamHI* e *SacI* para as quatro construções. Após confirmação por corrida eletroforética e sequenciamento, as construções foram submetidas a linearização com a enzima *NotI*, que realiza um corte em região específica da sequência, favorecendo o processo de recombinação homóloga no genoma de células de *T. brucei* linhagem 29-13.

Figura 8: Representação esquemática do plasmídeo (vetor) p2477



Legenda: Esquema do plasmídeo p2477. Em vermelho está a representação da inserção de um gene, com sítios de restrições 5' *HindIII* e 3' *BamHI* em amarelo. BleoR – resistência a bleomicina (fleomicina), TEV - Protease do vírus do mosaico do tabaco, HA - epítipo de hemaglutinina, AmpR - resistente à ampicilina, ori – origem de replicação.

Fonte: O autor (2025)

3.6 TRANSFEÇÃO DE CÉLULAS PROCÍCLICAS DE *TRYPANOSOMA BRUCEI*

Para expressão das helicases foram utilizadas células de *T. brucei* procíclicas, da linhagem transgênica 29-13, que é derivada da cepa selvagem 427. Nesta linhagem, a expressão da T7 RNA polimerase é constitutiva, assim como do repressor

da tetraciclina (WIRTZ *et al.*,1999). As células foram cultivadas em meio SDM-79 (Nova Biotecnologia) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 0,2% de hemina e solução de antibióticos específicos para manutenção da linhagem (Tabela 2), em uma estufa BOD a 26°C. O acompanhamento de crescimento das culturas foi realizado por contagem em câmara de Neubauer, para manutenção da fase exponencial e análise da morfologia celular em microscópio óptico.

Tabela 2: Antibióticos e suas concentrações para manutenção e seleção das culturas de *T. brucei*

Linhagens	Antibióticos	Concentração Final
29-13	Neomicina (G418)	15 µg/mL
	Higromicina	25 µg/mL
	<u>Fleomicina</u>	2,5 µg/mL

Legenda: O antibiótico utilizado para seleção das linhagens transfectadas encontra-se sublinhado.
Fonte: O autor (2025)

As transfecções foram realizadas com células de *T. brucei* 29-13, seguido da sedimentação de um total de 2×10^7 células, o qual foi ressuspensionado em 5 mL de tampão ZPFM (NaCl 132 mM, KCl 8 mM, Na_2HPO_4 8 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Mg $(\text{CH}_2\text{COO})_2$ 0,5 mM e Ca $(\text{CH}_2\text{COO})_2$ 0,09 mM) e centrifugado em $1690 \times g$ por 10 minutos. Logo após, o sobrenadante foi descartado e o sedimento foi novamente ressuspensionado, em uma solução de 450 µL do tampão ZPFM e 10 µg de DNA plasmidial linearizado do vetor p2477 com os respectivos insertos, com a enzima de restrição *NotI*. Esta solução foi submetida à eletroporação utilizando um eletroporador BioRad Gene Pulser II, em uma cuveta de 4 mm, utilizando um pulso de 1,5kV e 25µF de capacitância. Após a eletroporação, os parasitas foram transferidos para uma garrafa de cultura contendo 10 mL de meio SDM-79 e incubados na BOD a 26°C com injeção de 5% de CO_2 por cerca de 24h para recuperação. Após este período, foram adicionados os antibióticos de manutenção de linhagem (Tabela 2). Após adição dos antibióticos, as culturas foram diluídas em 10 e 100 vezes, em um volume de 12 mL, que foi distribuído em placas de 24 poços, para seleção no período de aproximadamente 15 dias. Após o período de seleção da transfecção, foram recuperados cinco clones da linhagem *TbDBP2B*, três da *TbDHH1* e um clone da *TbDED1-2*. Após três repasses por repique com antibióticos, foram retiradas alíquotas de todos os clones das culturas transfectadas para realização de extratos proteicos.

3.7 OBTENÇÃO DE EXTRATOS PROTEICOS

Para confirmar o perfil de expressão das RNA helicases-alvo, as culturas transfectadas de cada gene foram avaliadas por meio teste de indução e por curvas de crescimento (fase exponencial) de extratos proteicos, tanto induzidos (+TET) com tetraciclina (1 $\mu\text{g/mL}$), quanto não induzidos (-TET), em triplicata. Para isso, inicialmente foi realizada a contagem celular em câmara de *Neubauer*, com o intuito de diluir as culturas para fase exponencial, em uma concentração de 10^6 células/mL (estágio inicial 0h). Para evitar que as culturas atingissem a fase estacionária, o período da curva de crescimento foi estendido até 48 horas, tempo considerado adequado tanto para a expressão das proteínas quanto para manter as células em fase exponencial. Portanto, em 0h, 24h e 48h pós-indução, foram retiradas alíquotas das culturas induzidas e não induzidas, correspondendo a uma concentração total de 5×10^6 células. Em seguida, as alíquotas foram centrifugadas a $1690 \times g$ por 5 minutos e o sedimento resultante foi ressuspenso em 30 μL de tampão de amostra para SDS-PAGE (10% SDS, 1 M Tris-HCl pH 6.8, 50% glicerol, azul de bromofenol e 50 $\mu\text{L/mL}$ de 2-mercaptoetanol) e as amostras foram submetidas a 100 °C por 3 minutos. Um volume de 10 μL de cada amostra foi usada para separação eletroforética SDS-PAGE e para posterior análise da expressão proteica por *Western blot* (WB).

3.8 WESTERN BLOT

As amostras dos extratos proteicos foram submetidas ao ensaio de *Western blot*. Inicialmente, foi realizada a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% descrito acima. Em seguida, as proteínas no gel foram transferidas para a membrana de PVDF (*Immobilon-P*, *Millipore*®) no equipamento *Power Blotter XL System* (*ThermoFischer*). Posteriormente as membranas foram submetidas ao bloqueio com leite diluído a 5% em *TBS-T* (20 mM Tris, 500 mM NaCl – pH 7,5, contendo Tween-20) por 1 hora em agitação a 25 °C. Em seguida foram incubadas por mais 1 hora com o anticorpo primário monoclonal anti-HA (*Sigma*®) diluído 1:3000 em solução de leite 5% em tampão *TBS-T*. Após a incubação com o anticorpo primário, as membranas foram lavadas três vezes com leite 5% em *TBS-T* por cerca de 10 minutos e, em seguida, foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (*Jackson ImmunoResearch*) na diluição de 1:10.000 por 1 hora em agitação a 25 °C. Após esta segunda incubação, as membranas foram lavadas 3 vezes com *TBS* + Tween-20 1% e incubadas com o

reagente *Immobilon Forte Western HRP Substrate* (Millipore) por aproximadamente três minutos, para reação de quimioluminescência. A visualização e detecção de imagens das membranas foi feita utilizando o equipamento *iBright™ Western blot Imaging Systems*.

3.9 LISADOS E IMUNOPRECIPITAÇÕES

Após confirmar a expressão de 48h das helicases em linhagens de *T. brucei* 29-13, foram preparados lisados celulares desse mesmo período de crescimento. Para isso, foram realizados inóculos em triplicatas, utilizando os três clones transfectados da linhagem *TbDBP2B/p2477* e *TbDHH1/p2477*, uma triplicata do clone 1 (um) da *TbDED1-2/p2477* e também uma triplicata da cultura de *T. brucei* 29-13 não transfectada (controle negativo). Cada inóculo das triplicatas das linhagens foram diluídos em uma concentração inicial de 10^6 células/mL, para um volume final de 40 mL. Após a diluição, as culturas foram induzidas com tetraciclina (1 µg/mL) por um período de 48h em fase exponencial (5 a 8×10^6 células/mL). Em seguida, foram realizadas a quantificação de parasitas das culturas em câmara de Neubauer e determinado um volume contendo um número total de $1,2 \times 10^8$ células, para posterior centrifugação a $4696 \times g$ por 5 min. O sedimento celular resultante foi lavado em 5 mL de PBS a 4 °C e novamente centrifugado nas mesmas condições citadas acima. Em seguida, as células sedimentadas foram ressuspensas em 450 µL de tampão de lise (20 mM de HEPES-KOH pH: 7,4; 75 mM de acetato de potássio; 4 mM de acetato de magnésio e 2 mM de DTT) com inibidor de protease *EasyPack®* (Roche), de acordo com instruções do fabricante. Com o intuito de obter a fração citoplasmática das linhagens, as células foram submetidas ao processo de lise celular por cavitação, com uso de cilindro de alta pressão de nitrogênio, a uma pressão de 70 Bar por 15 min a 4°C. Após esse período, foi realizada uma rápida despressurização, causando assim a ruptura celular. Em seguida as amostras foram centrifugadas a $9600 \times g$ por 15 min a 4°C, para separação dos detritos celulares e armazenamento a -80°C da fração citoplasmática, que corresponde ao sobrenadante e do sedimento pós-lise.

Considerando que a literatura indica uma possível participação nuclear da proteína *TbDBP2B*, foi retirada uma alíquota do sedimento pós-lise dessa linhagem, bem como das demais linhagens-alvo, com o objetivo de verificar a ocorrência de lise parcial ou uma possível localização da proteína em organelas, como o núcleo. As

alíquotas do sedimento pós-lise, assim como da fração citoplasmática foram submetidos a separação eletroforética em SDS-PAGE, seguido de *Western blot* com anticorpo anti-HA, para confirmação da indução das proteínas-alvo. Além do uso do anti-HA, anticorpos como anti-BiP e anti-EIF4A1 foram utilizados como controle de carga e de eficiência na lise celular das amostras, uma vez que são anticorpos contra proteínas citoplasmáticas e de produção constitutiva no parasita. A BiP (proteína de ligação luminal 1) está presente tanto no citoplasma quanto no lúmen do retículo endoplasmático (Bangs *et al.*, 1993), enquanto a EIF4A1 é localizada exclusivamente no citoplasma (Berriman *et al.*, 2005).

Para realização dos ensaios de imunoprecipitação (IP), foram utilizadas as frações citoplasmáticas (sobrenadante ou lisados) das triplicatas de cada linhagem submetida ao processo de lise celular. Cerca de 200 µL dos sobrenadantes foram incubados por 30 min à 4°C com cerca de 0,2 mg de microesferas magnéticas anti-HA (*Pierce™ Anti-HA Magnetic Beads Thermo Scientific™*) previamente lavadas três vezes com PBS gelado com inibidores de proteases. As microesferas anti-HA têm a capacidade de se ligar ao epítopo HA das proteínas recombinantes. Após o período de incubação, o sobrenadante foi separado e armazenado a -80°C, correspondendo a fração depletada. Em seguida, as microesferas anti-HA foram lavadas novamente duas vezes com PBS a 4 °C. Na última lavagem o sobrenadante foi descartado e as microesferas anti-HA contendo antígeno, ou as proteínas recombinantes com antígeno HA, foram ressuspensas em 40 µL de tampão de amostra para SDS-PAGE, sendo 10% da amostra final submetida a corrida eletroforética em gel de poliacrilamida e posterior *Western blot* com uso do anticorpo anti-HA.

3.10 PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE IMUNOPRECIPITAÇÃO E ANÁLISE DE DADOS DA ESPECTROMETRIA DE MASSAS

Após a confirmação da imunoprecipitação, 30uL das amostras de IP (em triplicata) foram submetidas a corrida eletroforética de “empacotamento” (migração das IPs para o início do gel SDS-PAGE 15%) durante 15 minutos. Em seguida o gel foi corado com Coomassie Blue 250-R para visualização das bandas e descorado com solução de 25% de ácido acético glacial e 7% de metanol v/v. Em seguida as bandas foram excisadas e mantidas em água ultrapura para envio a Plataforma Tecnológica de Espectrometria de Massas do Instituto Carlos Chagas – Fiocruz, Paraná e em seguida serem analisadas pelo Espectrômetro de Massas - Orbitrap Exploris 120

acoplado a um cromatógrafo líquido UHPLC. Nessa Plataforma, a análise das amostras inclui a digestão por tripsina das proteínas empacotadas no gel SDS-PAGE, clivando os peptídeos em resíduos de arginina ou lisina, com. posterior purificação dos peptídeos e a identificação e quantificação dos peptídeos na plataforma denominada MaxQuant (<https://www.maxquant.org>).

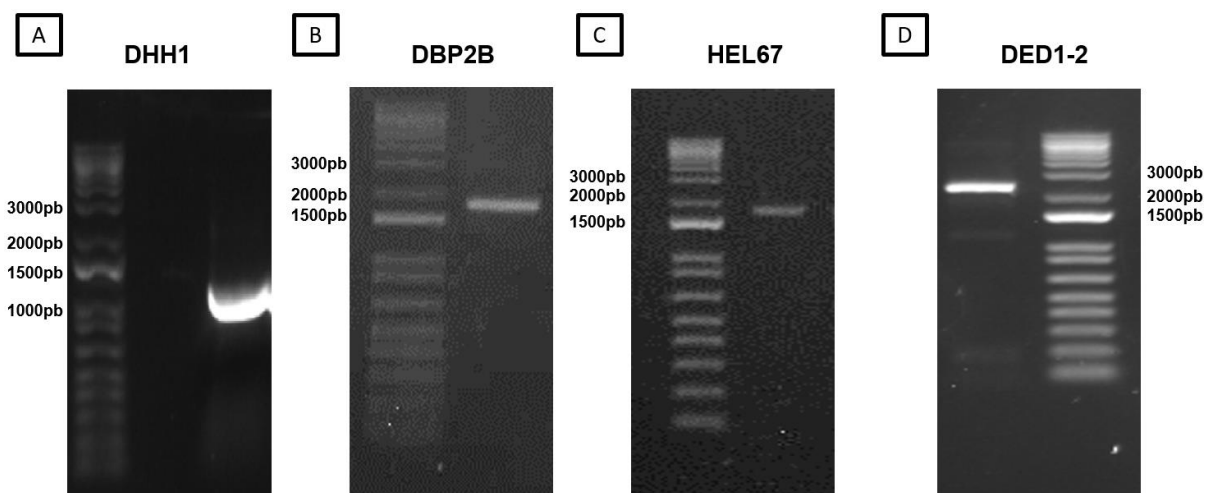
Para analisar os dados brutos que foram obtidos no ensaio de espectrometria de massas, foi realizada a identificação dos polipeptídeos que coprecipitaram (copurificaram) com as amostras contendo as proteínas de interesse. A identificação desses polipeptídeos foi através da sequência proteica de *T. brucei brucei* TREU927 em banco de dados online do *TritypDB* (<https://tritrypdb.org/tritrypdb/app>). Em seguida, os dados brutos passaram por um processo de normalização para corrigir discrepâncias de intensidade entre as replicatas. Esse processo envolveu o cálculo da soma das intensidades de todas as réplicas/clones das amostras (incluindo o controle) e a divisão do maior valor de soma pela soma individual de cada réplica/clone, gerando um fator de normalização usado para multiplicar os valores de intensidade dos polipeptídeos coprecipitados. Após a normalização, foi calculada a razão entre a média das intensidades das amostras-alvo e a média das intensidades do controle para cada proteína copurificada. Além disso, para identificar proteínas diferencialmente enriquecidas no conjunto de proteínas associadas a cada helicase, foi calculada a razão das médias de intensidade entre as proteínas copurificadas com DED1-2, DHH1 e DBP2B. Para a identificação dos polipeptídeos que coprecipitaram com as proteínas-alvo, foram consideradas apenas aquelas detectadas nas três réplicas. A seleção dos possíveis interatores foi baseada na razão de enriquecimento, adotando-se um valor igual ou superior a 4,0 para garantir maior confiabilidade na identificação de associações específicas, tanto em relação ao controle quanto entre as diferentes helicases-alvo. No caso de polipeptídeos como fatores de tradução, foi aplicado um critério menos restritivo, com razão de enriquecimento igual ou superior a 1,5, considerando que as proteínas-alvo já são descritas na literatura como associadas a fatores de tradução, o que justifica a inclusão de interações mais sutis, porém potencialmente relevantes do ponto de vista biológico.

4 RESULTADOS

4.1 AMPLIFICAÇÃO DOS GENES DE INTERESSE

Os genes codificantes das RNA helicases HEL67 (*Tb427_100153800*), DED1-2 (*Tb427_090072800*), DHH1 (*Tb427.10.3990*) e DBP2B (*Tb427.08.1510*) foram amplificados apresentando os tamanhos esperados de 1221 pb, 1710 pb, 1851 pb e 2220 pb para os genes *DHH1*, *DBP2B*, *HEL67* e *DED1-2*, respectivamente (Figura 9). Com essa confirmação, os fragmentos foram purificados, quantificados e submetidos à adenilação para clonagem no vetor pGEM®-T Easy.

Figura 9: Amplificação dos genes das RNA helicases de *Trypanosoma brucei*



Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando o produto da amplificação por PCR dos genes *DHH1*, *DBP2B*, *HEL67* e *DED1-2*. Amplicons correspondentes ao tamanho de 1221 pb (A), 1710 pb (B), 1851 pb (C) e 2220 pb (D). Notar a presença de marcador de peso molecular 1 Kb plus *DNA Ladder* (Invitrogen).

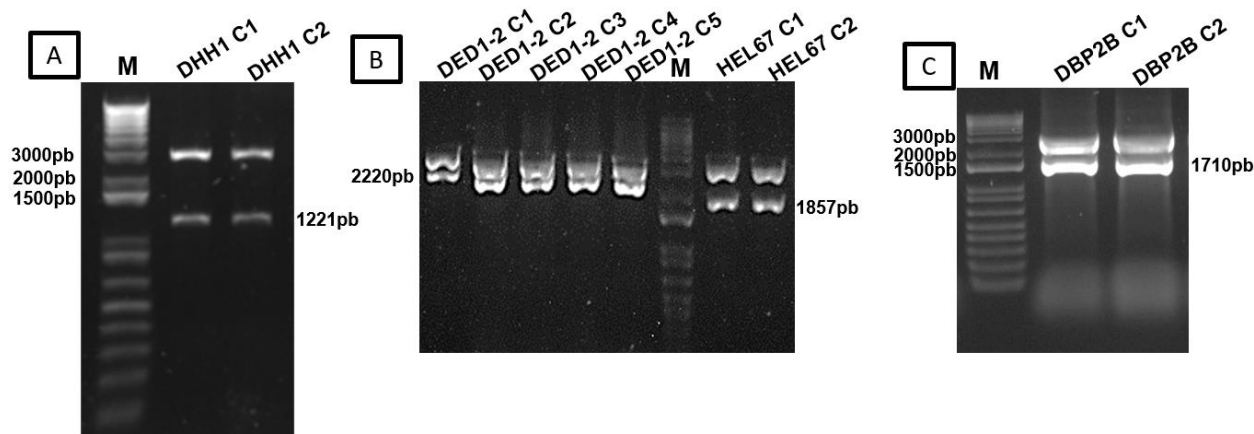
Fonte: O autor (2025)

4.2 OBTENÇÃO E CONFIRMAÇÃO DE CONSTRUÇÕES PLASMIDIAIS DE INTERESSE

Os genes de helicases, após purificação e adenilação, foram clonados em no vetor pGEM®-T Easy usados para transformação em células competentes de *E. coli*. Com crescimento dessas células, o DNA recombinante foi multiplicado, caracterizando o processo de clonagem. As reações resultantes da clonagem foram submetidas a extração do DNA plasmidial por meio de minipreparações. Essas preparações em pequena escala foram posteriormente submetidas à digestão enzimática com *EcoRI*, *HindIII* e *BamHI*, conforme ilustrado na Figura 10. Os

resultados evidenciam o sucesso da clonagem, com a liberação dos fragmentos nos tamanhos esperados: 1221 pb para *DHH1*, 2220 pb para *DED1-2*, 1851 pb para *HEL67* e 1710 pb para *DBP2B*.

Figura 10: Digestões enzimática em pequena escala para confirmação das clonagens dos genes das RNA helicases de *Trypanosoma brucei*



Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando a digestão enzimática das construções formadas pelos genes das RNA helicases com o vetor pGEM®-T Easy. (A) Digestão com *HindIII* e *BamHI* liberando o fragmento de 1221 pb, correspondente ao gene da *DHH1*. (B) Digestão com *EcoRI* das construções *DED1-2/pGEM®-T Easy* à esquerda do marcador de peso molecular 1 Kb plus *DNA Ladder* (*Invitrogen*), e digestão das construções da *HEL67/pGEM®-T Easy* à direita do marcador, liberação dos fragmentos alvo de 2220 pb e 1851 pb, respectivamente. (C) Digestão com *EcoRI* de clones da construção *DBP2B/pGEM®-T Easy*, com liberação do fragmento alvo de 1710 pb; C – Clone; M - Marcador de peso molecular 1 Kb plus *DNA Ladder* (*Invitrogen*).

Fonte: O autor (2025)

Após confirmação da clonagem por digestão enzimática, foi dado início a segunda etapa, que consistiu na verificação da integridade da sequência do DNA clonado por meio de sequenciamento capilar de Sanger. Os clones de cada gene foram submetidos a essa análise e foi constatado 100% de identidade da sequência de DNA com o seu gene de referência correspondente no banco de dados do *TritypDB*.

4.3 SUBCLONAGEM

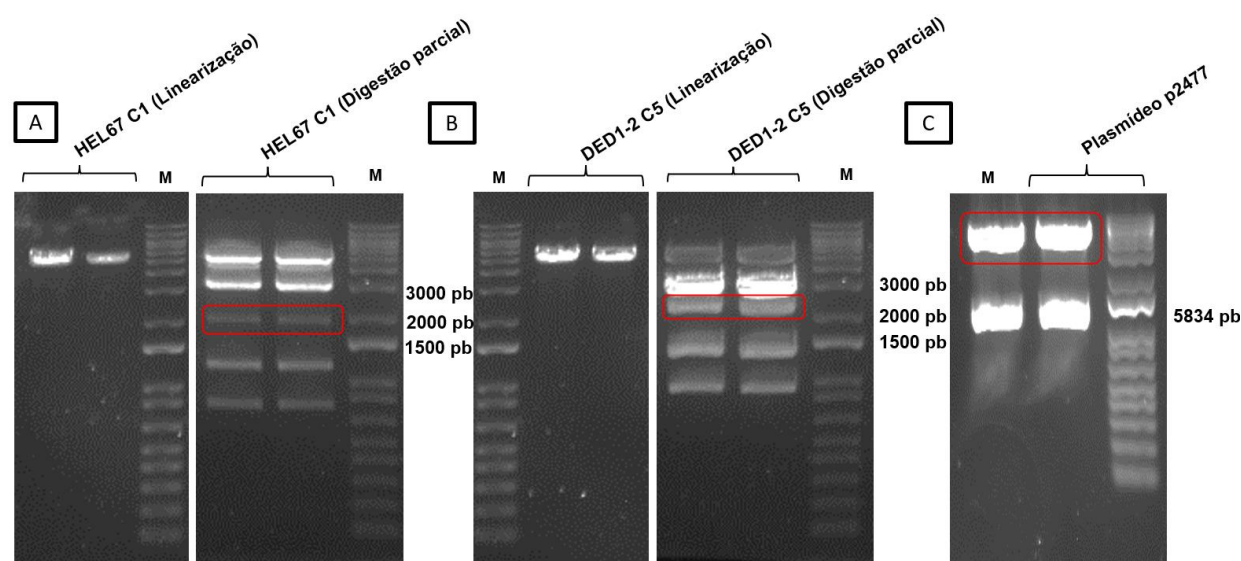
Com a confirmação da integridade e identidade das sequências pelo sequenciamento, um clone de cada construção foi selecionado (pGEM®-T Easy/*DED1-2*, pGEM®-T Easy/*HEL67*, pGEM®-T Easy/*DHH1* e pGEM®-T Easy/*DBP2B*) para digestão enzimática em larga escala e posterior ligação no vetor

de expressão eucariótico p2477, que permite a expressão das proteínas fusionadas a seis epítomos de Hemaglutinina (HA) em *tandem*.

4.3.1 *DED1-2* e *HEL67*

Os genes codificantes das helicases *DED1-2* e *HEL67* foram recuperadas do vetor pGEM®-T Easy por digestão parcial, em razão da presença de sítios internos para a enzima *HindIII*. As construções com os genes *DED1-2* e *HEL67* foram primeiramente linearizadas com as enzimas *BglIII* e *BamHI* (Figura 11A e 11B, painel à esquerda), respectivamente. Em seguida, os produtos linearizados foram submetidos a digestão parcial com *HindIII*, resultando na liberação dos insertos correspondentes: banda de 1851 pb (*HEL67*) e de 2220 pb (*DED1-2*) (Figura 11A e 11B, painel à direita respectivamente). Paralelamente, o plasmídeo p2477 foi preparado a partir de uma dupla digestão com *HindIII* e *BamHI*, utilizando uma construção proveniente de trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Figura 11C). Após a excisão em gel de agarose das bandas contendo o fragmento de DNA das helicases e do vetor p2477, foram purificados para posterior reação de ligação e transformação em células competentes de *E. coli*, gerando as construções finais *TbDED1-2/p2477* e *TbHEL67/p2477*.

Figura 11: Digestões em larga escala de *DED1-2* e *HEL67* em vetor pGEM®-T Easy para subclonagem no vetor p2477



Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando a digestão enzimática das construções *HEL67/pGEM®-T Easy*, *DED1-2/pGEM®-T Easy* e Plasmídeo p2477. (A) Linearização com a enzima *BamHI* e digestão parcial com *HindIII* do Clone 1 da *HEL67/pGEM®-T*, com liberação de fragmento alvo correspondendo a 1851 pb, marcado em retângulo vermelho. (B) Linearização com a enzima *BglIII* e digestão parcial com *HindIII* do Clone 5 da *DED1-2/pGEM®-T Easy*, com liberação de fragmento alvo

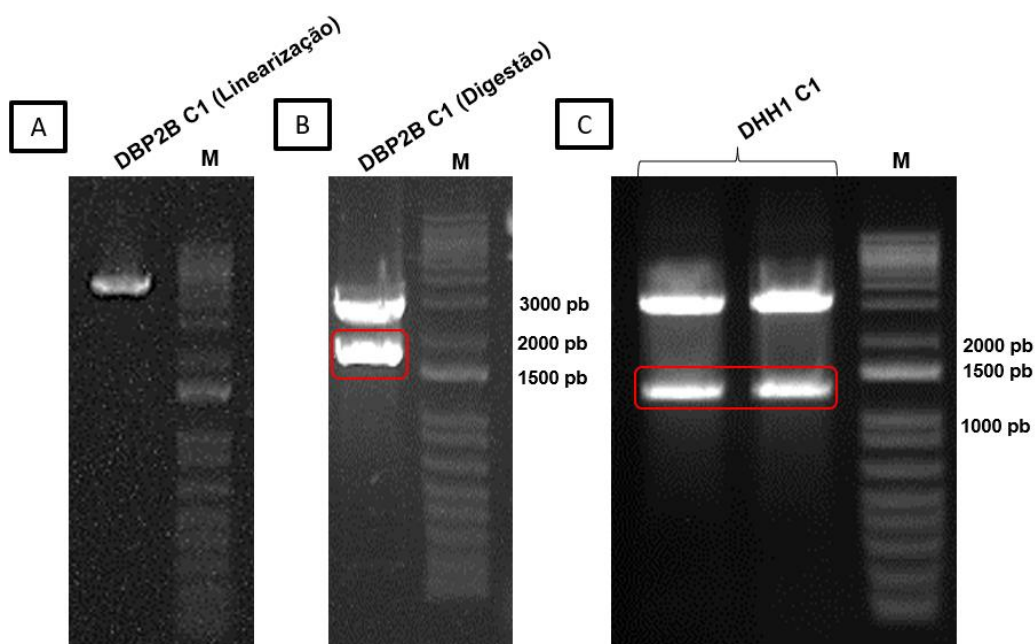
correspondendo a 2220 pb, marcado em retângulo vermelho. (C) Dupla digestão (*Bam*HI/*Hind*III) do plasmídeo p2477, com 5834 pb, marcado em retângulo vermelho; C- Clone; M - marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

Fonte: O autor (2025)

4.3.2 DBP2B e DHH1

Para obtenção das construções finais *TbDBP2B/p2477* e *TbDHH1/p2477*, inicialmente também foi realizada a recuperação do fragmento de DNA desses genes no vetor pGEM®-T Easy. O fragmento codificante da proteína DBP2B foi obtido do vetor pGEM®-T Easy por meio de digestão com a enzima *Bgl*III, resultando na linearização da construção (Figura 12A), seguida de uma segunda digestão com a enzima *Hind*III (Figura 12B). Paralelamente, foi realizado uma dupla digestão para a construção DHH1/pGEM®-T Easy, utilizando as enzimas *Hind*III e *Bam*HI (Figura 12C). Após a corrida eletroforética, foi realizada a excisão das bandas alvo para purificação e posterior reação de ligação com o plasmídeo p2477 previamente purificado como descrito acima, gerando as construções finais *TbDBP2B/p2477* e *TbDHH1/p2477*.

Figura 12: Digestões em larga escala da DBP2B e DHH1 em vetor pGEM®-T Easy



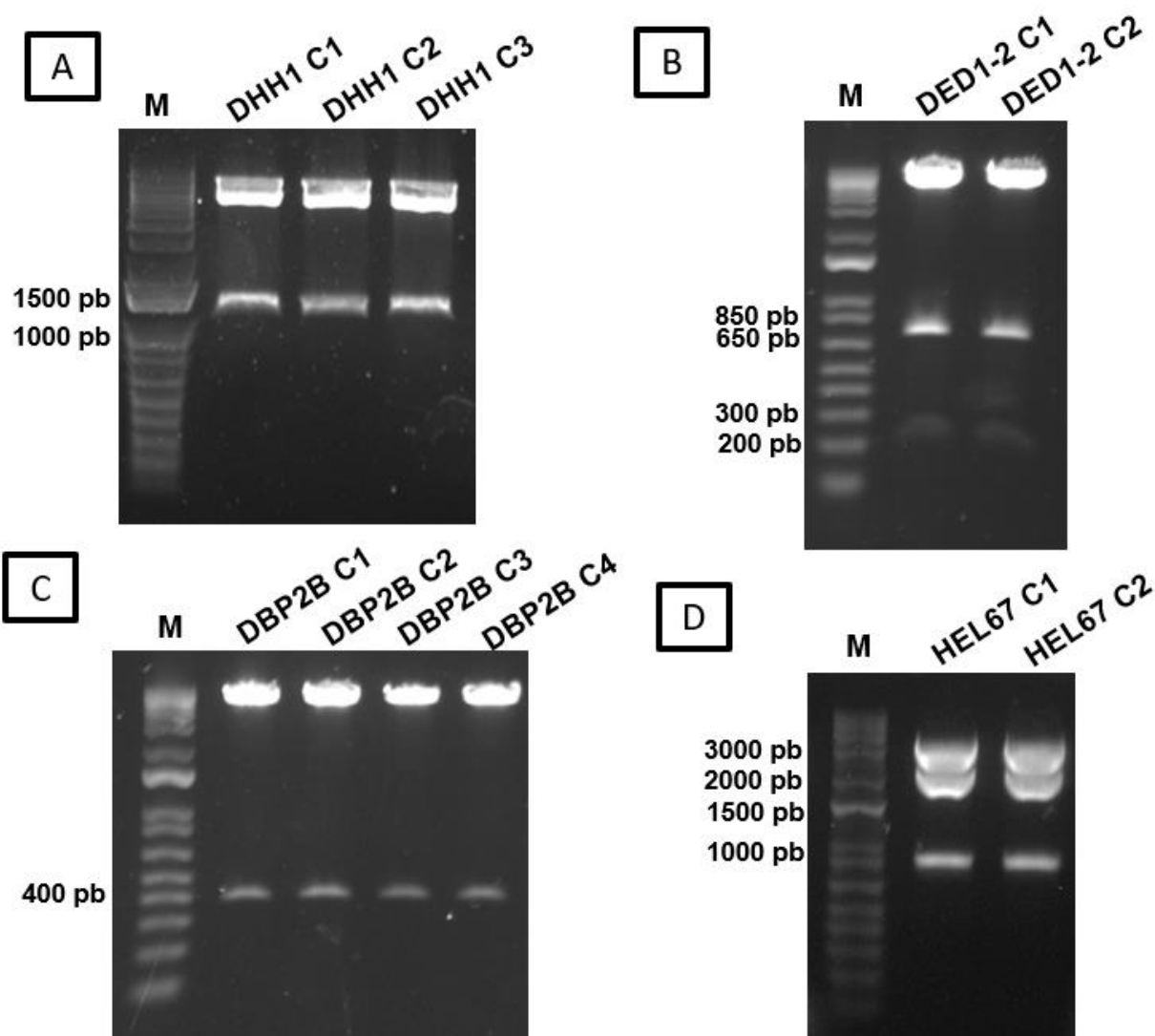
Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando a digestão enzimática das construções *DBP2B/pGEM®-T Easy* e *DHH1/pGEM®-T Easy*. (A) Linearização da *DBP2B/pGEM®-T Easy* com a enzima *Bgl*III. (B) Digestão da construção linearizada *DBP2B/pGEM®-T Easy*, com uso da enzima *Hind*III, resultando na liberação do fragmento alvo de 1710 pb. (C) Dupla digestão (*Hind*III/*Bam*HI) da construção *DHH1/pGEM®-T Easy*, com liberação do fragmento alvo de 1221 pb; C- Clone; M - marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder (Invitrogen).

Fonte: O autor (2025)

4.3.3 Confirmação da subclonagem

Após a transformação em células competentes de *E. coli*, com os plasmídeos contendo os insertos, o DNA plasmidial foi extraído dos clones oriundos do processo de subclonagem de cada gene. A confirmação do sucesso da clonagem foi avaliada após a digestão enzimática, e a detecção do tamanho esperado dos amplicons no gel de agarose (Figura 13). A construção *TbDHH1/p2477* foi digerida com as enzimas *BamHI* e *HindIII*, sendo possível observar o tamanho esperado do vetor sem o inserto (~6000 pb) e com o inserto (1221 pb) (Figura 13A), as demais construções apresentaram tamanhos diferentes do inserto. Isso ocorre porque, além da abolição do sítio 3' *BglIII* (inserto) / *BamHI* (vetor) no *TbDED1-2/p2477* e *TbDBP2B/p2477*, ambos também apresentam na sequência do gene, sítios internos para *HindIII/BamHI* e *BamHI*, respectivamente. Com isso, o padrão de bandas gerado de ~700 pb e ~200 pb (Figura 13B) e ~400 pb (Figura 13C), para digestão com *HindIII* e *BamHI*, foi correspondente a localização destes sítios. De forma semelhante ocorre com a construção *TbHEL67/p2477*, que também possui sítio interno de *HindIII*, mas por motivos estratégicos foi escolhido a enzima *BamHI* e *SacI*. Esta última enzima possui sítios no vetor e no gene, gerando um padrão de bandas específico que confirma a subclonagem (Figura 13D). Além disso, todas as digestões no vetor p2477 foram avaliadas no que diz respeito aos novos tamanhos resultantes das clivagens nos sítios internos e enviadas para sequenciamento, confirmando o sucesso nas subclonagens.

Figura 13: Digestões enzimáticas em pequena escala para confirmação de subclonagem



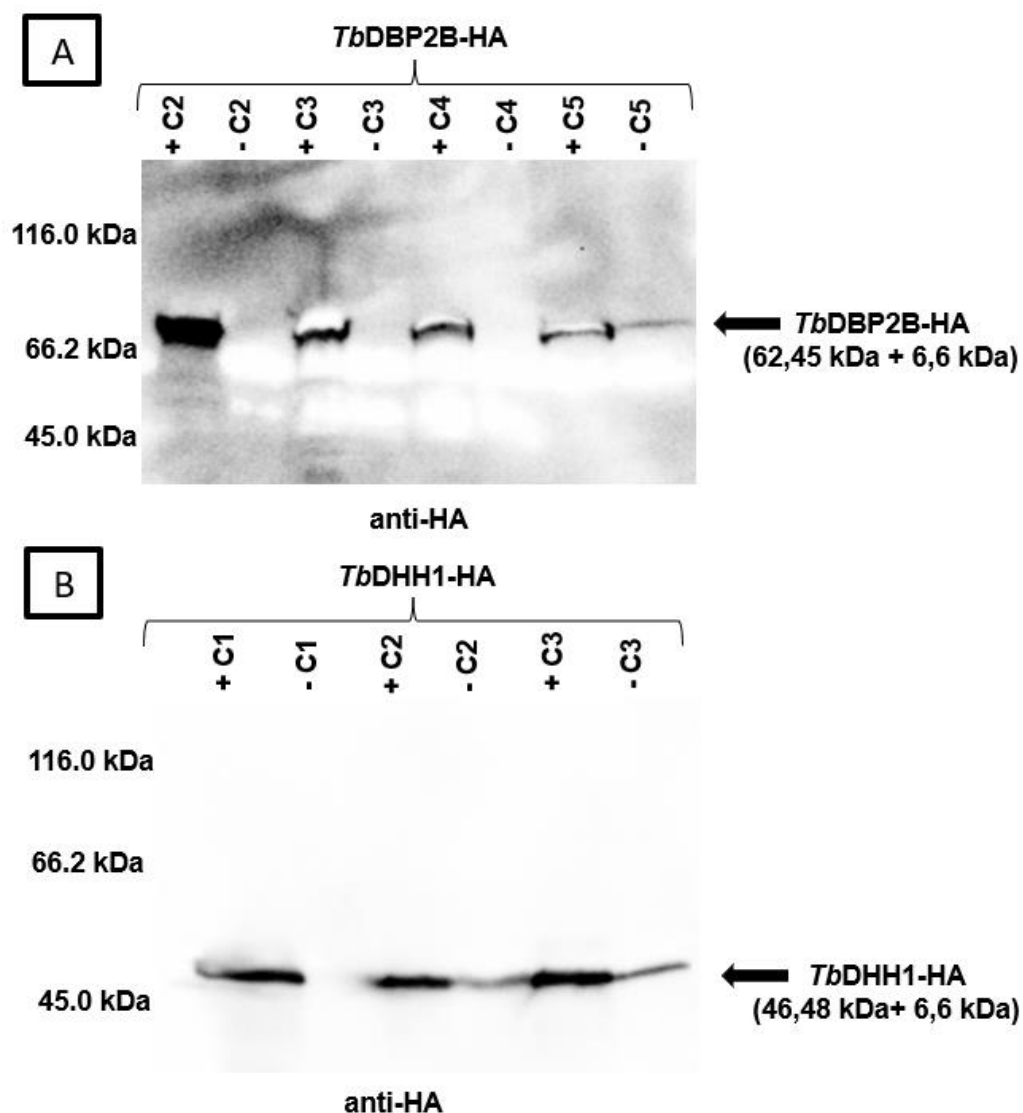
Legenda: Eletroforese de gel de agarose 1% mostrando a digestão enzimática das construções *TbHEL67/p2477*, *TbDED1-2/p2477*, *TbDHH1/p2477* e *TbDBP2B/p2477*. (A) Dupla digestão (*HindIII*/*BamHI*) da construção *TbDHH1/p2477*, com inserto em ~1200 pb, como esperado. (B) Digestão da *TbDED1-2/p2477* com *HindIII* e *BamHI* (sítios internos), com liberação de fragmentos em ~700 pb e ~200 pb, como esperado. (C) Digestão com *HindIII* e *BamHI* (sítio interno no gene) da *TbDBP2B/p2477*, com liberação de único inserto em ~400 pb. (D) Digestão com *BamHI* e *SacI* da construção *TbHEL67/p2477*, com liberação de fragmentos em ~1000 pb, ~2500 pb e ~3700 pb, como esperado, em virtude do sítio interno de *SacI* no gene e vetor. Todas as construções foram enviadas para o sequenciamento, confirmando as subclonagens; C – Clone; M - marcador de peso molecular 1 Kb plus *DNA Ladder* (*Invitrogen*).

Fonte: O autor (2025)

4.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS FUSIONADAS AO EPÍTOPO HA

Com o intuito de identificar o perfil de expressão das proteínas-alvo em *T. brucei*, cepa 29-13, as construções *TbDHH1/p2477*, *TbDBP2B/p2477*, *TbDED1-2/p2477* e *TbHEL67/p2477*, foram transfectadas nesta linhagem. As amostras obtidas das culturas transfectadas não-induzida e induzida com tetraciclina no período de 24h, foram avaliadas por *Western blot* com o uso do anticorpo anti-HA, com o intuito de confirmar a expressão das proteínas fusionadas com o epítipo HA. As proteínas apresentaram tamanhos esperados, como a DBP2B apresentando peso molecular aproximado de 69 kDa (Figura 14A), a DHH1 com ~53 kDa (Figura 14B) e DED1-2 com 83 kDa (Figura 15), fusionadas ao epítipo HA com 6,6 kDa. Por outro lado, a transfecção da *TbHEL67/p2477* não resultou na obtenção de clones como esperado, mesmo após a realização de mais três tentativas. A provável causa pode estar associada a diversos fatores, incluindo o meio de cultura, a qualidade do plasmídeo, procedimento de eletroporação ou a manipulação experimental. Diante das limitações de tempo, foi preferível dar prosseguimento aos experimentos com as proteínas DBP2B, DED1-2 e DHH1.

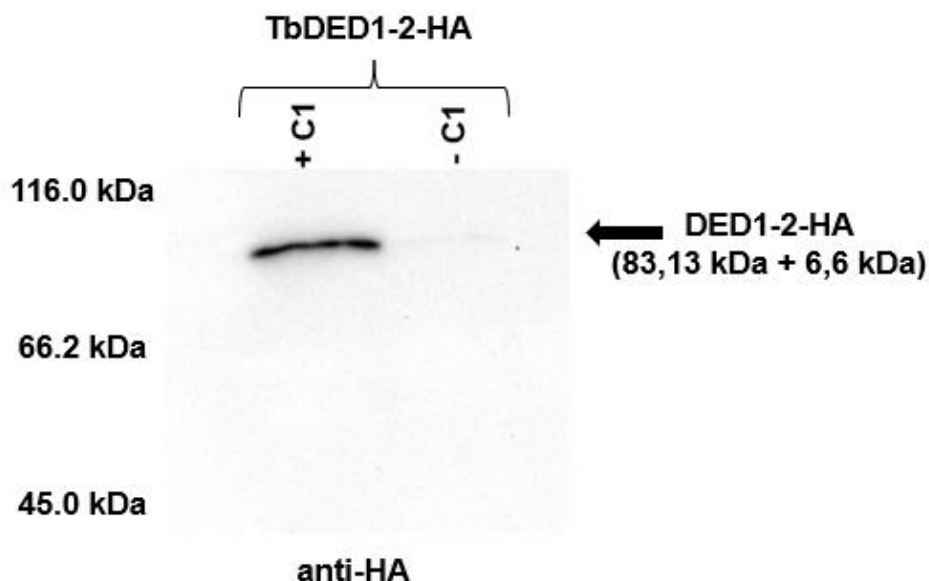
Figura 14: Teste de expressão da linhagem TbDBP2B-HA e TbDHH1-HA



Legenda: Ensaio de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-HA. (A) *Western blot* da linhagem *TbDBP2B*-HA, apresentando ~69 kDa, como esperado. (B) *Western blot* da linhagem *TbDHH1*-HA, apresentando ~53 kDa, como esperado. Seta preta indica a proteína de interesse, (+) representa os clones que foram induzidos com tetraciclina e (-) clones não induzidos; C - Clone.

Fonte: O autor (2025)

Figura 15: Teste de expressão da linhagem TbDED1-2-HA



Legenda: Ensaio de *Western blot* com anticorpo monoclonal anti-HA. A seta preta indica a proteína de interesse, (+) representa o clone que foi induzido com tetraciclina e (-) o clone não induzido; C - Clone. Fonte: O autor (2025)

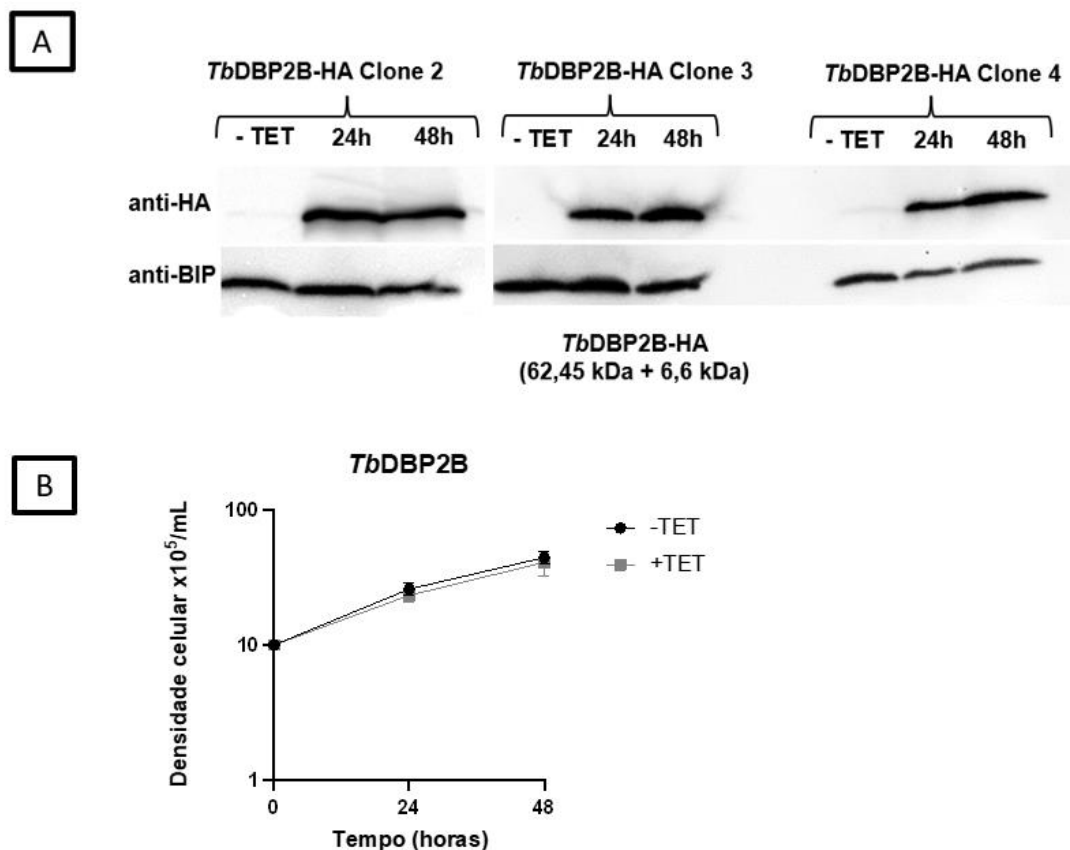
4.5 CURVAS DE CRESCIMENTO DAS LINHAGENS DE *T. BRUCEI* RECOMBINANTES

Além do teste inicial de expressão das proteínas, foi realizada uma avaliação em triplicata com os três clones das linhagens expressando a DHH1, DBP2B e com um clone da DED1-2 por meio de curvas de crescimento no período de 24-48h (exponencial), com o intuito de verificar se a expressão induzida dessas proteínas permanecia no período exponencial, período no qual comumente é realizado os ensaios de imunoprecipitação para *T. brucei*.

Os extratos proteicos foram submetidos a eletroforese em gel SDS-PAGE 15%, em seguida transferidos para membranas de difluoreto de polivinilideno (PVDF) e analisados por ensaios de *Western blot* utilizando o anticorpo anti-HA (Sigma®) e o anticorpo secundário anti-IgG, sendo possível verificar a expressão contínua da proteína até 48h, tanto para a DBP2B (Figura 16), quanto para a DHH1 (Figura 17) e DED1-2 (Figura 18). Além disso, a curva de crescimento dos clones das helicases mostraram-se similares no que diz respeito ao crescimento entre as culturas induzidas e não induzidas, indicando que a síntese dessas proteínas aparentemente não altera

o perfil de crescimento do parasita, pelo menos na fase exponencial, e poderia seguir para o ensaio de imunoprecipitação.

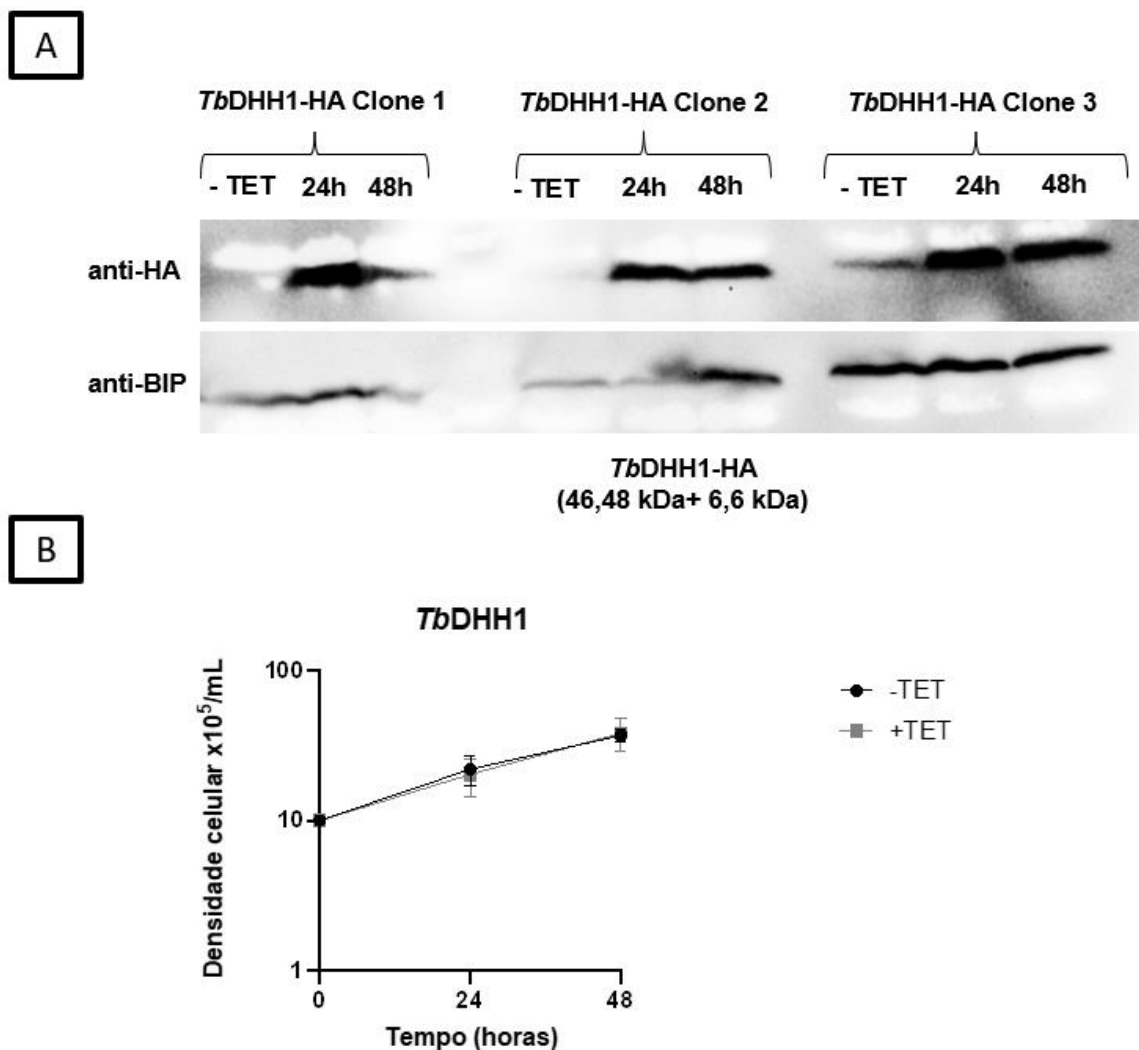
Figura 16: Avaliação do perfil de expressão e curva de crescimento da linhagem *TbDBP2B*-HA



Legenda: (A) Ensaio de *Western blot* e curva de crescimento da indução por 24h e 48h da proteína fusionada com epítipo HA da linhagem *TbDBP2B* (~ 69 kDa), com uso de anticorpo monoclonal anti-HA e proteína chaperona BIP (~ 71 kDa), de expressão constitutiva, sendo usada como controle no número de células por amostra. (B) Gráfico representativo da curva de crescimento, evidenciando a média de crescimento dos três clones da linhagem *TbDBP2B*, comparando a média de crescimento da cultura controle (-TET) com a cultura induzida (+TET); TET – tetraciclina.

Fonte: O autor (2025)

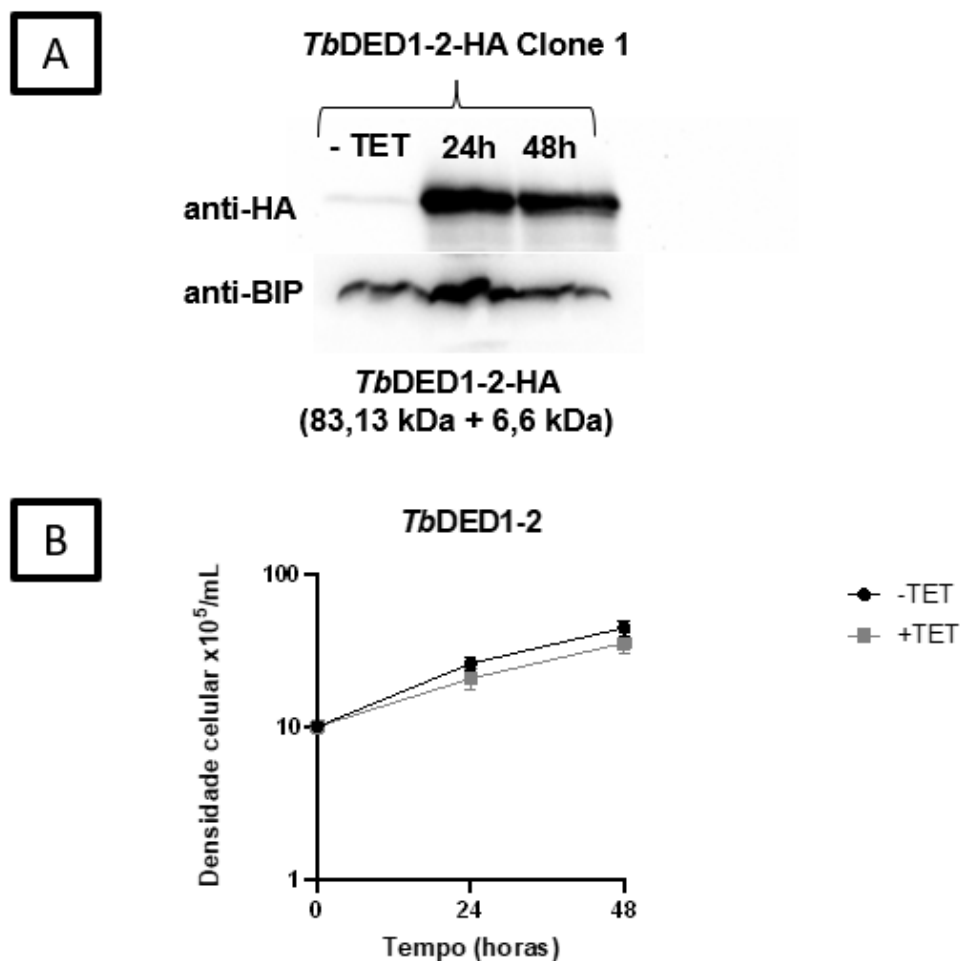
Figura 17: Avaliação do perfil de expressão e curva de crescimento da linhagem *TbDHH1*-HA



Legenda: (A) Ensaio de *Western blot* e curva de crescimento da indução por 24h e 48h da proteína fusionada com epítipo HA da linhagem *TbDHH1* (~ 53 kDa), com uso de anticorpo monoclonal anti-HA e proteína chaperona BIP (~ 71 kDa), de expressão constitutiva, sendo usada como controle no número de células por amostra. (B) Média das curvas de crescimento da triplicata de DHH1, mostrando o crescimento da cultura controle (-TET) em comparação com a cultura induzida (+TET); TET – tetraciclina.

Fonte: O autor (2025)

Figura 18: Avaliação do perfil de expressão e curva de crescimento da linhagem *TbDED1-2-HA*



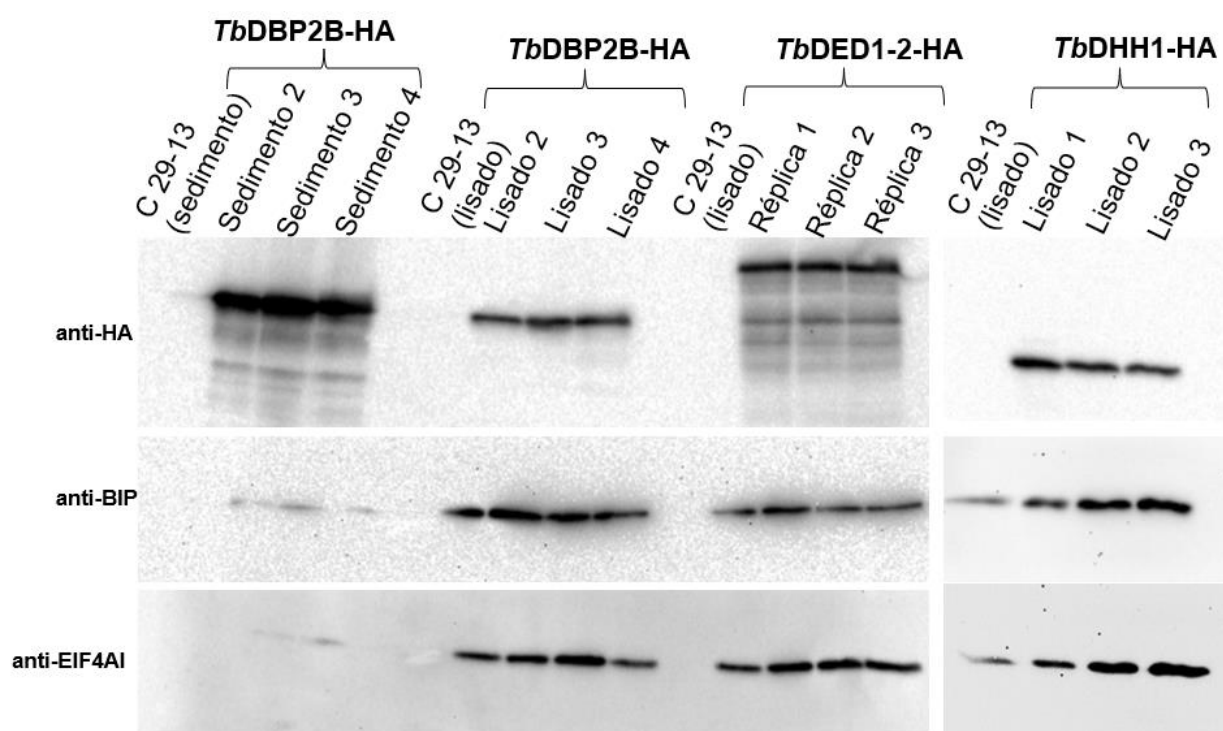
Legenda: (A) Ensaio de *Western blot* e curva de crescimento da indução por 24h e 48h da proteína fusionada com epítipo HA da linhagem *TbDED1-2* (~ 90 kDa), com uso de anticorpo monoclonal anti-HA e proteína chaperona BIP (~ 71 kDa), de expressão constitutiva, sendo usada como controle no número de células por amostra. (B) Curva de crescimento do clone 1 (um) da DED1-2, mostrando o crescimento da cultura controle (-TET) em comparação com a cultura induzida (+TET); TET – tetraciclina.

Fonte: O autor (2025)

4.6 DETECÇÃO DAS HELICASES NOS LISADOS E IMUNOPRECIPITAÇÕES

Com a confirmação da expressão das proteínas em fase exponencial de 48h, foi iniciado a preparação dos lisados celulares neste período. Os lisados foram realizados em triplicata, com obtenção das frações citoplasmáticas (sobrenadante) correspondentes as linhagens transfectadas *TbDHH1*-HA, *TbDBP2B*-HA e *TbDED1-2*-HA. Dentre as proteínas expressas, a DED1-2 apresentou sinais de degradação, entretanto, essa condição não comprometeu a realização dos ensaios posteriores (Figura 19). Observa-se ainda a presença da DBP2B no sedimento pós-lise, embora com quantidades menores dos marcadores citoplasmáticos anti-BiP e anti-EIF4AI em comparação à DBP2B, sugerindo uma predominância de localização nuclear em relação à citoplasmática para essa proteína em *T. brucei* (Figura 19).

Figura 19: Ensaio de *Western blot* dos lisados em triplicata das linhagens *TbDHH1*, *TbDBP2B* e *TbDED1-2*, todas marcadas com HA

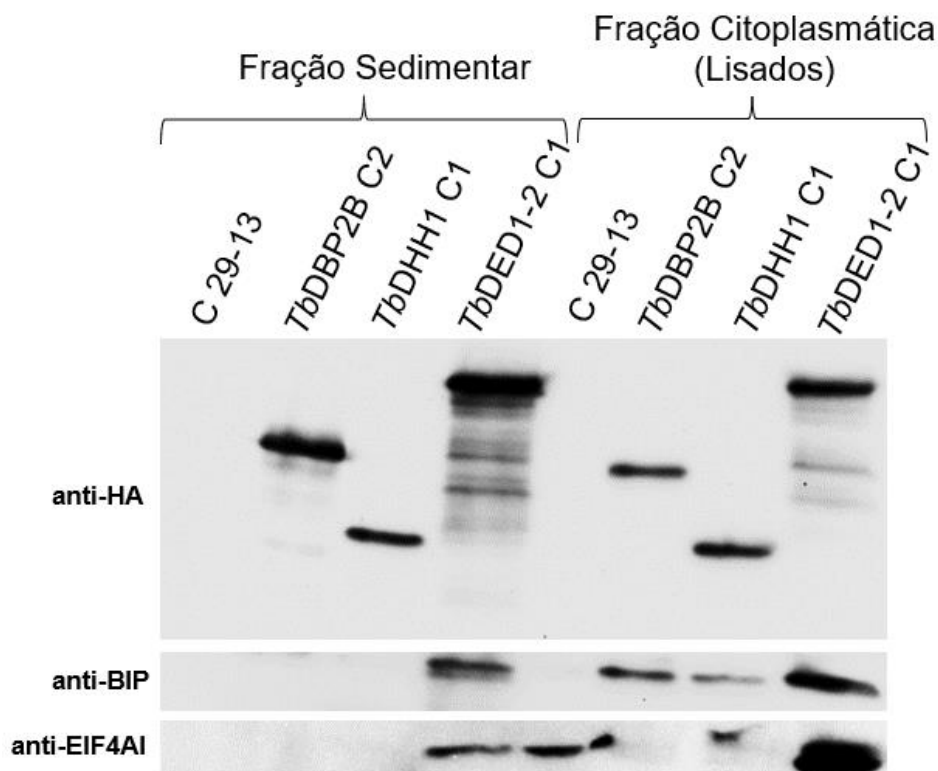


Legenda: Ensaio de *Western blot* para análise da fração sedimentar da *TbDBP2B* e confirmação da integridade das proteínas *TbDBP2B* (~69 kDa), *TbDED1-2* (~90 kDa) e *TbDHH1* (~53 kDa) na fração citoplasmática da lise celular. Uso de anticorpo monoclonal anti-HA e anticorpo contra a proteína chaperona BiP (~ 71 kDa - retículo endoplasmático/citoplasmática) e proteína EIF4AI (~ 45 kDa - citoplasmática), ambas de expressão constitutiva, sendo utilizadas como controle de carga e de lise celular, C - controle negativo que corresponde a células de *T. brucei* da linhagem parental 29-13.

Fonte: O autor (2025)

Em paralelo com a confirmação da integridade das proteínas nos lisados celulares, foi identificado maior quantidade da proteína *TbDBP2B* na fração do sedimento pós-lise em relação a proteína citoplasmática controle (BIP), na mesma fração, sendo indicativo de participação da *TbDBP2B* no núcleo do *T. brucei*. Com o intuito de verificar se o mesmo padrão ocorria com as demais proteínas, foi realizado um novo *Western blot* com as frações sedimentares e citoplasmáticas de todas as linhagens, e com o uso do controle BIP e EIF4AI (Figura 20). Nessa figura é possível observar a ausência da BIP e EIF4AI nas frações do sedimento pós-lise da *TbDBP2B* e *TbDHH1*, e fraca presença na fração sedimentar da *TbDED1-2*, o que pode indicar que, além do processo de lise por cavitação ter sido bem-sucedido, a *TbDHH1* e *TbDED1-2* também parece ter participação nuclear no *T. brucei*, apesar da BIP e da EIF4AI se apresentar fracamente na fração sedimentar da *TbDED1-2*, o que também pode indicar lise parcial durante a cavitação.

Figura 20: Ensaio de *Western blot* das frações sedimentares e citoplasmáticas das linhagens *TbDBP2B*, *TbDHH1* e *TbDED1-2*, todas marcadas com HA



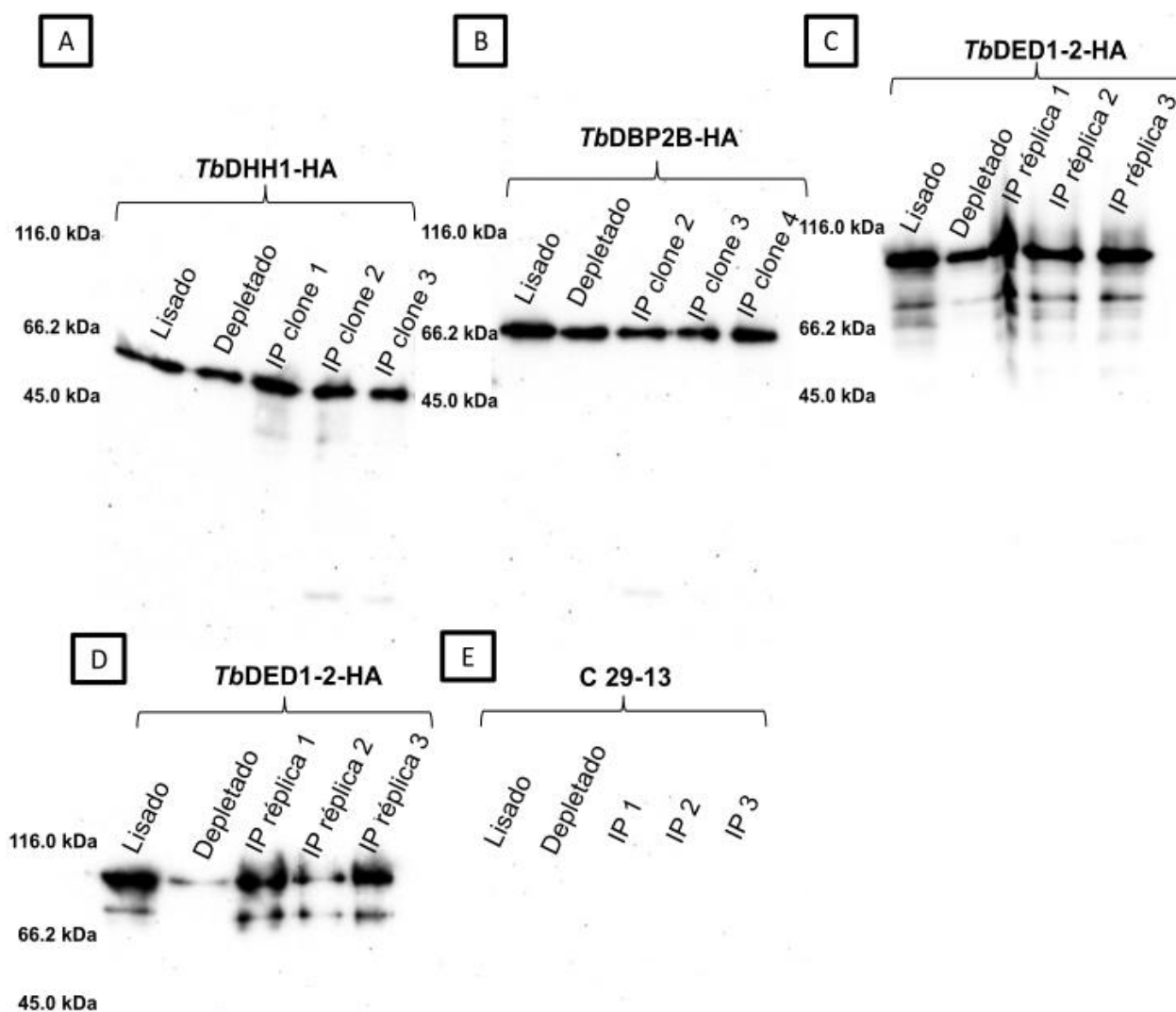
Legenda: Ensaio de *Western blot* para análise das frações sedimentares e citoplasmáticas da *TbDBP2B* (~69 kDa), *TbDHH1* (~53 kDa) e *TbDED1-2* (~90 kDa). Uso de anticorpo monoclonal anti-HA e anticorpo contra a proteína chaperona BiP (retículo endoplasmático/citoplasmática) e proteína EIF4AI (~45 kDa - citoplasmática), ambas de expressão constitutiva, sendo utilizadas como controle de carga e de lise celular; retângulo vermelho corresponde a expressão da proteína BiP, C - controle negativo que corresponde a células de *T. brucei* da linhagem parental 29-13.

Fonte: O autor (2025)

A partir da confirmação da integridade das proteínas nos lisados, seguiu-se para próxima etapa de ensaios de imunoprecipitação, que teve por intuito a precipitação dos complexos proteicos formados, para posterior identificação dessas proteínas por espectrometria de massas. Após o ensaio de imunoprecipitação, alíquotas do lisado celular, da fração depletada e da fração imunoprecipitada (lisados e esferas magnéticas anti-HA) foram submetidos a ensaios de *Western blot* com anticorpo anti-HA (Figura 21). Neste ensaio foi possível confirmar a imunoprecipitação (IP), demonstrando a presença das proteínas recombinantes em todas as amostras, ou seja, no lisado, na IP obtida e no sobrenadante depletado, neste caso uma redução do sinal no depletado foi observada apenas *TbDEAD1-2-HA* (Figura 21D). Para as demais linhagens, a presença da proteína-alvo no sobrenadante depletado pode ser

atribuída à saturação das beads magnéticas com anti-HA, resultando em uma fração excedente que não foi capturada durante o processo de IP.

Figura 21: Ensaio de *Western blot* dos lisados e imunoprecipitações das linhagens *TbDHH1*, *TbDBP2B* e *TbDED1-2*, todas marcadas com HA



Legenda: Ensaio de *Western blot* de confirmação das imunoprecipitações (IPs) da *TbDHH1* (A), *TbDBP2B* (B) e *TbDED1-2* (C e D) fusionadas ao epítipo HA. Presença do controle negativo sendo a linhagem selvagem transgênica (29-13) do *T. brucei* 427 (E); C - controle negativo que corresponde a células de *T. brucei* da linhagem parental 29-13.

Fonte: O autor (2025)

4.7 IDENTIFICAÇÃO DE PROTEÍNAS PARCEIRAS DAS HELICASES

A partir dos dados obtidos por espectrometria de massas, foi realizada uma análise detalhada das proteínas que copurificaram com as RNA helicases-alvo em *T. brucei*. Inicialmente, os códigos de identificação das proteínas foram comparados ao banco de dados online do *TritypDB* para validação. Em seguida, os valores de intensidade foram normalizados, calculadas as médias e aplicados critérios de filtragem, conforme descrito no item 3.10.

Com a indução na expressão das helicases-alvo, foi possível observar um aumento na intensidade média ou abundância dessas proteínas nas amostras da DED1-2 (Tabela 3), DHH1 (Tabela 4) e DBP2B (Tabela 5), em comparação com outros polipeptídeos coprecipitados.

4.7.1 Proteínas sem atuação conhecida na tradução que coprecipitaram com as RNA helicases-alvo

Dentre os 16 polipeptídeos que copurificaram com a DED1-2, dentro do *cut off* estabelecido (Tabela 3) destacaram-se a CAT (*Carnitine O-acetyltransferase*), *trans-sialidase*, HEL66 e a proteína hipotética *Tb927.9.10400*, as quais apresentaram um enriquecimento diferencial (razão ≥ 4) com a DED1-2 em relação a sua coprecipitação com a DHH1 e DBP2B. A CAT e a ACC (*Acetyl-CoA carboxylase*), ambas envolvidas na regulação do metabolismo energético, especialmente na biossíntese de ácidos graxos, apresentaram níveis de enriquecimento notavelmente altos com a DED1-2 (razão ≥ 60) quando comparadas ao *pool* de proteínas associadas à DBP2B. A CAT mostrou-se específica da DED1-2, enquanto a ACC também copurifica com a DHH1 em abundância semelhante com a DED1-2. De forma parecida, a *trans-sialidase*, glicoproteína de superfície, e a HEL66, uma RNA helicase, exibiram abundância com razão ≥ 20 na coprecipitação com a DED1-2 em comparação a DBP2B, com exceção da proteína hipotética *Tb927.9.10400*. Apesar da DED1-2 ser uma proteína notavelmente parceira da HEL67, esta não foi encontrada com o enriquecimento mínimo de 1,5 em relação ao controle negativo, sendo dessa forma estatisticamente removida das análises.

O padrão do IP de DHH1, por sua vez, mostrou uma coprecipitação significativa com 17 polipeptídeos, com destaque para subunidades do complexo de deadenilação NOT, incluindo NOT10, CAF40, NOT11 e NOT2 (Tabela 4). Além disso, a DED1-2 coprecipitou com a DHH1 e DBP2B, mas o inverso não foi observado.

A DBP2B, considerando os critérios de inclusão como razão ≥ 4 em relação ao controle negativo e entre as próprias helicases, foi a proteína alvo que apresentou o maior número de coprecipitados, com 44 polipeptídeos, contra 16 e 17 proteínas associadas a DED1-2 e DHH1, respectivamente. Este perfil indica um conjunto de parceiros mais diversos e menos sobreposto em relação ao DED1-2, no entanto, mais semelhante ao da DHH1 (Tabela 5). Dentre as proteínas associadas à DBP2B, destacaram-se PARN-1, envolvida na deadenilação de mRNAs, MTR4, associada à maturação de RNA ribossômico (rRNA), ALBA4 (proteína de ligação a RNA), HNRNPH/F (proteína de *splicing*) e NH2, proteína presente em glicossomos, que exibiram níveis significativos de enriquecimento com a DBP2B, principalmente na razão com sua copurificação na DED1-2. Por fim, foi realizado um diagrama de Venn, onde é possível verificar as proteínas que coprecipitam de forma diferencial e em comum entre as RNA helicases (Figura 22), sendo interessante notar que a DED1-2 foi a única proteína alvo que está presente em todas as amostras.

Tabela 3: Polipeptídeos detectados no imunoprecipitado da proteína recombinante DED1-2-HA por espectrometria de massas

Gene IDs	Nome do gene	Função	Méd. Int. (DBP2B)	Méd. Int. (DED1-2)	Méd. Int. (DHH1)	Razão DED1-2/C	Razão DED1-2/DBP2B	Razão DED1-2/DHH1
<i>Tb927.11.2230</i>	CAT	Regulação do metabolismo energético	9,16 x 10 ⁶	5,75 x 10 ⁸	6,69 x 10 ⁷	*	62,76	8,59
<i>Tb927.8.7100</i>	ACC	Regulação do metabolismo energético	6,95 x 10 ⁷	4,26 x 10 ⁹	2,70 x 10 ⁹	39,9	61,25	1,58
<i>Tb927.5.440</i>	Trans-sialidase	Glicoproteína de superfície	1,75 x 10 ⁸	4,72 x 10 ⁹	5,66 x 10 ⁸	*	26,94	8,34
<i>Tb927.10.1720</i>	HEL66	RNA helicase	6,80 x 10 ⁶	1,56 x 10 ⁸	3,40 x 10 ⁷	*	22,99	4,59
<i>Tb927.9.12510</i>	DED1-2	RNA helicase	8,81 x 10 ⁹	1,93 x 10 ¹¹	8,97 x 10 ⁹	105,8	21,85	21,47
<i>Tb927.9.8720</i>	FBPase	Regulação do metabolismo energético	7,54 x 10 ⁷	8,59 x 10 ⁸	5,98 x 10 ⁸	*	11,40	1,44
<i>Tb927.8.4950</i>	KLIF	Divisão celular (citocinese)	1,57 x 10 ⁸	1,17 x 10 ⁹	1,64 x 10 ⁹	7,4	7,46	0,72
<i>Tb927.9.10400</i>	Proteína hipotética	-	1,92 x 10 ⁸	9,63 x 10 ⁸	1,22 x 10 ⁸	*	5,00	7,90
<i>Tb927.11.630</i>	RPA135	Transcrição de RNA	4,50 x 10 ⁷	2,22 x 10 ⁸	2,10 x 10 ⁸	*	4,93	1,06
<i>Tb927.11.3120</i>	NOG1	Proteína nucleolar	1,53 x 10 ⁸	6,62 x 10 ⁸	3,62 x 10 ⁸	*	4,34	1,83
<i>Tb927.8.4450</i>	RBP11	Proteína de ligação a RNA	2,35 x 10 ⁸	9,17 x 10 ⁸	4,43 x 10 ⁸	*	3,91	2,07
<i>Tb927.10.9080</i>	Pteridine transporter	Transporte de pteridinas	1,60 x 10 ⁹	5,76 x 10 ⁹	1,44 x 10 ⁹	*	3,61	4,01
<i>Tb927.1.1270</i>	Homocysteine S-methyltransferase	Metabolismo de aminoácidos	1,98 x 10 ⁸	5,69 x 10 ⁸	0,00 x 10 ³	*	2,87	∅
<i>Tb927.11.7560</i>	CMF15	Componente de motilidade flagelar	1,70 x 10 ⁹	2,45 x 10 ⁹	1,72 x 10 ⁸	15,6	1,44	14,29
<i>Tb927.5.520</i>	Stomatin-like protein	Componente de membrana	1,79 x 10 ⁹	2,33 x 10 ⁹	1,41 x 10 ⁸	4,6	1,30	16,48
<i>Tb927.11.1330</i>	Stress responsive A/B Barrel Domain	Proteção contra estresse celular	1,28 x 10 ⁹	1,14 x 10 ⁹	2,09 x 10 ⁸	*	0,89	5,43

Legenda: Os polipeptídeos foram selecionados com base na razão ≥ 4 em relação ao controle negativo e em relação aos dados de coprecipitação nas helicases-alvo (DBP2B e DHH1). Regiões em vermelho representam um enriquecimento diferencial (≥ 4) do peptídeo com a DED1-2, em relação a sua coprecipitação com a DBP2B e DHH1. * Proteína não encontrada no controle, Méd. Int. (Média de intensidade), C (controle), ∅ - Indefinido. Fonte: O autor (2025)

Tabela 4: Polipeptídeos detectados no imunoprecipitado da proteína recombinante DHH1-HA por espectrometria de massas

Gene IDs	Nome do gene	Função	Méd. Int. (DBP2B)	Méd. Int. (DED1-2)	Méd. Int. (DHH1)	Razão DHH1/C	Razão DHH1/DBP2B	Razão DHH1/DED1-2
Tb927.8.4950	KLIF	Divisão celular (citocinese)	1,57 x 10 ⁸	1,17 x 10 ⁹	1,64 x 10 ⁹	10,3	10,39	1,39
Tb927.3.4390	GCVL-1	Regulação do metabolismo energético	9,12 x 10 ⁷	1,24 x 10 ⁸	8,21 x 10 ⁸	*	9,01	6,62
Tb927.10.8720	NOT10	Subunidade de complexo CCR4-NOT	9,79 x 10 ⁸	1,13 x 10 ⁹	5,53 x 10 ⁹	16,9	5,65	4,88
Tb927.10.3990	DHH1	Helicase RNA DEAD-box	1,92 x 10 ¹⁰	1,11 x 10 ¹⁰	9,13 x 10 ¹⁰	8,3	4,74	8,26
Tb927.9.12510	DED1-2	RNA Helicase DEAD-box	8,81 x 10 ⁹	1,93 x 10 ¹¹	8,97 x 10 ⁹	4,9	1,02	0,05
Tb927.10.9570	PFC14	Componente estrutural do paraflagelo	4,91 x 10 ⁸	5,42 x 10 ⁸	2,20 x 10 ⁹	*	4,48	4,06
Tb927.11.11780	Acyl-CoA dehydrogenase	Regulação do metabolismo energético	1,84 x 10 ⁸	3,35 x 10 ⁸	8,00 x 10 ⁸	*	4,35	2,39
Tb927.4.410	CAF40	Subunidade de complexo CCR4-NOT	1,65 x 10 ⁹	1,52 x 10 ⁹	6,93 x 10 ⁹	*	4,19	4,57
Tb927.8.1960	NOT11	Subunidade de complexo CCR4-NOT	2,04 x 10 ⁹	1,61 x 10 ⁹	8,49 x 10 ⁹	*	4,16	5,26
Tb927.6.5080	DUF3808	Função não caracterizada	3,33 x 10 ⁸	8,56 x 10 ⁸	1,38 x 10 ⁹	*	4,14	1,61
Tb927.6.850	NOT2	Subunidade de complexo CCR4-NOT	1,21 x 10 ⁹	5,92 x 10 ⁸	3,68 x 10 ⁹	*	3,04	6,22
Tb927.10.15740	WD40 repeat-containing protein	Interação proteína-proteína	8,71 x 10 ⁷	3,40 x 10 ⁷	2,17 x 10 ⁸	*	2,50	6,38
Tb927.2.3580	TFIIS2-1	Transcrição de RNA	3,30 x 10 ⁸	1,35 x 10 ⁸	6,15 x 10 ⁸	8,7	1,87	4,56
Tb927.11.6980	Phosphoenolpyruvate carboxykinase	Regulação do metabolismo energético	5,13 x 10 ⁸	1,78 x 10 ⁸	7,54 x 10 ⁸	*	1,47	4,23
Tb927.8.3690	IDH	Regulação do metabolismo energético	5,56 x 10 ⁹	8,26 x 10 ⁸	4,85 x 10 ⁹	*	0,87	5,88
Tb927.11.16830	RABL5	Regulação do transporte de vesículas	6,88 x 10 ⁸	1,12 x 10 ⁸	5,77 x 10 ⁸	*	0,84	5,14
Tb927.10.2810	Proteína hipotética	Função não caracterizada	9,79 x 10 ⁸	1,51 x 10 ⁸	6,16 x 10 ⁸	*	0,63	4,09

Legenda: Os peptídeos foram selecionados com base na razão ≥ 4 em relação ao controle negativo e em relação aos dados de coprecipitação nas helicases-alvo (DBP2B e DED1-2). Regiões em vermelho representam um enriquecimento diferencial (≥ 4) do peptídeo com a DHH1, em relação a sua coprecipitação com a DBP2B e DED1-2. * Proteína não encontrada no controle, Méd. Int. (Média de intensidade), C (controle). Fonte: O autor (2025).

Tabela 5: Polipeptídeos detectados no imunoprecipitado da proteína recombinante DBP2B-HA por espectrometria de massas

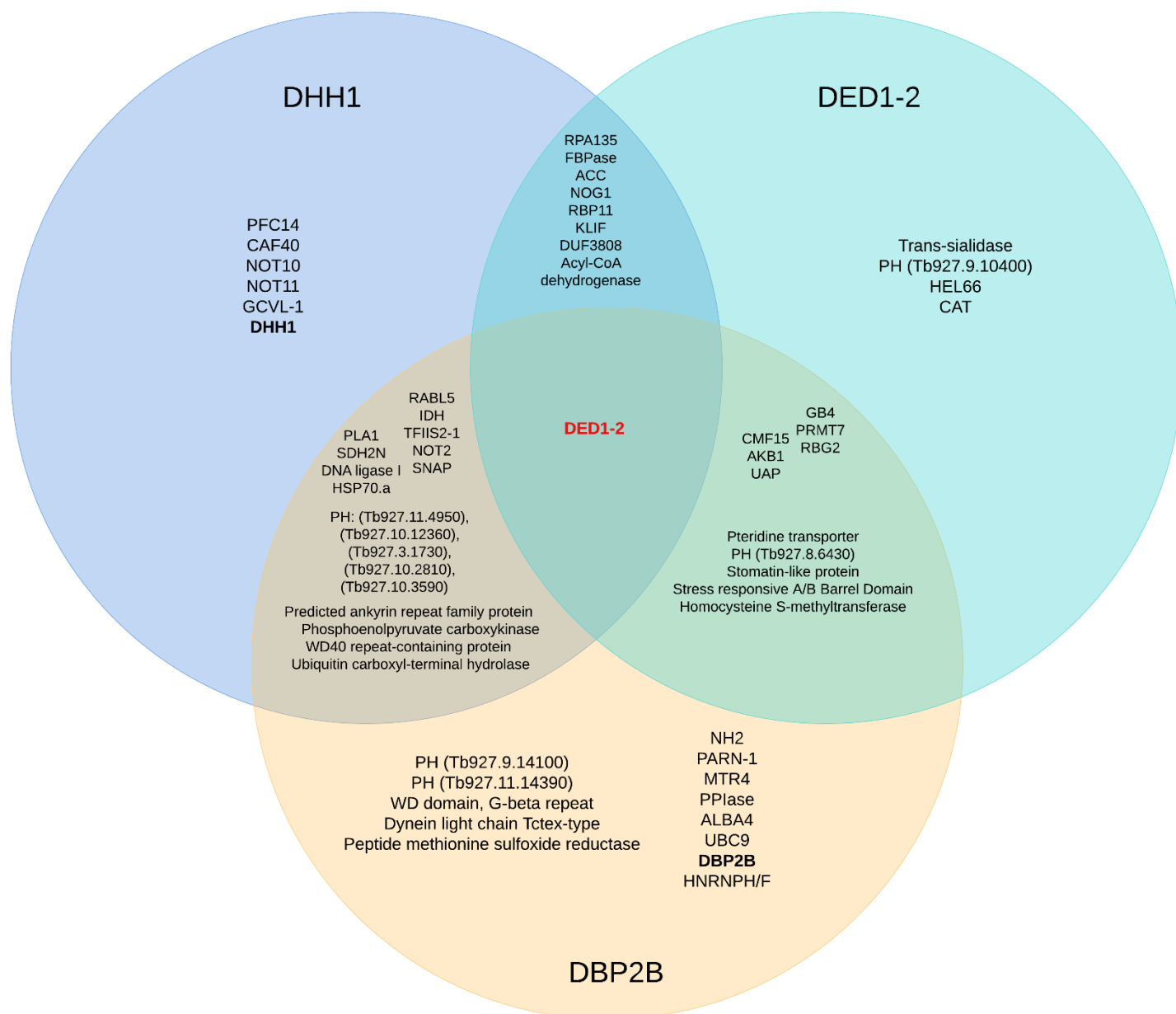
Gene IDs	Nome do gene	Função	Méd. Int DBP2B	Méd. Int DED1-2	Méd. Int DHH1	Razão DBP2B/C	Razão DBP2B/DED1-2	Razão DBP2B/DHH1
Tb927.8.1510	DBP2B	RNA Helicase DEAD-box	2,21 x 10¹⁰	8,37 x 10⁸	5,52 x 10⁸	50,2	26,39	40,06
Tb927.8.2850	PARN-1	Remoção de poli(A) de mRNAs	3,45 x 10⁸	1,32 x 10⁷	2,80 x 10⁷	*	26,06	12,30
Tb927.6.4780.1; Tb927.6.4780.2	DNA ligase I, putative	Replicação do DNA	2,11 x 10 ⁸	8,58 x 10 ⁶	9,72 x 10 ⁷	*	24,56	2,17
Tb927.10.7440	MTR4	RNA Helicase DEAD-box	4,99 x 10⁹	2,08 x 10⁸	2,94 x 10⁸	*	23,96	16,94
Tb927.9.12510	DED1-2	RNA Helicase DEAD-box	8,81 x 10⁹	1,93 x 10¹¹	8,97 x 10⁹	4,8	0,05	0,98
Tb927.6.4750	Proteína hipotética	Função não caracterizada	3,48 x 10⁸	1,59 x 10⁷	1,93 x 10⁸	*	21,94	1,81
Tb927.5.4350	NH2	Presente em glicossomos	4,65 x 10⁸	3,50 x 10⁷	5,24 x 10⁷	*	13,29	8,88
Tb927.4.380	WD domain, G-beta repeat	Interação proteína-proteína	2,44 x 10⁹	2,07 x 10⁸	2,24 x 10⁸	*	11,78	10,89
Tb927.11.4950	Proteína hipotética	Função não caracterizada	2,93 x 10⁸	2,63 x 10⁷	1,24 x 10⁸	*	11,12	2,37
Tb927.10.3500	U2AF2 (RBSR4)	Proteína de splicing	1,89 x 10⁸	1,77 x 10⁷	1,93 x 10⁸	*	10,71	0,98
Tb927.10.12360	Proteína hipotética	Função não caracterizada	3,79 x 10⁸	3,68 x 10⁷	1,21 x 10⁸	*	10,30	3,14
Tb927.10.12990	Predicted ankyrin repeat family protein	Associada a sinalização/transporte	2,07 x 10⁸	2,08 x 10⁷	7,77 x 10⁷	*	9,91	2,66
Tb927.8.3380	SDH2N	Proteína mitocondrial	6,13 x 10⁸	6,24 x 10⁷	2,45 x 10⁸	*	9,82	2,50
Tb927.10.10320	Dynein light chain Tctex-type	Proteína associada a flagelo	2,66 x 10⁸	2,81 x 10⁷	1,07 x 10⁷	*	9,46	24,88
Tb927.10.2990	CBP110	Proteína de splicing	1,94 x 10⁸	2,53 x 10⁷	1,10 x 10⁸	*	7,66	1,76
Tb927.9.4500	HSP70.a	Chaperona	6,97 x 10⁸	9,23 x 10⁷	2,03 x 10⁸	*	7,55	3,42
Tb927.2.2460	UBC9	Proteína de ubiquitinação	4,20 x 10⁸	6,03 x 10⁷	1,53 x 10⁷	*	6,96	27,47
Tb927.8.550	Peptide methionine sulfoxide reductase	Proteção contra radicais livres	1,33 x 10⁹	1,92 x 10⁸	0,00 x 10³	*	6,90	⊙
Tb927.8.3690	IDH	Regulação do metabolismo energético	5,56 x 10⁹	8,26 x 10⁸	4,85 x 10⁹	*	6,73	1,14
Tb927.11.16080	SNAP	Regulação do transporte vesicular	4,87 x 10⁸	7,30 x 10⁷	1,84 x 10⁸	*	6,67	2,64

<i>Tb927.10.2810</i>	Proteína hipotética	Função não caracterizada	9,79 x 10 ⁸	1,51 x 10 ⁸	6,16 x 10 ⁸	*	6,50	1,59
<i>Tb927.7.3180</i>	Adaptor complex AP-1 medium subunit, putative	Regulação do transporte vesicular	2,51 x 10 ⁸	3,90 x 10 ⁷	1,75 x 10 ⁸	*	6,43	1,44
<i>Tb927.11.16830</i>	RABL5	Regulação do transporte vesicular	6,88 x 10 ⁸	1,12 x 10 ⁸	5,77 x 10 ⁸	*	6,14	1,19
<i>Tb927.10.4620</i>	PPlase	Atua no dobramento de proteínas	7,49 x 10 ⁸	1,37 x 10 ⁸	2,83 x 10 ⁷	*	5,45	26,50
<i>Tb927.2.3880</i>	HNRNPH/F	Proteína de <i>splicing</i>	2,04 x 10 ⁸	4,10 x 10 ⁷	0,00 x 10 ³	*	4,97	⊙
<i>Tb927.11.14390</i>	Proteína hipotética	Função não caracterizada	2,64 x 10 ⁸	5,75 x 10 ⁷	3,64 x 10 ⁷	*	4,59	7,25
<i>Tb927.3.5490</i>	PIFTB2	Proteína associada a flagelo	1,02 x 10 ⁹	2,23 x 10 ⁸	5,19 x 10 ⁸	*	4,58	1,97
<i>Tb927.3.1730</i>	Proteína hipotética	Função não caracterizada	3,79 x 10 ⁸	8,28 x 10 ⁷	1,17 x 10 ⁸	*	4,58	3,25
<i>Tb927.4.2030</i>	ALBA4	Proteína de ligação a DNA/RNA	1,00 x 10 ⁹	2,21 x 10 ⁸	3,78 x 10 ⁷	*	4,54	26,52
<i>Tb927.1.1380</i>	Serine/threonine protein phosphatase 2A regulatory subunit	Regulação de fosfatases	4,17 x 10 ⁸	9,23 x 10 ⁷	2,09 x 10 ⁸	*	4,52	1,99
<i>Tb927.10.3590</i>	Proteína hipotética	Função não caracterizada	2,80 x 10 ⁸	6,27 x 10 ⁷	1,36 x 10 ⁸	*	4,47	2,06
<i>Tb927.1.2120</i>	CALP1.3	Proteólise	3,00 x 10 ⁸	7,03 x 10 ⁷	2,76 x 10 ⁸	*	4,27	1,09
<i>Tb927.10.2270</i>	Vacuolar protein sorting-associated protein 35	Transporte intracelular	4,12 x 10 ⁸	9,97 x 10 ⁷	3,24 x 10 ⁸	*	4,13	1,27
<i>Tb927.11.8310</i>	CITFA-4	Transcrição	1,88 x 10 ⁸	4,56 x 10 ⁷	9,38 x 10 ⁷	*	4,13	2,01
<i>Tb927.3.4840</i>	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase	Proteína de ubiquitinação	2,13 x 10 ⁹	5,18 x 10 ⁸	1,03 x 10 ⁹	8,4	4,10	2,07
<i>Tb927.1.4830</i>	PLA1	Hidrolise de fosfolípidos	2,89 x 10 ⁸	7,14 x 10 ⁷	1,39 x 10 ⁸	*	4,04	2,08
<i>Tb927.9.14100</i>	Proteína hipotética	Função não caracterizada	2,96 x 10 ⁸	7,40 x 10 ⁷	4,51 x 10 ⁷	*	4,00	6,56
<i>Tb927.9.9020</i>	RBG2	Montagem de ribossomo	1,72 x 10 ⁸	5,47 x 10 ⁷	3,64 x 10 ⁷	*	3,15	4,73
<i>Tb927.7.5490</i>	PRMT7	Proteína de metilação em resíduos de arginina	3,44 x 10 ⁸	1,30 x 10 ⁸	3,42 x 10 ⁷	*	2,65	10,05

<i>Tb11.v5.0868</i>	Mitotubule-associated protein Gb4	Participação em divisão celular	2,09 x 10 ⁹	8,51 x 10 ⁸	3,26 x 10 ⁸	*	2,46	6,41
<i>Tb927.11.2520</i>	UAP	Biossíntese de glicoconjugados	3,07 x 10 ⁸	1,47 x 10 ⁸	7,54 x 10 ⁷	*	2,10	4,08
<i>Tb927.8.6430</i>	Proteína hipotética	Função não caracterizada	4,98 x 10 ⁸	3,26 x 10 ⁸	2,39 x 10 ⁷	*	1,53	20,80
<i>Tb927.11.1330</i>	Stress responsive A/B Barrel Domain	Proteção contra estresse celular	1,28 x 10 ⁹	1,14 x 10 ⁹	2,09 x 10 ⁸	*	1,12	6,10
<i>Tb927.10.14770</i>	AKB1	Associada a Tb14-3-3/sinalização	4,19 x 10 ⁸	4,53 x 10 ⁸	1,05 x 10 ⁸	*	0,92	4,00

Legenda: Os peptídeos foram selecionados com base na razão ≥ 4 em relação ao controle negativo e em relação aos dados de coprecipitação das demais helicases-alvo (DED1-2 e DHH1). Regiões em vermelho representam um enriquecimento diferencial (≥ 4) do peptídeo em relação a sua coprecipitação com a DED1-2 e DHH1. * Proteína não encontrada no controle, Méd. Int. (Média de intensidade), C (controle), $\emptyset$ - Indefinido. Fonte: O autor (2025)

Figura 22: Diagrama de Venn comparando os polipeptídeos que coprecipitam com as helicases DHH1, DED1-2 e DBP2B, todas marcadas com HA



Legenda: Os polipeptídeos foram comparados com base em uma razão ≥ 4 , tanto em relação ao controle negativo quanto às próprias helicases-alvo, sendo possível identificar as proteínas diferencialmente enriquecidas e aquelas que coprecipitam de forma comum. PH refere-se a *Proteína Hipotética*. Observação: a proteína destacada em vermelho (DED1-2) é a única RNA helicase alvo que evidentemente copurifica com a DHH1 e DBP2B em razão ≥ 4 ao controle.

Fonte: O autor (2025).

4.7.2 Fatores de tradução que coprecipitaram com as RNA helicases-alvo

As helicases DED1-2, DHH1 e DBP2B coprecipitaram com diversos fatores de tradução, apresentando razões de enriquecimento $\geq 1,5$ em relação ao controle negativo (Tabela 6).

Tabela 6: Fatores de tradução detectados na espectrometria de massas das proteínas DBP2B, DED1-2 e DHH1, marcadas com HA

<i>Gene IDs</i>	<i>Nome do gene</i>	<i>Média de intensidade (DBP2B)</i>	<i>Média de intensidade (DED1-2)</i>	<i>Média de intensidade (DHH1)</i>	<i>Razão DBP2B/ Controle</i>	<i>Razão DED1-2/ Controle</i>	<i>Razão DHH1/ Controle</i>
<i>Tb927.6.1870</i>	EIF4E4	$6,75 \times 10^8$	$1,19 \times 10^9$	$1,08 \times 10^9$	*	*	*
<i>Tb927.10.5020</i>	EIF4E5	$3,81 \times 10^8$	$2,06 \times 10^8$	$1,96 \times 10^8$	*	*	*
<i>Tb927.7.1670</i>	EIF4E6	$7,69 \times 10^8$	$6,61 \times 10^8$	$5,11 \times 10^8$	*	*	*
<i>Tb927.8.4820</i>	EIF4G3	$5,32 \times 10^8$	$1,13 \times 10^9$	$1,37 \times 10^9$	*	*	*
<i>Tb927.11.10560</i>	EIF4G4	$1,92 \times 10^9$	$6,25 \times 10^8$	$2,03 \times 10^9$	7,3	2,4	7,7
<i>Tb927.9.4680</i>	EIF4AI	$3,44 \times 10^{10}$	$6,18 \times 10^{10}$	$5,08 \times 10^{10}$	1,0	1,7	1,4
<i>Tb927.8.5880</i>	EIF1A	$2,02 \times 10^9$	$1,66 \times 10^9$	$1,58 \times 10^9$	*	*	*
<i>Tb927.5.3450</i>	eIF2A	$1,27 \times 10^9$	$1,33 \times 10^9$	$1,47 \times 10^9$	*	*	*
<i>Tb927.11.13250</i>	eIF2 γ	$5,20 \times 10^9$	$7,47 \times 10^9$	$6,10 \times 10^9$	*	*	*
<i>Tb927.5.2570</i>	EIF3B	$5,65 \times 10^9$	$5,99 \times 10^9$	$5,20 \times 10^9$	2,5	2,7	2,3
<i>Tb927.10.8270;</i> <i>Tb927.10.8290</i>	EIF3C	$7,86 \times 10^9$	$7,35 \times 10^9$	$5,93 \times 10^9$	4,2	3,9	3,2
<i>Tb927.6.4370</i>	EIF3D	$7,58 \times 10^9$	$8,64 \times 10^9$	$6,39 \times 10^9$	6,7	7,7	5,7
<i>Tb927.11.11590</i>	EIF3E	$2,81 \times 10^9$	$2,49 \times 10^9$	$2,37 \times 10^9$	*	*	*
<i>Tb927.3.1680</i>	EIF3F	$4,64 \times 10^9$	$4,58 \times 10^9$	$4,08 \times 10^9$	3,0	3,0	2,6
<i>Tb927.11.9610</i>	EIF3I	$2,00 \times 10^9$	$1,65 \times 10^9$	$1,51 \times 10^9$	*	*	*
<i>Tb927.11.15420</i>	EIF3K	$3,20 \times 10^9$	$2,95 \times 10^9$	$2,88 \times 10^9$	4,9	4,5	4,4
<i>Tb927.11.740</i>	EIF5A	$1,68 \times 10^{10}$	$1,88 \times 10^{10}$	$1,54 \times 10^{10}$	1,6	1,8	1,5
<i>Tb927.10.5300</i>	EIF6	$2,19 \times 10^9$	$1,50 \times 10^9$	$1,61 \times 10^9$	*	*	*

Legenda: Os resultados das proteínas que copurificam com a DBP2B, DED1-2 e DHH1 com razão $\geq 1,5$ em relação ao controle negativo. *Proteínas não identificadas no controle.

Fonte: O autor (2025)

Análises comparativas entre os coprecipitados das helicases revelaram que DED1-2 e DHH1 exibem um enriquecimento diferencial ($\geq 1,5$) com um dos principais complexos do tipo eIF4F associados à tradução geral, baseado nas subunidades EIF4E4 e EIF4G3 (Tabela 7). Além disso, DHH1 e DBP2B também mostraram enriquecimento diferencial com a subunidade EIF4G4, indicando a participação dessas helicases no segundo principal complexo do tipo eIF4F envolvido na tradução geral, formado por EIF4E3/EIF4G4. Outras subunidades, como o EIF4E5 e EIF4E6

coprecipitaram com as três helicases-alvo, com destaque para o enriquecimento diferencial observado com a DBP2B destacando, nesse contexto, uma possível preferência de interação (Tabela 7).

A subunidade EIF4AI (pertencente ao complexo baseado nas subunidades EIF4E4/EIF4G3), curiosamente coprecipitou com a DHH1 e DBP2B em abundância semelhante com o controle negativo (Tabela 6), enquanto que, na amostra da DED1-2 se mostrou diferencialmente enriquecido, assim como na razão entre a amostra da DED1-2/DBP2B (Tabela 7). Além das associações com as principais subunidades do complexo eIF4F, as RNA helicases-alvo se associaram a outros fatores de tradução amplamente conservados, como eIF2A, eIF2 γ , EIF5A, EIF6 e subunidades do complexo eIF3, sendo essa associação capaz de fornecer indícios da possível localização espacial e funcional dessas helicases em relação aos complexos tipo eIF4F (Tabela 7), sugerindo assim seu potencial papel na regulação e organização da maquinaria de tradução em *T. brucei*.

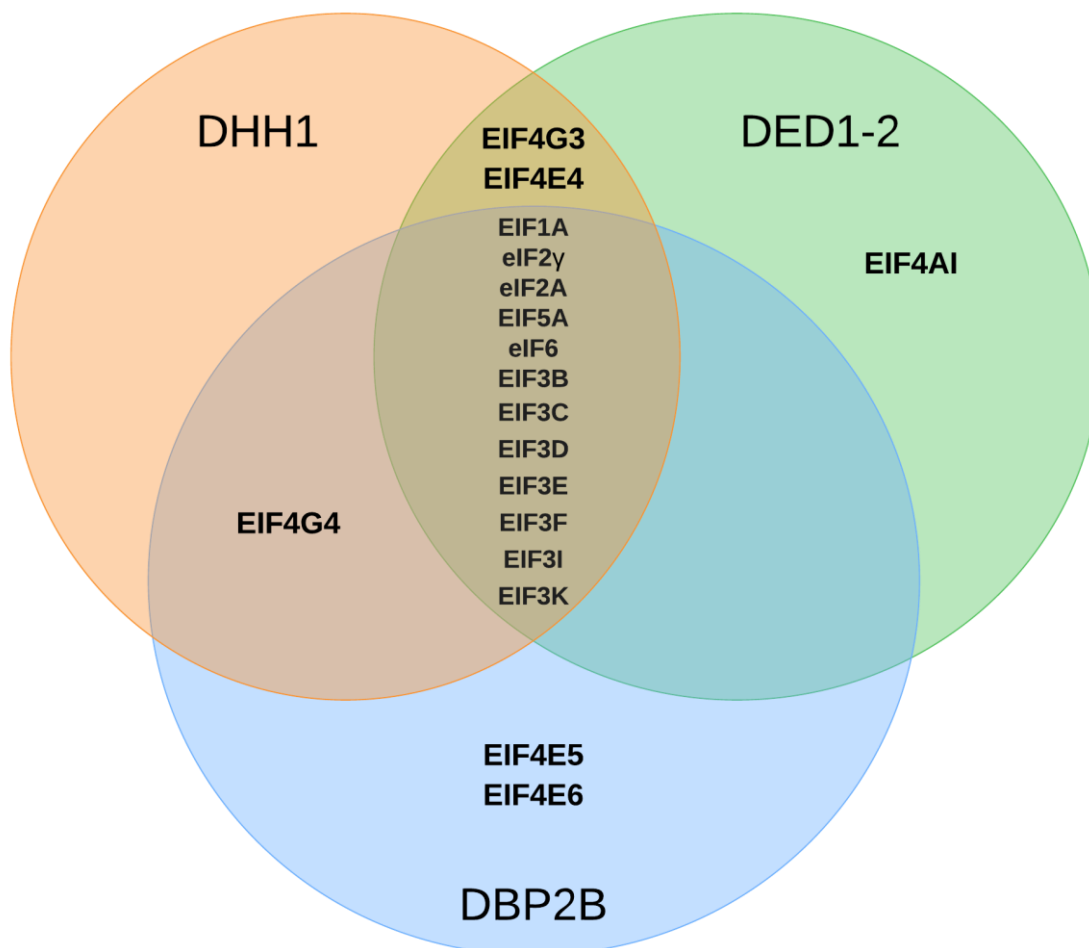
Tabela 7: Razão de enriquecimento entre os fatores de tradução que coprecipitam com a DBP2B, DED1-2 e DHH1, marcadas com HA

<i>Gene IDs</i>	<i>Nome do gene</i>	<i>Razão DBP2B/DED1-2</i>	<i>Razão DBP2B/DHH1</i>	<i>Razão DED1-2/DBP2B</i>	<i>Razão DED1-2/DHH1</i>	<i>Razão DHH1/DBP2B</i>	<i>Razão DHH1/DED1-2</i>
$\Delta\Box$ Tb927.6.1870	EIF4E4	0,57	0,62	1,77	1,10	1,60	0,91
●Tb927.10.5020	EIF4E5	1,85	1,94	0,54	1,05	0,52	0,95
●Tb927.7.1670	EIF4E6	1,16	1,50	0,86	1,29	0,67	0,77
$\Delta\Box$ Tb927.8.4820	EIF4G3	0,47	0,39	2,13	0,83	2,57	1,21
$\Delta\bullet$ Tb927.11.10560	EIF4G4	3,07	0,95	0,33	0,31	1,06	3,25
$\Box$ Tb927.9.4680	EIF4AI	0,56	0,68	1,80	1,22	1,48	0,82
Tb927.8.5880	EIF1A	1,21	1,28	0,82	1,05	0,78	0,95
Tb927.5.3450	eIF2A	0,96	0,87	1,05	0,91	1,15	1,10
Tb927.11.13250	eIF2 γ	0,70	0,85	1,43	1,22	1,17	0,82
Tb927.5.2570	EIF3B	0,94	1,08	1,06	1,15	0,92	0,87
Tb927.10.8270; Tb927.10.8290	EIF3C	1,07	1,32	0,94	1,24	0,76	0,81
Tb927.6.4370	EIF3D	0,88	1,19	1,14	1,35	0,84	0,74
Tb927.11.11590	EIF3E	1,13	1,19	0,88	1,05	0,84	0,95
Tb927.3.1680	EIF3F	1,01	1,14	0,99	1,12	0,88	0,89
Tb927.11.9610	EIF3I	1,21	1,33	0,83	1,10	0,75	0,91
Tb927.11.15420	EIF3K	1,08	1,11	0,92	1,03	0,90	0,97
Tb927.11.740	EIF5A	0,90	1,09	1,12	1,21	0,92	0,82
Tb927.10.5300	eIF6	1,47	1,36	0,68	0,93	0,73	1,08

Legenda: Fatores de tradução com razão $\geq 1,5$ determina enriquecimento diferencial com a proteína alvo no numerador, enquanto fatores com razão $\leq 1,5$, determina abundância semelhante entre o numerador e denominador. ● – Proteína enriquecida com a DBP2B, Δ - Proteína enriquecida com a DHH1, $\Box$ – Proteína enriquecida com a DED1-2.

Fonte: O autor (2025)

Figura 23: Diagrama de Venn comparando as proteínas do complexo tipo eIF4F que coprecipitam com as helicases DHH1, DED1-2 e DBP2B marcadas com HA, com razão $\geq 1,5$ em relação ao controle.



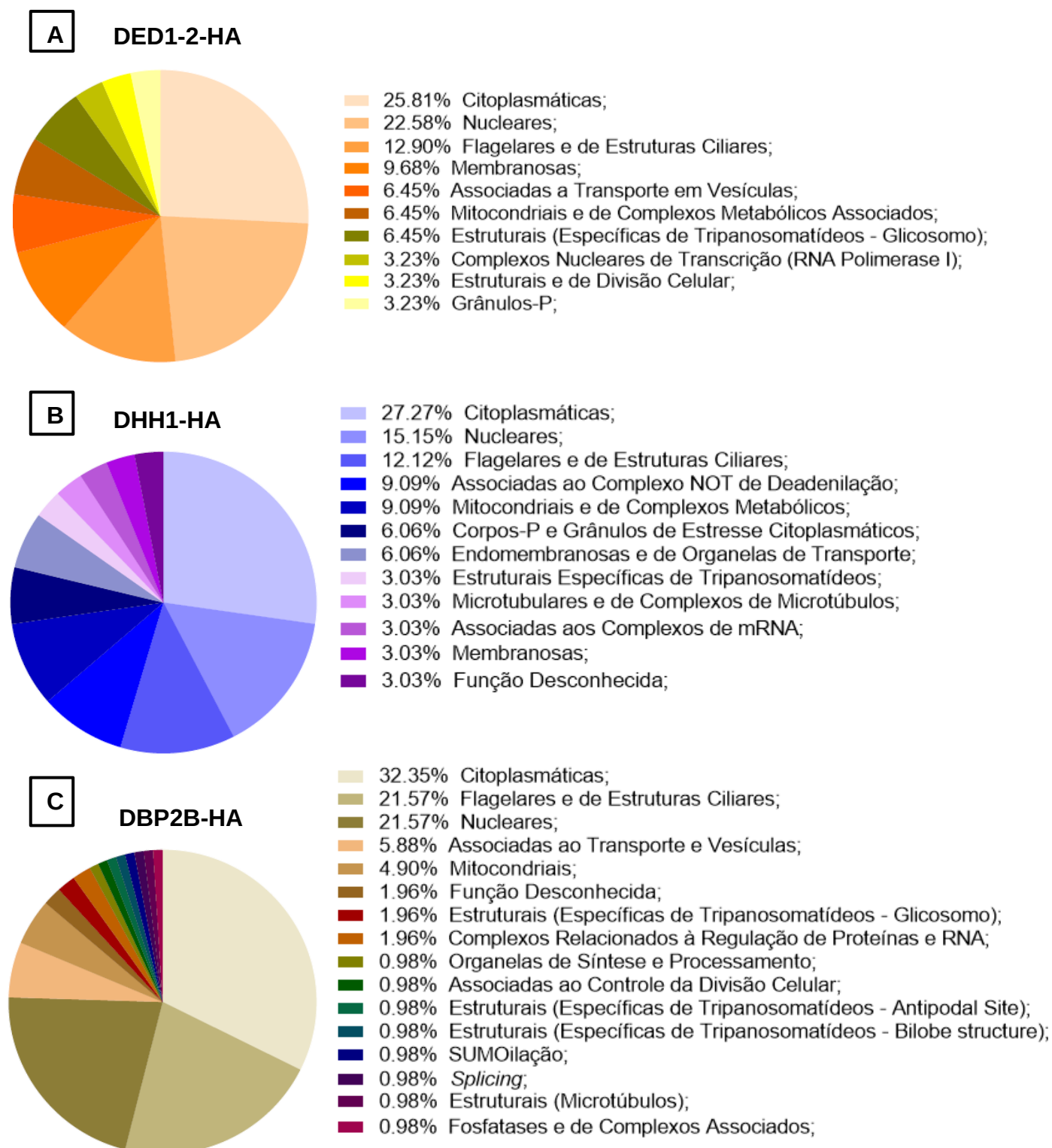
Legenda: As proteínas foram consideradas diferencialmente enriquecidas através da razão $\geq 1,5$ entre os coprecipitados de cada helicase alvo. Razões $\leq 1,5$ foram consideradas para proteínas abundantemente semelhante entre as helicase.

Fonte: O autor (2025)

4.7.3 Localização subcelular dos polipeptídeos que coprecipitaram com as RNA helicases-alvo

A localização subcelular dos polipeptídeos que coprecipitaram com as proteínas DED1-2, DHH1 e DBP2B, foram obtidas por meio de pesquisa na plataforma *TritypDB* onde estão anotadas em termos de Gene Ontology (GO) (Figura 24). A análise foi realizada em relação ao controle negativo, considerando a razão ≥ 4 . Como esperado, a maior proporção de proteínas que copurificaram com DED1-2, DHH1 e DBP2B apresentaram como uma das localizações, a citoplasmática (25,81% para DED1-2, 27,27% para DHH1 e 32,35% para DBP2B), seguido de proteínas que também apresentam participação nuclear (22,58% para DED1-2, 15,15% para DHH1 e 21,57% para DBP2B). Além disso, a categoria de proteínas que também possuem associação com flagelo e estruturas ciliares, se mostraram bem representadas (12,90% para DED1-2; 12,12% para DHH1 e 21,57% para DBP2B). Já as categorias mais específicas apresentam proporções iguais ou semelhantes, como por exemplo para a DED1-2, que se destaca com a presença de proteínas associadas a mitocôndrias, vesículas de transporte e glicossomos, todas com proporção de 6,45%. Já DHH1 apresenta maior proporção de proteínas relacionadas ao complexo NOT de deadenilação e mitocondriais (9,09% cada), além de proteínas endomembranas, de transporte, corpos-P e grânulos de estresse e citoplasmáticos (6,06% cada). A DBP2B, por sua vez, se diferencia com um perfil mais diverso de proteínas, como a identificação de proteínas relacionadas a mitocôndrias (4,90%), glicossomo (1,96%) e proteínas de regulação do ciclo celular, SUMOilação, estruturas específicas de tripanosomatídeos (*Antipodal site* e *Bilobe structure*), *splicing* e fosfatases, embora em menores proporções (0,98%). De maneira geral, as proteínas que copurificaram em parâmetros aceitáveis de análise, como em razão ≥ 4 , apresentaram localizações diversificadas, com maior concentração em compartimentos citoplasmáticos, nucleares e flagelares, mas também com associações relevantes a processos celulares específicos, como transporte, metabolismo mitocondrial e associação com estruturas específicas de tripanosomatídeos.

Figura 24: Localização subcelular de proteínas que coprecipitam com a DED1-2, DHH1 e DBP2B marcadas com HA



Legenda: A localização foi definida com base em pesquisa no *TritypDB* dos componentes celulares (anotados em termos de Gene Ontology - GO) das proteínas que coprecipitaram com a DED1-2 e DHH1 e DBP2B, apresentando razão ≥ 4 em relação ao controle negativo.

Fonte: O autor (2025)

5 DISCUSSÃO

O objetivo deste estudo foi contribuir na caracterização dos papéis funcionais das RNA helicases DED1-2, HEL67, DHH1 e DBP2B de *T. brucei*. Para tal estas proteínas foram expressas em sua forma nativa, fusionadas a epítomos de HA, utilizando um sistema induzível por tetraciclina (p2477) em células procíclicas do parasita. No entanto, a expressão de HEL67 foi inviabilizada devido a dificuldades na transfecção, com provável causa multifatorial (meio de cultura, eletroporação, manipulação experimental, etc) inviabilizando sua análise funcional. Os resultados da indução das demais proteínas recombinantes analisadas indicou uma expressão robusta, sem causar inviabilidade celular. Os dados da curva de crescimento confirmaram crescimento normal das células até 48h. As culturas não induzidas expressaram fracamente as RNA helicases, um resultado inesperado, uma vez que era esperada a ausência da proteína nas culturas não induzidas. No entanto, ao consultar a literatura, foi visto que este fato pode ocorrer devido a “vazamento” (*leaking*) do promotor, apresentando baixa atividade basal na repressão e resultando em níveis residuais de expressão da proteína, um fenômeno que pode ser comum em sistemas de expressão induzíveis por tetraciclina (Forster *et al.*, 1999; A-Mohammadi; Hawkins 1998).

Após a expressão, análises de lisados celulares mostraram que a *TbDHH1*, *TbDED1-2* e *TbDBP2B* estavam presentes na fração do sedimento pós-lise, mesmo na ausência de marcadores citoplasmáticos (EIF4AI e BiP), sugerindo que essas proteínas podem estar associadas a estruturas de tradução de maior tamanho, como polissomos e grânulos de estresse, ou organelas, como núcleo, retículo endoplasmático e mitocôndrias, não rompidos após a cavitação. Como dito anteriormente, homólogos da DHH1 frequentemente localizam-se em grânulos de estresse (Thanin Chantarachot *et al.*, 2019). Por outro lado, as proteínas DED1-2 e DBP2B podem participar de funções núcleo/citoplasma, conforme observado para Ded1p, que interage com a partícula de reconhecimento de sinal (SRPs) no núcleo celular de leveduras e em poros nucleares Xpol e Mex67, participando, assim como a DDX3X, em transporte nucleocitoplasmático de mRNPs, enquanto que os possíveis homólogos da DBP2B (Dbp2 e DDX5X), podem atuar na exportação nuclear de mRNAs (Vellky *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2024, Yeter-Alat *et al.*, 2024; Wai Kit Ma e Tran, 2014). Em *T. brucei*, a DBP2B de fato apresenta localização nuclear, mas não

está claro a sua função nesse compartimento, por isso, assim como a DHH1 e DED1-2, suas funções podem ser mais bem caracterizadas com dados de IP associados à espectrometria de massas.

Como esperado, em dados de espectrometria de massas, a DED1-2 também coprecipitou com proteínas nucleares, incluindo a RPA135 (fator de transcrição), NOG1 e a RNA helicase HEL66. Específica de tripanosomatídeos, a HEL66 se localiza no nucléolo e é essencial para o processamento de RNAs ribossômicos, uma vez que, experimentos de silenciamento por RNAi mostraram que sua depleção comprometeu a maturação dos rRNAs, prejudicando a tradução geral em *T. brucei* (Bakari-Soale *et al.*, 2021). Por outro lado, a HEL67, paróloga da DED1-2, apresentou baixa copurificação, com uma razão inferior a 1, em relação ao controle negativo, sendo então estatisticamente excluída das análises. Essa falta de associação da HEL67 com as demais helicases pode estar correlacionada com dados de silenciamento em *T. brucei*, indicando que a sua perda não afeta a viabilidade celular, ao contrário da DED1-2 (Zinoviev *et al.*, 2012a).

A IP da DED1-2 chamou atenção no que diz respeito a abundância de polipeptídeos associados ao metabolismo energético. Proteínas como Carnitina O-acetiltransferase (CAT) e Acetil-CoA carboxilase (ACC), associadas ao metabolismo de ácidos graxos, exibiram elevado nível de enriquecimento (razão ≥ 60) em comparação com sua coprecipitação com a DBP2B, revelando assim uma possível preferência funcional citoplasmática distinta da DED1-2 para com a DBP2B. Além disso, uma glicoproteína de superfície (*trans-sialidase*) que se utiliza de ácidos graxos para o correto ancoramento na superfície celular do parasita, apresentou enriquecimento diferencial com a DED1-2, reforçando assim uma possível preferência dessa helicase na tradução de proteínas do metabolismo de lipídeos (Oliveira *et al.*, 2022; Vigueira; Paul, 2011).

A DHH1 coprecipitou com diversas subunidades do complexo de deadenilação NOT (NOT10, CAF40, NOT11 e NOT2), sendo todos, com exceção do NOT2, diferencialmente enriquecidos com a DHH1, em relação ao controle e em relação a coprecipitação com a DBP2B e DED1-2. Esse complexo NOT está presente em todos os eucariotos, regulando a expressão gênica na síntese de mRNA no núcleo até sua degradação no citoplasma, em polissomos ou grânulos de RNA, onde é caracterizado por interagir com fatores que reprimem a tradução e/ou apresentam enzimas deadeniladoras para o decapeamento de mRNAs (Collart, 2016). Com isso, os dados

sobre a DHH1 gerados neste estudo, corroboram com os papéis já inferidos para os homólogos da DHH1, conferindo assim sua participação na regulação da meia vida de mRNAs (Thanin Chantarachot *et al.*, 2019). Além disso, inusitadamente, a DED1-2 coprecipitou com a DHH1 de forma mais abundante que as subunidades do complexo NOT, sugerindo que ambas, de alguma forma, podem estar relacionadas a um mesmo complexo tipo eIF4F.

A DBP2B apresentou um painel de polipeptídicos coprecipitados maior que o da DED1-2 e DHH1, o que pode caracterizar uma função multifacetada entre ação nuclear e citoplasmática. Entre as proteínas nucleares, a interação com MTR4, HNRNPH/F e U2AF2 (RBSR4) sugere uma participação da DBP2B no processamento de rRNAs e no *splicing*, respectivamente (Cristodero; Clayton 2007; Kramer 2021; Clayton 2019; Gómez-Liñán *et al.*, 2022). Além da coprecipitação diferencial com a MTR4, uma RNA helicase *DEAD-box*, a coprecipitação com RBG2 (proteína citoplasmática) reforça uma possível associação indireta com a tradução, sendo a primeira responsável pela maturação do rRNAs e a segunda pela montagem do ribossomo (Kramer 2021; Jones *et al.*, 2006). Além disso, no citoplasma, a associação diferencial com PARN-1, uma deadenilase de mRNAs, sugere um papel relevante no *turnover* de mRNAs (Utter *et al.*, 2011); enquanto a interação diferencial com ALBA4, proteína citoplasmática associada a grânulos de estresse, sugere a ideia de que a DBP2B também pode atuar nesses grânulos, desempenhando funções complementares (Mani *et al.*, 2011).

Além das proteínas com caracterização definida, a coprecipitação de proteínas hipotéticas ou com funções não caracterizadas destacam a necessidade de estudos funcionais adicionais para determinar o papel dessas proteínas, principalmente aquelas com razões de alto enriquecimento diferencial, como a Tb927.9.14100 e Tb927.11.14390. Por fim, de modo geral, a DBP2B parece desempenhar um papel mais amplo e diverso, interagindo com proteínas nucleares (de *splicing*, RNA helicases e de montagem de ribossomo) e proteínas citoplasmáticas associadas a turnover de mRNAs, caracterizando dessa forma uma possível ação *moonlighting* da DBP2B. Proteínas *moonlighting* são responsáveis por exercer duas ou mais funções na célula ou organismo, em vias bioquímicas diferentes (Jeffery, 2014). Em *T. brucei* hexocinases como TbHK1 e TbHK2 apresentam função *moonlighting*, com a TbHK2 desempenhando papéis distintos no flagelo e glicossomos (Michels *et al.*, 2006; Rodríguez-Saavedra *et al.*, 2021). Dessa forma, assim como a DBP2B, ambas as

hexocinases são caracterizadas pela capacidade de estar em diferentes compartimentos da célula, exercendo funções variadas.

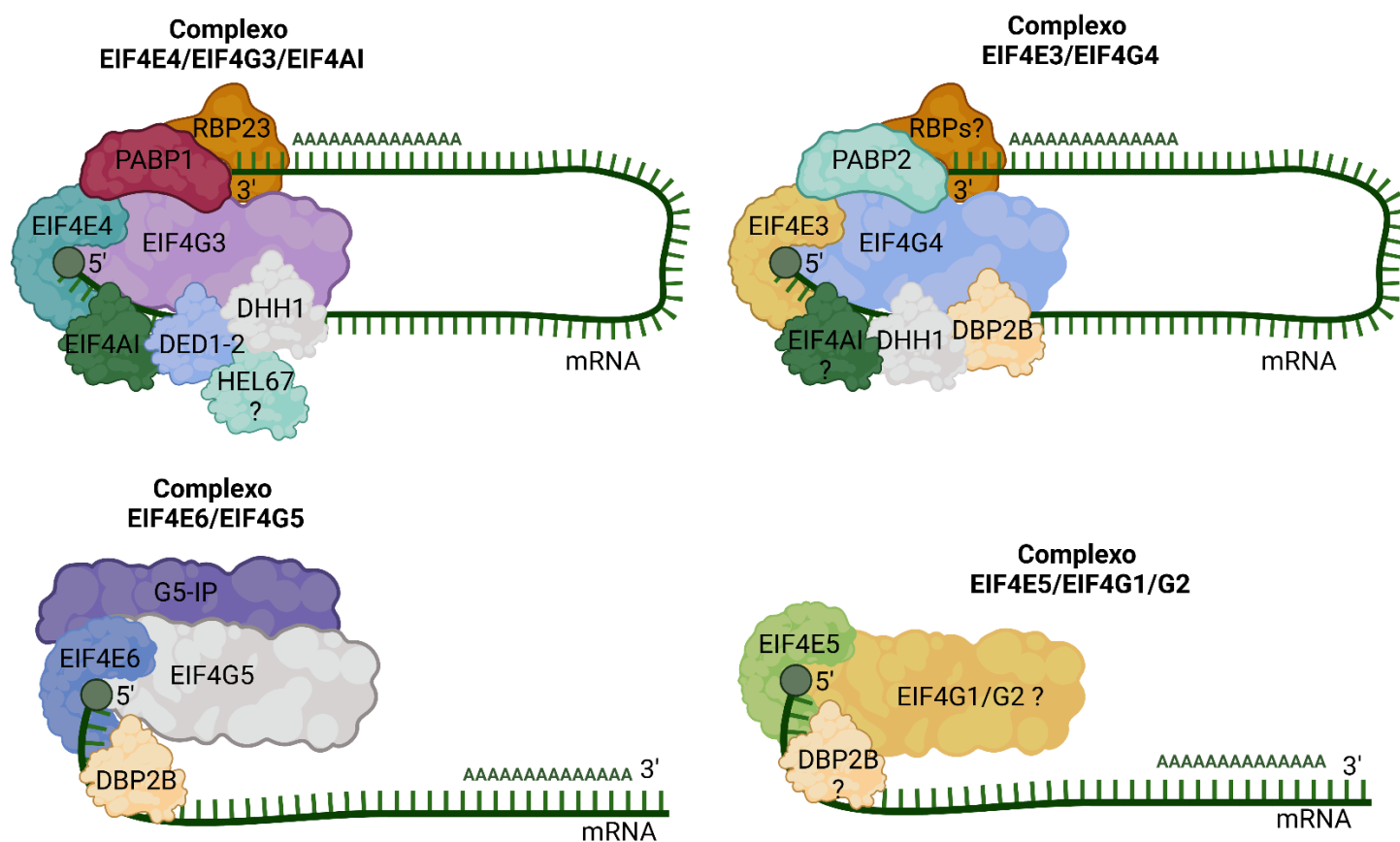
Ao comparar os fatores de tradução coprecipitados com as helicases, foram observadas diferenças significativas entre as amostras, sendo interessante notar, que apenas as principais subunidades do complexo eIF4F (EIF4E4, EIF4E5, EIF4E6, EIF4G3 e EIF4G4) apresentaram coprecipitação com enriquecimento diferencial ($\geq 1,5$) entre as proteínas-alvo, sugerindo especificidades funcionais nesses complexos. Por outro lado, outros fatores, como as subunidades do eIF3, eIF5A e eIF6, apresentaram abundância semelhante entre as três helicases-alvo. Esses dados evidenciam, portanto, uma interação preferencial dessas helicases com os diferentes complexos formados pelas subunidades homólogas do eIF4E e eIF4G. A DBP2B, por exemplo, coprecipitou com o fator EIF4G4, corroborando dados prévios dessa associação (Bezerra *et al.*, 2022). Esse fator também coprecipitou com a DHH1, diferentemente do que foi encontrado em resultados preliminares de Silva (2024), nos quais a DHH1 se mostrou associada ao complexo EIF4E6/EIF4G5. Contudo, vale ressaltar que a associação relatada por Silva (2024) foi observada em formas sanguíneas de *T. brucei*, enquanto os dados aqui apresentados foram obtidos em formas procíclicas, o que pode explicar as diferenças encontradas.

Diferentemente das outras helicases-alvo, a DBP2B apresentou uma associação preferencial com as subunidades EIF4E5 e EIF4E6, revelando aspectos da tradução específicos dos complexos aos quais esses fatores se associam. Por outro lado, a DHH1 e DED1-2 coprecipitaram de forma preferencial com as subunidades EIF4E4 e EIF4G3, complexo ao qual está associado à tradução geral (Moura *et al.*, 2015). No entanto, apenas a DED1-2 apresentou associação preferencial com a RNA helicase EIF4AI, parceira do complexo EIF4E4/EIF4G3, revelando que ambas as helicases podem atuar em cooperação no complexo citado acima. Por outro lado, na amostra da DHH1 e principalmente da DBP2B, a EIF4AI pode desempenhar um papel menos central ou secundário, sugerindo que sua contribuição funcional seja mais limitada ou complementar, assim como a HEL67, levando à hipótese de uma possível competição pelo mesmo sítio de ligação nos complexos eIF4F.

Por fim, apesar da DED1-2 se mostrar associada ao complexo EIF4E4/EIF4G3, dados obtidos em *Leishmania infantum* e *L. amazonensis*, evidenciam um perfil distinto, com interação preferencial com as subunidades EIF4E3 e EIF4G4 (Brito,

2023). No entanto, essa divergência pode ser justificada por diferenças específicas em contexto biológico entre *T. brucei* e *Leishmania spp.*, uma vez que essas espécies podem adotar estratégias distintas de regulação da tradução para se adaptarem aos seus ambientes. Com isso, os dados obtidos contribuem para o avanço no entendimento dos complexos tipo eIF4F, destacando como eles também podem ser regulados por proteínas acessórias (Figura 25), apresentando papéis núcleo-citoplasma que podem ser cruciais para início do processo traducional.

Figura 25: Modelos propostos de interação entre as RNA helicases-alvo DHH1, DED1-2 e DPB2B complexos do tipo eIF4F de *Trypanosoma brucei*



Legenda: Os modelos foram gerados com base na literatura sobre as interações entre as subunidades homólogas do complexo eIF4F de *T. brucei*, assim como nos resultados sobre a interação preferencial das RNA helicases-alvo desse estudo por complexos tipo eIF4F. Created in <https://BioRender.com>
Fonte: O autor (2025)

6 CONCLUSÕES

- A DED1-2 e DHH1 parecem se associar ao complexo EIF4E4/EIF4G3/EIF4A1, sendo a DED1-2 também capaz de interagir com proteínas relacionadas ao metabolismo energético de lipídeos e com proteínas de função nuclear.
- A DHH1 e DBP2B parecem interagir com o EIF4G4, sendo que a DHH1 também demonstra a capacidade de interagir de forma diferencial com o complexo de deadenilação NOT, sugerindo seu envolvimento no controle da meia-vida dos mRNAs.
- Além da potencial interação com EIF4G4, a proteína DBP2B mostrou associação preferencial com o EIF4E5 e EIF4E6, além de exibir um perfil diversificado de coprecipitados, incluindo proteínas envolvidas em *splicing*, montagem de ribossomos e em processos relacionados ao *turnover* de mRNAs, sugerindo uma possível característica *moonlighting*.

7 REFERÊNCIAS

A-MOHAMMADI, S.; HAWKINS, R. Efficient transgene regulation from a single tetracycline-controlled positive feedback regulatory system. **Gene Therapy**, v. 5, n. 1, p. 76–84, 1 jan. 1998.

ABDELKRIM, Y. Z. et al. The steroid derivative 6-aminocholestanol inhibits the DEAD-box helicase eIF4A (LielF4A) from the *Trypanosomatid* parasite *Leishmania* by perturbing the RNA and ATP binding sites. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 226, p. 9–19, 1 dez. 2018.

AITKEN, C. E.; LORSCH, J. R. A mechanistic overview of translation initiation in eukaryotes. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 19, n. 6, p. 568–576, jun. 2012.

AKHOUNDI, M. et al. A Historical overview of the classification, evolution, and dispersion of *Leishmania* parasites and sandflies. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. e0004349, 3 mar. 2016.

ÁLVAREZ-RODRÍGUEZ, A. et al. Recent progress in diagnosis and treatment of Human African Trypanosomiasis has made the elimination of this disease a realistic target by 2030. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. 9, 3 nov. 2022.

ANDREOU, A. Z.; KLOSTERMEIER, D. The DEAD-box helicase eIF4A. **RNA Biology**, v. 10, n. 1, p. 19–32, jan. 2013.

ASSIS, L. A. et al. Identification of novel proteins and mRNAs differentially bound to the *Leishmania* Poly(A) Binding Proteins reveals a direct association between PABP1, the RNA-binding protein RBP23 and mRNAs encoding ribosomal proteins. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 10, p. e0009899, 27 out. 2021.

BAKARI-SOALE, M. et al. The nucleolar DExD/H protein Hel66 is involved in ribosome biogenesis in *Trypanosoma brucei*. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, 15 set. 2021.

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, jun. 2009.

BANGS, J. D. et al. Molecular cloning and cellular localization of a BiP homologue in *Trypanosoma brucei*. Divergent ER retention signals in a lower eukaryote. **Journal of Cell Science**, v. 105 (Pt 4), n. 105, p. 1101–1113, 1 ago. 1993.

BERRIMAN, M. The Genome of the African Trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416–422, 15 jul. 2005.

BERTHELOT, K. et al. Dynamics and processivity of 40S ribosome scanning on mRNA in yeast. **Molecular Microbiology**, v. 51, n. 4, p. 987–1001, 22 dez. 2003.

BEZERRA, M. J. R. et al. Distinct mRNA and protein interactomes highlight functional differentiation of major eIF4F-like complexes from *Trypanosoma brucei*. **Frontiers in**

Molecular Biosciences, v. 9, n. 9, 7 out. 2022.

BILLINGTON, K. et al. Genome-wide subcellular protein map for the flagellate parasite *Trypanosoma brucei*. **Nature Microbiology**, v. 8, n. 3, p. 533–547, 20 fev. 2023.

BLANCHET, S.; RANJAN, N. Translation Phases in Eukaryotes. **Methods in molecular biology**, v. 2533, p. 217–228, 1 jan. 2022.

BOHNSACK, K. E. et al. Cellular functions of eukaryotic RNA helicases and their links to human diseases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 24, n. 10, p. 749–769, 1 out. 2023.

BOLINGER, C. et al. RNA helicase A modulates translation of HIV-1 and infectivity of progeny virions. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 5, p. 1686–1696, 6 fev. 2010.

BRINGAUD, F. et al. Characterization and disruption of a new *Trypanosoma brucei* repetitive flagellum protein, using double-stranded RNA inhibition. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 111, n. 2, p. 283–297, dez. 2000.

BRITO QUERIDO, J. et al. The structure of a human translation initiation complex reveals two independent roles for the helicase eIF4A. **Nature Structural & Molecular Biology**, v. 31, n. 3, p. 455–464, 1 mar. 2024.

BRITO, A. N. A. L. M. DE. **Caracterização de novos mecanismos de ação e de regulação ligados a homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E em *Leishmania* sp.** Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/54040>>. Acesso em: 6 jul. 2024.

BRUN, R. et al. Human African trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 375, n. 9709, p. 148–159, jan. 2010.

BUSCHAUER, R. et al. The Ccr4-Not complex monitors the translating ribosome for codon optimality. **Science**, v. 368, n. 6488, 17 abr. 2020.

BÜSCHER, P. et al. Human African trypanosomiasis. **The Lancet**, v. 390, n. 10110, p. 2397–2409, nov. 2017.

CARGILL, M.; VENKATARAMAN, R.; LEE, S. DEAD-Box RNA Helicases and Genome Stability. **Genes**, v. 12, n. 10, p. 1471, 23 set. 2021.

CASACUBERTA-SERRA, S.; GONZALEZ-LARREATEGUI, I.; SOUCEK, L. eIF4A dependency: the hidden key to unlock KRAS mutant non-small cell lung cancer's vulnerability. **Translational Lung Cancer Research**, v. 12, n. 12, p. 2570–2575, 26 dez. 2023.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CHRISTOU-KENT, M. et al. Diversity of RNA-Binding Proteins Modulating Post-

Transcriptional Regulation of Protein Expression in the Maturing Mammalian Oocyte. **Cells**, v. 9, n. 3, p. 662, 9 mar. 2020.

CLAYTON, C. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, ago. 2016.

CLAYTON, C. Regulation of gene expression in *Trypanosomatids*: living with polycistronic transcription. **Open Biology**, v. 9, n. 6, p. 190072, jun. 2019.

COLLART, M. A. The Ccr4-Not complex is a key regulator of eukaryotic gene expression. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 7, n. 4, p. 438–454, 29 jan. 2016.

CORDIN, O.; BEGGS, J. D. RNA helicases in splicing. **RNA Biology**, v. 10, n. 1, p. 83–95, jan. 2013.

CORDIN, O.; HAHN, D. E. E.; BEGGS, J. D. Structure, function and regulation of spliceosomal RNA helicases. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 24, n. 3, p. 431–438, 1 jun. 2012.

CRISTODERO, M.; CLAYTON, C. E. Trypanosome MTR4 is involved in rRNA processing. **Nucleic Acids Research**, v. 35, n. 20, p. 7023–7030, 16 out. 2007.

CRUZ et al. The p20 and Ded1 proteins have antagonistic roles in eIF4E-dependent translation in *Saccharomyces cerevisiae*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 10, p. 5201–5206, 13 maio 1997.

DA COSTA LIMA, T. D. et al. Functional Characterization of Three *Leishmania* Poly(A) Binding Protein Homologues with Distinct Binding Properties to RNA and Protein Partners. **Eukaryotic Cell**, v. 9, n. 10, p. 1484–1494, out. 2010.

DAS, S. Taking a re-look at cap-binding signatures of the mRNA cap-binding protein eIF4E orthologues in *Trypanosomatids*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 476, n. 1037–1049, 10 nov. 2020.

DE BORTOLI, F.; ESPINOSA, S.; ZHAO, R. DEAH-Box RNA Helicases in Pre-mRNA Splicing. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 46, n. 3, p. 225–238, mar. 2021.

DE CASTRO NETO, A. L.; DA SILVEIRA, J. F.; MORTARA, R. A. Role of Virulence Factors of *Trypanosomatids* in the Insect Vector and Putative Genetic Events Involved in Surface Protein Diversity. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, p. 807172, 2022.

DE GAUDENZI, J. G. et al. Gene expression regulation in *Trypanosomatids*. **Essays in Biochemistry**, v. 51, p. 31–46, 24 out. 2011.

DE MELO NETO, O. P. et al. The unique *Leishmania* EIF4E4 N-terminus is a target for multiple phosphorylation events and participates in critical interactions required for translation initiation. **RNA Biology**, v. 12, n. 11, p. 1209–1221, 4 set. 2015.

DE MELO NETO, O. P. et al. Phosphorylation and interactions associated with the control of the *Leishmania* Poly-A Binding Protein 1 (PABP1) function during translation initiation. **RNA Biology**, v. 15, n. 6, p. 1–17, 23 mar. 2018.

DE SOUSA, A. S. et al. Chagas disease. **The Lancet**, v. 403, n. 10422, p. 203–218, 13 jan. 2024.

DEAN, S.; SUNTER, J. D.; WHEELER, R. J. TrypTag.org: A Trypanosome Genome-wide Protein Localisation Resource. **Trends in Parasitology**, v. 33, n. 2, p. 80–82, fev. 2017.

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

DHALIA, R. et al. The two eIF4A helicases in *Trypanosoma brucei* are functionally distinct. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 9, p. 2495–2507, 1 maio 2006.

DJIKENG, A. et al. RNA interference in *Trypanosoma brucei*: cloning of small interfering RNAs provides evidence for retroposon-derived 24-26-nucleotide RNAs. **RNA**, v. 7, n. 11, p. 1522–1530, 1 nov. 2001.

DOWLING, J.; DOIG, C. L. Roles of ADP-Ribosylation during Infection Establishment by *Trypanosomatidae* Parasites. **Pathogens**, v. 12, n. 5, p. 708–708, 12 maio 2023.

DUNCAN, R.; MILBURN, S. C.; HERSHEY, J. W. Regulated phosphorylation and low abundance of HeLa cell initiation factor eIF-4F suggest a role in translational control. Heat shock effects on eIF-4F. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 1, p. 380–388, 5 jan. 1987.

ENGSTLER, M. Cold shock and regulation of surface protein trafficking convey sensitization to inducers of stage differentiation in *Trypanosoma brucei*. **Genes & Development**, v. 18, n. 22, p. 2798–2811, 15 nov. 2004.

ESTEVEZ, A. M. The exosome of *Trypanosoma brucei*. **The EMBO Journal**, v. 20, n. 14, p. 3831–3839, 16 jul. 2001.

FAIRMAN-WILLIAMS, M. E.; GUENTHER, U.-P.; JANKOWSKY, E. SF1 and SF2 helicases: family matters. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 20, n. 3, p. 313–324, jun. 2010.

FENN, K.; MATTHEWS, K. R. The cell biology of *Trypanosoma brucei* differentiation. **Current Opinion in Microbiology**, v. 10, n. 6, p. 539–546, dez. 2007.

FÈVRE, E. et al. A burgeoning epidemic of sleeping sickness in Uganda. **The Lancet**, v. 366, n. 9487, p. 745–747, 27 ago. 2005.

FISCHER, N. The DEAD box protein Dhh1 stimulates the decapping enzyme Dcp1. **The EMBO Journal**, v. 21, n. 11, p. 2788–2797, 3 jun. 2002.

FLOOR, S. N. et al. Autoinhibitory Interdomain Interactions and Subfamily-specific Extensions Redefine the Catalytic Core of the Human DEAD-box Protein DDX3. **The**

Journal of Biological Chemistry, v. 291, n. 5, p. 2412–2421, 29 jan. 2016.

FORSTER, K. et al. Tetracycline-inducible expression systems with reduced basal activity in mammalian cells. **Nucleic acids research**, v. 27, n. 2, p. 708–710, 1 jan. 1999.

FREIRE, E. et al. The Role of Cytoplasmic mRNA Cap-Binding Protein Complexes in *Trypanosoma brucei* and Other *Trypanosomatids*. **Pathogens**, v. 6, n. 4, p. 55, 27 out. 2017.

FREIRE, E. R. et al. The four *Trypanosomatid* eIF4E homologues fall into two separate groups, with distinct features in primary sequence and biological properties. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 176, n. 1, p. 25–36, mar. 2011.

FREIRE, E. R. et al. *Trypanosoma brucei* Translation Initiation Factor Homolog EIF4E6 Forms a Tripartite Cytosolic Complex with EIF4G5 and a Capping Enzyme Homolog. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 7, p. 896–908, jul. 2014a.

FREIRE, E. R. et al. eIF4F-like complexes formed by cap-binding homolog TbEIF4E5 with TbEIF4G1 or TbEIF4G2 are implicated in post-transcriptional regulation in *Trypanosoma brucei*. **RNA (New York, N.Y.)**, v. 20, n. 8, p. 1272–1286, 1 ago. 2014b.

GARCIA, E. S. et al. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*–*Rhodnius prolixus* interactions. **Journal of Insect Physiology**, v. 53, n. 1, p. 11–21, 1 jan. 2007.

GÓMEZ-LIÑÁN, C. et al. The RNA-binding protein RBP33 dampens non-productive transcription in trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n. 21, p. 12251–12265, 28 nov. 2022.

GRADI, A. et al. A Novel Functional Human Eukaryotic Translation Initiation Factor 4G. **Molecular and Cellular Biology**, v. 18, n. 1, p. 334–342, 1 jan. 1998.

GULAY, S. et al. Distinct interactions of eIF4A and eIF4E with RNA helicase Ded1 stimulate translation in vivo. **eLife**, v. 9, n. 9, 29 maio 2020.

GULL, K. Host–parasite interactions and trypanosome morphogenesis: a flagellar pocketful of goodies. **Current Opinion in Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 365–370, ago. 2003.

GÜNZLA. et al. RNA Polymerase I Transcribes Procyclin Genes and Variant Surface Glycoprotein Gene Expression Sites in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 3, p. 542–551, jun. 2003.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous *Leishmaniasis*: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, 1 dez. 2015.

HARDWICK, S. W.; LUISI, B. F. Rarely at rest. **RNA Biology**, v. 10, n. 1, p. 56–70, jan. 2013.

HEADRICK, D. R. Sleeping Sickness Epidemics and Colonial Responses in East and Central Africa, 1900–1940. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 4, p. e2772, 24 abr. 2014.

HILLIKER, A. et al. The DEAD-Box Protein Ded1 Modulates Translation by the Formation and Resolution of an eIF4F-mRNA Complex. **Molecular Cell**, v. 43, n. 6, p. 962–972, set. 2011.

HIREMATH, L. S.; WEBB, N. R.; RHOADS, R. E. Immunological detection of the messenger RNA cap-binding protein. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 13, p. 7843–7849, 5 jul. 1985.

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, 18 maio 2007.

HOLETZ, F. B. et al. Protein and mRNA content of TcDHH1-containing mRNPs in *Trypanosoma cruzi*. **FEBS Journal**, v. 277, n. 16, p. 3415–3426, 12 jul. 2010.

HÖÖG, J. L. et al. Cryo-electron tomography and 3-D analysis of the intact flagellum in *Trypanosoma brucei*. **Journal of structural biology**, v. 178, n. 2, p. 189–198, 1 maio 2012.

IOST, I.; DREYFUS, M.; LINDER, P. Ded1p, a DEAD-box Protein Required for Translation Initiation in *Saccharomyces cerevisiae*, Is an RNA Helicase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 274, n. 25, p. 17677–17683, jun. 1999.

IVENS, A. C. The Genome of the Kinetoplastid Parasite, *Leishmania major*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 436–442, 15 jul. 2005.

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

JAMONNEAU, V. et al. Untreated Human Infections by *Trypanosoma brucei* gambiense Are Not 100% Fatal. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 6, p. e1691, 12 jun. 2012.

JANKOWSKY, E.; FAIRMAN, M. E. RNA helicases — one fold for many functions. **Current Opinion in Structural Biology**, v. 17, n. 3, p. 316–324, jun. 2007.

JARMOSKAITE, I.; RUSSELL, R. DEAD-box proteins as RNA helicases and chaperones. **Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA**, v. 2, n. 1, p. 135–152, 20 set. 2010.

JARMOSKAITE, I.; RUSSELL, R. RNA Helicase Proteins as Chaperones and Remodelers. **Annual Review of Biochemistry**, v. 83, n. 1, p. 697–725, 2 jun. 2014.

JOHNSTONE, O. Interaction with eIF5B is essential for Vasa function during development. **Development**, v. 131, n. 17, p. 4167–4178, 1 set. 2004.

JONES, A. et al. Visualisation and analysis of proteomic data from the procyclic form

of *Trypanosoma brucei*. **PROTEOMICS**, v. 6, n. 1, p. 259–267, jan. 2006.

KAUFER, A. et al. The evolution of *Trypanosomatid* taxonomy. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 8 jun. 2017.

KELLY, S. et al. Functional genomics in *Trypanosoma brucei*: A collection of vectors for the expression of tagged proteins from endogenous and ectopic gene loci. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 154, n. 1, p. 103–109, jul. 2007.

KENNEDY, P. G. E. **Clinical Features, Diagnosis, and Treatment of Human African Trypanosomiasis (Sleeping Sickness)**. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23260189/>>.

KENNEDY, P. G. E. Update on human African trypanosomiasis (sleeping sickness). **Journal of Neurology**, v. 266, n. 9, p. 2334–2337, 17 jun. 2019.

KEVRIC, I.; CAPPEL, M. A.; KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections. **Dermatologic Clinics**, v. 33, n. 3, p. 579–593, jul. 2015.

KOSTYGOV, A. Y. et al. Euglenozoa: taxonomy, diversity and ecology, symbioses and viruses. **Open Biology**, v. 11, n. 3, mar. 2021.

KRAMER, S. et al. Heat shock causes a decrease in polysomes and the appearance of stress granules in trypanosomes independently of eIF2(alpha) phosphorylation at Thr169. **Journal of Cell Science**, v. 121, n. Pt 18, p. 3002–3014, 15 set. 2008.

KRAMER, S. et al. The RNA helicase DHH1 is central to the correct expression of many developmentally regulated mRNAs in trypanosomes. **Journal of Cell Science**, v. 123, n. Pt 5, p. 699–711, 1 mar. 2010.

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, fev. 2012.

KRAMER, S. Nuclear mRNA maturation and mRNA export control: from trypanosomes to opisthokonts. **Parasitology**, v. 148, n. 10, p. 1196–1218, 19 jan. 2021.

LAI, M.-C.; LEE, Y.-H. W.; TARN, W.-Y. The DEAD-box RNA helicase DDX3 associates with export messenger ribonucleoproteins as well as tip-associated protein and participates in translational control. **Molecular Biology of the Cell**, v. 19, n. 9, p. 3847–3858, 1 set. 2008.

LANGOUSIS, G.; HILL, K. L. Motility and more: the flagellum of *Trypanosoma brucei*. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 505–518, 16 jun. 2014.

LEBOWITZ, J. H. et al. Coupling of poly(A) site selection and trans-splicing in *Leishmania*. **Genes & Development**, v. 7, n. 6, p. 996–1007, 1 jun. 1993.

LEE, C. et al. Human DDX3 functions in translation and interacts with the translation initiation factor eIF3. **Nucleic Acids Research**, v. 36, n. 14, p. 4708–4718, 27 jun. 2008.

LIANG, X. et al. trans and cis Splicing in *Trypanosomatids*: Mechanism, Factors, and Regulation. **Eukaryotic Cell**, v. 2, n. 5, p. 830–840, 1 out. 2003.

LIANG, X. et al. Analysis of spliceosomal complexes in *Trypanosoma brucei* and silencing of two splicing factors Prp31 and Prp43. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 145, n. 1, p. 29–39, jan. 2006.

LINDER, P.; JANKOWSKY, E. From unwinding to clamping — the DEAD box RNA helicase family. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 12, n. 8, p. 505–516, 22 jul. 2011.

LIU, N.; HAN, H.; LASKO, P. Vasa promotes *Drosophila* germline stem cell differentiation by activating *mei-P26* translation by directly interacting with a (U)-rich motif in its 3' UTR. **Genes & Development**, v. 23, n. 23, p. 2742–2752, 1 dez. 2009.

LIU, Y.-C.; CHENG, S.-C. Functional roles of DExD/H-box RNA helicases in Pre-mRNA splicing. **Journal of Biomedical Science**, v. 22, n. 1, 16 jul. 2015.

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

MACHADO, H.; ANTÓNIO TEMUDO; MARIANA DE NIZ. The lymphatic system favours survival of a unique *T. brucei* population. **Biology open**, v. 12, n. 11, 9 nov. 2023.

MAIR, G. et al. A new twist in trypanosome RNA metabolism: cis-splicing of pre-mRNA. **RNA**, v. 6, n. 2, p. 163–169, fev. 2000.

MALHEIROS, M. et al. New insights into *Trypanosoma cruzi* genetic diversity, and its influence on parasite biology and clinical outcomes. **Frontiers in immunology**, v. 15, n. 15, 9 abr. 2024.

MANI, J. et al. Alba-Domain Proteins of *Trypanosoma brucei* Are Cytoplasmic RNA-Binding Proteins That Interact with the Translation Machinery. **PLOS ONE**, v. 6, n. 7, p. e22463–e22463, 21 jul. 2011.

MARINTCHEV, A. et al. Topology and regulation of the human eIF4A/4G/4H helicase complex in translation initiation. **Cell**, v. 136, n. 3, p. 447–460, 6 fev. 2009.

MARINTCHEV, A. Roles of helicases in translation initiation: A mechanistic view. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1829, n. 8, p. 799–809, ago. 2013.

MARSDEN, S. et al. Unwinding Single RNA Molecules Using Helicases Involved in Eukaryotic Translation Initiation. **Journal of Molecular Biology**, v. 361, n. 2, p. 327–335, ago. 2006.

MARTIN, R. et al. DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. **RNA Biology**, v. 10, n. 1, p. 4–18, jan. 2013.

MATHYS, H. et al. Structural and Biochemical Insights to the Role of the CCR4-NOT

Complex and DDX6 ATPase in MicroRNA Repression. **Molecular Cell**, v. 54, n. 5, p. 751–765, 1 jun. 2014.

MATTHEWS, K. R. The Developmental Cell Biology of *Trypanosoma brucei*. **Journal of Cell Science**, v. 118, n. 2, p. 283–290, 15 jan. 2005.

MATTHEWS, K. R.; TSCHUDI, C.; ULLU, E. A common pyrimidine-rich motif governs trans-splicing and polyadenylation of tubulin polycistronic pre-mRNA in trypanosomes. **Genes & Development**, v. 8, n. 4, p. 491–501, 15 fev. 1994.

MAYHO, M. et al. Post-transcriptional control of nuclear-encoded cytochrome oxidase subunits in *Trypanosoma brucei*: evidence for genome-wide conservation of life-cycle stage-specific regulatory elements. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n. 18, p. 5312–5324, 29 set. 2006.

MCCONVILLE, M. J. et al. Secretory Pathway of *Trypanosomatid* Parasites. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 66, n. 1, p. 122–154, 1 mar. 2002.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. *Leishmaniasis*: clinical syndromes and treatment. **QJM**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 5 jun. 2013.

MICHAELI, S. *Trans*-splicing in trypanosomes: machinery and its impact on the parasite transcriptome. **Future Microbiology**, v. 6, n. 4, p. 459–474, abr. 2011.

MICHELS, P. A. M. et al. Metabolic functions of glycosomes in *Trypanosomatids*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1463–1477, dez. 2006.

MINSHALL, N. et al. Role of p54 RNA Helicase Activity and Its C-terminal Domain in Translational Repression, P-body Localization and Assembly. **Molecular Biology of the Cell**, v. 20, n. 9, p. 2464–2472, 1 maio 2009.

MISSEL, A. et al. A putative RNA helicase of the DEAD-box family from *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, n. 1, p. 123–126, 1 dez. 1995.

MO, J. et al. DDX3X: structure, physiologic functions and cancer. **Molecular Cancer**, v. 20, p. 38, 24 fev. 2021.

MOKDADI, M. et al. The In Silico Identification of Potential Members of the Ded1/DDX3 Subfamily of DEAD-Box RNA Helicases from the Protozoan Parasite *Leishmania infantum* and Their Analyses in Yeast. **Genes**, v. 12, n. 2, p. 212, 1 fev. 2021.

MOTTRAM, J. et al. Isolation and Sequence of Four Small Nuclear U RNA Genes of *Trypanosoma brucei* subsp. *brucei*: Identification of the U2, U4, and U6 RNA Analogs. **Molecular and Cellular Biology**, v. 9, n. 3, p. 1212–1223, 1 mar. 1989.

MOURA, D. M. et al. Two related *Trypanosomatid* eIF4G homologues have functional differences compatible with distinct roles during translation initiation. **RNA Biology**, v. 12, n. 3, p. 305–319, 4 mar. 2015.

MOURA, D. M. N. **Análise da participação de dois homólogos do fator eIF4G na iniciação da síntese protéica de *Trypanosoma brucei***. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/6243>>. Acesso em: 7 jul. 2024.

NIEMIROWICZ, G. T. et al. Simplified inducible system for *Trypanosoma brucei*. **PloS one**, v. 13, n. 10, p. e0205527–e0205527, 11 out. 2018.

OLIVEIRA, C. et al. Modulation of Virulence Factors during *Trypanosoma cruzi* Differentiation. **Pathogens**, v. 12, n. 1, p. 32, 25 dez. 2022.

OSWALDO CRUZ, M. DO I. (ED.). Recommendations from a satellite meeting. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. suppl 1, p. 429–432, 1 set. 1999.

OVERATH, P.; STIERHOF, Y.-D.; WIESE, M. Endocytosis and secretion in *Trypanosomatid* parasites — Tumultuous traffic in a pocket. **Trends in Cell Biology**, v. 7, n. 1, p. 27–33, jan. 1997.

OWTTRIM, G. W. RNA helicases. **RNA Biology**, v. 10, n. 1, p. 96–110, jan. 2013.

PADMANABHAN, P. K. et al. Apoptosis-like programmed cell death induces antisense ribosomal RNA (rRNA) fragmentation and rRNA degradation in *Leishmania*. **Cell Death & Differentiation**, v. 19, n. 12, p. 1972–1982, 6 jul. 2012.

PADMANABHAN, P. K. et al. DDX3 DEAD-box RNA helicase plays a central role in mitochondrial protein quality control in *Leishmania*. **Cell Death & Disease**, v. 7, n. 10, p. e2406–e2406, 1 out. 2016.

PALENCHAR, J. B.; BELLOFATTO, V. Gene transcription in trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, n. 2, p. 135–141, abr. 2006.

PARKER, R.; SHETH, U. P Bodies and the Control of mRNA Translation and Degradation. **Molecular Cell**, v. 25, n. 5, p. 635–646, mar. 2007.

PARSYAN, A. et al. The helicase protein DHX29 promotes translation initiation, cell proliferation, and tumorigenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 52, p. 22217–22222, 29 dez. 2009.

PEK, J. W.; KAI, T. DEAD-box RNA helicase Belle/DDX3 and the RNA interference pathway promote mitotic chromosome segregation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 29, p. 12007–12012, 5 jul. 2011.

PENTEADO, R. F. et al. Structural analysis of the *Trypanosoma brucei* EIF4E6/EIF4G5 complex reveals details of the interaction between unusual eIF4F subunits. **Scientific reports (Nature Publishing Group)**, v. 14, n. 1, 25 jan. 2024.

PISAREVA, V. P. et al. Translation Initiation on Mammalian mRNAs with Structured 5'UTRs Requires DExH-Box Protein DHX29. **Cell**, v. 135, n. 7, p. 1237–1250, dez. 2008.

PISERÀ, A.; CAMPO, A.; CAMPO, S. Structure and functions of the translation initiation factor eIF4E and its role in cancer development and treatment. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 45, n. 1, p. 13–24, jan. 2018.

PONTING, C. P. Novel eIF4G domain homologues linking mRNA translation with nonsense-mediated mRNA decay. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 25, n. 9, p. 423–426, set. 2000.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, set. 2001.

PREUSSER, C. et al. Genome-wide RNA-binding analysis of the trypanosome U1 snRNP proteins U1C and U1-70K reveals cis/trans-spliceosomal network. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 10, p. 6603–6615, 19 abr. 2014.

PREUSSER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. mRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4-5, p. 221–224, out. 2012.

RANJI, A. et al. Features of Double-stranded RNA-binding Domains of RNA Helicase A Are Necessary for Selective Recognition and Translation of Complex mRNAs. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 7, p. 5328–5337, 18 fev. 2011.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–291, jun. 2012.

RHOADS, R. E. eIF4E: New Family Members, New Binding Partners, New Roles. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 25, p. 16711–16715, jun. 2009.

RICO, E. et al. Inducible high-efficiency CRISPR-Cas9-targeted gene editing and precision base editing in African trypanosomes. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 21 maio 2018.

RIGAUT, G. et al. A generic protein purification method for protein complex characterization and proteome exploration. **Nature Biotechnology**, v. 17, n. 10, p. 1030–1032, out. 1999.

ROCHA, G. M. et al. The flagellar attachment zone of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Journal of Structural Biology**, v. 154, n. 1, p. 89–99, 1 abr. 2006.

RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; DE SOUZA, W. Biology of human pathogenic *Trypanosomatids*: epidemiology, lifecycle and ultrastructure. **Sub-Cellular Biochemistry**, v. 74, p. 1–42, 2014.

RODRÍGUEZ-SAAVEDRA, C. et al. Moonlighting Proteins: The Case of the Hexokinases. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 8, 9 jun. 2021.

ROGERS, G. W.; KOMAR, A. A.; MERRICK, W. C. **eIF4A: The godfather of the DEAD box helicases**. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0079660302720734>>. Acesso em: 25 jan. 2024.

ROJAS-PIRELA, M. et al. Antimicrobial Peptides (AMPs): Potential Therapeutic Strategy against Trypanosomiasis? **Biomolecules**, v. 13, n. 4, p. 599–599, 26 mar.

2023.

ROMAGNOLI, A. et al. Control of the eIF4E activity: structural insights and pharmacological implications. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 78, n. 21-22, 19 set. 2021.

ROSE, C. et al. *Trypanosoma brucei* colonizes the tsetse gut via an immature peritrophic matrix in the proventriculus. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 7, p. 909–916, 20 abr. 2020.

SANTARÉM, N.; CARDOSO, L.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Advances in *Leishmania* Research: From Basic Parasite Biology to Disease Control. **Microorganisms**, v. 11, n. 3, p. 696, 8 mar. 2023.

SATISH CHANDRA PANDEY; PANDE, V.; SAMANT, M. DDX3 DEAD-box RNA helicase (Hel67) gene disruption impairs infectivity of *Leishmania donovani* and induces protective immunity against visceral *Leishmaniasis*. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, 26 out. 2020.

SCHIMANSKI, B.; NGUYEN, T. N.; GÜNZLA. Characterization of a Multisubunit Transcription Factor Complex Essential for Spliced-Leader RNA Gene Transcription in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 16, p. 7303–7313, 15 ago. 2005.

SCHUSTER, S. et al. Unexpected plasticity in the life cycle of *Trypanosoma brucei*. **eLife**, v. 10, p. e66028, 2021.

SCHUTZ, P. et al. Crystal structure of the yeast eIF4A-eIF4G complex: An RNA-helicase controlled by protein–protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 28, p. 9564–9569, 15 jul. 2008.

SEN, N. D. et al. Functional interplay between DEAD-box RNA helicases Ded1 and Dbp1 in preinitiation complex attachment and scanning on structured mRNAs in vivo. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 47, 12 jul. 2019.

SHIH, J-W. et al. Candidate tumor suppressor DDX3 RNA helicase specifically represses cap-dependent translation by acting as an eIF4E inhibitory protein. **Oncogene**, v. 27, n. 5, p. 700–714, 30 jul. 2007.

SHIH, J.-W. et al. Critical roles of RNA helicase DDX3 and its interactions with eIF4E/PABP1 in stress granule assembly and stress response. **Biochemical Journal**, v. 441, n. 1, p. 119–129, 14 dez. 2011.

SIEGEL, T. N. et al. Genome-wide analysis of mRNA abundance in two life-cycle stages of *Trypanosoma brucei* and identification of splicing and polyadenylation sites. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 15, p. 4946–4957, 12 abr. 2010.

SILVA, R. S. DA. **Mapeamento e análise de interações envolvidas na formação do complexo EIF4E6/ EIF4G5 de *Trypanosoma brucei***. Disponível em: <<https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/55860>>. Acesso em: 6 jul. 2024.

SILVESTER, E.; MCWILLIAM, K.; MATTHEWS, K. The Cytological Events and Molecular Control of Life Cycle Development of *Trypanosoma brucei* in the Mammalian Bloodstream. **Pathogens**, v. 6, n. 3, p. 29, 28 jun. 2017.

SIMPSON, A. G. B.; STEVENS, J. R.; LUKEŠ, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 4, p. 168–174, abr. 2006.

SKEIKY, Y. A. et al. LeIF: a recombinant *Leishmania* protein that induces an IL-12-mediated Th1 cytokine profile. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, v. 161, n. 11, p. 6171–6179, 1 dez. 1998.

SLOAN, K. E.; BOHNSACK, M. T. Unravelling the Mechanisms of RNA Helicase Regulation. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 237–250, 1 abr. 2018.

STEVERDING, D. The history of *Leishmaniasis*. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 15 fev. 2017.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 1 abr. 2008.

SUNTER, J. et al. A New Generation of T7 RNA Polymerase-Independent Inducible Expression Plasmids for *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e35167, 12 abr. 2012.

TANNER, N. KYLE.; LINDER, P. DExD/H Box RNA Helicases. **Molecular Cell**, v. 8, n. 2, p. 251–262, ago. 2001.

TARUN, S. Z.; SACHS, A. B. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. **The EMBO Journal**, v. 15, n. 24, p. 7168–7177, dez. 1996.

TAYLOR, M. C.; KELLY, J. M. pTcINDEX: a stable tetracycline-regulated expression vector for *Trypanosoma cruzi*. **BMC Biotechnology**, v. 6, n. 1, p. 32, 2006.

TEIXEIRA, D. Processing bodies require RNA for assembly and contain nontranslating mRNAs. **RNA**, v. 11, n. 4, p. 371–382, 1 abr. 2005.

THANIN CHANTARACHOT et al. DHH1/DDX6-like RNA helicases maintain ephemeral half-lives of stress-response mRNAs associated with innate immunity and growth inhibition. **bioRxiv (Cold Spring Harbor Laboratory)**, 18 set. 2019.

TOPISIROVIĆ, I. et al. Molecular dissection of the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) export-competent RNP. **The EMBO Journal**, v. 28, n. 8, p. 1087–1098, 5 mar. 2009.

TSCHUDI, C.; WILLIAMS, S. P.; ULLU, E. Conserved sequences in the U2 snRNA-encoding genes of Kinetoplastida do not include the putative branchpoint recognition region. **Gene**, v. 91, n. 1, p. 71–77, jan. 1990.

UCHIDA, N. et al. A Novel Role of the Mammalian GSPT/eRF3 Associating with Poly(A)-binding Protein in Cap/Poly(A)-dependent Translation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 52, p. 50286–50292, 1 dez. 2002.

UTTER, C. J. et al. Poly(A)-Specific Ribonuclease (PARN-1) Function in Stage-Specific mRNA Turnover in *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v. 10, n. 9, p. 1230–1240, 8 jul. 2011.

VELLKY, J. E. et al. Expression and Localization of DDX3 in Prostate Cancer Progression and Metastasis. **The American Journal of Pathology**, v. 189, n. 6, p. 1256–1267, 1 jun. 2019.

VICKERMAN, K. Antigenic variation in trypanosomes. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 613–617, 1 jun. 1978.

VIGUEIRA, P. A.; PAUL, K. S. Requirement for acetyl-CoA carboxylase in *Trypanosoma brucei* is dependent upon the growth environment. **Molecular Microbiology**, v. 80, n. 1, p. 117–132, 16 fev. 2011.

WAI KIT MA; TRAN, E. J. Measuring Helicase Inhibition of the DEAD-Box Protein Dbp2 by Yra1. **Methods in molecular biology**, v. 1259, p. 183–197, 10 dez. 2014.

WANG, J. et al. PABP/purine-rich-motif as an initiation module for cap-independent translation in pattern-triggered immunity. **Cell**, v. 185, n. 17, p. 3186–3200.e17, 18 ago. 2022.

WELLS, S. E. et al. Circularization of mRNA by Eukaryotic Translation Initiation Factors. **Molecular Cell**, v. 2, n. 1, p. 135–140, jul. 1998.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The Limits on *Trypanosomatid* Morphological Diversity. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. e79581, 19 nov. 2013.

WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 89–101, 5 mar. 1999.

WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science**, v. 268, n. 5214, p. 1179–1183, 26 maio 1995.

WIRTZ, E.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Gene expression mediated by bacteriophage T3 and 17 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. **Nucleic Acids Research**, v. 22, n. 19, p. 3887–3894, 1994.

WORD HEALTH ORGANIZATION. **Control and Surveillance of Human African Trypanosomiasis: Report of a WHO Expert Committee**. [s.l.] World Health Organization, 2013.

XING, Z.; MA, W. K.; TRAN, E. J. The DDX5/Dbp2 subfamily of DEAD-box RNA helicases. **WIREs RNA**, v. 10, n. 2, 2 dez. 2018.

YAN, S. et al. A low-background inducible promoter system in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 217–223, 1 fev. 2002.

YAN, S.; MYLER, P. J.; STUART, K. Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 112, n. 1, p. 61–69, jan. 2001.

YAO, C. et al. *Leishmania* chagasi: a tetracycline-inducible cell line driven by T7 RNA polymerase. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 205–213, 1 jul. 2007.

YASIR A. W. SKEIKY et al. A recombinant *Leishmania* antigen that stimulates human peripheral blood mononuclear cells to express a Th1-type cytokine profile and to produce interleukin 12. **Journal of Experimental Medicine**, v. 181, n. 4, p. 1527–1537, 1 abr. 1995.

YEDAVALLI, V. S. R. K. et al. Requirement of DDX3 DEAD Box RNA Helicase for HIV-1 Rev-RRE Export Function. **Cell**, v. 119, n. 3, p. 381–392, out. 2004.

YETER-ALAT, H. et al. The RNA Helicase Ded1 from Yeast Is Associated with the Signal Recognition Particle and Is Regulated by SRP21. **Molecules**, v. 29, n. 12, p. 2944, 1 jan. 2024.

YOFFE, Y. et al. Binding Specificities and Potential Roles of Isoforms of Eukaryotic Initiation Factor 4E in *Leishmania*. **Eukaryotic cell (Online)**, v. 5, n. 12, p. 1969–1979, 1 dez. 2006.

YOFFE, Y. et al. Evolutionary changes in the *Leishmania* eIF4F complex involve variations in the eIF4E-eIF4G interactions. **Nucleic Acids Research**, v. 37, n. 10, p. 3243–3253, 1 jun. 2009.

ZACHARIAE, W. Mass Spectrometric Analysis of the Anaphase-Promoting Complex from Yeast: Identification of a Subunit Related to Cullins. **Science**, v. 279, n. 5354, p. 1216–1219, 20 fev. 1998.

ZHANG, H. et al. DDX3X and Stress Granules: Emerging Players in Cancer and Drug Resistance. **Cancers**, v. 16, n. 6, p. 1131–1131, 12 mar. 2024.

ZHANG, L.; LI, X. DEAD-Box RNA Helicases in Cell Cycle Control and Clinical Therapy. **Cells**, v. 10, n. 6, p. 1540, 18 jun. 2021.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–1054, nov. 2009.

ZINOVIEV, A. et al. A novel 4E-interacting protein in *Leishmania* is involved in stage-specific translation pathways. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. 19, p. 8404–8415, 14 jul. 2011.

ZINOVIEV, A. et al. Gene duplication in *Trypanosomatids* – Two DED1 paralogs are functionally redundant and differentially expressed during the life cycle. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 185, n. 2, p. 127–136, 1 out. 2012.

CURRICULUM VITAE (LATTES)

Guilherme Albuquerque de França Monteiro
Curriculum Vitae

Identificação

Nome Guilherme Albuquerque de França Monteiro

Nascimento 26/08/1997 - Brasil

Nome em citações bibliográficas MONTEIRO, G. A. F.; MONTEIRO, GAF

Formação acadêmica/titulação

- 2022** Mestrado em Genética e Biologia Molecular.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
 Título: Caracterização da interação de RNA helicases do tipo DEAD-box com proteínas parceiras e complexos do tipo eIF4F de iniciação da tradução em *Trypanosoma brucei*
 Orientador: Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto
 Co-orientador: Danielle M. Nascimento Moura/Ludmila A. de Assis Aussourd
 Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, Brasil.
 Palavras-chave: Tripanosomatídeos, Biossíntese de proteínas, eIF4F, Regulação gênica.
 Grande área: Ciências Biológicas / Área: Genética / Subárea: Genética Molecular e de Microorganismos
- 2017 - 2022** Graduação em Biomedicina.
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2013 - 2015** Ensino Médio (2o grau) .
 Escola de Referência em Ensino Médio Nóbrega, EREM NÓBREGA, Brasil, Ano de obtenção: 2015
-

Formação complementar

- 2013 - 2014** Inglês. (Carga horária: 270h).
 Programa Ganhe o Mundo da Secretaria de Educação de Pernambuco, PGM, Brasil
- 2017 - 2017** Curso de curta duração em Práticas em PCR da XXIV Semana de Biomedicina. (Carga horária: 7h).
 Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Brasil
- 2019 - 2019** Curso de curta duração em Introdução ao Sequenciamento Capilar. (Carga horária: 4h).
 Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães, FIOCRUZ /

IAM, Brasil

- 2020 - 2020** Curso de curta duração em Ciências Forense.
Universidade Federal de Uberlândia, UFU, Uberlândia, Brasil
- 2022 - 2022** Biossegurança. (Carga horária: 50h).
Instituto Aggeu Magalhães - Fundação Oswaldo Cruz, IAM/FIOCRUZ-
PE, Brasil

Atuação profissional

. Universidade Federal de Pernambuco - UFPE

2018 - 2020 Vínculo: Monitor, Enquadramento funcional: Monitor da disciplina de Física e Biofísica I , Carga horária: 12, Regime: Universidade Federal de Pernambuco

Parcial

2017 - 2018 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 12, Regime: Universidade Federal de Pernambuco Parcial

Outras informações:

Bolsista PROExC / FACEPE no Laboratório de Microbiologia do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFPE

. Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

2019 - 2022 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Fundação Oswaldo Cruz Parcial

Outras informações:

Bolsista CNPq do Departamento de Microbiologia da FIOCRUZ / IAM

. Fiocruz-PE - IAM/FIOCRUZ-PE

2022 - Atual

. Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães - FIOCRUZ / IAM

2019 - 2019 Vínculo: Bolsista, Enquadramento funcional: Bolsista, Carga horária: 20, Regime: Fundação Oswaldo Cruz - Instituto Aggeu Magalhães Parcial

Outras informações:

Bolsista CNPq do Departamento de Microbiologia da FIOCRUZ / IAM

Projetos

Projetos de pesquisa

2022 - Atual Caracterização da interação de RNA helicases do tipo DEAD-box com proteínas parceiras e complexos do tipo eIF4F de iniciação da tradução em *Trypanosoma brucei*

Situação: Em andamento Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Mestrado acadêmico (1);

Integrantes: Guilherme Albuquerque de França Monteiro; Danielle Maria Nascimento Moura; Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Responsável); Ludmila Arruda de Assis

2019 - 2022 Produção em *Escherichia coli* de proteínas hipotéticas recombinantes associadas ao processo de tradução em *Leishmania infantum*.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1); Doutorado (2);

Integrantes: Guilherme Albuquerque de França Monteiro; Osvaldo Pompílio de Melo Neto (Responsável); Maria José Ribeiro Bezerra

2019 - 2019 Clonagem e expressão da proteína *TbPNO1* em *Escherichia coli*

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Guilherme Albuquerque de França Monteiro; Danielle Maria Nascimento Moura (Responsável)

2017 - 2018 EFEITO DE PRODUTOS DE CRANBERRY (*Vaccinium macrocarpon*) NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS MULTIDROGA-RESISTENTE- Programa BIA- Processo BIA-0152-9.06/17

Descrição: Produtos derivados de fontes botânicas estão sendo bastante avaliados pelas diversas propriedades biológicas que apresentam, inclusive a antibacteriana. Esses produtos podem ser excelentes opções terapêuticas principalmente em casos de resistência bacteriana aos fármacos tradicionais. O objetivo deste projeto é verificar susceptibilidade de bactérias multidroga-resistente a produtos de cranberry partir do desenvolvimento de atividades laboratoriais. BIA-0152-9.06/17.

Situação: Concluído Natureza: Projetos de pesquisa

Alunos envolvidos: Graduação (1);

Integrantes: Guilherme Albuquerque de França Monteiro; Ana Beatriz Sotero Siqueira (Responsável)

Projeto de extensão

2020 - 2020 Projeto Avivar

Descrição: Este projeto visa a capacitação de estudantes por meio de aulas e seminários sobre ventilação mecânica, para a manutenção de aparelhos respiratório de hospitais da cidade do Recife, em meio a pandemia do SARS-CoV-2. É uma parceria entre o SENAI-PE, Secretária de Saúde do Estado de Pernambuco, UFPE e Biotech Consultoria.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão
 Integrantes: Guilherme Albuquerque de França Monteiro (Responsável); ;
 Cristine Martins Gomes de Gusmão

2020 - 2021 Liga Acadêmica em Hematologia Clínica e Laboratorial da UFPE

Descrição: A LHCL é um projeto que visa o aprofundamento do conhecimento em hematologia clínica e laboratorial, utilizando os três pilares de ensino, pesquisa e extensão para suas atividades desenvolvidas. É um projeto que conta com a participação e coordenação de acadêmicos e professores de Biomedicina, podendo participar alunos de qualquer curso internos ou externos da UFPE. Os encontros da LHCL são periódicos, onde os alunos participarão de aulas, seminários e aplicação prática do conteúdo.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão
 Alunos envolvidos: Graduação (25);
 Integrantes: Guilherme Albuquerque de França Monteiro (Responsável); ;
 Marcos André Cavalcanti Bezerra

2019 - 2020 AÇÕES EDUCATIVAS E DE SAÚDE NO CONTROLE DE PARASITÓSES INTESTINAIS INFANTIS EM ESCOLAS PÚBLICAS DE RECIFE

Descrição: As parasitoses intestinais constituem um grave problema de saúde pública no Brasil, atingindo principalmente as crianças em idade escolar. O objetivo desse trabalho será controlar os índices de parasitoses nos escolares, a partir de ações conjuntas entre os acadêmicos de Biomedicina da UFPE e os professores das escolas, pais e ou responsáveis e as crianças que frequentam duas escolas municipais de Recife. Serão oferecidas reuniões mensais com os pais das crianças para alertá-los sobre a importância da realização dos exames parasitológicos periódicos e adoção de medidas individuais e coletivas de higiene pessoal e ambiental para controle dessas parasitoses.

Situação: Concluído Natureza: Projeto de extensão
 Alunos envolvidos: Doutorado (2);
 Integrantes: Guilherme Albuquerque de França Monteiro; Gutembergmann Batista Coutinho; Akíria Ohana Torreão; FRANCISCA JANAINA SOARES ROCHA (Responsável); Celina Cavalcanti Muniz Gomes; Lidiane Paloma Santos; Paulo de Tarso Nascimento Filho ; Sthefany D' Paula Elias Torres Gonçalves ; Wheverton Ricardo Correia do Nascimento; Felipe Rocha da Costa; Wellen Laís de Souza Gomes

2019 - 2020 CUIDADOS VOLTADOS À EDUCAÇÃO E SAÚDE DE PACIENTES IMUNOSSUPRIMIDOS FRENTE ÀS PARASITÓSES OPORTUNISTAS

Descrição: O estado de imunossupressão pode surgir em decorrência patologias como infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV), alcoolemia crônica, tabagismo, desnutrição e por tratamento com drogas imunossupressoras para controlar doenças autoimunes ou prevenir a rejeição contra os enxertos. As parasitoses oportunistas contribuem para o declínio abrupto da condição clínica do paciente imunossuprimido, dificultando o seu tratamento. Este projeto tem como objetivo identificar a presença de parasitos oportunistas em amostras fecais de pacientes imunossuprimidos.

Situação: Desativado Natureza: Projeto de extensão

Alunos envolvidos: Graduação (13); Mestrado acadêmico (2); Doutorado (2);
 Integrantes: Guilherme Albuquerque de França Monteiro; FRANCISCA JANAINA SOARES ROCHA (Responsável); Celina Cavalcanti Muniz Gomes; Sthefany D' Paula Elias Torres Gonçalves ; Wheverton Ricardo Correia do Nascimento; Líbia Cristina Rocha Vilela Moura; Cynthia Regina Pedrosa Soares; Juliana Tiemi Oikawa; Kalyne Monyque Lopes de Brito; Manoela de Aguiar Ferreira; Matheus Marinho Campos Siqueira; Pamella Almeida Pereira ; Saulo Brivaldo Mendonça da Silva ; Stella de Jesus Lourenço da Silva; Mayane Salgado de Lucena; Rhayanny Kethylly Pereira Santos; Vitória Mayanne Silva do Nascimento.

Idiomas

Inglês Compreende Razoavelmente, Fala Razoavelmente, Escreve Razoavelmente, Lê Razoavelmente

Produção

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. FERREIRA, A. I. B.; COUTINHO, G. B.; GOMES, C. C. M.; MONTEIRO, G. A. F.; GUIMARAES, G. D.; HENN, L.. Prevalence And Particularities Associated With Positive Serology For HIV In Trans Women And Travestis Sex Professionals. International Research Journal of Public Health. v.63, p.63, 2022.

2. COUTINHO, G. B.; MONTEIRO, G. A. F.; TORREAO, A. O.; GONCALVES, S. D. P. E. T.; GOMES, C. C. M.; BRITO, K. M. L.; LIRA, E. S.; ROCHA, F. J. S.. Presence of protozoans; helminths in quilombola children from Agreste region of Pernambuco, Northeast Brazil / Presença de protozoários e helmintos em crianças que residem em comunidades quilombolas, localizadas na cidade de Garanhuns, Pernambuco. Brazilian Journal of Health Review. v.3, p.19191 - 19199, 2020.

Capítulos de livros publicados

1. COUTINHO, G. B.; FERREIRA, A. I. B.; MONTEIRO, G. A. F.; GOMES, C. C. M.; GUIMARAES, G. D.; PEGADO, C. B. S.; SILVA, M. B. C. E.. EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF THE INCIDENCE OF DENGUE IN PERNAMBUCO BETWEEN 2007 AND 2019 In: EPIDEMIOLOGICAL ANALYSIS OF THE INCIDENCE OF DENGUE IN PERNAMBUCO BETWEEN 2007 AND 2019, ed.6. , 2021, p. 157

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. WIDMER, R.; FERREIRA, A. I. B.; MONTEIRO, G. A. F.; LEITE, M. C. G.; FIDELIS, R. V.; FEITOSA, L. C.; BRANDAO, C. A.; MELO, J. P. B.; ARCANJO, G. S.; BEZERRA, M. A. C.. Grupos sanguíneos e aloimunização: desafios da testagem em pacientes com Doença Falciforme e β-Talassemia In: Congresso Brasileiro de Hematologia, Hemoterapia e Terapia Celular (HEMO play), 2021, **Anais HEMO play**

2021 2021, v.43, p.S482 - S483

2. FERREIRA, A. I. B.; COUTINHO, G. B.; GUIMARAES, G. D.; MONTEIRO, G. A. F.; CRUZ, M. C. C.; ROCHA, F. J. S.. HANSENÍASE TUBERCULÓIDE, UM TÍPICO RELATO DE CASO: DISCUSSÃO DE ACHADOS CLÍNICOS E LABORATORIAIS In: XIII Jornada da Medicina Tropical Programa de Pós - Graduação em Medicina Tropical / UFPE, 2019, Recife. **Anais da XIII Jornada da Medicina Tropical / UFPE** Recife: Editora Universitária - UFPE, 2020, p.23 - 23

3. COUTINHO, G. B.; SOARES, M. E. H. S.; GUIMARAES, G. D.; LIMA, S. C. V.; **MONTEIRO, G. A. F.** Anais da XXV Semana de Biomedicina In: XXV Semana de Biomedicina, **Anais da XXV Semana de Biomedicina** Revista Eletrônica Acervo Saúde, 2019,

4. RIBEIRO, J. L. A. B.; SOARES, M. E. H. S.; COUTINHO, G. B.; GONCALVES, S. D. P. E. T.; TORREAO, A. O.; MONTEIRO, G. A. F.; FERREIRA, A. I. B.. OSTEOGÊNESE IMPERFEITA: UMA BREVE ANÁLISE DOS ASPECTOS CLÍNICOS E MORFOGENÉTICOS In: II Curso de Inverno em Biociências, 2019, **II Curso de Inverno em Biociências** 2019,

5. SILVA, E. G.; CRUZ, M. C. C.; SANTOS, K. A. P.; COUTINHO, G. B.; MONTEIRO, G. A. F.; VASCONCELOS NETO, A. J.. RELATO DE CASO CLÍNICO: FRENOTOMIA LINGUAL EM PACIENTE INFANTIL, FRENTE AO TRATAMENTO DE ANQUILOGLOSSIA In: II ENCONTRO DE ODONTOLOGIA DE EXCELÊNCIA Práticas baseadas em evidências, **Anais do II ENCONTRO DE ODONTOLOGIA DE EXCELÊNCIA Práticas baseadas em evidências** 2019, p.114 - 114

6. MACHADO, D. C.; TORREAO, A. O.; COUTINHO, G. B.; **MONTEIRO, G. A. F.** DIÁLISE CLÍNICA NO TRATAMENTO DA DOENÇA RENAL CRÔNICA: BREVE REVISÃO In: 2ª Semana de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (SEPEC) - 50 anos da Pedagogia do Oprimido: Vozes da Formação., 2018, Recife. **Anais da 2ª Semana de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (SEPEC)** 2018,

7. SIQUEIRA, A. B. S.; MONTEIRO, G. A. F.; ARAUJO, E. A.. EFEITO DE PRODUTOS DE CRANBERRY (*Vaccinium macrocarpon*) NO CRESCIMENTO DE BACTÉRIAS MULTIDROGA-RESISTENTE In: 2ª Semana de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (SEPEC) - 50 anos da Pedagogia do Oprimido: Vozes da Formação., 2018, Recife. **Anais da 2ª Semana de Ensino, Pesquisa, Extensão e Cultura (SEPEC)** Recife: Editora UFPE, 2018, v.3,

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo expandido)

1. GOMES, C. C. M.; MONTEIRO, G. A. F.; COUTINHO, G. B.; FERREIRA, A. I. B.; ROCHA, F. J. S.. Anais do I Congresso Online em Doenças Negligenciadas e Emergentes In: I Congresso Online em Doenças Negligenciadas e Emergentes, 2020, **Anais do I Congresso Online em Doenças Negligenciadas e Emergentes** Revista Eletrônica Acervo Saúde, 2020,

Apresentação de trabalho e palestra

1. **MONTEIRO, G. A. F.**; ASSIS, L. A.; MOURA, D. M. N.; MELO NETO, O. P.. “Caracterização da interação de helicases do tipo DEAD box de *Trypanosoma brucei* com complexos do tipo eIF 4 F de iniciação da tradução”, 2023. (Outra,Apresentação de Trabalho)

2. RIBEIRO, J. L. A. B.; **MONTEIRO, G. A. F.**; MOURA, D. M. N.; MELO NETO, O. P.. In silico study of the interactions between the translation factor EIF4A1; the MIF4G domain of two known partners, EIF4G3; EIF4G4, in *Trypanosoma brucei*, 2023. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

3. **MONTEIRO, G. A. F.**; BEZERRA, D. W. G.; ROCHA, M. E. O. P.; ASSIS, L. A.; MOURA, D. M. N.; MELO NETO, O. P.. Investigação das Interações Moleculares em *Leishmania infantum*: Um Estudo In Silico de Parceiros do Homólogo da Proteína de Ligação ao Poli-A (PABP1), 2023. (Outra,Apresentação de Trabalho)

4. **MONTEIRO, G. A. F.**; RIBEIRO, J. L. A. B.; ASSIS, L. A.; MELO NETO, O. P.. Investigating possible interactions between the MIF4G domain of the EIF4G4 translation factor with helicases of the *DEAD-box* family from *Trypanosoma brucei*, 2023. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

5. **MONTEIRO, G. A. F.**; ASSIS, L. A.; MOURA, D. M. N.; MELO NETO, O. P.. Caracterização da interação de helicases do tipo *DEAD-box* de *Trypanosoma brucei* com complexos do tipo eIF4F de iniciação da tradução, 2022. (Outra,Apresentação de Trabalho)

6. **MONTEIRO, G. A. F.**; BEZERRA, M. J. R.; MELO NETO, O. P.. Produção em “*Escherichia coli*” de proteínas hipotéticas recombinantes associadas ao processo de tradução em “*Leishmania infantum*”., 2020. (Outra,Apresentação de Trabalho)

7. COUTINHO, G. B.; SOARES, M. E. H. S.; GUIMARAES, G. D.; LIMA, S. C. V.; **MONTEIRO, G. A. F.**.. FLUOXETINA E SUA UTILIZAÇÃO NO TRATAMENTO FARMACOLÓGICO DO TRANSTORNO DEPRESSIVO MAIOR, 2019. (Outra,Apresentação de Trabalho)

8. **MONTEIRO, G. A. F.**; ROCHA NETO, J. C.; ARAUJO, E. A.; SILVA, E. C.; BARBOSA, F. M. A.; OLIVEIRA, J. M.; GALINDO, H. M. ; SIQUEIRA, A. B. S.. GROWTH INHIBITION OF BACTERIA FROM HOSPITAL ORIGIN BY VACCINIUM MACROCARPON., 2019. (Congresso,Apresentação de Trabalho)

9. **MONTEIRO, G. A. F.**; ARAUJO, E. A.; SILVA, E. C.; ROCHA NETO, J. C.; SIQUEIRA, A. B. S.. Inibição proliferativa de bactérias gram-negativas multidroga-resistente e não-multidroga-resistente frente a produtos a base de *Vaccinium macrocarpon*, 2019. (Outra,Apresentação de Trabalho)

10. SIQUEIRA, A. B. S.; **MONTEIRO, G. A. F.**; ARAUJO, E. A.. EFEITO ANTIMICROBIANO DE PRODUTOS DE CRANBERRY (*Vaccinium macrocarpon*) NA PROLIFERAÇÃO BACTERIANA DE *Eschericia coli* e *Klebsiella pneumoniae* MULTIDROGA-RESISTENTES, 2018. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Produção técnica

Demais produções técnicas

1. **MONTEIRO, G. A. F.**. Unraveling Protein-Protein Interactions - Collaborative Online International Learning (COIL), 2023. (Outro, Curso de curta duração ministrado).