

**INSTITUTO CARLOS CHAGAS MESTRADO EM BIOCIÊNCIAS E
BIOTECNOLOGIA**

VINÍCIUS LOPES LESSA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE
UDP-XILOSE A PARTIR DE UDP-GLICOSE EM *Trypanosoma cruzi***

**CURITIBA/PR
2020**



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

VINÍCIUS LOPES LESSA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL DOS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNTESE DE UDP-
XILOSE A PARTIR DE UDP-GLICOSE EM *Trypanosoma cruzi***

Dissertação apresentada ao Instituto Carlos Chagas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biociências e Biotecnologia.

Orientador: Stenio Perdigão Fragoso
Co-orientador: Augusto Sávio Peixoto Ramos

CURITIBA/PR
2020

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus orientadores, Dr. Augusto e Dr. Stenio, por terem me concedido a oportunidade de trabalhar neste projeto, me fazendo crescer profissionalmente como pesquisador em um instituto renomado que é o ICC, agradeço também por todos os conselhos nos experimentos, por todos os ensinamentos e aprendizados. Muito Obrigado!

Agradeço a todo o pessoal do laboratório de biologia molecular e sistêmica de tripanossomatídeos pela ajuda e apoio quando precisei. Agradeço a Kami e a Bruna pela amizade que construí, por todas as conversas descontraídas e alegres, por dividirem protocolos, experiências e dicas valiosas. Agradeço a Jaque e a Tabata pela ajuda nos experimentos de microscopia, por terem compartilhado protocolos e experiências também. Agradeço a Clau pelas experiências e ajudas no laboratório. Agradeço a Dra. Gisele Picchi e à Dra. Priscila Hiraiwa pela amizade, pelo conhecimento e dicas valiosas. Agradeço a Dra. Daniela Pavoni, Raphael, Junior, Matheus, Erick, Dr. Christian, Dr. Leonardo, Mallu, Thaisa, Nicole e Dra. Lyris, pelas trocas de experiências, orientações nos lab meetings, dicas para o trabalho e amizade.

Agradeço a plataforma de Microscopia do Instituto Carlos Chagas pelo auxílio durante o andamento do projeto.

Agraço ao pessoal do preparo de materiais, do biotério e do Instituto Carlos Chagas por todo o tempo disponibilizado e por fornecer a estrutura e condições necessárias para a execução do projeto.

Agradeço a minha família por todo o apoio e força nos momentos difíceis, por todo amor e carinho.

Por fim agradeço ao programa de pós-graduação do Instituto Carlos Chagas pela oportunidade de desenvolver este projeto de mestrado, aos avaliadores da Jornadinha Dra. Lia e Dr. Foti, por me acompanharem ao longo deste processo, pelas correções e sugestões realizadas; agradeço aos membros suplentes da banca examinadora, Dr. Foti e Dra. Fabiola por terem aceitado o convite de avaliar a dissertação. Agradeço a banca titular da defesa de mestrado, Dra. Lia, Dr. Fabiano e ao Dr. Wanderson por terem aceitado o convite de avaliar e contribuir com sugestões para aperfeiçoar esta dissertação. E à Fiocruz pelo apoio financeiro.

“Eis por que não há uma só ciência que seja, em todas as suas peças, obra de um só homem; nenhuma descoberta que o seu primeiro inventor tenha levado à perfeição. A cada edifício intelectual, vários homens e diversas gerações trouxeram seu contingente de pesquisas e de observações.”

- Allan Kardec

RESUMO

Glicoconjugados são fundamentais para a sobrevivência e infectividade de tripanossomatídeos, atuando desde a proteção contra proteases no inseto vetor aos processos de invasão do hospedeiro mamífero e modulação do seu sistema imunológico. A síntese de glicoconjugados ocorre no Retículo Endoplasmático e no Complexo de Golgi pela adição de monossacarídeos a proteínas e lipídeos. Nas reações de glicosilação, nucleotídeos-açúcares atuam como os doadores ativados de açúcares. Dentre os tripanossomatídeos mais estudados, devido a sua importância médica (*T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania* spp.), apenas *T. cruzi* apresenta os genes necessários para a síntese de UDP-xilose (UDP-Xil) e, de forma correspondente, é o único que apresenta resíduos de xilose em seus glicoconjugados. A síntese de UDP-Xil é feita em duas etapas: primeiramente, UDP-glicose é oxidada pela enzima UDP-glicose desidrogenase (UGD) a UDP-ácido glucurônico (UDP-GlcA); na segunda etapa, ocorre a descarboxilação de UDP-GlcA a UDP-Xil, pela enzima UDP-ácido glucurônico descarboxilase (UXS). Este trabalho tem como objetivo a caracterização funcional dos genes *TcUGD* e *TcUXS* de *T. cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas. Primeiramente a análise *in silico* mostrou que os genes *TcUGD* e *TcUXS* possuem apenas uma cópia no genoma do parasita, tornando viável a técnica de nocaute por recombinação homóloga. O nocaute do gene *TcUGD* foi feito pela substituição dos dois alelos pelos genes de resistência a neomicina e higromicina, sendo a correta inserção dos cassetes confirmada por PCR. Com relação ao gene *TcUXS*, tentativas para a sua deleção até o momento, não foram bem sucedidas. Após obter o nocaute do gene *TcUGD* foram feitos ensaios de curva de crescimento, microscopia eletrônica e de fluorescência, localização subcelular, diferenciação e análises em *western blot*. A curva de crescimento mostrou que a taxa de proliferação das formas epimastigotas do mutante *tcugdΔ* é menor em comparação com o parasita selvagem. Por *western blot* e imunofluorescência, observamos que a glicosilação da proteína GP72 está alterada. De acordo com dados da literatura, em mutantes nulos de *gp72*, o flagelo se encontra desadido do corpo do parasita. Apesar disso, experimentos de microscopia eletrônica de varredura e transmissão não mostraram alterações morfológicas aparentes no flagelo dos mutantes de *tcugdΔ*, o que sugere que a glicosilação de GP72 não é necessária para a sua atividade na adesão flagelar. A localização celular de *TcUGD* e *TcUXS* foi investigada pela fusão das proteínas com a etiqueta HA. Os resultados indicam uma possível localização da proteína *TcUGD*-HA no glicossomo, onde se supõe que ocorra a síntese de nucleotídeos-açúcares em tripanossomatídeos. O papel da xilose na infectividade e diferenciação do parasita ainda tem que ser avaliado, mas os resultados apresentados indicam que, apesar de um açúcar pouco abundante nos glicoconjugados de *T. cruzi*, níveis adequados de xilose são necessários para crescimento ótimo do parasita em cultura. Além disso, nossos dados indicam uma relação complexa entre a glicosilação de GP72 e sua atividade, que merece um estudo mais detalhado.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, glicoconjugados, nucleotídeo-açúcar, xilose

ABSTRACT

Glycoconjugates are essential for the survival and infectivity of trypanosomatids, acting in processes such as protection against proteases in the insect vector, cell invasion, and modulation of the host immune system. The synthesis of glycoconjugates occurs in the lumen of the Endoplasmic Reticulum and the Golgi apparatus through the addition of monosaccharides to proteins and lipids. Nucleotide sugars act as activated sugar donors in glycosylation reactions. Considering the most studied trypanosomatids due to their medical importance (*T. brucei*, *T. cruzi* and *Leishmania* spp.), only *T. cruzi* has the genes involved in the synthesis of UDP-Xylose (UDP-Xyl) and, as expected, it is the only one containing xylose residues in its glycoconjugates. The synthesis of UDP-Xyl occurs in two steps: first UDP-glucose is oxidized to UDP-glucuronic acid (UDP-GlcA) by UDP-glucose dehydrogenase (UGD), followed by decarboxylation of UDP-GlcA to UDP-Xyl through the action of UDP-glucuronic acid decarboxylase (UXS). This work aims to functionally characterize the *TcUGD* and *TcUXS* genes in *T. cruzi*, the etiological agent of Chagas disease. *In silico* analysis showed that *TcUGD* and *TcUXS* are single-copy genes in the parasite genome, making gene knockout by homologous recombination a feasible approach. The knockout of the *TcUGD* gene was achieved by replacement of both alleles by neomycin and hygromycin resistance genes and the correct insertion of the integration cassettes was confirmed by PCR. With respect for the *TcUXS* gene, attempts to deletion it for the moment were unsuccessful. After achieved the knockout of the *TcUGD* gene we did the assays of growth curve, electronic and fluorescence microscopy, subcellular localization, differentiation and analysis on western blot. The growth curve assay reveals that the growth rate of *tcugd* Δ null mutant epimastigotes was lower compared to the wild type parasite. By western blotting and immunofluorescence analysis, we observed that glycosylation of the GP72 protein was altered. It has been previously shown that a detached flagellum is observed in epimastigote forms. Scanning and transmission electron microscopy experiments, however, didn't show any apparent morphological changes in the flagellum of *Tcugd* mutants, suggesting that GP72 glycosylation is not necessary for its activity in flagellar adhesion. The cellular localization of *TcUGD* and *TcUXS* was investigated by fusion proteins with the HA tag. The results indicate a possible localization of *TcUGD*-HA in glycosomes, where nucleotide-sugar synthesis is supposed to occur in trypanosomatids. The role of xylose residues in infectivity and differentiation of the parasite has yet to be addressed, but our results indicated that, despite being a low abundant sugar in *T. cruzi* glycoconjugates, adequate levels of xylose are necessary for optimal growth of the parasite in culture. Also, our data indicate a complex relationship between the glycosylation of GP72 and its activity, which deserves a more detailed investigation.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*, glycoconjugates, nucleotide-sugar, xylose

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: O ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	2
Figura 1.2: Mucinas presentes em diferentes fases do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	4
Figura 1.3: Efeitos do nocaute da GP72 em <i>T. cruzi</i> observados em microscópio eletrônico de varredura.....	5
Figura 1.4: Figura 1.4: Efeitos do nocaute da GP72 em <i>T. cruzi</i> observados em microscópio eletrônico de transmissão	5
Figura 1.5: Estrutura proposta da porção glicana encontrada na glicoproteína GP72 em <i>T. cruzi</i> no estágio de epimastigotas	6
Figura 1.6: Estrutura de dois nucleotídeos açúcares.....	7
Figura 1.7: Ilustração da síntese de glicoconjugados.....	8
Figura 1.8: Reações de síntese de nucleotídeos-açúcares.....	9
Figura 1.9: Resumo das vias de biossíntese de nucleotídeos açúcares no glicosomo dos tripanossomatídeos <i>T. brucei</i> , <i>T. cruzi</i> e <i>L. major</i>	10
Figura 1.10: Esquematização das vias <i>de novo</i> e <i>salvage</i> na biossíntese de UDP-Xil em <i>T. cruzi</i>	14
Figura 3.1: Mapa dos vetores de destino.....	24
Figura 3.2: Mapa do vetor pET 28a (+)TcUGD.....	25
Figura 3.3: Desenho esquemático dos vetores pTc2KO-hyg e pTc2KO-neo.....	29
Figura 3.4: Esquema mostrando o anelamento dos <i>primers</i> para a amplificação das intergênicas <i>upstream</i> e <i>downstream</i> dos genes <i>TcUGD</i> e <i>TcUXS</i>	29
Figura 3.5: Mapa resumido dos cassetes com os genes de resistência a higromicina e neomicina.....	31
Figura 4.1: Locus gênico do gene <i>TcUGD</i>	36
Figura 4.2: Locus gênico do gene <i>TcUXS</i>	36
Figura 4.3: Alinhamento feito com os ortólogos da proteína TcUGD.....	37
Figura 4.4: Alinhamento feito com os ortólogos da proteína TcUXS.....	38
Figura 4.5: Modelagem da proteína TcUGD feita no programa Phyre ²	39
Figura 4.6: Análise de expressão das proteínas recombinantes TcUGD e TUXS em <i>T. cruzi</i> por western blot	40
Figura 4.7: Análise do localização celular de TcGAPDH, em <i>T. cruzi</i>	41
Figura 4.8: Imagens de microscopia de fluorescência com deconvolução do transfectante UXS.1.....	42
Figura 4.9: Imagens de microscopia de fluorescência com deconvolução do transfectante UXS.17.....	42
Figura 4.10: Imagens de microscopia de fluorescência com deconvolução do transfectante UGD.35.....	43
Figura 4.11: Ensaio de colocalização em microscopia confocal da enzima UXS.12 contendo etiqueta 3xHA na região C-terminal.....	43
Figura 4.12: Esquematização do nocaute do gene <i>TcUGD</i> com os cassetes contendo higromicina e neomicina, apresentando também os <i>primers</i> utilizados para análise do mutante simples nocaute e duplo nocaute.....	45
Figura 4.13: Ensaio de PCR para averiguar a correta substituição do gene <i>TcUGD</i> pelos cassetes de integração no clone <i>tcugdΔ/7</i>	46
Figura 4.14: Esquematização do nocaute do gene <i>TcUXS</i> com os cassetes contendo higromicina e neomicina, apresentando também os <i>primers</i> utilizados para análise do mutante simples nocaute e duplo nocaute	47
Figura 4.15: Ensaio de PCR para averiguar a inserção do cassete UXSPHKO para deleção de uma das cópias do gene <i>TcUXS</i>	48

Figura 4.16: Gráfico com o valor bruto da concentração de epimastigotas	49
Figura 4.17: Gráfico com as médias dos dados brutos.....	49
Figura 4.18: Gráfico onde foram plotados os dados brutos de cada triplicada técnica em função logarítmica	50
Figura 4.19: Gráfico com as médias de cada triplicata técnica reproduzidas nos experimentos (exp_1), (exp_2) e (exp_3) plotados em função logarítmica.	51
Figura 4.20: Gráfico mostrando a análise da diferenciação dos parasitas nocaute e selvagem	52
Figura 4.21: <i>Western blot</i> mostrando a presença do epítopo WIC29.26 em glicoproteínas no extrato proteico de epimasstigotas.....	53
Figura 4.22: Imunofluorescência para averiguar a presença das porções glicanas nos mutantes.	54
Figura 4.23: Microscopia de eletrônica de varredura para investigar a morfologia dos mutantes	55
Figura 4.24: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Lista de <i>primers</i> utilizados para a amplificação dos genes <i>TcUGD</i> e <i>TcUXS</i> com os sítios attB. Em verde é representado as sequências attB nos <i>primers</i> , em vermelho é representado o gene.....	24
Tabela 3.2: <i>Primers</i> utilizados para amplificar as intergênicas <i>upstream</i> e <i>downstream</i> dos genes <i>TcUGD</i> e <i>TcUXS</i>	30
Tabela 3.3: <i>Primers</i> utilizados para averiguar a inserção dos cassetes no genoma dos parasitas mutantes.	32
Tabela 4.1: Similaridade e identidade de <i>TcUGD</i> com as enzimas de outros organismos, cálculo feito utilizando o programa Blastp.	38
Tabela 4.2: Smilaridade e identidade de <i>TcUXS</i> com as enzimas de outros organismos, cálculo feito utilizando o programa Blastp.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2 GLICOCONJUGADOS E NUCLEOTÍDEOS-AÇÚCARES EM <i>T. Cruzi</i>	2
1.3 SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS E NUCLEOTÍDEOS-AÇÚCARES	6
1.4 O GLICOSSOMO E AS PRINCIPAIS VIAS DE SÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS-AÇÚCARES EM TRIPANOSSOMATÍDEOS	9
1.5 A VIA <i>DE NOVO</i> E <i>SALVAGE</i> PARA A SÍNTESE DE UDP-XIL EM <i>T. cruzi</i>	12
2. OBJETIVOS	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	16
3.2 MICROORGANISMOS	16
3.3 MEIOS DE CULTURA	17
3.3.1 Meio LB (Luria-Bertani).....	17
3.3.2 Meio LIT (Liver infusion Tryptose)	17
3.3.3 Meio TAU (Triatomine Artificial Urine).....	17
3.3.4 Meio TAU 3AAG pH 6,0 Meio Tau suplementado com:	18
3.4 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES.....	18
3.5 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES.....	18
3.6 PCR DE COLÔNIA.....	19
3.7 OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS DOS CLONES RECOMBINANTES	19
3.8 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA.....	19
3.9 PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DO GEL DE AGAROSE.....	20
3.10 PURIFICAÇÃO DE DNA POR ELETROELUIÇÃO	20
3.11 PRECIPITAÇÃO DE DNA POR ETANOL ABSOLUTO	20
3.12 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE <i>T. cruzi</i>	20
3.13 TRANSFEÇÃO DE DNA EM <i>T. cruzi</i>	21
3.14 CULTIVO DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS	21
3.15 METACICLOGÊNESE	22
3.16 PREPARO DO EXTRATO PROTEÍCO DE EPIMASTIGOTAS	22
3.17 <i>WESTERN BLOT</i>	22
3.18 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS TCUGD E TCUXS RECOMBINATES.....	23
3.18.1 Clonagem dos genes <i>TcUGD</i> e <i>TcUXS</i> nos vetores de expressão em bactérias e <i>T. cruzi</i>	23
3.19 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL.....	26

3.20	IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS	26
3.21	IMUNOFLUORESCÊNCIA E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR	27
3.22	NOCAUTE GÊNICO	28
3.22.1	Amplificação das intergênicas para a construção dos cassetes	28
3.22.2	Construção dos cassetes com as marcas de seleção a higromicina e neomicina	30
3.23	ISOLAMENTO DE CLONES MUTANTES	32
3.24	CURVAS DE CRESCIMENTO E ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO	32
3.25	AVALIAÇÃO DOS PARASITAS NOCAUTES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E TRANSMISSÃO	33
3.25.1	Preparo de parasitas para análise em microscopia eletrônica de varredura	33
3.25.2	Preparo de parasitas nocautes para microscopia eletrônica de transmissão	34
4.	RESULTADOS	36
4.1	ANÁLISE IN SILICO	36
4.2	ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR.....	39
4.2.1	Construção dos vetores e obtenção das enzimas fusionadas a tag 3xHA na região amino- terminal ou carboxi-terminal.....	39
4.2.2	Análise da superexpressão das proteínas TcUGD e TcUXS em <i>T. cruzi</i>	39
4.2.3	Análise da localização subcelular por microscopia de fluorescência e confocal.....	40
4.3	OBTENÇÃO DE PARASITAS NOCAUTES PARA O GENE <i>TcUGD</i> e <i>TcUXS</i> ..	44
4.4	ANÁLISE FENOTÍPICA DO NOCAUTE.....	48
4.4.1	Curvas de crescimento	48
4.4.2	Ensaio de metaciclogênese	51
4.4.3	Análise da porção glicana da proteína GP72 por <i>western blot</i> e imunofluorescência.....	53
4.4.4	Microscopia eletrônica de varredura.....	54
4.4.5	Microscopia eletrônica de transmissão	55
5.	DISCUSSÃO	56
5.1	ANÁLISE IN SILICO	56
5.2	LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR.....	57
5.3	ANÁLISE FENOTÍPICA DO NOCAUTE DO GENE <i>TcUGD</i>	58
5.4	ENSAIO DE METACICLOGÊNESE.....	61
6.	CONCLUSÕES	62
7.	PERSPECTIVAS	63
8.	REFERÊNCIAS	64

1. INTRODUÇÃO

1.1 DOENÇA DE CHAGAS

Em torno de 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estão infectadas por *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas (WHO, 2019). Sua transmissão acontece pelo contato da ferida ocasionada pela picada, com as fezes e urina do triatomíneo infectado, ocorrendo também por transfusão sanguínea, transplantes de órgãos, ingestão de alimentos contaminados e por transmissão da mãe para o feto durante a gestação ou no momento do parto (WHO, 2017).

Atualmente 70 milhões de pessoas moram em áreas de alto risco de transmissão da doença (WHO, 2019). As áreas endêmicas incluem os países Brasil, México, Argentina e Bolívia, sendo o último país o que possui a maior taxa de incidência da doença, com 60% do seu território considerado uma zona de risco (WHO, 2019). Houve redução no números de novos casos, devido ao controle da transmissão vetorial, porém a doença é negligenciada, devido ao baixo investimento na busca de novos tratamentos por parte do setor privado. Em 2015 foi estimado que mais de 80% da população contaminada pelo parasita não possui acesso a diagnóstico e tratamento contra a doença (PINHEIRO, *et al.*, 2017 apud DIAS, 2016).

Apesar de ser endêmica na América Latina, na última década houve um aumento na incidência da doença em países como Estados Unidos da América, Canadá, e em alguns países europeus devido à migração de portadores da doença, um cenário que não pode ser ignorado (WHO, 2017). Frente a forma como a doença é tratada mundialmente, ela gera um custo de R\$ 7,19 bilhões de dólares mundialmente, prejuízo esse que excede o de outras doenças como rotavírus (R\$ 2 bilhões) e câncer cervical (R\$ 4,7 bilhões) (LEE *et al.*, 2013; WHO, 2017).

O ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* está esquematizado na figura 1.1. O inseto vetor infectado, pertencente aos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, realiza seu repasto sanguíneo no vertebrado. Os parasitas, na forma de tripomastigotas metacíclicos, são liberados por meio das fezes do inseto vetor próximo ao local da picada, a forma infectiva invade o hospedeiro por meio de soluções de continuidade geradas pela picada do inseto vetor, ou pelas mucosas como a conjuntiva. Dentro do hospedeiro, os tripomastigotas metacíclicos invadem as células próximas ao sítio de inoculação. Dentro das células infectadas os parasitas se diferenciam em amastigotas que se multiplicam por fissão binária. Após a sua multiplicação

dentro da célula, o parasita se diferencia novamente para a forma de tripomastigota sanguíneo. O parasita, rompe a célula sendo liberado para circulação sanguínea, infectando células de outros tecidos. Os tripomastigotas presentes na corrente sanguínea do hospedeiro são suscetíveis de serem ingeridos pelo inseto vetor, se diferenciando para a forma epimastigota quando estes se encontram no intestino médio do inseto. No intestino médio o parasita se multiplica e quando presente no intestino posterior se diferencia na forma infectiva novamente, para quando o inseto vetor realizar o novo respasto sanguíneo, o ciclo de vida do parasita no hospedeiro se reinicie. (CDC, 2019).

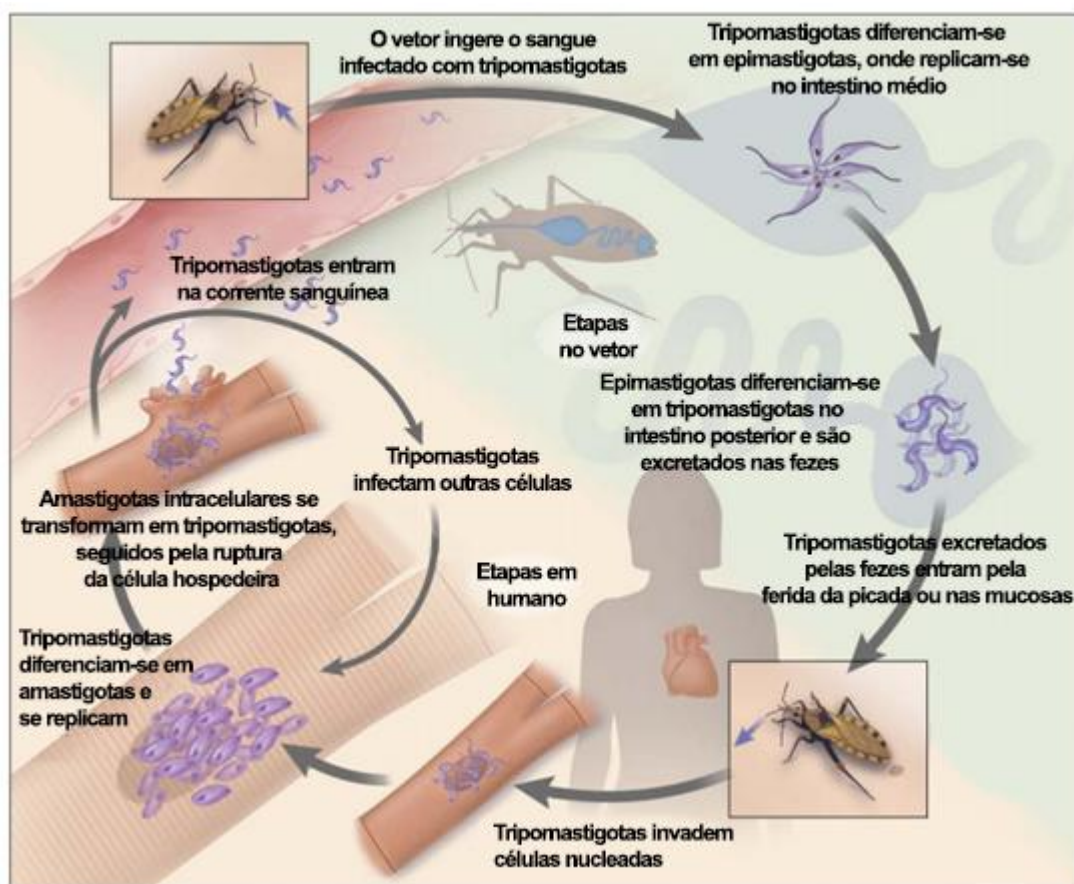


Figura 1.1: O ciclo de vida do *T. cruzi*. Observa-se no ciclo de vida do parasita as formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos presentes no inseto vetor, e as formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneos presentes no hospedeiro mamífero.
 Fonte: Adaptado de BERN, C. (2011).

1.2 GLICOCONJUGADOS E NUCLEOTÍDEOS-AÇÚCARES EM *T. Cruzi*

Os glicoconjugados são monossacarídeos e oligossacarídeos ligados covalentemente a proteínas e lipídeos, e se constituem em moléculas biologicamente ativas encontradas praticamente em todas as células eucarióticas (VARKI, 2008). Os glicoconjugados compreendem algumas classes de macromoléculas denominadas proteoglicanos,

glicoproteínas e glicolípideos (BHAGAVAN; HA, 2011).

Os glicoconjugados desempenham um papel fundamental na sobrevivência e infectividade do *T. cruzi*, por exemplo, atuando na adesão da superfície do trato digestivo do inseto vetor (NOGUERIA *et al.*, 2007), e no bloqueio da ativação de células TCD4 (GOMES *et al.*, 1996; NOGUERIA *et al.*, 2007). O *T. cruzi* apresenta em sua superfície celular uma grande quantidade de glicoconjugados, dentre os quais podemos destacar os glicosilinositolfosfolípideos (GIPLs) (LEDERKREMER; BERTELLO, 2001), transialidases (TS) (BUSCAGLIA *et al.*, 2006 apud FRASCH, 2000), mucinas e proteínas de superfície associadas a mucinas (MASPs, de mucin-associated surface proteins) (BUSCAGLIA *et al.*, 2006, apud EL-SAYED, 2005).

Uma característica marcante dos tripanossomatídeos é o uso extensivo de âncoras de glicosilfosfaditilinositol (GPI) para ancorar seus glicoconjugados à membrana plasmática. Em *T. cruzi*, importantes glicoproteínas como as mucinas e a família de transialidases estão ancoradas à membrana por GPI, enquanto os GIPLs correspondem a glicolípideos ricos em resíduos de galactose e N-acetilglicosamina (LEDERKREMER; BERTELLO, 2001). Essas moléculas estão presentes em todas as fases de vida do parasita, formam uma camada densa ao redor do parasita, auxiliam na adesão do parasita no intestino médio do vetor, e regulam a ativação de células TCD4⁺ e TCD8⁺ (BERGTER; VERMELHO, 2010).

As mucinas são glicoproteínas hidrofílicas presentes em grande quantidade e em quase todas as fases do ciclo de vida do parasita (fig.1.2). A glicoproteína possui um núcleo que varia de 50 a 200 kDa, ele é rico em resíduos de serina, treonina e prolina O-glicosilados (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). A porção glicana é rica em resíduos de galactose, N-acetilglicosamina e ácido siálico (BUSCAGLIA *et al.*, 2006). Na fase epimastigota e tripomastigota metacíclico atuam na proteção contra peptidases do inseto vetor, em tripomastigotas os resíduos de galactose das mucinas servem de receptores para o ácido siálico, transferido das células do hospedeiro para o parasita pelas transialidades presentes em sua superfície. Esse processo confere ao *T. cruzi* resistência ao sistema complemento humano (BERGTER; VERMELHO, 2010). Na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, as mucinas induzem a síntese de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-12) e oxido nítrico. (BUSCAGLIA *et al.*, 2006, apud ALMEIDA, 2000).

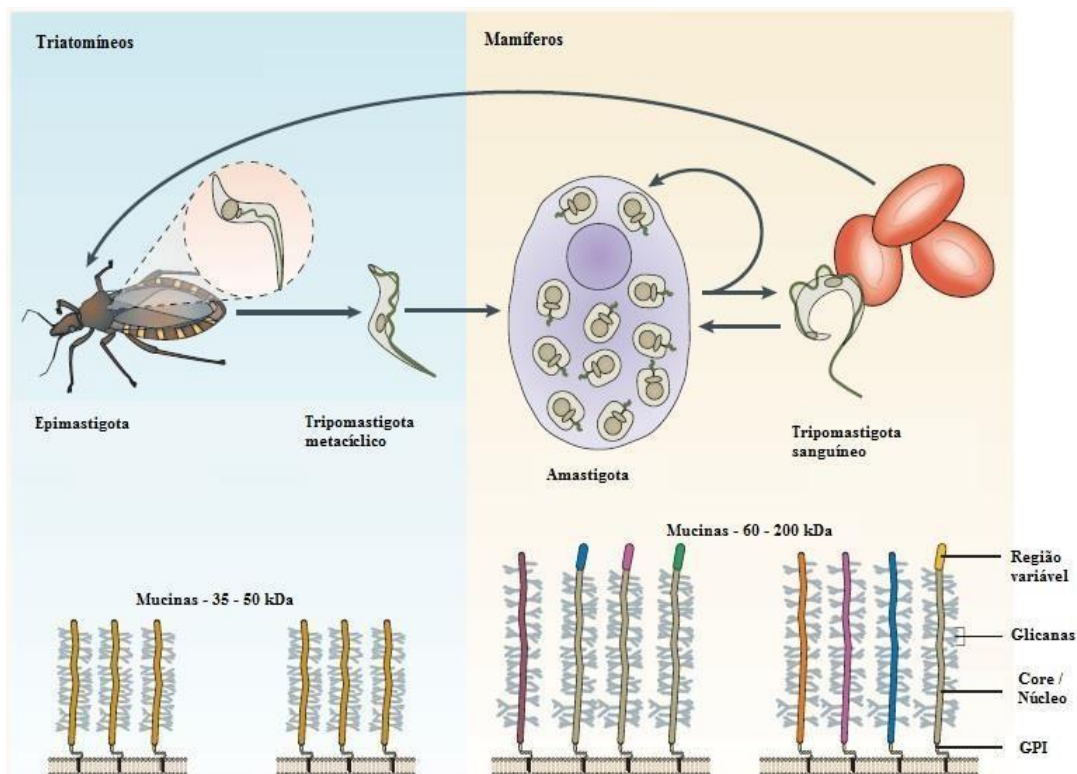


Figura 1.2: Mucinas presentes em diferentes fases do ciclo de vida do *T. cruzi*. Representação esquemática das diferentes formas e graus de complexidade destas moléculas em diferentes fases do ciclo de vida do parasita.

Fonte: Adaptado de Busgaglia. (2006).

As transialidases (TS) são uma classe de glicoproteínas de *T. cruzi* ancoradas na membrana plasmática do parasita pelos GPIs. As transialidases são diferentes de acordo com a forma em que o parasita se encontra em seu ciclo de vida. Em epimastigotas as transialidases não estão ancoradas na membrana plasmática pelos GPIs, a sialilação pode alterar a interação do parasita com receptores do inseto vetor provocando adesão e não adesão no intestino do inseto (RUBIN; SCHENKMAN, 2012 apud ALVES *et al.*, 2007), além de proteger o parasita de enzimas glicolíticas encontradas no sistema digestivo do inseto vetor (RUBIN; SCHENKMAN, 2012 apud GARCIA; AZAMBUJA, 1991).

Em metacíclicos e tripomastigotas sanguíneos as TS apresentam uma região amino-terminal onde é catalisada a reação de sialilação e a outra região é a carboxi-terminal que possui um domínio com 12 aminoácidos repetidos em tandem denominada de SAPA (Shed acute phase antigen-antígeno secretado da fase aguda) (NARDY *et al.*, 2016 apud POLLEVICK *et al.*, 1991). Algumas TS apresentam a região catalítica inativada por uma mutação que troca os resíduos de tirosina por histidina. Apesar de algumas TS serem inativas elas ainda podem se ligar em resíduos de ácido siálico e β -galactose e sendo conseqüentemente envolvidas na adesão e invasão celular. (NARDY *et al.*, 2016 apud

CREMONA *et al.*,1995).

A GP72 é uma glicoproteína localizada na zona de adesão flagelar do *T. cruzi*. A presença desta molécula é relatada nas fases de epimastigota, tripomastigota metacíclico e amastigota (COOPER; JESUS; CROSS, 1993; JESUS *et al.*, 1993; HAYNES; RUSSEL; CROSS, 1996; JESUS *et al.*, 1993). O nocaute do gene codificador da GP72 gerou parasitas com defeitos na adesão flagelar e alteração morfológica como encurtamento da extremidade anterior do parasita (fig.1.3 e 1.4), apesar deste fenótipo marcante, as formas epimastigotas dos mutantes apresentaram crescimento em meio LIT a níveis semelhantes ao parasita selvagem, além de não ter sido observada diferença significativa na diferenciação *in vitro* (COOPER; JESUS; CROSS, 1993). Porém observou-se que a sobrevivência e a virulência dos parasitas nocautes de GP72 é afetada nos ensaios *in vivo* com inseto vetor e camundongos (BASOMBRÍO *et al.*, 2002; JESUS *et al.*, 1993).

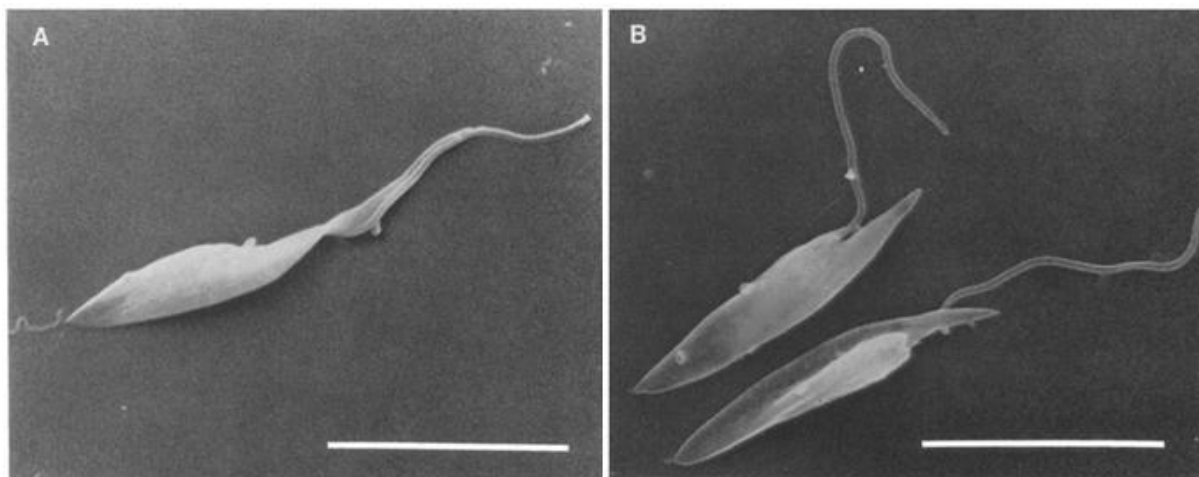


Figura 1.3: Efeitos do nocaute da GP72 em *T. cruzi* observados em microscópio eletrônico de varredura: (A) epimastigota selvagem e (B) parasitas nocaute de GP72. Escala da barra: 10 μm
Fonte: Adaptado de Cooper, Jesus & Cross, (1993).

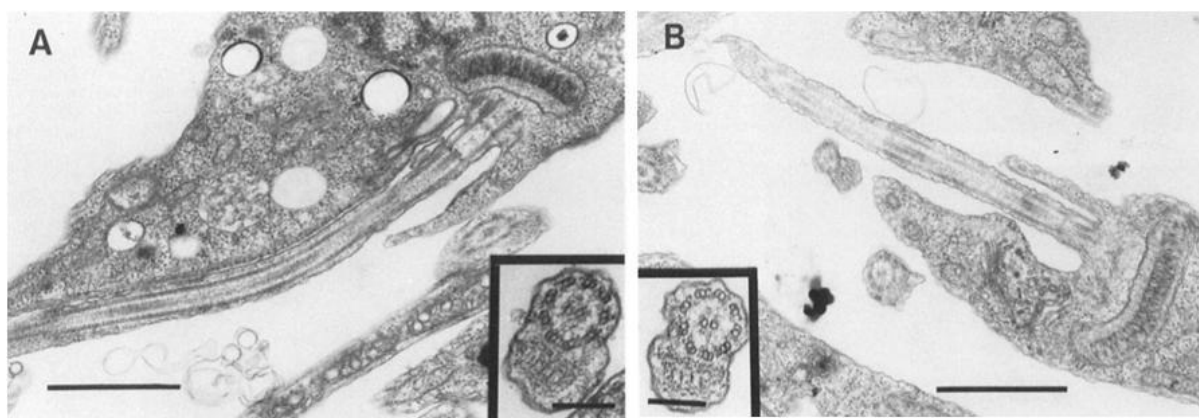


Figura 1.4: Efeitos do nocaute da GP72 em *T. cruzi* observados em microscópio eletrônico de transmissão: (A) epimastigotas selvagens e no inserto uma imagem de um axonema. (B) imagem do flagelo de epimastigota nocaute de GP72, nota-se no inserto o axonema do mutante. Escala da barra maior: 1 μm . Escala da barra menor: 0,1 μm .
Fonte: Adaptado de Cooper, Jesus & Cross, (1993).

Estudos sobre a composição de GP72 mostram uma alta quantidade de monossacarídeos com aproximadamente 49% de sua massa molecular e a presença de um domínio rico em prolina e treonina (PTVTPTPPLTPTPTPEVTPTPTVTPTPTPEVTPTPPVTPSPTITI), com 17 sítios de treonina e 1 de serina. A presença de serina e treonina na composição da glicoproteína indica a existência de carboidratos O-ligantes e fosfoglicosilação (SNAR, 1983; JESUS *et al.*, 1993; ALLEN *et al.*, 2013).

A porção glicana da glicoproteína é composta por seis diferentes tipos de açúcares, dentre os quais xilose é um dos seus constituintes (fig.1.5) (ALLEN *et al.*, 2013). A função específica dessa estrutura ainda não foi elucidada, porém foi observada uma inibição na diferenciação do parasita epimastigota em tripomastigota metacíclico pela presença do anticorpo mAbWIC29.26, que reconhece a porção glicana de GP72, levantando a possibilidade de que uma interação análoga pode ocorrer entre GP72 presente nos epimastigotas e em lectinas do trato digestivo do vetor (SHER; SNARY, 1982).

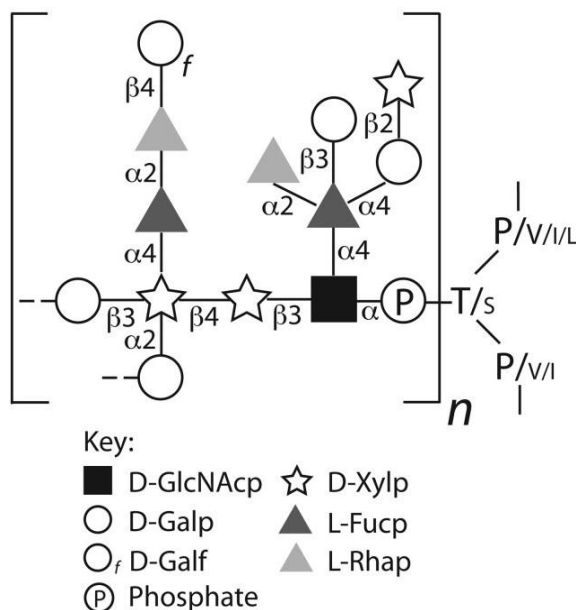


Figura 1.5: Estrutura proposta da porção glicana encontrada na glicoproteína GP72 em *T. cruzi* no estágio de epimastigotas: Nota-se a presença de xilose representada na figura por um símbolo em forma de estrela, como um dos carboidratos que compõe a porção glicana.

Fonte: Adaptado de Allen. *et al.*, (2013).

1.3 SÍNTESE DE GLICOCONJUGADOS E NUCLEOTÍDEOS–AÇÚCARES

A síntese de glicoconjugados é realizada por diversas etapas de adição de mono e oligossacarídeos em proteínas e/ou lipídeos no lúmen do retículo endoplasmático (RE) e complexo de Golgi. Para a formação de ligações glicosídicas com moléculas receptoras na

síntese de glicoconjugados, primeiramente é necessário que esses açúcares estejam ativados pela ligação com nucleotídeos mono ou difosfatados (UDP, GDP e AMP) (VARKI, 2008). A ligação de um açúcar com um nucleotídeo forma moléculas denominadas de nucleotídeos-açúcares (fig.1.6) (VARKI, 2008).

Os nucleotídeos-açúcares conhecidos na natureza são UDP-glicose (UDP-Glc), UDP-galactose (UDP-Gal), UDP-N-acetilglicosamina (UDP-GlcNac), UDP-N-acetilgalactosamina (UDP-GalNac), UDP-ácido glucurônico (UDP-GlcA), UDP-xilose (UDP-Xil), GDP-manose (GDP-Man), GDP-fucose (GDP-Fuc), UDP-ramnose (UDP-Ram) e CMP-siálico (CMP-Sia) (HANDFORD, FURLÁN & ORELLANA, 2006; VARKI, 2008).

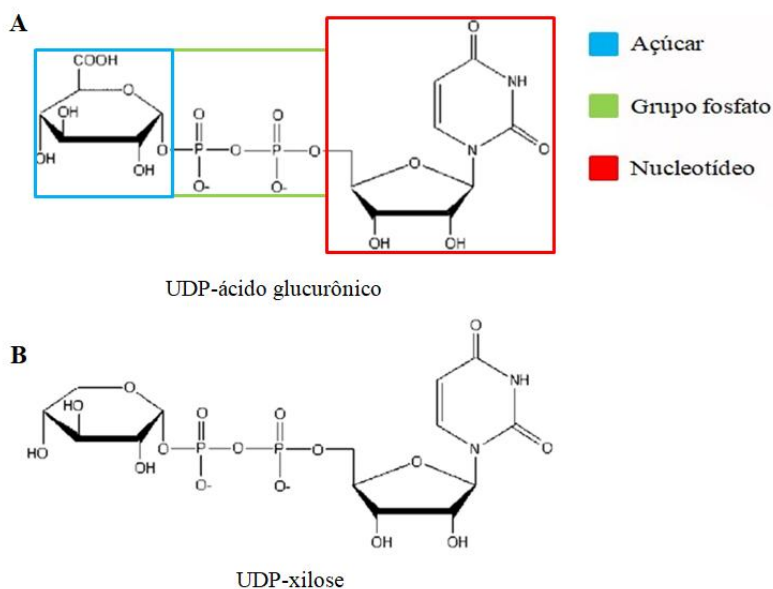


Figura 1.6: Estrutura de dois nucleotídeos açúcares: (A) UDP-ácido glucurônico e (B) UDP-xilose, encontrados em *T. cruzi*.

Fonte: Adaptado de Caffaro, C. E & Hirschberg, C. B, (2006).

Devido ao peso molecular de 500-600 Da e a carga negativa do grupo fosfato, a difusão dos nucleotídeos-açúcares pela membrana do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi se torna inviável (ORELLANA *et al.*, 2016). O transporte dos nucleotídeos-açúcares para o interior do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi é realizada por moléculas transmembranares denominadas de transportadores de nucleotídeos-açúcares (NTS). A entrada dos nucleotídeos-açúcares funciona por meio do mecanismo de transporte do tipo antiporte, o nucleotídeo-açúcar entra por meio da energia fornecida pela saída de uma molécula de um nucleosídeo monofosfatado quando a concentração deste no interior da organela for maior que no citoplasma da célula. Após a entrada do nucleotídeo açúcar para dentro da organela glicosiltransferases (GT) catalisam a reação de transferência do açúcar

ligado ao nucleotídeo para a molécula receptora. O nucleotídeo liberado é então hidrolisado e transformado no respectivo nucleotídeo-monofosfatado, sendo transportado para fora da organela pelos NTS (HANDFORD; FURLÁN; ORELLANA, 2006). A síntese de glicoconjugados descrita neste parágrafo está ilustrada na figura 1.7.

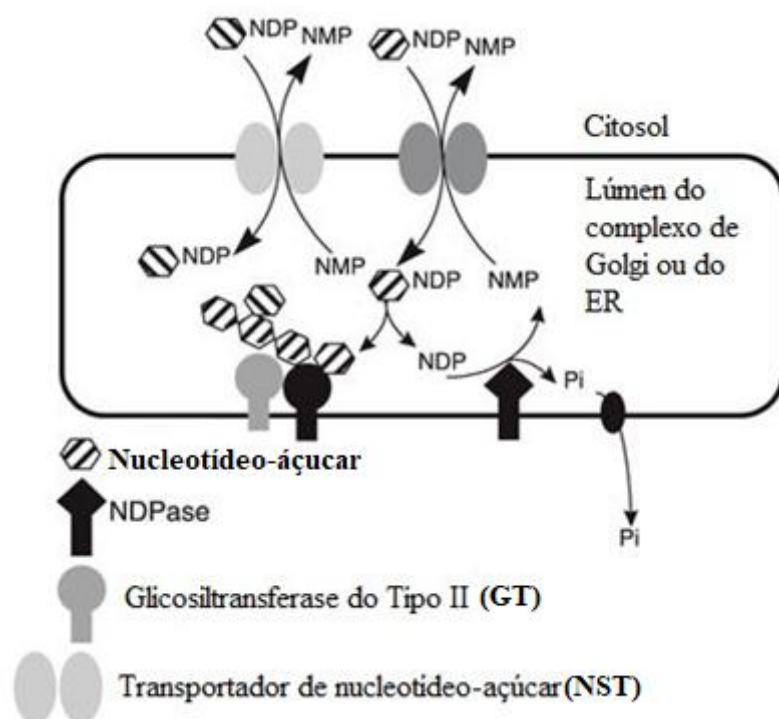


Figura 1.7: Ilustração da síntese de glicoconjugados: Os nucleotídeos-açúcares (NDP-nucleosídeo difosfatados representados pelos hexágonos) são transportados do citosol para o lúmen do ER ou do complexo de Golgi pelos transportadores de nucleotídeos-açúcares (NTS). A transferência dos açúcares ligados aos nucleotídeos para a molécula receptora é catalisada pela enzima glicosiltransferase (GT). O nucleotídeo é hidrolisado no lúmen da organela por uma NDPase e exportado para fora servindo de energia para a entrada de um novo nucleotídeo-açúcar por transporte tipo antiporte.

Fonte: Adaptado de Handford, M; Furlán, R. C & ORELLANA, A, (2006).

A formação de nucleotídeos-açúcares ocorre de duas formas, pela transferência de um nucleotídeo para um açúcar fosforilado catalisado por uma nucleotíditransferase (fig.1.8A) e por meio da interconversão de um nucleotídeo-açúcar em outro (fig.1.8B) (VARKI *et al.*, 2008). Nos tripanossomatídeos estes compostos são sintetizados em organelas formadas por uma única bicamada lipídica e sem material genético denominadas de glicossomos, em outros organismos a síntese ocorre no citosol. (TURNOCK; ISQUIERDO; FERGUNSON, 2006; STOKES *et al.*, 2008; MARIÑO *et al.*, 2010).

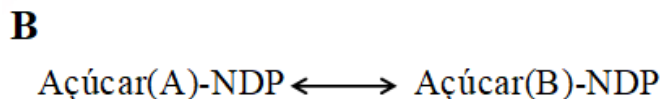
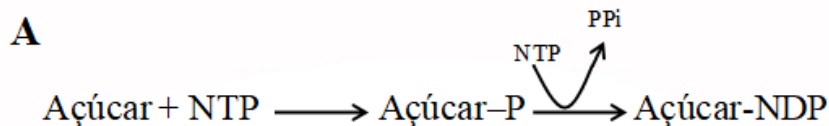


Figura 1.8: Reações de síntese de nucleotídeos-açúcares: (A): Reação de síntese a partir de um açúcar fosforilado. (B): Reação de síntese por meio de outro nucleotídeo-açúcar previamente formado. NTP: nucleotídeo trifosfatado; NDP:nucleotídeo difosfatado.

Fonte: Adaptado de Varki, A., *et al* (2008).

Existem duas vias para síntese de nucleotídeos-açúcares, a via *de novo* e a via de salvamento ou *salvage* (VARKI, *et al.*, 2008). A *via de novo* consiste em reações de interconversões (fig. 1.8B) para a produção de novos nucleotídeos-açúcar. A *via salvage* é uma via alternativa para a biossíntese de nucleotídeos-açúcares. Nesta via a célula sintetiza os nucleotídeos-açúcares a partir de carboidratos obtidos por meio da reciclagem de glicoconjugados ou por captação externa, os carboidratos então são fosforilados no C-1 por uma quinase e ligados a um nucleotídeo pela ação de uma nucleotidiltransferase (fig. 1.8A) (VARKI, *et al.*, 2008). A *via salvage* foi descrita em *Trypanosoma brucei* para a síntese de GDP-manose e em UDP-galactose para *Leishmania. Major* (DAMEROW *et al.*, 2015; KUETTEL *et al.*, 2012). A *via de salvage* para GDP-manose pode desempenhar um papel importante no crescimento e recuperação de *T. brucei*, ou como no caso de UDP-galactose em *L. major*, apenas para contribuir para a síntese de glicoconjugados mas não sendo essencial para a síntese destes no crescimento das promastigotas de *L. major*. (DAMEROW *et al.*, 2015; KUETTEL *et al.*, 2012).

1.4 O GLICOSSOMO E AS PRINCIPAIS VIAS DE SÍNTESE DE NUCLEOTÍDEOS-AÇÚCARES EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

No glicossomo é relatada a presença das enzimas relacionadas à via glicolítica e das vias de síntese nucleotídeos-açúcares como UDP-Glc e UDP-GlcNAc (OPPERDOES; BORST, 1997; STOKES *et al.*, 2008; MARIÑO *et al.*, 2010).

Um resumo das vias de biossíntese de nucleotídeos-açúcares no glicossomo de tripanossomatídeos está representado na figura 1.9. A seguir, uma breve revisão do papel dos principais nucleotídeos-açúcares nestes parasitas.

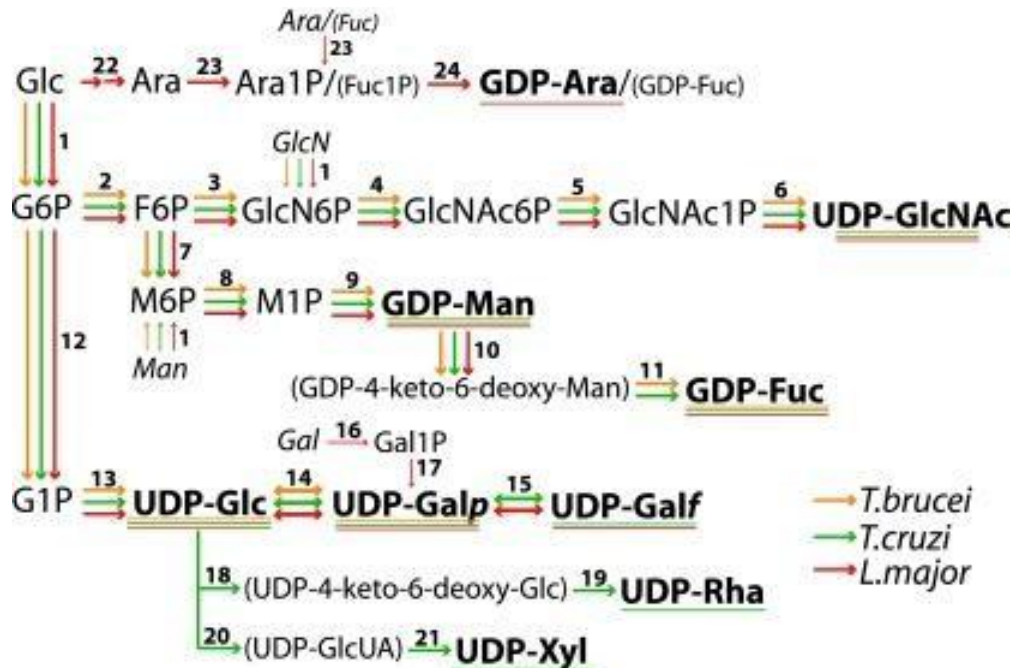


Figura 1.9: Resumo das vias de biossíntese de nucleotídeos açúcares no glicosossomo dos tripanossomatídeos *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. major*. As enzimas que participam das vias são: 1- Hexoquinase; 2- Glicose-6-fosfato isomerase; 3- Glicosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase; 4-Glicosamina-fosfato N-acetiltransferase; 5- Fosfoacetilglucosamina mutase; 6-UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase; 7- Fosfomanose isomerase; 8- fosfomanomutase; 9-Manose-1-fosfato-guaniltransferase (manose pirofosforilase); 10- GDP-manose 4,6-desidratase; 11- GDP-L-fucose sintetase; 12-Fosfoglucomutase; 13-UTP glucose-1-fosfato uridiltransferase; 14-UDP-galactose 4-epimerase; 15-UDP-galactopiranosose mutase; 16- Galactoquinase; 17- UTP hexose-1-fosfato uridiltransferase ou UDP-glucose hexose-1-fosfato uridiltransferase; 18- UDP-glicose-4,6-desidratase; 19- UDP-4-queto-6-deoxiglicose redutase; 20-UDP-glicose-6-dehidrogenase; 21-UDP-glicuronato descarboxilase; 22- Via desconhecida; 23- Fucose (arabinose) quinase; 24- Arabinose-1-fosfato guaniltransferase.
 Fonte: Turnock, C. D & Ferguson, M. A. J, (2007).

UDP-Glc: Esse nucleotídeo-açúcar é precursor na biossíntese de outros nucleotídeos-açúcares como UDP-Xil, UDP-Galp, UDP-Galf e UDP-Ram, além de ser importante no controle de qualidade da glicosilação de proteínas que saem do retículo endoplasmático pois resíduos de glicose são utilizadas no reconhecimento de proteínas imaturas que precisam ser dobradas de forma apropriada pelas enzimas calnexinas (CNX) e calreticulinas (CRT) antes de serem transportadas para o Golgi (VARKI *et al.*, 2008). UDP-Glc é encontrado em grande concentração em *T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania major*, com valores entre 110 a 540 μM , possivelmente devido a abundância de Glc-1-P e Uridil trifosfato (UTP) (TURNOCK; FERGUSON, 2007).

UDP-Gal: Este nucleotídeo açúcar é sintetizado a partir de UDP-Glc pela enzima UDP-glicose 4-epimerase ou UDP-galactose 4-epimerase e desempenha um importante papel para a sobrevivência de *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania spp.* A síntese de UDP-Gal é essencial pois os nocautes dos genes *TcGALE* e *TbGALE* geram parasitas inviáveis, sendo o estudo em *T. brucei* possível pelo uso de uma cópia ectópica induzida por tetraciclina, e o

estudo em *T. cruzi* feito mediante análises dos mutantes simples nocaute (MACRAE *et al.*, 2006; URBANIAK *et al.*, 2006). O nocaute de *TcGALE* em *T. cruzi* e *TbGALE* em *T. brucei* gera alterações morfológicas aberrantes e lise celular nos parasitas com a cópia ectópica após 96 horas sem sintetizar galactose, e alteração na estrutura das mucinas em *T. cruzi* simples nocaute (MACRAE *et al.*, 2006; URBANIAK *et al.*, 2006).

Diferente de *T. brucei* e *T. cruzi* o nocaute da enzima UDP-Glicose-4-epimerase em *L. major*, mostrou não ser essencial para o parasita, fora a redução de biossíntese de lipofosfoglicano (LPG), o nocaute não induziu mudanças no crescimento celular como observado em *T. brucei* e em *T. cruzi* (LAMERZ *et al.*, 2010). Apesar da enzima LmUGP ocupar uma posição central no metabolismo de galactose, a sobrevivência dos parasitas mutantes é atribuída a capacidade de *L. major* de captar galactose do meio diferente de *T. brucei* e *T. cruzi* (LAMERZ *et al.*, 2010). A aquisição de galactose pelo parasita leva a conversão em galactose-1-P e depois em UDP-Gal por uma pirofosforilase (USP) suprimindo a necessidade deste açúcar no parasita (LAMERZ *et al.*, 2010).

GDP-Man: GDP-Man é importante para síntese de glicoconjugados, pois manose está presente nas âncoras de GPI dos três tripanossomatídeos, em LPGs de *Leishmania spp* e em NETNES, de *T. cruzi* (STEWART *et al.*, 2005). O nocaute do gene *LmGDP-MP* que codifica a enzima GDP-manose pirofosforilase responsável pela conversão de manose-1-P em GDP-Man mostrou que os mutantes nulos apresentaram maior sensibilidade ao sistema complemento, com a morte de 80% de parasitas promastigotas em comparação com os parasitas selvagens que foi de 40%, além da redução na invasão dos parasitas e incapacidade de sobreviver no fagolisossomo de macrófagos (STEWART *et al.*, 2005).

Em *T. brucei* a redução em 20% de transcritos por RNAi para GDP-manose pirofosforilase envolvida na biossíntese de GDP-Man foi suficiente para afetar o crescimento e a sobrevivência das formas sanguíneas, além da redução de 40% na formação de glicolípideos A e C, precursores na síntese de GPIs. (DENTON; FYFFE; SMITH, 2010). Além destes genes, o nocaute do gene *TbPMI* em *T. brucei*, que codifica a enzima fosfomanose isomerase que converte frutose-6-P em manose-6-P mostrou ser essencial, devido a redução do crescimento e morte celular das formas sanguíneas após 3 dias de cultivo (KUTTEL *et al.*, 2012).

GDP-Fuc: A biossíntese de GDP-Fuc é essencial para o crescimento e sobrevivência das formas procíclicas e sanguíneas de *T. brucei*. Foi demonstrado que o nocaute do gene *TbGMD*, que codifica a enzima GDP-manose desidratase (ou GDP-manose 4,6-desidratase),

envolvida na etapa de conversão de GDP-Man em GDP-4-queto-6-desoxi-manose, précursores de GDP-Fuc, gerou parasitas da forma sanguínea incapazes de se proliferar após 4 dias de cultivo e subsequente morte celular dos mutantes nulos. Foi observado também que para as formas procíclicas, o nocaute gerou parasitas com o flagelo desaderecido, mostrando o envolvimento deste nucleotídeo-açúcar para a composição da glicoproteína FLA-1, envolvida com a adesão flagelar em *T. brucei*. (TURNOCK; ISQUIERDO; FERGUNSON, 2006).

UDP-GlcNAc: Em *L. major*, o nucleotídeo-açúcar UDP-GlcNAc desempenha importante papel na síntese de GlcN-Pi e GlcNAc2-pp-dolicol, que são intermediários na síntese de GPIs e oligossacarídeos ligados a dolicol. Parasitas mutantes para a enzima glutamina-frutose-6-fosfato (GFAT), responsável pela síntese de glucosamina-6-fosfato, componente na primeira etapa na síntese de UDP-GlcNAc, apresentaram diminuição nos níveis de GlcNAc2-pp-dolicol, Man1GlcNPI, GPI, Gp63 e LPG, além da incapacidade de proliferação em macrófagos após a internalização das formas promastigotas (NADERER; WEE; MCCONVILLE, 2008).

Em *T. brucei* o nocaute do gene que codifica a enzima UDP-N-acetilglicosamina pirofosforilase, envolvida na etapa de conversão de N-acetilglicosamina-1P em UDP-GlcNAc, mostrou ser essencial para o parasita. Além da virulência dos parasitas ter sido afetada a ponto de não ser detectado o sinal de infecção em camundongos, foi observada também lise celular após 5 dias de cultivo (STOKES; MATTHEW *et al.*, 2008). GlcNAc está presente nas mucinas e em N-glicanos de *T. cruzi*, mas não há estudos funcionais deste açúcar no parasita (TURNOCK; FERGUSON, 2007).

1.5 A VIA *DE NOVO* E *SALVAGE* PARA A SÍNTESE DE UDP-XIL EM *T. cruzi*

Os monossacarídeos glicose (Glc), N-acetilglicosamina (GlcNAc), glicosamina (GlcN), galactopiranosose (Galp) e manose (Man), são encontrados nos glicoconjugados dos três tripanossomatídeos de importância médica (*T. brucei*, *T. cruzi* e *Leishmania spp*) (TURNOCK & FERGUSON, 2007). Porém entre esses tripanossomatídeos, apenas em *T. cruzi* foi constatada a presença de xilose e de genes possivelmente envolvidos na codificação das enzimas UDP-glicose desidrogenase (UGD) (EC:1.1.22) e UDP-ácido glucorônico descarboxilase (UXS) (EC:4.1.1.35) envolvidas na biossíntese de UDP-Xil. Esses genes também encontrados em tripanossomatídeos próximos evolutivamente de *T. cruzi*, como *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma grayi* (TURNOCK & FERGUSON, 2007).

A via *de novo* para a biossíntese de UDP-Xil conhecida em eucariotos, ocorre em duas

etapas, inicialmente a UDP-Glc sofre uma reação de desidrogenação que leva à síntese de UDP-ácido glucurônico (UDP-GlcA) pela ação da enzima UGD; em seguida, a enzima UXS, descarboxiliza o carboidrato do nucleotídeo UDP-GlcA, liberando uma molécula de CO₂ e formando UDP-Xil (TURNOCK & FERGUSON, 2007; VARKI *et al.*, 2008).

A enzima UGD envolvida na primeira etapa de síntese de UDP-xilose apresenta um domínio NH-terminal envolvido na ligação com NAD⁺ pelo motivo GxGxxG conhecido como dobra de Rossmann, e um domínio C-terminal, envolvido na ligação com o nucleotídeo UDP, do nucleotídeo açúcar UDP-Glc. Existem duas classes de UGD, que são UGDH-I, presente em procariotos, sendo caracterizada pelo número de aminoácidos que vão de 380 a 460, e por uma sequência peptídica interna conservada AEXXK(Y/L)(F/A)XNX(F/Y)LAX(K/R)(I/V)(S/A)(F/Y)(I/F)N(E/D), onde X representa qualquer aminoácido e os aminoácidos contidos em parênteses representam mais de um tipo de aminoácidos na mesma posição (EGGER *et al.*, 2010). O grupo UGDH-II é ligeiramente maior com enzimas contendo de 480 a 500 aminoácidos, e uma sequência peptídica interna conservada, diferente da observada no grupo UGDH-I, sendo a sequência descrita da seguinte forma, WS(S/A)ELSKLXANA(F/M)LAQRIS(I/V)N(S/A)XSA(I/L/V)CEATGA. O grupo UGDH-II é encontrado nos eucariotos superiores e inferiores (EGGER *et al.*, 2010). A enzima UXS, envolvida na segunda etapa de síntese de UDP-xilose, foi descrita em plantas, estando envolvida na síntese de xilose presente em grande abundância na hemicelulose dos vegetais, na síntese de UDP-GlcA e UDP-Xil para a formação da cápsula de glucuronoxilomanana (GXM) em *Cryptococcus neoformans* e na formação de lipoglicanos em *Trichomonas vaginalis*. A enzima possui dois domínios, um domínio amino-terminal que se liga ao NAD⁺ e o segundo domínio carboxi-terminal que se liga ao nucleotídeo UDP do nucleotídeo-açúcar UDP-GlcA, no domínio ligado ao NAD⁺ é encontrado o motivo GXGXXG, sequência consenso presente na dobra de Rossmann (EIXELBERGER *et al.*, 2012; BAR, GRIFFITH & DOERING, 2001; ANDREA *et al.*, 2012).

Em *T. cruzi* existe uma possível via de salvamento para a biossíntese de UDP-Gal, UDP-Glc, UDP-Xil e UDP-GlcA, formados pela ação de uma nucleotíditransferase denominada de Tcsloppy. Apesar da biossíntese de UDP-Gal pela conversão de galactose-1-P em UDP-Gal, a enzima Tcsloppy parece não suprir a demanda de UDP-Gal no parasita, visto que o nocaute do gene *TcGALE* é essencial (MACRAE *et al.*, 2006). A enzima Tcsloppy *in vitro* consegue converter xilose-1-fosfato e ácido glucurônico-1-fosfato em UDP-Xil e UDP-GlcA respectivamente. Com isso há possibilidade dessa via alternativa reciclar xilose e ácido

glucurônico de glicoproteínas degradadas ou pela captação externa desses açúcares, sendo estes fosforilados por uma quinase específica e convertidos em nucleotídeos-açúcares pela enzima Tcsloppy (YANG & PELED, 2010).

Uma esquema das vias *de novo* e *salvage* para a síntese de xilose em *T. cruzi* está representada na figura 1.10.

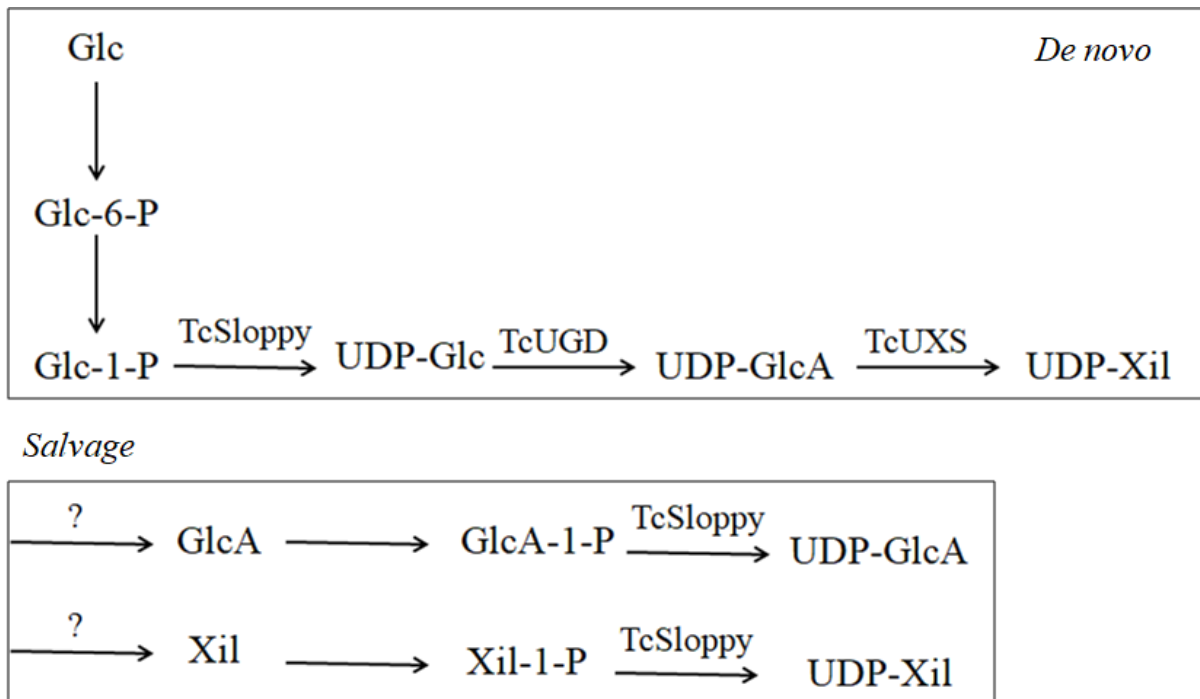


Figura 1.10: Esquemática das vias *de novo* e *salvage* na biossíntese de UDP-Xil em *T. cruzi*.
 Fonte: Adaptado de Yang, T & Pelet, B, (2010).

Como foi visto os nucleotídeos-açúcares são componentes essenciais na biossíntese de glicoconjugados e importantes para o crescimento e sobrevivência dos tripanossomatídeos de importância médica, fazendo com que as vias de biossíntese destas moléculas sejam potenciais alvos terapêuticos. Porém nem todos os genes relacionados às vias de síntese de nucleotídeos-açúcares foram caracterizados em *T. cruzi*. Xilose e ramnose são açúcares exclusivos de *T. cruzi*, dentre os três tripanossomatídeos discutidos neste trabalho, e pouco abundantes. Com exceção de GP72, desconhece-se a presença de outros glicoconjugados em *T. cruzi* que possuam em suas composições estes açúcares. Neste trabalho, iniciamos um estudo de caracterização das enzimas TcUGD e TcUXS, a fim de elucidar o seu papel na síntese de UDP-Xil, uma vez que há teoricamente uma outra via de síntese deste nucleotídeo-açúcar, e a importância de xilose, na biologia do parasita.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este trabalho tem como objetivo caracterizar funcionalmente os genes *TcUGD* e *TcUXS* de *Trypanosoma cruzi*, e avaliar a importância dos mesmos no ciclo de vida do parasita.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Definir a localização subcelular de *TcUGD* e *TcUXS* por microscopia de fluorescência;
- Obter mutantes nulos dos genes *TcUGD* e *TcUXS*;
- Analisar mutantes em relação à sua taxa de crescimento e diferenciação;
- Analisar perfil de glicosilação da proteína GP72 nos mutantes por *western blotting*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

- Azul de coomassie - 0,1% azul de coomassie R-250, 45% metanol, 10% ácido acético;
- Fenol - clorofórmio - álcool isoamílico: Fenol saturado 25 partes, clorofórmio 24 partes, álcool isoamílico 1 parte, Tris-HCl 100 mM pH 8,0 10 partes;
- Tampão TBE: Tris-base 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM;
- Tampão de SDS-PAGE: Tris-base 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0,1%;
- Tampão TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1Mm;
- Tampão TELT: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 9,0, LiCl 2,5M e 4% Triton X100;
- Tampão de amostra 4X para SDS-PAGE: Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS1%, glicerol 6%, azul de bromofenol 0,005% e β -Mercaptoetanol 2,5%;
- Tampão de Western Blot: glicina 39 mM, SDS 0,037%, Tris base 48mM e metanol 20%;
- Solução Ponceau S: Ponceau S 0,1%, ácido acético 5%;
- Solução PBS/Tween 0,1% – Tampão PBS 1X; Tween 20 0,1%;
- Solução de bloqueio para Western blot – Tampão PBS 1X; Tween 20 0,1%; Leite em pó desnatado 5%;
- Solução de brometo de etídio – Brometo de etídio 0,5 μ g/ml em água destilada;
- Tampão de eletroporação: KCl 5 mM, CaCl₂ 0,15 mM, Na₂HPO₄ 90mM, HEPES 50 mM pH 7,3;
- Tampão de bloqueio - PBS, 0,1% Tween 20 e 5% leite em pó desnatado;
- PBS 10x – NaCl 0,137 M; KCl 2,7 mM; Na₂HPO₄7H₂O 4,3 mM; KH₂PO₄ 1,5 mM;
- Tampão TBE 1X – Tris-base 89 mM; Ácido bórico 89 mM; EDTA 2 mM pH 8,0;
- Tampão TELT - Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 62,5 mM pH 8,0, LiCl 2,5M, 4% Triton X-100;
- Solução de estocagem de células cálcio competentes – 100 mM CaCl₂; 10mM; Hepes pH 7,0, glicerol 10%

3.2 MICROORGANISMOS

Escherichia coli TOP 10 químico competentes (F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ 80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74recA1araD139* Δ (*araleu*)7697*galUgalK*rpsL (StrR)*endA1nupG*):

células cultivadas em meio LB a 37 °C por 18 horas.

Roseta Gami 2 (DE3) ($\Delta(ara-leu)7697 \Delta lacX74 \Delta phoA PvuII phoR araD139 ahpC galE galK rpsL$ (DE3) F'[lac⁺ lacI^q pro] gor522::Tn10 trxB pRARE2 (Cam^R, Str^R, Tet^R): células cultivadas em meio LB a 37 °C por 18 horas.

Trypanosoma cruzi Dm28c: células cultivadas em meio LIT a temperatura de 28 °C.

3.3 MEIOS DE CULTURA

3.3.1 Meio LB (Luria-Bertani)

Bacto-triptona.....	10,0g/mL
NaCl.....	10,00g/mL
Extrato de levedura.....	5,00g/mL

(LB-ágar: adição de 1,5% de ágar-ágar)

3.3.2 Meio LIT (Liver infusion Tryptose)

Infusão de fígado.....	5,0 g/L
NaCl.....	4,4 g/L
KCl.....	0,4 g/L
Glicose.....	2,2 g/L
Triptose.....	5,0 g/L
Fosfato dibásico de sódio.....	11,56 g/L
Extrato de levedura.....	15,0 g/L
Hemina.....	0,02 g/L
Soro fetal bovino.....	10%
Penicilina.....	10000 U

3.3.3 Meio TAU (Triatomine Artificial Urine)

NaCl.....	190,0 mM
CaCl ₂	2,0 mM
KCl.....	17,0 mM
MgCl ₂	2,0 mM
Tampão fosfato pH 6,0.....	8,0 mM

3.3.4 Meio TAU 3AAG pH 6,0 Meio Tau suplementado com:

Glicose.....	10,0 mM
Ácido L-aspártico	2,0 mM
Ácido L-glutâmico	50,0 mM
L-Prolina.....	10,0 mM

3.4 PREPARO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

Neste trabalho foram utilizadas as cepas de *E.coli* TOP10 (Invitrogen) e Rosetta Gami 2 (DE3) (Novagem). Para o preparo das células quimiocompetentes, primeiramente as células presentes no estoque de glicerol foram semeadas em placa LB-Agar, contendo os antibióticos apropriados. Em seguida as placas foram incubadas por 16h a 37 °C. Após o cultivo em placa, foi retirada uma colônia bacteriana para cultivo em 5 mL de meio LB (pré-inóculo) incubando sob agitação a 200 rpm por 16 h a 37 °C. Após o crescimento do pré-inóculo, 2 mL foram inoculados em 200 mL de meio LB, suplementado com os antibióticos apropriados. A cultura foi incubada a 37 °C em agitação até atingir a DO_{600nm} de 0,6. Em seguida a cultura foi centrifugada a 4000 x g a 4 °C por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 50 mL da solução de CaCl₂ 100 mM/Hepes 10 mM pH 7, sendo incubadas logo em seguida em gelo por 30 minutos. Para a etapa seguinte foi feita uma nova centrifugação nas mesmas condições. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 3,7 mL da solução de CaCl₂, 100mM/ Hepes 10mM pH 7 + glicerol 10% v/v (tudo estéril). Foram aliqüotadas 100 µL da suspensão de células em microtubos previamente resfriados, incubando as aliqüotas imediatamente em gelo. Por fim as células foram armazenadas a -70°C.

3.5 TRANSFORMAÇÃO DE CÉLULAS QUIMIOCOMPETENTES

As cepas de TOP10 foram utilizadas para a obtenção de plasmídeos contendo o material de interesse e também para a expansão de plasmídeos purificados. Para a transformação das cepas de *E.coli*, inicialmente foi feita a adição de 1 a 100 ng de DNA plasmidial em aliqüotas de 100 µL de TOP 10 sendo incubados em gelo por 30 min. Em seguida o material foi incubado a 42 °C por 2 min. Na próxima etapa foi adicionado na amostra 1 mL de meio LB sem antibiótico, sendo incubada logo em seguida a 37 °C por 60

min sob agitação de 200 rpm. Após a incubação, foram plaqueados 100 µL de amostra, em placas contendo o antibiótico específico para a seleção das bactérias com o plasmídeo de interesse. Por último as placas contendo as bactérias foram incubadas por 16 h a 37 °C.

3.6 PCR DE COLÔNIA

Após a transformação e crescimento das colônias, foram feitas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), para investigar a presença de clones recombinantes. As reações de PCR foram feitas com colônias de bactérias isoladas, misturadas em mistura de PCR Kit NAT HIV/HCV/HBV (IBMP, Instituto de Biologia Molecular do Paraná) e 10 pmol de primers específicos para cada sequência de DNA que foi clonado em volume de 20 µL. A PCR de colônia foi feita em termociclador modelo ProFlex (Thermo Fisher Scientific). O material foi submetido nas seguintes condições: desnaturação a 94 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos, e por fim uma etapa de extensão com 72°C por 10 min. Após a reação de PCR o material foi analisado em gel de agarose. O gel foi corado em brometo de etídio (0,5 µg/mL) e revelado por luz ultra violeta. O gel foi fotografado no sistema de fotodocumentação L-PIX (Loccus).

3.7 OBTENÇÃO DOS PLASMÍDEOS DOS CLONES RECOMBINANTES

Após a identificação dos clones recombinantes por PCR de colônia e gel de agarose, foi feita a recuperação do plasmídeo de interesse. O clone recombinante selecionado foi cultivado em 5 mL de meio LB a 37 °C e 200 rpm por 16 h. Após o cultivo, as bactérias foram centrifugadas por 3 min a 13000 x g e os plasmídeos foram purificados com o kit de minipreparação de plasmídeo QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.8 PURIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS DE DNA

Os produtos de PCR presentes na faixa de 50pb a 20kpb, foram purificados com o uso do kit NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL,MN), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante.

3.9 PURIFICAÇÃO DE DNA A PARTIR DO GEL DE AGAROSE

A purificação dos fragmentos de DNA (cassete para transfecção) por eletroeluição foi feita por eletroforese em gel de agarose. Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etidíó (0,5µg/mL) para revelação do material. A porção do gel contendo o material de interesse foi isolado com o uso de lâmina de bisturi e purificado com o uso do kit NucleoSpin®Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL,MN) conforme o protocolo do fabricante.

3.10 PURIFICAÇÃO DE DNA POR ELETROELUIÇÃO

A eletroeluição foi feita com tampão TBE em voltagem de 100 V por 2 h com o material dentro da membrana de diálise (Thermo Fischer Scientific). O material foi coletado e precipitado com o uso de etanol absoluto e acetato de sódio. A purificação dos fragmentos de DNA (cassete para transfecção) por eletroeluição foi feita por eletroforese em gel de agarose. Após a eletroforese o gel foi corado com brometo de etidíó (0,5µg/mL) para revelação do material. A porção do gel contendo o material de interesse foi isolado com o uso de lâmina de bisturi.

3.11 PRECIPITAÇÃO DE DNA POR ETANOL ABSOLUTO

O material a ser purificado foi misturado com acetato de sódio 3 M pH 5,0 para a concentração final de 0,3 M. A solução foi homogeneizada e misturada com 2 a 3 volumes de etanol absoluto. A amostra foi novamente homogeneizada e deixada por 16 h a -20°C. Após a precipitação do material, a amostra foi centrifugada 13000 x g por 10 min a 4 °C e o sobrenadante descartado. O *pellet* contendo o material foi lavado com etanol 70% (v/v) por centrifugação 13000 x g por 5 min a 4 °C. Após a centrifugação, o etanol 70% (v/v) foi descartado e a amostra desidratada a 42°C em termobloco.

3.12 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE *T. cruzi*

O DNA de *T. cruzi* clone Dm28c foi isolado a partir da metodologia descrita por Medina-Acosta & Cross (1993). A extração de DNA genômico de *T. cruzi* clone Dm28c foi feita com parasitas mantidos na fase exponencial (3 a 4 dias) de crescimento. Em torno de

1×10^7 células foram coletadas por centrifugação a $13000 \times g$ por 1 min. Após a coleta dos parasitas, foram adicionados 350 μL de tampão TELT. A solução foi homogeneizada gentilmente sendo incubada por aproximadamente 5 min em bancada a temperatura ambiente. Foi adicionado fenol clorofórmio a uma proporção de 1:1. A solução foi homogeneizada e centrifugada por 3 minutos a $13000 \times g$. Após a centrifugação a fase aquosa foi extraída e colocada em outro microtubo para a repetição da etapa anterior. Em seguida foram adicionados 2 volumes de etanol absoluto e a amostra acondicionada por 30 min a -20°C . Após a etapa de precipitação de DNA, a amostra foi centrifugada por 20 min a $13000 \times g$ a 4°C . O sobrenadante foi descartado sendo o material lavado com 1 mL de etanol 70% por centrifugação a 5 min por $13000 \times g$. O sobrenadante foi descartado e a amostra incubada a 42°C . Após a etapa de secagem o material foi ressuscitado em 100 μL de solução TE contendo RNase ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$).

3.13 TRANSFEÇÃO DE DNA EM *T. cruzi*

Para a obtenção dos parasitas transfectantes, foi realizada a transfecção por eletroporação, sendo utilizado o eletroporador NucleofectorTM2b (Lonza) e programa U-033 (LUGO *et al.*, 2017). A transfecção foi feita utilizando 2×10^7 células na forma epimastigota cultivadas na fase exponencial. Os parasitas foram coletados por centrifugação a $3000 \times g$ por 2 min. O sobrenadante foi descartado e os parasitas lavados 2 vezes com 1 mL de PBS estéril nas mesmas condições de centrifugação. Após o descarte do sobrenadante, os parasitas foram ressuscitados em 100 μL de tampão de eletroporação. A solução contendo os parasitas foi dispensada no centro da cubeta de eletroporação, e os parasitas submetidos à eletroporação. Após a transfecção, os parasitas foram inoculados em 5 mL de meio LIT suplementado com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de penicilina e estreptomicina.

3.14 CULTIVO DAS FORMAS EPIMASTIGOTAS

Os parasitas na forma epimastigota foram cultivados em meio LIT. A incubação foi feita em B.O.D em temperatura de 28°C , sendo feitas passagens a cada 3 dias, com inóculo de $1,0 \times 10^6$ células/mL.

3.15 METACICLOGÊNESE

O ensaio de metaciclogênese foi feito com parasitas mantidos na fase exponencial. Os parasitas foram cultivados em 15 mL de meio LIT em erlemayers de 100 mL até atingirem a concentração de 5×10^7 células/mL. Em seguida foram coletados 5×10^8 parasitas por centrifugação a $3000 \times g$ por 5 min. Os parasitas foram lavados uma vez com meio TAU e centrifugados a $3000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os parasitas ressuspensos em um mililitro de meio TAU sendo incubados posteriormente a 28°C por 2 h. Em seguida foram postos 5×10^7 parasitas em 10 mL de meio TAU3AAG em garrafas de cultivo celular de 25 cm^2 e incubados a 28°C por 72 h. Em seguida os metacíclicos foram contados em câmara de Neubauer.

3.16 PREPARO DO EXTRATO PROTEÍCO DE EPIMASTIGOTAS

No preparo do extrato proteico, foram utilizados parasitas mantidos em crescimento exponencial. Foram coletados 1×10^8 células por centrifugação a $3000 \times g$ por 5 min em tubo de 50 mL à temperatura ambiente. Após o sobrenadante ser descartado, os parasitas foram ressuspensos em 5 mL de PBS estéril e centrifugado por 5 min a $3000 \times g$. Em seguida foram retirados 4 mL de PBS e o *pellet* foi ressuspendido em 1 mL de PBS e transferido para microtubo de 1,5 mL. Os parasitas foram centrifugados por 5 min a $3000 \times g$ e o sobrenadante descartado, sendo o *pellet* ressuspendido em 225 μL de PBS estéril. Os parasitas foram ressuspensos em 75 μL de tampão de amostra e sonicados a 2 ciclos por 15 segundos e potência de 3 watts utilizando o processador ultrassônico Qsonica sonicator. Após a etapa de sonicação o extrato foi fervido a 95°C por 5 minutos e armazenado a -20°C . O extrato continha o equivalente a 1×10^6 células/ μL .

3.17 WESTERN BLOT

Os extratos proteicos de *T. cruzi* foram submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). As corridas foram feitas em corrente constante de 30 mA e os géis preparados com uma porcentagem específica de acrilamida que variava com o peso molecular das amostras a serem analisadas, sendo feitos géis entre 10% a 15%. Após a eletroforese, foi feita a transferência das proteínas em membranas de nitrocelulose (Whatman™ Protran BA 83 0.2 μm , GE Healthcare) a 25 volts por 16 h a 4°C utilizando o

tampão de *western blot*. Após a transferência a membrana foi corada com Ponceau S por 5 min para determinar a qualidade das proteínas e marcar a posição de cada extrato proteico. Em seguida a membrana foi descorada com PBS-T 0,1% e bloqueada por 1 h a temperatura ambiente sob agitação com uso da solução PBS-T leite (PBS-T com 5% de leite em pó desnatado). Após a etapa de bloqueio, a membrana foi incubada em solução PBS-T contendo anticorpos primários monoclonais comerciais contra as proteínas de interesse etiquetadas com HA (hemaglutinina) na região amino-terminal ou carboxi-terminal, por 1h sob agitação de 80 rpm a temperatura ambiente. Após a primeira etapa, as membranas foram lavadas com PBS-T. Após a lavagem foram incubadas com anticorpos secundários comerciais anti-IgG de camundongo e coelho conjugados com a enzima peroxidase (Thermo Fisher Scientific) na diluição de 1:10.000 e 1:6000 respectivamente em PBS-T leite durante 1 h a temperatura ambiente. As membranas foram lavadas em PBS-T e reveladas com kit de quimioluminescência Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate* (Thermo Fisher Scientific) no sistema L-Pix CHEMI EXPRESS (Loccus).

3.18 OBTENÇÃO DAS PROTEÍNAS TcUGD E TcUXS RECOMBINATES

3.18.1 Clonagem dos genes *TcUGD* e *TcUXS* nos vetores de expressão em bactérias e *T. Cruzi*

Primeiramente, os genes *TcUGD* e *TcUXS* foram amplificados por meio de reação de PCR a partir do DNA genômico do clone Dm28c, utilizando a enzima *Platinum™Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen) e *primers* com sequências attB (tabela 3.1). Os *primers* reversos não possuem códons de parada, isso permitindo que as regiões codantes dos genes ficassem na mesma fase de leitura da etiqueta carboxi-terminal que é a etiqueta 3xHA. As reações de PCR foram feitas nas seguintes condições: 10 pmol de cada *primer*, 100 ng de DNA de *T. cruzi*, tampão 2X *Pfx*, 1,5 a 2 mM de MgSO₄, 100 µM de dNTPs e 0,4 µL de *Platinum™Pfx DNA Polymerase* (Invitrogen), volume final de 20 µL. Foi utilizado o termociclador modelo ProFlex (Thermo Fischer Scientific) com desnaturação a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30s, a hibridização dos primers ocorreu a 55°C e 60°C por 30 s, e a temperatura de extensão foi de 68°C por 1 a 2 min e extensão final de 68°C por 10 min. Os produtos amplificados foram purificados por meio do kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL,MN), seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante. Os genes foram inseridos no vetor de entrada pDONR™ 221 da plataforma Gateway (invitrogen) por

meio de reação de recombinação usando a enzima BP clonase II (Invitrogen). Após a confirmação e recuperação dos clones positivos com os genes recombinados em pDONRTM 221, foi realizada a transferência dos insertos para os vetores destinos por reação de recombinação catalisada pela enzima LR Clonase II (Invitrogen), seguindo as instruções do fabricante. Na figura 3.1 são apresentados os vetores destinos denominados de pTc-3xHA.NH.UGD (fig.3.1A), pTc-3xHA-NH.UXS (fig.3.1B), pTc-3xHA-CO.UGD (fig.3.1C) e pTc-3xHA-CO.UXS (fig.3.1D).

Tabela 3.1: Lista de *primers* utilizados para a amplificação dos genes *TcUGD* e *TcUXS* com os sítios attB. Em verde é representado as sequências attB nos *primers*, em vermelho é representado o gene.

Nome	Sequência (5'-3')
715_90F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCTGAGCCTCGCCAAGT
715_90R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCAAATGAAACTGTCGCGACTGG
715_90R2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCAAATGAAACTGTCGCGACTGGA
051_30F	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTCATGCCTGGGGAGAATTCGCGC
051_30R	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCACTCCCCACGACTCACACG
051_30R2	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCTCCCCACGACTCACACGC

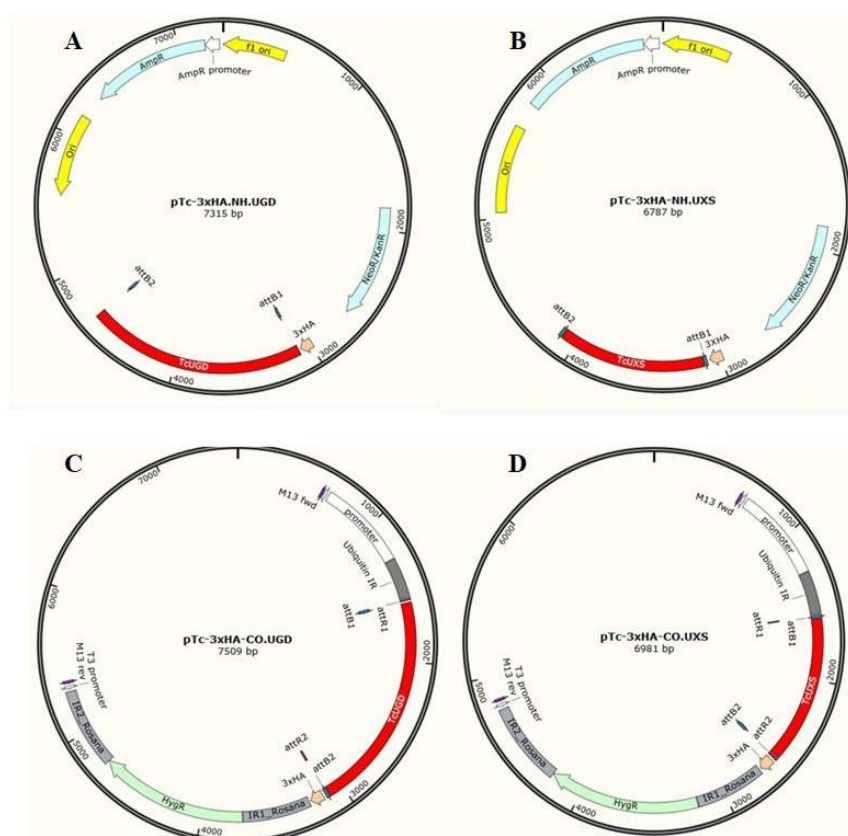


Figura 3.1: Mapa dos vetores de destino. A etiqueta 3xHA em todos os vetores está representada pela pequena flecha em rosa, os sítios attB1 e attB2 são indicados por pequenas flechas azuis flaqueando os genes que estão representados pelas flechas em vermelho, Os vetores A e B com a etiqueta 3xHA na região amino-terminal, apresentam o gene de resistência a neomicina pela flecha azul claro. Os vetores C e D com a etiqueta 3xHA na região carboxi-terminal, apresentam o gene de resistência à higromicina representado por uma flecha azul claro.

Para obter o soro policlonal, um fragmento de 672pb do gene *TcUGD* foi amplificado, correspondendo ao domínio NH-terminal da enzima TcUGD utilizando os *primers* 90F3 (5'-CGCGGATCCATGCCTGAGCCTCGCCAA-3') e 90R3 (5'-TCCGGTCTGACTCATGTGCAAATAATACGCGACTTG-3'). As reações de PCR foram feitas nas seguintes condições: 10 pmol de cada *primer*, 100 ng de DNA de *T. cruzi*, tampão 2X *Pfx*, 1,5 a 2 mM de MgSO₄, 100 μM de dNTPs e 0,4 μL de *PlatinumTMPfx DNA Polymerase* (Invitrogen), a reação foi preparada em volume final de 50 μL. Foi utilizado o termociclador modelo ProFlex (Thermo Fischer Scientific) com desnaturação a 94°C por 3 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 s, a hibridização dos *primers* ocorreu a 55°C e 60°C por 30 s, e a temperatura de extensão foi de 68°C por 1 a 2 min e extensão final de 68°C por 10 min. Os produtos amplificados foram purificados por meio do kit NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL,MN). Após a purificação os produtos de PCR foram digeridos com as enzimas de restrição *Sall* e *BamHI* e inseridos no vetor pET 28a (+) por reação de ligação catalisada pela enzima *T4 ligase*. Após a ligação dos insertos com o vetor, foi feita a transformação em TOP 10, as bactérias foram plaqueadas em placas LB/ágar contendo antibiótico canamicina em concentração de 100 μg/mL e incubadas a 37 °C por 16 h, após o crescimento das colônias, foi realizada PCR de colônia de acordo com item 3.6. Os plasmídeos foram coletados seguindo a técnica descrita no item 3.7. O vetor de expressão contendo a sequência gênica codificadora do domínio amino-terminal da enzima TcUGD foi denominado de pET 28a(+) TcUGD (fig.3.3).

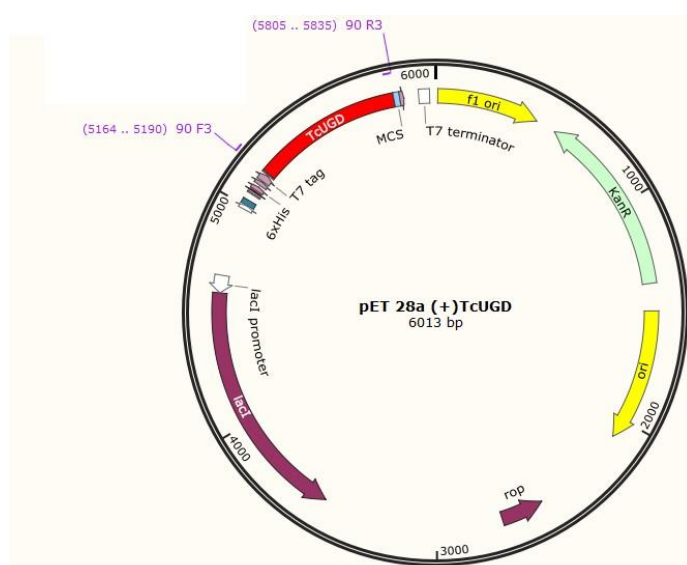


Figura 3.2: Mapa do vetor pET 28a (+)TcUGD: O vetor foi utilizado para expressão da proteína TcUGD truncada. Em vermelho está representado a sequência gênica do gene *TcUGD* correspondente ao domínio amino-terminal da proteína TcUGD.

3.19 PRODUÇÃO DE SORO POLICLONAL

Para a produção de soro policlonal, o vetor pET 28a (+) TcUGD foi transformado na cepa Rosseta Gami 2 (DE3). O clone que teve a maior expressão foi submetido a uma indução com 1 mM de IPTG e volume 300 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado. As proteínas recombinantes foram purificadas a partir dos corpúsculos de inclusão, uma vez que estavam presentes na fração insolúvel. As culturas induzidas foram centrifugadas a 6.000 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* resultante foi homogeneizado em 8 mL de PBS 1X e lisoenzima na concentração de 0,5 mg/mL, sendo incubado por 30 min em temperatura ambiente. Em seguida a solução foi submetida à lise por ultrassom usando o processador ultrassônico Qsonica sonicator 12,5mm (5 ciclos de 15 s e potência de 10 watts). O lisado foi centrifugado por 10 min a 10000 x g a 4 °C, o sobrenadante foi descartado, e o *pellet* solubilizado em 8 mL de tampão de lavagem (NaH₂PO₄ 100 mM, NaCl 500 mM, Triton 2%, Ureia 2 M, PMSF 1mM). Após a solubilização do *pellet*, o lisado foi vortexado e centrifugado a 4 °C por 10000 x g e 10 min, sendo coletado 8 mL do sobrenadante para averiguar a lavagem posteriormente em gel de proteína. O *pellet* foi novamente ressuspenso em tampão de lavagem e sonicação sendo esta etapa repetida 3x onde para cada repetição foi retirado 8 mL de sobradante para acompanhamento das lavagens em gel de proteína. Após a retirada do sobrenadane na última lavagem, o *pellet* foi solubilizado em 2 mL de PBS 1X e 2 mL de tampão de amostra para SDS-PAGE. O material foi aquecido a 95 °C por 15 min, aplicado em gel preparativo (20 cm X 20 cm, espaçamento 2 mm) (poliacrilamida 15%) e submetido à eletroforese (15 mA durante 17 h). Após a corrida, o gel foi corado com solução de KCl 100 mM gelado e a banda de interesse (correspondente ao tamanho da proteína recombinante) foi isolada. A porção do gel de poliacrilamida recortada foi reduzida a pequenos pedaços para facilitar a eluição da proteína em tampão de eluição (Tris HCl 50 mM pH 8,0, NaCl 150 mM), as porções do gel foram colocadas em 3 falcons de 50 mL e solubizadas em 1mL de tampão de eluição sendo deixadas em repouso na bancada por 18 h.

3.20 IMUNIZAÇÃO DE CAMUNDONGOS

Após a obtenção das proteínas recombinantes purificadas, camundongos da linhagem Balb/c foram imunizados para a obtenção dos antissoros contra as proteínas de interesse. Os animais foram inoculados com 50 µg de proteína recombinante. As proteínas recombinantes foram diluídas em tampão de eluição (descrito no item 3.19) e misturadas com o adjuvante

Alu-Gel (SERVA). Foram realizadas 4 inoculações a cada 14 dias. O sangue foi coletado, por punção cardíaca, após 7 dias da última inoculação, para extração do soro, sendo coletado pré-imune e pós-imune. Todos os procedimentos foram realizados em conformidade com o Comitê de Ética em Experimentação Animal da Fundação Oswaldo Cruz (CEUA protocolo p-47/12-3).

3.21 IMUNOFLUORESCÊNCIA E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

Os parasitas foram coletados por centrifugação a 3000 x g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e os parasitas lavados 2x em PBS estéril utilizando as mesmas condições de centrifugação. Os parasitas foram ressuspensos em solução fixadora contendo água 18.2, tampão fosfato 0,2 M e paraformaldeído 4% (para ensaios com marcação intracelular) e formaldeído 4% (para ensaios com marcação na superfície do parasita).

Após a etapa de fixação os parasitas foram aderidos em lâminas previamente tratadas com poli-L-lisina (1 µg/mL) à temperatura ambiente por 10 min. Os parasitas foram permeabilizados com PBS-Triton X-100 0,5% pH 8,0 durante 10 min. Em ensaios que envolvessem marcação na superfície do parasita, a etapa de permeabilização não era utilizada. Após a permeabilização, a lâmina foi lavada com PBS e incubada em solução PBS+BSA 3% durante 16 h a 4 °C. Após o bloqueio os parasitas foram incubados com anticorpos monoclonais diluídos em solução PBS+BSA 1,5% durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida as lâminas foram lavadas com PBS e os parasitas incubados com anticorpos secundários conjugados a Alexa Fluóro 488 e 546 (Invitrogen) na diluição de 1:600 em solução PBS + BSA 3% com adição do corante Hoechst 33342 (Invitrogen) a 2 µg/µL, por 1 hora a 37 °C. Por fim, as lâminas foram lavadas 3x com PBS por 5 minutos e montadas com ProLong® Gold Antifade (Life Technologies) e observados em microscópio de fluorescência. Os vetores construídos para o ensaio de localização subcelular foram transfectados em clones de *T. cruzi* Dm28c por eletroporação. Os parasitas foram selecionados com uso de antibiótico G418 (transfectantes com o vetor pTc-3xHA-NH) e higromicina (transfectantes com o vetor pTc-3xHA-CO) em concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL respectivamente. Para os transfectantes com os vetores pTc-3xHA.NH.UGD e pTc-3xHA-NH.UXS foi usado o anticorpo primário IgG anti-HA (Invitrogen) de camundongo e secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen) e observados em microscópio de fluorescência associado a *software* de deconvolução (modelo DMI 6000 B, LEICA Biosystems). Para os parasitas com os vetores pTc-3xHA-CO.UGD e pTc-3xHA-

CO.UXS foi utilizado o anticorpo primário IgG anti-HA de coelho e secundário anti-IgG de coelho conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 488 (Invitrogen), para a marcação do glicosomo foi utilizado IgG anti-TcGAPDH de camundongo e secundário anti-IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor 546 (Invitrogen), para fazer os ensaios de colocalização. Para os ensaios de colocalização foi utilizado o microscópio confocal a laser (modelo Leica SP5 AOBS).

3.22 NOCAUTE GÊNICO

3.22.1 Amplificação das intergênicas para a construção dos cassetes

Para o estudo do papel biológico dos resíduos de xilose no *T. cruzi*, foi realizado o nocaute separadamente dos genes *TcUGD* e *TcUXS*, por recombinação homóloga. Os vetores pTc2KO-hyg (fig.3.3A) e pTc2KO-neo (fig.3.3B), contendo os genes de resistência à higromicina fosfotransferase e neomicina fosfotransferase sob o controle das intergênicas dos genes das enzimas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase e enolase, foram utilizados na construção dos cassetes para o nocaute dos genes *TcUGD* e *TcUXS*. Primeiramente, foi realizada a amplificação das intergênicas dos genes em estudo a partir do DNA genômico do clone Dm28c. Para o gene *TcUGD* foi utilizado um *primer* que anela no final da intergênica (nomeado de IR_90_5'F com sítio de restrição *SalI*) e um que se anela no início da sequência do gene (nomeado de IR_90_5'R com sítio de restrição *KpnI*) para amplificar a intergênica localizada na região a montante do gene (*upstream*) (Fig. 3.3A). Para a região a jusante (*downstream*) do gene *TcUGD* (Fig. 3.3A) foram utilizados os primers nomeados de IR_90_3'F (com sítio de restrição *BamHI*) e IR_90_3'_R (com sítio de restrição *XbaI*).

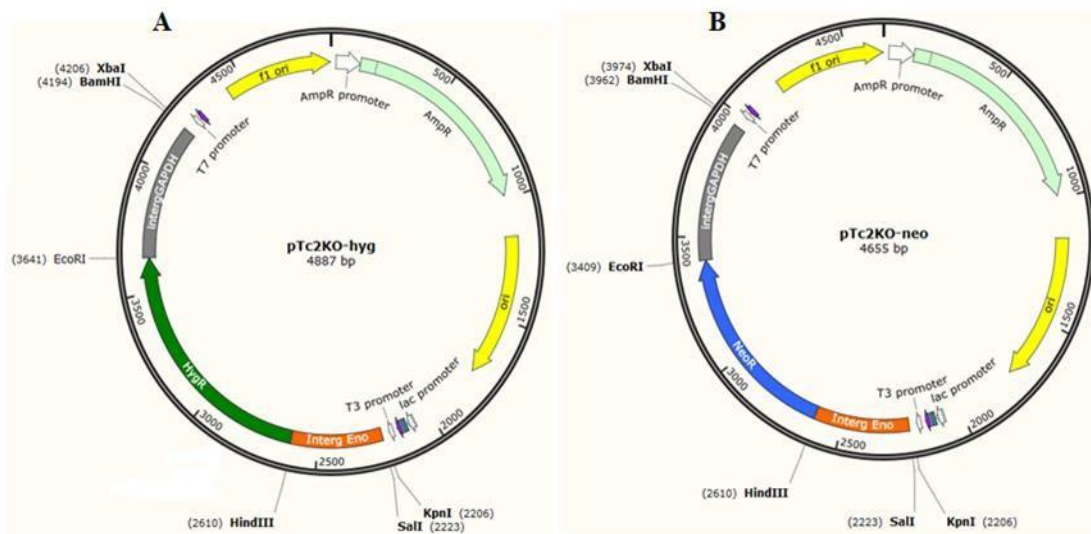


Figura 3.3: Desenho esquemático dos vetores pTc2KO-hyg e pTc2KO-neo. O retângulo verde escuro representa o gene de resistência à higromicina (HygR, 1026pb) e o retângulo em azul, o gene de resistência à neomicina (NeoR, 794pb). As regiões intergênicas Interg ENO (do gene da enolase/retângulo laranja) e Interg GAPDH (do gene de GAPDH/retângulo cinza), que irão regular a expressão dos genes de resistências. As enzimas de restrição utilizadas nas clonagens das regiões intergênicas dos genes *TcUGD* e *TcUXS* para a obtenção dos cassetes estão indicadas nos mapas.

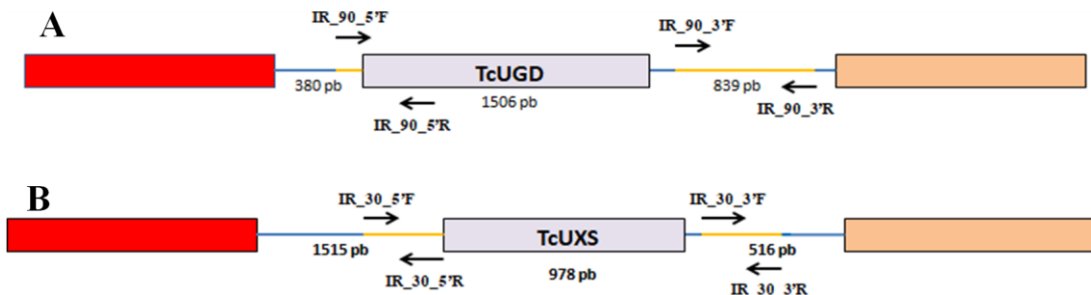


Figura 3.4: Esquema mostrando o anelamento dos *primers* para a amplificação das intergênicas *upstream* e *downstream* dos genes *TcUGD* e *TcUXS*. As linhas marcadas em laranja, representam os fragmentos das intergênicas utilizados na construção dos cassetes. As linhas marcadas em azul são os fragmentos que não foram amplificados e utilizados para a construção dos cassetes. Fragmentos em laranja e azul em escala.

Na obtenção das intergênicas do gene *TcUXS* foram utilizados os *primers* nomeados de IR_30_5'F (com sítio de restrição *Sali*) e IR_30_5'R (com sítio de restrição *KpnI*) para a região *upstream* e *primers* (nomeados IR_30_3'R_F com o sítio *BamHI* e IR_30_3'R *XbaI*) para a região *downstream* (Fig. 10B). As reações de PCR foram feitas com o Kit NAT HIV/HCV/HBV (IBMP, Instituto de Biologia Molecular do Paraná), sob as seguintes condições: desnaturação de 94 °C por 3 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 30 s e temperatura de anelamento de 55 °C por 30 s e extensão de 72 °C por 1 min e por fim uma última etapa de extensão de 72 °C por 10 min. A tabela 2 mostra os *primers* utilizados para amplificar as intergênicas.

Tabela 3.2: Primers utilizados para amplificar as intergênicas *upstream* e *downstream* dos genes *TcUGD* e *TcUXS*.

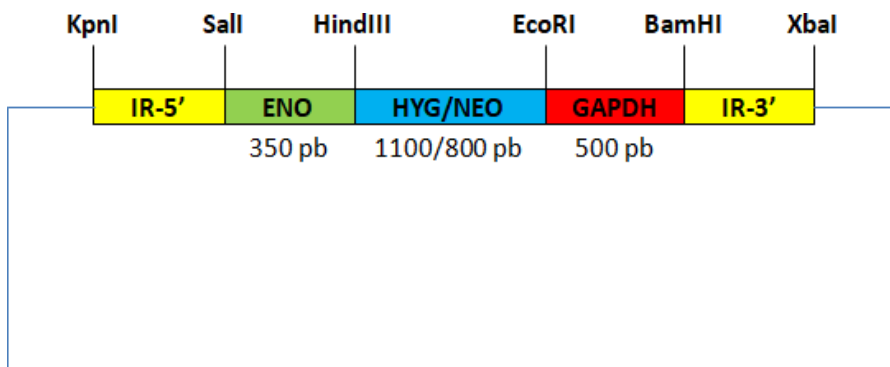
Nome	Sequências (5'-3')
IR_90_5'F	ATCCTCCGGAATTGTGAGTGGC
IR_90_5'R	ACGCGTCGACTGTTGTTGTTGTTTTCGCTTTCCC
IR_90_3'F	CGCGGATCCTAGTACGGAGGGGAATGGGG
IR_90_3'R	GCTCTAGACACAAGAAGCCAGTCTCAACG
IR_30_5'F	CGGGGTACCGAAAACGAAAGGAAGAAGGGGGAT
IR_30_5'R	ACGCGTCGACCGTTGGACAAAACACCCAATGC
IR_30_3'F	CGCGGATCCACAATGACAGCGCGGCTG
IR_30_3'R	GCTCTAGAAGTTGTTACGTGGATTTCTGCG

3.22.2 Construção dos cassetes com as marcas de seleção a higromicina e neomicina

As intergênicas amplificadas foram inseridas entre os sítios *KpnI* e *Sall* (*upstream*) e *BamHI* e *XhoI* (*downstream*) do vetor pTc2KO-hyg e pTc2KO-neo por reação de ligação catalisada pela enzima *T4 DNA ligase* (Invitrogen). Para a etapa de clonagem, seleção dos clones por PCR de colônia e expansão dos vetores, foi utilizado a cepa bacteriana TOP 10. O vetor pTc2KO-hyg contendo o cassete para nocaute do gene *TcUXS* passou a ser denominado de pTc-UXSKO-Higro, e para o nocaute do gene *TcUGD* passou a ser denominado de pTc-UGDKO-Higro. Para transfectar os cassetes denominados de UGDHKO e UXSHKO no parasita, foi necessária amplifica-los, a partir dos vetores pTc-UGDKO-Higro e pTc-UXSKO-Higro para se obter uma quantidade de material suficiente para isolamento em gel de agarose e recuperação do material pelo método de eletroeluição. Os cassetes foram transfectados no parasita por eletroporação utilizando o equipamento Nucleofector® II Device (Lonza) e programa U-033. Para a seleção do parasita nocaute inicialmente foi utilizado uma concentração de 500 µg/ml de higromicina. Após alguns repiques aumentou-se a concentração da droga para 750 µg/ml. A seleção ocorreu quando houve aumento no uso de 1000 µg/ml tendo transcorrido 2 meses.

Na construção dos vetores denominados de pTcUGDKO-Neo e pTcUXSKO-Neo para o nocaute do segundo alelo dos genes *TcUGD* e *TcUXS*, foram empregadas duas estratégias. A sequência de NEO foi obtida por digestão do vetor pTc2KO-neo, utilizando as enzimas *HindIII* e *EcoRI*, após essa etapa ela foi purificada do gel de agarose e ligada utilizando a enzima *T4 ligase* ao vetor pTcUGDKO-Higro, cujo o gene de resistência a higromicina foi removido por digestão com *HindIII* e *EcoRI*, finalizando a construção do vetor pTcUGDKO-Neo. Para a construção do vetor pTcUXSKO-Neo, foi realizada uma outra estratégia. Primeiro a clonagem da intergênica *downstream* entre os sítios de *BamHI* e *XbaI*, e depois a clonagem da intergênica *upstream* entre os sítios de restrição *KpnI* e *Sall*. Um mapa resumindo a estrutura dos cassetes com os genes de resistência a higromicina e neomicina esta

presente na figura 3.5.



- IR-5'** Intergênica da região upstream do gene de interesse
- ENO** Região intergênica entre Enolase e KAP3
- HYG/NEO** Gene de resistência Higromicina ou neomicina
- GAPDH** Região intergênica entre as cópias do gene GAPDH
- IR-3'** Intergênica da região downstream do gene de interesse

Figura 3.5: Mapa resumido dos cassetes com os genes de resistência a higromicina e neomicina. Em amarelo é mostrado as intergênicas *upstream* e *downstream* para a recombinação homóloga, em verde a intergênica Enolase e em vermelho a intergênica de GAPDH.

Para os plasmídeos com o cassete contendo a marca de seleção de neomicina foi feita a transformação em TOP 10, em seguida as bactérias foram cultivadas em 3 tubos de ensaio cada um contendo 8 mL de meio LB. Os plasmídeos foram recuperados utilizando o Kit QIAprep Spin Miniprep (Qiagen).

Para o nocaute do segundo alelo não foi utilizada a estratégia de amplificação dos cassetes por PCR. Devido a varias tentativas sem sucesso na obtenção do nocaute duplo, foi adotada uma estratégia diferente. Primeiramente foi utilizada a enzima de restrição *KpnI* para a linearização dos plasmídeos pTcUGDKO-Neo e pTcUXSKO-Neo. Os materiais foram concentrados por precipitação em acetato de sódio ($C_2H_3NaO_2$ 3M) pH 5 e etanol absoluto. Por último foi feita a transfecção dos plasmídeos linearizados por eletroporação utilizando o equipamento Nucleofector® II Device (Lonza) e programa U-033. A construção dos cassetes UGDHKO e UXSHKO nos vetores foi confirmada por reação de PCR utilizando os primers IR_90.5'F + IR_90_90.3'R para o cassete UGDHKO e os primers IR_30.5'F e IR_30.3'R. Para confirmar a construção do cassete UGDHKO foram feitas digestões com as enzimas de restrição *HindIII* e *EcoRI*, para averiguar a troca da sequência de resistência à higromicina do cassete UGDHKO pela sequência de resistência a G418. Para o cassete UXSNKO, foram feitas digestões com as enzimas *KpnI* e *Sall*, para confirmar a clonagem da intergênica

upstream e digestões com *BamHI* e *XbaI* para confirmar a clonagem da intergênia *dowstream*. Outra técnica utilizada para confirmar a construção correte dos cassetes foi o sequenciamento das regiões intergênicas. Os mutantes foram selecionados em 3 semanas usando higromicina B e G418 na concentração de 1000 µg/mL e 500 µg/mL respectivamente. Para averiguar a inserção dos cassetes nos mutantes foram utilizados os *primers* citados na tabela 3.3.

Tabela 3.3: *Primers* utilizados para averiguar a inserção dos cassetes no genoma dos parasitas mutantes.

Nome	Sequências 5'-3'
UGD Ext_F	ATCCTCCGGAATTGTGAGTGGC
UGD Ext_R	CAATACCGCAGGATGTACCAA
UXS Ext_F	TGACTGCGGGAATAACCCCAA
UXS Ext_R	GATGCCGCGTTCCACCTTGTA
Hyg out F	ACTGTCTGGGCGTACACAAAT
Hyg out R	ATTGACCGATTCCTTGCGGT
Neo Hind F	GGGGAAGCTTATGATTGAACAAGATGGATTGCACGCAG
NeoEco R	GGGGGAATTCAGAAGAAGTTCGTCAAGAAGGCGATAGAA

3.23 ISOLAMENTO DE CLONES MUTANTES

Após a averiguar correta inserção dos cassetes, foi feito o isolamento de clones nocautes por diluição limitante. Primeiro foi realizada uma contagem em câmara de Neubauer e coletados 1×10^7 de células e ressuspensas em 1 mL de PBS 1X estéril, em seguida foram coletados 10 µL da solução e ressuspensa em 990 µL de PBS 1X estéril para se chegar a uma concentração de 1×10^5 cél/mL, por fim os parasitas foram diluídos 10X para se chegar a uma solução contendo 1×10^3 cél/mL. Foram coletados da última diluição 50 µL ou seja teoricamente 50 parasitas e ressuspensos em 20 mL de meio LIT presente em placa de petri. Após a ressuspensão foram aliqotas 200 µL da solução em placas de 96 poços, sendo posteriormente incubadas em estufa B.O.D a 28 °C por 21 dias.

3.24 CURVAS DE CRESCIMENTO E ANÁLISE DA DIFERENCIAÇÃO

A taxa de proliferação de formas epimastigotas mutantes para o gene *TcUGD* foi comparada com a taxa das formas epimastigotas selvagens. Partindo-se de uma concentração de 1×10^6 células/mL foram feitas contagens a cada 24 horas em contador de células (Z2 Coulter Particle and Size Analyzer, BECKMAN COULTER). Para a comparação das curvas de crescimento dos clones representados pela cepa selvagem Dm28c e dos clones com o gene nocauteados denominados de *TcugdΔ*, *TcugdΔ/7* e *TcugdΔ/11*, três experimentos

independentes foram realizados, cada um com três réplicas (garrafas), para avaliar a concentração de células/mL a cada 24 horas, ao longo de 168 horas. Um modelo linear de efeitos mistos (Pinheiro; Bates, 2000) foi utilizado para o ajuste do logaritmo da concentração de células (resposta de interesse), a fim de considerar a repetição de medidas de concentração de células para uma mesma unidade experimental. Uma variável categórica correspondente ao grupo de cepas representou a variável independente de interesse. Após o ajuste do modelo, para a comparação dos grupos, foi utilizado o teste de Dunnett (Dunnett, 1964), de modo a comparar cada clone nocaute (*Tcugd/7* e *Tcugd/11*) e a população mãe *TcugdΔ* com a cepa selvagem. Para este teste o nível de significância adotado foi de 5%.

A avaliação de metaciclo gênese no grupo de cepas selvagens Dm28C e no de cepas com gene nocauteado (neste caso, representado pela população mãe *TcugdΔ*) foi realizada por meio de três réplicas (garrafas) para cada grupo em dois experimentos independentes. No primeiro, a avaliação da transformação de parasitas em sua forma infectiva foi realizada em 72 horas, e no segundo em 96 horas, para ambos os grupos de cepa, selvagem e com gene nocauteado. A comparação da quantidade média de parasitas na forma infectiva entre a população selvagem Dm28C e a população mãe *TcugdΔ* foi realizada separadamente para cada experimento, por meio do teste t de Student. As comparações foram realizadas após aplicação da transformação logarítmica à variável de interesse (representada, neste caso, pela quantidade de parasitas na forma infectiva). A modelagem foi realizada utilizando o programa R versão 3.6.2.

3.25 AVALIAÇÃO DOS PARASITAS NOCAUTES POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA E TRANSMISSÃO

3.25.1 Preparo de parasitas para análise em microscopia eletrônica de varredura

Foram coletados 5×10^7 parasitas selvagens e mutantes na forma epimastigotas e mantidos em crescimento exponencial por centrifugação a 3000 x g por 5 min. As células foram lavadas duas vezes com PBS 1X. Após as lavagens as células foram ressuspensas em solução fixadora contendo glutaraldeído a 2,5% em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 40 minutos. Após a fixação, o material foi lavado com o mesmo tampão por 2 vezes. Em seguida, as células foram aderidas em lamínulas recobertas com poli-L-lysina 0,01% e pós-fixadas com uma solução contendo tetróxido de ósmio 1%, ferrocianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 1mM em tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2 por 30 minutos, no escuro, à

temperatura ambiente. Após a incubação, as células foram lavadas 2 vezes com água ultrapura. O material foi desidratado gradativamente em soluções com concentrações crescentes de etanol e mantidos em etanol 100%. Na sequência foi realizada a secagem do material pelo método do ponto crítico utilizando equipamento Leica EM CPD300 e a metalização com ouro foi feita em sistema de revestimento EM ACE200. As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de varredura JEOL, modelo JSM6010.

3.25.2 Preparo de parasitas nocautes para microscopia eletrônica de transmissão

Foram coletados 5×10^7 parasitas selvagens e mutantes na forma epimastigotas mantidos em crescimento exponencial por centrifugação a $3000 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado e os parasitas foram lavados duas vezes em 10 mL de PBS em temperatura de 28 °C e centrifugação a $3000 \times g$ por 5 min. Os parasitas foram ressuspensos em solução fixadora de Karnovsky (2,5% de glutaraldeído – grau I, Sigma e 4% de paraformaldeído, em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2) em um volume correspondente a pelo menos 4 vezes o volume do *pellet*. A incubação foi feita na solução por 1 hora em temperatura ambiente. Após a incubação as células foram centrifugadas a $3000 \times g$ por 5 min, o sobrenadante foi descartado e a amostra ressuspensa em tampão cacodilato de sódio 0,1 M por 5 min em um volume correspondente a 4 vezes a do *pellet*. Repetiu-se este procedimento duas vezes. Centrifugou-se as células nas mesmas condições, o sobrenadante foi descartado e foi acrescentado a solução contendo 1% de tetróxido de ósmio + 0,8% de ferrocianeto de potássio + 5 mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, em um volume correspondente a 2 vezes o da amostra. As células foram ressuspensas nesta solução por 30-45 minutos, em temperatura ambiente, protegido da luz e com vedação por Parafilm®. Os parasitas foram centrifugados novamente e o sobrenadante descartado, a amostra foi lavada com tampão cacodilato de sódio 0,1 M com incubação por 5 minutos e em um volume correspondente a pelo menos 4 vezes a do *pellet*, esse procedimento foi repetido duas vezes. Após essa etapa a amostra foi desidratada com soluções de concentração crescente de acetona (30%, 50%, 70%, 90% e 100%), com incubação de 10 minutos em cada uma. As trocas foram feitas sempre através de centrifugação, descarte do sobrenadante e acréscimo da solução subsequente. Na etapa de incubação com acetona 100% foi feita duas vezes. Após essa etapa a acetona 100% por uma solução 2:1 de acetona; resina epoxi (Embed 812). A amostra foi incubada nesta solução por 16 horas. Foi substituída a solução 2:1 de acetona;resina por uma solução 1:1 de acetona;resina, incubando por 8 horas. A solução 1;1

de acetona;resina foi substituída por uma solução 1:2 de acetona;resina e incubada por 16 horas. Após essa etapa a solução 1:2 de acetona;resina foi substituída por resina 100% pura sendo a amostra incubada nesta solução por 8 horas. Foi feita uma nova troca da resina 100% e amostra emblocada a 60° C por 48-72 horas para polimerização da resina. A amostra foi removida dos moldes para ser armazenada em local seco e limpo. As células foram compostas por aldeído glutárico (3%) diluído em solução tampão de cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,0. As amostras foram seccionadas em cortes de espessura de cerca de 70 nm utilizando o ultramicrotomo Leica EM UC6. Os cortes foram coletados em grades de cobre, contrastados por 40 minutos em acetato de uranila a 5% em água, e por 5 minutos em citrato de chumbo. As amostras foram visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão (MET) JEOL, modelo JEM-1400Plus.

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE IN SILICO

Com o uso das ferramentas Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), das sequências CNAG_04969 para a enzima UGD e CNG_02560 para a enzima UXS de *Cryptococcus neoformans* var *grubii* H99, e a base de dados TriTryp (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) descobriu-se que os gene *TcUGD*, com ID TcCLB.509715.90 (alelo TcCLB.510105.100), é traduzido para uma proteína com 501 aminoácidos e 56,6 kDa, e o gene *TcUXS*, com ID TcCLB.509051.30 (alelo TcCLB.509965.380), codifica uma proteína com 325 aminoácidos e 36,6 kDa. Extraíndo informações iniciais do sequenciamento do genoma de CL Brener, juntamente com informações do sequenciamento recente do genoma do Dm28c sequenciado pela plataforma PACBIO (PROBST, C M; submetido para publicação) que permitiu visualizar com mais detalhes a organização gênica do parasita, pois permite a leitura de sequências mais longas facilitando na previsão de cópias, observou-se que os genes *TcUGD* e *TcUXS* possuem uma cópia no genoma do parasita. Uma esquematização feita a partir dos dados de sequenciamento do clone Dm28c mostra a localização dos gene *TcUGD* no locus MBSY01000286 (fig.4.1) e *TcUXS* presente no locus MBSY01000301 (fig.4.2).

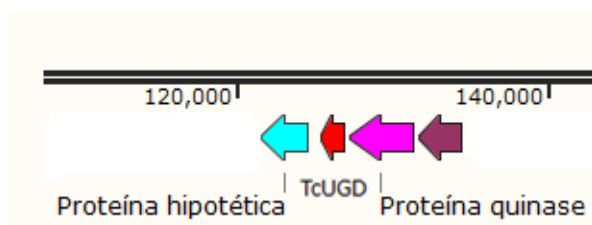


Figura 4.1: Locus gênico do gene *TcUGD*. Observa-se nesta montagem locus MBSY01000286 feita a partir de informações extraídas do sequenciamento do genoma do clone Dm28c, a presença do gene *TcUGD* entre as sequências que codificam uma proteína quinase e uma proteína hipotética.

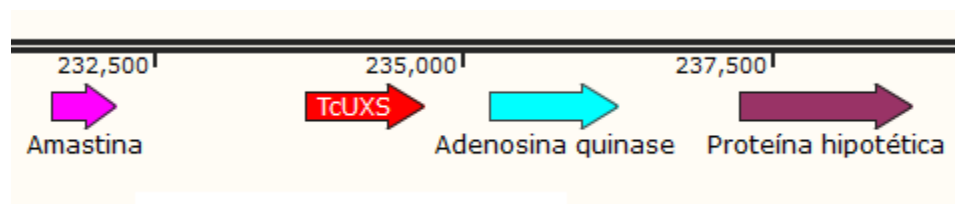


Figura 4.2: Locus gênico do gene *TcUXS*. Montagem do Locus gênico MBSY01000053 onde se localiza o gene *TcUXS* entre as sequências que codificam uma amastina e uma adenosina quinase. Montagem feita a partir de informações extraídas do sequenciamento do genoma do clone Dm28c.

Utilizando as ferramentas Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e T-coffee (TOMMASO *et al.*, 2011) foi possível buscar e alinhar as sequências dos ortólogos das proteínas *TcUGD* e *TcUXS*. Como se observa nas figuras 4.3 e 4.4, é possível identificar na

sequência das enzimas TcUGD e TcUXS o motivo GXGXXG.

Na enzima TcUGD é possível também identificar a sequência peptídica WS(S/A)ELSKLXANA(F/M)LAQRIS(I/V)N(S/A)XSA-(I/L/V)CEATGA presente no grupo UGDH-II que se encontra em eucariotos superiores e inferiores (fig.4.3). Além do alinhamento entre as sequências, foi observado utilizando a ferramenta Blastp (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a porcentagem de similaridade e identidade das sequências de aminoácidos das enzimas UGD de *Homo sapiens* (H.sapiens, [NP_003350.1](#)), *Arabidopsis thaliana* (A.thaliana, [NP_197053.1](#)), *Caenorhabditis elegans* (C.elegans, [NP_505730.1](#)), *Cryptococcus neoformans* var. Grubii H99 (C.neoformans, [XP_012048628.1](#)) com a enzima TcUGD (tabela 4.1). A mesma análise foi feita com os ortólogos da proteína TcUXS, *H. sapiens* (H. sapiens, [4EF7 A](#)), *C. neoformans* var. Grubii H99 (C.neoformans, [XP_012051178.1](#)) (tabela 4.2).

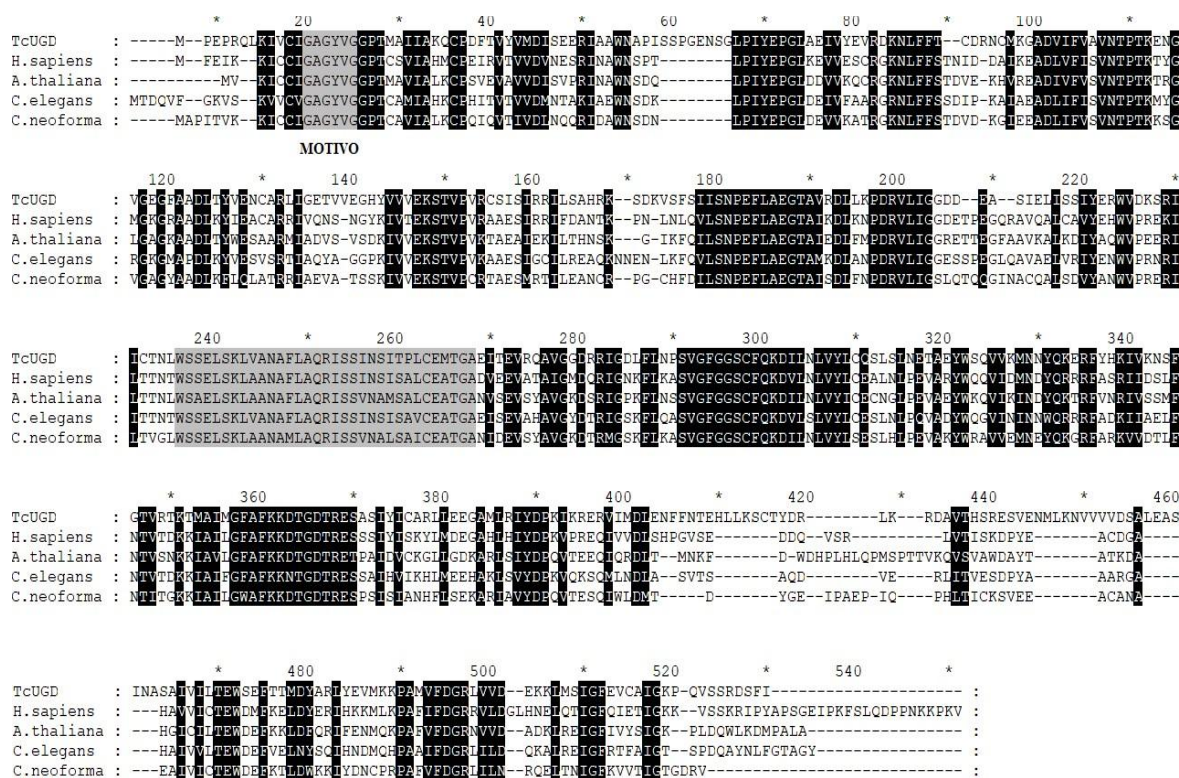


Figura 4.3: Alinhamento feito com os ortólogos da proteína TcUGD. O ID das sequências são, *Homo sapiens* (H.sapiens, NP_003350.1), *Arabidopsis thaliana* (A.thaliana, NP_197053.1), *Caenorhabditis elegans* (C.elegans, NP_505730.1), *Cryptococcus neoformans* var. Grubii H99 (C.neoformans, XP_012048628.1). As sequências pintadas em cinza mostram o motivo GXGXXG (sequência curta) e a sequência peptídica WS(S/A)ELSKLXANA(F/M)LAQRIS(I/V)N(S/A)XSA-(I/L/V)CEATGA (sequência mais longa) encontrada na classe UGDH-II.

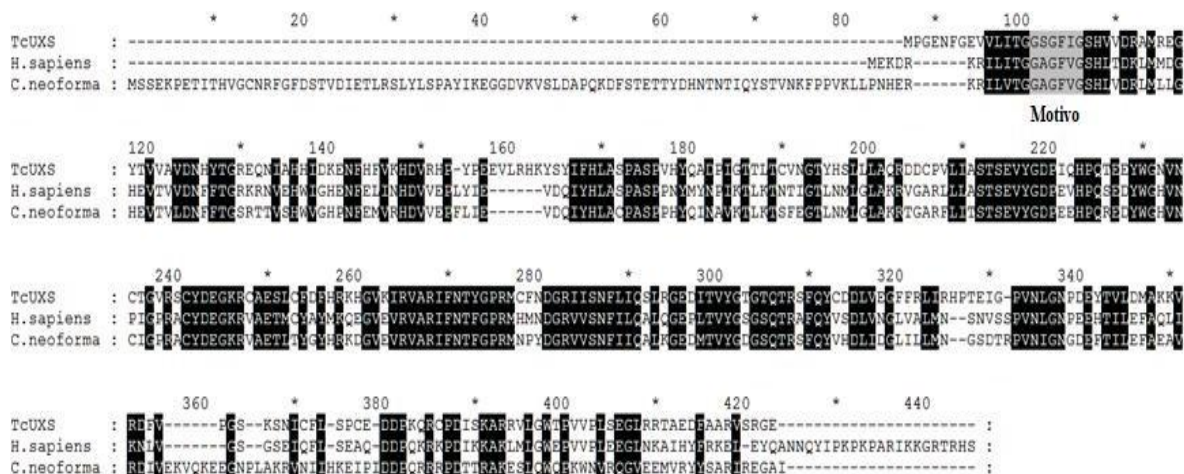


Figura 4.4: Alinhamento feito com os ortólogos da proteína TcUXS. O ID das sequências são, Homo sapiens (H.sapiens, 4EF7_A), Cryptococcus neoformans var. Grubii H99 (C.neoformans, XP_012051178.1). A sequência pintadas em cinza mostra o motivo GXXGXXG localizado na região amino-terminal da enzima.

Tabela 4.1: Similaridade e identidade de TcUGD com as enzimas de outros organismos, cálculo feito utilizando o programa Blastp.

Organismo	Similaridade (%)	Identidade (%)
<i>H.sapiens</i>	69	52
<i>A.thaliana</i>	68	53
<i>C.elegans</i>	67	51
<i>C.neoformans</i>	69	49

Tabela 4.2: Similaridade e identidade de TcUXS com as enzimas de outros organismos, cálculo feito utilizando o programa Blastp.

Organismo	Similaridade (%)	Identidade (%)
H.sapiens	72	54
C.neoformans	65	48

Com as ferramentas pfam (GEBALI *et al.*, 2019) e MOTIF search (<https://www.genome.jp/tools/motif/>), foram encontrados 3 domínios conservados para a proteína TcUGD, que são o domínio amino-terminal (aminoácido 7 ao 205), possivelmente envolvido na ligação da enzima com o grupo NAD⁺ (UDPG MGD_{dh} N), um domínio UDP-glicose/GDP-manose desidrogenase central (UDPG MGD_{dh}, abrange o aminoácido 221 ao 316) e o domínio carboxi-terminal, possivelmente envolvido na ligação com o nucleotídeo UDP do nucleotídeo-açúcar UDP-glicose (UDPG MGD_{dh} C), abrange o aminoácido 339 ao 476).

A estrutura da protena TcUGD é mostrada por modelagem 3D feita usando a ferramenta Phyre² (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre2/html/page.cgi?id=index>) como mostrado na figura 4.5.

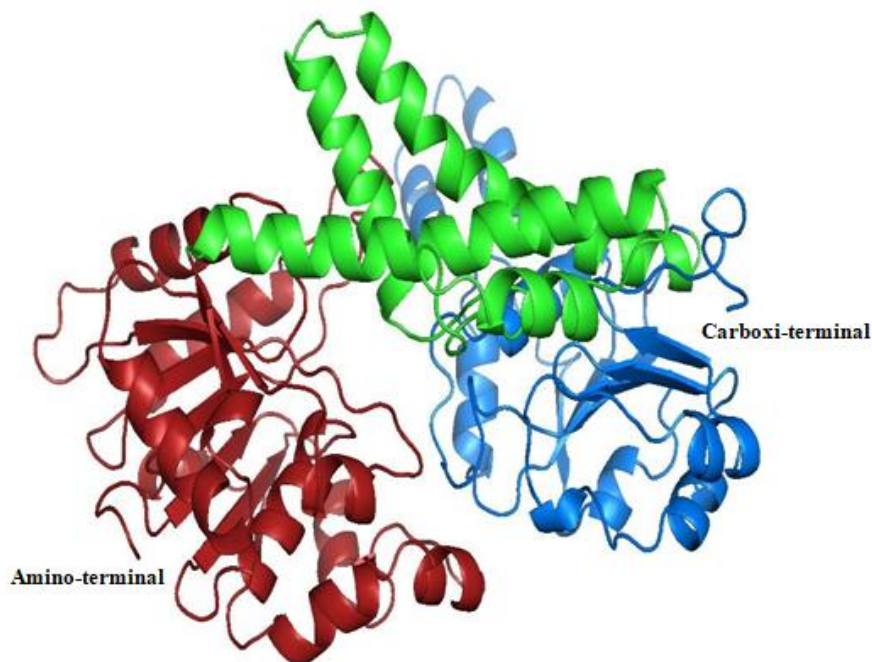


Figura 4.5: **Modelagem da proteína TcUGD feita no programa Phyre²**. Observa-se em vermelho o domínio amino-terminal que contém o motivo GXGXXG envolvido possivelmente na ligação com o NAD⁺, em verde esta representado o domínio central da proteína e em azul o domínio carboxi-terminal possivelmente envolvido na ligação com o nucleotídeo UDP do nucleotídeo açúcar UDP-Glc.

4.2 ENSAIO DE LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

4.2.1 Construção dos vetores e obtenção das enzimas fusionadas a tag 3xHA na região amino-terminal ou carboxi-terminal

Foram construídos os vetores pTc-3xHA.NH.UGD, pTc-3xHA-NH.UXS, pTc-3xHA-CO.UGD e pTc-3xHA-CO.UXS para a expressão das enzimas TcUGD e TcUXS com o tag 3xHA, nas extremidades amino-terminal ou carboxi-terminal conforme descrito no item 3.18 da seção de material e métodos. A confirmação da clonagem foi feita por PCR ou clivagem com enzimas de restrição e sequenciamento. Os clones de *T. cruzi* com expressão das enzimas TcUGD e TcUXS com o tag na região amino-terminal foram nomeados de UXS.1, UXS.17 e UGD.35, e os clones utilizados com expressão das enzimas com o tag na região carboxi-terminal foram nomeados de UXS.12 e UGD.1.

4.2.2 Análise da superexpressão das proteínas TcUGD e TcUXS em *T. cruzi*

A análise das proteínas superexpressas foi feita pela técnica de *western blotting* utilizando anticorpos IgG anti-HA (invitrogen) e como normalizador anticorpos IgG anti-TcGAPDH (Laboratório de biologia molecular de tripanossomatídeos).

A análise mostrou que as proteínas UXS.1, UXS.17 e UGD.35 estão expressas e o tamanho observado no ensaio é condizente com o esperado (fig. 4.6A). No caso da proteína TcUXS e TcUGD, com a etiqueta na extremidade carboxi-terminal, obtivemos dois clones, UGD.1 e UXS.12 (fig.4.6B), com níveis de expressão diferentes. Infelizmente, não há como comparar com o nível de expressão no clone selvagem de *T. cruzi*, Dm28c, uma vez que não temos anti-soro com as proteínas endógenas.

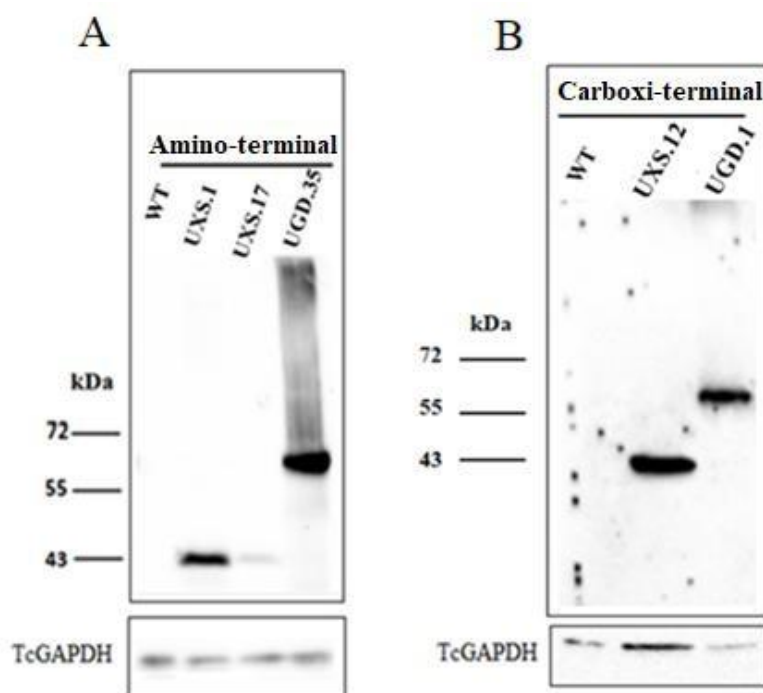


Figura 4.6: Análise de expressão das proteínas recombinantes TcUGD e TUXS em *T. cruzi* por western blot. (A) Observa-se que a proteína recombinante UXS.17 está menos expressa que a UXS 1, nestes extratos foi usado os anticorpos IgG anti-HA de camundongos (1:500) para marcar as proteínas com etiqueta (3xHA) na extremidade amino-terminal. (B) Para marcar as proteínas com a etiqueta HA na extremidade carboxi-terminal, foi usado os anticorpos IgG anti-HA de coelho (1:500). Os extratos de *T. cruzi* utilizados nos ensaio foram incubados também com anticorpos IgG anti-TcGAPDH feito em camundongos (1:500). Foi usado o marcador PageRuler Prestained Protein Ladder (Thermo Fischer Scientific). O anticorpo anti-TcGADPH foi utilizado como controle na quantidade de extrato.

4.2.3 Análise da localização subcelular por microscopia de fluorescência e confocal

Primeiramente, analisamos o padrão de marcação da proteína glicossomal TcGAPDH uma vez que a síntese de nucleotídeos-açúcares em tripanossomatídeos ocorre supostamente nos glicossomos, com base na localização de algumas enzimas envolvidas na síntese destes compostos (ROPER; FERGUSON, 2003; MARÍÑO *et al.*, 2010, 2011). Foram obtidas imagens de fluorescência com deconvolução de parasitas selvagem (fig.4.7) marcados com anticorpos IgG anti-TcGAPDH de mouse e secundários anti-IgG de mouse conjugado ao

Alexa Flúor 546 (invitrogen) para observar o padrão de marcação glicosomal no *T. cruzi*.

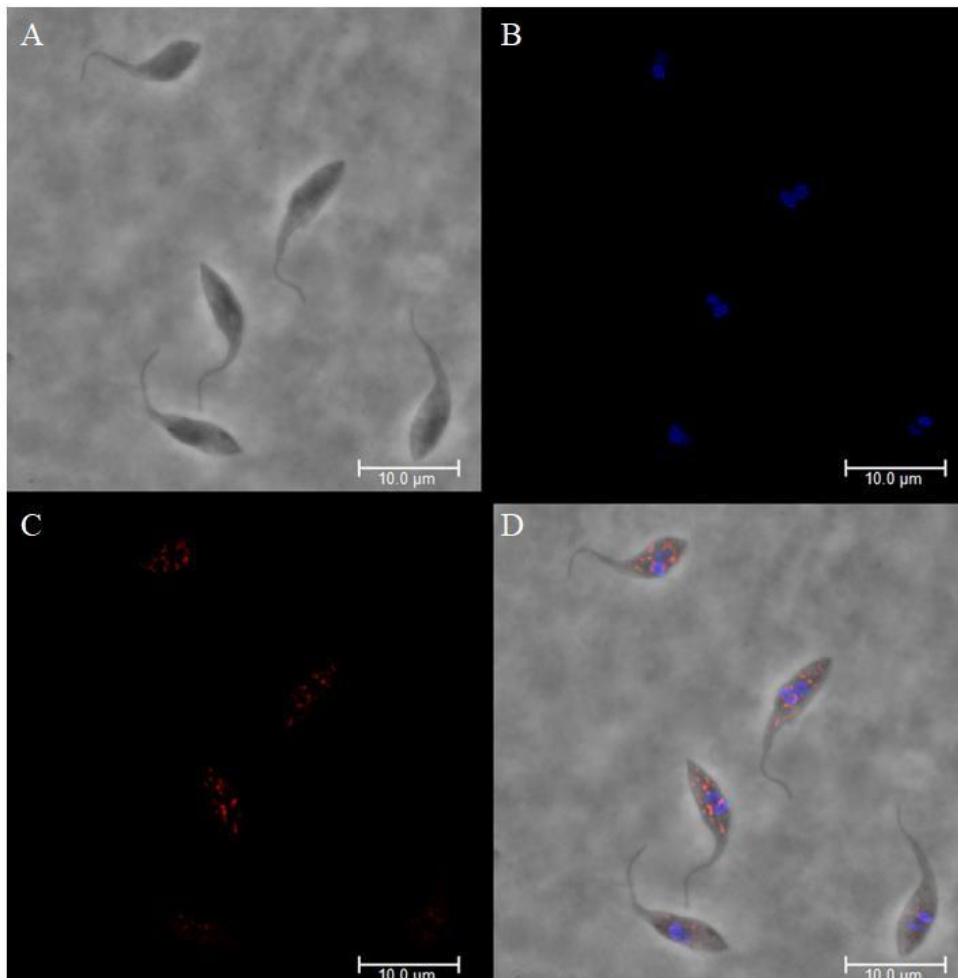


Figura 4.7: Análise do localização celular de TcGAPDH, em *T. cruzi*. (A) Imagens de microscopia de fluorescência com deconvolução demonstrando o contraste de fase de epimastigotas. (B) parasitas marcados por Hoechst (C) parasitas epimastigotas marcados com anticorpos primários IgG anti-TcGAPDH (1:500) e anticorpos secundários conjugados ao fluoroforo 546 Alexa Flúor (invitrogen) (1:600). (D) Sobreposição das Imagens A,B e C. Escala da barra: 10 μm.

Foram obtidas imagens de fluorescência com deconvolução com os parasitas que superexpressam as proteínas UXS.1 (fig.4.8), UXS.17 (fig.4.9) e UGD.35 (fig.4.10) na região amino-terminal. Observa-se que a marcação das proteínas TcUGD e TcUXS apresentam um padrão diferente do esperado de uma marcação com TcGAPDH. Além das proteínas com etiqueta na região amino-terminal, foi feito ensaio de colocalização em microscópio confocal com a proteína recombinante TcUXS.12 (fig.4.11), com a tag 3xHA na região Carboxi-terminal. Observa-se que a marcação com Alexa Flúor 488 (Invitrogen) utilizada para a proteína TcUXS.12 (fig.4.11B) recombinante está colocalizando com a marcação Alexa Flúor 546 (Invitrogen) utilizada para a proteína TcGAPDH (fig.4.11D).

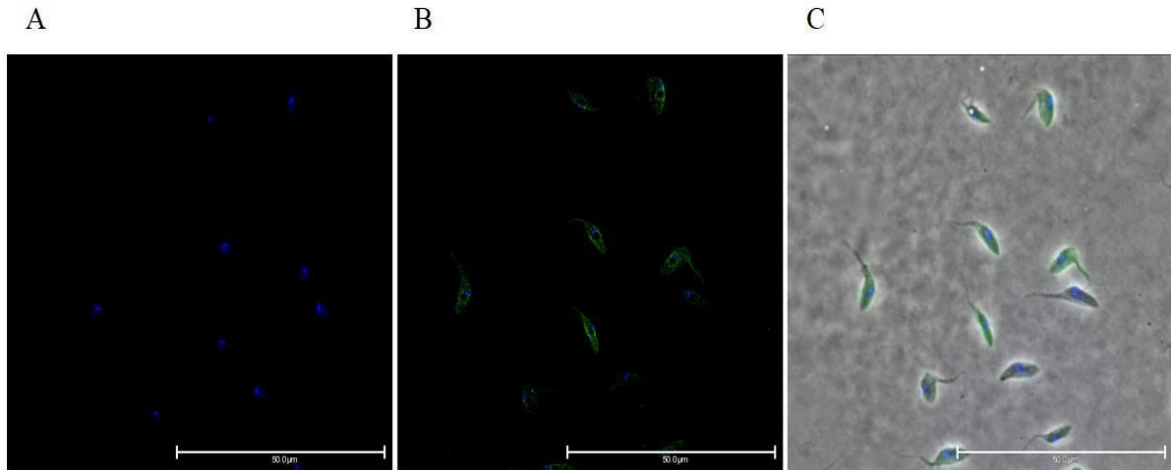


Figura 4.8: Imagens de microscopia de fluorescência com deconvolução do transfetante UXS.1: (A) imagem deconvoluída mostrando a marcação por Hoechst. (B) Imagem deconvoluída mostrando a marcação dos anticorpos primários mouse IgG anti-HA (1:500) e secundário anti-mouse conjugado ao Alexia Fluor 488nm (1:600).(C) Sobreposição das Imagens deconvoluída com a imagem gerada por contraste de fase. Escala da barra: 50 µm.

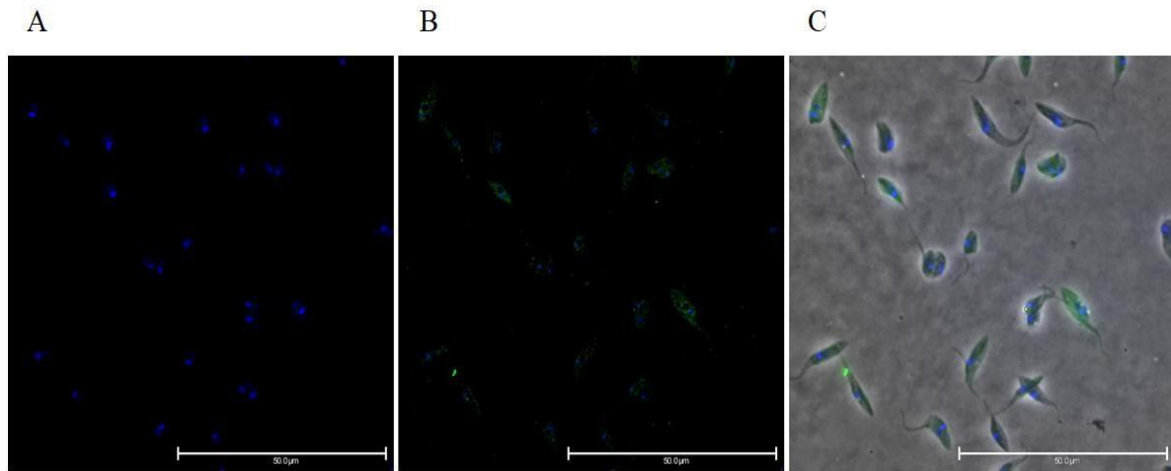


Figura 4.9: Imagens de microscopia de fluorescência com deconvolução do transfetante UXS.17: (A) imagem deconvoluída mostrando a marcação por Hoechst. (B) Imagem deconvoluída mostrando a marcação dos anticorpos primários *mouse* IgG anti-HA (1:500) e secundário anti-mouse conjugado ao Alexa Flúor 488 (in vitro) (1:600), observa-se a baixa intensidade da fluorescência nessas amostras. (C) Sobreposição das Imagens deconvoluídas com a imagem gerada por contraste de fase. Escala da barra: 50 µm.

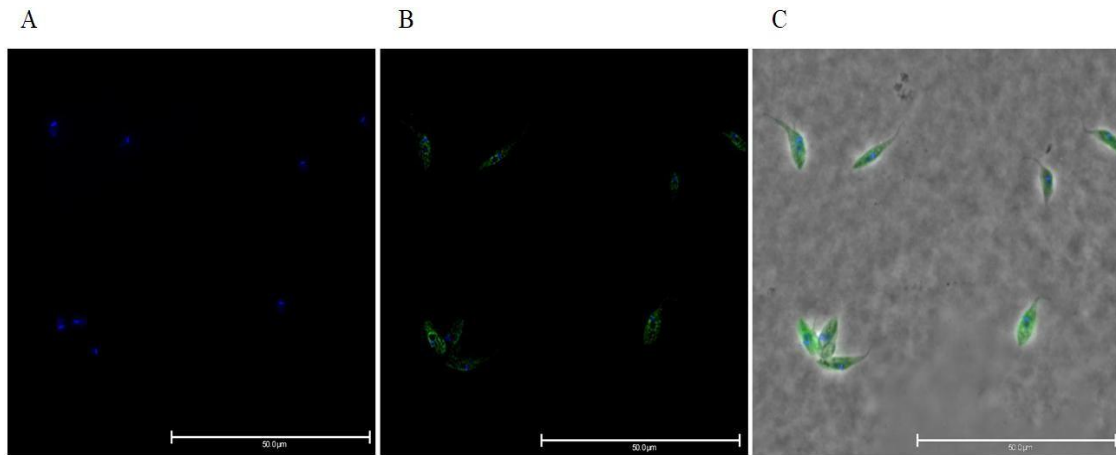


Figura 4.10: Imagens de microscopia de fluorescência com deconvolução do transfectante UGD.35: (A) imagem deconvolvida mostrando a marcação por Hoechst. (B) Imagem deconvolvida mostrando a marcação dos anticorpos primários *mouse* IgG anti-HA (1:500) e secundário anti-mouse conjugado ao Alexa Flúor 488 (invitrogen) (1:600), observa-se um padrão de marcação semelhante a proteína recombinante TcUXS.1. (C) Sobreposição das imagens deconvolvida com a imagem gerada por contraste de fase. Escala da barra: 50 μ m.

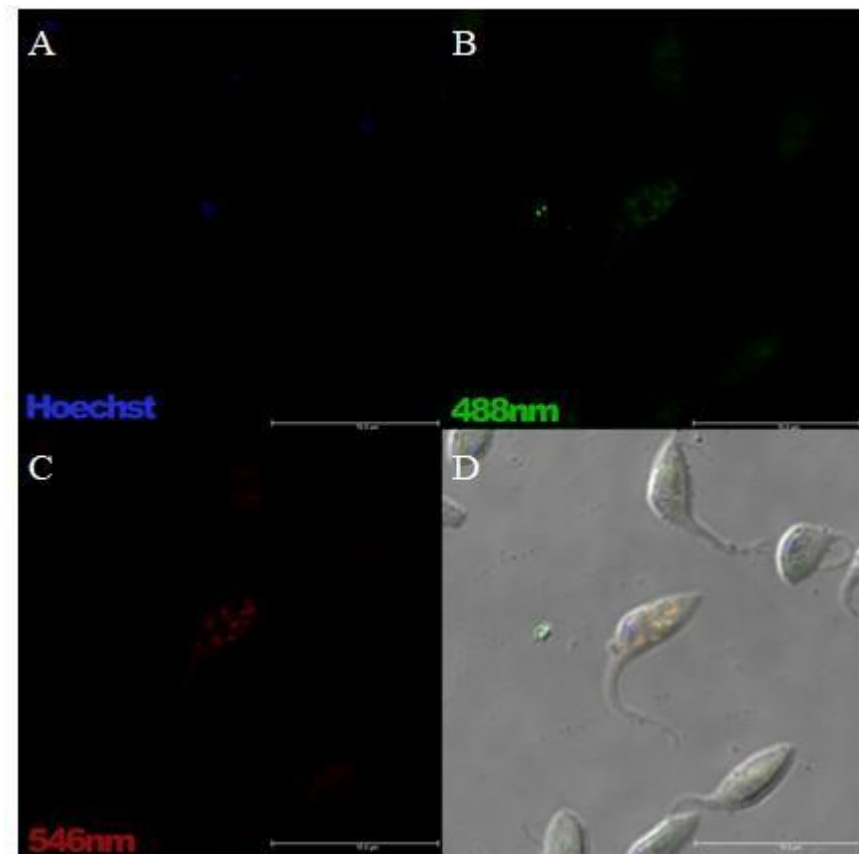


Figura 4.11: Ensaio de colocalização em microscopia confocal da enzima UXS.12 contendo etiqueta 3xHA na região C-terminal. (A) imagem confocal mostrando a marcação por Hoechst. (B) Imagem confocal mostrando a marcação dos anticorpos primários IgG anti-HA feito em coelho (1:250), foi utilizado o fluoróforo 488 Alexa Flúor (invitrogen), (C) Imagem em confocal mostrando a marcação com anticorpos anti-GAPDH (1:75), foi utilizado anticorpo secundário conjugado ao fluorófor 546 Alexa Flúor (invitrogen). (D) Sobreposição das Imagens A, B e C com DIC. Escala da barra: 10 μ m.

4.3 OBTENÇÃO DE PARASITAS NOCAUTES PARA O GENE *TcUGD* e *TcUXS*

A construção dos cassetes para o nocaute dos genes *TcUGD* e *TcUXS* e o método de transfecção utilizado foram descritos no item 3.22.2, da seção de material e métodos. Primeiramente, foi feito o nocaute simples de cada gene, nos quais apenas um dos alelos foi substituído pelo gene de resistência à higromicina e foram parasitas selecionados a uma concentração de 1000 µg/ml. Após a seleção de uma população estável resistente ao antibiótico, foi feita a transfecção com o segundo cassete, que conferia resistência a G418 (500 µg/ml), para o nocaute do segundo alelo.

Em relação ao gene *TcUGD*, a população obtida após o nocaute dos dois alelos foi denominada de *tcugdΔ*. A partir desta população, foram isolados, por diluição limitante, dois clones denominados de *tcugdΔ/7* e *tcugdΔ/11*. A correta integração dos cassetes no DNA genômico dos mutantes foi confirmada por PCR. A análise foi feita com a seguinte combinação de primers: i) UGD Ext_F + UGD Ext_R; ii) UGD Ext _F + Hygro out R; iii) UGD Ext_R + Hygro out F; e iv) Ext_F + Neo EcoR; v) Ext_ R + Neo HindF (fig. 4.12). Os primers UGD Ext_F e UGD Ext amplificam o gene *TcUGD* e suas regiões intergênicas, mas não fazem parte do cassete de integração. Os primers específicos do gene *TcUGD*, 30F1+30R1, que amplificam toda a sequência codificadora, foram utilizados para confirmar a ausência do genes no mutante nulo.

A análise do clone *tcugdΔ/7* está indicada na figura 4.13. Para efeito de comparação, também estão apresentados os resultados da cepa selvagem (WT) e do nocaute simples (Sko), resistente apenas à higromicina. A combinação dos primers Ext F + Ext R gerou, no clone *tcugdΔ/7*, uma banda única (coluna 1, figuras 4.13A e B). Este resultado é comum, embora o esperado fossem duas bandas, 3338pb e 3142pb, já que o cassete de resistência a G418 é maior que o de resistência à higromicina. No parasita selvagem, observa-se, conforme esperado, uma única banda, de 2832pb (coluna 2, figuras 4.13A e B). No mutante simples (Sko), observamos duas bandas, uma correspondente ao locus mutante, no qual um dos alelos foi substituído pelo cassete de resistência à higromicina (3338 pb) e outra, ao locus selvagem (2832 pb) (coluna 3, fig 4.13A e B). No mutante nulo, a combinação de primers UGD ExtF + Hygro outR (2015pb, coluna 4, fig. 4.13A) e UGD ExtR + Hyg outF (2424 pb, coluna 7, fig. 4.13A) geraram produtos de PCR que confirmam a integração correta do cassete. As mesmas bandas aparecem no mutante simples (colunas 6 e 9, fig. 4.13A), mas não no WT (colunas 5 e 8, fig. 4.13A). Os produtos de PCR gerados pela combinação de primers UGDExt_F + Neo EcoR (1783pb, coluna 4, fig.4.13B) e UGD Ext_ R + Neo HindF (2192pb, coluna 7,

fig.4.13B) confirmam a inserção do cassete de NEO no parasita *tcugd* Δ /7, não gerando nenhum produto de PCR nos parasitas selvagem (colunas 5 e 8, fig.4.13B) ou no nocaute simples, que é resistente apenas à higromicina (colunas 6 e 9, fig.4.13B).

A reação duplex usando os *primers* 30F1+30R1 e 90F1+90R1, que amplificam, respectivamente, as sequências codificadoras dos genes *TcUXS* (978 pb) e *TcUGD* (1506 pb), confirmaram a ausência de *TcUGD* no nocaute duplo (coluna 10, fig. 4.13B), mas não no WT (coluna 11, fig. 4.13B), que apresenta os dois genes, ou no mutante simples (coluna 12, fig.4.13B).

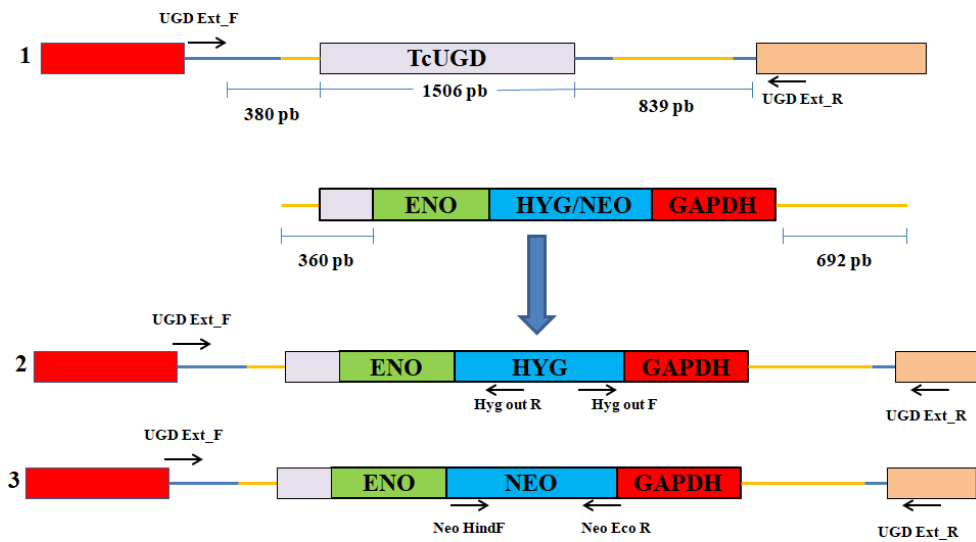


Figura 4.12: Esquematização do nocaute do gene *TcUGD* com os cassetes contendo higromicina e neomicina, apresentando também os primers utilizados para análise do mutante simples nocaute e duplo nocaute. 1) Representação esquemática do loccus do parasita selvagem antes da inserção dos cassetes. 2) Representação esquemática do cassete UGDPHKO após recombinação homóloga. 3) Representação esquemática do cassete UGDPNKO presente no segundo alelo.

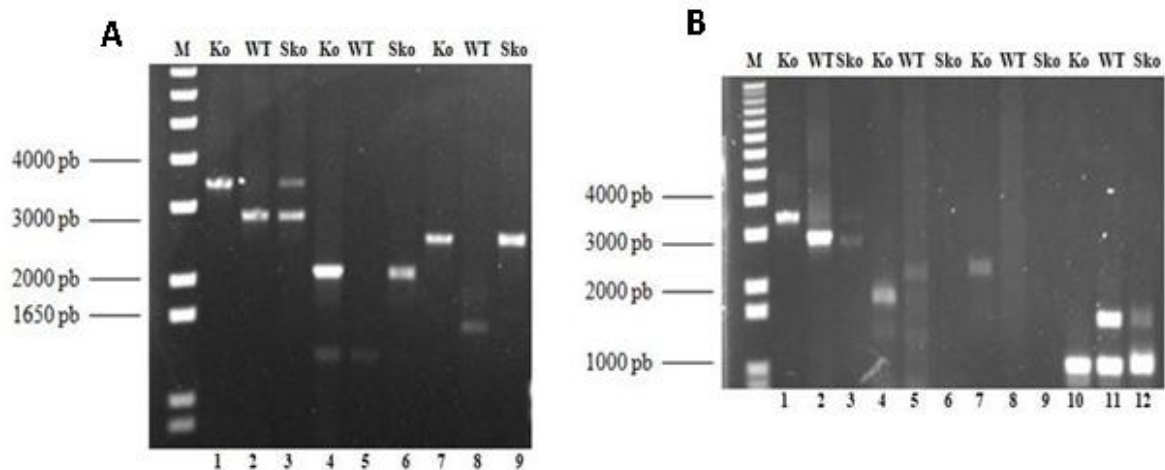


Figura 4.13: Ensaios de PCR para averiguar a correta substituição do gene *TcUGD* pelos cassetes de integração no clone *tcugdΔ/7*. (A) Amostras de DNA genômico do nocaute duplo (*tcugdΔ/7*, coluna 1), da cepa selvagem (WT, coluna 2) e do mutante simples (Sko, coluna 3) foram amplificadas com os *primers* UGD Ext_F e UGD Ext_R (ver figura 4.12 para a localização dos primers). Fragmentos do tamanho esperado foram obtidos com os *primers* Ext_F + Hyg out R no nocaute duplo (coluna 4) e no mutante simples (coluna 6), mas não no WT (coluna 5). Também foi utilizado o par de *primers* Ext_R + Hyg out F, no clone TcUGD/7 (coluna 7) e em SKo (coluna 9). Não houve amplificação no WT (coluna 8). (B) Nesta imagem, mostra-se a mesma estratégia de amplificação empregada para a análise do cassete de higromicina, porém utilizando *primers* que anelam no gene que confere resistência a G418. Observa-se a confirmação da inserção do cassete de neomicina no locus correto com os *primers* Ext_F + Neo EcoR (coluna 4) e Ext_R + Neo HindF (coluna 7). Os mesmos pares de *primers* não amplificam o mutante simples (colunas 6 e 9) ou o WT (colunas 5 e 8). A ausência do gene *TcUGD* no nocaute duplo foi confirmada com o par de *primers* 90F1+90R e 30F1+30R1 (coluna 10). O gene está presente no WT (coluna 11) e no nocaute simples (coluna 12), embora a banda correspondente esteja mais fraca. O gene *TcUXS*, está presente em todos os parasitas (colunas de 10 a 12, banda menor). M: 1 Kb plus DNA ladder (in vitro gen), Ko: nocaute duplo *tcugdΔ/7*, WT: selvagem Dm28c, Sko: Simples nocaute ou mutante simples.

O nocaute do primeiro alelo do gene *TcUXS* foi semelhante ao do gene *TcUGD*. A análise dos mutantes obtidos por PCR foi feita com *primers* equivalentes: os *primers* UXS Ext_F e UXS Ext_R se correspondem aos *primers* UGD Ext_F e UGD Ext_R, enquanto os *primers* Hyg out R; Neo HindF, Neo EcoR são os mesmos. O *primer* Hyg Hind F foi utilizado no lugar de Hyg out F por ter oferecido melhores resultados na análise deste gene (fig. 4.14).

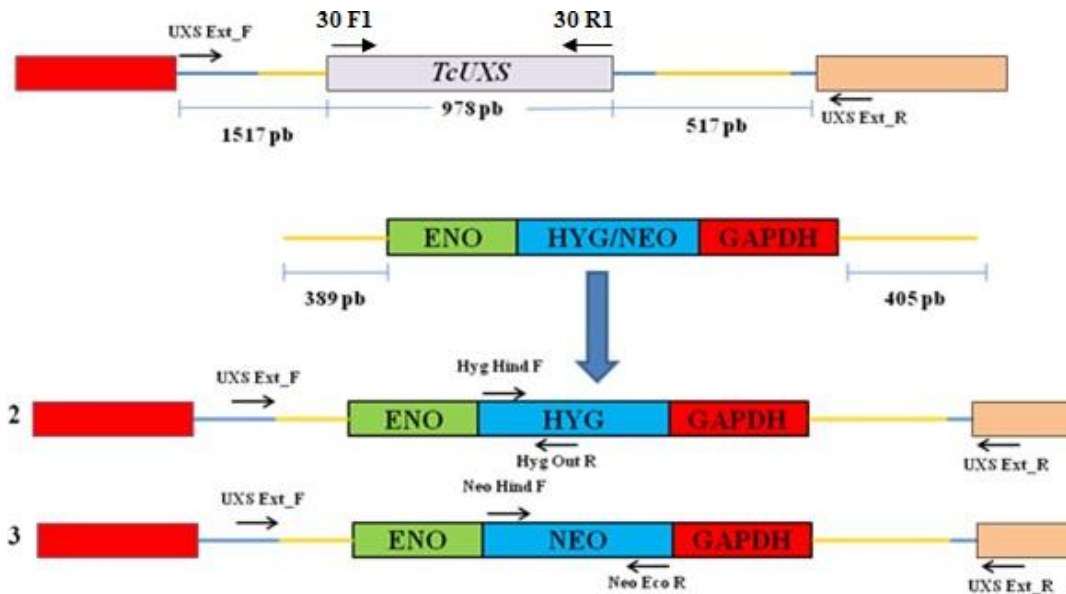


Figura 4.14: Esquemática do nocaute do gene *TcUXS* com os cassetes contendo higromicina e neomicina, apresentando também os primers utilizados para análise do mutante simples nocaute e duplo nocaute. 1) Representação esquemática do locus do parasita selvagem antes da inserção dos cassetes. 2) Representação esquemática do cassete UXSPHKO após recombinação homóloga e deleção do gene. 3) Representação esquemática do cassete UXSPNKO após deleção do gene.

A figura 4.15 apresenta a análise de um mutante simples do gene *TcUXS*, obtido com o cassete de resistência à higromicina. A combinação de *primers* UXS Ext_F + UXS Ext_R gerou dois produtos de PCR, um com 2832pb, correspondendo ao locus selvagem, e outro com 3142 pb, correspondendo ao locus mutante, no qual um dos alelos foi substituído pelo cassete (coluna 1). No parasita selvagem, observa-se, conforme o esperado, apenas uma banda (coluna 2). Os pares de *primers* Ext_F + Hyg out R e Ext_R + Hyg hind F geraram produtos de PCR apenas para o parasita mutante, com produtos de PCR de 1440 pb (coluna 3) e 2157pb (coluna 5), confirmando a correta integração do cassete no locus *TcUXS*. Não houve amplificação nas amostras do selvagem (colunas 4 e 6), que não apresentam o gene de resistência à higromicina.

O mutante simples foi, então, utilizado para a obtenção de um mutante nulo, pela transfecção com o cassete de resistência a G418. Embora tenha sido possível obter transfectantes resistentes aos dois antibióticos, o gene *TcUXS* manteve-se presente no genoma dos parasitas obtidos. Resolvemos, então, manter os parasitas em seleção por mais tempo, na presença dos dois antibióticos, mas o problema não se resolveu (dados não apresentados). Pela possibilidade de que estivéssemos trabalhando com uma população mista, ainda contendo parasitas com o nocaute de apenas um dos alelos, clones foram obtidos por diluição limitante. Apesar disso, o gene *TcUXS* continuou a ser amplificados nas amostras de DNA genômico. Devido à reduzida disponibilidade de tempo, o trabalho prosseguiu apenas com o

gene *TcUGD*, através da caracterização fenotípica do mutante nulo deste gene.

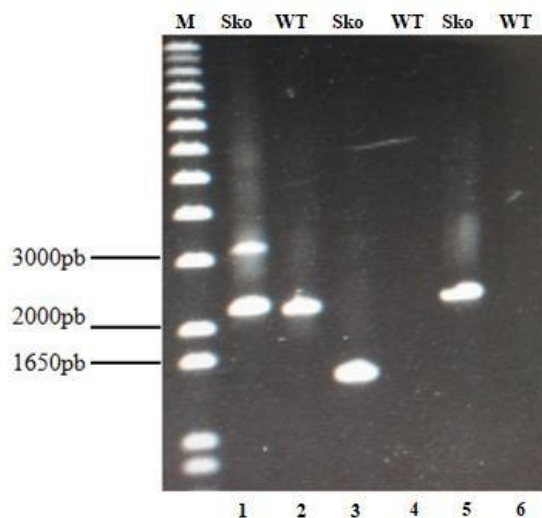


Figura 4.15: Ensaio de PCR para averiguar a inserção do cassete UXSPHKO para deleção de uma das cópias do gene *TcUXS*. As colunas 1 (simple nocaute), 2 (selvagem) são produtos de PCR amplificados com os primers UXD Ext_F e UXD Ext_R. Observa-se a confirmação da presença do cassete de higromicina com os primers Ext_F, Hyg out R no nocaute simples (coluna 3) e Ext_R, Hyg out F (coluna 5). M: 1 Kb plus DNA ladder (invitrogen), Sko: parasita simples nocaute para o gene *TcUXS*; WT: parasita selvagem Dm28c.

4.4 ANÁLISE FENOTÍPICA DO NOCAUTE

4.4.1 Curvas de crescimento

Para avaliar o efeito da deleção do gene *TcUGD* no crescimento das formas epimastigotas, foram feitas curvas de crescimento da cepa selvagem, da população *tcugdΔ* e dos clones *tcugdΔ/7* e *tcugdΔ/11*, em meio LIT, durante o período de 7 dias, com a contagem de células feita a cada 24 h. Foram feitos três experimentos independentes. Em cada experimento, três garrafas de cultivo foram utilizadas para cada população de células. A análise estatística dos dados está descrita no item 3.24, na seção de material e métodos. Na figura 4.16 foram plotados os dados brutos dos experimentos, sem terem sido feitas as médias das garrafas de cada experimento.

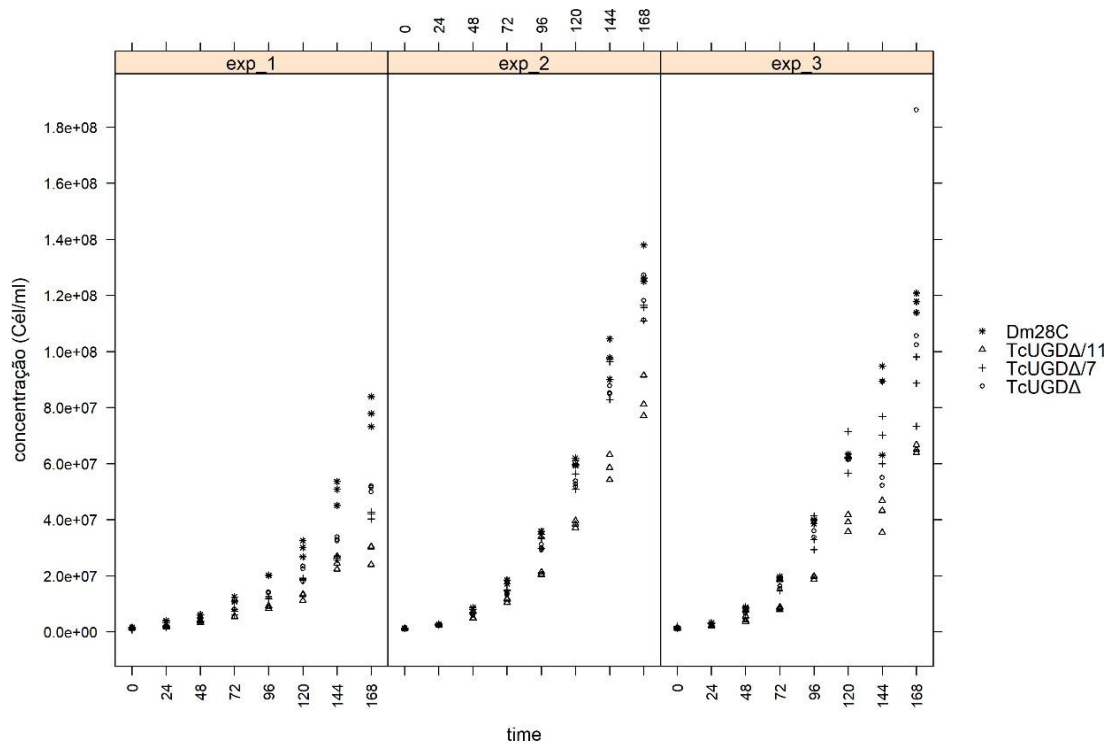


Figura 4.16: Gráfico com o valor bruto da concentração de epimastigotas. Não foi plotado as médias das réplicas, só os valores das triplicatas técnicas de cada população ao longo do tempo. As triplicatas foram feita para o experimento 1 (exp_1), experimento 2 (exp_2) e experimento 3 (exp_3) independentes. Para fazer os gráficos foi utilizado o programa R versão 3.6.2.

Na continuidade da análise dos dados, as réplicas de um mesmo clone, em cada experimento, foram agrupadas em uma única média, como mostrado na figura 32.

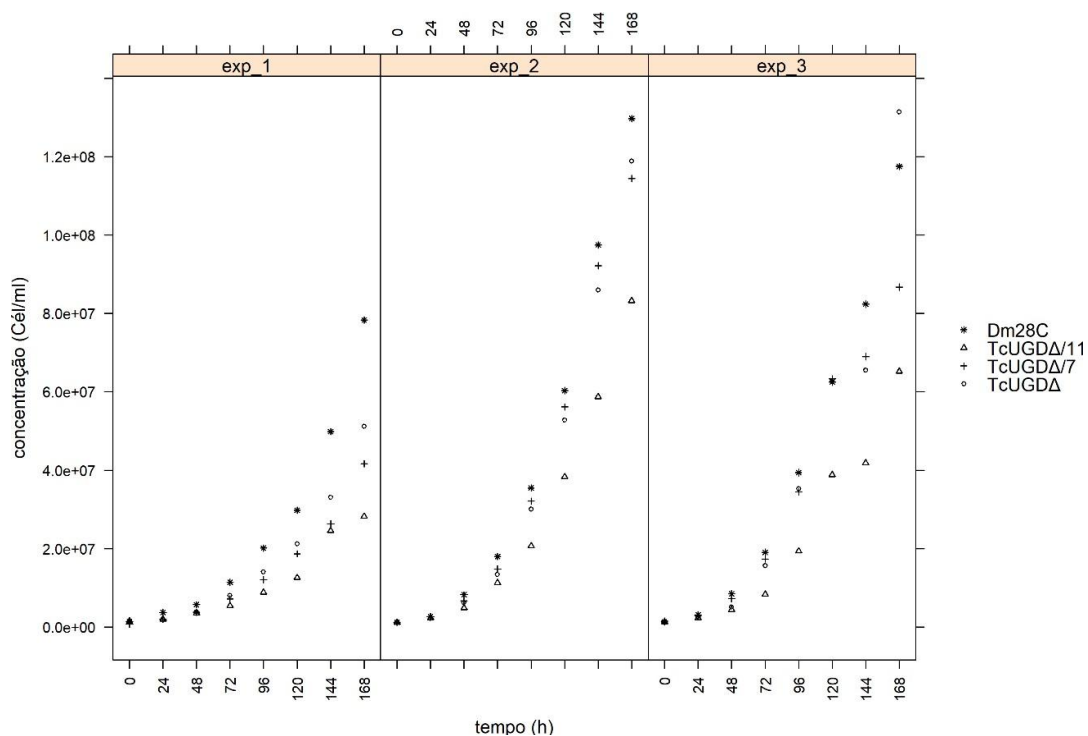


Figura 4.17: Gráfico com as médias dos dados brutos. Neste gráfico é mostrado a média dos valores das triplicadas técnicas feitas para cada população e reproduzidas nos experimentos (exp_1), (exp_2) e (exp_3) independentes.

Devido a características não-lineares das curvas de crescimento, optou-se por utilizar a transformação logarítmica, conforme apresentado nas figuras 4.18 e 4.19, respectivamente, para réplicas desagregadas e agregadas por grupo de um mesmo experimento.

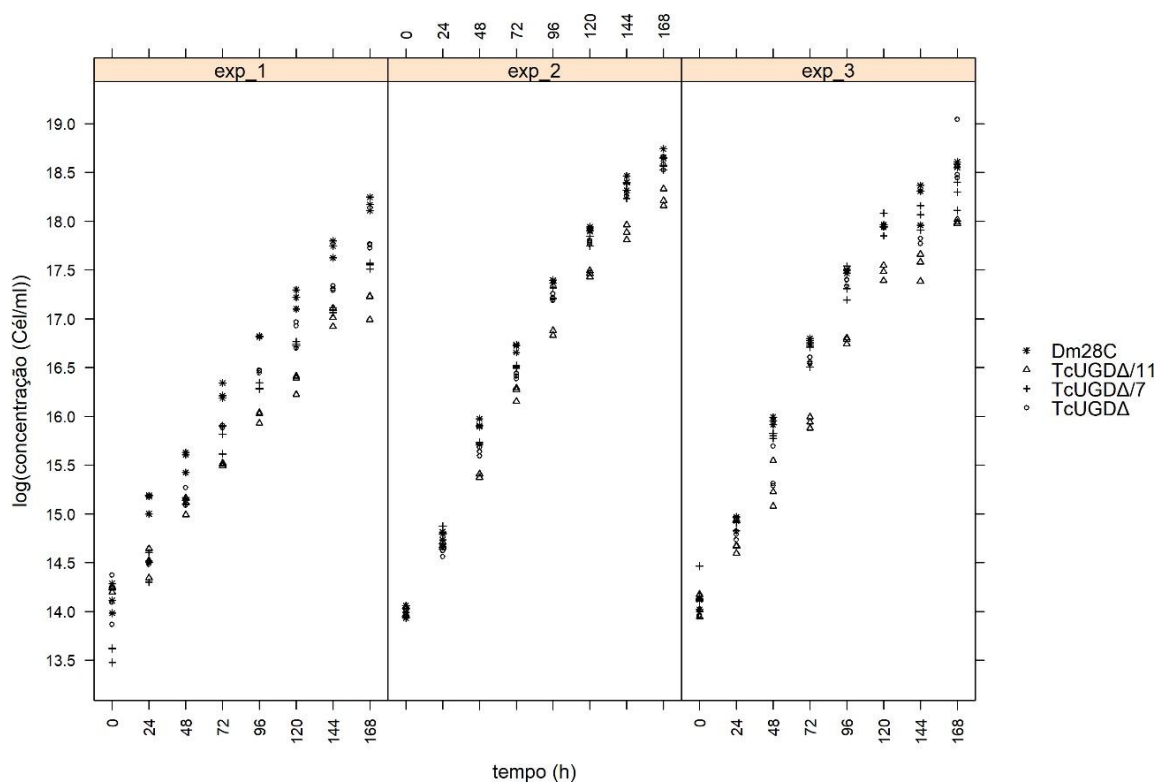


Figura 4.18: Gráfico onde foram plotados os dados brutos de cada triplicada técnica em função logarítmica. Neste gráfico estão representados os dados brutos sem ter plotado as médias das réplicas. Dados não agregados em função logarítmica.

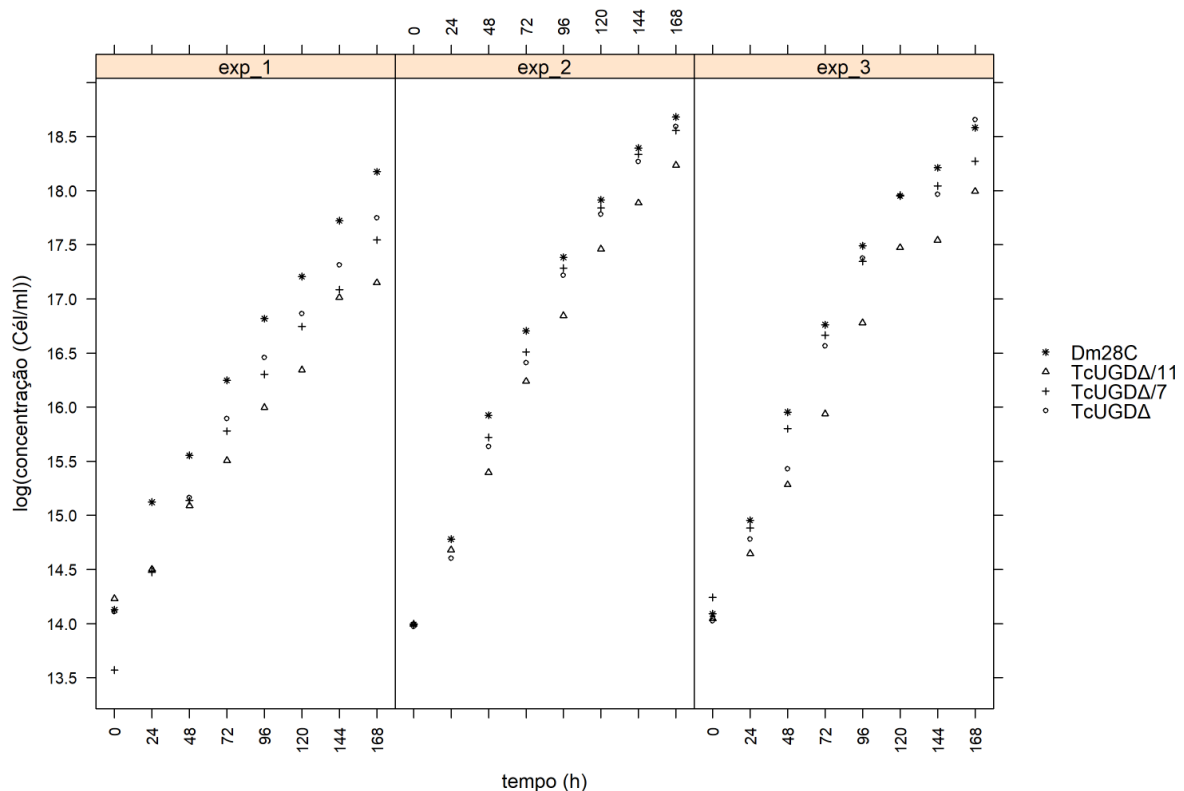


Figura 4.19: Gráfico com as médias de cada triplicata técnica reproduzidas nos experimentos (exp_1), (exp_2) e (exp_3) plotados em função logarítmica.

Após o ajuste de modelo linear com efeitos mistos, observou-se um efeito significativo para a variável grupo (p-valor de 0,0021). Para comparações entre as categorias desta variável, foi utilizado o teste de Dunnett. As diferenças observadas entre o grupo selvagem Dm28c e os grupos com gene nocauteado foram:

TcUGDΔ/11 vs. Dm28C: -0,519 (IC95%: -0,740; -0,297), p-valor: 0,0009

TcUGDΔ/7 vs. Dm28C: -0,243 (IC95%: -0,465; -0,021), p-valor: 0,0345

TcUGDΔ vs. Dm28C: -0,224 (IC95%: -0,446; -0,002), p-valor: 0,0480

Ou seja, todas as diferenças foram significativas. Logo, há evidências de que o crescimento dos três populações que contêm o gene *TcUGD* nocauteado é menor que o da população selvagem de *T. cruzi*, nas condições analisadas.

4.4.2 Ensaio de metaciclogênese

Para avaliar se houve alteração na diferenciação celular dos parasitas nocautes, foi feito o ensaio de metaciclogênese *in vitro*, de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, descrito no item 3.15 da seção de materiais e métodos. Nesta análise de metaciclogênese,

apenas a população *tcugdΔ* foi comparada com a cepa selvagem de *T. cruzi*. Foram feitos dois experimentos independentes: o primeiro com 3 réplicas para cada população de células; e o segundo, devido a uma problema de contaminação com 2 réplicas para o mutante e 3 réplicas para o selvagem. A análise estatística empregada está descrita no item 3.24. No primeiro ensaio, os parasitas foram submetidos a 72h de diferenciação, com 11,1% da população do clone Dm28c transformada em metacíclicos e o mutante com 7,56% da população diferenciada. No segundo, após 72h, a taxa de diferenciação havia sido muito baixa, mesmo para a cepa selvagem; por esta razão, a contagem diferencial de metacíclicos foi feita após 96 h de diferenciação no meio TAU 3AAG. Neste caso, a taxa de diferenciação da cepa selvagem foi de 28,7% e do mutante de 13,42%. No experimento realizado em 72 horas, a diferença entre a média do logaritmo de parasitas na forma infectiva do clone Dm28c e a do clone *tcugdΔ* foi de 0,389 (IC95%: 0,026;0,753), p-valor: 0,04173. Já para o experimento em 96 horas, esta diferença foi de 0,672 (IC95%: -0,503; 1,848) com p-valor de 0.1415. A figura 4.20 mostra o gráfico da metaciclogênese dos experimentos com 72h e 96h.

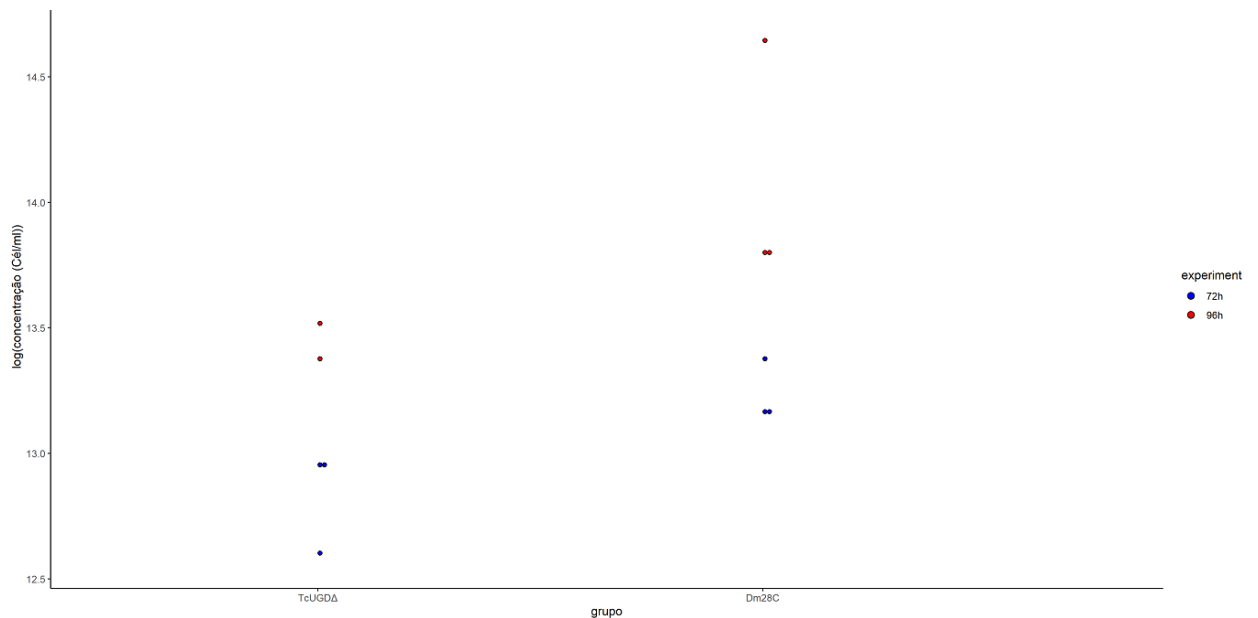


Figura 4.20: Gráfico mostrando a análise da diferenciação dos parasitas nocaute e selvagem. Foi plotado no gráfico a média logaritmica da concentração de células.

4.4.3 Análise da porção glicana da proteína GP72 por *western blot* e imunofluorescência

Após a confirmação do nocaute do gene *TcUGD* foi feito o *western blot* dos parasitas Dm28c, cepa Y, *tcugd* Δ , *tcugd* Δ /7 e *tcugd* Δ /11, utilizando o anticorpo monoclonal mAb WIC 29.26, que reconhece a porção glicana da proteína GP72, envolvida com a adesão flagelar. O epítipo reconhecido pelo anticorpo está presente, provavelmente, em outras glicoproteínas do parasita (JESUS *et al.*, 1993). Como pode-se observar na figura 4.21, houve ausência de marcação nas populações nocaute. Além do *western blot* essa alteração também foi investigada com o uso de microscopia de fluorescência utilizando parasitas nas formas epimastigotas. Observa-se que na imunofluorescência houve marcação apenas nos parasitas selvagens (fig. 4.22A) e ausência nos clones *tcugd* Δ /7 (fig. 4.22B), *tcugd* Δ /11 (fig. 4.22C) e na população *tcugd* Δ (fig. 4.22D), coincidindo com o resultado apresentando em *western blot*. Apesar de apresentar uma fluorescência mais intensa na bolsa flagelar e no flagelo, nota-se que a marcação com o anticorpo mAb WIC 29.26 não se restringiu a essas regiões, mas em toda a superfície do epimastigota selvagem.

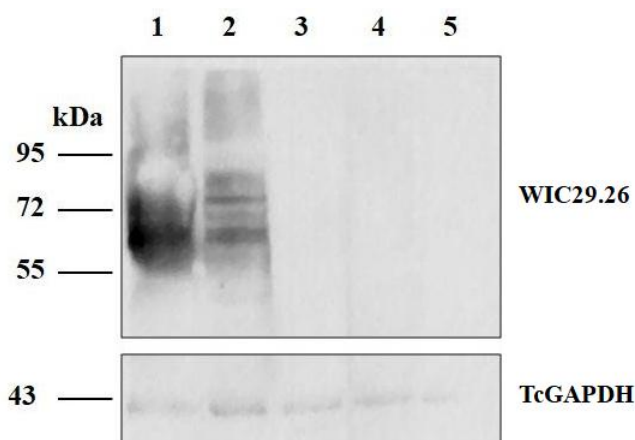


Figura 4.21: *Western blot* mostrando a presença do epítipo WIC29.26 em glicoproteínas no extrato proteico de epimastigotas: clones Dm28 (lane 1), cepa Y (lane 2), *tcugd* Δ /7 (lane 3), *tcugd* Δ /11 (lane 4) e *tcugd* Δ (lane 5). As amostras foram incubadas com o anticorpo WIC29.26 (1:2000) e anti-TcGAPDH (1:500). Foi utilizado o marcador *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fischer Scientific).

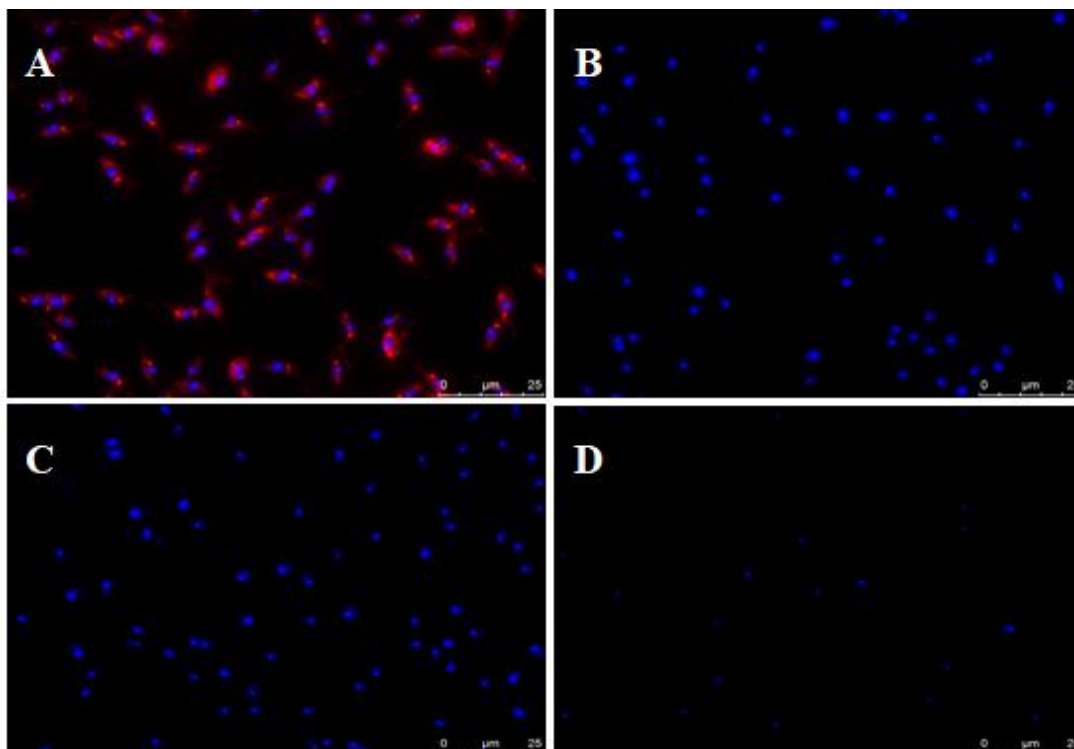


Figura 4.22: Imunofluorescência para averiguar a presença das porções glicanas nos mutantes: foi feita a comparação da marcação de epimastigotas selvagens e mutantes, incubados com anticorpo mAb WIC 29.26 (diluição:1:2000) e secundário Alexa fluor 546 anti-mouse, para marcar o DNA genômico e mitocondrial foi usado o corante Hoechst. No quadrante (A) selvagens, (B) são os parasitas *tcugdΔ/7*, (C) *tcugdΔ/11* e (D) *tcugdΔ*. Escala da barra: 25 μ m.

4.4.4 Microscopia eletrônica de varredura

Uma vez que a proteína GP72 está envolvida na adesão flagelar (figuras 1.3 e 1.4 introdução), foi feita a microscopia eletrônica de varredura, seguindo o método descrito no item 3.25 na seção de material e métodos no preparo das amostras, para investigar uma possível alteração morfológica nos parasitas mutantes, com foco na adesão do flagelo ao corpo celular. Como se observa na figura 38, nenhuma modificação morfológica nos parasitas *tcugdΔ/7* (fig. 4.23B) e *tcugdΔ/11* (fig. 4.23C) foi observada ao ser comparada com o parasita selvagem (fig. 4.23A). Vários campos foram analisados, obtendo-se o mesmo resultado. Os parasitas mutantes aparentemente mantêm uma morfologia semelhante ao selvagem com o flagelo aderido ao corpo celular.

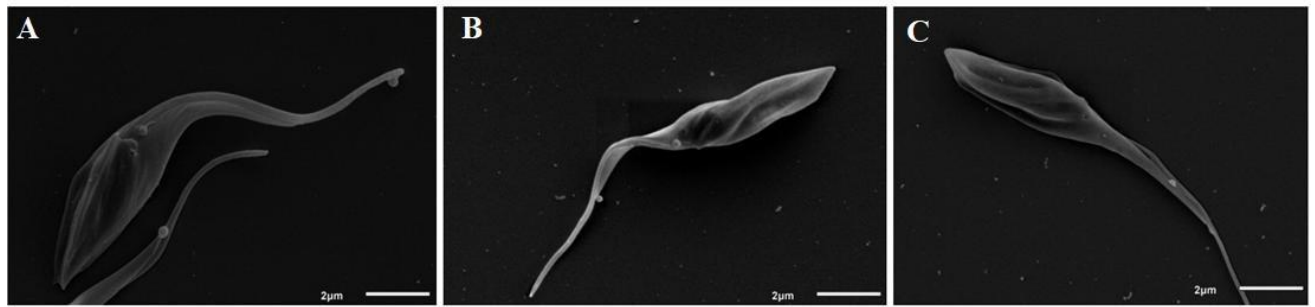


Figura 4.23: Microscopia de eletrônica de varredura para investigar a morfologia dos mutantes. Na imagem é mostrado os parasitas selvagem (A) e os mutantes *tcugd/7Δ* (B) e *tcugd/11Δ* (C) na forma epimastigota. Escala da barra: 2 μm .

4.4.5 Microscopia eletrônica de transmissão

Frente a análise feita em microscopia eletrônica de varredura não ter revelado nenhuma alteração aparente nos mutantes, foi feita a análise por microscopia eletrônica de transmissão para investigar possíveis alterações no interior do parasita nocaute, principalmente na região da bolsa flagelar. Nesta análise, foi utilizado apenas o clone *tcugdΔ/7*. Como a bolsa flagelar e o flagelo do mutante nulo (fig.4.24B) se mantêm semelhante a mesma região apresentada no selvagem (fig.4.24A). O flagelo está aderido ao corpo celular do parasita, não sendo visível qualquer alteração em outras organelas no mutante em relação o parasita selvagem.

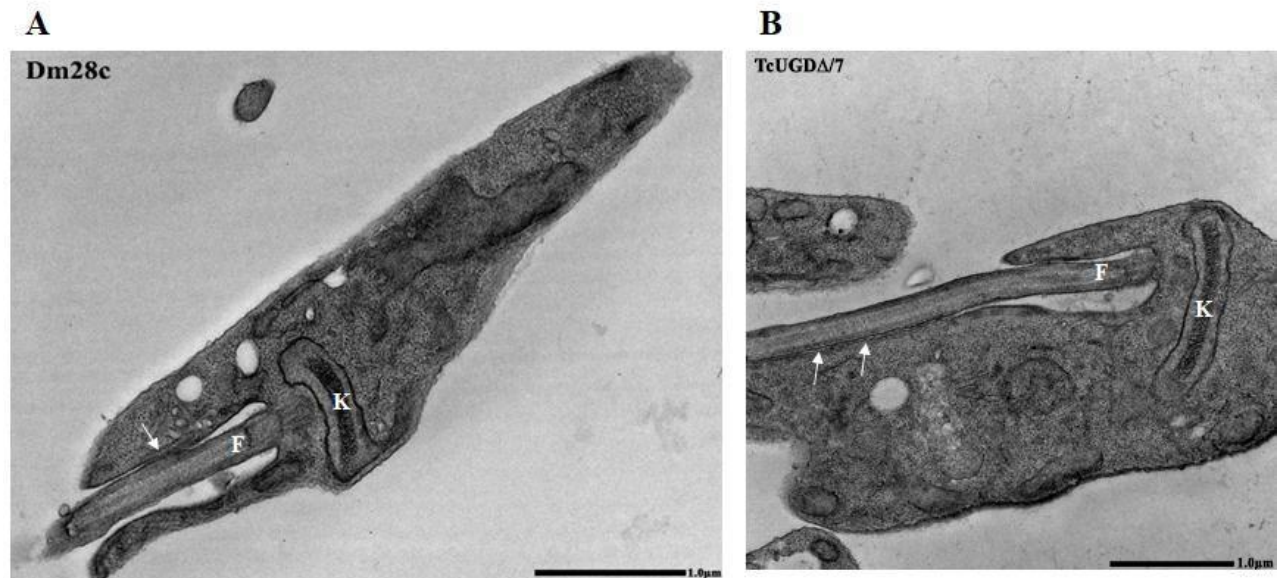


Figura 4.24: Imagens de microscopia eletrônica de transmissão. (A) observa-se o parasita selvagem epimastigota onde pode-se indentificar o flagelo (F), e o cinetoplasto (K). (B) Nesta imagem observa-se o mutante *TcugdΔ/7* sendo identificado o flagelo e o cinetoplasto, as flechas em branco mostram o flagelo aderido ao corpo do parasita. Escala da barra: 1 μm .

5. DISCUSSÃO

5.1 ANÁLISE IN SILICO

Os glicoconjugados são necessários para a adaptação, crescimento e sobrevivência dos tripanossomatídeos, e os nucleotídeos-açúcares são fundamentais na síntese destas moléculas. O conhecimento das vias de síntese dos nucleotídeos-açúcares permite com que elas se tornem potenciais alvos terapêuticos, por exemplo, descobriu-se que além da enzima UDP-glicose epimerase (TcGALE) em *T. cruzi* ser essencial para a sobrevivência do parasita, ela também é diferente da sua correspondente em mamíferos pois é incapaz de converter UDP-GlcNac em UDP-GalNac (ROPER; FERGUSON, 2003). Outro exemplo é a descoberta de que o carboidrato galactofuranose (Galf) não é encontrado em glicoconjugados de células de mamíferos, tornando a via de conversão de UDP-galp em UDP-galf pela enzima TcUGM potencial alvo de estudos (TURNOCK; FERGUSON, 2007). Dentre os tripanossomatídeos de importância médica, apenas em *T. cruzi* foi encontrado genes candidatos envolvidos na síntese de UDP-xilose a partir de UDP-glicose (TURNOCK; FERGUSON, 2007).

O genoma de *T. cruzi* é muito repetitivo (EL-SAYED *et al.*, 2005) com várias famílias gênicas, incluindo os genes de glicoconjugados importantes, como as mucinas e transialidades, codificadas por mais de 800 genes (BUSCAGLIA *et al.*, 2006; dC-RUBIN, SCHENKAN, 2012). De acordo com o sequenciamento das cepas Cl Brener e pela montagem do genoma do Dm28c utilizando a plataforma PACBIO (PROBST, C. M; submetido para publicação), os genes *TcUGD* e *TcUXS* seriam de cópia única, o que possibilitava a abordagem proposta inicialmente de nocaute de ambos os genes por recombinação homóloga, com cassetes de integração que substituiriam os genes endógenos por marcas de seleção. O nocaute do gene *TcUGD* confirma a predição de cópia única e a viabilidade desta abordagem proposta, já utilizada em outros trabalhos de nosso laboratório (SOUZA *et al.*, 2012; MOREIRA *et al.*, 2017; VISNIESKI *et al.*, 2018). Não foi possível, no entanto, obter o nocaute do gene *TcUXS*. Obtivemos parasitas resistentes aos antibióticos, mas a presença do gene ainda era detectada por PCR. Mesmo após a obtenção de clones, por diluição limitante, o gene se mantinha presente. Apesar da possibilidade de que o gene esteja presente em mais de uma cópia, acreditamos que a possibilidade de que o cassete de resistência a G418 tenha se integrado em outro *locus* no genoma seja mais provável.

De acordo com a análise *in silico*, a enzima TcUGD apresenta três domínios e um motivo conservado, GxGxxG, presente no domínio amino-terminal da enzima. Embora não

tenha sido demonstrado experimentalmente que a enzima TcUGD converte UDP-Glc em UDP-GlcA, os domínios da enzima TcUGD estão presentes em procariotos e em eucariotos inferiores e superiores, sendo eles um amino-terminal, envolvido na ligação com NAD, um domínio central e um domínio C-terminal, envolvido na ligação com o nucleotídeo UDP. A análise *in silico*, portanto, sugere a enzima TcUGD seja funcional. Com a relação a enzima TcUXS, ela também apresenta a dobra de Rossman e os domínios N-terminal e C-terminal encontrados nas enzimas de *Cryptococcus neoformans* e *Homo sapiens*, sugerindo que ela possa catalisar a conversão de UDP-GlcA em UDP-Xil.

5.2 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR

As imagens de microscopia de fluorescência (fig. 4.8, 4.9 e 4.10) mostram um padrão de marcação das enzimas TcUGD e TcUXS com a tag 3xHA na região amino-terminal que difere do padrão de TcGAPDH (fig. 4.7), porém a marcação da proteína TcUXS com tag 3xHA na região C-terminal apresentou aparente colocalização com TcGAPDH (fig.4.11). Para a enzima TcUGD com tag carboxi-terminal, não foi possível determinar o padrão de marcação devido a baixa emissão de fluorescência. Essa diferença na marcação se deve possivelmente a alteração no sinal de endereçamento presente nas enzimas. As proteínas presentes em glicossomos e peroxissomos possuem, em geral, a sequência –SKL no final de sua extremidade carboxi-terminal (PTS1). Esta sequência, no entanto, pode sofrer variações, com a substituição do primeiro aminoácido por qualquer aminoácido neutro, do segundo, por um aminoácido capaz de formar pontes de hidrogênio, e do terceiro, por um aminoácido hidrofóbico (SOMMER; WANG, 1994; OPPERDOES; SZIKORA, 2006). Nenhuma destas possíveis formas variantes foi encontrada em TcUGD ou TcUXS. Além de PTS1, há um outro sinal, localizado na extremidade amino-terminal (PTS2), com a sequência consenso [RK]-[LVI]-x5-[HQ]-[LA] (OPPERDOES; SZIKORA, 2006). Embora esteja na região amino-terminal, esta sequência possui uma posição variável em relação ao início da proteína. Há ainda, embora seja menos comum, proteínas que não possuem um sinal típico de endereçamento. A enzima fosfoglucomutase, de *T. cruzi*, por exemplo, responsável pela interconversão de glicose 1-fosfato e glicose 6-fosfato, não possui nenhum dos sinais PTS. O endereçamento para o glicossomo parece ser feito por um domínio interno localizado entre os aminoácidos 260 e 380 (PENHA *et al.*,2009). Programas de predição de localização subcelular de proteínas, tais como PSORT II e DeppLoc-1.0, não forneceram resultados conclusivos de localização de TcUGD ou TcUXS. Apesar do padrão de marcação dos

parasitas contendo a proteína TcUXS com etiqueta na região carboxi-terminal aparentemente colocalizar com a marcação glicossomal, ainda serão necessários mais ensaios para averiguar se as enzimas TcUXS e TcUGD estão presentes no glicossomo.

5.3 ANÁLISE FENOTÍPICA DO NOCAUTE DO GENE *TcUGD*

O nocaute do gene *TcUGD* foi obtido com sucesso, como se mostrou pela ausência do gene no genoma dos parasitas mutantes por PCR (coluna 10, fig. 4.13). Teria sido importante a análise de TcUGD no mutante nulo por *western blot*, mas não obtivemos um anti-soro reativo contra a proteína. Inicialmente, tentamos expressar toda a proteína em bactérias, mas sem sucesso. Foi feita, então, a expressão de um domínio globular, correspondente aos primeiros 218 aminoácidos, com base no modelo estrutural da proteína (fig. 4.5). Este domínio foi purificado de corpos de inclusão e inoculado em camundongos, mas o anti-soro obtido não reconheceu a proteína em extratos proteicos de *T. cruzi* (dados não apresentados).

Após a obtenção dos mutantes nulos, foram feitos ensaios para observar os efeitos da deleção do gene *TcUGD*. O primeiro ensaio foi a análise da interação do anticorpo mAb WIC29.26 com a proteína GP72 por *western blot* (fig. 4.21). Este anticorpo reconhece um epítipo presente na porção glicana de GP72 e de outras glicoproteínas de *T. cruzi* (SNARY *et al*, 1981). A marcação por fluorescência indireta do epítipo WIC29.26 revela sua presença no flagelo e na superfície de epimastigotas e metaciclícos (HAYNES; RUSSEL; CROSS, 1996). Nossos resultados de imunofluorescência de epimastigotas (fig.4.22), com a marcação na superfície do parasita, se intensificando na região da bolsa flagelar, confirmam os dados da literatura. Um resultado particularmente interessante foi a ausência de marcação do anticorpo mAb WIC29.26 nos mutantes duplos nocautes *tcugd* Δ /7 (coluna 3, fig.4.21) *tcugd* Δ /11 (coluna 4, fig.4.21), e *tcugd* Δ (coluna 5, fig.4.21) por *western blot*. Esse resultado é um indício do envolvimento da enzima TcUGD na síntese de xilose, pois este carboidrato é encontrado no oligossacarídeo presente em GP72, com base na estrutura proposta por Allen e colaboradores (fig.1.5). A xilose ocupa uma posição central nas cadeias oligossacarídicas, o que significa que, na sua ausência, não há a incorporação subsequente de resíduos de fucose, ramnose e galactose. A ausência de marcação está provavelmente associada com a glicosilação parcial e defeituosa de GP72.

Esses resultados nos fizeram cogitar na possibilidade de a adesão do flagelo nos parasitas nocautes do gene *TcUGD* ter sido afetada, já que o nocaute de GP72 faz com que o flagelo fique desaderido do corpo do parasita (figuras 1.3 e 1.4, na Introdução) (COOPER;

JESUS; CROSS, 1993). Além disso, o nocaute da enzima TbGMD, envolvida na síntese de GDP-fucose em *T. brucei*, apresentou formas prociclícas com o flagelo desaderido. Esse fenótipo foi atribuído a alteração na composição glicana da glicoproteína FLA-1 devido a ausência de fucose (TURNOCK; IZQUIERDO; FERGUSON, 2007). Esta proteína é homóloga a glicoproteína GP72, que também possui fucose em sua composição. Pelos ensaios feitos por microscopia eletrônica de varredura, no entanto, não foi identificada nenhuma alteração no flagelo dos parasitas mutantes (fig. 4.23C e D), quando se compara com a imagem do parasita selvagem (fig. 4.23A). Por não ter sido identificada uma modificação morfológica por microscopia eletrônica de varredura, foram feitos ensaios com microscopia eletrônica de transmissão, para visualizar algum tipo de alteração no interior do parasita. Pelas imagens obtidas, nota-se que o flagelo do parasita mutante *tcugd* Δ /7 (fig.4.24B), ao sair da bolsa flagelar, se mantêm aderido ao corpo celular do parasita, não aparentando diferença com relação ao parasita selvagem (fig.4.24A). Este resultado foi, de certa forma, surpreendente, devido ao fato de a glicosilação de GP72 estar afetada nos mutantes. É importante notar que desconhecemos se GP72 esta presente nos mutantes, por não termos anticorpos contra a cadeia polipeptídica da proteína, Os resultados sugerem, no entanto, que GP72 esteja presente e que sua porção glicana não seja necessária para a sua atividade na adesão flagelar. É uma hipótese consistente com nossos resultados, mas curiosa, já que os oligossacarídeos de GP72 chegam a corresponder a 49% de sua massa molecular (FERGUSON; ALLEN; SNARY, 1983). Naturalmente, a glicosilação pode ser essencial para outras funções de GP72, cujo nocaute também resulta no decréscimo da diferenciação do parasita no insetor vetor e na infectividade de camundongos. Será interessante avaliar, em primeiro lugar, se GP72 está, de fato, presente nos mutantes nulos de *tcugd* Δ , e se a diferenciação e infectividade *in vivo* dos mutantes estão afetadas.

Em seguida, foi analisado o crescimento de epimastigotas em meio LIT. De acordo com análise estatística, feita pela modelagem da curva de crescimento (fig.4.19) usando o modelo linear de efeitos mistos (Pinheiro, Bates, 2000) e o teste de Dunnet (Dunnett, 1964) juntamente com o valor do *p-value* gerado nessa análise, foi observada diferença no crescimento dos clones nocaute em relação ao selvagem. Foi observado que os clones *tcugd* Δ /7, *tcugd* Δ /11 e a população mãe *tcugd* Δ tiveram um crescimento menor em relação ao selvagem, sendo a diferença mais significativa no clone *tcugd* Δ /11 que teve uma concentração de parasitas menor do que todos eles. Depreende-se pela análise da curva de crescimento que a provável falta ou a redução da síntese de UDP-xilose afetou o crescimento dos mutantes parasitas. O modelo linear de efeitos mistos foi usado para considerar a dependência entre as

medidas repetidas na mesma unidade experimental (garrafas). Foi utilizada também a transformação logarítmica para linearizar a curva de crescimento e também tornar a variabilidade nas concentrações medidas constante ao longo do tempo.

A correlação entre a redução na síntese de determinado nucleotídeo-açúcar com o crescimento do parasita foi relatada em *Leishmania mexicana*, com a redução na proliferação celular em um mutante da enzima fosfomanose isomerase, responsável pela interconversão de frutose 6-fosfato e manose 6-fosfato, uma etapa necessária para a síntese de GDP-manose (GARAMI; ILG, 2000). Outro fenômeno observado foi a recuperação do crescimento dos mutantes pela suplementação de manose em concentrações de 200 μM . A suplementação deste açúcar e a recuperação do fenótipo destes parasitas se deve, possivelmente, à presença da *via salvage* para sintetizar GDP-manose a partir da captura do açúcar do meio ou reciclagem do mesmo de glicoconjugados degradados. (GARAMI; ILG, 2000).

A compensação na síntese de nucleotídeo-açúcar por uma via alternativa também foi observada com UDP-Gal em *L. major* que apesar do gene codificante da enzima UDP-glicose 4- epimerase envolvida na etapa de conversão de UDP-Glc em UDP-Gal ter sido nocauteado, seus efeitos não foram letais, diferentemente do observado em *T. brucei* e *T. cruzi* (LAMERS *et al.*, 2010). O fato do nocaute desta enzima não ter sido letal, provavelmente se deu devido à capacidade do parasita de captar galactose do meio e da conversão de Gal-1P em UDP-Gal pela ação de uma nucleotidiltransferase (DAMERWO, S. *et al.*, 2015), semelhante à enzima Tcsloppy, de *T. cruzi*, abordada na Introdução. Em *T. cruzi*, seria possível a síntese de xilose por uma via alternativa, por meio da enzima Tcsloppy, que converte xilose-1-fosfato em UDP-xilose ou pela conversão de ácido glucurônico-1-fosfato em UDP-ácido-glucurônico, que, em seguida, poderia ser convertido em UDP-xilose na segunda etapa da via *de novo*. É importante destacar que nenhum transportador de xilose ou ácido glucurônico foi identificado no parasita (YANG; PELED, 2010), o que seria necessário para a captação destes açúcares do meio de cultura. Além disso, a afinidade de Tcsloppy por xilose-1-fosfato é muito baixa ($K_m = 2538,8 \mu\text{M}$). A afinidade na enzima por glicose-1-fosfato, por exemplo, é muito maior (K_m de 177 μM). Por enquanto, não se sabe a relevância de Tcsloppy para *T. cruzi*. Nossos resultados, no entanto, sugerem que o parasita não seja capaz de sintetizar UDP-xilose pela via salvage, pelo menos não em quantidade suficiente para a glicosilação de GP72 ou o crescimento normal em meio LIT.

5.4 ENSAIO DE METACICLOGÊNESE

Os ensaios de metaciclogênese (fig.4.20), embora sejam preliminares, sugerem uma diminuição na capacidade de diferenciação dos parasitas mutantes estressados por 72 horas. No ensaio de 96 horas, foi obtida uma diferenciação semelhante a do parasita selvagem. Embora seja necessário realizar mais experimentos para se obter dados mais robustos, esses ensaios mostram que as formas epimastigotas não perderam a capacidade de se transformar na forma infectiva. Foi observado nos nocautes de GP72 um crescimento e diferenciação *in vitro* semelhantes aos níveis do parasita selvagem, não havendo alterações na infectividade de macrófagos e de células não fagocíticas. Além disso, a resistência das formas metacíclicas à lise pelo sistema complemento e a expressão de transialidases não foram afetadas (JESUS, R.B. *et al.*,1993). Porém, conforme discutido anteriormente, em ensaios *in vivo* os mutantes exibiram uma considerável redução na infectividade em camundongos e na sobrevivência no interior do inseto vetor (BASOMBRÍO *et al.*, 2002). Além dos fenótipos constados nos ensaios *in vivo*, foi observada que a interação do anticorpo mAbWIC.29.26 com o epítipo presente na GP72 e em outras glicoproteínas, inibe a diferenciação do parasita na forma epimastigota para tripomastigota metacíclico (SHER; SNARY, 1982). Isso mostra que possivelmente existe uma interação análoga entre essas porções glicanas detentoras de xilose com lectinas presente no interior do inseto vetor, desempenhando um papel importante para a regulação na diferenciação do parasita no barbeiro. Apesar de não termos dados infectividade, é razoável supor que o nocaute do gene *TcUGD* possa afetar a virulência e sobrevivência do parasita *in vivo*.

6. CONCLUSÕES

Com base nos dados obtidos podemos concluir que:

1. O gene *TcUGD* não é essencial em *T. cruzi*, uma vez que foi possível obter uma população estável na qual o gene não é detectado por PCR;
2. O nocaute do gene *TcUGD* reduz a taxa de crescimento de epimastigotas de *T. Cruzi* em meio LIT;
3. O nocaute do gene *TcUGD* altera o padrão de glicosilação da proteína GP72 de *T. cruzi*, mas não afeta a adesão flagelar no parasita.

7. PERSPECTIVAS

Este trabalho abre algumas perspectivas para estudos posteriores com os genes *TcUXS* e *TcUGD*:

- Obter o nocaute do gene *TcUXS* em *T. cruzi* a fim de estudar os efeitos no crescimento, diferenciação e infecção no parasita.
- Analisar o efeito do nocaute de *TcUGD* na diferenciação *in vitro* e *in vivo* de *T. cruzi*;
- Realizar ensaios de infecção *in vitro* e em *in vivo* dos parasitas nocautes para o gene *TcUGD*;
- Analisar a relação entre a glicosilação de GP72 e seu papel na adesão flagelar, diferenciação e infectividade de *T. cruzi*;
- Analisar a composição de gliconjugados nos mutantes nulos do gene *TcUGD*.
- Repetir os ensaios de colocalização das enzimas TcUGD e TcUXS para determinar a localização destas proteínas no parasita.

8. REFERÊNCIAS

ALLEN, S. *et al.* Structure of a complex phosphoglycan epitope from gp72 of *Trypanosome cruzi*. **Journal of biological chemistry**, v.288, n.16, p.11093-11104, 2013.

BASOMBRÍO, A. M. *et al.* Targeted deletion of the gp72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors. **The Journal of parasitology**, v.88, n.3, p.489-493, 2002.

BHAGAVAN, N, V; & HA, E. C. Heteropolysaccharides: glycoconjugates, glycoproteins, and glycolipids. **Essentials of medical biochemistry**, 1.ed, p.75-83, 2011.

BERGTER, B. E; VERMELHO, A, B. Structure of glycolips found in trypanosomatids: Contribution to parasite Functions. **The open parasitology journal**, v.4, p.84-97. 2010.

BERN, C. Antitrypanosomal therapy for chronic chagas disease. **The new england journal of medicine**, v. 364, p. 2527-2534, 2011.

BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews**, vol. 4, p.229- 236, 2006.

COOPER, R; JESUS, A. R. CROSS, G. A. M. Deletion of an immunodominant *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein disrupts flagellum-cell adhesion. **The journal of cell biology**, vol.122, n.1, p.149-156, 1993.

CAFFARO, C. E; HIRSCHBERG, C .B. Nucleotide sugar transporters of the golgi apparatus: from basic science to diseases. **Accounts of chemical research**, v.39, n.11, p.805-812, 2006.

CDC: Centers of disease control and prevention. Atualizado em março de 2019. Disponível em : <https://www.cdc.gov/parasites/chagas/biology.html> (2019).

DENTON, H; FYFFE, S; SMITH, T. K. GDP-mannose pyrophosphorylase is essential in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. **The Biochemical Journal**, v.425, n.3, p.603-614,

2010.

DAMERWO, S. *et al.* Leishmania major UDP-sugar pyrophosphorylase salvages galactose for glycoconjugate biosynthesis. **International journal for parasitology**, v.45, n.12, p.783-790, 2015.

dC-RUBIN, S. S. C; SCHENKAN, S. Trypanosoma cruzi trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cellular Microbiology**, v.14, n.10, p.1522-1530, 2012.

EIXELSBERGER, T. *et al.* Structure and mechanism of human UDP-xylose synthase evidence for a promoting role of sugar ring distortion in a three-step catalytic conversion of UDP-glucuronic acid. **Journal of biological chemistry**, v.287, n.37, p.31349-31358, 2012.

EGGER, S. *et al.* UDP-glucose dehydrogenase: structure and function of a potential drug target. **Biochemical Society transactions**, v.38, n.5, p.1378-1385, 2010.

EL-SAYED, N, M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, vol, 309, n.5733, p.409-415, 2005.

FERGUSON, M. A; ALLEN, A. K; SNARY, D. Studies on the structure of a phosphoglycoprotein from the parasitic protozoan *Trypanosoma cruzi*. **The biochemical Journal**, v.23, n.2, p.313-139, 1983.

GARAMI, A; ILG, T. The role of phosphomannose isomerase in Leishmania Mexicana glycoconjugate synthesis and virulence. **The journal of Biological Chemistry**, v.276, n.9, p.6566-6575, 2001.

GOMES, N. A. *et al.* Down-regulation of T lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*. Assignment of the T cell-suppressive determinant to the ceramide domain. **The journal of immunology**, v.156, n.2, p.628-635, 1996.

HANDFORD, M; FURLÁN, R.C; ORELLANA, A. Nucleotide-sugar transporters: structure function and roles in vivo. **Brazilian journal of medical and biological research**, v.39, n.9, p.1149-1158, 2006.

HAYNES, P. A; RUSSEL, D. G; CROSS, G. A. M. Subcellular localization of *Trypanosoma cruzi* glycoprotein GP72. **Journal of Cell Science**, v.109, p.2979-2988, 1996.

JESUS, R. B. *et al.* Gene deletion suggests a role for *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein GP72 in the insect and mammalian stages of the life cycle. **Journal of cell science**, v. 106, p. 1023-1033, 1993.

KUETTEL, S. *et al.* The *de novo* and *salvage* pathways of GDP-mannose biosynthesis are both sufficient for the growth of bloodstream-form *Trypanosoma brucei*. **Molecular microbiology**, v.84, n.2, p.340-351, 2012.

KELLEY, L. A. *et al.* The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. **Nature protocols**, v.10, p.845-858, 2015.

LAMERS, C. A. *et al.* Deletion of UDP-glucose pyrophosphorylase reveals a UDP-glucose independent UDP-galactose salvage pathway in *Leishmania major*. **Glycobiology**, v.20, n.7, p.872-882, 2010.

LUGO, P. L. *et al.* Effective gene delivery to *Trypanosoma cruzi* epimastigotes through nucleofection. **Parasitology international**, v. 66, n.3, p.236-239, 2017.

LEE, Y. B. *et al.* Global economic burden of Chagas disease: a computational simulation model. **National institutes of health**, v. 13, n.4, p.342-348, 2013.

LEDERKREMER, R. M; BERTELLO, L. E. Glycoinositolphospholipids, Free and as Anchors of Proteins, in *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v.7, n.12, p.1165-1178, 2001.

MARIÑO, K. *et al.* Identification, subcellular localization, biochemical properties, and high-resolution crystal structure of *Trypanosoma brucei* UDP-glucose pyrophosphorylase. **Glycobiology**, v.20, n.12, p.1619-1630, 2010.

MARIÑO, K. *et al.* Characterization, localization, essentiality, and high-resolution crystal structure of glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase from *Trypanosoma brucei*. **Eukaryotic Cell**, v.10, n.7, p.985-997, 2011.

MEDINA-ACOSTA, E., CROSS, G. A. M. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 59, p. 327-330, 1993.

MOYRAND, F; JANBON, G. UGD1, Encoding the *Cryptococcus neoformans* UDP-Glucose Dehydrogenase, Is Essential for Growth at 37 °C and for Capsule Biosynthesis. **Eukaryotic Cell**, v.3, n.6, p.1601-1607, 2004.

MOREIRA, C. M. N. *et al.* Knockout of the gamma subunit of the AP-1 adaptor complex in the human parasite *trypanosome cruzi* impairs infectivity and differentiation and prevents the maturation and targeting of the major protease cruzipain. **PLoS ONE**, p. 1-22, 2017.

MACRAE, J. I. *et al.* The suppression of galactose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes causes changes in cell surface molecular architecture and cell morphology. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.147, n.1, p.126-136, 2006.

NARDY, A. F. F. R. *et al.* Role of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase on the escape from host Immune surveillance. **frontiers in microbiology**, v.7, n.348, p.1-9, 2016.

NOGUERIA, N. F. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Experimental parasitology**, v.116, n. 2, p.120-128, 2007.

NADERER, T; WEE, E; MCCONVILLE, M. J. Role of hexosamine biosynthesis in *Leishmania* growth and virulence. **Molecular Microbiology**, v.69, n.4, p.858-869, 2008.

OPPERDOES, R, F; BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma Brucei*: the glycosome. **Febs Letters**, v.80, n.2, p. 360-364, 1977.

OPPERDOES, R. F; SZIKORA, J. P. *In silico* prediction of the glycosomal enzymes of *Leishmania major* and trypanosomes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.147, n.2, p.193-206, 2006.

ORELLANA, A. *et al.* Overview of Nucleotide Sugar Transporter Gene Family Functions Across Multiple Species. **Journal of molecular biology**, v.428, n.16, p.3150-3165, 2016.

PELED, B.M; GRIFFITH, C. L; DOERING, T. L; Functional cloning and characterization of UDP-glucuronic acid decarboxylase: The pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans* elucidates UDP-xylose synthesis. **Biochemistry**, v.98, n.21, p.12003-12008, 2001.

PINHEIRO, E. *et al.* Chagas disease: review of needs, neglect, and obstacles to treatment access in Latin America. **Revista da sociedade brasileira de medicina tropical**, v. 50, n.3, p.296-299, 2017.

PENHA, L. L. *et al.* Sorting of phosphoglucomutase to glycosomes in *Trypanosoma cruzi* is mediated by an internal domain. **Glycobiology**, v.19, n.12, p.1462-1472, 2009.

ROSENBERGER, N. F. A. *et al.* UDP-xylose and UDP-galactose synthesis in *Trichomonas vaginalis*. **Molecular biochemistry parasitology**, v.181, n.2, p.53-56, 2012.

RUBIN, S. S; SCHENKMAN, S. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase as a multifunctional enzyme in Chagas' disease. **Cell Microbiol** ,v. 10 p. 1522-30, 2012.

ROPER, J. R; FERGUSON, M. A. J. Cloning and characterization of the UDP-glucose 4'-epimerase of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.132, p.47-53, 2003.

SNARY, D. *et al.* Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*. Use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v.3, p343-356, 1981.

SHER, A; SNARY, D. Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a

monoclonal antibody. **Nature**, v.300, n.5893, p.639-640, 1982.

STOKES, J. M. *et al*; The synthesis of UDP-N-acetylglucosamine is essential for Bloodstream form *Trypanosoma brucei* *in Vitro* and *in Vivo* and UDP-N-acetylglucosamine starvation reveals a hierarchy in parasites protein glycosylation. **Journal of Biological Chemistry**, v.283, n.23, p.16147-16161, 2008.

SOUZA, F. S. P. *et al*. Knockout of the gene encoding the kinetoplast-associated protein 3 (KAP3) in *Trypanosoma cruzi*: effect on kinetoplast organization, cell proliferation and differentiation. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 172, p. 90–98, 2010.

SOMMER, M. J; WANG, C. C. Targeting proteins to the glycosomes of African Trypanosomes. **Annual Review of Microbiology**, v.48, p.105-128, 1994.

STEWART, J. *et al*. Characterisation of a *Leishmania mexicana* knockout lacking guanosine diphosphate-mannose pyrophosphorylase. **International journal for parasitology**, v.35, n.8, p.861-873, 2005.

TURNOCK, D. C; IZQUIERDO, L; FERGUSON, M. A. The *de novo* synthesis of GDP-fucose is essential for flagellar adhesion and cell growth in *Trypanosoma brucei*. **The journal of biological chemistry**, v.282, n.39, p.28853- 28863, 2007.

TURNOCK, C. D ; FERGUSON, M. A, J; Sugar Nucleotide Pools of *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, and *Leishmania major*. **Eukaryotic Cell**, v.6, n.8, p. 1450-1463, 2007.

TOMMASO, P. D. T-Coffe: a web server for the multiple sequence alignment of protein and RNA sequences using structural information and homology extension. **Nucleic Acids Research**, v.39, p.13-17, 2011.

URBANIAK, M. D. *et al*. Galactose Starvation in a Bloodstream form *Trypanosoma brucei* UDP-Glucose 4'-Epimerase Null Mutant. **Eukaryotic cell**, v.5, n.11, p.1906-1913, 2006.

VARKI, A. *et al*. Essentials of glycobiology. 2 ed, p. 47-60, 2008.

VISNIESKI, A. M. *et al.* Knockout of the CCCH zinc finger protein TcZC3H31 blocks *Trypanosoma cruzi* differentiation into the infective metacyclic form. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.221, p.1-9, 2018.

WHO: World Health Organization - WHO. Chagas Disease. Fact sheet N°340. Atualizado em março 2017. acessado em:<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>, (2017).

WHO: World Health Organization-WHO. Chagas Disease. Atualizado em Abril de 2019. Disponível em: [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)) (2019).

YANG, T; PELED,B.M. Identification of a novel UDP-Sugar pyrophosphorylase with a broad substrate specificity in *Trypanosoma cruzi*. **The biochemical Journal**, v.429, n,3, p.533-543, 2010.