

INSTITUTO CARLOS CHAGAS – FIOCRUZ-PR
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

**Identificação dos Genes, Expressão e
Localização Celular do Complexo Adaptador 1
em *Trypanosoma cruzi***

Claudia Maria do Nascimento Moreira

CURITIBA/PR
2013

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Mestrado em Biociências e Biotecnologia

**Identificação dos Genes, Expressão e Localização
Celular do Complexo Adaptador 1 em
*Trypanosoma cruzi***

CLAUDIA MARIA DO NASCIMENTO MOREIRA

CURITIBA/PR

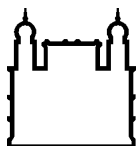
2013

Lombada

DISSERTAÇÃO M-ICC

C.M.N.MOREIRA

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS
Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia

Claudia Maria do Nascimento Moreira

**Identificação dos Genes, Expressão e
Localização Celular do Complexo Adaptador 1
em *Trypanosoma cruzi***

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

Orientador: Dr. Maurilio José Soares

CURITIBA/PR

2013

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

M838 Moreira, Claudia Maria do Nascimento

Identificação dos genes, expressão e localização celular do complexo adaptador 1 em *Trypanosoma cruzi* / Claudia Maria do Nascimento Moreira. – Curitiba, 2013.

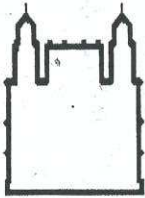
v, 75 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Carlos Chagas, Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, 2013.

Bibliografia: f. 69-75

1. Complexo adaptador 1. 2. Adaptina. 3. Vesículas. 4. *Trypanosoma cruzi*. I. Título.

CDD 616.9363



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
Instituto Carlos Chagas
Coordenação Curso de Pós-Graduação em Biociências e
Biotecnologia
Rua Prof. Algacyr Munhoz Mader 3775
Cidade Industrial / 81350-010 Curitiba, PR
Tel. / Fax: (041) 3316-3230 / 3316-3267



Ata da Sessão Pública de exame de dissertação para obtenção do grau de **Mestre** em
Biociências e Biotecnologia.

Aos vinte cinco dias do mês de fevereiro de dois mil e treze , às nove horas e trinta minutos , nas dependências do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz Paraná, reuniu-se a Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Biociências e Biotecnologia, composta pelos professores doutores **Stenio Perdigão Fragoso, Iriane Eger, Edvaldo Trindade**, com a finalidade de julgar a dissertação da candidata **CLAUDIA MARIA DO NASCIMENTO MOREIRA** , intitulada: "**IDENTIFICAÇÃO DOS GENES, EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO CELULAR DO COMPLEXO ADAPTADOR 1 EM TRYPANOSOMA CRUZI**" , para obtenção do grau de Mestre em Biociências e Biotecnologia. O candidato teve até 45 (quarenta e cinco) minutos para a apresentação, e cada examinador teve um tempo máximo de arguição de 30 (trinta) minutos, seguido de 30 (trinta) minutos para resposta do candidato ou de 60 (sessenta) minutos quando houve diálogo na arguição. O desenvolvimento dos trabalhos seguiu o roteiro de sessão de defesa, estabelecido pela Coordenação do Programa, com abertura, condução e encerramento da sessão solene de defesa feito pelo Presidente Dr. **Stenio Perdigão Fragoso** . Após haver analisado o referido trabalho e arguido o candidato, os membros da banca examinadora deliberaram pela "*aprovação*" habilitando-o ao título de Mestre em Biociências e Biotecnologia, condicionada à implementação das correções sugeridas pelos membros da Banca Examinadora e ao cumprimento integral das exigências estabelecidas no Regimento Interno deste Programa de Pós-Graduação.


Prof. Dr. Stenio Perdigão Fragoso

Presidente da Banca

ICC


Prof. Dr. Iriane Eger

ICC


Prof. Dr. Edvaldo Trindade

UFPR


CONFERIDO COM O ORIGINAL
Daniel Yutaka Yamamoto
Analista de Gestão em Saúde
Matr. SIAPE: 1873156
Instituto Carlos Chagas - Fiocruz PR

À minha amada família

Sobretudo aos meus pais
Maria do Nascimento Moreira e Francisco de Assis Gomes
Moreira

Aos meus irmãos e suas famílias
Maurisclei, Ketty e Cristina

Aos meus avós
Francisco Barbosa
Francisca Moreira (*in memoriam*)
Manoel Julio do Nascimento (*in memoriam*)
Maria Ferreira do Nascimento

Ao melhor companheiro que alguém poderia ter,
meu amor, Giancarlo Lupatini.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Maurilio José Soares, primeiro por me aceitar como aluna e acreditar em mim, depois, pela paciência e simplicidade com que ensina os processos mais complexos da biologia celular, pelo exemplo de profissional e por fim, pela amizade e conversas sobre a vida, o universo e tudo mais.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso, por sempre se mostrar disponível para ajudar.

Ao Laboratório de virologia do ICC, pela ajuda com os monoclonais.

À Dra. Josiane Cardoso, por revisar essa dissertação e sempre demonstrar uma palavra amiga nos momentos mais difíceis, pelos cafezinhos e conversas diversas.

À Dra. Iriane Eger pelas ajudas e sugestões, pelo ombro amigo, pelos cafés e conversas diversas.

A Vanessa Stela, pela amizade e pelo apoio de sempre.

Aos grandes amigos do laboratório de Biologia Celular pelo grupo colaborador, trabalhador, divertido, engraçado e unido.

Aos amigos do Instituto Carlos Chagas, estudantes, pesquisadores e funcionários, pela convivência, respeito, amizade, trocas, ajudas e risadas.

Aos técnicos Vanessa Huf, Nilson, Tania, Silvio e Sibebe, pela ótima convivência, amizade e apoio técnico.

Ao meu amado, Giancalo Lupatini, por acreditar em mim, mesmo quando eu mesma duvidei. Por seu apoio, pois sem ele não teria sido possível.

À minha família, por me mostrarem que sempre posso buscá-los.

Aos meus queridos amigos por compreenderem minhas ausências e mesmo assim, não desistirem de mim.

À FIOCRUZ pelo suporte financeiro.

E principalmente à Deus, por me permitir buscar meus sonhos, abençoando meus caminhos.

“(…) algo superior e poderoso que torna os homens diferentes dos animais e que os faz resistir além de suas forças, alcançar limites acima do possível: a vontade.”

Amyr Klink
(Cem dias entre o céu e o mar)

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	i
LISTA DE TABELAS.....	iii
RESUMO.....	iv
ABSTRACT	v
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Endocitose.....	1
1.2 Endocitose mediada por clatrina.....	2
1.3 Complexo de Golgi e Via Biossintética.....	3
1.4 Clatrina.....	4
1.5 Complexo Adaptador.....	5
1.6 Complexo adaptador 1 (AP-1).....	8
1.7 Protozoários tripanosomatídeos.....	10
1.8 <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas.....	10
1.9 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
1.10 Biologia celular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	12
1.11 Clatrina e AP-1 em tripanosomatídeos.....	15
2 OBJETIVO GERAL.....	17
2.1 Objetivos específicos.....	17
3 MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1 Reagentes.....	18
3.2 Meios de cultura.....	19
3.3 Tampões e Soluções.....	19
3.4 Organismos.....	20
3.5 Cultivo de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
3.5.1 Formas epimastigotas.....	21
3.5.2 Formas tripomastigotas e amastigotas.....	21
3.6 Obtenção de extrato protéico de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
3.7 Seleção de Genes.....	22
3.8 Alinhamento de sequências gênicas do complexo adaptador 1.....	23
3.9 Amplificação e clonagem dos genes do complexo AP-1 de <i>T. cruzi</i>	23
3.9.1 Clonagem usando endonucleases de restrição.....	25
3.9.2 Clonagem e recombinação de AP1- γ D em vetores da plataforma Gateway.....	27
3.10 Transformação dos clones recombinantes.....	29
3.10.1 Preparação de bactérias cálcio-competentes.....	29
3.10.2 Transformação por choque térmico.....	30
3.11 Seleção dos clones recombinantes através da técnica da palitagem (Toothpick).....	30
3.12 Purificação de plasmídeos contendo os produtos de PCR.....	30
3.13 Expressão de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	31
3.14 Purificação da proteína recombinante a partir de corpúsculos de inclusão.....	32
3.15 Produção de anticorpos.....	32

3.15.1	Anticorpo Policlonal.....	32
3.15.2	Anticorpo Monoclonal.....	33
3.16	Imunolocalização por microscopia de fluorescência	35
3.16.1	Colocalização da proteína AP1- γ D com a proteína Rab7 fusionada a GFP em parasita transfectados	35
4	RESULTADOS	37
4.1	Bioinformática	37
4.1.1	Genes das subunidades do complexo adaptador 1 (AP-1).....	37
4.1.1.1	Alinhamento da sequência de aminoácidos	40
4.1.2	Identificação de domínios protéicos das subunidades maiores do complexo AP-1 (AP1- γ e AP1- β) em <i>H. sapiens</i> , <i>T. brucei</i> e <i>T. cruzi</i>	45
4.2	Obtenção de proteína recombinante.....	46
4.2.1	Amplificação dos genes	46
4.2.2	Expressão e purificação das proteínas heterólogas	48
4.3	Obtenção de anticorpos e análise da expressão das proteínas em <i>T. cruzi</i> por western blot	51
4.3.1	Subunidades AP1- μ e AP1- σ	51
4.3.2	Subunidade AP1- β	52
4.3.3	Subunidade AP1- γ	54
4.4	Localização celular	55
5	DISCUSSÃO.....	61
5.1	Estudo in silico.....	63
5.2	Análise da expressão gênica por western blot e imunofluorescência.....	64
5.2.1	Subunidade AP1- σ	64
5.2.2	Subunidade AP1- μ	65
5.2.3	Subunidade AP1- β	65
5.2.4	Subunidade AP1- γ	66
5.3	Considerações finais	67
6	CONCLUSÕES	68
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

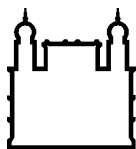
LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1 Vias de endocitose.	2
Figura 1.2 Clatrina.....	5
Figura 1.3 Proteínas de revestimento e vias de tráfego onde podem estar envolvidas.....	6
Figura 1.4 Representação esquemática dos complexos adaptadores.....	7
Figura 1.5 Desenho esquemático de brotamento de vesículas revestidas por clatrina/AP-1 no Golgi.	9
Figura 1.6 Desenho esquemático do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	12
Figura 1.7 Esquema das principais estruturas celulares de <i>T. cruzi</i>	13
Figura 1.8 Micrografia de formas epimastigota de <i>T. cruzi</i>	14
Figura 3.1 Desenho esquemático do complexo adaptador 1.	24
Figura 3.2 Esquema do plasmídeo pGEX-4T-1.	26
Figura 3.3 Vetor de entrada pDONR 221 (Invitrogen).	28
Figura 3.4 Vetor de destino utilizado, pDEST17 (Invitrogen)	29
Figura 4.1 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- γ entre diferentes organismos eucariontes.	41
Figura 4.2 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- σ entre diferentes organismos eucariontes.	41
Figura 4.3 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- μ entre diferentes organismos eucariontes.	42
Figura 4.4 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- β entre diferentes organismos eucariontes.	42
Figura 4.5 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- γ entre diferentes tripanosomatídeos.	43
Figura 4.6 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- σ entre diferentes tripanosomatídeos.	43
Figura 4.7 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- β entre diferentes tripanosomatídeos.	44
Figura 4.8 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- μ entre diferentes tripanosomatídeos.	44
Figura 4.9 Domínios da subunidade AP1- γ do complexo AP-1.....	45
Figura 4.10 Domínios da subunidade AP1- β do complexo AP-1.	45
Figura 4.11 Amplificação dos genes do complexo adaptador 1 de <i>T. cruzi</i>	46
Figura 4.12 Confirmação de clonagem dos genes no vetor p-GEX-4T-1.	47
Figura 4.13 Clonagem do gene no vetor pDONR (A) e pDEST (B).....	48
Figura 4.14 Expressão com vetor pGEX-4T e purificação de proteínas recombinantes insolúveis.	49
Figura 4.15 Expressão com vetor pGEX-4T e purificação da proteína recombinante AP1- γ N insolúvel.	50
Figura 4.16 Expressão com vetor pDEST17 e purificação de AP1- γ D.....	51
Figura 4.17 Análise por western blot da expressão da subunidade AP1- μ em <i>T. cruzi</i>	52
Figura 4.18 Análise por western blot da expressão da subunidade AP1- β em <i>T. cruzi</i>	52
Figura 4.19 Análise por western blot da produção de anticorpos monoclonais contra a subunidade AP1- β de <i>T. cruzi</i>	53
Figura 4.20 Análise por western blot da produção de anticorpos para a subunidade AP1- γ N.....	54

Figura 4.21 Análise da produção de anticorpos para a subunidade AP1- γ D.	55
Figura 4.22 Localização da subunidade AP1- γ D em epimastigotas por microscopia confocal a laser.....	56
Figura 4.23 Localização da subunidade AP1- γ D em amastigotas (A) e tripomastigotas (T) por microscopia confocal a laser.	57
Figura 4.24 Figura 4.24. Localização da subunidade AP1- γ nas três formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> por microscopia confocal a laser.	58
Figura 4.25 Co-localização da subunidade AP1- γ e a GTPase Rab7 na forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> por microscopia confocal a laser.	59
Figura 4.26 Colocalização por imunofluorescência (epifluorescência em microscópio Nikon) da subunidade AP1- γ e da GTPase Rab7 em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 Genes de subunidades do complexo adaptador-1 selecionados no genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
Tabela 3.2 Oligonucleotídeos iniciadores para amplificar sequências gênicas de subunidades do complexo adaptador 1 de <i>T. cruzi</i>	25
Tabela 3.3 Sequências adaptadoras para plataforma Gateway. O códon de parada (destacado em negrito) foi acrescentado ao final da sequência codificadora da proteína recombinante. ...	25
Tabela 3.4 Tamanho dos polipeptídeos recombinantes para o complexo AP-1.....	31
Tabela 4.1 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- γ entre diferentes organismos quando comparados ao organismo modelo <i>H. sapiens</i>	37
Tabela 4.2 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- β entre diferentes organismos quando comparados ao organismo modelo <i>H. sapiens</i>	38
Tabela 4.3 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- μ entre diferentes organismos quando comparados ao organismo modelo <i>H. sapiens</i>	38
Tabela 4.4 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- σ entre diferentes organismos quando comparados ao organismo modelo <i>H. sapiens</i>	38
Tabela 4.5 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- γ de diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao organismo modelo <i>T. cruzi</i>	39
Tabela 4.6 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- β de diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao organismo modelo <i>T. cruzi</i>	39
Tabela 4.7 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- μ de diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao organismo modelo <i>T. cruzi</i>	39
Tabela 4.8 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- σ de diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao organismo modelo <i>T. cruzi</i>	40
Tabela 4.9 Tamanho esperado das proteínas recombinantes em vetor pGEX-4T.....	49



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

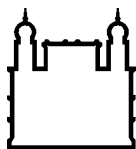
INSTITUTO CARLOS CHAGAS

RESUMO

Identificação dos Genes, Expressão e Localização Celular do Complexo Adaptador 1 em *Trypanosoma cruzi*

O complexo adaptador 1 (AP-1) atua na formação do revestimento de vesículas com clatrina na rede trans-Golgi em células eucariontes. O conhecimento sobre o complexo AP-1 em tripanosomatídeos é escasso, mas já foi demonstrada sua importância na infectividade de *Leishmania mexicana* em macrófagos, assim como na viabilidade de *Trypanosoma brucei*. O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado pertencente à família Trypanosomatidae, sendo o agente etiológico da doença de Chagas, a qual afeta milhões de pessoas no mundo. Neste contexto, esta dissertação teve como objetivo identificar os genes que codificam as quatro subunidades do complexo AP-1 no genoma de *T. cruzi*, analisar sua expressão e localização subcelular nesse parasita. Busca em banco de dados genômicos permitiu identificar as sequências codificantes para todas as subunidades do complexo AP-1, sendo obtidos os seguintes números de acesso gênicos: AP1- γ : XP_818958.1; AP1- β : XP_820334.1; AP1- μ :XP_818899.1; AP1- σ : XP_804127.1. Foram produzidos anticorpos em camundongos contra as proteínas recombinantes de todas as subunidades do complexo AP-1. Análise da especificidade dos anticorpos foi realizada por western blot e a localização subcelular das proteínas foi feita por imunofluorescência em microscopia de epifluorescência e microscopia confocal a laser. Resultados negativos foram obtidos com o antisoro contra a subunidade AP1- σ . Anticorpos obtidos contra as subunidades AP1- μ (policlonal) e AP1- β (monoclonal) reconheceram polipetídeos de tamanho compatível ao peso molecular da proteína endógena em extratos de formas epimastigotas, porém não reconheceram as proteínas por imunofluorescência. O antisoro policlonal obtido contra a subunidade AP1- γ reconheceu em extratos de diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas) um polipeptídeo de peso molecular compatível com o predito em banco de dados (~90 kDa). Imunolocalização demonstrou reação positiva pontual em região compatível com a do complexo de Golgi deste protozoário: entre núcleo e cinetoplasto de formas tripomastigotas e entre cinetoplasto e bolsa flagelar de epimastigotas e amastigotas. Colocalização da AP1- γ com a GTPase Rab7 (marcador de complexo de Golgi em *T. cruzi*) confirmou a localização desta subunidade no complexo de Golgi desse parasita. Nossos resultados demonstram que as subunidades do complexo AP-1 são conservadas e expressas em *T. cruzi* e que pelo menos a subunidade AP1- γ possui localização celular em complexo de Golgi, similar ao que é descrito em outras células eucariontes.

Palavras-chave: complexo adaptador 1, adaptina, vesículas, *Trypanosoma cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO CARLOS CHAGAS

ABSTRACT

Gene Identification, Expression and Cellular Localization of Adapter Complex-1 in *Trypanosoma cruzi*

The adaptor complex 1 (AP-1) acts in the formation of clathrin-coated vesicles at the trans-Golgi network of eukaryotic cells. Knowledge about the AP-1 complex in trypanosomatids is scarce, but it has been already demonstrated its importance in the infectivity of *Leishmania mexicana* in macrophages, as well as the viability of *Trypanosoma brucei*. *Trypanosoma cruzi* is a protozoan flagellate that belongs to the family Trypanosomatidae, being the etiologic agent of Chagas disease, which affects millions of people worldwide. In this context, this study aimed to identify the genes encoding the four subunits of the AP-1 complex in the genome of *T. cruzi* and analyze their expression and subcellular localization in this parasite. Search in genomic database identified gene sequences coding for all subunits of the AP-1 complex, the following accession numbers being obtained: AP1- γ : XP_818958.1; AP1- β : XP_820334.1; AP1- μ : XP_818899 .1; AP1- σ : XP_804127.1. Antibodies were produced in mice against recombinant proteins of all subunits of the AP-1 complex. Analysis of the specificity of the antibodies was performed by western blot and subcellular localization of the proteins by immunofluorescence was done by epifluorescence microscopy and confocal laser microscopy. Negative results were obtained with the antiserum against subunit AP1- σ . Antibodies raised against the AP1- μ (polyclonal) and AP1- β (monoclonal) subunits recognized polypeptides with size compatible to the molecular weight of the endogenous protein in extracts from epimastigotes, but no proteins could be localized by fluorescence microscopy. The antiserum polyclonal obtained against the AP1- γ subunit recognized a polypeptide in extracts of different evolutionary forms of *T. cruzi* (epimastigotes, trypomastigotes and amastigotes) of molecular weight consistent with that predicted in database (~90 kDa). Immunolocalization showed punctual positive reaction in the region compatible with the Golgi complex of this protozoan: between nucleus and kinetoplast of trypomastigotes and between kinetoplast and flagellar pocket of epimastigotes and amastigotes. Colocalization of AP1- γ with the GTPase Rab7 (a marker of the Golgi complex in *T. cruzi*) confirmed the location of this subunit in the Golgi apparatus of this parasite. Our results demonstrate that the subunits of the AP-1 complex are conserved and expressed in *T. cruzi* and that at least the AP1- γ subunit has cellular localization in the Golgi apparatus, similar to that described in other eukaryotic cells.

Keywords: adaptor complex 1, adaptin, vesicles, *Trypanosoma cruzi*.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Endocitose

As células eucarióticas possuem um elaborado sistema de endomembranas que permite uma refinada comunicação com o seu ambiente. Esse sistema é composto por compartimentos intracelulares que se comunicam através de vesículas, as quais podem brotar a partir da membrana plasmática (via endocítica) ou das membranas do retículo endoplasmático e do complexo de Golgi (via secretória-biossintética) (Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003).

A membrana plasmática é uma estrutura celular dinâmica que tem por função separar dois ambientes quimicamente distintos: o citoplasma e o meio extracelular. Moléculas pequenas e essenciais tais como carboidratos, aminoácidos e íons atravessam essa barreira por canais ou bombas protéicas inseridas na membrana. Por sua vez, macromoléculas como hormônios, lipídios e proteínas são interiorizadas em de vesículas que brotam por invaginações da membrana plasmática. Esse último processo é denominado endocitose (Conner & Schmid, 2003).

A endocitose pode ocorrer por múltiplos mecanismos, divididos em duas categorias principais: fagocitose e endocitose. A fagocitose consiste na captação de grandes partículas (>2 µm) através de projeções da membrana plasmática ao redor da partícula a ser ingerida, sendo realizada por células especializadas como macrófagos, neutrófilos e monócitos. A endocitose por sua vez acontece em todas as células e está envolvida na captação de fluídos e macromoléculas. A endocitose propriamente dita pode ser dividida em quatro mecanismos básicos: macropinocitose, endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina e endocitose independente de clatrina e de caveolina (Figura 1.1) (Schliwa & Soldati, 2006).

O material endocitado segue então por compartimentos da via endocítica como os endossomos e pode ter como destino final os lisossomos. Estes são compartimentos acidificados cuja função é manter a homeostase celular através da degradação do material endocitado assim como de componentes oriundos de autofagia (Meel & Klumpperman, 2008). A quebra de moléculas é realizada pelas hidrolases lisossomais, que são selecionadas e transportadas para os lisossomos a partir do complexo de Golgi (Conner & Schmid, 2003). A seleção das hidrolases e seu transporte até os lisossomos, como veremos posteriormente, depende de

diversos grupos de moléculas que atuam junto à superfície da membrana do complexo de Golgi.

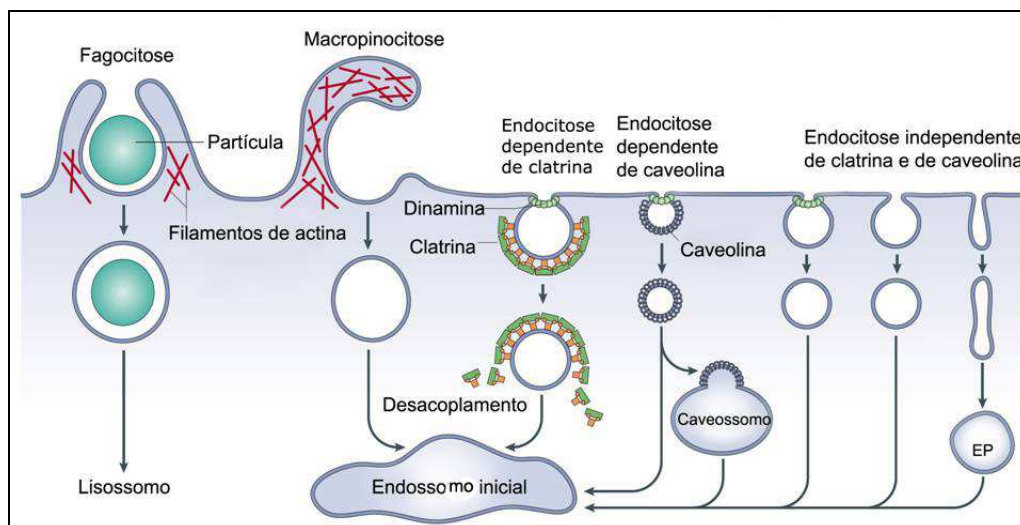


Figura 1.1 Vias de endocitose. Partículas maiores podem ser envolvidas por fagocitose ou macropinocitose, enquanto fluidos e moléculas podem ser ingeridos por meio de diferentes tipos de vesículas endocíticas. Em todos os processos as alterações que ocorrem na membrana são dependentes de actina. As vesículas endocíticas podem ser classificadas de acordo com a presença ou ausência de componente protéico em seu revestimento, como endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina ou endocitose independente de clatrina e caveolina. EP: endossomo inicial rico em proteínas ancoradas à membrana via GPI (Glicosilfosfatidilinositol). Adaptado de Mayor & Pagano (2007).

1.2 Endocitose mediada por clatrina

A endocitose mediada por clatrina envolve a concentração de receptores transmembranares, os quais juntamente com seus ligantes são incluídos em invaginações da membrana plasmática, formando vesículas com revestimento protéico de clatrina. Essas vesículas, com auxílio de outras proteínas como a dinamina, destacam-se da membrana e seguem para os endossomos iniciais, endossomos tardios e lisosomos. Muitos ligantes são degradados nos lisosomos e alguns receptores são reciclados de volta à membrana plasmática, onde podem ser reutilizados (Conner & Schmid, 2003).

Vesículas com revestimento de clatrina ocorrem em todas as células nucleadas, desde leveduras até células humanas, possuindo tamanhos que variam de 60 a 100 nm de diâmetro. Essas vesículas não são evidenciadas apenas na membrana plasmática, sendo também observadas brotando a partir do complexo de Golgi, mais precisamente na rede trans-Golgi (Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003).

1.3 Complexo de Golgi e Via Biossintética

O aparato de Golgi ou complexo de Golgi recebeu esse nome em homenagem a Camilo Golgi, que em 1898 relatou a presença de uma estrutura reticular em vários tipos celulares utilizando coloração por nitrato de prata e observação por microscopia de luz. Aproximadamente meio século depois, com o advento da microscopia eletrônica, é que foi verificado que esta estrutura era formada por compartimentos envoltos por membranas ou cisternas achatadas, as quais são comumente arranjadas em pilhas (Munro, 2011).

As pilhas de cisternas que compõem o complexo de Golgi são morfologicamente heterogêneas, possuem uma superfície lisa e dependendo da célula à qual pertencem podem variar quanto ao número, forma e também quanto à localização. Normalmente essas pilhas se arranjam em número de quatro a seis cisternas e localizam-se entre o retículo endoplasmático e a membrana plasmática (Farquhar & Palade, 1998). Em invertebrados e plantas o complexo de Golgi pode se organizar em uma única pilha ou em centenas de pilhas individuais dispersas no citosol. No caso de alguns fungos, o complexo de Golgi se organiza como algumas cisternas espalhadas pela célula (Munro, 2011).

Quanto à estrutura, o complexo de Golgi é classicamente dividido em três regiões: (a) a rede cis do Golgi é a mais próxima do retículo endoplasmático e por onde ocorre a comunicação entre esta organela e o complexo de Golgi; (b) as cisternas do complexo de Golgi propriamente dito, divididas em cisternas cis, medial e trans e finalmente, (c) a rede trans do Golgi que está orientada para membrana plasmática. Essas regiões também diferem entre si quanto ao conteúdo e composição de membrana, o que permite que estes compartimentos realizem diferentes funções dentro da organela (Farquhar & Palade, 1981).

A rede trans-Golgi é a região responsável pela triagem e distribuição do material modificado (em geral glicosilação e sulfatação) ao longo das cisternas do Golgi. As glicoproteínas e glicolipídeos resultantes são empacotados em vesículas e o destino pode ser o exterior da célula (via regulada), a membrana plasmática (via constitutiva) ou os lisosomos (via biossintética) (Traub & Kornfeld, 1997).

Na via biossintética, as hidrolases lisosomais produzidas no retículo endoplasmático sofrem no complexo de Golgi, a adição do sacarídeo manose-6-fosfato. No lúmen da rede trans-Golgi estas enzimas lisosomais são reconhecidas por receptores transmembranares de manose-6-fosfato, se aculando em regiões na membrana e posteriormente segregados em vesículas com revestimento de clatrina (Le Borgne & Hoflack, 1997). Essas vesículas seguirão para o sistema endosomo/lisosomo, onde ocorrerá a dissociação do complexo e os receptores de manose-6-fosfato serão reciclados de volta a rede trans-Golgi. As enzimas seguirão para os lisosomos, onde com o pH apropriado, se tornarão ativas (Traub & Kornfeld, 1997).

Assim, vesículas com revestimento da proteína clatrina podem brotar a partir da membrana plasmática (via endocítica) assim como na membrana das cisternas da rede trans-Golgi (via biossintética).

1.4 Clatrina

As primeiras descrições sobre a formação de vesículas revestidas por clatrina começaram na década de 1960. Thomas Roth e Keith Porter observaram por microscopia eletrônica de transmissão (MET) o processo de endocitose de gema de ovo por oócitos de mosquitos e notaram revestimentos parecidos com cerdas na borda da membrana plasmática e também em vesículas no citosol (revisto por Roth, 2006). Em algumas células era possível observar que o revestimento era composto por uma estrutura poligonal semelhante à de uma bola de futebol. Em 1975 Barbara Pearse conseguiu purificar essas vesículas e descobriu que essa estrutura era composta por uma proteína majoritária, à qual ela denominou clatrina (revisto por Roth, 2006).

A molécula clatrina é formada por três cadeias polipeptídicas pesadas de aproximadamente 192 kDa, ligadas cada uma a uma cadeia polipeptídica leve que possui em torno de 25 kDa. Juntas, essas cadeias formam uma estrutura com três pernas ligadas por um vértice denominada trisquélion (Figura 1.2). Por sua vez, os trisquélions de clatrina se associam formando uma rede convexa de hexágonos e pentágonos semelhante a um cesto no lado citosólico das membranas (Edeling et al., 2006).

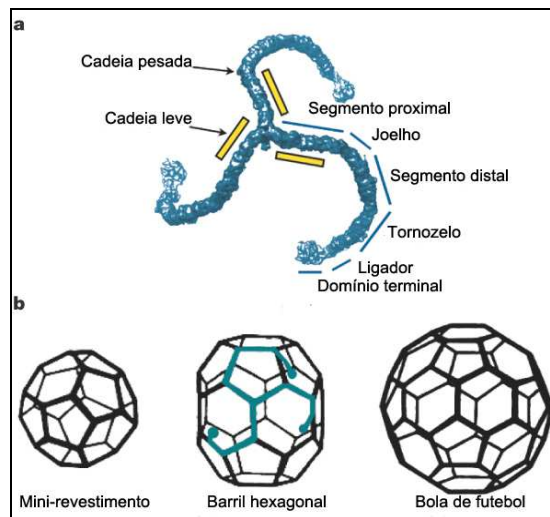


Figura 1.2 Clatrina a) Desenho esquemático do trisquélion de clatrina com os respectivos segmentos. A região C-terminal corresponde ao vértice da molécula e a região N-terminal ao domínio terminal. b) Revestimento de vesículas a partir da associação de clatrina in vitro. Para fechamento da estrutura geométrica devem ocorrer ao menos 12 pentágonos. O esqueleto trimérico da clatrina está destacado em azul. Adaptado de Fotin et al 2004).

Entretanto, a clatrina por si só não interage diretamente com a membrana. Existem diversas proteínas acessórias que são recrutadas para a bicamada lipídica no momento da iniciação do revestimento, dentre as quais são destacadas as proteínas dos complexos adaptadores (APs). Após a clatrina, os APs são as proteínas mais abundantes nas vesículas com revestimento de clatrina.

1.5 Complexo Adaptador

Aproximadamente 20 anos após a primeira descrição por Roth e Porter dos “poços revestidos por cerdas” foram identificadas outras proteínas no revestimento de clatrina, as quais foram denominadas na época de proteínas de 100-50 KDa (Pearse & Robinson, 1984; Zaremba & Keen, 1983). Atualmente sabe-se que estas proteínas formam os complexos adaptadores ou AP. Tais complexos tem a função de auxiliar a clatrina a formar o revestimento protéico e também de selecionar a molécula a ser internalizada, através do reconhecimento e ligação à cauda citoplasmática do receptor presente na membrana.

Até o momento foram identificados quatro complexos adaptadores heterotetraméricos (AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4), cada um deles atuando na formação de vesículas em diferentes locais dentro da célula (Figura 1.3). O complexo AP-1 é encontrado em vesículas com revestimento de clatrina na rede trans-Golgi, o AP2 em vesículas endocíticas na membrana

plasmática, o AP3 próximo ao endossomos e o AP4 também na RTG, sendo que nestes dois últimos não há confirmação de associação com clatrina (Robinson, 2004)

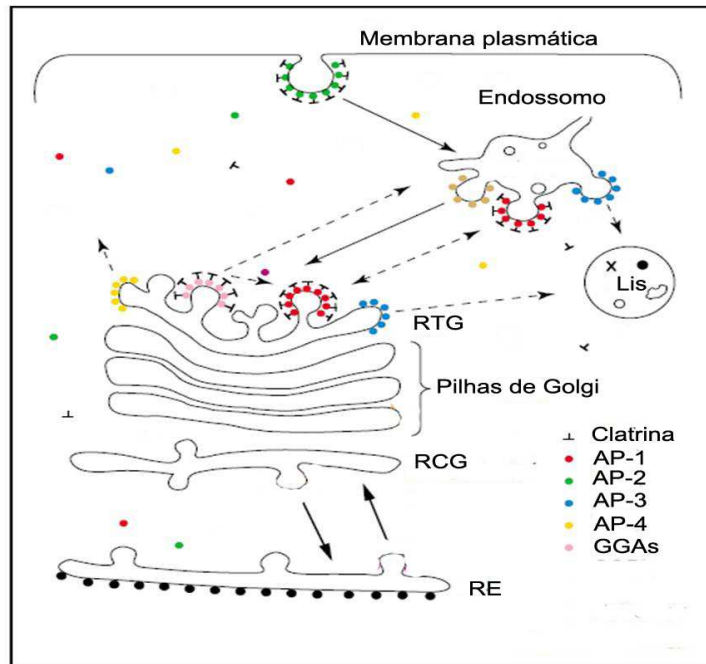


Figura 1.3 Proteínas de revestimento e vias de tráfego onde podem estar envolvidas. Esquema simplificado apresentando apenas um tipo de endossomo. As setas indicam a comunicação entre os compartimentos. GGAs= proteína adaptadora monomérica; Lis= lisossomo; RTG= Rede trans-Golgi; RCG= Rede Cis Golgi; RE= Retículo Endoplasmático. Adaptado de Robinson (2004).

Deve-se ressaltar que a presença dos quatro complexos adaptadores não é comum em todos os organismos. Por exemplo, *Caenorhabditis elegans* e leveduras *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe* possuem apenas AP-1, AP-2 e AP-3 (Robinson, 2004).

Em relação à estrutura, os complexos adaptadores possuem basicamente a mesma formação. Todos são compostos por quatro subunidades chamadas de adaptinas, que se associam e formam uma estrutura parecida a um tijolo (Figura 1.4).

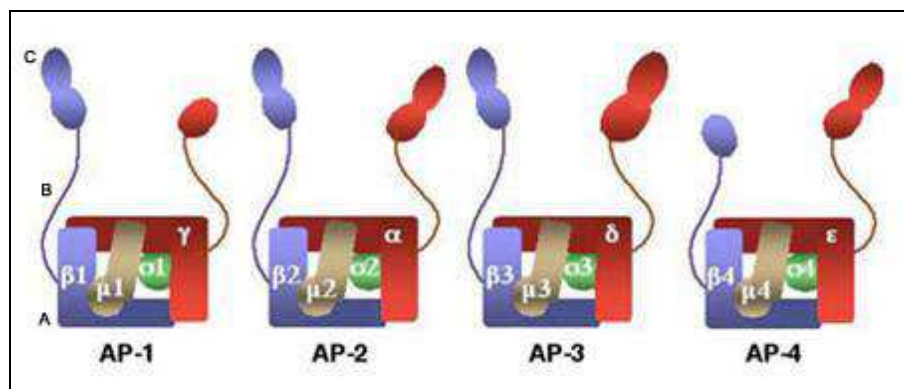


Figura 1.4 Representação esquemática dos complexos adaptadores. As subunidades maiores dos complexos adaptadores (γ , α , δ , ϵ e $\beta 1-4$) possuem: A- região N-terminal (tronco), B- haste flexível (dobradiça) e C- apêndice ou orelha (C-terminal). Fonte: <http://cbmp.nichd.nih.gov/sipt/index.html>

Cada complexo AP possui duas subunidades grandes com aproximadamente 100 kDA. Uma delas é a subunidade $\beta 1-4$, semelhante nos quatro complexos. A outra subunidade grande é denominada γ , α , δ e ϵ para os complexos AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4, respectivamente (Figura 1.5). Os complexos APs também possuem uma subunidade média de aproximadamente 50 kDA ($\mu 1-4$) e uma menor com cerca de 20 kDA ($\sigma 1-4$) (Kirchhausen, 1999). No caso de AP-1 e AP-2 as subunidades β , μ e σ possuem alto grau de homologia (~40%-85% de sequência idêntica), enquanto as subunidades γ e α são mais diversas (~25% de identidade) (Edeling et al., 2006).

As subunidades maiores (γ , α , δ , ϵ e β) possuem um domínio N-terminal (tronco) e um domínio C-terminal (apêndice ou orelha), ligados por uma haste flexível (dobradiça). A dobradiça é uma região das adaptinas que possui maior sensibilidade a proteases, diferentemente do tronco e do apêndice, os quais são mais estáveis (Kirchhausen et al., 1989). Cada uma dessas regiões desempenha uma função de interação com os diversos componentes do revestimento de clatrina e componentes da membrana alvo.

O complexo AP-2 é um dos mais estudados e assim são atribuídas funções similares aos demais APs devido à similaridade de estrutura entre os complexos adaptadores. A estrutura do complexo adaptador é sustentada pela interação entre as diversas subunidades, sendo que grande parte desta interação é feita pelo tronco das subunidades maiores.

Neste contexto, a subunidade α define em qual região da membrana plasmática será formado o revestimento através da interação com fosfolipídeos. Da mesma forma, as demais subunidades γ , δ e ϵ dos complexos AP-1, AP-3 e AP-4 atuam na membrana de origem. As subunidades medianas (μ), por sua vez, reconhecem e ligam-se a um sinal de tirosina (YXXØ) ou dileucina (DXXLL) na cauda citoplasmática dos receptores (Kirchhausen, 2000),

enquanto a adaptina σ parece ter função estrutural na estabilização do complexo (Collins et al., 2002). Já o recrutamento da clatrina para a membrana plasmática é realizado primeiramente pela dobradiça da subunidade $\beta 2$, que possui um motivo de ligação a clatrina (Shih et al., 1995). Esse motivo de ligação a clatrina foi demonstrado por Dell'Angelica e colaboradores (1998) como sendo uma combinação de sequência de resíduos hidrofóbicos [L(L,I)(D,E,N)(L,F)(D,E)].

Além dos complexos APs existem outras proteínas acessórias que auxiliam a formação do revestimento e seleção da molécula a ser internalizada. Dentre elas estão eps15 (Epidermal growth factor receptor substrate 15), epsina, anfifisina, AP-180 e auxilina, que atuam na membrana plasmática (Kirchhausen, 2000) e Arf1 (ADP-ribosylation factor), Arf3 e GGAs (Golgi localized, gamma-ear-containing, ADP-ribosylation factor-binding protein), as quais estão envolvidas no tráfego de vesículas na RTG. A GGA é uma proteína adaptadora monomérica que possui homologia com a subunidade γ do complexo AP-1. Esse adaptador está envolvido com o transporte de vesículas a partir da RTG. Entretanto, ainda não é claro se a GGA atua associada ao complexo AP-1 ou paralelamente (Boman, 2001).

1.6 Complexo adaptador 1 (AP-1)

O complexo AP-1 está associado principalmente ao transporte anterógrado da rede trans-Golgi para o lisosomo (via endossomos) em células não polarizadas de mamíferos. As vesículas se formam na rede trans-Golgi envolvendo diversas proteínas e através de trilhos de microtubúlos, são guiadas até seu destino, o sistema endossomal (Gosh, 2003) (Figura 1.5).

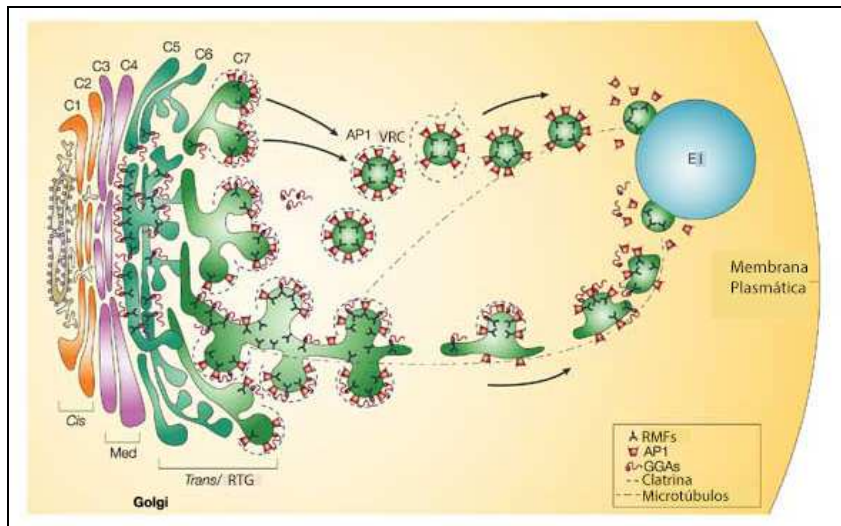


Figura 1.5 Desenho esquemático de brotamento de vesículas revestidas por clatrina/AP-1 no Golgi.

As cisternas de Golgi são numeradas de C1 a C7. Duas ou três cisternas formam a rede trans-Golgi (RTG). Vesículas revestidas por clatrina brotam a partir da última cisterna da RTG. O receptor transmembranar de manose-6-fosfato (RMF) presente RTG reconhece o ligante no lúmen da cisterna. Na face citoplasmática da membrana, proteínas adaptadoras (AP-1 ou GGA) se ligam à cauda do receptor e dão início à formação de um microdomínio na membrana. Por sua vez, a clatrina liga-se às proteínas adaptadoras para iniciar a formação do revestimento. Este aumenta e ocorre o desprendimento da vesícula que, em seguida, se desacopla da clatrina. As vesículas então se fundem com a membrana dos endossomos, onde entregam seu conteúdo. Adaptado de Gosh, 2003

Entretanto, estudos tem proposto que o AP-1 também pode atuar no transporte retrógrado, a partir do endossomo inicial ou de reciclagem. Essa via recicla para a rede trans-Golgi os receptores de manose-6-fosfato que seguiram para o sistema endossomo/lisosomo, ou aqueles que equivocadamente foram enviados para a membrana plasmática e posteriormente endocitados (Hirst et al., 2012).

O complexo adaptador-1 é expresso em todas as células eucarióticas e pode assumir funções diversificadas dependendo do tipo celular. Podemos citar como exemplo o envolvimento de AP-1 com o revestimento de clatrina de grânulos de secreção imaturos em células neuroendócrinas de rato (Dittie et al., 1996), com o tráfego de proteínas para os cílios olfativos em *Caenorhabditis elegans*, com a biogênese das roptrias (organelas de secreção) em *Toxoplasma gondii* (Ngô et al., 2003), com a formação do vacúolo contrátil em *Dictyostelium discoideum* (Lefkir et al., 2004) e localização de proteínas no RTG em leveduras (Foote & Nothwehr, 2006). Na maioria das células epiteliais existem dois complexos adaptadores AP-1: AP-1A e AP-1B. Enquanto o AP-1A atua no transporte rede

trans-Golgi / endosomos, o complexo AP-1B atua no transporte vesicular rede trans-Golgi / superfície basolateral da célula (Fölsch et al., 2003).

Foi proposto que fosfadil-inositol-4,5-bifosfato é o fosfolípídeo que interage com o AP-1 na membrana do rede trans-Golgi (Crottet et al., 2002). Outros componentes que podem auxiliar na formação do revestimento de clatrina interagindo com AP-1 são GTPase ARF-1, GGA, γ -sinergina, rabaptina-5, epsinaR, NECAP, anftifilina e γ -BAR, assim como as anftifisinas 1 e 2, as quais por sua vez também podem interagir com o complexo AP-2.

Muitos aspectos que envolvem o complexo AP-1 ainda não estão totalmente esclarecidos a respeito de sua função, formação do revestimento e envolvimento com outros elementos na formação dessa complexa rede de interações. O complexo AP1 tem sido objeto de estudo em diversos organismos, mas no que se refere aos tripanosomatídeos os conhecimentos a respeito desse adaptador ainda são incipientes.

1.7 Protozoários tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos são protozoários flagelados pertencentes ao reino Protozoa, sub-reino Eozoa, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae (Cavalier-Smith, 2010).

A família Trypanosomatidae compreende um grande número de protozoários parasitas, muitos dos quais causam graves doenças em humanos. Entre eles estão *T. brucei*, *Leishmania* spp. e *T. cruzi*. O *Trypanosoma brucei* é o agente causador da doença do sono em humanos e da nagana em gado. Essas enfermidades são as principais causas de morbidade e dificuldades econômicas em regiões endêmicas da África. Espécies de *Leishmania* são causadoras de diversos tipos de leishmaniose, que variam desde pequena úlcera na pele até doença visceral fatal, atingindo África, Ásia, partes da Europa e América Latina (WHO, 2012). Todos os parasitas descritos acima são transmitidos principalmente por insetos vetores hematófagos infectados e invadem uma gama de células e tecidos no hospedeiro mamífero.

1.8 *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanosomíase americana ou doença de Chagas e estima-se que mais de 10 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, com mais de 25 milhões de pessoas em risco de contrair a doença (WHO, 2012). A transmissão do protozoário acontece principalmente pela via vetorial, através das fezes do inseto barbeiro,

podendo ocorrer também por via transfusional, via congênita (através da placenta), por transplante de órgãos, via oral e via acidental como acidente laboratorial ou contato com animais infectados (Coura, 2007).

A doença de Chagas se caracteriza por apresentar fases aguda e crônica distintas. A fase aguda pode ser ou não sintomática e nesse último caso os sintomas podem ser febre, adenopatia generalizada, edema, hepatoesplenomegalia e miocardia. Se não tratados os casos agudos podem evoluir para quadros crônicos podendo apresentar ou não sintomas como distúrbios cardíacos e digestivos (Coura, 2007). As formas mais graves são caracterizadas pelo comprometimento cardíaco e/ou digestivo (Prata, 2001).

É válido ressaltar que ainda não existe profilaxia eficiente para a doença de Chagas seja por vacinação ou tratamento quimioterápico efetivo. Dessa forma, a obtenção de conhecimentos sobre os processos biológicos desse parasita e sobre o tratamento efetivo dessa doença são necessários. Além da relevância para a área da saúde pública, o *T. cruzi* é um organismo eucariótico primitivo sendo um excelente modelo para o estudo de sistemas biológicos.

1.9 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* em seu ciclo de vida passa por dois hospedeiros: um inseto triatomíneo (ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, conhecidos popularmente como barbeiros) e um mamífero. O mamífero hospedeiro pode ser um animal silvestre ou doméstico ou mesmo o homem.

Durante o repasto sanguíneo de um mamífero infectado, o triatomíneo se alimenta de formas infectivas (tripomastigotas sanguíneas) de *T. cruzi*, que ao atingirem o trato digestivo do inseto assumem a forma replicativa epimastigota. Após sucessivas replicações por divisão binária, esses parasitas assumem a forma tripomastigota metacíclica na ampola retal dos insetos. Em um novo repasto do inseto, esses tripomastigotas metacíclicos serão eliminados juntamente com as fezes e urina no local da picada e podem então alcançar a corrente sanguínea do hospedeiro por via cutânea ou através de mucosas. No hospedeiro vertebrado os tripomastigotas podem infectar células, onde se diferenciam em formas amastigotas que se replicam e se diferenciam em tripomastigotas. Com o rompimento da célula hospedeira, formas tripomastigotas são liberadas para infectar outras células ou alcançar a corrente sanguínea para serem capturadas por um novo inseto vetor (Figura 1.7).

A diferenciação da forma epimastigota em tripomastigota metacíclica do *T. cruzi* é denominada metaciclogênese e ocorre naturalmente no intestino do inseto vetor. Esse processo no entanto pode ser mimetizado in vitro utilizando-se meio quimicamente definido que simula as condições da urina do inseto vetor (Contrera et al., 1985).

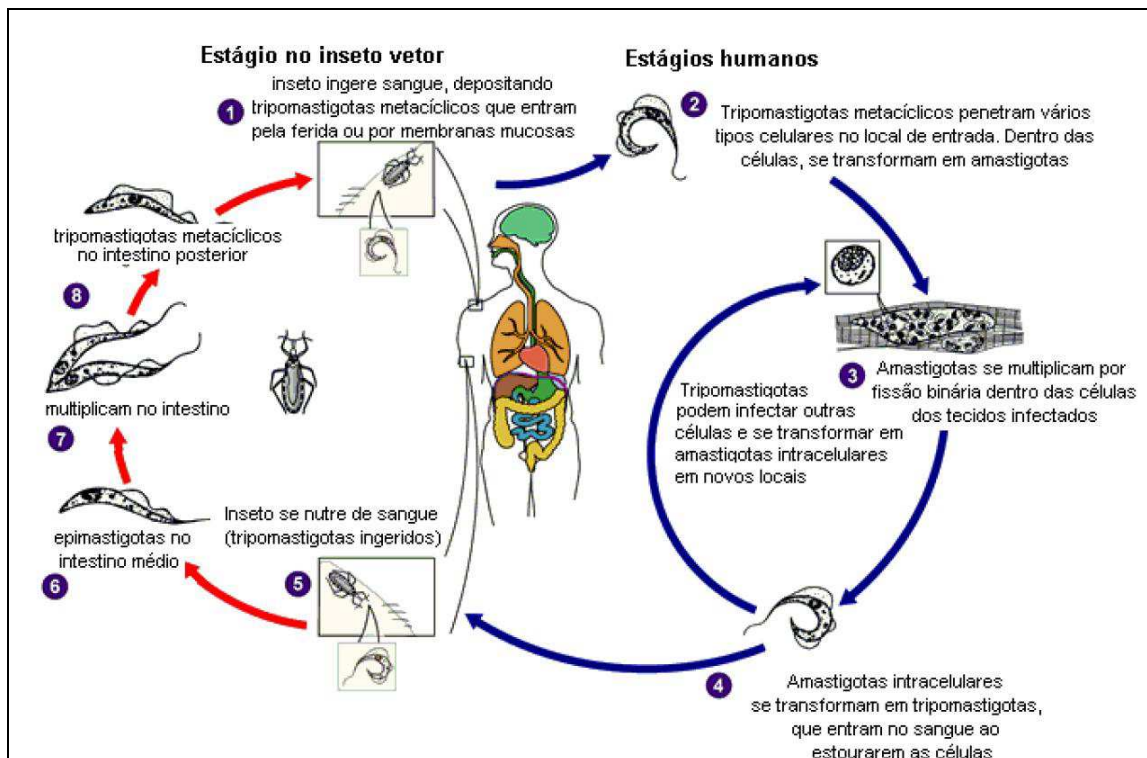


Figura 1.6 Desenho esquemático do ciclo de vida de *T. cruzi*.

Fonte: CDC (Center for Disease and Control)

www.dpd.cdc.gov/dpdx.

1.10 Biologia celular do *Trypanosoma cruzi*

Todos os membros da família Trypanosomatidae possuem um único flagelo, que surge a partir de uma invaginação na região anterior da célula chamada bolsa flagelar (Figura 1.7). O tamanho do flagelo pode variar dependendo do estágio de desenvolvimento do parasita. Em epimastigotas e tripomastigotas parte do flagelo mantém-se aderido ao corpo, enquanto que em formas amastigotas o flagelo é muito curto e não é aderido ao corpo (De Souza, 2002). Os tripanosomatídeos possuem somente uma mitocôndria, que se estende ao longo da célula. Na porção anterior do parasita a mitocôndria forma uma matriz de DNA conhecida como cinetoplasto (De Souza, 2002).

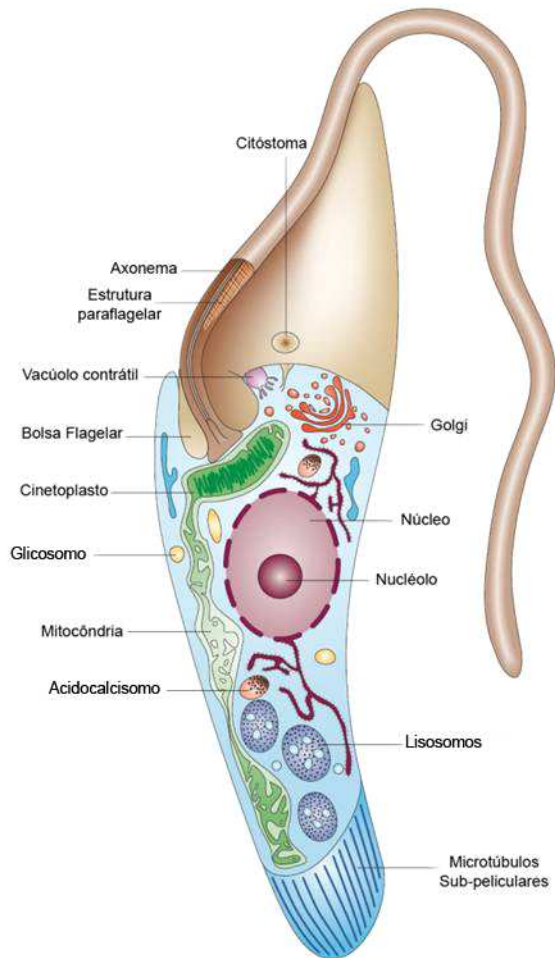


Figura 1.7 Esquema das principais estruturas celulares de *T. cruzi*. Fonte: Do Campo et al (1975).

Abaixo da membrana plasmática ocorre uma rede subpelicular de microtúbulos, ligados à membrana plasmática por filamentos curtos de natureza desconhecida. Essa forte associação do citoesqueleto confere à superfície desses organismos uma alta resistência à ação mecânica, temperatura ou drogas (De Souza, 2002). A bolsa flagelar é a única região da célula onde não existem microtúbulos associados à membrana (Overath et al., 1997). Devido à localização específica de vários receptores na bolsa flagelar, acredita-se que a maior parte do tráfego vesicular e a entrada de nutrientes ocorram nesta região. Outra invaginação menor, localizada próxima à bolsa flagelar, é o citóstoma (Figura 1.7), também envolvido com a absorção de nutrientes (Porto-Carreiro et al., 2000).

A forma epimastigota do *T. cruzi* é capaz de ingerir macromoléculas do meio externo por endocitose, seja pela bolsa flagelar ou pelo citóstoma. Tal atividade é inexistente ou muito reduzida nas formas tripomastigotas e amastigotas (De Souza et al., 2009). Na região posterior de epimastigotas de *T. cruzi* são encontrados os reservosomos, organelas esféricas onde se acumulam proteínas ingeridas oriundas da bolsa flagelar e do citóstoma. Entre as

proteínases presentes nos reservosomos destaca-se em quantidade a cruzipaina (uma cisteíno-proteinase), tendo sido proposto que reservosomos são compartimentos pré-lisosomais (Soares et al., 1992). Também foi proposta a participação dos reservosomos no processo de metaciclo-gênese, como principal fonte de energia para esta atividade (Soares, 1999).

Distribuídos pelo citoplasma estão os glicosomos, um tipo especializado de peroxisomo que acumula enzimas da via glicolítica envolvidas na conversão da glicose a 3-fosfoglicerato (Hannaert et al., 2003). Outras organelas particulares são os acidocalcisomos, envolvidos na estocagem intracelular de cálcio, um íon importante para os processos de sinalização celular. Os acidocalcisomos provavelmente estão envolvidos em diversos processos biológicos, tais como adaptação a condições de estresse ambiental, manutenção do pH intracelular e osmo-regulação (Docampo et al., 2005).

O retículo endoplasmático (RE) liso e rugoso é encontrado por todo o corpo de todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. Ocorre um único complexo de Golgi e suas cisternas são sempre observadas na porção anterior do corpo celular, entre o núcleo e o cinetoplasto, próximo à bolsa flagelar (Figura 1.8) (De Souza, 2002).

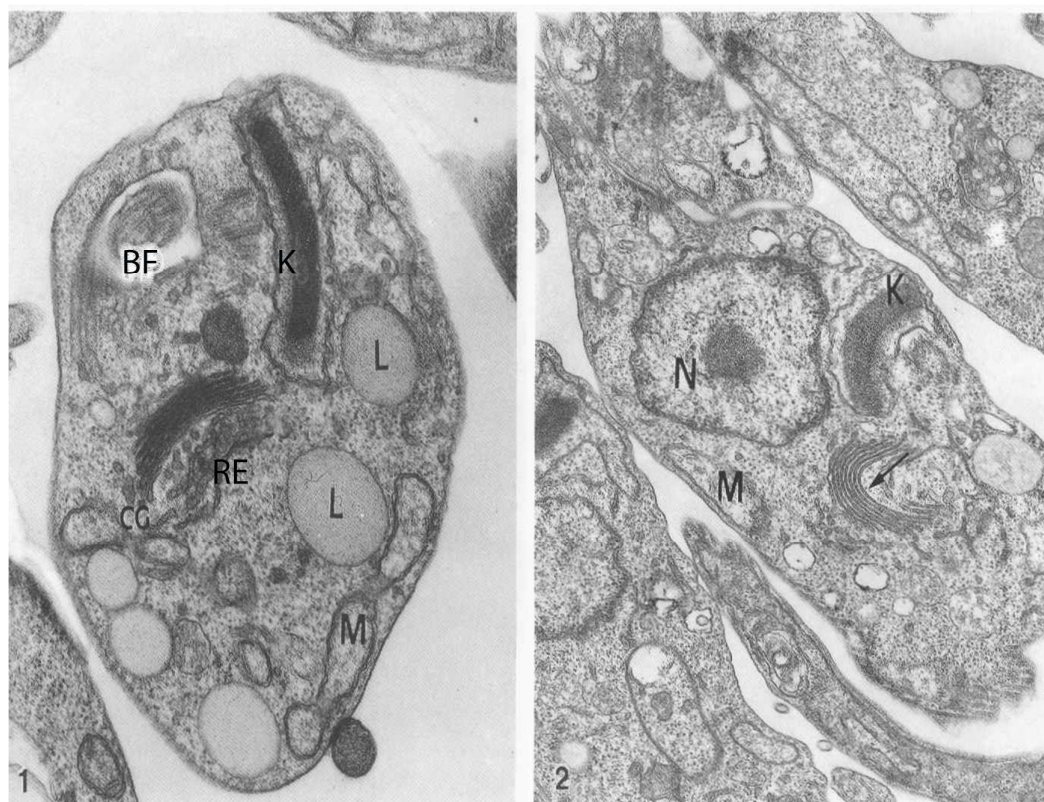


Figura 1.8 Micrografia de formas epimastigota de *T. cruzi*. 1: Região anterior do parasita, onde se localiza a bolsa flagelar (BF), kinetoplasto (K), retículo endoplasmático (RE), complexo de Golgi (CG), mitocôndria (M) e gotas de lipídios (L). 2: Cisternas de Golgi (seta) além de núcleo (N) e kinetoplasto e mitocôndria. Adaptado de Figueiredo, 1995.

1.11 Clatrina e AP-1 em tripanosomatídeos

Os tripanosomatídeos possuem características distintas e importantes nos processos de endocitose e exocitose. Tais processos nesses organismos, diferentemente do que acontece na maioria das células eucarióticas, são altamente polarizados, ocorrendo principalmente na região da bolsa flagelar (De Souza, 2002).

Nos poucos trabalhos existentes sobre clatrina e complexos adaptadores em tripanosomatídeos, destaca-se a relevância destas proteínas na infectividade e na viabilidade dos parasitas. Estes estudos estão concentrados em *T. brucei*, *Leishmania* spp. e *T. cruzi*.

Em *T. brucei* foi evidenciada a presença de vesículas com revestimento de clatrina na bolsa flagelar e no complexo de Golgi. Demonstrou-se que depleção da clatrina é letal, indicando a sua importância na sobrevivência do parasita. Através da técnica de RNA de interferência de clatrina notou-se, por microscopia eletrônica de transmissão, que as células apresentavam um grande inchaço na bolsa flagelar, indicando que apesar da endocitose ter sido prejudicada, o processo exocítico permaneceu em atividade (Allen et al., 2003).

A função do complexo AP-1 em *T. brucei* foi investigada por silenciamento (através de RNA de interferência) da subunidade $\mu 1$. Demonstrou-se que este complexo é essencial para o protozoário, mediando o tráfego lisosomal a partir da RTG. Entretanto, a falta de Tb $\mu 1$ não afetou o processo exocítico do parasita (Tazeh et al., 2009).

É importante ressaltar que no genoma de *T. brucei* são encontrados apenas os complexos adaptadores AP-1, AP-3 e AP-4. Por outro lado, em *Leishmania* spp. o complexo adaptador que está ausente é o AP-4. Já *T. cruzi* possui os quatro complexos adaptadores, porém há somente três subunidades β : β -1/2, β -3 e β -4. Assim, a subunidade β está presente tanto no AP-1 como no AP-2 nesse parasita (Denny et al., 2005).

Foi demonstrada a presença de vesículas com revestimento na bolsa flagelar e no complexo de Golgi em *Leishmania mexicana*, sugerindo a presença de clatrina nessas regiões (Weise, 2000). Gokool (2003) verificou a importância das subunidades μ e σ do complexo AP-1 em *L. mexicana*. Após deleção desses dois genes observou-se que os protozoários mutantes mantiveram-se viáveis em cultura, porém sem capacidade de infectar células (macrófagos) ou o vertebrado (camundongo).

Denny e colaboradores (2005) realizaram imunolocalização da cadeia pesada de clatrina e da subunidade β de AP-1 em *Leishmania major*. Clatrina foi localizada em estruturas vesiculares ao longo do corpo do parasita e a subunidade $\beta 1$ co-localizou parcialmente com o complexo de Golgi e também ao longo da célula.

Em um estudo inicial em *T. cruzi* foi relatada a possível presença de endocitose mediada por receptor em formas epimastigotas (Soares et al., 1991). Posteriormente, um estudo por microscopia eletrônica de transmissão evidenciou-se a presença de vesículas com possível revestimento de clatrina brotando a partir do complexo de Golgi (Sant'Anna et al., 2004).

Corrêa e colaboradores (2007) identificaram em base de dados genômicos de *T. cruzi* a presença do conjunto de genes que expressam as proteínas necessárias para o brotamento de vesículas revestidas com clatrina nesse protozoário. Nesse conjunto estão presentes os genes que expressam as adaptinas do complexo adaptador AP-1. A expressão de clatrina em formas epimastigotas de *T. cruzi* foi demonstrada por ensaio de western blot utilizando anticorpos contra clatrina bovina. Imunolocalização da clatrina por microscopia confocal evidenciou sua presença na região anterior do parasita, na região da bolsa flagelar e complexo de Golgi. Ensaio de endocitose de albumina marcada com ouro coloidal analisado por microscopia eletrônica de transmissão mostrou a presença de vesículas com possível revestimento de clatrina brotando da bolsa flagelar e próximo ao complexo de Golgi (Corrêa et al., 2007).

Recentemente, Kalb (2011) produziu anticorpos policlonais em camundongo contra a cadeia pesada de clatrina de *T. cruzi* e demonstrou sua existência e expressão nesse parasita. Imunolocalização por microscopia confocal a laser e microscopia eletrônica de transmissão mostrou a presença de clatrina na região da bolsa flagelar e complexo de Golgi, além de marcação difusa pelo citoplasma, reforçando os dados obtidos anteriormente por Corrêa e colaboradores (2007).

O conhecimento sobre a formação de vesículas revestidas com clatrina (nas via endocítica e biossintética), e mais precisamente sobre o complexo adaptador 1 na RTG (via biossintética) pode ser considerado escasso em tripanosomatídeos. Dados de bioinformática, associados à demonstração de brotamento de vesículas com possível revestimento de clatrina a partir do complexo de Golgi em *T. cruzi* (Sant'Anna et al., 2004; Corrêa et al., 2007) são até o momento, os únicos estudos a respeito da via que leva hidrolases até os lisosomos nesse parasita. Portanto, ainda não se sabe se esse processo é realizado por meio de vesículas revestidas com clatrina e pelo do complexo adaptador 1, como nos demais eucariontes.

Nesse sentido, ampliar os conhecimentos que envolvem o complexo AP-1 em *T. cruzi* é de grande importância para a compreensão dos mecanismos de um processo biológico essencial para maioria das células eucarióticas.

2 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de subunidades do complexo adaptador AP-1 em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*, assim como sua localização subcelular.

2.1 Objetivos específicos

- 1) Caracterizar por análise bioinformática os genes para as quatro subunidades do complexo adaptador 1 (β , μ , σ e γ) no genoma de *T. cruzi*;

- 2) Produzir anticorpos em camundongos contra adaptinas de *T. cruzi*, para isso:
 - 2.1 obter adaptinas recombinantes a partir da amplificação e clonagem dos genes identificados em vetores de expressão em bactérias;
 - 2.2 imunizar camundongos com as proteínas recombinantes para obtenção de antisoros policlonais e monoclonais;

- 3) Avaliar a expressão dos genes das adaptinas do complexo AP-1 nas três formas evolutivas de *T. cruzi* (formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas);

- 4) Identificar a localização subcelular das proteínas selecionadas em formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Reagentes

Amersham Bioscience: dNTPs, membrana de nitrocelulose Hybond C, anticorpo monoclonal anti-GST (glutathione-S-transferase), Anti-IgG de camundongo, *Taq* DNA polimerase.

Appligene: IPTG (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside).

Bio-Rad: Acrilamida, agarose (ultraPure DNA grade), azul de Bromofenol, bis-acrilamida, persulfato de amônio.

Cultilab: Soro fetal bovino (SFB).

Difco: Bacto triptona, extrato de levedura, infuso de fígado, triptose.

Electron Microscopy Science: Paraformaldeído, poli-L-lisina, cloridrato de ouro.

GE Lifesciences: pGEX-4T₁.

Invitrogen Inc.: EDTA, fenol, Tris-HCl, IPTG, agarose, marcador de massa molecular Benchmark, AlexaFluor 488, Gateway *BP Clonase*TM II, Gateway *LR Clonase*TM II, Gateway pDONRTM221, *kit PCR Platinum Pfx*, Hoechst 33342, SDM79.

Merck: Acetato de sódio, ácido acético glacial, ácido clorídrico, Bicarbonato de sódio, carbonato de sódio, cloreto de cálcio, cloreto de magnésio, cloreto de potássio, cloreto de sódio, clorofórmio, etanol absoluto, formaldeído, glicina, glicose, metanol, SDS, sulfato de magnésio, hidróxido de sódio, isopropanol, fosfato dibásico de sódio.

Microbiológica: Hemina.

New England Biolabs: Endonucleases de restrição e Tampões, 1 kb Plus DNA Ladder.

Promega: Tripsina, NBT, BCIP.

Qiagen: QIAprep spin miniprep kit.

Seppic: Montanide.

Serva Electrophoresis: Alu-Gel.

Sigma: Acetato de amônio, ácido bórico, Amberlit, ampicilina, anti-mouse IgG conjugado a ouro coloidal 10 nm, β -mercaptoetanol, brometo de etídeo, soro albumina bovina (BSA), cacodilato de sódio, cloreto de amônio, cloreto de magnésio, Dulbecco's Modified Eagle's medium (DMEM), DEAE-celulose, glicerol, glutaraldeído, Ficoll, canamicina, Ponceau S, meio Schneider, TEMED, Triton-X-100, Tween 20, adjuvante completo de Freund, HT (hipoxantina e timina), HAT (hipoxantina, aminopterina e timina), streptomomicina.

USB Corporation: Persulfato de amônio, *T4 DNA Ligase*, Tris-HCl, uréia, L-glutamina.

3.2 Meios de cultura

- **Meio LB (Luria Bertani):** Triptona 1%, extrato de levedura 5% e NaCl 1%
- **Meio LB agar:** Meio LB suplementado com 15 g/l de Agar.
- **Meio LIT (liver infusion tryptose):** infuso de fígado 0,5%, NaCl 75,3 mM, KCl 5,4 mM, glicose 10 mM, bacto-triptose 0,5%, Na₂HPO₄ 56,4 mM, hemina 0,0025%, soro fetal bovino 10% e extrato de levedura 15 g/l.
- **Meio TAU (Triatomine Artificial Urine):** NaCl 190 mM, KCl 17 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 2 mM e tampão fosfato 8 mM pH 6,0.
- **Meio TAU3AAG:** meio TAU suplementado com L-prolina 10 mM, glutamato sódico 50 mM, aspartato sódico 2 mM e glicose 10 mM.
- **Meio HAT:** Meio Hipoxantina Aminopterina Timidina. RPMI suplementado com 10 mM hipoxantina; 1,6 mM timidina; 0,04 mM aminopterina
- **Meio HT:** Meio Hipoxantina Timidina. RPMI suplementado com 10 mM hipoxantina; 1,6 mM timidina
- **Meio RPMI:** Meio Roswell Park Memorial Institute. Contendo: 41,6 g de meio RPMI comercial em pó, 8,0 g de Bicarbonato de Sódio, 9,2 g de Hepes. Para a obtenção do meio completo deve-se adicionar 20% de Soro Fetal Bovino, 1% do volume final de Glutamina 100mM; 1% do volume final de Piruvato de Sódio.
- **PEG:** Polietilenoglicol - 50% v/v em meio RPMI sem soro fetal bovino.

3.3 Tampões e Soluções

Fenol/Clorofórmio: 25 partes de fenol saturado, 24 partes de clorofórmio, 1 parte de álcool isoamílico.

PBS: NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 4,3 mM e KH₂PO₄ 1,5 mM.

PSG: Na₂HPO₄ (anidro) 47,47 mM, NaH₂PO₄·H₂O 2,5 mM, NaCl 36,76 mM e glicose 55,5 mM.

Solução de suspensão de corpúsculo: Tris-HCl 20 mM pH 8,0, NaCl 0,5 M e Triton X-100 2%.

Solução de bloqueio para imunocitoquímica: PBS-1x pH 8,0, BSA 1,5%, Tween 20 0,01%.

Solução de bloqueio para imunofluorescência: PBS-1x e BSA 1%.

Solução de bloqueio para western blot: PBS, Tween 0,05% e leite em pó desnatado 5%.

Solução de lise para toothpick: NaOH 50 mM, Glicerol 5%, SDS 0,5%, EDTA 5 mM e azul de bromofenol 0,025%.

Solução Ponceau S: Ponceau S 0,5% em ácido acético 1%.

Solução de coloração para géis de proteína: Coomassie blue R-250 0,1% em metanol/ácido acético (45%/10%).

Solução para descoloração de géis de proteína: Metanol 4%, ácido acético 7,5%.

Solução reveladora para ELISA: Com o substrato enzimático e cromógeno: Sure Blue Reserve TMB Microwell Peroxidase substrate.

Solução de lise de hemácias: cloreto de amônio 168 mM.

Tampão da fosfatase alcalina: Tris-HCl pH 9,5 1M, NaCl 5M, MgCl₂ 5M.

Tampão de amostra para DNA 10X: Ficoll 400 25%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol FF 0,25%.

Tampão de amostra para proteína 4X: Tris-HCl 40 mM pH 6,8, SDS 1%, β-mercaptoetanol 2,5%, glicerol 6% e azul de bromofenol 0,005%.

Tampão de eletroforese para SDS-PAGE: Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e SDS 0,1%.

Tampão para transferência (*western blotting*): Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM e metanol 20%.

Tampão TBE: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 8,0 e EDTA 1 mM.

3.4 Organismos

- *Escherichia coli* linhagens TOP10F', DH5α, BL21STAR (DE3).
- *Mus musculus* linhagem Balb/c.
- *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c.
- *Trypanosoma cruzi* clone Dm28c transgênico contendo um alelo do gene que codifica a proteína Rab7 fusionada a GFP (*Green fluorescent protein*).

3.5 Cultivo de *Trypanosoma cruzi*

Nesta dissertação foi utilizado o clone Dm28c de *Trypanosoma cruzi*, cuja cepa original foi isolada de *Didelphis marsupialis* (Contreras et al., 1985, Contreras et al., 1988)

nas formas epimastigotas de cultura, tripomastigotas metacíclicos obtidas de metaciclologênese in vitro, tripomastigotas e amastigotas obtidos de cultura de células Vero.

3.5.1 Formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas axenicamente a 28°C em meio LIT (Camargo, 1964) com repiques a cada três dias e inóculo de 10^6 células/ml. Para os experimentos, formas epimastigotas foram coletadas por centrifugação a 7.000g por 5 minutos no terceiro dia de cultivo (fase logarítmica de crescimento).

3.5.2 Formas tripomastigotas e amastigotas

Formas metacíclicas foram obtidas através do processo de diferenciação in vitro (Contreras et al., 1985; Bonaldo et al., 1988; Contreras et al., 1988). Formas epimastigotas de cultura em final de fase exponencial de crescimento (densidade celular $5-7 \times 10^7$ células/ml) foram coletadas por centrifugação a 7.000g por 5 minutos a 10°C, ressuspensas em meio TAU na concentração de 5×10^8 células/ml e mantidas a 28°C por 2 horas. Após este período, correspondente ao estresse nutricional, as células foram transferidas para garrafas de 300 cm² contendo 200 ml de meio TAU3AAG (concentração final de 5×10^6 células/ml). Após 72 horas de cultivo as formas tripomastigotas metacíclicas liberadas no sobrenadante foram coletadas e purificadas por passagem em coluna contendo a resina DEAE celulose equilibrada em PSG.

Para obter formas amastigotas e tripomastigotas de cultura de células, formas tripomastigotas metacíclicas foram utilizadas para infectar culturas de células Vero (ATCC n° CRL-2783), mantidas em meio RPMI suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Formas tripomastigotas foram coletadas no sobrenadante das culturas 96h após a infecção, enquanto formas amastigotas intracelulares foram obtidas após 10 dias de infecção. As formas amastigotas e tripomastigotas liberadas no sobrenadante foram coletadas por centrifugação a 7.000g por 5 minutos e utilizadas para obtenção de extrato proteico e ensaios de imunolocalização.

3.6 Obtenção de extrato protéico de *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas foram obtidas como descrito no item anterior. Para a produção de extratos protéicos, 2×10^8 células foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,5 por centrifugação (7.000g, 10 min a 4°C). Após as lavagens os parasitas foram ressuspensos em uma solução contendo 150 μ l de PBS, 50 μ l de tampão de amostra para proteína 4x e PMSF (phenylmethyl-sulfonyl fluoride) a 1 mM. As células foram incubadas neste tampão por 5 min a 100°C, rompidas por ultra-som (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co., USA) por 3 segundos em microtip na potência 2 e em seguida resfriadas em gelo. Os extratos foram utilizados a uma concentração final de 10^6 células/ μ l.

3.7 Seleção de Genes

Através do algoritmo BLAST foi realizada uma busca pelas sequências codificantes para cada subunidade do complexo adaptador-1 (AP-1) em *T. cruzi* no banco de dados do NCBI (National Center for Biotechnology Information), tendo como organismo modelo o *Homo sapiens*. Os genes selecionados (Tabela 3.1) foram os mesmos identificados anteriormente por Corrêa e colaboradores (2007).

Tabela 3.1 Genes de subunidades do complexo adaptador-1 selecionados no genoma de *Trypanosoma cruzi*.

Gene/ Proteína	Identificação	Tamanho do gene (pb)	Tamanho da proteína (kDa)
Adaptina Gama (AP1- γ)	Tc00.1047053508257.260	2403	89,1
Adaptina Beta (AP1- β)	Tc00.1047053506247.200	2898	106,1
Adaptina Mu (AP1- μ)	Tc00.1047053510533.40	1300	49
Adaptina Sigma (AP1- σ)	Tc00.1047053509623.19	504	19

As sequências gênicas das subunidades do complexo adaptador-1 de *Homo sapiens* foram usadas também para identificar as subunidades no genoma de diferentes eucariotos

(*Danio rerius*, *Gallus gallus* e *Drosophila melanogaster*). As sequências gênicas das subunidades do complexo adaptador-1 de *T. cruzi* foram usadas para identificar as subunidades no genoma de diferentes tripanosomatídeos (*Trypanosoma brucei*, *Leishmania braziliensis*, *Leishmania major* e *Leishmania infantum*). Para as análises de alinhamento foram selecionadas as sequências de maior similaridade e identidade.

3.8 Alinhamento de sequências gênicas do complexo adaptador 1

Através do programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) foi realizado alinhamento múltiplo entre as sequências das subunidades de AP-1, comparando-as entre diferentes organismos eucariotos selecionados e também entre protozoários da família Trypanosomatidae. Além de realizar o alinhamento de sequências, o programa ClustalW forneceu cladogramas evidenciando a divergência evolutiva para tais proteínas entre os diferentes organismos.

As sequências codificantes para as duas subunidades maiores do complexo AP-1 (AP1- γ e AP1- β) dos organismos *H. sapiens*, *T. brucei* e *T. cruzi* foram utilizadas para determinar os domínios proteicos dessas subunidades. Essa busca foi realizada através do software pFAM (<http://pfam.sanger.ac.uk/search/sequence>, Sanger Institute, Cambridge, UK), o qual possibilitou identificar domínios comuns nestas sequências.

3.9 Amplificação e clonagem dos genes do complexo AP-1 de *T. cruzi*

Para as subunidades menores do complexo AP-1 (μ e σ) optou-se por clonar o gene inteiro. Para a subunidade AP1- β foi clonada a sequência que codifica a região N-terminal da proteína. Já para a subunidade AP1- γ optou-se por clonar duas regiões: a região N-terminal (AP1- γ N) e a região chamada de dobradiça (AP1- γ D), região essa que liga a região N-terminal à C-terminal (Figura 3.1).

A região da dobradiça foi clonada utilizando-se a plataforma Gateway. As demais sequências (μ , σ , β e γ -N-terminal) foram clonadas utilizando-se endonucleases de restrição.

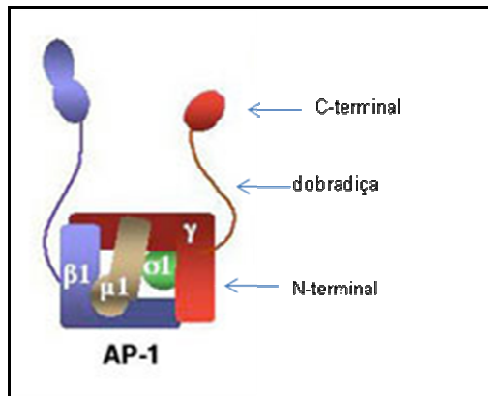


Figura 3.1 Desenho esquemático do complexo adaptador 1. Demonstração das regiões da subunidade AP1- γ , da qual foram clonadas a região da dobradiça e a região N-terminal. Fonte: <http://cbmp.nichd.nih.gov/sipt/index.html>

Com auxílio do programa *Primer Select* (Laser Gene, DNA Star) foram desenhados iniciadores direto (forward, F) e reverso (reverse, R) para amplificar as sequências mencionadas acima, usando como base a sequência gênica disponível no banco de dados do GeneDB (www.genedb.org, The Wellcome Trust Sanger Institute). À extremidade de cada iniciador foi acrescentada uma sequência de nucleotídeos correspondente aos sítios para endonucleases de restrição específicas para clonagem em vetores de expressão em *E. coli* (Tabela 3.2). Já para clonagem da dobradiça foram acrescentadas as sequências correspondentes aos sítios **attB** (Tabela 3.3) nas extremidades dos iniciadores (Tabela 3.2) para inserção das sequências na plataforma Gateway de clonagem.

Tabela 3.2 Oligonucleotídeos iniciadores para amplificar sequências gênicas de subunidades do complexo adaptador 1 de *T. cruzi*.

Gene	Oligonucleotídeos	Enzimas	Tamanho dos fragmentos
AP1- γ D (dobradiça)	F5' ATGAAAATCGCCTCCAGGTATCC 3' R5' ACAATCAAACACATGCACTTCAGG 3'	Sistema Gateway	485 pb
AP1- γ N (N-terminal)	F5' ATGGAGGGGAAACTTGAGTCG 3' R5' CATTCGTAATGGAATGGAGCAACC 3'	Eco e Sal	855 pb
AP1- β	F5' ATGCCGTATTGCGAAAGGT 3' R5' TCACGCAGTTTTTCCAGCTTAACATAGGGC 3'	Not e Sal	1080 pb
Ap1- μ	F5' ATGGCGTCAGTGTCTACATCTTGGACAGC 3' R5' TCAATATGTTCTTATCTGATAGTCCCCGC 3'	Eco e Sal	Inteira (1300 pb)
AP1- σ	F5' ATGATAAAATACCTGCTTCTAATCAGCC3' R5' TCAGGTGGCTGCAATGGCGGCGGC 3'	Eco e Sal	Inteira (504 pb)

Tabela 3.3 Sequências adaptadoras para plataforma Gateway. O códon de parada (destacado em negrito) foi acrescentado ao final da sequência codificadora da proteína recombinante.

Iniciadores	Sequências utilizadas
attB1 (inserida na extremidade do iniciador direto)	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTTC
attB2 (inserida na extremidade do iniciador reverso)	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGTCCTA

3.9.1 Clonagem usando endonucleases de restrição

O vetor de expressão utilizado foi o pGEX-4T-1 (Figura 3.2). Este plasmídeo permite clonar o gene de interesse fusionado ao gene da GST (Glutathione-S-Transferase). Este plasmídeo confere à bactéria resistência à ampicilina.

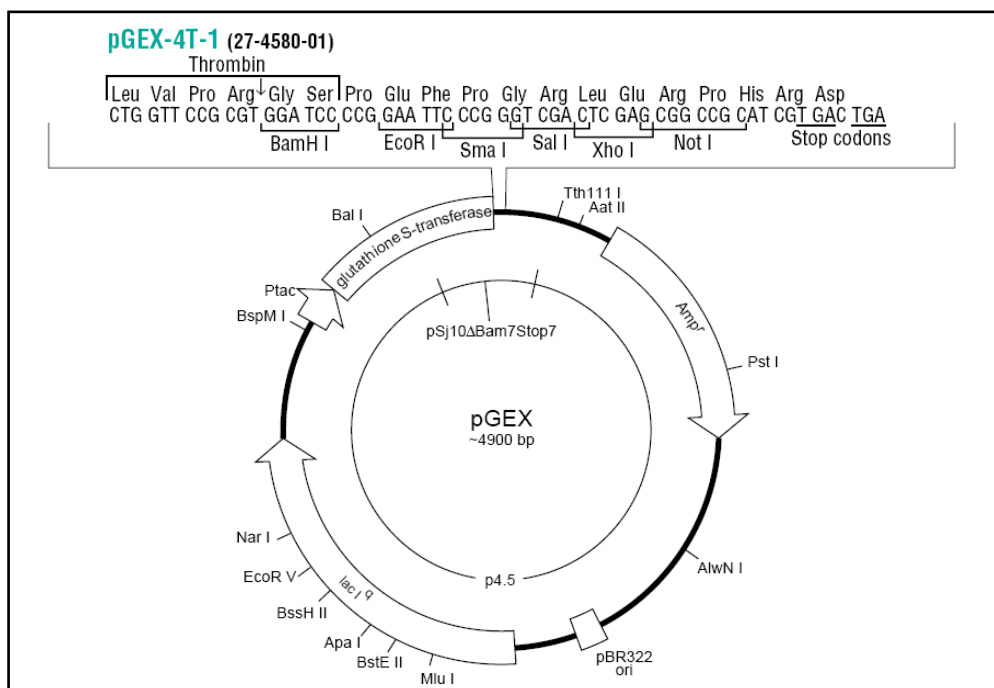


Figura 3.2 Esquema do plasmídeo pGEX-4T-1. Este plasmídeo possui os sítios de restrição para BamHI, EcoRI, SmaI, SalI, XhoI e NotI.

As ampliações por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foram realizadas com Taq DNA polimerase, tampão Taq DNA polimerase 1x, 100 ng de DNA total de *T. cruzi* (cedido por Rosana Gonçalves Pinho, ICC-FIOCRUZ), 10 pmol de cada oligonucleotídeo, 200 μM de cada dNTP, MgCl₂ 1,5 mM, e água qsp 100 μl.

As mesmas concentrações de reação foram utilizadas para todos os genes. As reações foram submetidas a 35 ciclos de PCR, sendo as condições de amplificação: desnaturação por 30 segundos a 94°C, anelamento dos iniciadores por 30 segundos a 55°C e extensão por 1-2 min a 72°C, dependendo do tamanho do gene (1 minuto para cada 1000 pares de bases). Antes do primeiro ciclo as reações foram mantidas por 4 minutos a 94°C. As reações foram realizadas em termociclador Eppendorf Mastercycler.

A amplificação foi verificada através de eletroforese em matriz de agarose horizontal a uma tensão de cerca de 100V, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989). As amostras foram diluídas em tampão de amostra de DNA 10x e aplicadas na matriz de agarose 1% em TBE, juntamente com o padrão de massa molecular (1 Kb Plus). O DNA foi corado com solução de brometo de etídio (0,5 μg/ml) e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador. O perfil eletroforético foi registrado em um sistema de foto documentação UVP (Biorad).

Os produtos da amplificação foram purificados por extração com fenol/clorofórmio. Para isso, foi adicionado ao material amplificado um volume igual de fenol/clorofórmio, seguindo-se centrifugação a 13.000g por 2 minutos e precipitação com etanol na presença de acetato de sódio a 0,3 M, pH 6,0 por 30 minutos em gelo seco. O DNA foi coletado por centrifugação a 13.000g e lavado com etanol 70%. Após secar a temperatura ambiente, o DNA foi diluído em tampão TE contendo RNase a 20 µg/ml e quantificado por espectrofotometria UV a 260 nm.

O material amplificado e purificado por extração em fenol/clorofórmio (inserto) foi digerido com as enzimas de restrição adequadas (Tabela 3.2) na relação molar de 3:1 (inserto:plasmídeo), com uso de 20 U de cada enzima e seus respectivos tampões em volume final de 20 µl, por 16 h a 37°C. O material foi novamente purificado por extração em fenol/clorofórmio.

O inserto foi ligado ao vetor pGEX-4T-1, previamente digerido com as enzimas de restrição correspondentes (Tabela 3.2) em volume de reação de 10 µl, contendo tampão da enzima T4 DNA ligase e uma unidade da enzima T4 DNA ligase. A reação foi incubada a 16°C por 18 h, gerando um clone, o qual foi usado para transformar as cepas TOP10F' (AP1-β, AP1-μ e AP1-σ) e BL21Star (AP1-γN) de *Escherichia coli* competente por tratamento com cloreto de cálcio (cepa cálcio-competente). Tendo selecionado o clone contendo a inserção correta, foi feita a purificação dos plasmídeos conforme item 3.12. Tanto na transformação quanto na purificação o antibiótico usado para a seleção foi a ampicilina.

3.9.2 Clonagem e recombinação de AP1- γD em vetores da plataforma Gateway

Para o gene que codifica a proteína adaptina Gama (AP1-γ), optou-se por clonar também a região dobradiça (AP1-γD) que está entre as porções N-terminal e C-terminal. Para essa clonagem foi utilizada a tecnologia *Gateway*, que tem por base a recombinação utilizando-se sequências sítio-específicas do bacteriófago lambda (Landy, 1989). Para isso, na criação dos oligonucleotídeos foi adicionada uma sequência **attB** nucleotídica específica de acordo com instruções do fabricante, para ser possível a recombinação com o sítio **attP** presente no vetor de entrada pDONR. A amplificação foi realizada conforme descrito no item 3.9.1.

Após a amplificação, a purificação foi realizada com solução de polietilenoglicol (30% PEG 8000 e 30 mM MgCl₂). Para isso, o produto da PCR foi diluído quatro vezes em TE, seguido da adição e homogeneização em meio volume de solução de polietilenoglicol. Em

seguida essa mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento foi seco e então ressuspenso em 15 µl de água. As amostras purificadas foram submetidas a eletroforese em matriz de agarose.

O produto de PCR purificado foi utilizado em reação de recombinação com vetor de entrada pDONR221 (Figura 3.3), conforme orientações do fabricante (*Gateway BP clonase II Enzyme mix*, Invitrogen). Para isso foram utilizados 30 ng do produto de PCR contendo o sítio **attB** e 150 ng do plasmídeo pDONR221, 2 µl de mix enzimático BP Clonase II em um volume final de 8 µl em TE. As reações foram incubadas a 25°C por 16 horas. Após essa etapa, foi adicionado 2 µg de proteinase K e a reação foi incubada por 10 min a 37°C. Em seguida esse material foi usado para transformar células cálcio-competentes de *E. coli* linhagem DH5α (item 3.10) e os clones foram selecionados mediante técnica de palitagem descrita no item 3.11. Tendo selecionado o clone contendo a inserção correta, foi feita a purificação dos plasmídeos conforme item 3.12. Tanto na transformação quanto na purificação o antibiótico usado para a seleção foi a canamicina.

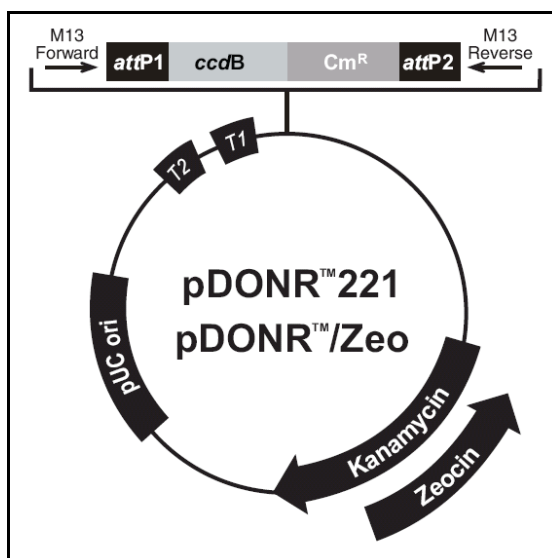


Figura 3.3 Vetor de entrada pDONR 221 (Invitrogen).

O clone de entrada foi recombinado para o vetor de expressão pDEST17 (Figura 3.4), o qual possui a característica de adicionar uma etiqueta de histidina à proteína heteróloga. Este procedimento foi realizado com o auxílio do mix enzimático LR Clonase II. Foi seguido a recomendação pelo fabricante, sendo utilizados 150 ng do plasmídeo pDONR22 com o fragmento do gene e 150 ng do plasmídeo pDEST17, 2 µl da enzima LR clonase II e TE a um volume final de 10 µL. A reação de recombinação foi mantida a 25°C por 16 horas. Após esse período foi adicionado 2 µg de proteinase K e a reação foi incubada por 10 minutos a 37°C.

Em seguida esse material foi usado para transformar células cálcio-competentes BL21Star (item 3.10). Clones foram selecionados através da técnica de palitagem conforme descrito no item 3.11, sendo que o antibiótico usado para a seleção foi a ampicilina. Tendo selecionado o clone contendo a inserção correta, foi feita a purificação dos plasmídeos conforme descrito no item 3.12 e confirmação dos clones positivos por PCR.

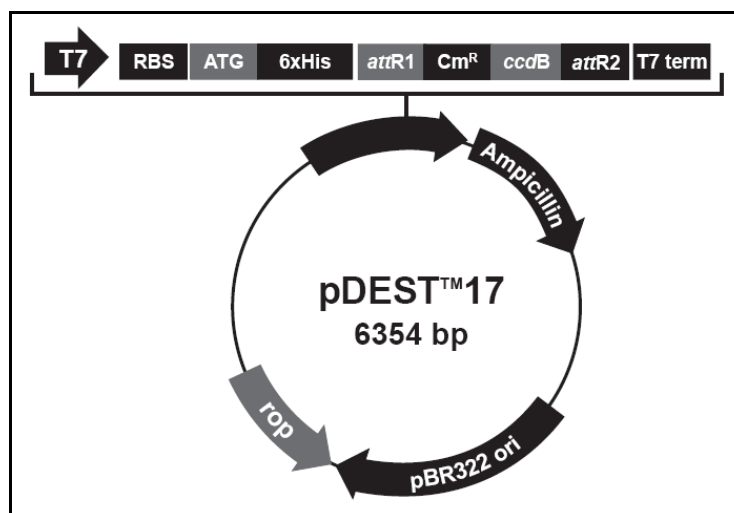


Figura 3.4 Vetor de destino utilizado, pDEST17 (Invitrogen) .

3.10 Transformação dos clones recombinantes

3.10.1 Preparação de bactérias cálcio-competentes

Uma colônia de *E. coli* da cepa desejada foi inoculada em 5 ml de meio LB contendo antibiótico apropriado para cada cepa. A cultura foi incubada a 37°C por 18 horas sob agitação constante. Um volume de 1 ml (inóculo de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 ml de meio LB e incubado a 37°C sob agitação constante até o início da fase de crescimento exponencial (aproximadamente 3 horas; densidade ótica a 600 nm entre 0.4 a 0.6, medida em espectrofotômetro LKB Ultrospec II, Pharmacia).

Após o crescimento, as células foram resfriadas em gelo por 15 minutos. A partir desse ponto todas as etapas foram feitas a 4°C. As culturas foram centrifugadas a 4.000g por 5 minutos e as células foram suspensas em 50 ml (metade do volume da cultura original) de tampão de preparo de células cálcio-competentes gelado e estéril. As células foram mantidas em gelo por 30 minutos e então submetidas a centrifugação sob as mesmas condições anteriores. O sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 2 ml (1/50 do volume da

cultura original) de tampão de estocagem de células cálcio-competentes. As células foram aliquotadas e estocadas a -70°C.

3.10.2 Transformação por choque térmico

Plasmídeos purificados (miniprep) foram incubados com *E. coli* cálcio-competentes por 30 min a 4°C e então foi realizado choque térmico (1 min 42°C, 2 minutos a 4°C) para inserção dos clones. Em seguida, 1 ml de meio LB foi adicionado e as células foram incubadas a 37°C por 1 hora e semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo LB (agar 1,5%, ampicilina para pGEX-4T-1 e canamicina para pDONR a 25 mg/ml). Clones contendo plasmídeos recombinantes foram selecionados mediante a técnica de palitagem.

3.11 Seleção dos clones recombinantes através da técnica da palitagem (Toothpick)

Colônias foram coletadas com o auxílio de palitos de dente (toothpick) estéreis e transferidas para o fundo de tubos de microcentrifuga (e também para a superfície de uma placa-mãe: placa de Petri contendo meio LB solidificado para a obtenção de uma réplica das colônias a serem analisadas). A cada um dos tubos foram acrescentados 10 µl de tampão de lise. Os tubos foram incubados em banho-maria a 65°C por 10 min. As amostras foram analisadas por eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE, usando o plasmídeo original como controle, a fim de selecionar as colônias positivas. Ao fim da eletroforese o gel foi corado com brometo de etídio (0,5 µg/ml) por aproximadamente 20 minutos, lavado com água ultra-pura e analisado em luz ultravioleta. O gel foi fotografado no sistema de fotodocumentação UVP (Biorad).

3.12 Purificação de plasmídeos contendo os produtos de PCR

As colônias positivas selecionadas foram inoculadas em meio LB contendo o antibiótico de resistência (ampicilina ou canamicina, dependendo do vetor) e cultivadas por 16 horas a 37°C sob agitação constante. As células obtidas foram centrifugadas a 12.000g por 1 minuto e o sedimento obtido foi utilizado para a extração dos plasmídeos através do sistema “QIAprep spin miniprep kit”, conforme protocolo recomendado pelo fabricante. Nestas condições, cerca de 5 a 10 µg de DNA dos diferentes plasmídeos foram recuperados e utilizados para sequenciamento de DNA (Macrogen, Seul, Coreia do Sul), utilizando os oligonucleotídeos dos vetores.

3.13 Expressão de proteínas recombinantes em *E. coli*

Colônias recombinantes foram inoculadas em 30 ml de meio LB contendo o antibiótico de resistência do plasmídeo (ampicilina 100 mg/mL) e cultivadas durante 16 horas a 37°C sob agitação (pré-inóculo). A seguir, as culturas foram inoculadas em 270 ml de meio LB/ampicilina e incubadas por uma hora a 37°C sob agitação. Após esse período foi adicionado IPTG na concentração final de 1 mM. Uma alíquota da cultura sem adição de IPTG (não induzida) foi reservada para servir de controle negativo da expressão. Ambas as culturas foram incubadas a 37°C por mais três horas. As bactérias foram coletadas por centrifugação a 12.000g por 2 min e ressuspensas em solução de suspensão de corpúsculo.

A suspensão bacteriana foi lisada por ultrassom (Ultrasonic Homogenizer 4710 Series, Cole-Parmer Instrument Co.). Vinte microlitros desses extratos de culturas bacterianas (correspondentes à fração insolúvel da proteína) foram adicionados a 5 µl de tampão de amostra para proteínas 4x, sendo em seguida incubados por 5 min a 100°C. Cada amostra foi submetida a eletroforese em gel desnaturante de poliácridamida com SDS (SDS-PAGE) a 30 mA (Laemmli, 1970). Após a eletroforese as proteínas foram coradas com solução de Coomassie Blue R-250 e descoradas com trocas sucessivas de solução de descoloração para géis de proteína.

A expressão da proteína recombinante foi confirmada através de ensaio de imunodeteção por western blot (Towbin et al., 1979) usando anticorpos comerciais que reconhecem as etiquetas de GST e HIS conferidas pelos plasmídeos. O tamanho esperado do polipeptídeo recombinante está na tabela 3.4.

Tabela 3.4 Tamanho dos polipeptídeos recombinantes para o complexo AP-1.

Proteína recombinante	Tamanho da porção clonada (kDa)	Tamanho da etiqueta (kDa)	Tamanho total esperado do polipeptídeo recombinante (kDa)
AP1-γN	26	26 (GST)	52
AP1-γD	15	6 (HIS)	21
AP1-β	33	26 (GST)	59
AP1-μ	49	26 (GST)	75
AP1-σ	19	26 (GST)	45

3.14 Purificação da proteína recombinante a partir de corpúsculos de inclusão

À fração insolúvel foi adicionado 1 ml de tampão de amostra para proteínas 4x e a fração foi purificada por eletroforese em gel preparativo de poliacrilamida a 13%, com 15 cm de largura por 10 cm de altura. O gel foi submetido a eletroforese por 16 horas a 20 mA. O gel foi corado com solução de KCl 100 mM e a banda correspondente foi cortada, inserida em uma membrana de diálise e eletro-eluída por 2 horas a 60 volts em tampão para eletroforese SDS-PAGE. Esse procedimento foi repetido por mais duas vezes, resultando nas eluições E1, E2 e E3.

Para a proteína recombinante AP1- γ dobradiça, a purificação foi realizada somente através de eluição a 4°C devido a degradação quando submetida a eletroeluição. As eluições foram retiradas a cada 24 horas.

3.15 Produção de anticorpos

3.15.1 Anticorpo Policlonal

As proteínas recombinantes purificadas (AP1- γ D, AP1- γ N, AP1- β , AP1 μ e AP1 σ) foram dosadas e inoculadas em camundongos da linhagem Balb/c, por via intraperitoneal. Foram utilizados três animais para cada proteína, todos adultos machos com idade entre 30-45 dias. Foram feitas 5 aplicações de aproximadamente 20 μ g de antígeno em cada inóculo em intervalos de 15 dias, seguindo-se obtenção do soro uma semana após a última inoculação. O antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund (na concentração de 1:1) na primeira inoculação e em Alu-Gel nas inoculações subsequentes. Antes da primeira imunização, os soros de todos os camudongos foram testados por ensaio de western blot e imunofluorescência.

A especificidade dos antisoros produzidos foi verificada por ensaio western blot, onde extratos proteicos dos parasitas foram submetidos a eletroforese em gel desnaturante de poliacrilamida (10-13%) e posteriormente transferidos para uma membrana de nitrocelulose (Hybond C, Amersham Biosciences), na presença de tampão para transferência 1x (Towbin et al., 1979). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 minutos para visualização das bandas, lavada em água corrente e bloqueada em solução de bloqueio para western blot, por 1 hora em temperatura ambiente ou por 16 horas a 4°C.

A membrana foi incubada com os antisoros diluído a 1:200 em PBS/Tween 0,05% e leite em pó desnatado 0,5% por 1 hora a temperatura ambiente. Em seguida a membrana foi lavada com PBS/Tween 0,05% e incubada com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado

a fosfatase alcalina diluído a 1:10.000 em PBS / Tween 0,05% / leite desnatado 0,5% por 1 hora a temperatura ambiente. A reação foi detectada através de kit contendo fosfatase alcalina, nitroblue tetrazolium (NBT) e 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) em tampão de fosfatase alcalina, como recomendado pelo fabricante.

O soro positivo foi testado também, além de extratos das diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*, em extrato de célula Vero. Isso porque os amastigotas foram obtidos a partir da infecção nessas células, e dessa forma demonstrar que o soro é específico para a proteína do parasita.

3.15.2 Anticorpo Monoclonal

Para as subunidades AP1- β e AP1- γ D optamos por produzir anticorpos monoclonais. As imunizações foram feitas em camundongos da linhagem Balb/c. Para AP1- β foram utilizados três animais e para AP1- γ D quatro animais, todos adultos machos com idade entre 30-45 dias. Antes da primeira imunização, os soros dos animais foram coletados e testados por western blot e imunofluorescência. As proteínas recombinantes purificadas foram dosadas e inoculadas por via intraperitoneal para as 4 primeiras aplicações e por via intravenosa caudal na última inoculação, com quantidade de aproximadamente 20 μ g de antígeno em cada inóculo. Para a imunização com AP1- β , o antígeno foi emulsificado em adjuvante completo de Freund (na concentração de 1:1) na primeira inoculação e em Alu-Gel nas inoculações subsequentes. Já para AP1- γ D em todas as imunizações foi usado o adjuvante Montanide na concentração de 1:1.

O intervalo entre cada aplicação foi de 7 dias, sendo que três dias após a última imunização o soro dos animais foram examinados por western blot e imunolocalização por microscopia de fluorescência para se verificar qual camundongo respondeu melhor às imunizações. Selecionou-se então o camundongo com melhor resposta para cada proteína, o qual foi anestesiado com quetamina e xilazina via intraperitoneal (100 e 10 mg/kg respectivamente) para coleta do soro através de punção cardíaca.

Depois de eutanasiado (através de deslocamento cervical), o animal teve seu baço retirado. O órgão foi macerado, homogeneizado e filtrado em filtro de nylon para obtenção dos linfócitos B, posteriormente foi utilizado 5 ml de tampão de lise de hemácias por 5 minutos em gelo. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com meio RPMI contendo antibióticos (penicilina, estreptomicina e anfotericina), L-glutamina e piruvato de sódio. Os esplenócitos foram fusionados com células de mieloma usando-se polietilenoglicol (PEG) a

1:1 em meio RPMI por 2 minutos, e lavados com RPMI sem PEG por 5 minutos. Após a fusão, as células híbridas foram eluídas em meio RPMI com 20% de soro fetal bovino e semeadas em placas de 96 poços na concentração de $2,5 \times 10^6$ células por poço. Após 24 horas de crescimento a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ foi adicionado meio HAT, trocado a cada 48 horas. Após 15 dias foi adicionado meio HT nos hibridomas viáveis. As células foram mantidas neste meio por 4 dias, com trocas a cada 48 horas. Posteriormente, os hibridomas foram cultivados em meio RPMI com 20% de soro fetal bovino até serem triados pela secreção de anticorpos específicos através de ensaio de ELISA.

Após clonagem por diluição limitante, os clones com reação positiva no ELISA e western blot foram submetidos a dois ciclos sucessivos de congelamento a fim de verificar sua estabilidade e mantidos em cultivo in vitro no meio RPMI acrescido de 20% de SFB até densidade adequada para expansão do cultivo.

3.15.2.1 Seleção dos hibridomas através de ensaio ELISA

Placas de 96 poços foram incubadas por 24 horas a 4°C com as proteínas recombinantes (AP1-β e AP1-γD) e tampão de sensibilização. Em seguida, foram lavadas 5 vezes com PBS + Tween 0,01%, bloqueadas com tampão de bloqueio (PBS + Tween 0,01% + 2% leite desnatado) por 1 hora. As placas sensibilizadas foram então lavadas novamente e incubadas com o sobrenadante dos hibridomas. Após 1 hora, as placas foram lavadas e incubadas por 1 hora com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado a peroxidase. Após lavagem, adicionou-se 50 µl de solução reveladora contendo substrato enzimático e cromógeno. Após incubação por 10 minutos a reação foi interrompida com adição de 50 µl de H₂SO₄ 2 M. A leitura da densidade ótica foi efetuada em espectrofotômetro (EL800, Biotech) no comprimento de onda de 492 nm. As amostras que apresentaram uma densidade ótica próxima ao controle positivo (soro policlonal) foram consideradas reagentes e submetidas então aos ensaios de imunofluorescência e de western blot. Os hibridomas positivos foram então transferidos para placas de 24 poços e foram feitas diluições limitantes para se obter clones. Os clones positivos foram testados em ensaio de western blot e imunofluorescência.

3.16 Imunolocalização por microscopia de fluorescência

Para os ensaios de imunofluorescência, os parasitas (epimastigotas, tripomastigotas de cultura e amastigotas) foram coletados por centrifugação a 6.000g por 1 minuto, lavados em PBS pH 7,2, ressuspensos em paraformaldeído a 4% e fixados por 30 minutos. Os parasitas fixados foram então aderidos por 20 minutos a lâminas recobertas com poli-L-lisina a 0,1%. O material foi então incubado com Triton X-100 a 0,5% diluído em PBS por 5 minutos a temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas com PBS, incubadas em solução de bloqueio para imunofluorescência (PBS + BSA 1,5%) por 1 hora e em seguida incubadas por 1 hora com o antisoro policlonal correspondente diluído a 1:150 ou com o sobrenadante dos hibridomas ou clones em solução de bloqueio para imunofluorescência.

Posteriormente as lâminas foram lavadas com PBS e incubadas por 30 minutos com anticorpo anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488 diluído a 1:600 em solução de bloqueio para imunofluorescência. Após este tempo, as lâminas foram incubadas por 5 minutos com o corante de DNA Hoechst 33342 diluído a 1:300 em PBS, lavadas em PBS e montadas com n-propil-galato.

Os parasitas incubados com antisoros contra as subunidades AP1- γ D, AP1- β , AP1 μ e AP1 σ foram examinados em um microscópio Nikon E-600 equipado com epifluorescência. Fotos digitais foram obtidas com uma câmera digital Evolution refrigerada. Os parasitas incubados com o antisoro contra a subunidade AP1- γ D foi observado também no microscópio confocal a laser LEICA SP5. As imagens obtidas foram editadas com o programa Photoshop CS5.

3.16.1 Colocalização da proteína AP1- γ D com a proteína Rab7 fusionada a GFP em parasita transfectados

Formas epimastigotas de *T. cruzi* clone Dm28C transfectadas com plasmídeo contendo o gene da proteína Rab7 fusionada a GFP (cedidas por Michel Batista, ICC-Fiocruz) foram mantidas em meio LIT com antibiótico neomicina a 250 mg/ml (devido à resistência do plasmídeo a este antibiótico) com repiques semanais. Estes parasitas foram tratados para imunofluorescência conforme descrito acima (item 3.16), sendo incubados com o antisoro policlonal contra a proteína AP1- γ D, com o objetivo de fazer co-localização das proteínas Rab 7 (marcadora de complexo de Golgi) e AP1- γ D. Foi utilizado um anticorpo secundário acoplado a AlexaFluor 594 que emite a cor vermelha, para diferenciar da emissão verde do

GFP. Os parasitas foram observados no microscópio confocal a laser LEICA SP5. As imagens obtidas foram editadas com o programa Photoshop CS5.

4 RESULTADOS

4.1 Bioinformática

4.1.1 Genes das subunidades do complexo adaptador 1 (AP-1)

Busca em banco de dados gênicos utilizando as sequências codificantes para as subunidades do complexo adaptador AP-1 (AP1- γ , AP1- β , AP1- μ e AP1- σ) do genoma do organismo modelo *H. sapiens* como isca de busca (template) permitiu identificar essas subunidades no genoma de *T. cruzi*.

As sequências codificantes selecionadas do genoma humano foram também utilizadas para identificar esses genes no genoma de outros organismos eucariontes, a fim de verificar o grau de conservação das adaptinas do complexo AP-1 entre diferentes eucariotos. As tabelas 4.1 a 4.4 apresentam as relações de identidade e similaridade entre diferentes eucariontes, inclusive o *T. cruzi*, quando comparados ao modelo *H. sapiens*.

É possível observar nas tabelas 4.1 a 4.4 que os genes estão conservados entre todos os eucariontes analisados (*Trypanosoma cruzi*, *Danio rerio*, *Gallus gallus*, *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*). Além disto, quando *T. cruzi* é comparado com organismos distantemente relacionados pode-se observar um alto nível de identidade (de 34% a 53%) e similaridade (de 51% a 73%) entre as proteínas que compõem o complexo adaptador AP-1. Menor identidade e similaridade foi encontrada para a subunidade AP1- γ , enquanto maior identidade e similaridade foi encontrada para a subunidade AP1- σ .

Tabela 4.1 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- γ entre diferentes organismos quando comparados ao organismo modelo *H. sapiens*

	Identid. %	Similarid. %	Número de acesso
<i>Homo sapiens</i>	100	100	NP_001025178
<i>Gallus gallus</i>	96	98	NP_001006132.1
<i>Danio rerius</i>	89	95	NP_955976.1
<i>Drosophila melanogaster</i>	60	75	NP_572527.2
<i>Trypanosoma cruzi</i>	34	51	XP_818958.1

Tabela 4.2 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- β entre diferentes organismos quando comparados ao organismo modelo *H. sapiens*

	Identid. %	Similarid. %	Número de acesso
<i>Homo sapiens</i>	100	100	NP_001159491.1
<i>Gallus gallus</i>	84	86	XP_415311.2
<i>Danio rerius</i>	85	89	NP_001122002.1
<i>Drosophila melanogaster</i>	71	81	NP_523415.1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	41	62	XP_820334.1

Tabela 4.3 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- μ entre diferentes organismos quando comparados ao organismo modelo *H. sapiens*

	Identid. %	Similarid. %	Número de acesso
<i>Homo sapiens</i>	100	100	NP_001123996.1
<i>Gallus gallus</i>	97	97	NP_001007887.1
<i>Danio rerius</i>	94	96	XP_002660766.1
<i>Drosophila melanogaster</i>	80	89	NP_649906.1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	46	66	XP_818899.1

Tabela 4.4 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- σ entre diferentes organismos quando comparados ao organismo modelo *H. sapiens*

	Identid. %	Similarid. %	Número de acesso
<i>Homo sapiens</i>	100	100	NP_003907.3
<i>Gallus gallus</i>	99	100	NP_001006261.1
<i>Danio rerius</i>	92	98	NP_991121.1
<i>Drosophila melanogaster</i>	82	89	NP_651198.1
<i>Trypanosoma cruzi</i>	53	73	XP_843992.1

As seqüências codificantes encontradas para as subunidades do complexo AP-1 de *T. cruzi* foram em seguida utilizadas como modelo para identificar os genes correspondentes em outros protozoários da família Trypanosomatidae. As tabelas 4.5 a 4.8 apresentam a relação de identidade e similaridade dos genes em diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao modelo *T. cruzi*.

Quando as subunidades do complexo adaptador AP-1 de *T. cruzi* foram comparadas com aquelas de *T. brucei*, *L. major*, *L. infantum* e *L. braziliensis* foi possível observar que o conjunto protéico é bem conservado entre os tripanosomatídeos, sendo que *T. brucei* é o organismo com subunidades com relação mais próxima ao *T. cruzi* (identidade entre 60% e 72% e similaridade entre 75% e 88%), enquanto *L. braziliensis* é o organismo mais distante (identidade entre 49% e 66% e similaridade entre 66% e 81%).

Tabela 4.5 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- γ de diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao organismo modelo *T. cruzi*

	Identid. %	Similarid. %	Número de acesso
<i>Trypanosoma cruzi</i>	100	100	XP_818958.1
<i>Trypanosoma brucei</i>	60	75	XP_844226.1
<i>Leishmania braziliensis</i>	49	66	XP_001564640.1
<i>Leishmania major</i>	50	68	XP_001686504.1
<i>Leishmania infantum</i>	49	67	XP_001468737.1

Tabela 4.6 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- β de diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao organismo modelo *T. cruzi*

	Identid. %	Similarid. %	Número de acesso
<i>Trypanosoma cruzi</i>	100	100	XP_820334.1
<i>Trypanosoma brucei</i>	67	77	XP_823038.1
<i>Leishmania braziliensis</i>	58	74	XP_001569324.1
<i>Leishmania major</i>	62	80	XP_001687270.1
<i>Leishmania infantum</i>	63	81	XP_001469386.1

Tabela 4.7 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- μ de diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao organismo modelo *T. cruzi*

	Identid. %	Similarid. %	Número de acesso
<i>Trypanosoma cruzi</i>	100	100	XP_818899.1
<i>Trypanosoma brucei</i>	72	83	XP_845941.1
<i>Leishmania braziliensis</i>	57	74	XP_001565023.1
<i>Leishmania major</i>	57	74	XP_001683265.1
<i>Leishmania infantum</i>	53	71	XP_001465626.1

Tabela 4.8 Relação de identidade e similaridade entre genes da subunidade AP1- σ de diferentes tripanosomatídeos quando comparados ao organismo modelo *T. cruzi*

	Identid. %	Similarid. %	Número de acesso
<i>Trypanosoma cruzi</i>	100	100	XP_804127.1
<i>Trypanosoma brucei</i>	72	88	XP_843992.1
<i>Leishmania braziliensis</i>	66	81	XP_001566497.1
<i>Leishmania major</i>	69	82	XP_847808.1
<i>Leishmania infantum</i>	69	82	XP_001466671.1

4.1.1 Alinhamento da sequência de aminoácidos

Alinhamento de sequências de aminoácidos permite comparar sequências de aminoácidos de proteínas de diferentes organismos, possibilitando assim atribuir-se funções e propriedades às proteínas, criar hipóteses evolutivas e modelos de homologia.

As figuras 4.1 a 4.8 apresentam o alinhamento múltiplo das sequências aminoacídicas das subunidades do complexo AP-1 dos eucariontes *T. cruzi*, *D. rerio*, *G. gallus*, *D. melanogaster* e *H. sapiens* (Figuras 4.1 a 4.4) e de diferentes tripanosomatídeos (Figuras 4.5 a 4.8). O cladograma situado abaixo de cada alinhamento demonstra a relação evolutiva do gene para cada adaptina entre os organismos.

Análise do alinhamento múltiplo das subunidades do complexo AP-1 (AP1- γ , AP1- β , AP1- μ e AP1- σ) entre diferentes organismos eucariontes demonstra maior número de aminoácidos idênticos e similares na porção N-terminal das proteínas (Figuras 4.1 a 4.4).

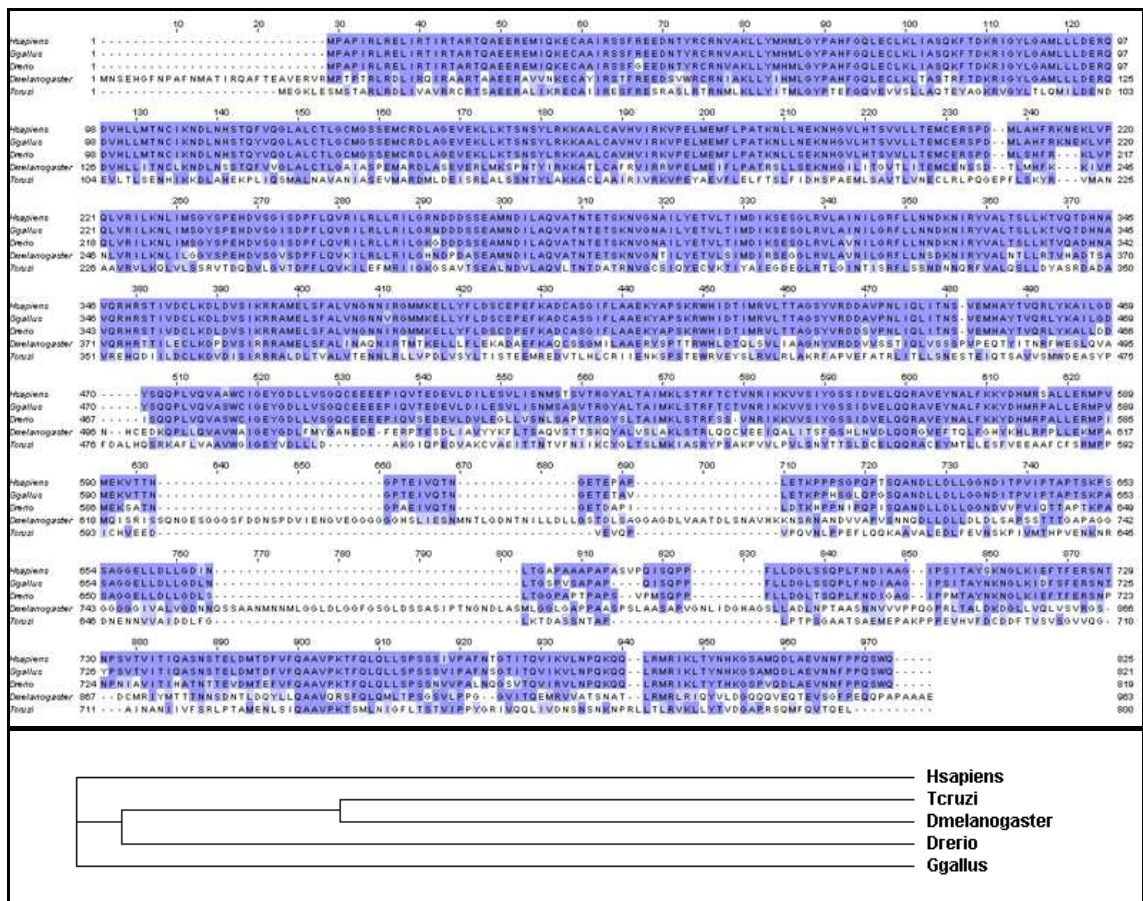


Figura 4.1 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- γ entre diferentes organismos eucariontes.

Em azul escuro = aminoácidos idênticos. Em azul claro = aminoácidos similares.

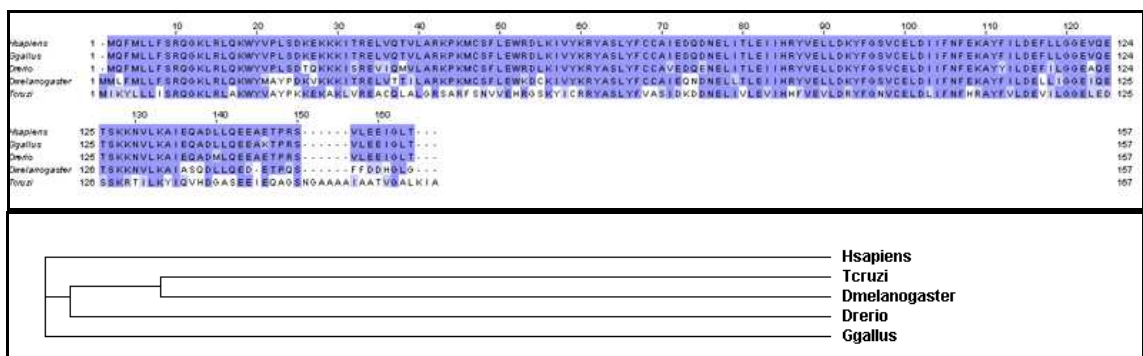


Figura 4.2 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- σ entre diferentes organismos eucariontes.

Em azul escuro = aminoácidos idênticos. Em azul claro = aminoácidos similares.

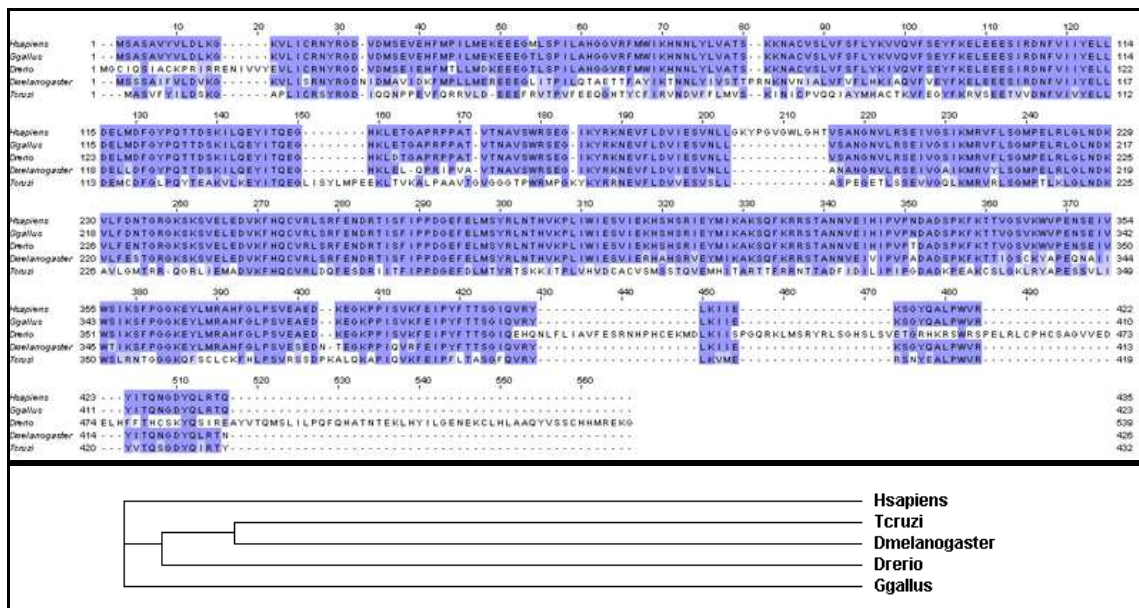


Figura 4.3 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1-μ entre diferentes organismos eucariontes.

Em azul escuro = aminoácidos idênticos. Em azul claro = aminoácidos similares.

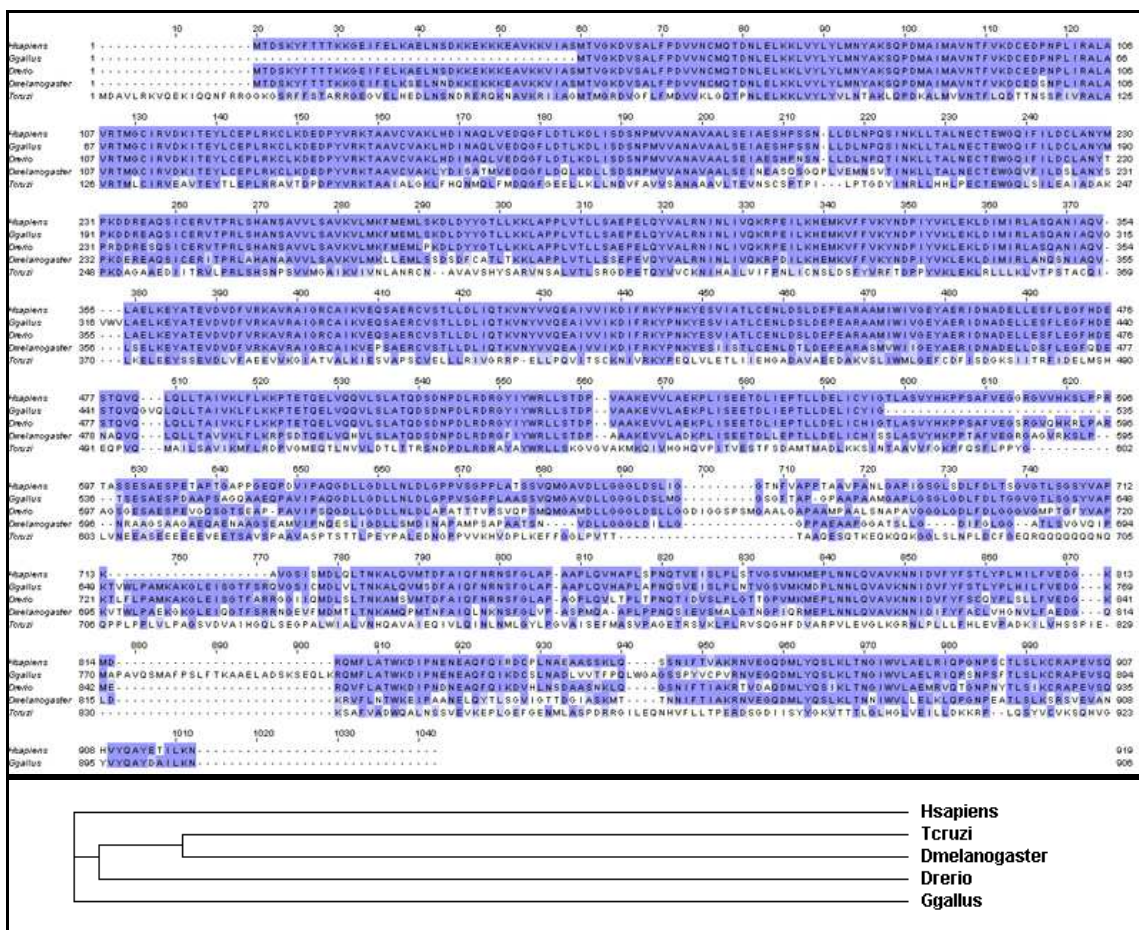


Figura 4.4 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1-β entre diferentes organismos eucariontes.

Em azul escuro = aminoácidos idênticos. Em azul claro = aminoácidos similares.

Entre os protozoários tripanosomatídeos, análise do alinhamento múltiplo das subunidades do complexo AP-1 (AP1- γ , AP1- β , AP1- μ e AP1- σ) demonstrou grande quantidade de aminoácidos idênticos e similares ao longo das proteínas, com maior divergência na porção C-terminal. Tal divergência é mais evidente na subunidade AP1- β (Figuras 4.5 a 4.8).

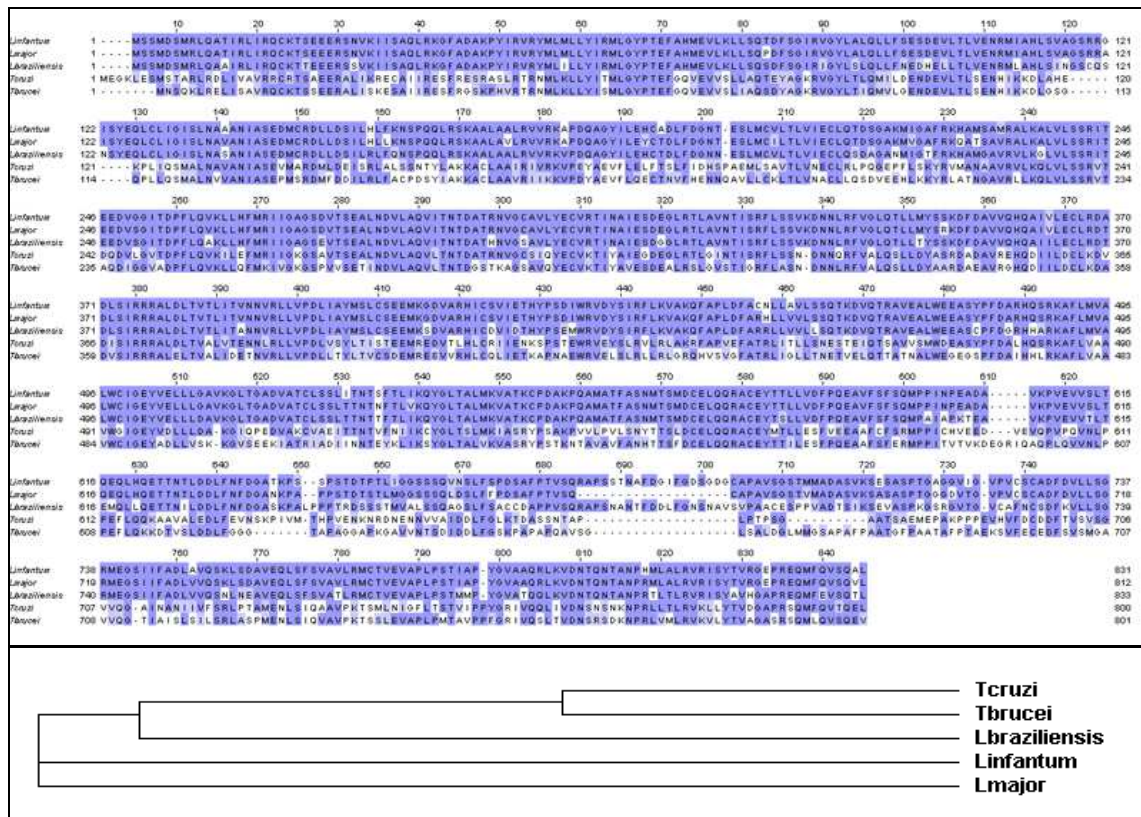


Figura 4.5 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- γ entre diferentes tripanosomatídeos.

Em azul escuro = aminoácidos idênticos. Em azul claro = aminoácidos similares.

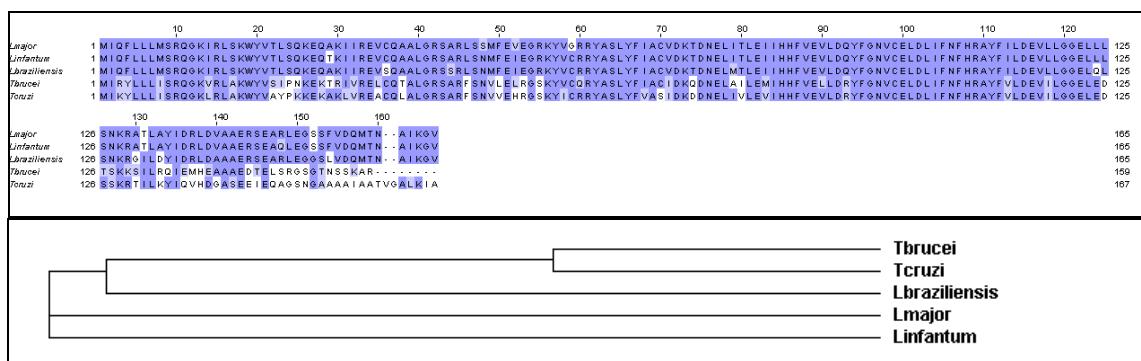


Figura 4.6 Alinhamento múltiplo da subunidade AP1- σ entre diferentes tripanosomatídeos.

Em azul escuro = aminoácidos idênticos. Em azul claro = aminoácidos similares.

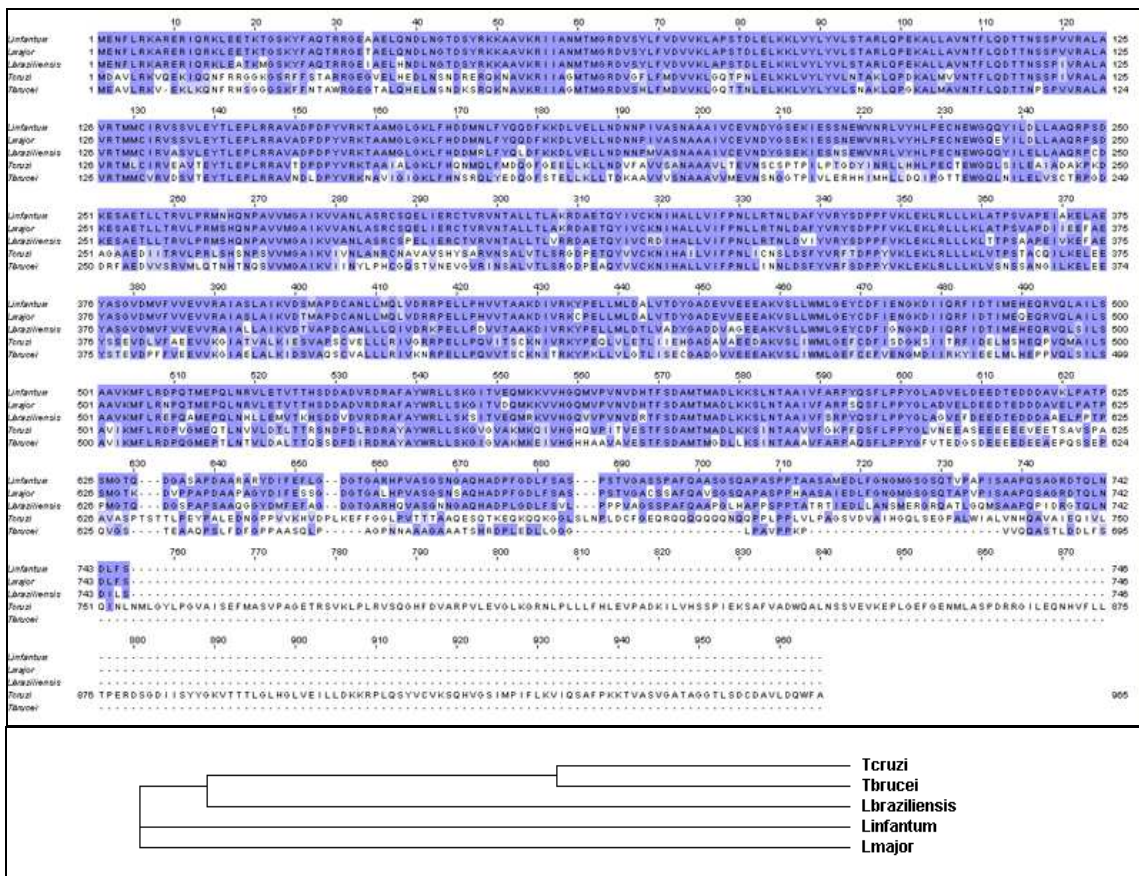


Figura 4.7 Alinhamento múltiplo da subunidade API-β entre diferentes tripanosomatídeos.

Em azul escuro = aminoácidos idênticos. Em azul claro = aminoácidos similares.

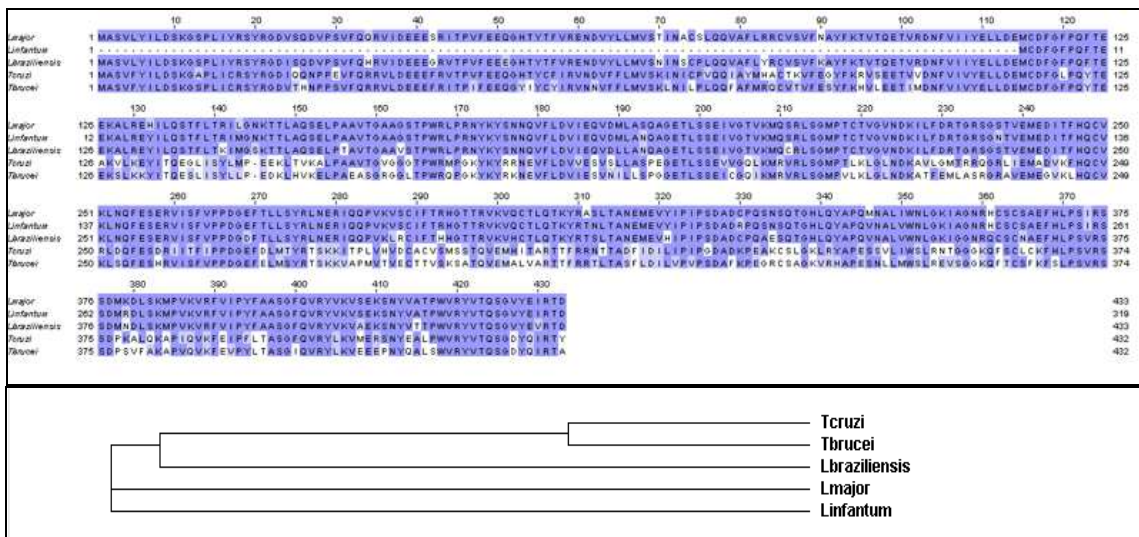


Figura 4.8 Alinhamento múltiplo da subunidade API-μ entre diferentes tripanosomatídeos.

Em azul escuro = aminoácidos idênticos. Em azul claro = aminoácidos similares.

4.1.2 Identificação de domínios protéicos das subunidades maiores do complexo AP-1 (AP1- γ e AP1- β) em *H. sapiens*, *T. brucei* e *T. cruzi*

Análise das sequências de aminoácidos das proteínas AP1- γ e AP1- β dos organismos *H. sapiens*, *T. brucei* e *T. cruzi* por meio do software pFAM permitiu identificar e localizar domínios protéicos comuns a estas adaptinas (Figuras 4.9 e 4.10).

A adaptina AP1- γ dos três organismos analisados (Figura 4.9) apresenta dois domínios em comum (Adaptin_N e domínio C-terminal). Entretanto as adaptinas AP1- β de *T. brucei* e *T. cruzi* (Figura 4.10) não apresentaram o domínio C-terminal e o subdomínio C-terminal presentes na proteína humana.

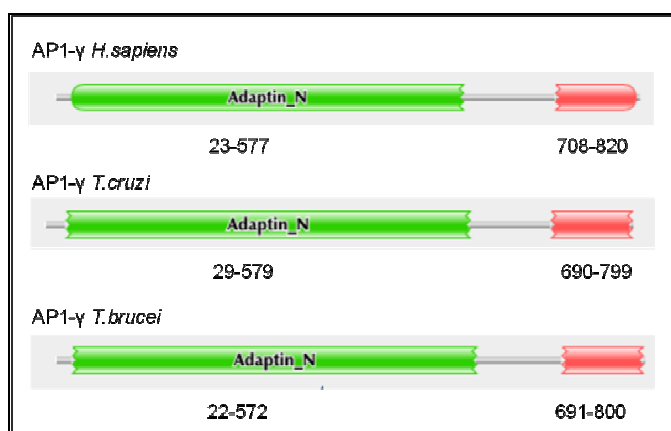


Figura 4.9 Domínios da subunidade AP1- γ do complexo AP-1. A região verde corresponde ao domínio Adaptin_N, enquanto a região em vermelho corresponde ao domínio C-terminal. Abaixo de cada domínio estão indicados os aminoácidos iniciais e finais.

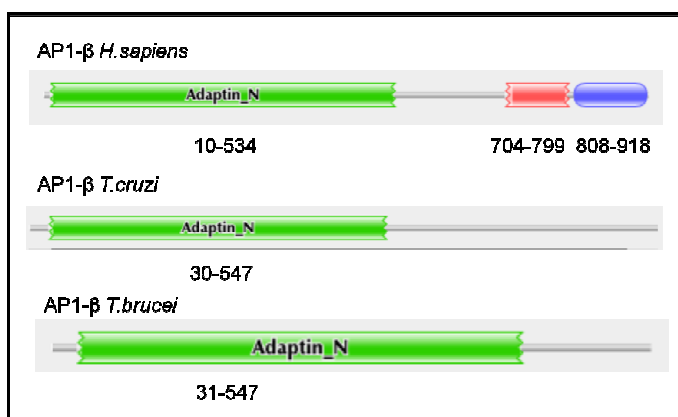


Figura 4.10 Domínios da subunidade AP1- β do complexo AP-1. A região verde corresponde ao domínio Adaptin_N, enquanto a região em vermelho corresponde ao domínio C-terminal. Em azul está um subdomínio C-terminal. Abaixo de cada domínio estão indicados os aminoácidos iniciais e finais.

É possível observar que o domínio Adaptin-N está presente nas duas subunidades maiores dos complexos AP-1 nos três organismos analisados. Além disto, este domínio é a região mais conservada das subunidades maiores dos complexos adaptadores AP-1.

4.2 Obtenção de proteína recombinante

4.2.1 Amplificação dos genes

Para genes maiores que 2000 pares de bases (pb) foi utilizado somente o fragmento N-terminal para clonagem do gene, expressão de proteína recombinante e obtenção de anticorpos (AP1- γ , AP1- β). Para os genes menores (AP1- μ e AP1- σ) foram clonados os genes inteiros. Também foi clonada a região da dobradiça do gene AP1- γ (AP1- γ D).

As ampliações dos genes selecionados foram realizadas a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, resultando em produtos com tamanho de acordo com o previsto:

- AP1- γ D: aproximadamente 500 pb (Figura 4.11A1);
- AP1- γ N (N-terminal): aproximadamente 900 pb (Figura 4.11A2);
- AP1- β : aproximadamente 1100 pb (Figura 4.11B);
- AP1- σ : aproximadamente 500 pb (Figura 4.11.C);
- AP1- μ : aproximadamente 1300 pb (Figura 4.11C).

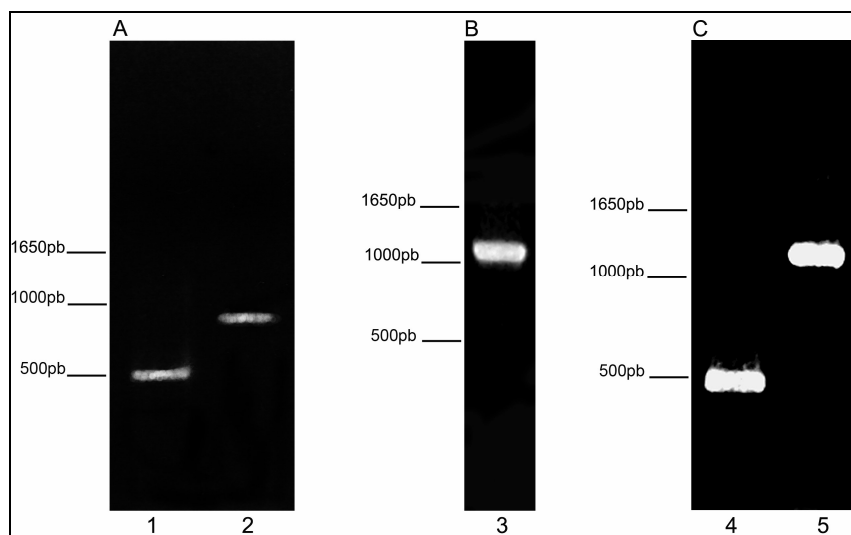


Figura 4.11 Amplificação dos genes do complexo adaptador 1 de *T. cruzi*. Eletroforese em matriz de agarose 1%. A) Amplificação das subunidades 1-AP1- γ D (~500 pb) e 2-AP1- γ N (~900 pb). B) Amplificação da subunidade 3-AP1- β (~ 1100 pb). C) Amplificação da subunidade 4-AP1- σ (~500 pb) e 5-AP1- μ (~1300 pb). Marcador de peso molecular utilizado: 1Kb plus.

Depois de purificados e digeridos, os produtos da PCR dos genes que codificam as proteínas AP1- μ , AP1- σ , AP1- β e AP1- γ N foram clonados no vetor plasmidial pGEX-4T-1. A confirmação da inserção do gene nos vetores foi feita pela técnica de palitagem tendo como controle o plasmídeo original sem o inserto (dados não mostrados).

As colônias positivas foram expandidas em meio LB e os plasmídeos recombinados foram purificados. Foi então, realizada PCR do plasmídeo utilizando os oligonucleotídeos iniciadores, para confirmação da inserção dos genes de interesse (Figura 4.12). O resultado foi positivo para todos os genes, sendo o tamanho obtido de acordo com o esperado, conforme mostrado abaixo:

- AP1- γ N: aproximadamente 900 pb (Figura 4.12.A);
- AP1- β : aproximadamente 1100 pb (Figura 4.12.B);
- AP1- σ : aproximadamente 500 pb (Figura 4.12.C);
- AP1- μ : aproximadamente 1300 pb (Figura 4.12.C).

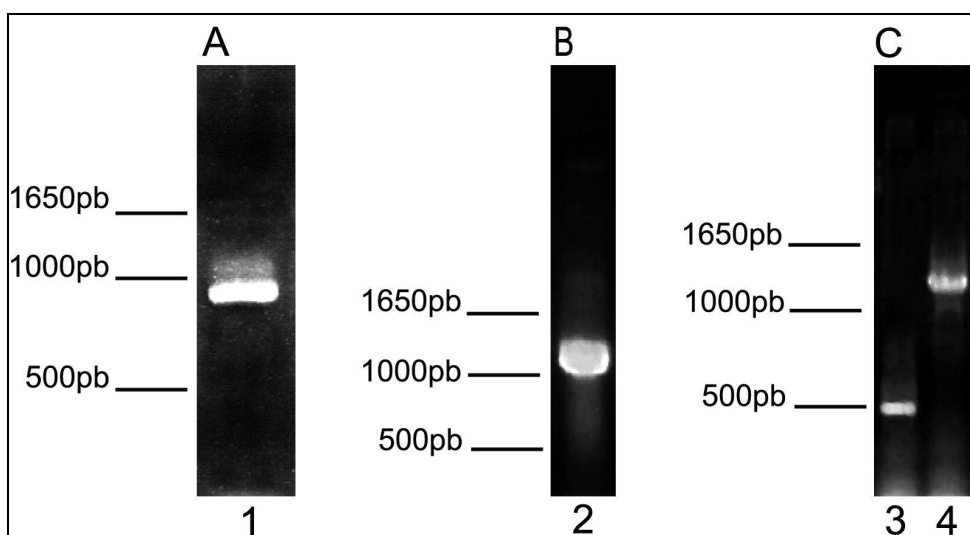


Figura 4.12 Confirmação de clonagem dos genes no vetor p-GEX-4T-1. Eletroforese em matriz de agarose 1%. A) Amplificação da subunidade 1-AP1- γ N (~900 pb) B) Amplificação da subunidade 2-AP1- β (~1100 pb) C) Amplificação das subunidades 3- AP1- σ (~500 pb) 4-AP1- μ (~1300 pb) . Marcador de peso molecular utilizado: 1Kb plus.

Para a região da dobradiça de AP1- γ (AP1- γ D), os produtos de PCR amplificados e purificados (possuindo a seqüência adaptadora para a correta inserção na plataforma Gateway) foram recombinados com o vetor de entrada pDONR221 e posteriormente com o vetor de expressão pDEST17. Para confirmar a correta inserção dos genes nos vetores foi realizada PCR dos plasmídeos, sendo utilizados iniciadores específicos para cada gene. O gene amplificado apresentou tamanho de acordo com o esperado:

AP1- γ D: aproximadamente 500 pb (Figura 4.13).

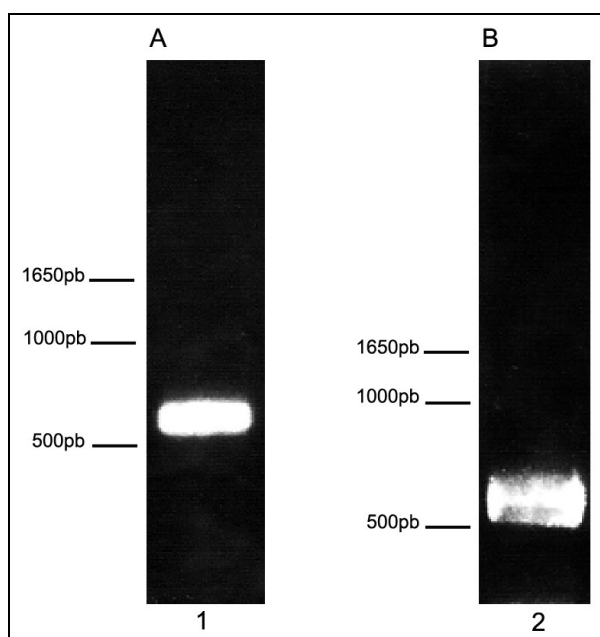


Figura 4.13 Clonagem do gene no vetor pDONR (A) e pDEST (B). Eletroforese em matriz de agarose 1%, marcador de peso molecular utilizado: 1kb plus. A – amplificação de dois clones das subunidades AP1- γ D em pDONR (aproximadamente de 500 pb) B- amplificação de dez clones da subunidade AP1- γ D em pDEST (aproximadamente 500 pb).

Sequenciamento de todos os plasmídeos (realizado pela firma Macrogen, Coréia do Sul) confirmou a inserção dos genes de interesse (dados não mostrados).

4.2.2 Expressão e purificação das proteínas heterólogas

Os clones em pGEX-4T-1 foram expressos em *E. coli* linhagem Top10F' (AP1- β , AP1- μ e AP1- σ) e BL21 *Star* (AP1- γ N). Análise do perfil eletroforético em gel de poliacrilamida das expressões heterólogas permitiu demonstrar que as proteínas foram majoritariamente expressas na fração insolúvel (Figuras 4.14A e 4.15A). O tamanho das proteínas expressas foi correspondente ao esperado (Tabela 4.9) e foi confirmado por western blot com anticorpos que identificam a etiqueta de GST fusionada à proteína recombinante pelo vetor utilizado (dado não mostrado).

Tabela 4.9 Tamanho esperado das proteínas recombinantes em vetor pGEX-4T.

Gene	Proteína recombinante
AP1- μ	~75 kDa
AP1- σ	~45 kDa
AP1- β	~59 kDa
AP1- γ N	~52 kDa

As proteínas foram purificadas por eletroeluição a partir do gel de poliacrilamida e as purificações foram confirmadas por western blot utilizando anticorpos anti-GST (Figuras 4.14B e 4.15B). Com essa abordagem foi possível obter quantidade suficiente de proteína para imunização de camundongos.

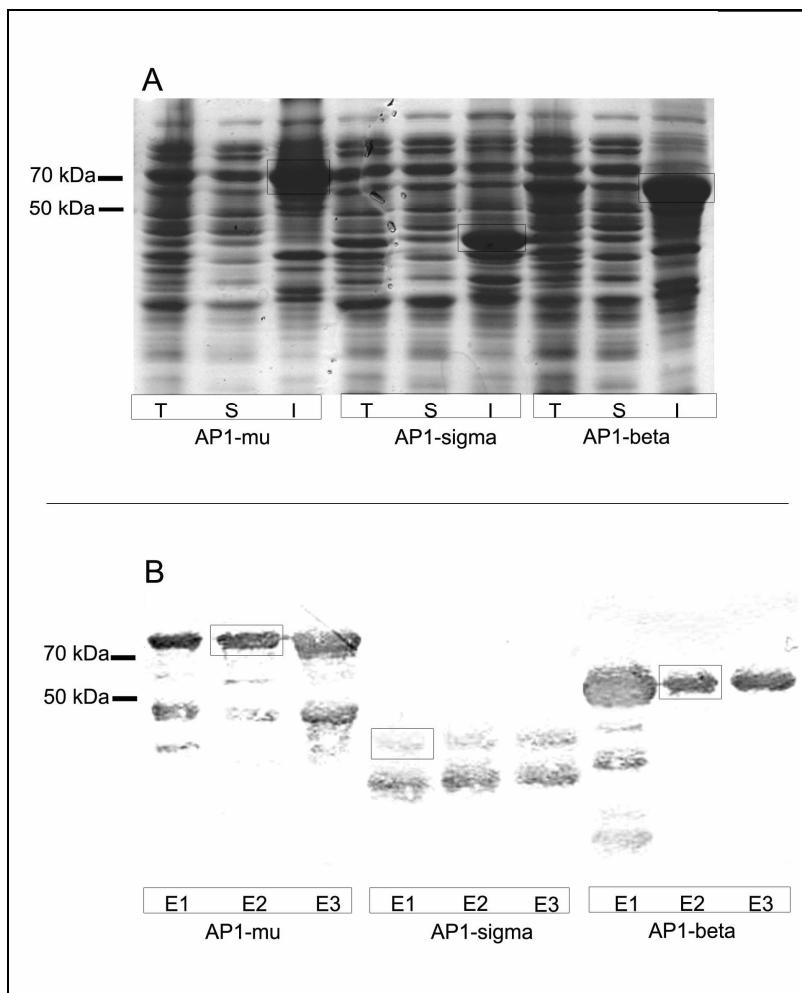


Figura 4.14 Expressão com vetor pGEX-4T e purificação de proteínas recombinantes insolúveis.

A) Matriz de poliacrilamida 13% corada com Coomassie Blue, mostrando perfil da proteína expressa. T: Fração total; S: Fração solúvel; I: Fração insolúvel; Todas as proteínas foram expressas no tamanho esperado e na fração insolúvel. **B)** Western blot da proteína purificada, com anticorpo anti-GST. E1-E3: Eluições sucessivas de cada proteína; a eluição assinalada com retângulo foi a utilizada para imunização de camundongos.

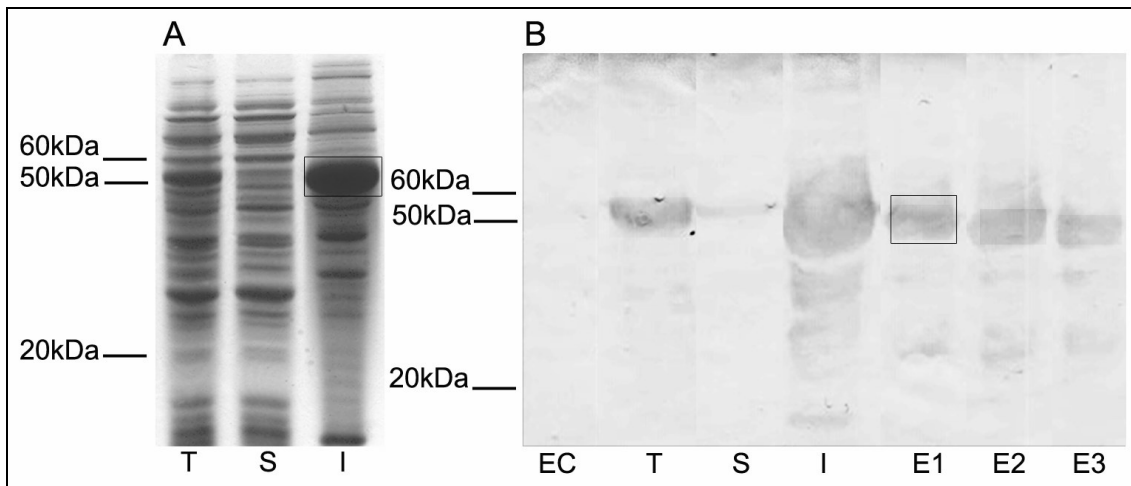


Figura 4.15 Expressão com vetor pGEX-4T e purificação da proteína recombinante AP1- γ N insolúvel. **A)** matriz de poliacrilamida corada com Comassie Blue, mostrando perfil da proteína expressa. T: Fração total; S: Fração solúvel; I: Fração insolúvel; A proteína foi expressa no tamanho esperado e na fração insolúvel. **B)** Western blot da proteína purificada, com anticorpo anti-GST. EC: Extrato de *E. coli* sem o plasmídeo; E1-E3: Eluições sucessivas de cada proteína; a eluição assinalada com retângulo foi a utilizada para imunização de camundongos.

O clone em pDEST (AP1- γ D) foi expresso em *E. coli* linhagem BL21 *Star*. Assim como nas demais expressões heterólogas, essa proteína também foi expressa na fração insolúvel. O tamanho da proteína expressa foi correspondente ao esperado (~20 kDa) e foi confirmado por western blot com anticorpo que identifica a etiqueta de histidina (HIS) fusionada à proteína recombinante pelo vetor utilizado (Figura 4.16A).

A proteína foi purificada por eluição a partir do gel de poliacrilamida e a purificação foi confirmada por western blot utilizando anticorpo anti-HIS (Figura 4.16 B). Com essa abordagem foi possível obter quantidade suficiente de proteína para imunização de camundongos.

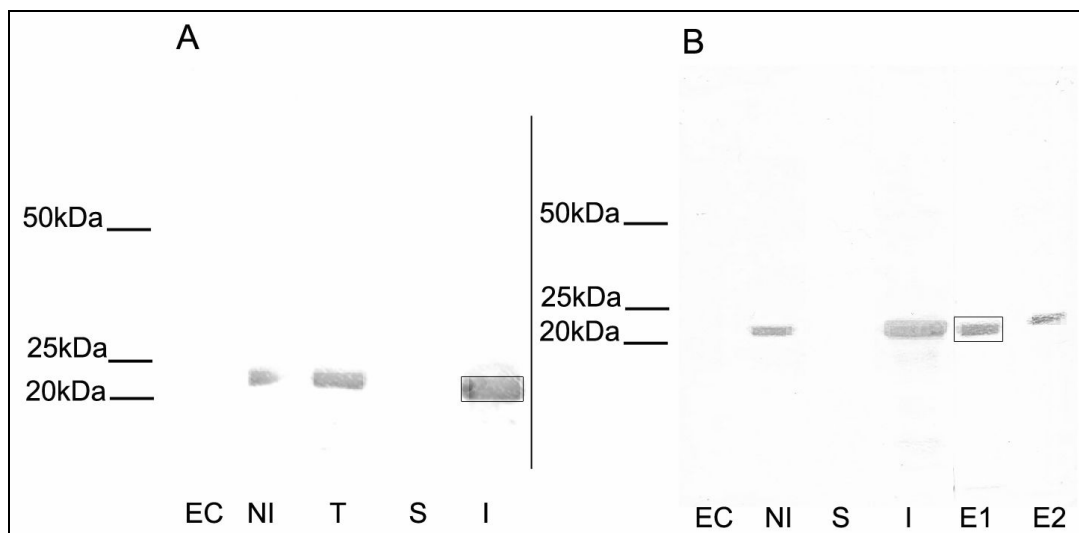


Figura 4.16 Expressão com vetor pDEST17 e purificação de AP1- γ D. Em A: western blot com anticorpo anti-HIS mostrando o perfil da proteína recombinante expressa. EC: Extrato de *E. coli* sem o plasmídeo; NI: não induzido; T: Fração total; S: Fração solúvel; I: Fração insolúvel. A proteína foi expressa no tamanho esperado e na fração insolúvel. B) Western blot da proteína purificada, usando anticorpo anti-HIS. E1 e E2: Eluições sucessivas de cada proteína; a eluição assinalada com retângulo foi utilizada para imunização de camundongos.

4.3 Obtenção de anticorpos e análise da expressão das proteínas em *T. cruzi* por western blot

Após a purificação, os polipeptídeos recombinantes (AP1- μ , AP1- σ , AP1- β e AP1- γ N e AP1- γ D) foram utilizados para imunizar camundongos da linhagem Balb/c visando a produção de anticorpos policlonais e monoclonais. Antes das imunizações foi retirado o soro dos animais para testar contra extrato protéico de *T. cruzi*, a fim de verificar a presença de anticorpos inespecíficos contra proteínas desse protozoário. A análise foi feita por western blot e o resultado, como esperado, foi negativo para todos os animais testados (dados não mostrados).

Após a quarta imunização o soro de cada camundongo foi retirado para avaliar a produção de anticorpos. A análise da especificidade dos anticorpos foi realizada por western blot, usando extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

4.3.1 Subunidades AP1- μ e AP1- σ

O ensaio por western blot para a subunidade AP1- μ mostrou que o soro policlonal de apenas um dos camundongos reconheceu a proteína de tamanho esperado, ou seja, ~50 kDa (Figura 4.17). O soro produzido contra a subunidade AP1- σ não reconheceu nenhuma

proteína do extrato de *T. cruzi* (dados não mostrados). No ensaio de imunolocalização celular não houve marcação para os dois casos (dado não mostrado).

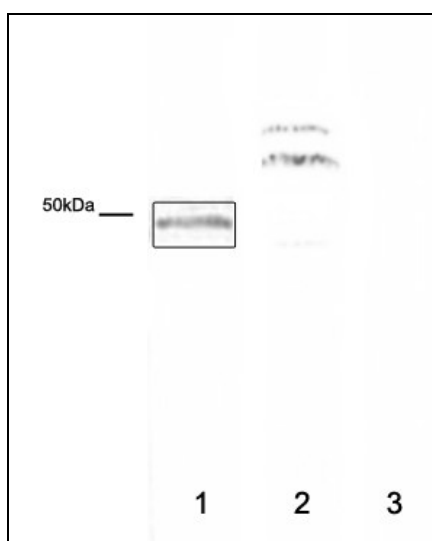


Figura 4.17 Análise por western blot da expressão da subunidade AP1- μ em *T. cruzi*

Os antisoros foram testados em extrato protéico de formas epimastigotas de *T. cruzi* através de ensaio de western blot. Os números 1, 2, 3 referem-se aos camundongos. O soro 1 reconheceu polipeptídeo de tamanho esperado. O soro 2 reconheceu proteínas de tamanho não esperado e o soro 3 não obteve reação.

4.3.2 Subunidade AP1- β

O antisoro contra a subunidade AP1- β reconheceu um polipeptídeo de peso molecular previsto, porém apresentou um reconhecimento inespecífico (Figura 4.18). No ensaio de imunolocalização celular este soro não reconheceu a proteína nativa (dado não mostrado).

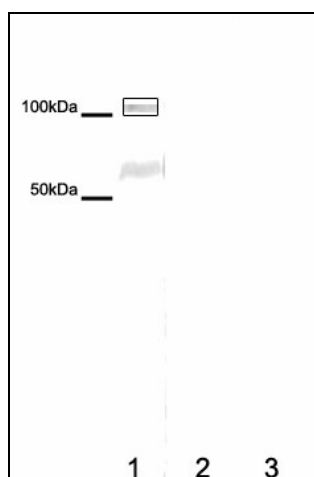


Figura 4.18 Análise por western blot da expressão da subunidade AP1- β em *T. cruzi*.

Os antisoros foram testados em extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os números 1, 2, 3 se referem aos camundongos. O soro 1 reconheceu polipeptídeo de tamanho esperado (marcado com retângulo). Os soros 2 e 3 não reagiram.

Uma vez que os antisoros contra AP1- μ e AP1- β tiveram resultados positivos por western blot, decidimos produzir anticorpos monoclonais para a subunidade AP1- β . Foi retirado o baço do camundongo positivo, a fim de isolar esplenócitos para posteriormente fusioná-los com células de mieloma.

Após a fusão, foram selecionados três hibridomas positivos através de ensaio ELISA. Foi realizada então a diluição limitante, obtendo-se então 11 clones produzindo anticorpos específicos para subunidade AP1- β , confirmados por western blot com extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Foi possível observar que todos os monoclonais reconheceram uma proteína de peso molecular previsto, ou seja, aproximadamente 100 kDa (Figura 4.19A). Quando o sobrenadante desses clones foi testado contra extratos de *E. coli* não foi observada nenhuma reação, diferentemente do soro policlonal que reconheceu algumas proteínas (Figura 4.19B).

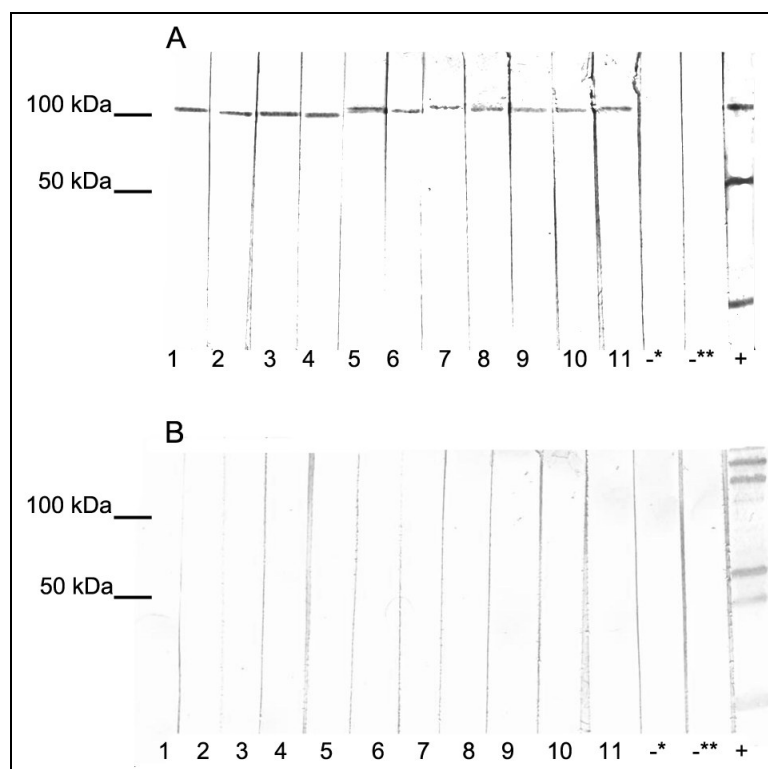


Figura 4.19 Análise por western blot da produção de anticorpos monoclonais contra a subunidade AP1- β de *T. cruzi*. **A)** Extrato protéico de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Cada clone está indicado abaixo da coluna, assim como os controles negativos - (sendo -* meio RPMI e -** tampão de bloqueio) e positivo + (soro policlonal). O anticorpo reconheceu um polipeptídeo de massa molecular esperada (106 kDa) **B)** Extrato protéico de *E. coli* com os mesmos monoclonais e controles. Não houve reconhecimento dos anticorpos monoclonais, apenas do policlonal, como esperado.

4.3.3 Subunidade AP1- γ

Para a subunidade AP1- γ foram produzidos polipeptídeos recombinantes de duas regiões distintas: N-terminal e dobradiça, sendo imunizados quatro camundongos para cada caso. Após a quarta imunização o soro foi testado contra extrato de epimastigotas de *T. cruzi* por western blot e também por imunofluorescência, a fim de confirmar a produção de anticorpos policlonais.

Para adaptina AP1- γ N apenas um dos soros foi positivo no ensaio de western blot contra extrato de *T. cruzi*, entretanto com tamanho diferente do previsto em bancos de dados (Figura 4.20).

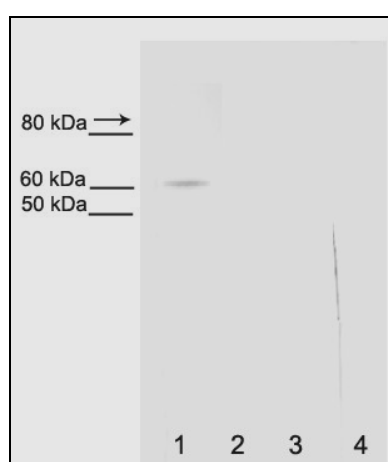


Figura 4.20 Análise por western blot da produção de anticorpos para a subunidade AP1- γ N.

Os antisoros foram testados em extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os números 1, 2, 3 e 4 referem-se aos camundongos. O soro 1 reconheceu polipeptídeo de tamanho não esperado. A seta indica o tamanho esperado para essa proteína (89 kDa). Os soros 2, 3 e 4 não obtiveram reação.

Os antisoros produzidos contra a adaptina AP1- γ D foram testados por ensaio de western blot, sendo possível observar reação positiva para uma proteína de tamanho esperado, ou seja ~90 kDa (Figuras 4.21A). Todos os quatro antisoros foram testados em ensaios por imunofluorescência com formas epimastigotas. Apenas um dos antisoros (camundongo 02) forneceu uma reação positiva na região anterior dos parasitas, em geral lateralmente ao cinetoplasto. Esta localização é compatível com o complexo de Golgi, onde o complexo adaptador AP-1 se localiza (Figura 4.22).

O camundongo do qual foi obtido o soro positivo por imunofluorescência foi selecionado para a produção de anticorpos monoclonais. Porém não foi possível obter hibridomas produtores de anticorpos, como avaliado por ensaio de ELISA. Assim, estes hibridomas foram descartados.

O soro policlonal positivo tanto por western blot como por imunofluorescência em formas epimastigotas (camundongo 02) foi analisado também nas formas evolutivas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* através de western blot (Figura 4.21B). Foi possível observar que o antisoro reconheceu um polipeptídeo de tamanho previsto (cerca de 90 kDa) em todas as formas evolutivas.

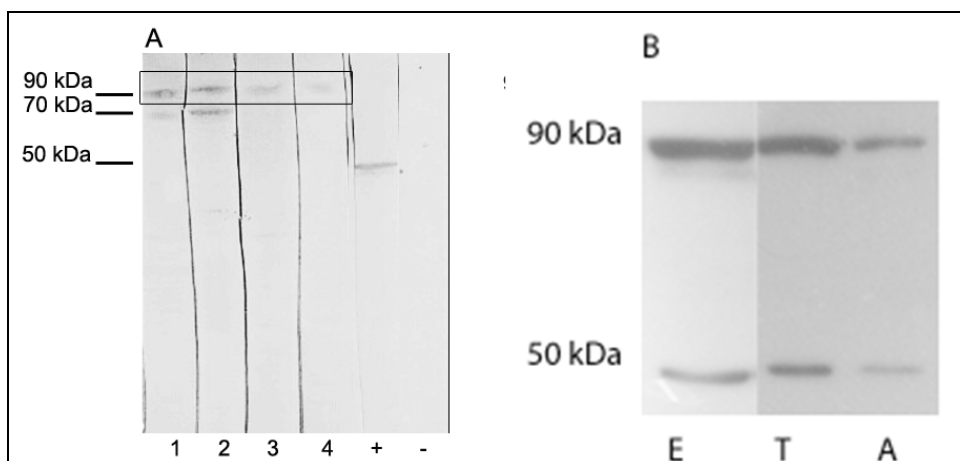


Figura 4.21 Análise da produção de anticorpos para a subunidade AP1- γ D. A) Teste do antisoro de quatro camundongos contra extratos de epimastigotas de *T. cruzi*, mostrando reconhecimento de uma banda de peso molecular previsto (retângulo). + = controle positivo (anticorpo monoclonal de actina) - = controle negativo (tampão de bloqueio) B) Teste do soro policlonal do camundongo 2 contra extratos de formas epimastigotas (E), tripomastigotas metacíclicas (T), amastigotas (A) de *T. cruzi*. Como normalizador foi utilizado anti-soro contra proteína GAPDH.

4.4 Localização celular

Como mencionado acima, foram realizados ensaios de localização celular por imunofluorescência indireta com os soros policlonais obtidos contra as subunidades adaptadoras AP1- γ D, AP1- β , AP1- μ e AP1- σ . Os resultados com os soros dos camundongos imunizados com as subunidades AP1- μ , AP1- σ e AP- β de *T. cruzi* foram negativos (dados não mostrados).

Ensaio por imunofluorescência com o soro pré-imune (soro retirado do camundongo antes das imunizações) também foram realizados, não se obtendo marcação, como esperado (dados não mostrados).

Incubação de formas epimastigotas de *T. cruzi* com antisoro contra a subunidade AP1- γ D resultou em localização da proteína na região anterior dos parasitas, predominantemente próximo ao cinetoplasto, uma região compatível com o complexo de Golgi (Figura 4.22).

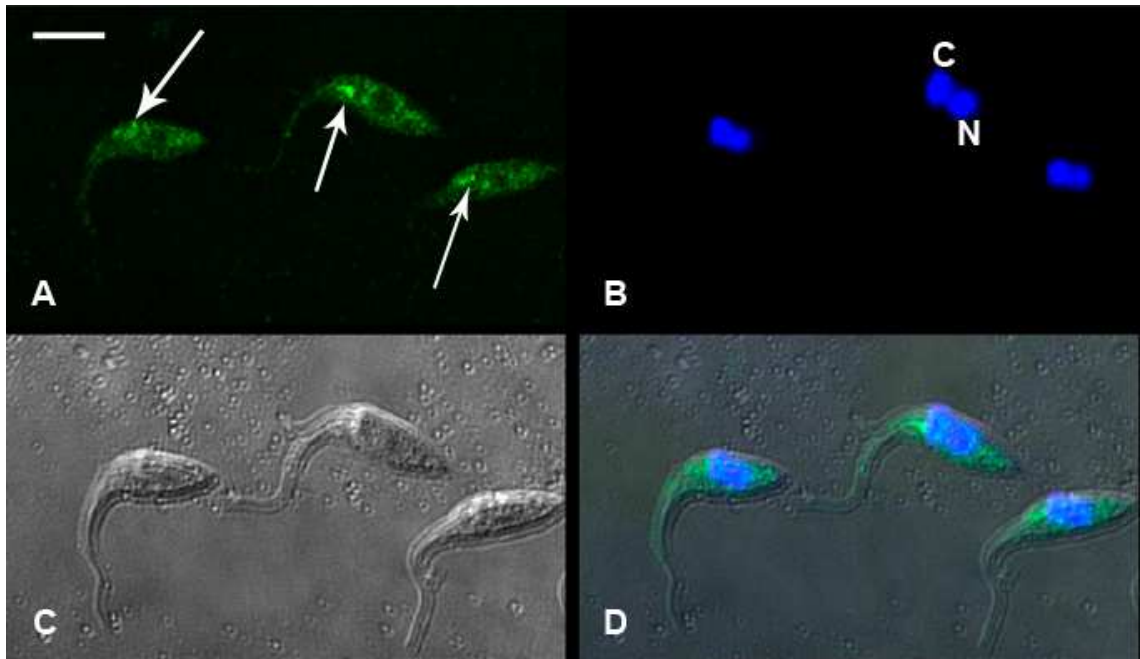


Figura 4.22 Localização da subunidade AP1- γ D em epimastigotas por microscopia confocal a laser.

A) Detecção usando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. Nota-se reação pontual (setas). B) Marcação do DNA do núcleo (N) e cinetoplasto (C) com Hoechst 33342. C) Imagem do corpo do parasita por contraste interferencial (DIC). D) Sobreposição das imagens A, B e C, demonstrando que a marcação predominante se localiza próxima ao cinetoplasto. Barra = 5 μ m.

Resultados semelhantes foram encontrados com formas amastigotas e tripomastigotas. Em amastigotas, reação positiva foi encontrada próxima ao cinetoplasto (Figura 4.23), enquanto em formas tripomastigotas a reação positiva foi observada entre o núcleo e cinetoplasto, mais próxima ao cinetoplasto (Figuras 4.23), região também compatível com a localização do complexo de Golgi nesta forma evolutiva.

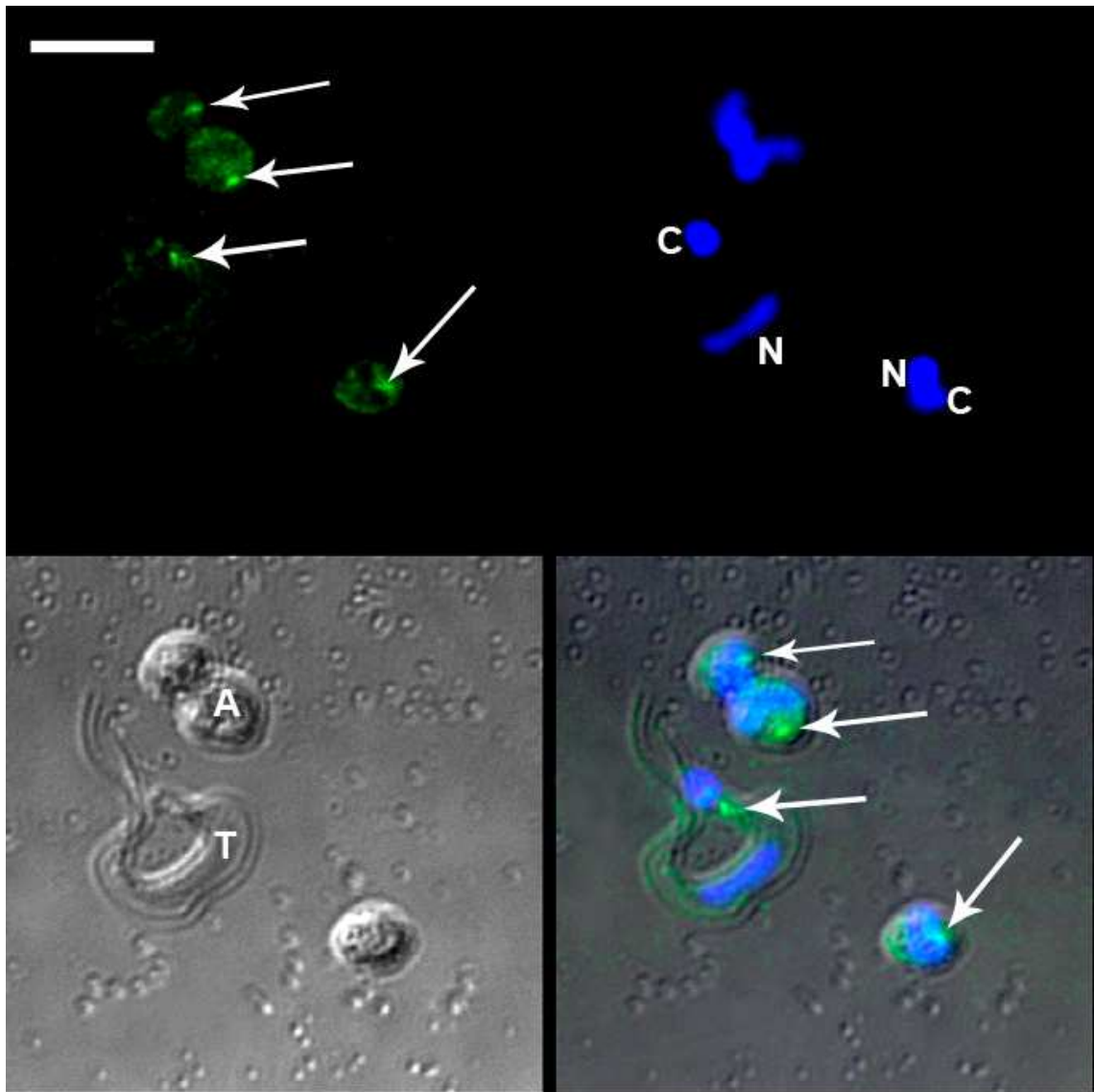


Figura 4.23 Localização da subunidade AP1- γ D em amastigotas (A) e tripomastigotas (T) por microscopia confocal a laser. **A)** Detecção usando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. Note reação pontual (setas). **B)** Marcação do DNA do núcleo (N) e cinetoplasto (C) com Hoechst 33342. **C)** Imagem do corpo do parasita por contraste interferencial (DIC). **D)** Sobreposição das imagens, demonstrando que a marcação pontual (setas) se localiza próxima ao cinetoplasto. Barra = 5 μ m.

Visualização dos parasitas incubados com o anticorpo anti AP1- γ D por imunofluorescência em menor aumento ao microscópio permitiu demonstrar expressão da subunidade AP1- γ na maior parte das células (Figura 4.24).

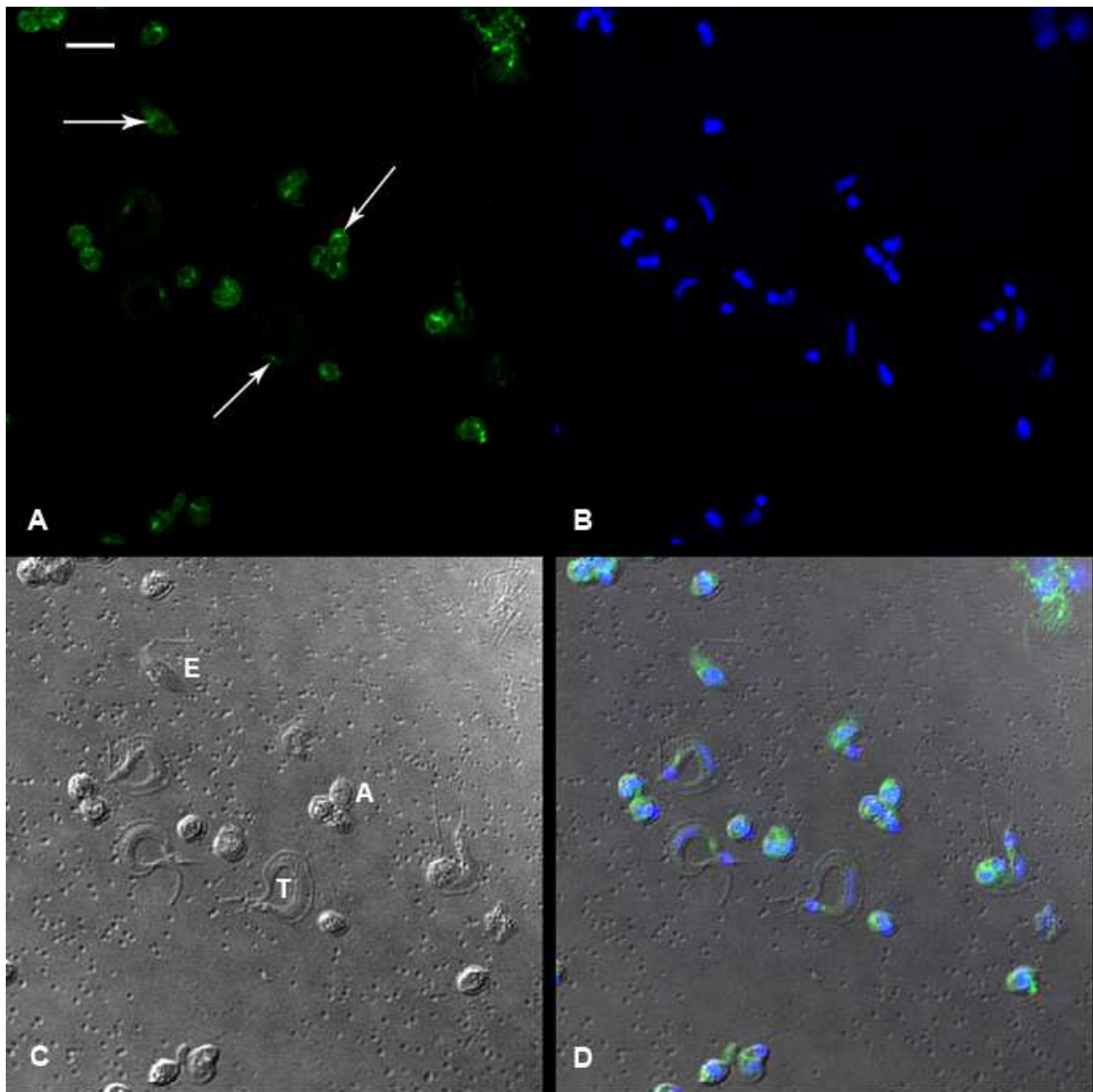


Figura 4.24 Localização da subunidade AP1- γ nas três formas evolutivas de *T. cruzi* por microscopia confocal a laser. **A)** Detecção usando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 488. Note reação pontual (setas) na maior parte das células. **B)** Marcação do DNA do núcleo e cinetoplasto com Hoechst 33342. **C)** Imagem do corpo do parasita (E: epimastigota; A: amastigota; T: tripomastigota) por contraste interferencial (DIC). **D)** Sobreposição das imagens, demonstrando que a marcação pontual se localiza próxima ao cinetoplasto. Barra = 5 μ m.

Em células de mamíferos a GTPase Rab7 está associada aos endossomos tardios e está envolvida no tráfego de vesículas entre o endossomo inicial e o endossomo tardio e/ou endossomo tardio e lisossomo (Bucci et al., 2000). Entretanto, em *T. cruzi* a Rab7 se localiza no complexo de Golgi (Araripe et al., 2004). Assim, formas epimastigotas de *T. cruzi* mutantes expressando Rab7 fusionada a GFP (cedidas por Michel Batista ICC-Fiocruz) foram utilizadas para demonstrar que o antisoro produzido contra AP1- γ D reconhece um polipetídeo que se localiza no Golgi deste parasita. Localização e colocalização de Rab7 com a

subunidade AP1- γ demonstrou que as duas proteínas estão localizadas na mesma estrutura, que portanto corresponde ao complexo de Golgi (Figuras 4.25 e 4.26).

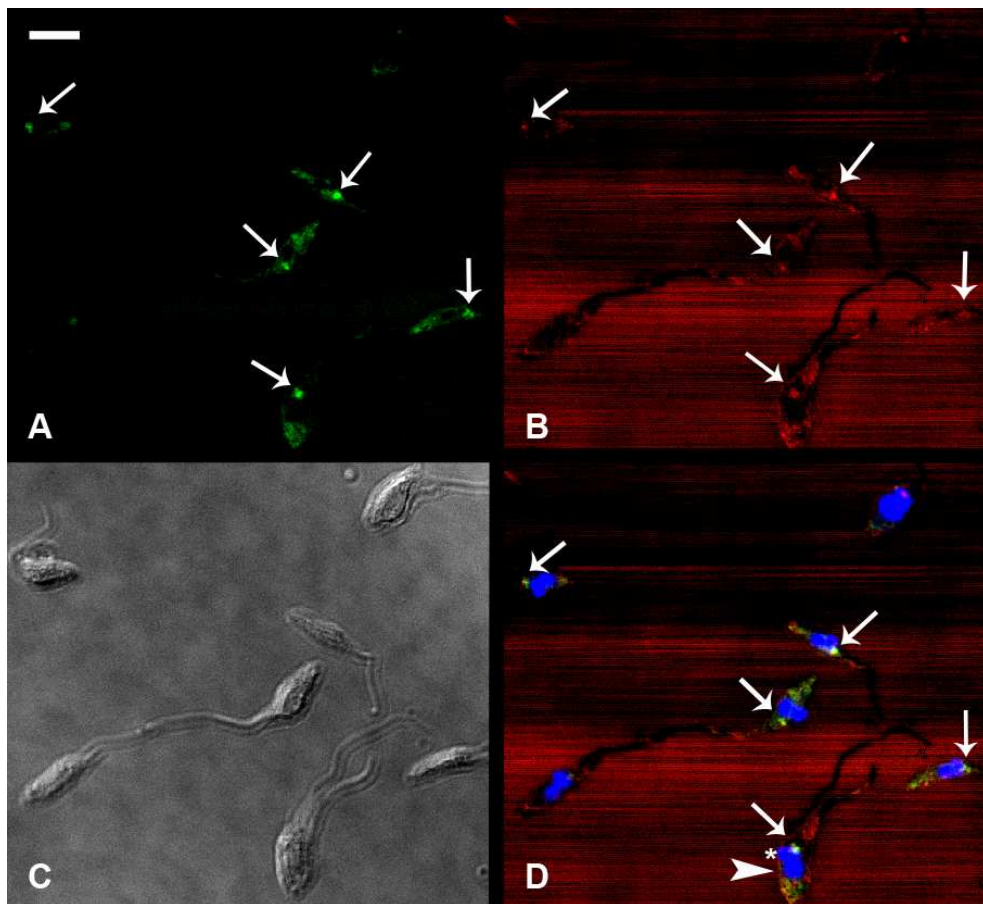


Figura 4.25 Co-localização da subunidade AP1- γ e a GTPase Rab7 na forma epimastigota de *T. cruzi* por microscopia confocal a laser. **A)** Células expressando Rab7 fusionada a GFP (setas). **B)** Detecção de AP1- γ D (setas) usando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 594. **C)** Imagem do corpo do parasita por contraste interferencial (DIC). **D)** Sobreposição das imagens A e B mostrando colocalização (em amarelo, setas) das proteínas Rab7 (verde) e AP1- γ D (vermelho). Marcação de DNA nuclear (cabeça de seta) e do cinetoplasto (*) com Hoechst 33342. Barra = 5 μ m

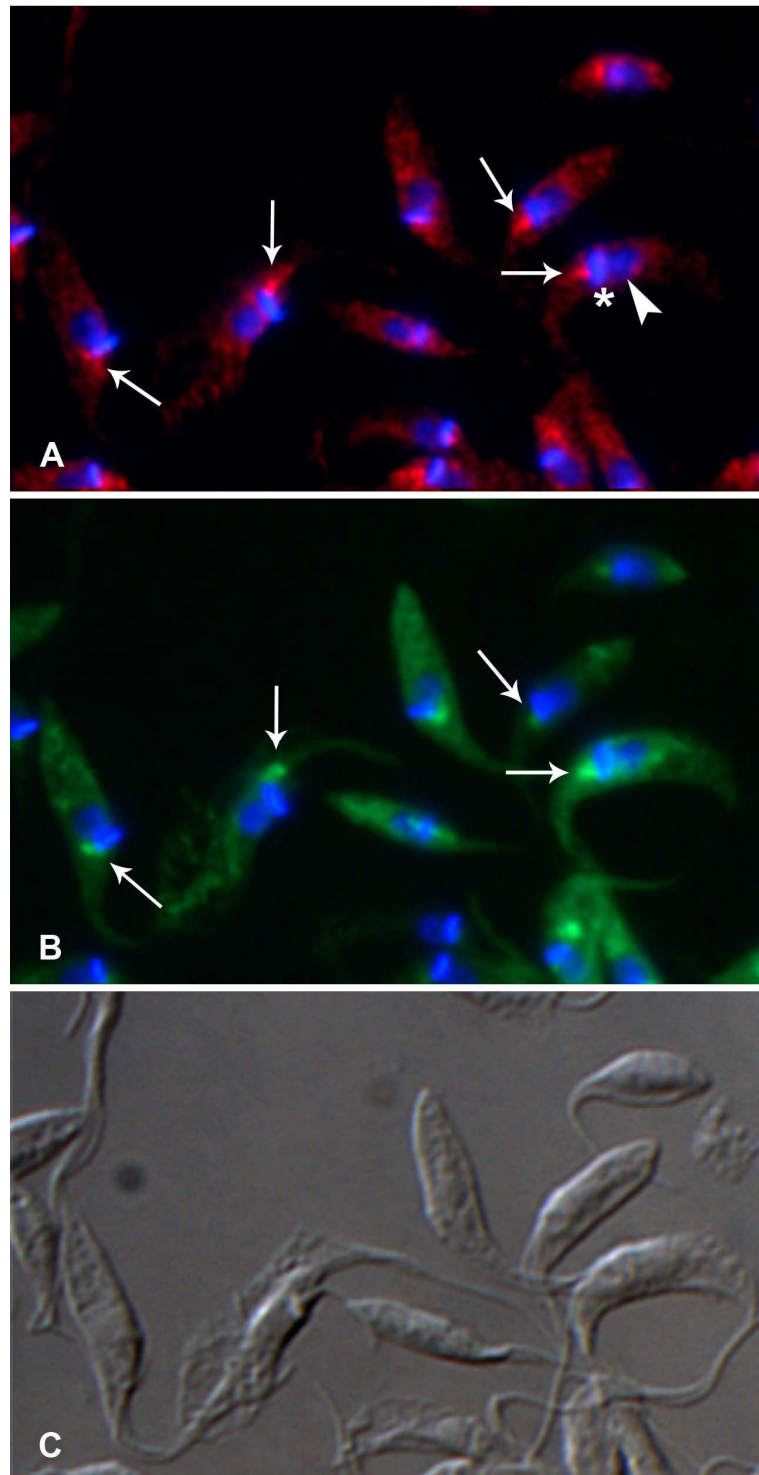


Figura 4.26 Colocalização por imunofluorescência (epifluorescência em microscópio Nikon) da subunidade AP1- γ e da GTPase Rab7 em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

A) detecção de AP1- γ D usando anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a AlexaFluor 594. **B)** Parasita expressando Rab7 fusionada a GFP. **C)** Imagem do corpo dos parasitas por contraste interferencial (DIC) Em azul marcação do DNA do núcleo (cabeça de seta) e cinetoplasto (*) com Hoechst 33342.

5 DISCUSSÃO

Vesículas com revestimento protéico de clatrina estão presentes em células nucleadas e são especializadas em transportar moléculas capturadas seletivamente através de receptores localizados em membranas celulares (Maxfield e McGraw, 2004). Estas vesículas brotam a partir da membrana plasmática (vesículas endocíticas) ou a partir da Rede Trans do Golgi (RTG). Neste último caso, as vesículas podem transportar moléculas específicas da RTG, via endossomos tardios, para atuar em lisosomos (Kirchhausen, 2000). No entanto, a clatrina não se associa diretamente ao receptor presente na membrana. Para isso é necessária a presença de complexos adaptadores (Brodsky et al., 2001).

Os complexos adaptadores (APs) são complexos heterotetraméricos que possuem a função de estabelecer uma ligação cruzada entre a cauda citoplasmática do receptor de membrana e a clatrina, recrutando assim clatrina para as membranas, além de ligarem-se a fosfolipídeos na membrana e demais proteínas acessórias (Owen et al., 2004). Depois da clatrina, os complexos adaptadores são os complexos protéicos mais abundantes em vesículas revestidas com clatrina, estando presentes a uma taxa de um complexo adaptador para dois trisquéilions de clatrina (Kirchhausen, 2000).

Diversos complexos adaptadores já foram descritos (AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4), sendo os complexos AP-1 e AP-2 os mais caracterizados (Robinson, 2004). O complexo AP-2 está envolvido na formação de revestimento de clatrina na membrana plasmática. Já o complexo AP-1 atua na membrana da rede Trans do Golgi, onde vesículas com revestimento de clatrina selecionam as moléculas que serão empacotadas e direcionadas ao endossomos tardios / lisosomos (Robinson, 2004). Exemplos de enzimas lisosomais de tripanosomatídeos possivelmente carregadas em vesículas com revestimento de clatrina são as cisteíno-proteinases (enzimas residentes no lúmen de reservosomos de *T. cruzi*) (Soares et al., 1992) ou proteínas de membrana lisosomal, como a p67 encontrada em *T. brucei* (McConville et al., 2002).

O complexo adaptador AP-1 é composto por: (a) duas subunidades maiores, AP1- γ (89 kDa) e AP1- β (106 kDa), as quais possuem três regiões distintas: N-terminal, dobradiça e C-terminal, (b) uma subunidade média AP1- μ (49 kDa) e (c) uma subunidade menor AP1- σ (19 kDa). Cada uma delas possui funções distintas dentro do complexo (Bonifacino, 2001).

A subunidade AP1- β tem por função reconhecer uma sequência sinal (LL) na cauda citoplasmática do receptor de membrana, além de possuir sítios de ligação a proteínas acessórias e clatrina [LLpL(-)]. Já a subunidade AP1- γ possivelmente define a região da

membrana onde se formará o revestimento de clatrina, se ligando a fosfolipídeos e também apresenta sítios de ligação a clatrina (Tooze and Hinners, 2003). A subunidade AP1- μ reconhece um sinal de tirosina (YXX Φ) ou dileucina presente na cauda do receptor transmembranar (Kirchhausen & Traub, 2003). A função da subunidade AP1- σ dentro do complexo ainda não é totalmente clara, mas tem sido relacionada uma função estrutural na estabilização do complexo (Collins et al., 2002).

Nossa análise do genoma de *T. cruzi* permitiu identificar todos os genes que codificam as subunidades do complexo adaptador 1. Um estudo anterior analisou o genoma de *T. cruzi* e identificou a presença de conjuntos completos de genes codificantes para todas as subunidades dos complexos adaptadores AP1-4 (Denny et al., 2005). Entretanto, *T. brucei* não possui o complexo AP-2 e no genoma de *L. major* faltam as seqüências codificantes para as subunidades do complexo AP-4 (Denny et al., 2005). O motivo dessas diferenças ainda não é claro, porém a ausência do complexo AP-2 no sistema endocítico de *T. brucei* foi atribuída a uma simplificação da via permitindo uma rápida endocitose de VSGs (glicoproteínas variáveis de superfície) e anticorpos (Allen et al., 2003; McGregor & Matthews, 2008). O *T. cruzi* por outro lado possui um ciclo de vida complexo, o que talvez exija o conjunto completo dos quatro complexos AP para que o parasita possa infectar variados tipos celulares em seus hospedeiros. Para tanto, ele necessita modificar suas moléculas de superfície e escapar do vacúolo parasitóforo para o citoplasma (Denny et al., 2005). Um estudo realizado em *L. major* mostrou que o complexo AP-1 é importante para a infectividade deste parasita em macrófagos (Gokool, 2003), o que reforça a hipótese apresentada.

Os tripanosomatídeos possuem características distintas e importantes nos processos de endocitose e exocitose. Tais processos nesses organismos, diferentemente do que acontece na maioria das células eucarióticas, são altamente polarizados, ocorrendo principalmente na região da bolsa flagelar (De Souza, 2002; Morgan et al., 2002a). É próximo a essa região que normalmente está localizado o complexo de Golgi desses organismos, estando a região Cis do Golgi orientada para o retículo endoplasmático e a região Trans do Golgi para a bolsa flagelar (Figueiredo & Soares, 1995). O transporte de vesículas a partir da RTG dos tripanosomatídeos pode seguir três destinos: a bolsa flagelar, os acidocalcisomos e os lisosomos (Mcconville et al., 2002). As proteínas que saem do RTG podem ser entregues aos lisosomos por uma via indireta (através da bolsa flagelar) ou direta (via RTG-endosomo/lisosomo).

Todas as formas evolutivas de *T. cruzi* possuem um único complexo de Golgi (De Souza, 2002). Foi demonstrada por análise ultraestrutural a presença de vesículas com possível revestimento de clatrina brotando a partir do complexo de Golgi (Sant'Anna et al., 2004). A formação do revestimento clatrina na RTG normalmente está relacionada com a presença do complexo adaptador AP-1, o que nos levou a investigar a expressão do complexo AP-1 em *T. cruzi*. É escasso o conhecimento sobre o complexo adaptador AP-1 em tripanosomatídeos, sendo que a maior parte dos estudos está concentrada em *T. brucei* e *Leishmania* spp.

5.1 Estudo in silico

Uso de bancos de dados genômicos e suas ferramentas na busca de genes em diferentes organismos, no alinhamento de sequências gênicas e na identificação de estruturas protéicas permite obter grande quantidade de informações a respeito de um gene. Por exemplo, uso da ferramenta BLAST no banco de dados do NCBI permite comparar sequências de aminoácidos entre diferentes organismos e obter o nível de identidade e similaridade entre eles. Identidade é uma medida quantitativa e compara a presença do mesmo nucleotídeo ou aminoácido na mesma posição em duas sequências alinhadas, enquanto a similaridade compara a porcentagem de aminoácidos idênticos e aqueles com propriedades químicas semelhantes. Através desses dados é possível deduzir o grau de conservação entre dois ou mais genes.

Para verificar o nível de conservação entre proteínas das subunidades do complexo AP-1 de *T. cruzi*, sequências de aminoácidos de *T. cruzi* e dos eucariontes *Danio rerio*, *Gallus gallus* e *Drosophila melanogaster* foram comparadas às sequências do complexo AP-1 do organismo modelo *H. sapiens*. Essa comparação gênica demonstrou que as subunidades do complexo AP-1 se mantiveram conservadas ao longo da evolução, provavelmente devido a sua importância biológica.

As sequências encontradas no genoma de *T. cruzi* foram usadas como modelo para localizar os genes das adaptinas do complexo AP-1 nos genomas dos tripanosomatídeos *T. brucei*, *L. major*, *L. brasiliensis* e *L. infantum*. Os dados obtidos sobre o grau de identidade/similaridade entre as adaptinas de tais organismos demonstram que o complexo adaptador AP-1 também é conservado também entre os tripanosomatídeos e que o complexo AP-1 de *T. brucei* é o que possui relação evolutiva mais próxima com o de *T. cruzi*, estando os complexos AP-1 de espécies de *Leishmania* menos relacionados. Os dados demonstram que essas proteínas mantêm-se conservadas entre as espécies, inclusive entre os

tripanosomatídeos. A manutenção dessas proteínas ao longo da evolução sugere que participem de processos importantes para as células e que possivelmente desempenhem a mesma função nos organismos avaliados.

Alinhamento das sequências de aminoácidos das quatro subunidades do complexo AP-1 permitiu identificar regiões mais conservadas dessas sequências entre os diferentes organismos analisados. Alinhamento entre tripanosomatídeos demonstrou que quase toda a sequência aminoacídica das quatro subunidades é conservada. Porém, alinhamento múltiplo realizado entre as proteínas de *T. cruzi* e diferentes eucariontes demonstrou que na região N-terminal dessas proteínas existe maior identidade entre os aminoácidos. Esse resultado está de acordo com os previamente obtidos por Schledzewski (1999), que demonstrou que o domínio N-terminal é altamente conservado não apenas nas subunidades maiores do AP-1 como também nos demais complexos, e que as regiões da dobradiça e C-terminal das subunidades maiores (γ , α , β , δ e ϵ) são menos conservadas.

Os dados acima ficaram mais evidentes quando buscamos os domínios proteicos das subunidades AP1- β e AP1- γ de *T. cruzi* e *T. brucei*, a fim de comparar com os domínios correspondentes da proteína humana. Foi possível observar que o domínio N-terminal das subunidades AP1- β e AP1- γ se mantem conservado em *T. brucei* e *T. cruzi*. Essa conservação provavelmente deve-se à função da proteína, pois de acordo com Boehm e Bonifacino (2001) essa região está envolvida com a interação das adaptinas maiores com as médias dos complexos adaptadores, e com o direcionamento desses complexos para a membrana alvo.

Entretanto, na subunidade AP1- β de *T. cruzi* e *T. brucei* estão ausentes o domínio e subdomínio C-terminal encontrados na proteína humana. O domínio C-terminal é responsável pela translocação de proteínas acessórias endocíticas para o local de formação da vesícula (Traub et al., 1999). O subdomínio C-terminal é necessário para ligação e subsequente polimerização da clatrina e também colabora com a associação de proteínas acessórias que se ligam ao domínio C-terminal da adaptina (Owen et al., 2000). Entretanto, já foi mostrado que a ausência desses domínios não interfere na formação de revestimento de clatrina em *T. brucei* (Morgan et al., 2001).

5.2 Análise da expressão gênica por western blot e imunofluorescência

5.2.1 Subunidade AP1- σ

Foram produzidos anticorpos policlonais contra a subunidade AP1- σ , utilizando-se uma proteína recombinante correspondente à sequência inteira da proteína conforme deduzido

a partir do banco de dados genômicos de *T. cruzi*. A especificidade dos anticorpos foi analisada por western blot utilizando extratos proteicos totais de formas epimastigotas de *T. cruzi*, mas neste ensaio não foi obtido reconhecimento da proteína pelo antisoro. Da mesma forma, o resultado do ensaio de imunofluorescência foi negativo. Gokool (2003) em estudo com *L. mexicana* demonstrou a expressão de AP1- σ nesse parasita, mas o ensaio de imunolocalização apresentou resultados negativos, a exemplo do que foi obtido neste estudo em *T. cruzi*. Assim, possíveis causas do insucesso do reconhecimento da subunidade AP1- σ pelo nosso antisoro podem estar relacionadas aos seguintes aspectos: baixa expressão dessa proteína ou difícil acesso à proteína nativa pelo anticorpo no ensaio de imunolocalização.

5.2.2 Subunidade AP1- μ

O anticorpo produzido contra a subunidade AP1- μ reconheceu em ensaio de western blot um polipeptídeo de tamanho aproximado de 50 kDa, compatível com a proteína endógena. Entretanto, no ensaio de imunofluorescência o resultado foi negativo. Da mesma forma, em trabalho com o tripanosomatídeo *L. mexicana*, Gokool (2003) também obteve expressão da subunidade AP1- μ através de western blot, porém com resultado negativo na imunolocalização. Resultado negativo também foi obtido na tentativa de localizar a subunidade AP1- μ no tripanosomatídeo *T. brucei* (TAZEH et al., 2009).

A dificuldade de localizar esta subunidade é um ponto comum entre nossos dados e os trabalhos mencionados acima. Tal fato pode estar relacionado ou à posição da AP1- μ dentro do complexo protéico, onde esta subunidade fica menos exposta não havendo epítomos acessíveis aos anticorpos, ou à baixa expressão da proteína.

5.2.3 Subunidade AP1- β

Como obtivemos um anticorpo policlonal satisfatório por western blot contra a subunidade AP1- β , optou-se por produzir anticorpos monoclonais com o objetivo de obter reconhecimento de um único epítipo da proteína aumentando assim a especificidade. Para isso foi utilizada a sequência da região N-terminal da proteína. Foram obtidos 11 clones que reconheceram um polipeptídeo com tamanho de aproximadamente 100 kDa, o que está de acordo com o predito em bancos de dados genômicos do *T. cruzi*.

Assim como em *T. cruzi*, também foi demonstrada em *T. brucei* a expressão de Tb β 1 através de western blot, onde os anticorpos reconheceram um polipeptídeo de

aproximadamente de 76kDa, conforme predito em bancos de dados desse organismo (Morgan et al., 2001). Da mesma forma Denny (2004), demonstrou que *L. major* também expressa essa proteína.

Era esperado que subunidade AP-1 β , por fazer parte dos complexos AP-1 e AP-2 em *T. cruzi*, apresentasse localização no complexo de Golgi e na membrana da bolsa flagelar dessa parasita. Em ensaios de imunolocalização em *L. major* (Denny et al., 2005) e em *T. brucei* (Morgan et al., 2001) demonstrou-se que a AP1- β colocaliza parcialmente com o complexo de Golgi, assim como em estruturas distribuídas pela célula.

Porém, em nossos ensaios de imunofluorescência os anticorpos monoclonais produzidos não reconheceram a proteína nativa em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Esse resultado pode ser devido à impossibilidade do nosso anticorpo se associar a epítomos escondidos na proteína nativa.

5.2.4 Subunidade AP1- γ

Para a produção de anticorpos contra a subunidade AP1- γ foram utilizadas sequências de duas regiões distintas da proteína de *T. cruzi*: a região N-terminal, contendo em torno de 1000 pb, e a região da dobradiça, contendo 485 pb. A dobradiça é a região que liga a região N-terminal ao domínio C-terminal e é um local da proteína de maior exposição, sendo possivelmente mais acessível à interação dos anticorpos (Robinson, 1990).

Os anticorpos produzidos para região N-terminal de AP1- γ reconheceram um polipeptídeo de tamanho aproximado a 60 kDa, não compatível com o esperado (~90 kDa). Essa diferença poderia ser atribuída a uma clivagem da proteína, já que na região da dobradiça existe uma sequência de aminoácidos suscetíveis à ação de proteases (Kirchhausen et al., 1989). No ensaio de imunolocalização esse antisoro não obteve reação. Esse resultado pode ser atribuído à baixa especificidade do antisoro.

Já os anticorpos produzidos para região da dobradiça da subunidade AP1- γ de *T. cruzi* reconheceram em western blot em todas as formas evolutivas do parasita (epimastigota, tripomastigota metacíclico e amastigota), um polipeptídeo de tamanho compatível com o predito em banco de dados (aproximadamente 90 kDa). Esses resultados são compatíveis com os estudos de expressão da AP1- γ em *T. brucei* conduzidos por Allen e colaboradores (2007), onde foi identificada expressão de um polipeptídeo com tamanho predito (87,5kDa) em duas formas evolutivas desse parasita (formas procíclicas e sanguíneas), porém não foi obtido sucesso na imunolocalização dessa proteína.

Os anticorpos policlonais produzidos contra a subunidade AP1- γ D (resíduos 578-711) foram utilizados para a localização subcelular da adaptina AP1- γ em *T. cruzi*. Em formas epimastigotas e amastigotas o antisoro forneceu uma reação positiva na região anterior do parasita, próximo ao cinetoplasto, região esta compatível com o complexo de Golgi em *T. cruzi* (Figueiredo & Soares, 1995; De Souza, 2002). Em tripomastigota foi observada reação entre o núcleo e cinetoplasto, sendo mais próximo do cinetoplasto, região esta também compatível com o complexo de Golgi nesta forma evolutiva (De Souza, 2002).

Para confirmar a localização da proteína reconhecida pelo antisoro contra AP1- γ optou-se por realizar o ensaio de colocalização com outra proteína residente no complexo de Golgi de *T. cruzi*, a Rab7. Em células de mamíferos a GTPase Rab7 está associada aos endossomos tardios e está envolvida no tráfego de vesículas entre o endossomo inicial e o endossomo tardio e/ou endossomo tardio e lisossomo (Feng et al., 1995; Bucci et al., 2000). Todavia, foi demonstrado que em que *T. cruzi*, a Rab7 se localiza no complexo de Golgi (Araripe et al., 2004). O nosso ensaio de colocalização confirmou que a subunidade AP1- γ está localizada no complexo de Golgi juntamente com a GTPase Rab7.

5.3 Considerações finais

Nessa dissertação foi possível verificar que as subunidades do complexo adaptador AP1 são conservadas em *T. cruzi*, porém com algumas particularidades, como a ausência do subdomínio C-terminal da subunidade AP1- β presente na proteína humana.

Foi possível identificar a expressão das subunidades (AP1- μ , AP1- β e AP1- γ) do complexo AP-1 em *T. cruzi*, além de localizar a subunidade AP1- γ no complexo de Golgi como esperado, e em todas as formas evolutivas desse parasita. Esses dados demonstram a existência do complexo AP-1 em *T. cruzi* e sugerem fortemente que ele se localiza no complexo de Golgi, assim como em outras células eucarióticas.

Considerando a função atribuída em outros organismos, é possível que o complexo AP-1 tenha função relacionada em *T. cruzi*. Uma delas seria o envio de enzimas lisossomais, como cruzipaina e chagasina, aos reservosomos (organelas prelisossomais) (Soares et al., 1992; Santos et al., 2005) em formas epimastigotas ou lisossomos em amastigotas e tripomastigotas. Estudos posteriores, como o nocaute gênico de uma das subunidades do complexo AP-1 são necessários para analisar a função deste adaptador neste parasita.

6 CONCLUSÕES

1 - As análises in silico permitiram concluir que:

Os genes que codificam as quatro subunidades do complexo adaptador 1 de *T. cruzi* estão presentes no genoma do parasita, sendo conservados;

A subunidade AP1- β de *T. cruzi* não possui o domínio e o subdomínio C-terminais presentes na proteína humana;

As subunidades maiores AP1- γ e AP1- β do complexo adaptador AP-1 de *T. cruzi* possuem o domínio conservado N-terminal presentes nas proteínas humanas;

2- Anticorpo monoclonal produzido contra a subunidade AP1- β reconheceu um polipetídeo de tamanho aproximado a 100 kDa em extratos totais de formas epimastigotas de *T. cruzi*, que corresponde ao peso molecular da proteína endógena dessa parasita. Entretanto, este anticorpo não reconheceu a proteína nativa.

3- Anticorpo policlonal produzido contra a subunidade AP1- μ reconheceu um polipetídeo de tamanho aproximado a 50 kDa em extratos totais de formas epimastigotas de *T. cruzi*, que corresponde ao peso molecular da proteína endógena dessa parasita. Entretanto, este anticorpo não reconheceu a proteína nativa.

4- Anticorpo policlonal produzido contra a subunidade AP1- γ (região da dobradiça) reconheceu um polipetídeo de tamanho aproximado a 90 kDa em extratos totais de formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos e amastigotas de *T. cruzi*, que corresponde ao peso molecular da proteína endógena dessa parasita. Este antisoro localizou, através de microscopia confocal, reação positiva pontual no complexo de Golgi de formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, definido pela colocalização com o marcador Rab7.

5- Os dados produzidos nesse estudo demonstram a existência do complexo AP-1 em *T. cruzi* e sugerem fortemente que ele se localiza no complexo de Golgi, assim como em outras células eucarióticas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLEN, C. L.; DANGJIN, L.; CHUNG, W. L.; FIELD, M. C. **Dileucine signal-dependent and AP-1-independent targeting of a lysosomal glycoprotein in *Trypanosoma brucei*.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 156, p. 175-190, 2007.

ALLEN, C. L.; GOULDING, D.; FIELD, M. C. **Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*.** *The EMBO Journal*, v. 22, p. 4991-5002, 2003.

ARARIPE, J. R.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; LEAL, S. T.; DE SOUZA, W.; RONDINELLI, E. ***Trypanosoma cruzi*: TcRAB7 protein is localized at the Golgi apparatus in epimastigotes.** *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 321, p. 397-402, 2004.

BOEHM, M.; BONIFACINO, J. S. **Adaptins: The Final Recount.** *Molecular biology of the cell*, v. 12, p. 2907-2920, 2001.

BOMAN, A L. **GGA proteins: new players in the sorting game.** *Journal of Cell Science*, v. 114, p. 3413-3418, 2001.

BONALDO, M. C.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GOLDENBERG, S. **Cell substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation.** *Journal of Cell Biology*, v. 106 p. 1349-1358, 1988.

BONIFACINO, J. S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. **Coat proteins: shaping membrane transport.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 4, p. 409-414, 2003.

BONIFACINO, J. S.; TRAUB, L. M. **Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes.** *Annual Review of Biochemistry*, v. 72, p. 395-447, 2003.

BRODSKY, F. M.; CHEN, C. Y.; KNUEHL, C.; TOWLER, M. C.; WAKEHAM, D. E. **Biological basketweaving: Formation and Function of Clathrin-Coated Vesicles.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v.17, p. 517-568, 2001.

BUCCI, C.; THOMSEN, P.; DEURS, B. V. **Rab7: a key to lysosome biogenesis.** *Molecular Biology of the Cell*, v. 11, p. 467-480, 2000.

CAMARGO, E. P. **Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical*, v. 12, p. 93-100, 1964.

- CAVALIER-SMITH, T. **Kingdoms protozoa and chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree.** *Biology Letters*, v. 6, p. 342-345, 2010.
- COLLINS, B. M.; EVANS, P. R.; McCOY, A. J.; KENT, H. M.; OWEN, D. J. **Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex.** *Cell*, v. 109, p. 523-535, 2002.
- CONNER, S. D.; SCHMID, S. L. **Regulated portals of entry into the cell.** *Nature*, v. 422, p. 37-44, 2003.
- CONTRERAS, V. T.; SALLES, J. M.; THOMAS, N.; MOREL, C. M.; GOLDENBERG, S. **In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions.** *Molecular and Biochemical Parasitology*, v.16, p. 315-327, 1985.
- CORRÊA, J. R.; ATELLA, G. C.; MENNA-BARRETO, R. S.; SOARES, M. J. **Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites.** *The Journal of Eukaryotic Microbiology*, v. 54, p. 297-302, 2007.
- COURA, J. R. **Chagas disease: what is known and what is needed- A background article.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102 Suppl , 113-122, 2007.
- CROTTET, P.; MEYER, D. M.; ROHRER, J.; SPIESS, M. **ARF1 GTP, tyrosine-based signals, and phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate constitute a minimal machinery to recruit the AP-1 clathrin adaptor to membranes.** *Molecular Biology of the Cell* v. 13, p. 3672-3682, 2002.
- DE SOUZA, W. **Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 8, p. 269-285, 2002.
- DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. L. **Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa.** *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, v. 44, p. 67-124, 2009.
- DELL'ANGELICA, E. C. **Association of the AP-3 adaptor complex with clathrin.** *Science*, v. 280, p. 431-434, 1998.
- DENNY, P. W.; MORGAN, G. W.; FIELD, M. C.; SMITH, D. F. **Leishmania major: clathrin and adaptin complexes of an intra-cellular parasite.** *Experimental Parasitology*, v. 109, p. 33-37, 2005.
- DITTIE, A S.; HAJIBAGHERI, N.; TOOZE, S. A. **The AP-1 adaptor complex binds to immature secretory granules from PC12 cells, and is regulated by ADP-ribosylation factor.** *The Journal of cell biology*, v. 132, p. 523-536, 1996.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. **Acidocalcisomes – conserved from bacteria to man.** Nature Reviews Microbiology, v. 3, p. 251-261, 2005.

EDELING, M. A; SMITH, C.; OWEN, D. **Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures.** Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v. 7, p. 32-44, 2006.

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. **The Golgi apparatus (complex)-(1954-1981)-from artifact to center stage.** The Journal of Cell Biology, v. 91, p. 77-103, 1981.

FARQUHAR, M. G.; PALADE, G. E. **The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy.** Trends in Cell Biology, v. 8, p. 2-10, 1998.

FENG, Y.; PRESS, B.; WANDINGER-NESS, A. **Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic.** The Journal of Cell Biology, v. 131, p. 1435-1452, 1995.

FIGUEIREDO, R. C.; SOARES, M. J. **The complex de Golgi of Trypanosoma cruzi epimastigote forms.** Journal of. Submicroscopic. Cytology and. Pathology, v. 27, p. 209-215, 1995.

FOOTE, C.; NOTHWEHR, S. F. **The clathrin adaptor complex 1 directly binds to a sorting signal in Ste13p to reduce the rate of its trafficking to the late endosome of yeast.** The Journal of Cell Biology, v. 173, p. 615-626, 2006.

FÖLSCH, H.; PYPART, M.; SCHU, P.; MELLMAN, I. **The AP-1A and AP-1B clathrin adaptor complexes define biochemically and functionally distinct membrane domains.** The Journal of Cell Biology, v. 163, p. 351-362, 2003.

FOTIN, A.; CHENG, Y.; SLIZ, P.; GRIGORIEFF, N.; HARRISON, S. C.; KIRCHHAUSEN, T.; WALTZ, T. **Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy.** Nature, v. 432, p.573-579, 2004.

GHOSH, P.; DAHMS, N. M.; KORNFELD, S. **Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the table.** Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v. 4, p. 202-212, 2003.

GOKOOL, S. **Sigma-1 and mu-1adaplin homologues of Leishmania mexicana are required for parasite survival in the infected host.** The Journal of Biological Chemistry, v. 278, p. 29400-29409, 2003.

HANNAERT, V.; BRINGAUD, F.; OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. **Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida.** Kinetoplastid Biology Disease, v. 2, p. 11, 2003.

HINNERS, I.; TOOZE, S. A. **Changing directions: clathrin-mediated transport between the Golgi and endosomes.** *Journal of Cell Science*, v. 116, p. 763-771, 2003.

HIRST, J.; BORNER, G. H. H.; ANTROBUS, R.; PEDEN, A. A.; HODSON, N. A.; SAHLENDER, D. A.; ROBINSON, M. S. **Distinct and overlapping roles for AP-1 and GGAs revealed by the “knocksideways” System.** *Current Biology*, v. 22, p. 1711-1716, 2012.

KALB, L. **Clatrina em *Trypanosoma cruzi*: identificação do gene e localização celular.** Dissertação de Mestrado. Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, UFPR- PR, 2011.

KIRCHHAUSEN, T.; NATHANSON, K. L.; MATSUI, W.; VAISBERG, A.; CHOW, E. P.; BURNE, C.; KEEN, J. H.; DAVIS, A. E. **Structural and functional division into two domains of the large (100- to 115-kDa) chains of the clathrin-associated protein.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 86, p. 2612-2616, 1989.

KIRCHHAUSEN, T. **Adaptors for clathrin-mediated traffic.** *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 15, p. 705-732, 1999.

KIRCHHAUSEN, T. **Three ways to make a vesicle.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 1, p. 187-198, 2000.

LANDY, A. **Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination.** *Annual Review of Biochemistry*, v. 58, p. 913-949, 1989.

LE BORGNE, R.; HOFLACK, B. **Mannose 6-phosphate receptors regulate the formation of clathrin-coated vesicles in the TGN.** *The Journal of Cell Biology*, v. 137, p. 335-345, 1997.

LEFKIR, Y.; MALBOUYRES, M.; GOTTHARDT, D.; OZINSKY, A.; CORNILLON, S.; BRUCKERT, F.; ADEREM, A. A.; SOLDATI, T.; COSSON, P.; LETOURNEUR, F. **Involvement of the AP-1 adaptor complex in early steps of phagocytosis and macropinocytosis.** *Molecular Biology of the Cell*, v. 15, p. 861-869, 2004.

MCGREGOR, P.; MATTHEWS, K. R. **Modelling trypanosome chronicity: VSG dysnaties and parasite density.** *Trends Parasitology*, v. 24, p. 1-4, 2008.

MAXFIELD, F. R.; MCGRAW, T. E. **Endocytic recycling.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 5, p. 121-132, 2004.

- MAYOR, S.; PAGANO, R. E. **Pathways of clathrin-independent endocytosis**. Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v.8, p. 1-10, 2007.
- MCCONVILLE, M. J.; MULLIN, K. A.; ILGOUTZ, S. C.; TEASDALE, R. D. **Secretory pathway of trypanosomatid parasites**. Microbiology and Molecular Biology Reviews, v. 66, p. 122-154, 2002.
- MEEL, V. E.; KLUMPERMAN, J. **Imaging and magination understanding the endo-lysosomal system**. Histochemistry and Cell Biology, v. 129, p. 250-266, 2008.
- MIACZYNSKA, M.; STENMARK, H. **Mechanisms and functions of endocytosis**. The Journal of Cell Biology, v. 180, p. 7-11, 2008.
- MORGAN, G. W.; ALLEN, C. L.; JEFFRIES, T. R.; HOLLINSHEAD, M.; FIELD, M. C. **Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in Trypanosoma brucei**. Journal of Cell Science, v. 114, p. 2605-2615, 2001.
- MORGAN G. W.; HALL B. S.; DENNY P. W.; CARRINGTON M.; FIELD, M. C. **The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences**. Trends Parasitology, v. 8, p. 491-496, 2002.
- MUNRO, S. **What is the Golgi apparatus, and why are we asking?** BMC Biology, v. 9, p. 1-5, 2011.
- NGÔ, H. M.; YANG, M.; PAPROTKA, K.; PYPAERT, M.; HOPPE, H.; JOINER, K. **AP-1 in Toxoplasma gondii mediates biogenesis of the rhoptry**. The Journal of Biological Chemistry, v. 278, p. 5343-5352, 2003.
- OVERATH, P.; STIERHOF, Y. D.; WIESE, M. **Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites - tumultuous traffic in a pocket**. Trends Cell Biology, v. 7, p. 27-33, 1997.
- OWEN, D. J.; VALLIS, Y.; PEARSE, B. M. F.; MCMAHON, H. T.; EVANS, P. R. **The structure and function of the beta 2-adaptin appendage domain**. The EMBO Journal, v. 19, p. 4216-4227, 2000.
- OWEN, D. J.; COLLINS, B. M.; EVANS, P. R. **Adaptors for clathrin coats: structure and function**. Annual Review of Cell and Developmental Biology, v. 20, p. 153-191, 2004.
- PEARSE, B. M.; ROBINSON, M. S. **Purification and properties of 100-kd proteins from coated vesicles and their reconstitution with clathrin**. The EMBO Journal, v. 3, p. 1951-1957, 1984.
- PORTO-CARREIRO, I.; ATTÍAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. **Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the**

cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. European Journal of Cell Biology, v. 79, p. 858-869, 2000.

PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** Lancet Infectious Diseases, v.1, p.92-100, 2001.

ROBINSON, M. S. **Cloning and expression of γ -adaptin, a component of clathrin-coated vesicles associated with the Golgi apparatus.** The Journal of Cell Biology, v. 111, p. 2319-2326, 1990.

ROBINSON, M. S. **Adaptable adaptors for coated vesicles.** Trends in Cell Biology, v. 14, p. 167-174, 2004.

ROTH, M. G. **Clathrin-mediated endocytosis before fluorescent proteins.** Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v. 7, p. 63-68, 2006.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: A laboratory manual.** N.Y: Cold Spring Harbor, 1989.

SANTOS, C. C.; SANT'ANNA, C.; TERRES, A.; CUNHA-E-SILVA, N. L.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. **Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of Trypanosoma cruzi, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells.** Journal of Cell Science, v. 118, p. 901-915, 2005.

SANT'ANNA, C.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. **Biogenesis of the reservosomes of Trypanosoma cruzi.** Microscopy and Microanalysis, v. 10, p. 637-646, 2004.

SCHLEDZEWSKI, K.; BRINKMANN, H.; MENDEL, R. R. **Phylogenetic analysis of components of the eukaryotic vesicle transport system reveals a common origin of adaptor protein complexes 1, 2, and 3 and the F subcomplex of the coatamer COPI.** Journal of Molecular Evolution, v. 48, p. 770-778, 1999.

SCHLIWA, M.; SOLDATI, T. **Powering membrane traffic in endocytosis and recycling.** Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v. 7, p. 473-83, jul. 2006.

SHIH, W.; GALLUSSER, A.; KIRCHHAUSEN, T. **A Clathrin-binding site in the hinge of the B2 chain of mammalian AP-2 complexes.** The Journal of Biological Chemistry, v. 270, p. 31083-31090, 1995.

SOARES, M.J. **The reservosome of Trypanosoma cruzi epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 94(1), p. 139-141, 1999

SOARES, M. J.; SOUZA, W. DE. **Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi***. Parasitology Research, v. 77, p. 461-468, 1991.

SOARES, M. J.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. **Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi***. Journal of Cell Science, v. 102, p. 157-167, 1992.

TAZEH, N. N.; SILVERMAN, J. S.; SCHWARTZ, K. J.; SEVOVA, E. S.; SUTTERWALA, S. S.; BANGS, J. D. **Role of AP-1 in developmentally regulated lysosomal trafficking in *Trypanosoma brucei***. Eukaryotic Cell, v. 8, p. 1352-1361, 2009.

TRAUB, L. M.; DOWNS, M. A.; WESTRICH, J. L.; FREMONT, D. H. **Crystal structure of the alpha appendage of AP-2 reveals a recruitment platform for clathrin-coat assembly**. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, v. 96, p. 8907-12, 1999.

TRAUB, L. M.; KORNFELD, S. **The trans-Golgi network: a late secretory sorting station**. Current Opinion in Cell Biology, v. 9, p. 527-533, 1997.

WEISE, F.; SITERHOF, Y. D.; KUHN, C.; WIESE, M.; OVERATH, P. **Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells**. Journal of Cell Science, v. 113, p. 4587-4603, 2000.

ZAREMBA, S. A. M.; KEEN, J. H. **Assembly polypeptides from coated vesicles mediate reassembly of unique clathrin coats separation of clathrin and assembly**. The Journal of Cell Biology, v. 97, p. 1339-1347, 1983.

WHO. Control of Chagas disease. WHO Tech Series vol. 811, Geneva, 1991. p. 1-95.<
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/> > Acessado em: 30/09/2012