

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

JESSICA CHIMENE FERNANDES

ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA AP-1 γ DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E PRODUÇÃO
DE ANTICORPOS POLICLONAIS

CURITIBA

2013

JESSICA CHIMENE FERNANDES

ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA AP-1 γ DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E PRODUÇÃO
DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Trabalho apresentado como requisito para
à disciplina TCC II (Bmed06) no curso de
graduação em Biomedicina, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná.
Orientador: Prof. Dr. Luciano Fernandes Huergo
Co-orientador. Dr. Maurílio José Soares.

TERMO DE APROVAÇÃO

JESSICA CHIMENE FERNANDES

ANÁLISE *IN SILICO* DA PROTEÍNA AP-1 γ DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E PRODUÇÃO
DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Trabalho apresentado como requisito á disciplina TCC II (Bmed006) no Curso de
Graduação em Biomedicina, pela seguinte banca examinadora:

Prof. Doutor Luciano Fernandes Huergo

Orientador - Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal, UFPR.

Dr. Maurílio José Soares

Co-orientador - ICC – Instituto Carlos Chagas/Fiocruz –PR

Mestrando Cassiano Martin Batista

ICC – Instituto Carlos Chagas/Fiocruz –PR

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, que me guia em tudo.

Em segundo lugar, dedico a minha família e amigos que sempre me apoiaram nas decisões e nos momentos difíceis. Dedico também aos que me orientaram neste projeto de forma paciente e generosa. Por fim, agradeço a todos que me acompanharam nesta trajetória.

RESUMO

O presente trabalho tem como objetivos analisar a sequência aminoacídica *in silico* e produzir anticorpos policlonais contra a subunidade gama do complexo adaptador 1 (AP-1 γ) de *Trypanosoma cruzi*, para estudos de expressão e localização subcelular. Primeiramente, foi encontrada uma sequência codificadora para AP-1 γ no banco de dados TritypDB (ID Tc00.1047053508257.260). Esta sequência foi utilizada para alinhamento simples usando o algoritmo *Protein Blast* (Blastp) e demonstrou sua conservação entre os tripanosomatídeos. Para a análise de domínios foi utilizado o software pFAM, que permitiu concluir que o AP-1 γ de *T. cruzi* possui domínios típicos de complexo adaptador 1 (região N-terminal e domínio C-terminal da adaptina), o que sugere a sua função na formação de vesículas com revestimento de clatrina que brotam do complexo de Golgi com direcionamento aos endossomos tardios. Através do alinhamento múltiplo, realizado no programa ClustalW, foi possível identificar maior conservação nas regiões iniciais da sequência aminoacídica do AP-1 γ de *T. cruzi* comparadas a sequências de AP-1 γ de outros organismos. Para a produção de anticorpos policlonais, a região Hinge do AP-1 γ foi clonada, expressa em vetor procarioto e purificada por gel preparativo. A proteína recombinante purificada foi inoculada em camundongos BALB/c para obtenção dos soros imunes. Em formas epimastigotas, os soros imunes foram capazes de reconhecer uma proteína de aproximadamente 90 kDa, com exceção do soro 2, que reconheceu também uma proteína de peso molecular menor. Em tripomastigotas metacíclicos e amastigotas intracelulares, o soro policlonal anti-Hinge também reconheceu um polipeptídeo de 90 kDa. Por imunofluorescência indireta, foi possível observar uma localização subcelular lateral ao cinetoplasto, próximo à bolsa flagelar (compatível com o complexo de Golgi) em epimastigotas, amastigotas intracelulares e amastigotas axênicos e entre o cinetoplasto e o núcleo em tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas de cultura. A co-localização com TcHIP/AC, um marcador de complexo de Golgi em *T. cruzi*, confirmou a localização AP-1 γ nesta organela.

Palavras-Chave: *Trypanosoma cruzi*. Complexo de Golgi. AP-1 γ . Anticorpos policlonais.

ABSTRACT

This work aims to analyze the amino acid sequence *in silico* and produce polyclonal antibodies against the gamma subunit of the adapter complex 1 (AP-1 γ) of *Trypanosoma cruzi*, for studies on expression and subcellular localization. First, we found a coding sequence for AP-1 γ in the database TritypDB (ID Tc00.1047053508257.260). This sequence was used for simple alignment algorithm using the Protein Blast (Blastp), demonstrating its conservation among trypanosomatids. For the analysis of the domains pFAM software was used, allowing to conclude that AP-1 γ *T. cruzi* have typical domains adapter complex 1 (N-terminal and C-terminal domain of adaptina), suggesting its role in the formation of clathrin-coated vesicles budding from the Golgi apparatus with guidance to late endosomes. Through the multiple alignment, performed in ClustalW program, it was possible to identify higher conservation at the initial regions of the aminoacidic sequence of AP-1 γ of *T. cruzi*, compared to the AP-1 γ of other organisms. For the production of polyclonal antibodies, the Hinge region of AP-1 γ gene was cloned, expressed in prokaryotic vector and purified with preparative SDS-PAGE gel. The purified recombinant protein was inoculated into BALB / c mice to obtain the immune sera, which were used to evaluate the expression and subcellular localization of AP-1 γ , first in epimastigotes. The immune sera were able to recognize a protein of approximately 90 kDa, with the exception of serum 2, which also recognized a protein of lower molecular weight. In metacyclics trypomastigotes and intracellular amastigotes, the polyclonal anti-Hinge also recognized a region corresponding to the 90 kDa. By indirect immunofluorescence, we observed a side subcellular localization to the kinetoplast near the flagellar pocket (compatible with the Golgi complex) epimastigotes, intracellular culture amastigotes and axenic amastigotes and between the kinetoplast and nucleus in trypomastigotes and metacyclic trypomastigotes culture. Co-localization with TcHIP/AC, a Golgi marker of *T. cruzi*, confirmed the localization of the AP-1 γ in that organelle.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Golgi complex. AP1- γ . Polyclonal antibodies.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Comparação de identidade e similaridades da sequência de aminoácidos da AP-1 γ em tripanosomatídeos.....	20
---	----

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1. Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com destaque o cinetoplasto (condensamento do DNA mitocondrial).....	10
FIGURA 1.2. Complexos adaptadores AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4. Seta : região Hinge presente no complexo adaptador 1.....	13
FIGURA 4.1 – Sequência nucleotídica do gene do Complexo Adaptador 1, subunidade gama (AP-1 γ) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
FIGURA 4.2. - Sequência aminoacídica do produto do gene do Complexo Adaptador 1, subunidade gama (AP-1 γ) de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
FIGURA 4.3. – Domínios N-terminal e C-terminal da adaptina encontrados na sequência do AP-1 γ de <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
FIGURA 4.4. – Alinhamento múltiplo de sequências randômicas codificadoras para a subunidade gama do complexo adaptador 1 de diferentes organismos, demonstrando regiões de conservação.....	22
FIGURA 4.5. – Produção de anticorpo policlonal contra a região Hinge de AP1- γ de <i>Trypanosoma cruzi</i> por <i>western blot</i>	26
FIGURA 4.6. – Produção de anticorpo policlonal contra a região Hinge de AP-1 γ de <i>Trypanosoma cruzi</i> em teste de imunofluorescência indireta para formas epimastigotas.....	27
FIGURA 4.7. – Expressão de AP-1 γ em diferentes formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i> incubadas com soro policlonal anti Hinge e normalização com TcActina.....	29
FIGURA 4.8. – Localização subcelular de AP-1 γ de <i>Trypanosoma cruzi</i> em diferentes formas evolutivas do parasito.....	29

SUMÁRIO

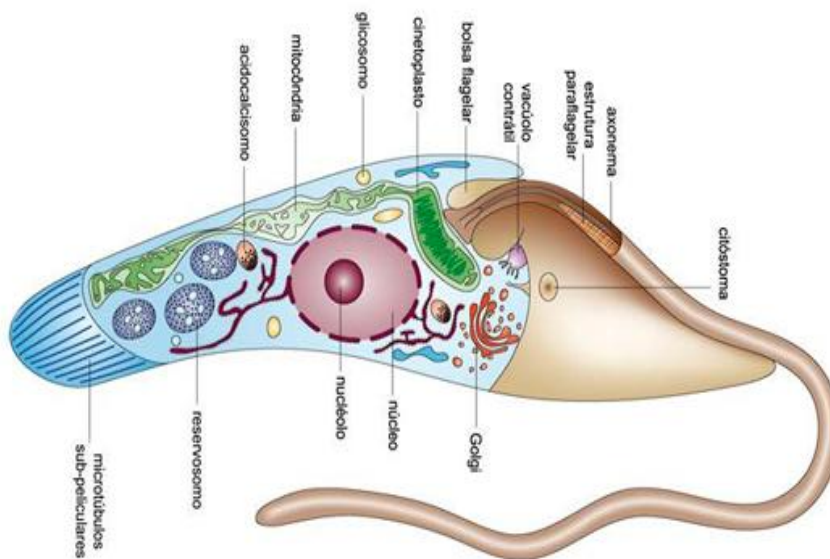
1 INTRODUÇÃO.....	10
1.1 <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	10
1.2 DOENÇA DE CHAGAS.....	11
1.3 FISILOGIA DO PARASITO.....	11
1.4 REVESTIMENTO DE CLATRINA, COMPLEXOS ADAPTADORES E A PROTEÍNA AP-1 γ	12
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 OBJETIVO GERAL.....	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	16
3.1 PARASITAS.....	16
3.2 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	16
3.3 CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO.....	17
3.4 IMUNIZAÇÃO E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS.....	17
3.5 EXPRESSÃO DE AP1- γ EM FORMAS EPIMATIGOTAS DE <i>T. CRUZI</i>	17
3.6 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE AP1- γ EM DIFERENTES FORMAS DE <i>T. CRUZI</i>	18
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	19
4.1 ANÁLISE <i>IN SILICO</i> DA SEQUENCIA CODIFICADORA PARA AP1- γ	19
4.2 OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL ANTI-HINGE PURIFICADA RECOMBINANTE DE <i>T. CRUZI</i>	25
4.3 EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE AP-1 γ EM DIFERENTES FASES DO CICLO DE VIDA DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	28
5 CONCLUSÕES.....	31
6 PERSPECTIVAS.....	32
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	33

1. INTRODUÇÃO

1.1. *TRYPANOSOMA CRUZI*

O *Trypanosoma cruzi* (Euglenozoa: Kinetoplastea) é um protozoário hemoflagelado causador da tripanosomíase americana também conhecida como doença de Chagas, atingindo 10 a 12 milhões de indivíduos nas Américas (Coura e Dias, 2009). Os vetores deste protozoário são triatomíneos que ao praticarem hematofagia infectam o homem, eliminando suas fezes próximo a região da picada e o hospedeiro ao coçar no local carrega o agente causador da doença para a corrente sanguínea. O *T. cruzi* possui diferentes formas evolutivas, sendo elas basicamente: epimastigotas (Fig.1.1) e tripomastigotas metacíclicas (presente no inseto vetor), amastigota (intracelular no hospedeiro vertebrado) e tripomastigota sanguínea (parasita presente na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero). Quando se alimentam do sangue de mamíferos infectados os triatomíneos podem ingerir formas tripomastigotas (Sarmiento, 2008).

FIGURA 1.1. Formas epimastigotas de *T. cruzi* com destaque o cinetoplasto (condensamento do DNA mitocôndrial).



1.2. DOENÇA DE CHAGAS

Grande parte dos indivíduos infectados estão presentes no Brasil. (Argolo et al., 2008). A doença de Chagas possui as fases aguda e crônica, podendo ocorrer na fase aguda inflamação do coração com alterações do eletrocardiograma e número de batimentos por minuto aumentado ou até mesmo meningite e encefalites em casos mais graves (Sarmiento, 2008). Em alguns casos, na fase crônica o coração aparece bastante comprometido podendo apresentar arritmias, perda da capacidade de contração e aumento do órgão assim como ocorre também no esôfago e intestino grosso (Argolo et al., 2008). Para o tratamento, o único fármaco disponível no Brasil é o benzonidazol (Rochagan®), com limitada eficácia, resistência pelos parasitos e significativos efeitos colaterais (Urbina e Docampo, 2003).

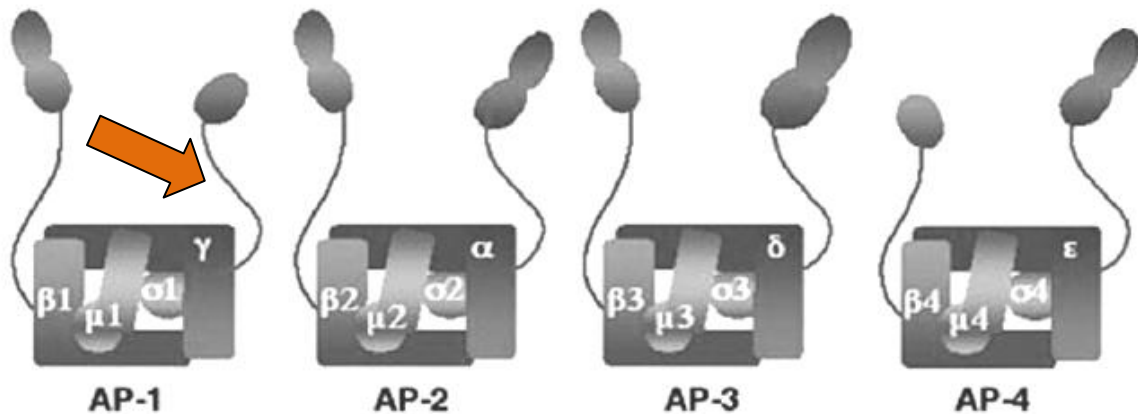
1.3. FISILOGIA DO PARASITO

Entre diferentes alvos para estudos, estão a captação (endocitose) e o *turnover* de proteínas, pois representam vias metabólicas essenciais para o desenvolvimento de *T. cruzi* (De Souza, 2002) e apresenta particularidades marcantes nos tripanosomatídeos (Sant'Anna et al, 2008). Em contraste à maioria dos eucariontes, os tripanosomatídeos apresentam sistemas altamente polarizados de endocitose, restritos à região da bolsa flagelar e, particularmente em *T. cruzi*, do complexo citóstoma/citofaringe, além do envolvimento de organelas distintas, como os reservossomos, por exemplo (Soares, 1999). Dessa forma, nutrientes do meio extracelular são endocitados e seguem por uma complexa rede de compartimentos que tem como destino final os reservossomos (Soares M.J, et al 1992) onde enzimas provenientes da rede *trans*-Golgi atuarão na digestão das moléculas (Sant'Anna et al, 2009). Tanto moléculas da via endocítica quanto exocítica são carregadas em vesículas, as quais podem apresentar uma complexa rede de revestimento composta por proteínas que auxiliam na captação, sinalização, transporte e destino final do cargo.

1.4. REVESTIMENTO DE CLATRINA, COMPLEXOS ADAPTADORES E A PROTEÍNA AP-1 γ

Entre as proteínas que compõem o revestimento destas vesículas estão as proteínas do Complexo Adaptador. Até o momento foram identificados quatro complexos adaptadores (AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4) (Fig. 1.2), cada um deles atuando na formação de vesículas em diferentes locais dentro da célula. O complexo AP-1, alvo do presente estudo, é encontrado em vesículas com revestimento de clatrina na rede *trans*-Golgi, que tem a função de distribuir vesículas contendo glicoconjugados tanto para o exterior da célula quanto para a membrana ou para os endossomos tardios/ lisossomos (Traub e Kornfeld, 1997). Em relação ao complexo AP-1 ainda não estão totalmente esclarecidos vários aspectos a respeito de sua função, formação de revestimento e envolvimento com outros elementos que integram essa complexa rede de interações, sobretudo em tripanosomatídeos. Nos poucos trabalhos existentes sobre clatrina e complexos adaptadores em tripanosomatídeos, destaca-se a relevância destas proteínas na infectividade e na viabilidade dos parasitas (Allen et al., 2003, Gokool, 2003, Tazeh et al., 2009). O AP-1 γ é um heterotetrâmero contendo duas subunidades maiores (γ e β) que se ligam à clatrina, uma subunidade média (μ) e uma subunidade pequena (σ). A subunidade γ é característica do complexo adaptador 1 e contém a região Hinge, que é exposta em forma de pescoço. Neste contexto, o estudo da biologia celular deste protozoário pode auxiliar no estabelecimento de alvos intracelulares ou ao desenvolvimento de meios eficazes de combate a este parasito (Wilkinson e Kelly, 2009).

FIGURA 1.2. Complexos adaptadores AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4. Seta : região Hinge presente no complexo adaptador 1.



Adaptado de: ALB, 2011).

Dessa forma, o presente trabalho faz parte de um projeto maior que visa à busca de marcadores celulares, baseada na produção de anticorpos específicos contra proteínas do *T. cruzi*, para posterior estudo de eventos biológicos em tripanosomatídeos. Neste sentido, neste trabalho será realizado: 1) Análise *in silico* da sequência aminoacídica da subunidade gama do complexo adaptador 1 (AP-1 γ) de *T. cruzi*, afim de estabelecer o seu nível de conservação com outros organismos, bem como caracterizar os seus domínios; 2) Obtenção de anticorpos policlonais contra a região Hinge do AP-1 γ , afim de verificar a expressão e a localização subcelular em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*. A região Hinge foi escolhida como alvo do trabalho por estar exposta e permitir que os anticorpos a reconheçam com maior facilidade.

Resultados da análise *in silico* do AP-1 γ demonstraram que sua sequência nucleotídica possui 2402 pares de base e codifica par uma sequência aminoacídica com peso molecular de 89,14 kDa. Esta região possui identidade e similaridade com outros tripanosomatídeos e possuem domínios típicos de complexo adaptador 1 (região N-terminal e domínio C-terminal da adaptina). Com o alinhamento múltiplo foi possível

observar conservação na região inicial da proteína, com outros organismos, diferente da porção final. A imunização dos camundongos se mostrou eficaz visto que os anticorpos policlonais reconheceram uma proteína de aproximadamente 90 kDa (normalização com TcActina) , que é compatível com o peso molecular teórico de AP-1 γ de *T. cruzi* e a localização subcelular lateral ao cinetoplasto, próxima à bolsa flagelar, compatível com o complexo de Golgi em diferentes formas evolutivas do parasito. Foi realizada a co-localização com a proteína TcHIP/AC, confirmando a presença do AP-1 γ no complexo de Golgi de *T. cruzi*.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Caracterizar *in silico* a sequência aminoacídica do AP1- γ de *T. cruzi* e produzir anticorpos policlonais para estudos de expressão e localização subcelular.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a busca da sequência codificadora para AP-1 γ ;
- Realizar alinhamento simples e múltiplo utilizando a sequência codificadora para AP-1 γ ;
- Realizar análise dos domínios da sequência codificadora para AP-1 γ ;
- Obter soro policlonal murino anti- Hinge do AP-1 γ recombinante de *T. cruzi*;
- Avaliar a expressão e a localização intracelular de AP-1 γ em diferentes formas de *T. cruzi*.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. PARASITAS

Neste estudo será utilizado o clone Dm28c de *T. cruzi*. Epimastigotas serão mantidos através de repiques semanais em meio LIT (do inglês *Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% SFB (soro fetal bovino).

Tripomastigotas metacíclicos serão obtidos através de metaciclologênese *in vitro* (diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos *in vitro*) (Contreras et al., 1985).

Formas tripomastigotas de cultura e amastigotas intracelulares serão obtidas através de cultivo celular após infecção com células Vero (ATCC CCL-81).

Amastigotas axênicos serão obtidos por amastigogênese secundária *in vitro* (diferenciação de tripomastigotas de cultura para amastigotas *in vitro*) (Hernández-Osorio et al., 2010).

3.2 ANÁLISE *IN SILICO*

A busca da sequência codificadora para AP-1 γ será realizada no banco de dados TritypDB. O alinhamento simples da sequência aminoacídica de AP-1 γ será realizado através do algoritmo *Protein Blast* (Blastp, NCBI, Bethesda, MD, USA), a fim de verificar dados de identidade e similaridade desta proteína em outros seres vivos. Para o alinhamento múltiplo, sequências randômicas codificadoras para AP-1 γ de vários organismos serão alinhados utilizando o algoritmo ClustalW (EMBL, Heildeberg, Alemanha) sendo os números de acesso: NP_572527.2 (*Drosophila melanogaster*), P22892.3 (*Mus musculus*), EET02217.1 (*Giardia intestinalis*), CBH10349.1 (*Trypanosoma brucei*), XP_003878959.1 (*Leishmania mexicana*), 1704251A (*Bos taurus*), BAA33389.1 (*Homo sapiens*), XP_818958.1 (*Trypanosoma cruzi*). Para a análise dos domínios da proteína AP-1 γ será utilizado o *software* pFAM (Sanger Institute, Cambridge, Inglaterra).

3.3. CLONAGEM, EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO

O segmento do gene que codifica para a região Hinge do AP-1 γ será amplificado por PCR, utilizando oligonucleotídeos específicos contendo os sítios de recombinação para o vetor de entrada pDONR 221® (Gateway, Invitrogen), o qual será amplificado em células DH5- α . Após a minipreparação, o plasmídeo será recombinado com o vetor de expressão pDEST17® e inserido em células BL21. Esse vetor expressa as proteínas recombinantes na presença de Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosida (IPTG) e insere uma cauda de histidina ao final da sequência protéica. As proteínas recombinantes serão purificadas por gel preparativo, para posterior imunização.

3.4. IMUNIZAÇÃO E OBTENÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS

Camundongos Balb/c serão imunizados semanalmente via i.p. com a proteína purificada durante 5 semanas. Três dias após a última inoculação, o soro será analisado por *western blot* (WB) contra a proteína recombinante e extrato total de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os procedimentos de imunização murina serão realizados de acordo com o protocolo aprovado pela CEUA-Fiocruz (Protocolo P-47/12-3 com licença número LW-15/13).

3.5. EXPRESSÃO DE AP-1 γ EM DIFERENTES FORMAS EVOLUTIVAS *T. CRUZI*

A expressão de AP-1 γ em *T. cruzi* será avaliada através de *western blot* (WB), conforme descrito por Ausubel et al., 1994. Brevemente, formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas intracelulares e células Vero serão submetidos a extração de proteínas. Para o WB, o extrato protéico (15 μ g/canaleta) será submetido à eletroforese em gel de poliacrilamida 10% (SDS-PAGE), seguido da transferência para membrana de nitrocelulose. Os anticorpos policlonais (diluídos 1:200) produzidos contra AP-1 γ serão incubados durante uma hora com a membrana e a revelação será realizada através de anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina. Como controle, será

utilizado o soro dos animais coletado antes da primeira imunização (soro pré-imune). Será feita uma normalização utilizando anticorpo anti-TcActina (diluídos 1:200).

3.6 LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE AP-1 γ EM DIFERENTES FORMAS DE *T. CRUZI*

Para os ensaios de imunolocalização, formas epimastigotas, tripomastigotas de cultura, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas intracelulares e amastigotas axênicos de *T. cruzi* serão lavados em PBS (1.000 g/10 minutos), fixadas por 30 minutos em paraformaldeído 4% e aderidas em lâminas recobertas com poli-L-lisina. Após 5 minutos de permeabilização com Triton X-100 a 0,5%, as lâminas serão utilizadas para os ensaios de imunofluorescência indireta (IFI), utilizando os anticorpos policlonais e o soro pré-imune, conforme descrito por Batista et al., 2013. A análise será realizada em microscópio de epifluorescência Nikon Eclipse E600 (Nikon Instruments, Tokyo, Japão).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANALISE *IN SILICO* DA SEQUÊNCIA CODIFICADORA PARA AP-1 γ :

Através da busca pela proteína AP-1 γ do complexo adaptador de *T. cruzi*, no banco de dados TritypDB foi encontrada a sequência de nucleotídeos e de aminoácidos (ID Tc00.1047053508257.260). A sequência de nucleotídeos localiza-se entre os pares de base 195.505 e 193.103 do cromossomo 34 do parasita, contendo 2402 pb (Fig. 4.1), codificando para uma proteína de 89,14 KDa (Fig 4.2).

FIGURA 4.1 – Sequência nucleotídica do gene do Complexo Adaptador 1, subunidade gama (AP-1 γ) de *Trypanosoma cruzi*.

```

ATGGAGGGGAAACTTGAGTCGATGAGCACTGCGAGACTTCGTGACTTGATCGTTGCCGTG
CGACGGTGCCCGCACCTCCGCGGAGGAGAGAGCGCTCATCAAACGGGAGTGCCCCATCATT
CGCGAGTCATTCCGGGAGAGCAGAGCGTCACTTCGCACACGCAACATGCTGAAGTTGCTG
TACATCACCATGCTTGGCTATCCGACGGAGTTTGGACAGGTGGAGGTGGTGAATCTTCTC
GCTCAGACCCGAATACGCCGGCAACCGCTCGGCTACCTCACACTGCAGATGATCCTTGAT
GAAAATGACGAGGTCTCACATTGTCTGAGAATCACATAAAAAAGGATTTAGCGCACGAG
AAGCCCCTCATTCAATCTATGGCATTGAACGCGGTGGCAAAATATTGCGAGTGAGGTGATG
GCACGTGACATGCTGGATGAAATAAGCCGGCTGGCACTCTCTTCAAACACGTACCTGGCA
AAGAAAGCATGCTTGGCGGCAATTAGGATTGTACGAAAAGTACCAGAGTATGCCGAGGTG
TTTTTGGAGTTGTTTACAAGCTTGTATTGATCACAGTCCGGCGGAGATGCTTTCGGCG
GTCACGCTTGTGAATGAATGCTTGGGTTGCCACAGGGAGAGCCATTTCTTCCAAATAC
CGTGTGATGGCTAATGCTGCTGTTCCGCTACTGAAACAGTTAGTCTTATCATCGCGTGTG
ACGGACCAGGATGTTCTTGGGGTACGGATCCATTTCTCAGGTGAAGATTCTGGAGTTT
ATCGGAATTATTGGCAAAGGCAGCGCCGTTACCTCCGAGGCGTTGAACGACGTGTTGGCG
CAGGTTCTACCAACACGGACGCTACTCGCAACGTGCGTTGCTCCATTAGTACGAATGC
GTGAAAACGATTTACGCCATCGAGGGTACGAGGGACTTCGTACGTTAGGAATCAACACC
ATCAGCCGTTTTCTGCTCGTCAACGATAACAATCAGCGTTTTGTGGCGCTACAGTCACTT
CTGGACTACGCTTCCCGCATGACAGATGCGGTTGCTGAGCATCAGGACATTATTTTGGAT
TGCTTAAAGATGTGGATATCTCAATTCGTGACGTGCACCTTGATCTGACGGTGGCGCTT
GTCACGTGAAAACAATCTGCGTTTTGTTGGTTCCGGACTTGGTTTTCTACCTGACCATTCT
ACGGAGGAGATGCGGGAGGATGTGACCCTTCATTTATGCCGATTATAGAGAACAATCC
CCCAGTACGGAGTGGCGGTGGAGTATTCGCTACGGGTTTTGCGATTAGCGAAGCGGTTT
GCCCTGTGGAATTCGCCACTCGTCTTATAACTCTGCTCTCGAATGAATCTACGGAAATA
CAAACCTCGGCGGTTGTCTCCATGTGGGATGAGGCTTCTACCCATTTGATGCTCTTCAT
CAATCTCGCAAGGCATTTCTTGGCGGGCGTGTGGGGCATCGGTGAATACGTTGATCTT
TTGCTTGACGCAAAGGAATCCAGCCTGAGGATGTAGCGAAATGCGTTGCCGAAATCAGG
ACTAACACTGTATCAACATAATCAAATGTTATGGCCTTACTTCGCTTATGAAAATCGCC
TCCAGGTATCCGTGAGCGAAGCCAGTTGTTCTCCCGTACTTCCAACTACACCACAAGC
TTGGATTGCGAACTGCAGCAAAGGGCATGTGAGTACATGACACTGTTGGAATCTTTTGTG
GAGGAAGCGGCCTTTGTTTTTCTGAATGCGCCAATTTGTACAGTGAAGAGGATGTT
GAGGTGCAACCGGTGCTCAGGTGAATCTTCCACCCGAGTTTTTGCAGCAAAGGCAGCC
GTTGCCCTGGAAGATTTATTTGAAGTGAATTCCAAACCGATTGTGATGACACATCCTGTG
GAGAACAAAAATAGGGACAACGAAAACAACGTTGTAGCCATAGATGATCTTTTTGGGTTA
AAAACGGATGCCTCTTGAATACCGCCCTCTGCCACTCCATCGGGAGCTGCCACTTCT
GCTGAAATGGAGCCTGCGAAACCTCCTCCTGAAGTGCATGTGTTGATTGTGATGATTC
ACTGTGAGTGTGACGGCGTGGTGCAGGGAGCCATCAACGCAAATATAATTGTTTTTCA
CGACTTCTACCGCATGGAGAACCTCTCCATCCAGGCAGCGGTGCCAAAGACATCGATG
CTGAATATTGGCTTCTGACGCTACGGTGTATCCCCCTTATGGGGCATTGTTCCAGCAG
CTTATTGTCGACAACCTCCAATAGCAACAAGAACCTCGCCTTCTGACACTTGTGTGAAG
CTACTCTACACAGTTGACGGGGCTCCACGCTCGCAGATGTTTCCAGGTGACGCAGGAGTTG
TAA

```

FIGURA 4.2. - Sequência aminoacídica do produto do gene do Complexo Adaptador 1, subunidade gama (AP-1 γ) de *Trypanosoma cruzi*.

```
MEGKLESMSTARLRDLIVAVRRCRTSAEERALIKRECAI IRESFRESRASLRTRNMLKLL
YITMLGYPTEFGQVEVVSLLAQTEYAGKRVGYLTLMILDENDEVLTLSENHIKKDLAHE
KPLIQSMALNAVANIASEVMARDMLDEI SRLALSSNTYLAKKACLAAIRIVRKVPEYAEV
FLELFTSLFIDHSPAEMLSAVTLVNECLRLPQGEPPFLSKYRVMANAAVRVLKQLVLSRV
TDQDVLGVTDPPFLQVKILEFMRIIGKGSAVTSEALNDVLAQVLTNTDATRNVGCSIQYEC
VKTIIYAIEGDEGLRTLGINITISRFLSSNDNNQRFVALQSLDYASRDADAVREHQDIILD
CLKDVDISIRRRALDLTVALVTENNRLLLVLPDLVSYLTISTEEMREDVTLHLCRIIENKS
PSTEWRVEYSRLVRLAKRFAPVEFATRLITLLSNESTEIQTSAVVSMWDEASYPFDALH
QSRKAFVAAVWGIGEYVDLLLDKAGIQPEDVAKCVAEITNTVFNIIKCYGLTSLMKIA
SRYPsAKPVVLPVLSNYTTSLDCELQQRACEYMTLLESFVEEAAFCFSRMPPICHVEEDV
EVQVPVQVNLPPPEFLQQAVALLEDLFEVNSKPIVMTHPVENKNRDNENNVVAIDDLFGL
KTDASSNTAPLPTPSGAATSAEMEPKPPPEVHVFDCCDFTVSVSGVVQGANANIIVFS
RLPTAMENLSIQAAVPKTSMLNIGFLTSTVIPPYGRIVQQLIVDNSNSKNPRLLTLRVK
LLYTVDGAQRSQMFQVTQEL
```

A sequência de aminoácidos do AP-1 γ foi submetida a um alinhamento simples no programa Blastp para comparar a identidade e a similaridade desta proteína com proteínas de outros organismos a fim de verificar o seu grau de conservação. A identidade variou de 100% em *Trypanosoma cruzi* a 50% em *Leishmania mexicana* (Tab.1). Já a similaridade variou de 67 em *Leishmania mexicana* a 100% em *Trypanosoma cruzi* (Tab.1). Esses resultados demonstram que a sequência de aminoácidos do AP-1 γ é conservada entre os tripanosomatídeos.

TABELA 1. Comparação de identidade e similaridades da sequência de aminoácidos da AP-1 γ em tripanosomatídeos.

IDENTIFICAÇÃO		Nº de Acesso	IDENTIDADE (%)	SIMILARIDADE (%)
1)	gamma-adaptin (<i>Trypanosoma cruzi</i> strain CL Brener)	1 XP_818958.1	100	100
2)	gamma-adaptin (<i>Trypanosoma cruzi</i>)	1 EKG05218.1	98	99
3)	gamma-adaptin (<i>Trypanosoma marinkellei</i>)	1 EKF33645.1	96	97

4)	AP-1 complex subunit gamma (<i>Trypanosoma grayi</i>)	AGH62050.1	74	83
5)	AP-1 adapter complex gamma subunit (<i>Trypanosoma brucei gambiense</i> DAL972)	CBH10349.1	61	75
6)	gamma-adaptin 1 (<i>Trypanosoma brucei brucei</i> strain 927/4 GUTat10.1)	XP_844226.1	61	75
7)	adaptor gamma-1 (<i>Trypanosoma brucei</i>)	AAL85341.1 AF478690_1	60	74
8)	AP-1 adapter complex gamma subunit (<i>Trypanosoma vivax</i> Y486)	CCC47383.1	60	73
9)	unnamed protein product, partial (<i>Trypanosoma congolense</i> IL3000)	CCC89955.1	63	78
10)	putative adaptor gamma-1 chain (<i>Leishmania mexicana</i>)	XP_003878959.1	50	67

Através do programa pFAM é possível obter informações importantes sobre os domínios das proteínas, pois este software faz uma busca comparando a sequência aminoacídica de interesse com sequências de proteínas cujos domínios estão estabelecidos. Esta busca foi realizada com a sequência de aminoácidos do AP-1 γ (Fig. 4.3). Foi possível identificar dois domínios, sendo eles a região N terminal da adaptina (início no resíduo 29 e término no resíduo 579) e o domínio C terminal da adaptina (início no resíduo 690 e término no resíduo 799). O domínio N terminal consiste em diversas subunidades alfa, beta e gama dos complexos adaptadores AP-1, AP-2 e AP-3 que estão envolvidos na formação de vesículas revestidas por clatrina. Esta região é constante quando comparada com a região C terminal que varia entre os membros do AP-2. Tem sido proposto que esta região conservada interage com outro componente uniforme das vesículas revestidas. O domínio C terminal da adaptina é um heterotetrâmero que regula a formação de revestimento de clatrina. O apêndice no terminal carboxila da subunidade

alfa regula a translocação de proteínas acessórias endocíticas para o local de revestimento. Este domínio às vezes é encontrado em alfa, beta e gama adaptina (Fonte: <http://pfam.sanger.ac.uk/>).

FIGURA 4.3. – Domínios N-terminal e C-terminal da adaptina encontrados na sequência do AP-1 γ de *Trypanosoma cruzi*.



O alinhamento múltiplo da sequência aminoacídica da proteína AP-1 γ foi realizado através do programa ClustalW, que compara a sequência de aminoácidos de diversos organismos distintos. Este alinhamento mostrou que a porção inicial (N terminal) da proteína possui conservação com outros organismos e que a porção final (C terminal) se manteve distinta entre eles (Fig. 4.4). Estes dados demonstram que esta proteína possui sequências características em *T. cruzi*, podendo ser um alvo para a busca de terapias alternativas para a doença de Chagas.

FIGURA 4.4. – Alinhamento múltiplo de sequências randômicas codificadoras para a subunidade gama do complexo adaptador 1 de diferentes organismos, demonstrando regiões de conservação, (*) aminoácidos conservados, (:) aminoácidos muito semelhantes, (.) aminoácidos semelhantes. Nota-se que a porção C terminal possui menor conservação entre as espécies analisadas.

```

M. musculus -----MPAPIRLRELIRTIPTARTDAEEPEMIQKECA 32
B. taurus -----MPAPIRLRELIRTIPTARTDAEEPEMIQKECA 32
H. sapiens -----MPAPIRLRELIRTIPTARTDAEEPEMIQKECA 32
D. melanogaster MNSEHGFPNPAFNMATIRQAFTEAVERVRMPTPTRLRDLIRQIRAARTAAEERAVVNKECA 60
T. brucei -----MNSQKIRELISAVROCKTSSSEERALISKECA 31
T. cruzi -----MEGKLESMSTARLRLDILIVAVRRCRTSAEERALIKRECA 38
L. mexicana -----MSSMDSMRLQATIRLIRQCKTSEEERSNVKIITA 34
G. intestinalis -----MDLSNFIIRRVRTSRTSTQMPREIETEIA 28
          * * : * : * : * : *

M. musculus AIRSSFREEDNTYRCRNVAKLLYMHLGYPAHFGQLECLKLIASQK-FTDKRIGYLGAML 91
B. taurus AIRSSFREEDNTYRCRNVAKLLYMHLGYPAHFGQLECLKLIASQK-FTDKRIGYLGAML 91
H. sapiens AIRSSFREEDNTYRCRNVAKLLYMHLGYPAHFGQLECLKLIASQK-FTDKRIGYLGAML 91
D. melanogaster YIRSTFREEDSVMRCRNIAKLLYIHMLGYPAHFGQLECLKLIASQK-FTDKRIGYLGAML 119
T. brucei IIRSFREGSKPHVTRNMLKLLYISMLGYPTEFGQVEVVSLLAQSD-YAGKRVGYLTIQM 90
T. cruzi IIRSFRESRASLRNMLKLLYITMLGYPTEFGQVEVVSLLAQTE-YAGKRVGYLTIQM 97
L. mexicana QLRKGFTEAKPYIRVRYMLMLLYIRMLGYPTEFAHMEVLKLLSQTD-FSGIRVGYLALQL 93
G. intestinalis NIRAECLKPNADLAEALVAKMTCALHVGFWVSWGYVHICTLCSVAKTHAEKRIAYLALTL 88
          : * : . : : * : . . . . * : . : * : * * :

M. musculus LLEERQDVHLLMTN-----CIKNDLNHS---TQFVQGLALCTLGCMGSSSEMRDLA 139
B. taurus LLEERQDVHLLMTN-----CIKNDLNHS---TQFVQGLALCTLGCMGSSSEMRDLA 139
H. sapiens LLEERQDVHLLMTN-----CIKNDLNHS---TQFVQGLALCTLGCMGSSSEMRDLA 139
D. melanogaster LLEERQDVHLLMTN-----CLKNDLNSS---TQFVQGLALCTLGAIASPEMARDLA 167
T. brucei VLGENDVLTLSSEN-----HIKIDLGS---QPLQSMALNVAANIASEPMSRDMF 138
T. cruzi ILLENDVLTLSSEN-----HIKDLAHE---KPLIQSMALNAVAANIASEVMARDML 145
L. mexicana LFSSEDEVLTLSVENRMIAHLSLAGSRRGISYE---QLCLIGISLNAANIASEDMCRDLL 150
G. intestinalis NYAETQLFNLLTN-----ALAKDLVEDNVSTHYKVSALNTICTICSKEAPVFS 139
          * : : * * * .. : * : * : * :

M. musculus GEVEKLLKT-SNSYLRRKKAALCAVHVIRKVPPELMEFPLPATKNLLNEKNHGVLTSSVLL 198
B. taurus GEVEKLLKT-SNSYLRRKKAALCAVHVIRKVPPELMEFPLPATKNLLNEKNHGVLTSSVLL 198
H. sapiens GEVEKLLKT-SNSYLRRKKAALCAVHVIRKVPPELMEFPLPATKNLLNEKNHGVLTSSVLL 198
D. melanogaster SEVERLMKS-PNTYIRKKAATLCAFRVIRKVPPELMEIFLPATRSLLSEKMHGILITGVTLI 226
T. brucei DDILRFLAC-PDPYIAKKACLAARIRIKKVPDYAEVFLQECTNVFHENNQAVLLCKLTLV 197
T. cruzi DEISRLALS-SNTYLAKKACLAAIRIVKVPPEYAEVFLFTSLFIDHSPAEMLSAVTLV 204
L. mexicana DSILHLFKN-SPQQLRSKAALAAALRVVRKAPDQAGYILEHCTDLFDG-NTE SVMCVLTLV 208
G. intestinalis TQVYGLISSGSSVYLRKKAINAACAILQACPDLSPRFLDVCASLSDKAHSVVLGCELG 199
          . : * . : * * * : : * : * : * :

M. musculus TEMCERS--PDMLAHFRKLVLPQLVRILKMLINSGYSPEHDVSGISDPFLQVRIIRLLR-- 254
B. taurus TEMCERS--PDMLAHFRKLVLPQLVRILKMLINSGYSPEHDVSGISDPFLQVRIIRLLR-- 254
H. sapiens TEMCERS--PDMLAHFRKLVLPQLVRILKMLINSGYSPEHDVSGISDPFLQVRIIRLLR-- 254
D. melanogaster TEMCENS--SDTLMHFKKIVPNLVRILKMLILGGYSPEHDVSGVSDPFLQVKILRLLR-- 282
T. brucei NECLLQSDVEEHLKKYRLATNGAVRLLKQLVLSRVTAQDIGVADPFLQIKLLQFMK-- 255
T. cruzi NECLRLPQGE PFLSKYRVMANAAVRVLLKQLVLSRVTDQDVLGVD PFLQVKILEFMR-- 262
L. mexicana IECLQIDSGAKMIGAFRKHAMSAVRALKALVLSRITDEDVMGITD PFLQVKLLHFMR-- 266
G. intestinalis LIILDTS--EELIHKLASKIYHLLKVLNKLCAVITTFPDHNVGGFDPLLQAIIRFLSRA 257
          : : * * . . . : * * * : * :

```

M. musculus ILGRNDDDSSEAMN-----DILAQVATNTETSKNVGNAILLYETVLTIMDIK- 300
B. taurus ILGRNDDDSSEAMN-----DILAQVATNTETSKNVGNAILLYETVLTIMDIK- 300
H. sapiens ILGRNDDDSSEAMN-----DILAQVATNTETSKNVGNAILLYETVLTIMDIK- 300
D. melanogaster ILGHNDPDASEAMN-----DILAQVATNTETSKNVGNAILLYETVLSIMDIR- 328
T. brucei IVGKGSPPVSETIN-----DVLAQVLTNTDGSITKAGSAVQYECVKTIYAVE- 301
T. cruzi IIGKGSAVTSEALN-----DVLAQVLTNTDATRNVGCSIQYECVKTIYAIIE- 308
L. mexicana IIGADSDVTSEALN-----DVLAQVITNTDATRNVGCAVLYECVRTINAIE- 312
G. intestinalis IKAAFSCNCTTFLTTLPSLRRYFLSVFSSILEKCSSTIVSRNIGLSICAQVFTLSEIPD 317
* . . : : : : * : : * : : . . : :

M. musculus -----SESGLRVLA INILGRFL LNM---DKNIRYVALTSL LKTVQTDHNA 342
B. taurus -----SESGLRVLA INILGRFL LNM---DKNIRYVALTSL LKTVQTDHNA 342
H. sapiens -----SESGLRVLA INILGRFL LNM---DKNIRYVALTSL LKTVQTDHNA 342
D. melanogaster -----SEGGLRVLA VNILGRFL LNS---DKNIRYVALTSL LRTVHADTSA 370
T. brucei -----SDEALRSLGVSTIGRFL ASN---DNNLRFVALQSL LDYAARDAEA 343
T. cruzi -----GDEGLRTLGINTISRFL SSM---DNNQRFVALQSL LDYASRDADA 350
L. mexicana -----SDEGLRTL AINTISRFL ASVK---DNNLRFVGLQTL LMYSSKDFDA 355
G. intestinalis QFFFDTTMXLSKAIPEEEALVELVMSFMRILL EAVTDYSDLLSCTALEALTSFVRHKKQT 377
: . * : : : : * . . . * : :

M. musculus VQRHRSTIV---DCLKDLVSIKRRAMEL SFALVNGNIRGMMKELLYFLD--SCEPEF 396
B. taurus VQRHRSTIV---DCLKDLVSIKRRAMEL SFALVNGNIRGMMKELLYFLD--SCEPEF 396
H. sapiens VQRHRSTIV---DCLKDLVSIKRRAMEL SFALVNGNIRGMMKELLYFLD--SCEPEF 396
D. melanogaster VQRHRTTIL---ECLKDPVSIKRRAMEL SFALINAQNI RTHIKELLLFLE--KADAEF 424
T. brucei VRGHQDIIL---DCLKADVSIKRRALDL TVALIDETNVRLLVPDLLTYLT--VCSDEM 397
T. cruzi VREHQDIIL---DCLKQVDVSIKRRALDL TVALVTENNLRLVPDLVSYLT--ISTEEM 404
L. mexicana VVQHQAIIVL---ECLRDADLSIKRRALDL TVALITVNNVRLVPDLIAYMS--LCSEEM 409
G. intestinalis VGLSDTKFRKFSQLLKRQNPATKRRALDL LLLLVHKKDIRSYISDLFAYIEKDSAVKLT 437
* . . : : * : : * : : * : : * : : * : :

M. musculus KADCASGIFLAAEKYAPSKRWHIDTIMRVLT TAGSYVRDDAVPNLIQLITNS---VENHA 453
B. taurus KADCASGIFLAAEKYAPSKRWHIDTIMRVLT TAGSYVRDDAVPNLIQLITNS---VENHA 453
H. sapiens KADCASGIFLAAEKYAPSKRWHIDTIMRVLT TAGSYVRDDAVPNLIQLITNS---VENHA 453
D. melanogaster KAQCSSGHILAAERYSPTRWHLDTQLSVLIAAGNYVRDDVVSSTIQLVSSP--VPEQT 482
T. brucei REEVVRHLCLIETKAPNAEWRVELSLRLLRGRQHVS VGFATRLLIGLLTNET--VELQT 455
T. cruzi REDVTLHLCRIIENKSPSTEWRVEYSRLVRLRAKRFAPVEFATRLITLLSNES--TEIQT 462
L. mexicana KGDVARHICSVIETHYPSDIWRIDYSIRFLKVAQFAPLDFARRLLVVLSSQT--KDVQT 467
G. intestinalis RVDFSNSIRDIVLLSVLSPAEGFDYLLRLLILLVEKGSNDALTHAIITTSRDPDTAADKK 497
: : : : . : : : . : : :

M. musculus YTVQRLYK--AILGD---YSQQPLVQVAAMCIGEY GDLVSGQCEEEPIQVTEDE---- 504
B. taurus YTVQRLYK--AILGD---YSQQPLVQVAAMCIGEY GDLVSGQCEEEPIQVTEDE---- 504
H. sapiens YTVQRLYK--AILGD---YSQQPLVQVAAMCIGEY GDLVSGQCEEEPIQVTEDE---- 504
D. melanogaster YITNRFWE--SLQVANHCEDKQPLLQVAVVAIGEY GDLFMYGANEDE-FERPTESD---- 535
T. brucei TATNALWEGEGSPFDAIHHLRKAFVAAVVCIGEYADLLVSK-----KGVSEE---- 503
T. cruzi SAVVSMWDEASYPFDALHQSRKAFVAAVVGIGEYV DLLLDA-----KGIQPE---- 510
L. mexicana RAVEALWEEASYPFDARHQSRKAFLLVALWCIGEYVELLLGAV-----KGLTAV---- 516
G. intestinalis HFIDAFAAHHDTHVDVAVRNGRITALVDTYLLSVSY ILQLDGANATSDSQNPILSSIDFAL 557
: : : : : * :

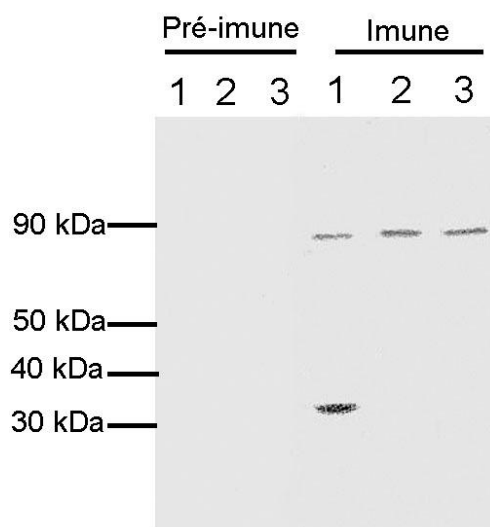
M. musculus	--VLDILESVLISNMSTSVTRGYALTAIMKLSTRFTCTVNRRIKKVVSIIYGSSIDVELQQR	562
B. taurus	--VLDILESVLISNMSTSVTRGYALTAIMKLSTRFTCTVNRRIKKVVSIIYGSSIDVELQQR	562
H. sapiens	--VLDILESVLISNMSTSVTRGYALTAIMKLSTRFTCTVNRRIKKVVSIIYGSSIDVELQQR	562
D. melanogaster	--LIAVYKFLTSAQVSTTSKQYALVSLAKLSTRLQQCVVEIQALITSGSHLNVDLQQR	593
T. brucei	--KIATRIADIINNEYKLIKSYGLTALVKVASRYPSKNTAVAVFANHTTSFDCELQQR	561
T. cruzi	--DVAKCAEITNTVFNIIKCYGLTSLMKIASRYPSAKPVVLPVLSNYTTSLDCELQQR	568
L. mexicana	--DVATCLSSLTINSSTFLIKQYGLTALMKVATKCPDAKSQAMATLTSNMTSMDCELQQR	574
G. intestinalis	TFKLCQHI FCMPTNDNTVTLKLTAAARSLVFLADLSDSARKKVLEYDSSIMQTVSPILLMT	617
	: . : . : : : :	.. *
M. musculus	AVEYNALFKKYDHMRSALLERMPVMEK---VTTNGPS-----	596
B. taurus	AVEYNALFKKYDHMRSALLERMPVMEK---VTTNGPS-----	596
H. sapiens	AVEYNALFKKYDHMRSALLERMPVMEK---VTTNGPT-----	596
D. melanogaster	GVEFTQLFGHYKHLRPPLEKMPAMQISRISSQNGESGGGSFDDNSPDVIENGVEGGGGG	653
T. brucei	ACEYTTILESFPQEAASF FERMPPI TVTVKDEGR-----	595
T. cruzi	ACEYMTLLESFVEEA AFCFSRMPPICHVEED-----	599
L. mexicana	ACEYTTLLVDFPQEA VFSFSQMPPI NPEADA-----	605
G. intestinalis	ILQFKHILLNPSLRSTLVAVPNIVLTPPNIKSTKR-----	652
	: : : :	
M. musculus	--EIVQTNG-----ETEPAPLETKPPPSGP---QP	621
B. taurus	--EIVQTNG-----ETEPAPLETKPPPSGP---QP	621
H. sapiens	--EIVQTNG-----ETEPAPLETKPPPSGP---QP	621
D. melanogaster	GHSLESNMNTLGDNTNILLDLLGSTDLSAGGAGDLVAATDLSNAVHKMNSRNANDVVAP	713
T. brucei	-----IQAQPLQVNNLPPEFLQ-----	612
T. cruzi	-----VEVQPVQVNNLPPEFLQ-----	616
L. mexicana	-----VKPVEVVS LTQEQLR-----	620
G. intestinalis	-----YTNPLLFAHIPHSTQLS-----	669
	..	
M. musculus	TSQANDLLDLLGGN-DITPVIPTAPT SKPASAGGELLDLLGDIT-----	664
B. taurus	TSQANDLLDLLGGN-DITPVIPTAPT SKPASAGGELLDLLGDIT-----	664
H. sapiens	TSQANDLLDLLGGN-DITPVIPTAPT SKPASAGGELLDLLGDIN-----	664
D. melanogaster	VSNNDLLDLLDLD-LSAPSSSTTTGAPAGGGGGGGIVALVGDNNQSSAANMNMLGGLDL	772
T. brucei	KKDTVSLDDLFGGG---TAPAGGAPKGA VVNTSDIDDLFGSKP-----	652
T. cruzi	QKA AVALEDLFEVN----SKP-----IVMTHPVENKMRDN-----	647
L. mexicana	QETTNTLDDLFNFDGATKPTSPGIDTPTLMAGSSSQVHSLFSPNVT-----	666
G. intestinalis	KSSVEKPDIDITLSTIGQNLKRIAETNHVEQAPQKTS SREESTTS-----	715
	. *:	.
M. musculus	-----LTGAPAAAPTASVPQIS-----QPFLLDGLSS	693
B. taurus	-----LTGAPAAAPTASVPQIS-----QPFLLDGLSS	693
H. sapiens	-----LTGAPAAAPASVPQIS-----QPFLLDGLSS	693
D. melanogaster	GGFGSLDSSASIPTNGNDLASHLGLGAPPAASPSLAASAPVGNLIDGHAGSLADLNP	832
T. brucei	-----APAPQAVSGLSALDGLMMASAPA--FPAATGFP	683
T. cruzi	-----ENNVVAIDDLFGLKTDASSNTAP--LPTPSGAA	678
L. mexicana	-----VLTHPQRATSS TNAFDDIFGDSGEGCAPAVSGSTHMAEASV	707
G. intestinalis	-----PAFVNDDLKVVYVMRVVQDSGDGTAEPDMSAGDDARSV	751

4.2. OBTENÇÃO DO SORO POLICLONAL ANTI-HINGE PURIFICADA RECOMBINANTE DE *T. CRUZI*:

Extratos totais de formas epimastigotas foram incubados com os soros dos camundongos antes de serem inoculados com a proteína recombinante (soros pré-ímmunes). Como esperado, estes soros não reconheceram nenhuma proteína (Fig. 4.5). Após três inoculações da proteína recombinante purificada, entretanto, houve um fraco reconhecimento de uma proteína de aproximadamente 90 kDa. Como o reconhecimento era fraco, foram realizadas mais duas inoculações, e assim obtidos os soros ímmunes. Ao incubar estes soros com extrato total de epimastigotas, o reconhecimento da proteína de

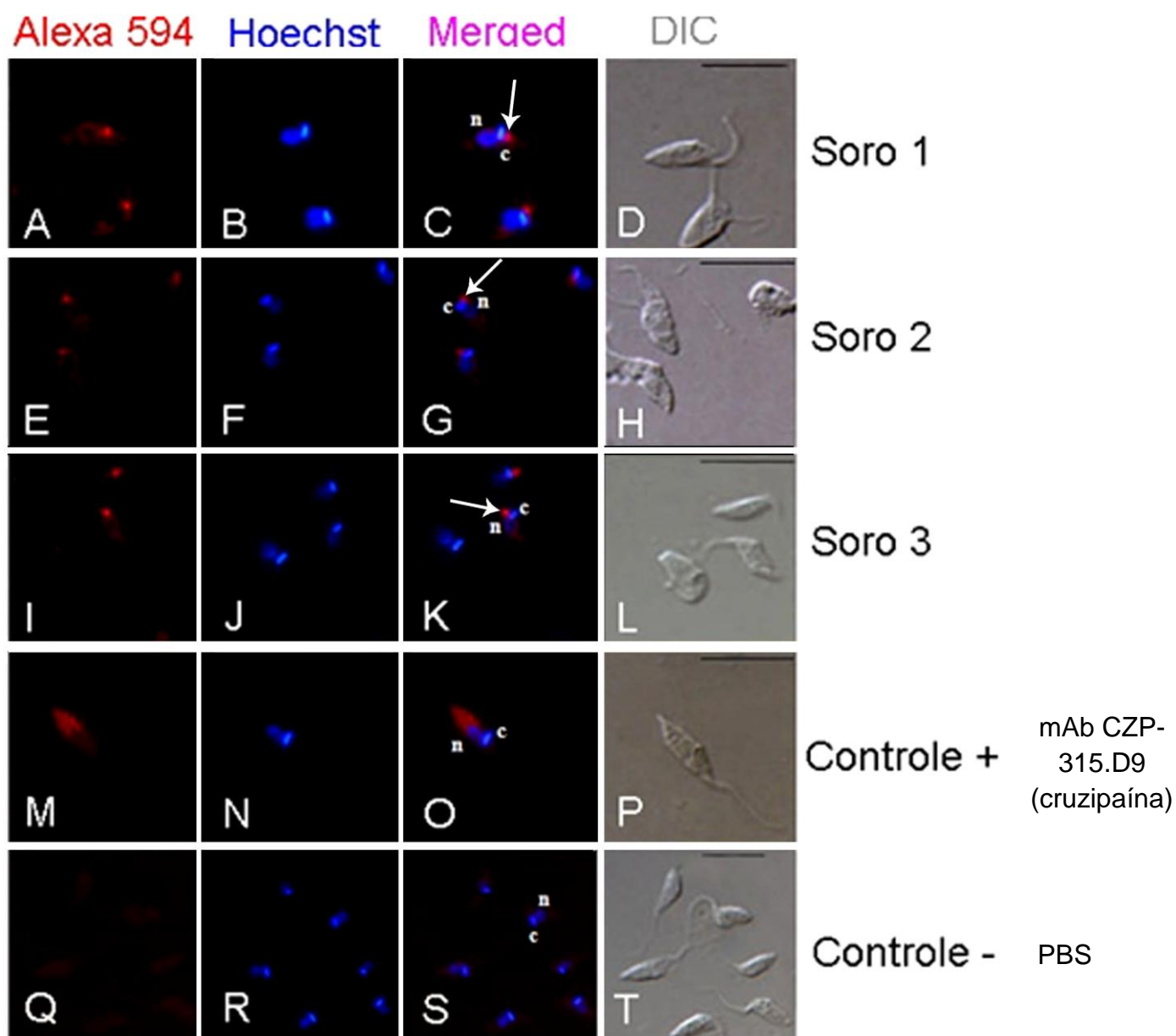
90 kDa foi mais intenso (Fig. 4.5). Apesar disso, o soro do camundongo 1 também reconheceu outra proteína de peso molecular menor de aproximadamente 35 KDa (Fig. 4.5). Esses resultados corroboram com a análise *in silico*, a qual demonstrou que a sequência aminoacídica do AP1- γ de *T. cruzi* possui 89,14 kDa.

FIGURA 4.5. – Produção de anticorpo policlonal contra a região Hinge de AP1- γ de *Trypanosoma cruzi* analisada por *western blot*. Pré-imune: extratos totais de formas epimastigotas frente aos soros pré-ímmes dos camundongos 1, 2 e 3; Imune: extratos totais de formas epimastigotas frente a soros da 5ª imunização dos camundongos 1, 2 e 3. O marcador de peso molecular Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen) foi utilizado como referência.



Para avaliar a localização subcelular do AP-1 γ de *T. cruzi*, formas epimastigotas foram incubadas com os soros anti-Hinge recombinante. Os três soros ímmes foram capazes de reconhecer uma proteína localizada na região da bolsa flagelar, lateral ao cinetoplasto (Fig. 4.6). Esta localização é compatível com o único complexo de Golgi do parasita.

FIGURA 4.6. – Produção de anticorpo policlonal contra a região Hinge de AP-1 γ de *Trypanosoma cruzi* em teste de imunofluorescência indireta para formas epimastigotas. A,E,I,M e Q: marcação do anticorpo policlonal anti-Hinge do AP-1 γ com o fluoróforo Alexa 594 (seta) conjugado ao anticorpo anti-mouse (vermelho), B,F,J,N e R: marcação do DNA do núcleo (n) e do cinetoplasto (c) com Hoechst (azul); C,G,K,O e S: sobreposição das imagens com Alexa 594 e Hoechst; D,H,L,P e T: imagem da morfologia do parasito por contraste interdiferencial (DIC). Barra = 10 μ m.



4.3. EXPRESSÃO E LOCALIZAÇÃO SUBCELULAR DE AP-1 γ EM DIFERENTES FASES DO CICLO DE VIDA DE *TRYPANOSOMA CRUZI*.

Para avaliar a expressão e localização subcelular de AP-1 γ em diferentes fases do ciclo de vida de *T.cruzi* o soro policlonal 2 foi escolhido, devido sua maior expressão em testes de *western blot* e marcação mais pontual na imunofluorescência, em formas epimastigotas, respectivamente (Fig 4.5 e 4.6). Extratos totais de diferentes formas de vida do *Trypanosoma cruzi* foram transferidas para membrana de nitrocelulose a fim de se verificar a reação dos anticorpos policlonais anti-Hinge, após a 5^a imunização, sob estas formas. O peso molecular conhecido da proteína AP-1 γ , presente nas diferentes formas é de 89,14 kDa segundo o banco de dados TritypDB (Fig. 4.7). Em ambas as formas houve reconhecimento da região de peso molecular aproximado de 90 kDa, correspondente a proteína AP-1 γ , utilizando-se como controle células vero não infectadas com *T.cruzi*. Na imunofluorescência foi possível observar uma marcação do soro policlonal 2 na região do complexo de Golgi, confirmada pela co-localização com TcHIP/AC que encontra-se nesta organela (Fig 4.8 - B e C).

Estes resultados demonstram a importância da proteína AP-1 γ para a fisiologia do parasita, visto que ela está presente em diferentes formas evolutivas e devido sua localização, pode possuir um papel importante em *T.cruzi*. O soro policlonal foi eficiente em reconhecer a proteína AP-1 γ nos diferentes extratos em *western blot* e reconheceu pontualmente a proteína no complexo de Golgi (Fig 4.7 e 4.8). Esta localização é compatível com dados da literatura para proteínas homólogas à AP-1 γ de *T. cruzi* e reforça a sugestão de que, neste parasito, esta proteína também tenha a função de distribuir vesículas contendo glicoconjugados tanto para o exterior da célula quanto para a membrana ou para os endossomos tardios/ lisossomos (Traub e Kornfeld, 1997)

FIGURA 4.7. – Expressão de AP-1 γ em diferentes formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi* incubadas com soro policlonal anti Hinge e normalização com TcActina. Epi (epimastigota), Meta (tripomastigota metacíclico), Ama (amastigota intracelular), Vero (células vero não infectadas). O marcador de peso molecular Bench Mark Protein Ladder (Invitrogen) foi utilizado como referência.

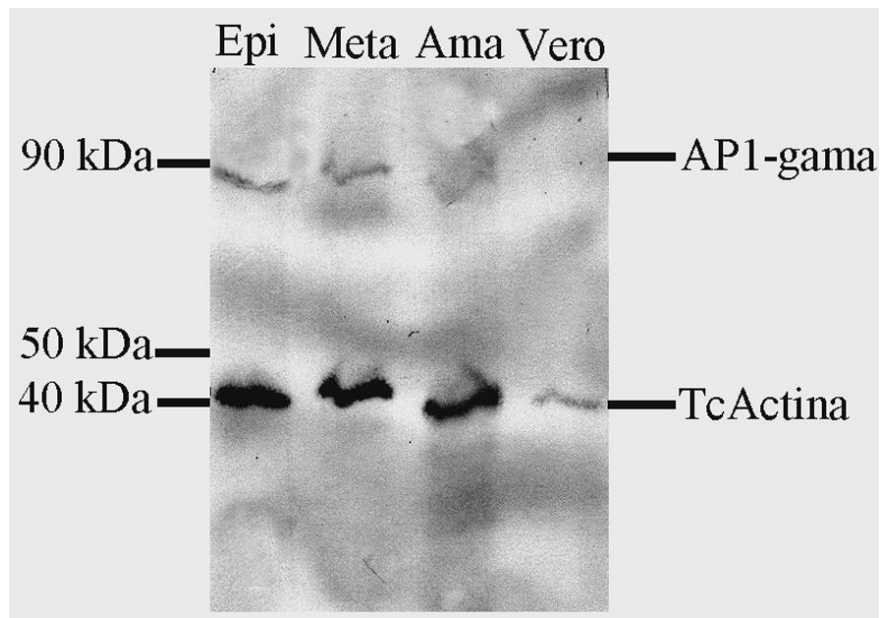
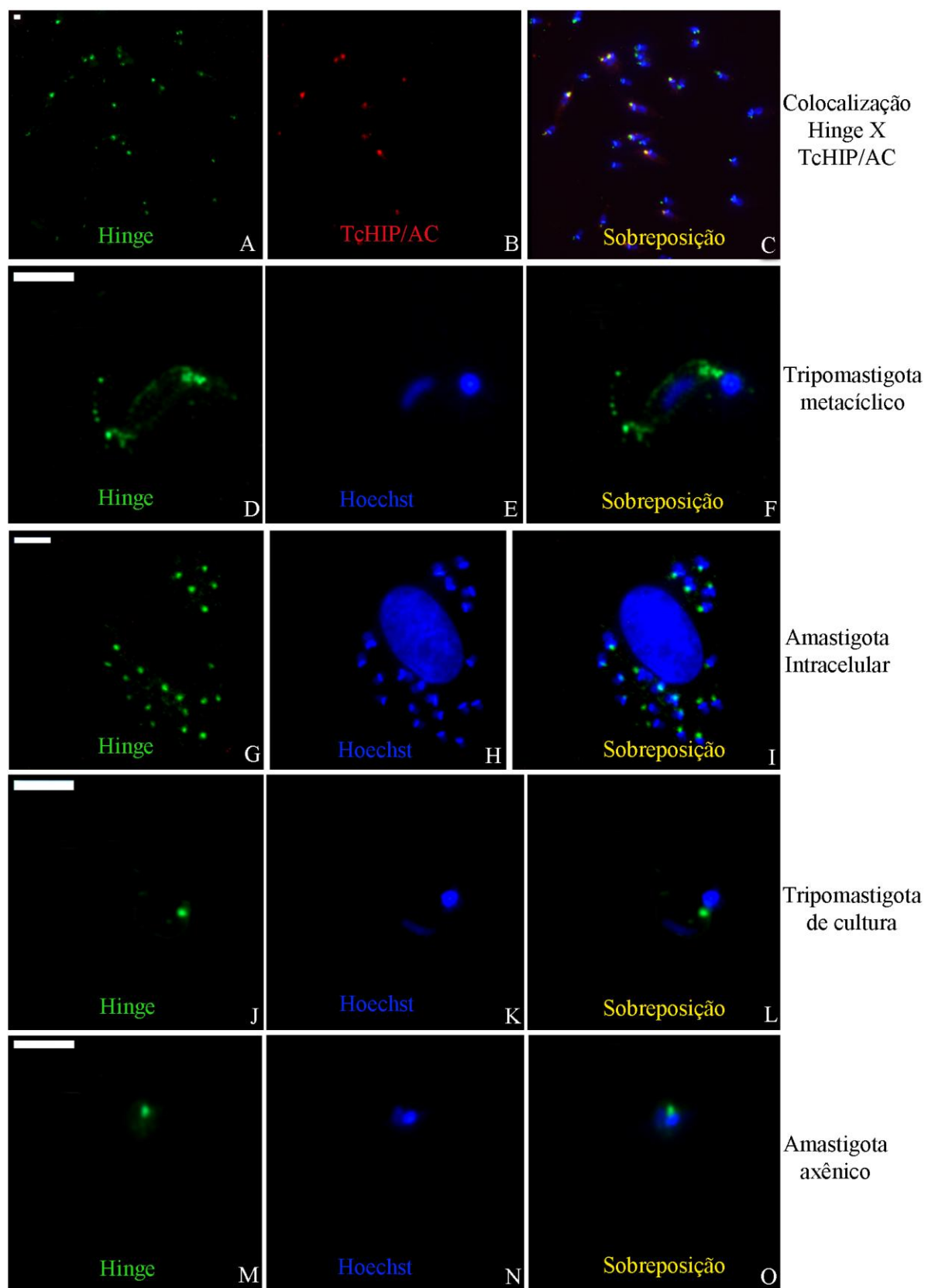


FIGURA 4.8. – Localização subcelular de AP-1 γ de *Trypanosoma cruzi* em diferentes formas evolutivas do parasito. A,D,G,J e M: Marcação do anticorpo policlonal anti-Hinge do AP1- γ com o fluoróforo Alexa 488 conjugado ao anticorpo anti-mouse (verde), B: marcação com anticorpo anti proteína TcHIP/AC localizada no Complexo de Golgi em formas epimastigotas, E,H,K e N: marcação do DNA do núcleo (n) e do cinetoplasto (c) com Hoechst (azul), F,I,L,O: sobreposição das imagens com Alexa 488 e Hoechst, C: sobreposição Alexa 488 e TcHIP/AC. Barras = 5 μ m.



5. CONCLUSÕES

- A análise *in silico* da sequência codificadora para AP-1 γ demonstra que há identidade e similaridade com outros organismos;
- A sequência de aminoácidos da AP-1 γ é conservada em tripanosomatídeos;
- A sequência de aminoácidos da AP-1 γ não é conservada em organismos distintos;
- Comparando a sequência aminoacídica da AP-1 γ com sequências de proteínas cujos domínios estão estabelecidos foi possível identificar dois domínios, que estão envolvidos na formação de vesículas revestidas por clatrina;
- O soro imune reconheceu um polipeptídeo de 90 kDa, compatível com o peso molecular esperado (89,14kDa) para a proteína AP-1 γ em diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*;
- A localização subcelular de AP-1 γ demonstrou ser compatível com o complexo de Golgi nas diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*, o que se confirmou com a co-localização com TchIP/AC, um marcador desta organela neste parasito.

6. PERSPECTIVAS

- Produção de anticorpos monoclonais contra a região Hinge da AP-1 γ .

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- WIKINSON, S. R., KELLY, J. M. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. **Expert Rev Mol Med.** v. 11, n. 31, 2009.
- URBINA, J. A., DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.** v. 19, n. 11, p. 495-501, 2003.
- 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.
- SOARES, M. J., The Reservosome of Trypanosoma cruzi Epimastigotes: an Organelle of the Endocytic Pathway with a Role on Metacyclogenesis. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 94, n. 1, p. 139-141, 1999.
- SANT'ANNA, C., PARUSSINI, F., LOURENÇO, D., SOUZA, W., CAZZULO, J. J., SILVA, N. L. C. All Trypanosoma cruzi developmental forms present lysosome-related organelles. **Histochem Cell Biol.,** v. 130, p. 1187–1198, 2008.
- SANT'ANNA, C; PARUSSINI, F; LOURENÇO, D; SOUZA, W; CAZZULO, J.J; SILVA, N.C. All Trypanosoma cruzi developmental forms present lysosome-related organelles. **Histochem Cell Biol** 130:1187–1198, 2008.
- GOKOOL, S. Sigma 1- and mu 1-adaptin homologues of Leishmania mexicana are required for parasite survival in the infected host. **J BIOL CHEM** , 278 (32) 29400 – 29409, 2003.
- SOUZA, W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol Res,** 88: 1013-1025, 2002.
- COURA J. Present situation and new strategies for Chagas disease chemotherapy: a proposal. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** Jul;104(4):549-54, 2009.
- CONNER, S.D; SCHMID, S.L. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* Mar 6;422(6927):37-44, 2003.
- BATISTA, C.M; KALB, L.C; MOREIRA, C.M; BATISTA, G.T, EGER, I; SOARES, M.J. Identification and subcellular localization of TchIP, a putative Golgi zDHHC palmitoyl transferase of Trypanosoma cruzi. **Parasitol.** 134 (1): 52-60, 2013.

- AUSUBEL, F.M; BRENT, R; KINGSSTON, R.E; MOORE, D.D; SEIDMAN, J.G; SMITH, J.A; STRUHL, K. Current Protocols in Molecular Biology. **ISBN:** 978-0-471-50338-5, 1994.
- 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. **Proc Natl Acad Sci U S A**, Aug 3;96(16):8907-12, 1999.
- ALLEN, C.L; GOULDING, D; FIELD, M.C. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. **EMBO J**, Oct 1;22(19):4991-5002, 2003.
- KIRCHHAUSEN, T; BONIFACINO, J.S; RIEZMAN, H. Linking cargo to vesicle formation – receptor tail interaction with coat proteins. **Current Opinion in Cell Biology**, 9: 488-495, 1997.
- 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-kDa to 115-kDa) chains of the clathrin-associated protein complex AP 2. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 86:2612-2616, 1989.
- ARGOLO, A.M; FELIZ,M; PACHECO, R;COSTA,J.Doença de Chagas e seus principais vetores no Brasil. Laboratório de Biodiversidade Entomológica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz e Laboratório de Sistemática e Bioquímica, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz. Rio de Janeiro 2008.
- SARMENTO, R.R. Interação do *Trypanossoma cruzi* com células da resposta imune inata .UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA CLÍNICA MODALIDADE IMUNOLOGIA. UBERABA-MG, 2008.
- SANT'ANNA,C; NAKAYASU,E.S,PEREIRA,M.G; LOURENÇO,D; SOUZA,W; ALMEIDA,I.C;SILVA, N.L.C. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. **Proteomics**, Apr;9(7):1782-94. 2009.
- Doença de Chagas. Disponível em <[http:// www.fiocruz.br/ chagas/ cgi/ cgilua.exe/ sys/ start.htm?sid=13](http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=13)> Acesso em: 04/12/2013.

- KALB, L.C. CLATRINA EM Trypanosoma cruzi: IDENTIFICAÇÃO DO GENE E LOCALIZAÇÃO CELULAR. **Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, 2011.**

