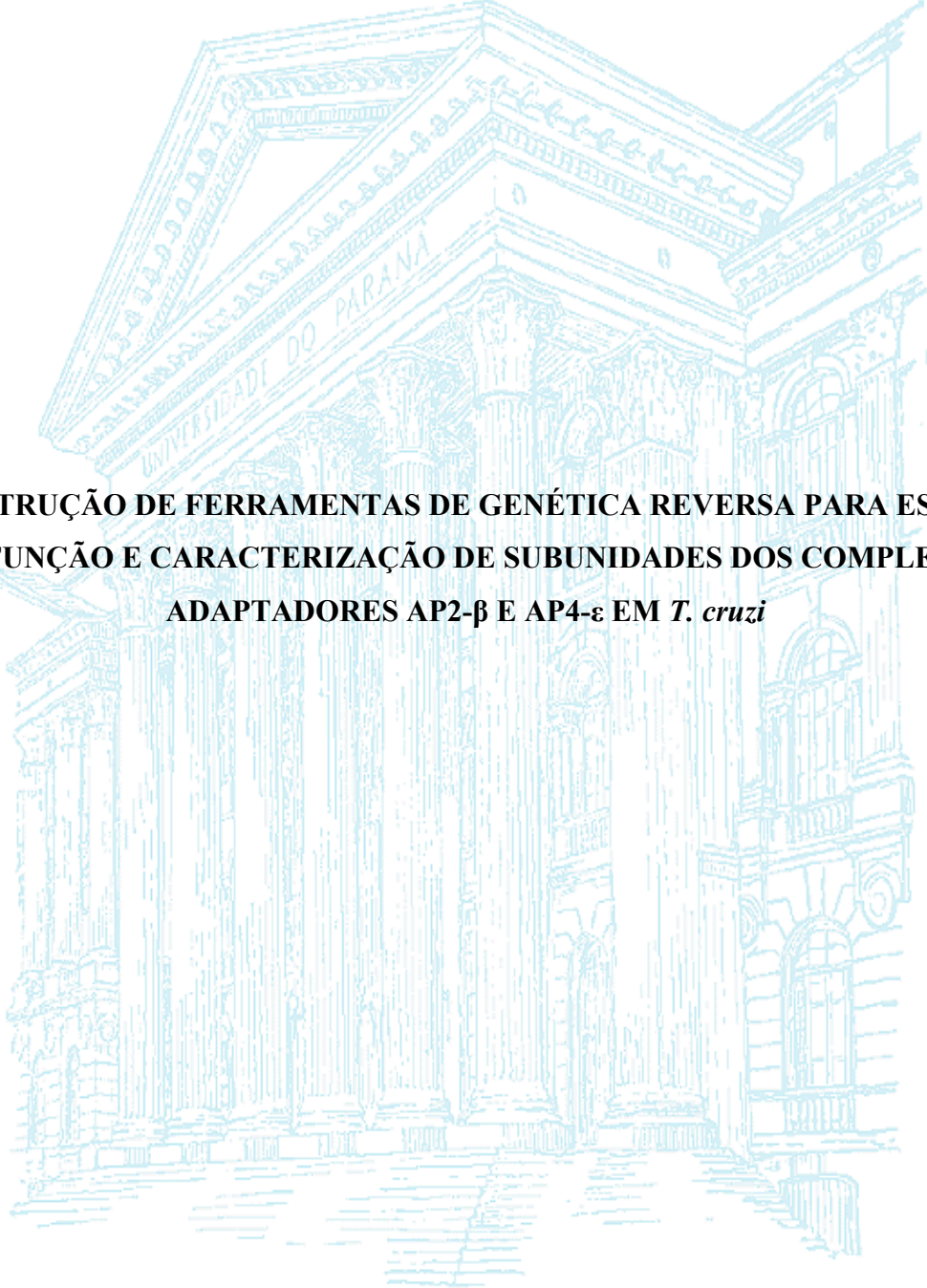


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

BRENDA MARIN



**CONSTRUÇÃO DE FERRAMENTAS DE GENÉTICA REVERSA PARA ESTUDO
DE FUNÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBUNIDADES DOS COMPLEXOS
ADAPTADORES AP2- β E AP4- ϵ EM *T. cruzi***

CURITIBA

2016

BRENDA MARIN

**CONSTRUÇÃO DE FERRAMENTAS DE GENÉTICA REVERSA PARA ESTUDO
DE FUNÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SUBUNIDADES DOS COMPLEXOS
ADAPTADORES AP2- β E AP4- ϵ EM *T. cruzi***

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado para avaliação da disciplina TCCII de graduação em Biomedicina, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dr.^a Andrea Senff Ribeiro

Coorientadora: Me.^a Claudia Maria do Nascimento Moreira

CURITIBA

2016

AGRADECIMENTOS

Gratidão a Deus pela vida, por abençoar minhas escolhas e meus caminhos.

A minha família, sobretudo aos meus pais e minha irmã, pelos cuidados, pelas lições e por todo o apoio para que eu pudesse chegar até aqui. Sem vocês eu não seria nada.

Ao meu amor, que esteve ao meu lado me apoiando, me acalmando e me amando, por me ensinar todos os dias a ser uma pessoa melhor e por dividir sua vida e permitir com que eu compartilhe da minha de uma forma tão incrível.

Aos amigos, do colégio, da vida acadêmica, dos trabalhos e a todos aqueles que marcaram minha vida, por entenderem a ausência, por compartilharem das crises de vida, e por estarem sempre ao meu lado comemorando as vitórias e conquistas.

Ao Dr. Stenio Perdigão Fragoso, que me concedeu um espacinho tão especial dentro de seu laboratório, que tanto me ensinou e me ajudou durante esse ano.

A minha orientadora Me^a. Claudia Maria do Nascimento Moreira, pelo coração enorme, pelo apoio, compreensão, paciência, confiança e pelo trabalho em equipe. Grata por ter cruzado seu caminho e por todos os ensinamentos.

A todos os colegas de laboratório de Biologia Molecular de Tripanosomatídeos, técnicos, funcionários, pesquisadores do Instituto Carlos Chagas que me ajudaram na realização deste trabalho, pela convivência, amizade e troca de conselhos.

Aos meus colegas do Laboratório de Matriz Extracelular e Biotecnologia de Venenos na UFPR, por terem me acolhido quando caloura na faculdade. Por todos os conselhos, momentos de diversão e de aprendizado, vocês me ensinaram muito. Grata principalmente à minha primeira orientadora, Dr^a. Olga Meiri Chaim que acreditou em mim e sempre esteve disposta a me ajudar. Obrigada pelos puxões de orelha, por ser esse exemplo profissional e pessoal para mim. Ao meu co-orientador e amigo Me. Adriano Morgon, pela disposição, calma, carinho e paciência ao ensinar e pelos conselhos que, até hoje, sou muito grata e faço questão de sempre levar comigo.

À CAPES, Fiocruz e todos os envolvidos para que minha formação pudesse ser concluída com excelência.

RESUMO

Os adaptadores são proteínas que se associam em complexos atuando na comunicação celular entre diferentes compartimentos dentro da célula. Alguns deles são encontrados em vesículas revestidas por clatrina a partir da membrana plasmática ou do complexo de Golgi. Na literatura são descritos cinco complexos adaptadores (AP-1, AP-2, AP3, AP4 e AP5) que, estruturalmente são heterotetrâmeros composto por subunidades homólogas. Estudos sobre os complexos adaptadores em tripanosomatídeos são escassos na literatura, mas já demonstraram que a deleção de certas subunidades de complexos adaptadores influencia na infectividade e viabilidade de *Leishmania mexicana* e *Trypanosoma brucei*, respectivamente. O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado da família dos tripanosomatídeos e é o agente causador da doença de Chagas, endêmica e considerada de grande importância para a saúde pública. Os recentes estudos envolvendo os complexos adaptadores em *T. cruzi* já demonstraram a existência do AP-1 no complexo de Golgi do parasita, assim como relatado em células eucarióticas. Porém, pouco se sabe a respeito da função desses complexos adaptadores em processos básicos do ciclo de vida do parasita. Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo iniciar as análises de função e caracterização da subunidade β do complexo AP-2 e da subunidade ϵ do complexo AP-4 em *T. cruzi* através de técnicas de genética reversa. A metodologia escolhida foi o nocaute gênico, em que o gene a ser estudado é deletado por recombinação homóloga a fim de se aferir uma função à proteína a partir dos fenótipos obtidos nos parasitas mutantes. Para isso, foram desenhados oligonucleotídeos específicos para as regiões *upstream* e *downstream* ao gene de interesse a fim de se obter os cassetes de nocaute gênico com marcadores de seleção, que serão transfectados em parasitas. A construção dessas ferramentas possibilitará futuras análises referentes à ausência dessas proteínas e a relação com processos vitais para o parasita, como endocitose, proliferação, diferenciação, infectividade, alterações morfológicas, dentre outros aspectos.

Palavras-chave: complexos adaptadores, *T. cruzi*, nocaute gênico.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	6
1.1 TRÁFEGO INTRACELULAR DE VESÍCULAS	6
1.1.1 Via Endocítica	6
1.1.2 Via Biossintética do Complexo de Golgi	8
1.2 CLATRINA	8
1.3 PROTEÍNAS ADAPTADORAS	9
1.4 PROTOZOÁRIOS TRIPANOSOMATÍDEOS E O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	11
1.5 DOENÇA DE CHAGAS	13
1.6 BIOLOGIA CELULAR DO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	13
1.7 VIA ENDOCÍTICA EM <i>T. CRUZI</i>	16
1.8 CLATRINA E COMPLEXOS ADAPTADORES EM TRIPANOSOMATÍDEOS	16
2 OBJETIVOS	17
2.1 OBJETIVO GERAL	17
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 ORGANISMOS	18
3.2 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS	18
3.3 ESQUEMA GERAL DA CLONAGEM PARA REALIZAÇÃO DO NOCAUTE GÊNICO	19
3.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DAS SUBUNIDADES AP2- β e AP4- ϵ	21
3.5 PURIFICAÇÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DAS SUBUNIDADES AP2- β e AP4- ϵ	21
3.6 DIGESTÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DAS SUBUNIDADES AP2- β e AP4- ϵ E DOS VETORES pHIGRO2 E pNEO2	21
3.7 LIGAÇÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DAS SUBUNIDADES SUBUNIDADES AP2- β e AP4- ϵ AOS VETORES E TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO	22
3.8 SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES	22

3.9	PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS OBTIDOS – MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS	22
3.10	TRANSFEÇÃO DE <i>T. cruzi</i> COM OS CASSETES	23
4	RESULTADOS	24
4.1	DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS	24
4.2	NOCAUTE GÊNICO AP4- ϵ	26
4.3	NOCAUTE GÊNICO AP2- β	32
5	DISCUSSÃO	40
6	CONCLUSÃO	42
	REFERÊNCIAS	43

1 INTRODUÇÃO

1.1 TRÁFEGO INTRACELULAR DE VESÍCULAS

A comunicação das células eucarióticas com o ambiente em que se encontram ocorre por meio de um refinado sistema de endomembranas, 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) e seguem para seu destino. Este tráfego intracelular de vesículas é fundamental para a célula, pois permite uma série de processos celulares essenciais, como a internalização de solutos, transporte de proteínas, reciclagem de membranas e a própria sinalização celular (Bonifcaino & Lippincott-Schwartz, 2003).

Uma vez que esse processo seja tão essencial para as células, deve ser, portanto, altamente regulado e coordenado para que haja um funcionamento adequado. Para cada via de tráfego vesicular existem diferentes tipos de proteínas carga que devem ser acomodadas na mesma vesícula (Robinson, 2004). A caveolina e a clatrina são as proteínas de revestimento mais conhecidas (Jackson et al., 2012), que tem por função principal acomodar todas as proteínas na mesma vesícula a fim de que ela brote e seja liberada do compartimento doador com destino ao compartimento receptor (Robinson, 2004).

Este sistema de comunicação é fundamental para manter a viabilidade das células, atuando na “reciclagem” de proteínas e lipídeos da membrana plasmática, na captação endocítica de nutrientes e no tráfego de vesículas a partir da rede Trans-Golgi (Giardi, et. al. 2005). As vias de transporte dependentes de clatrina são as mais estudadas e relacionam-se com a quantidade de receptores transmembrânicos de alta afinidade e seus respectivos ligantes que, nas invaginações da membrana plasmática, formarão as vesículas com revestimento protéico de clatrina (Conner & Schmid, 2003). Conforme a clatrina se associa à membrana plasmática da célula, o revestimento formado gera a força necessária para curvar a membrana e facilitar o brotamento da vesícula (Schekman e Orci, 1996; Aridor e Traub, 2002).

1.1.1 Via Endocítica

Endocitose é o mecanismo pelo qual células internalizam diversas macromoléculas (hormônios, lipídios e proteínas) e partículas através do transporte de vesículas provenientes da membrana plasmática. Nas células eucarióticas, a endocitose é fundamental para nutrição e

remoção de proteínas da superfície celular, para o desenvolvimento das células, resposta imune, neurotransmissão, comunicação intercelular, homeostase, entre outros.

Dependendo do material a ser internalizado, o processo de endocitose pode ser dividido em: macropinocitose, fagocitose e endocitose propriamente dita. A macropinocitose é a ingestão de fluidos extracelulares através de macroprojeções da membrana sustentadas por filamentos de actina. A fagocitose é a ingestão de partículas através da emissão de expansões de membrana plasmática sustentadas por filamentos de actina. Quando dentro da célula, o material ingerido se encontra nos fagossomos, onde é degradado no sistema endossomal-lisossomal e pode gerar outros precursores da via metabólica. Já na endocitose propriamente dita há a formação e brotamento de vesículas de membrana plasmática, contendo o material ingerido. Os mecanismos básicos para o brotamento dessas vesículas podem ser divididos em: endocitose dependente de clatrina, endocitose dependente de caveolina e endocitose independente de clatrina e caveolina (Figura 1.1) (Soldati & Schliwa, 2006).

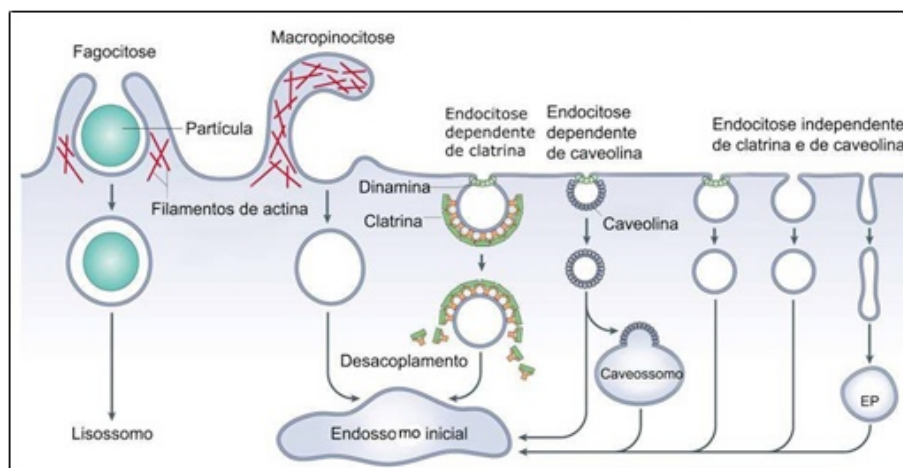


Figura 1.1 – Via Endocítica. Ingestão de partículas por fagocitose e de fluidos por macropinocitose. Na endocitose propriamente dita há a formação e brotamento de vesículas e pode ser classificada em dependente de clatrina, dependente de caveolina ou independente de clatrina e de caveolina. O material endocitado segue para o sistema endossomal. (adaptado de Mayor & Pagano, 2007).

As vesículas com revestimento proteico de clatrina brotam da membrana plasmática com auxílio de outras proteínas como a dinamina, e os componentes endocitados são entregues para o endossomo inicial. Receptores transmembrana são reciclados de volta à membrana plasmática, e as moléculas endocitadas seguem ao longo do sistema endossomal. No endossomo tardio, o material endocitado pode ser enviado para outras rotas, como para exocitose ou para o lisossomo, onde será degradado (Scott et al., 2014).

Vesículas com revestimentos também são observadas no complexo de Golgi, na rede-trans-Golgi, em processos biossintéticos e exocíticos (Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003).

1.1.2 Via Biossintética do Complexo de Golgi

O complexo de Golgi compreende uma rede de cisternas e vesículas com três porções definidas: as cisternas da face *cis*, que recebem as enzimas do retículo endoplasmático, as cisternas mediais, onde ocorrem as modificações pós-traducionais das enzimas e as cisternas da face *trans*, de onde brotam as vesículas com o conteúdo enzimático. A rede trans-Golgi, orientada para a membrana plasmática, é responsável pela triagem e distribuição de glicoproteínas e glicolípídeos modificados que podem ser encaminhadas para o exterior da célula (via regulada), para a membrana plasmática (via constitutiva) ou para os lisossomos (via biossintética) (revisto por Braulke e Bonifacino, 2009; Traub & Kornfeld, 1997). Em células epiteliais polarizadas, o transporte de moléculas pode ocorrer através desta via (Gravotta et al., 2012) (Figura 1.2).

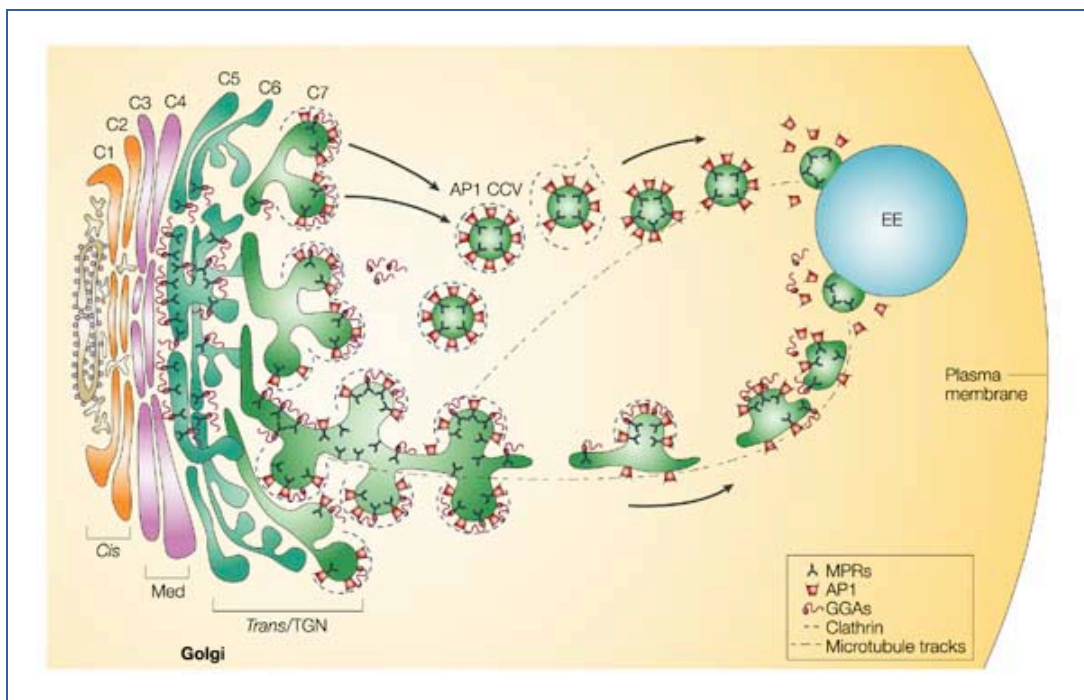


Figura 1.2 – Via Biossintética do Complexo de Golgi. A face *trans* do Golgi, de onde brotam as vesículas da rede trans-Golgi, é voltada para a membrana plasmática.

1.2 CLATRINA

A clatrina é uma proteína de revestimento que forma uma estrutura poligonal em formato de “cesto”. É o componente mais abundante no revestimento das vesículas (Perse,

1975). A ausência de clatrina é sempre severa para o organismo, levando ou não à morte, e pode causar danos ao processo endocítico e ao tráfego intracelular. Em pesquisas posteriores à descoberta da molécula, foi descoberto que essa estrutura de revestimento é composta por um trímero de clatrina, que foi posteriormente denominado trisquélion (Figura 1.3) (revisto por Roth, 2006). A molécula de clatrina por si só é formada por três cadeias polipeptídicas pesadas de aproximadamente 192 kDa, cada uma delas ligada a uma cadeia polipeptídica leve de aproximadamente 25 kDa (Baisa et al., 2013).

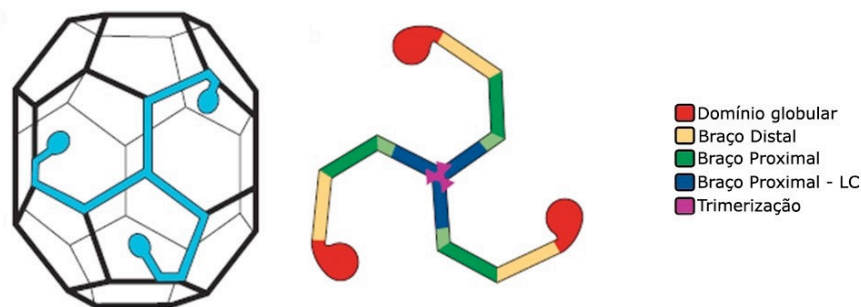


Figura 1.3 – Clatrina. Em azul, observa-se o trisquélion, a unidade de formação da clatrina. A arquitetura do trisquélion é formada por três cadeias pesadas de clatrina, unidas por um domínio de trimerização (representado em roxo). O braço proximal (em azul e verde) e o braço distal (em amarelo) e o domínio globular (em vermelho) que se dispõe em direção à membrana (adaptado de Edeling et al. 2006).

Sob condições não-fisiológicas, os trisquélion se associam espontaneamente em suas estruturas poligonais. Entretanto, sob condições fisiológicas, a clatrina não se associa diretamente à membrana da célula e requer, portanto, a presença de fatores citoplasmáticos, como proteínas acessórias (Conner & Schmid, 2003). A interação destas proteínas com as vesículas revestidas por clatrina auxilia na regulação das vias endocítica e biossintética. Depois da clatrina, as proteínas mais abundantes nesse revestimento são os complexos adaptadores, os quais se ligam diretamente à cauda citoplasmática de receptores transmembrana específicos (Edelling et al., 2006).

1.3 PROTEÍNAS ADAPTADORAS

Os complexos adaptadores são proteínas que desempenham diferentes funções nas membranas como, a seleção de proteínas transmembrana e seus ligantes para incorporação nas vesículas, ligação de fatores acessórios que regulam a montagem e a desmontagem do revestimento, a formação das vesículas, a interação com o citoesqueleto assim como também podem recrutar a clatrina especificadamente para a organela de origem da vesícula (Bonifacino & Lippincott-Schwartz, 2003).

Os primeiros complexos identificados foram o AP-1 e AP-2. Na busca por homólogos destes, os complexos AP-3 e AP-4 foram descobertos (Robinson, 2004). Durante anos foram os únicos complexos descritos na literatura até que em 2011 Hirst et al. descreveram um quinto complexo, o AP-5. Os complexos adaptadores contêm regiões que interagem com alguns dos quatro tipos de ligantes: lipídeo, carga, clatrina ou outras proteínas acessórias (Reider e Wendland, 2011).

Os complexos variam em tamanho e estrutura, mas possuem propriedades similares, como o fato de serem heterotetraméricos, ou seja, são formados por quatro subunidades de adaptinas associadas (Figura 1.4) (Boehm & Bonifacino, 2001; Reider e Wendland, 2011). Cada um dos complexos possui duas subunidades grandes (~100 kDa), α e β . A α é correspondente a γ , δ , ϵ e ζ nos complexos AP-1, AP-3, AP-4 e AP-5, respectivamente (Boehm & Bonifacino, 2001; Robinson, 2004; Hirst et al., 2013). A subunidade média (~50 kDa), é denominada μ e varia de $\mu 1$ a $\mu 5$ de acordo com o respectivo adaptador. A subunidade pequena (~20 kDa) é denominada σ e segue a mesma lógica (Eddeling, et al., 2006).

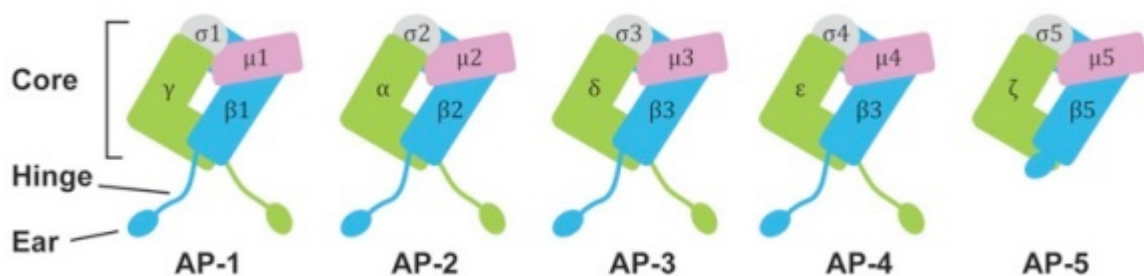


Figura 1.4 – Estrutura dos complexos adaptadores. Em azul e verde as subunidades grandes (β e γ , α , δ , ϵ ou ζ). Em lilás as subunidades médias ($\mu 1-5$) e em cinza as pequenas ($\sigma 1-5$). As subunidades maiores apresentam também uma região N-terminal (*core*), uma haste flexível (*hinge*) e C-terminal (*ear*) (Park & Guo, 2014).

Cada subunidade desempenha funções similares, independente do complexo adaptador em que se encontram. A subunidade α especifica o local de montagem da clatrina na membrana plasmática através da interação com os fosfolipídeos, e as subunidades homólogas orientam a montagem na membrana de outras organelas. As subunidades μ reconhecem a cauda citoplasmática do receptor através de um sinal de tirosina (YXX \emptyset) ou dileucina (DXXLL), enquanto que as subunidades β interagem com a cadeia pesada da clatrina e promovendo o recrutamento desta (Kirchhausen, 2000). O reconhecimento desses sinais confere especificidade no tráfego entre membranas. A subunidade σ parece ter um papel estrutural na estabilização do domínio central (Collins et al., 2002).

Quanto à localização (Figura 1.5), o complexo AP-1 é encontrado em vesículas com revestimento na rede trans-Golgi, o AP-2 em vesículas endocíticas da membrana plasmática ao endossomo tardio, o AP-3 próximo aos endossomos, o AP-4 também próximo a rede trans-Golgi, (Robinson, 2004; Dell'Angelica et al., 1997) e o AP-5 em endossomos tardios (Hirst et al., 2012).

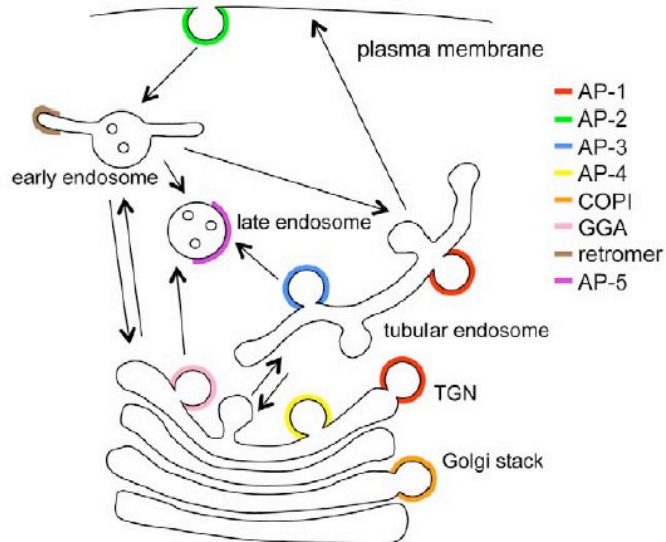


Figura 1.5 – Localização dos Complexos Adaptadores. O complexo AP1 está localizado na rede Trans-Golgi e em endossomos. O AP-2 facilita a endocitose mediada por clatrina e é o complexo melhor caracterizado. O AP-3 se encontra no endossomo tardio. O AP-4 está localizado no Complexo de Golgi e em endossomos iniciais. O AP-5 se encontra em endossomos tardios de células HeLa (Hirst et al. 2012).

1.4 PROTOZOÁRIOS TRIPANOSOMATÍDEOS E O *TRYPANOSOMA CRUZI*

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

A família Trypanosomatidae representa grande risco à saúde humana, de animais e plantas em muitos países da América Latina e África (Alsford et al., 2013) uma vez que entre eles estão os causadores de doenças graves como leishmaniose, doença de chagas e doença do sono. Além disso, algumas espécies também podem ter grande impacto econômico uma vez que podem afetar bovinos e equinos, como na doença de nagana (Rodrigues, et al., 2014). A leishmaniose é uma doença do gênero *Leishmania* e pode desencadear casos graves de

leishmaniose visceral ou outras variações de lesões cutâneas, dependendo da espécie causadora.

Um dos membros da família dos tripanosomatídeos é o *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado causador da doença de Chagas e de grande importância para a saúde mundial (WHO, 2016). O ciclo evolutivo (Figura 1.6) do *T. cruzi* envolve dois hospedeiros: o inseto triatomídeo (ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae) e um mamífero, podendo este ser o homem ou um animal silvestre ou doméstico. A transmissão ao mamífero se inicia durante o repasto sanguíneo do inseto vetor, que elimina formas tripomastigotas metacíclicas junto de suas fezes e urina no local da picada. Estas formas alcançam a corrente sanguínea do hospedeiro via cutânea ou através das mucosas. Quando no interior das células do hospedeiro vertebrado, o parasita se diferencia nas formas amastigotas, que se dividem e se diferenciam novamente em formas tripomastigotas sanguíneas. Com o rompimento da célula, formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea do hospedeiro e podem infectar outras células ou, eventualmente, ser capturadas por um novo inseto vetor. No interior do trato digestivo do inseto, as formas tripomastigotas sanguíneas se diferenciam na forma replicativa epimastigota, que se divide por divisão binária. Após estresse nutricional no intestino do vetor, as epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese) quando atingem a ampola retal do inseto (Contreras et al., 1985).

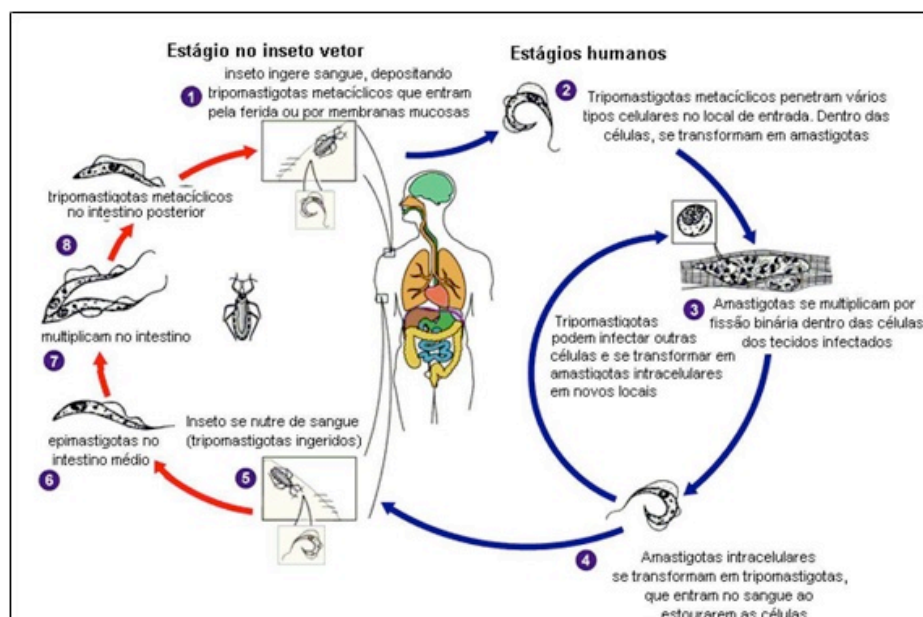


Figura 1.6 – Ciclo de vida do *T. cruzi*. Em azul estão representados os estágios que ocorrem nos mamíferos, no caso o humano, e em vermelho os estágios do inseto vetor (Fonte: CDC – Center for Disease Control. www.dpd.cdc.gov/dpdx).

1.5 DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é considerada endêmica principalmente na América Latina e em certas regiões de países da América do Norte. Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas com *T. cruzi*, e que 90 milhões estão expostas, principalmente devido à migração populacional da América Latina para o resto do mundo (WHO, 2016).

A transmissão da doença ocorre principalmente pelo contato com as fezes ou urina contaminados do inseto triatomíneo, conhecido como barbeiro. Pode ocorrer também através de transfusão sanguínea, via congênita, por transplante de órgãos, via oral, contato com animais infectados ou acidente laboratorial (Coura 2007).

A doença de Chagas se manifesta em duas fases: a fase aguda e a crônica. Durante a fase aguda os parasitas circulam no sangue e esta fase inicial dura em torno de dois meses após a infecção, na maioria dos casos não apresentando quaisquer sintomas. Caso sintomático, há a presença de lesão no local da picada do inseto, além de poder ocorrer febre, dor de cabeça, dor muscular, entre outros sintomas. Se não tratados, os casos agudos podem evoluir para casos crônicos, em que o parasita se aloja principalmente no miocárdio e nos músculos digestivos, podendo levar a complicações mais graves e até mesmo fatais (WHO, 2016; Coura 2007).

Como tratamento, ainda não há vacinas ou quimioterápico efetivo, uma vez que só são eficazes para a fase aguda e causam uma série de efeitos colaterais. Para prevenção, o controle do vetor é o mais eficiente e recomendado e, para isso, deve-se usar pesticidas, telas protetoras, tratar corretamente o alimento, além de realizar testes quando no caso de doações de sangue e transplante de órgãos (WHO, 2016).

1.6 BIOLOGIA CELULAR DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Os tripanosomatídeos são seres eucariotos que possuem algumas características exclusivas, como organelas especiais, que aumentam as possibilidades de alvos para novos quimioterápicos (Rodrigues et al., 2014).

Todos os tripanosomatídeos apresentam um único flagelo anterior, que se origina no corpo basal e passa por uma invaginação da membrana que reveste o corpo celular e forma a bolsa flagelar. O flagelo varia em tamanho conforme o estágio evolutivo do parasita. Quando

na forma amastigota, o flagelo é muito curto e não é aderido ao corpo. Já quando epimastigota e tripomastigota, o flagelo é aderido ao corpo numa região conhecida como FAZ (flagellar attachment zone) (De Souza, 2002).

Os tripanosomtídeos possuem uma única mitocôndria, ramificada e que se estende por todo o corpo celular. Na porção anterior do parasita a mitocôndria forma o cinetoplasto, uma região em que se concentra uma matriz de DNA mitocondrial (kDNA). O DNA presente no cinetoplasto representa até 30% do DNA total da célula. (De Souza, 2002).

O glicocálix é composto por diversas proteínas integrais e periféricas, glicoproteínas, glicolipídeos e mucinas (Rodrigues et al., 2014). As macromoléculas se ligam à membrana plasmática através de âncoras de glicosil-fofatidil-inositol (GPI) (De Souza, 2002). O glicocálix é responsável por promover a interação dos diferentes estágios evolutivos do parasita com a superfície do hospedeiro, seja o invertebrado ou o vertebrado (Rodrigues et al., 2014).

Para conferir resistência mecânica, à temperatura e ação de drogas, há a associação de microtúbulos subpeliculares à membrana plasmática, ligados por filamentos curtos de natureza desconhecida (De Souza, 2002). Além disso, este citoesqueleto mantém o formato do corpo celular em cada estágio evolutivo do parasita. Esta associação de microtúbulos não está presente apenas na bolsa flagelar (Overath et al., 1997). Entretanto, em associação com a membrana da bolsa flagelar do *T. cruzi* há um vacúolo contrátil osmoregulador essencial para adaptação a diferentes pressões osmóticas, regulação da homeostase de cálcio e transporte de proteínas para a membrana plasmática (Allen e Naitoh, 2002).

A região anterior do parasita é de extremo interesse no estudo da biologia celular, pois é neste local que se encontram os portais da endocitose (bolsa flagelar e complexo citóstoma-citofaringe) e exocitose (complexo de Golgi e bolsa flagelar). Na bolsa flagelar encontram-se diversos receptores, sendo uma região de tráfego vesicular e entrada de nutrientes, assim como o citóstoma, uma invaginação menor localizado próximo à bolsa flagelar, envolvido com a absorção de nutrientes (Figura 1.7) (Porto-Carreiro et al., 2000; Morgan, et al., 2002).

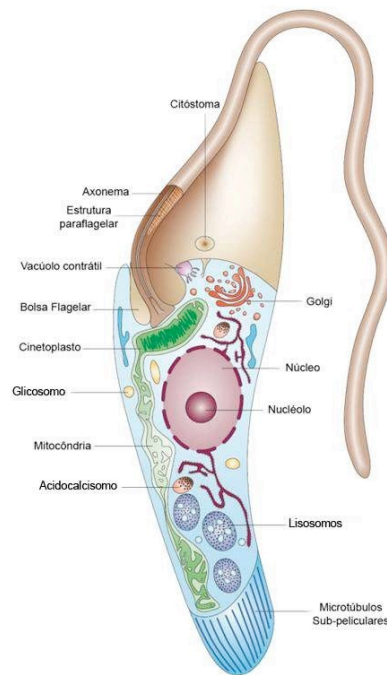


Figura 1.7 – Principais estruturas celulares de *T. cruzi*. (Fonte: Do Campo et al., 2005).

No citoplasma da célula se encontram os glicosomos, uma organela na qual as enzimas da via glicolítica se concentram, sendo, portanto, considerado um tipo especializado de peroxisomo. Essa organela está envolvida com várias funções como B-oxidação de ácidos graxos e metabolismo de carboidratos, convertendo glicose em 3-fosfoglicerato (Oppendoes e Michels, 1991; Hannaert et al., 2003). Outra organela citoplasmática presente é o acidocalcisomo, rico em cálcio e fosfato e de pH ácido. O acidocalcisomo está presente principalmente na periferia da célula, e varia em quantidade dependendo do estágio evolutivo do parasita. A forma amastigota apresenta um número mais elevado dessas organelas, uma vez que no ambiente intracelular a concentração de cálcio é menor. Além disso, os acidocalcisomos estão envolvidos com outros processos biológicos, como regulação osmótica, homeostase do pH intracelular e adaptação a condições de estresse ambiental (Do Campo e Moreno, 2011).

O retículo endoplasmático (RE) liso e rugoso é encontrado por todo o corpo celular de todas as formas evolutivas de *T. cruzi*. O único complexo de Golgi está sempre presente e é localizado próximo ao cinetoplasto e à bolsa flagelar, na face *trans*, de onde brotam as vesículas (De Souza, 2002).

1.7 VIA ENDOCÍTICA EM *T. CRUZI*

O processo de endocitose nestes protozoários ocorre pela bolsa flagelar ou pelo citóstoma. Em *T. cruzi* este processo já foi observado e descrito apenas nas formas epimastigotas e amastigotas (De Souza et al., 2009; Batista et al., 2015). O citóstoma é uma invaginação especializada na membrana plasmática que penetra na célula, atingindo a região posterior da célula após o núcleo do parasita (Porto-Carreiro et al., 2000; De Souza et al., 2009). As moléculas endocitadas pelo citóstoma são internalizadas em vesículas que se fundem e formam os reservossomos, organelas esféricas que acumulam proteínas endocitadas, para futura degradação (Soares et al., 1992). Por essa razão são conhecidos como compartimentos pré-lisossomais ou endossomos tardios. Entre as hidrolases presentes nos reservossomos, destaca-se a presença da principal cisteína proteinase de *T. cruzi*, a cruzipaina, um fator fundamental para a virulência do parasita durante a invasão da célula hospedeira e para a sobrevivência intracelular, sendo, portanto, um alvo terapêutico para a doença de Chagas (revisto por Scharfstein, 2010). Os reservossomos estocam, além do material ingerido, lipídeos e colesterol e devido a isto é proposto que estas organelas participem como fonte de energia no processo de diferenciação do parasita (Soares e De Souza, 1988; Sant'Anna et al., 2008; Pereira et al., 2011).

1.8 CLATRINA E COMPLEXOS ADAPTADORES EM TRIPANOSOMATÍDEOS

Estudos anteriores com *T. brucei* e *Leishmania spp.* elucidam que a clatrina e os complexos adaptadores são importantes para a infectividade e viabilidade dos parasitas tripanosomatídeos. Em *Leishmania mexicana* já foi demonstrado que o nocaute das subunidades AP1- μ e AP1- σ do complexo AP-1 não interferem na viabilidade e sim na infectividade *in vitro* dos parasitas em macrófagos (Gokool, 2003). Estudos utilizando técnica de silenciamento das subunidades AP1- μ e AP1- γ em *T. brucei* levou a letalidade do parasita (Allen et al., 2007; Tazeh et al., 2009).

Em trabalhos recentes do nosso grupo de pesquisa já foram produzidos anticorpos policlonais para a subunidade AP1- γ de *T. cruzi* em camundongos. Este estudo demonstrou a existência do complexo AP-1 em *T. cruzi* e demonstrou a sua presença no complexo de Golgi, como em outras células eucarióticas (Moreira et al., 2013). Os anticorpos produzidos neste trabalho foram utilizados para confirmar estudos recentes de nocaute gênico e ensaios de imunoprecipitação destas subunidades (dados não publicados).

Estudos realizados com clatrina mostraram que essa proteína possui localização na região anterior, onde estão localizados a bolsa flagelar e o complexo de Golgi em epimastigotas de *T. cruzi* (Correa et al., 2007; Kalb et al., 2014). Outros dados interessantes foram mostrados nesse trabalho em ensaio de imunoprecipitação e análise por proteômica: tanto AP-1 quanto AP-4 interagem com essa proteína mas não AP-2, mostrando divergência do que acontece com outros eucariotos onde apenas AP-1 e AP-2 claramente interagem com clatrina (Kalb et al., 2016; Canagarajah et al., 2013). Entretanto ainda não se sabe qual é a função desses adaptadores nesse organismo.

Apesar da conhecida importância do complexo AP-2 na endocitose mediada por clatrina, este adaptador não se encontra em *T. brucei*. Além disso, o AP-4, mediador do transporte seletivo da proteína precursora de amiloide para o endossomo, também não é encontrado em algumas espécies como de *Phytomonas* a *Leishmania* (Berriman et al., 2005; Burgos et al., 2010; Field et al., 2007; Nevin & Dacks, 2009). Os tripanosomatídeos africanos, como o *T. brucei* possuem um eficiente mecanismo de defesa alternativo, o que pode explicar a falta do complexo AP-2 como uma adaptação devido ao estilo de vida do parasita. Já em *T. cruzi* os quatro complexos adaptadores estão presentes em bancos de dados genômicos, o que gera um questionamento quanto à importância destes complexos para outros parasitas e para *T. cruzi* e quanto à hipótese de ser ou não apenas uma questão de adaptação evolutiva (Manna et al., 2013).

O nocaute gênico é uma ferramenta importante para estudo da função de proteínas em *T. cruzi*. A técnica envolve a deleção do gene por recombinação homóloga substituindo-o por marcadores de seleção (Clayton, 1999). Dessa forma é possível avaliar o efeito da ausência da proteína em questão no parasita mutante. Nesse sentido, o presente trabalho tem como objetivo dar início ao processo de nocaute gênico das subunidades AP2- β e AP4- ϵ em *T. cruzi* a fim de analisar a função desses adaptadores no parasita e aprofundar os estudos nos processos básicos fundamentais como multiplicação, endocitose, infectividade e o próprio transporte de vesículas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Construção de ferramentas de genética reversa para estudo da função e caracterização do gene AP2- β e AP4- ϵ em *T. cruzi*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenhar oligonucleotídeos específicos para amplificação das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* do genes AP2- β e AP4- ϵ ;
- Amplificar os fragmentos das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* dos genes AP2- β e AP4- ϵ ;
- Clonar os fragmentos amplificados nos vetores pNEO2 e pHIGRO2;
- Amplificar os cassetes contendo as intergênicas *upstream* e *downstream*, assim como o gene de resistência aos antibióticos neomicina e higromicina;
- Transfectar os cassetes em formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- Selecionar os parasitas mutantes com as drogas G418 e higromicina.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ORGANISMOS

- *Escherichia coli*

Linhagens de bactérias quimiocompetentes: TOP10 e DH5 α

- *Trypanosoma cruzi*

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* do clone Dm28c cultivadas em meio de cultura LIT com passagem a cada três dias a partir do inóculo contendo 1×10^6 células/mL.

3.2 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS

Em trabalhos anteriores foram obtidas as identificações dos genes de cada subunidade dos complexos adaptadores AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4 de *T. cruzi* (Correa et al., 2007; Manna et al., 2013). Com base nesses dados foi possível encontrar a sequência codificante assim como as intergênicas dos genes no banco de dados TriTryp (Kinetoplastid Genomics Resource: <http://tritrypdb.org/tritrypdb/>) utilizando a identificação de cada gene. A subunidade β do complexo AP-2 apresenta a identificação “Tc00.1047053506297.180” e a subunidade ϵ do complexo AP-4 “Tc00.1047053507023.10”. Com isso e com o auxílio do programa SnapGene, foi possível desenhar oligonucleotídeos específicos para as regiões intergênicas *upstream* (parte final da intergênica) e *downstream* (parte inicial da intergênica). Para cada região foi desenhado um oligonucleotídeo direto (forward, F) e um reverso (reverse,

R) contendo sítios para as enzimas de restrição para clonagem em vetores de clonagem de *E. coli*. Também foram desenhados primers externos a região a ser amplificada para futura confirmação da inserção do cassete no locus correto.

3.3 ESQUEMA GERAL DA CLONAGEM PARA REALIZAÇÃO DO NOCAUTE GÊNICO

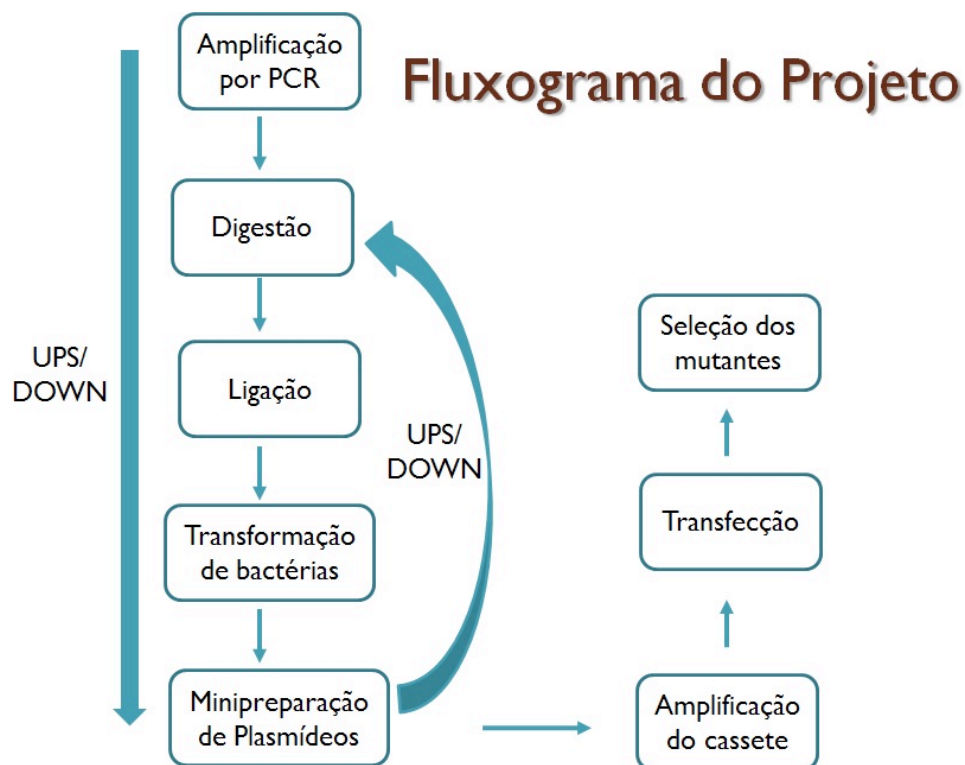


Figura 3.1 – Fluxograma da Metodologia. As regiões intergênicas do gene de interesse devem ser amplificadas e uma delas escolhidas para iniciar o processo de clonagem, passando pelas etapas de digestão juntamente ao vetor de interesse, ligação, transformação de bactérias e minipreparação de plasmídeos. Após isso, a outra intergênica já amplificada passa pelos mesmos processos juntamente à miniprep obtida anteriormente. O cassete obtido é amplificado, os parasitas são transfectados e os mutantes selecionados para análise. Todo o processo se repete para o outro vetor de interesse, a fim de promover o nocaute do segundo alelo.

O vetor pHIGRO2 (Figura 3.2) possui um gene que confere resistência ao antibiótico higromicina enquanto que o gene do vetor pNEO2 (Figura 3.3) confere resistência ao antibiótico G418 ou neomicina. Ambos possuem um gene que confere resistência à ampicilina, antibiótico usado para selecionar clones positivos para a construção. O plasmídeo recombinante passará pelas mesmas etapas já descritas para clonagem da região a jusante do gene (*downstream*).

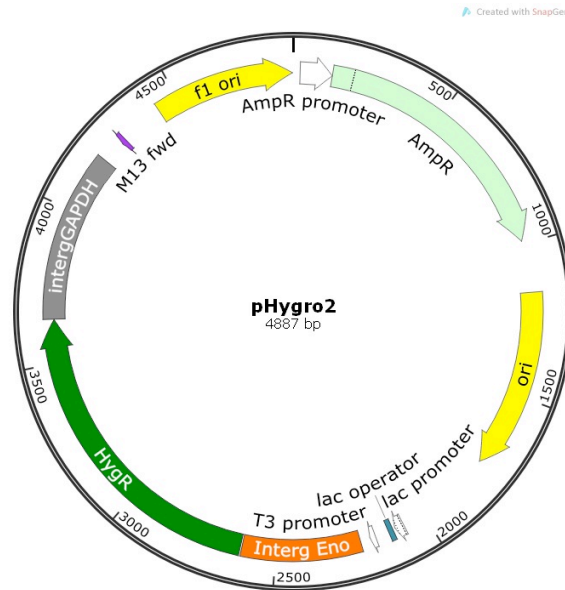


Figura 3.2 – Vetor pHYGRO2. Em verde escuro é possível observar o gene de resistência ao antibiótico higromicina e em azul lilás e laranja as regiões intergênicas de genes que são expressos constitutivamente em *T. cruzi*.

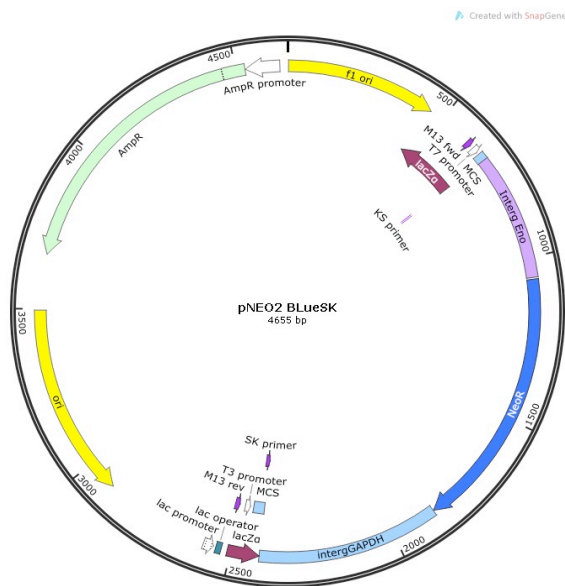


Figura 3.3 – Vetor pNEO2. Em azul escuro é possível observar o gene de resistência ao antibiótico G418 e em azul claro e lilás as regiões intergênicas de genes que são expressos constitutivamente em *T. cruzi*.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DAS SUBUNIDADES AP2- β e AP4- ϵ

As amplificações por PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) seguiram as descrições de Sambrook e colaboradores (1989) contendo 10pMol de cada oligonucleotídeo, 1,5mM de MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP, 100ng de DNA molde de *T.cruzi*, tampão Taq DNA polimerase 1x, Taq DNA polimerase e água qsp 50ul. As reações foram submetidas de 30 a 35 ciclos, sendo as condições, em ordem: 30 segundos de desnaturação a 94°C, 30 segundos de anelamento a 55°C, 1 minuto de extensão a 72°C. Antes de o primeiro ciclo iniciar as reações passam por 4 minutos a 94°C e, ao final, 7 minutos a 72°C. Todas as reações foram realizadas em termociclador Proflex PCR System *by Life Technologies*.

Para confirmar as amplificações, as amostras foram diluídas em tampão de amostra de DNA (10x) e submetidas à eletroforese em matriz de agarose 0,8%-1% a uma tensão de 100V, conforme descrito por Sambrook e colaboradores (1989). O DNA foi corado com solução de brometo de etídio (0,5ug/ml) e visualizado sob luz ultravioleta em transiluminador, registrado em sistema L-PIX Molecular Imaging Loccus Biotecnologia.

3.5 PURIFICAÇÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DAS SUBUNIDADES AP2- β e AP4- ϵ

Após confirmação da amplificação do fragmento de interesse, este foi purificado por extração com fenol/clorofórmio ou pelo QIAquick PCR Purification KIT. O primeiro método consiste na adição de fenol num volume igual ao da reação de PCR, seguida de centrifugação a 13.000rpm por 2 minutos e precipitação com etanol absoluto na presença de acetato de sódio 0,3M por 30 minutos em gelo seco. Após 10 minutos de centrifugação a 13.000rpm, lava-se com 1ml de etanol 70% e o DNA precipitado, após secar a temperatura ambiente, é diluído em tampão TE e quantificado por espectrofotometria UV a 260nm (Spectrophotometer ND-1000), assim como o DNA eluído da coluna de purificação seguindo o protocolo de fabricação do KIT.

3.6 DIGESTÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DAS SUBUNIDADES AP2- β e AP4- ϵ E DOS VETORES pHIGRO2 E pNEO2

As digestões do inserto purificado e dos vetores de interesse ocorrem com, no mínimo, 2ug de material e 20U de cada enzima, e seus respectivos tampões para que a eficiência seja o

mais próximo de 100%, a 37°C por 2h ou por 16h (*overnight*). Após cada digestão o material é purificado seguindo o protocolo descrito acima.

3.7 LIGAÇÃO DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DAS SUBUNIDADES SUBUNIDADES AP2- β e AP4- ϵ AOS VETORES E TRANSFORMAÇÃO POR CHOQUE TÉRMICO

O inserto digerido é, então, ligado ao vetor de interesse previamente digerido numa relação molar de 3:1 (inserto:plasmídeo) em uma reação contendo o tampão específico para 1U da enzima de ligação T4 DNA Ligase. Essa reação é incubada a 16°C *overnight* ou a 4°C durante o final de semana e, após isso, transformada em cepa de bactéria quimiocompetente de *Escherichia coli*. A transformação ocorre adicionando o plasmídeo recombinante às bactérias e deixados interagir por 30 minutos a 4°C, seguida de um choque térmico de 1 minuto a 42°C e 2 minutos a 4°C. Após 1h de recuperação da transformação em 1 mL de LB 1x a 37°C, 200rpm, 50uL e 200uL de cultura foram plaqueados em placas de LB contendo Ampicilina como antibiótico de seleção.

3.8 SELEÇÃO DOS CLONES RECOMBINANTES

As colônias que cresceram foram selecionadas para confirmação da inserção do inserto ao plasmídeo, através do método de Toothpick, em que ocorre a lise da colônia pelo tampão de lise e incubação a 65°C por 10 minutos e, por fim, o resultado se dá por comparação de tamanho entre o plasmídeo original com o recombinante por eletroforese em gel de agarose 0,8%. As colônias que apresentam um tamanho diferenciado podem indicar o sucesso da clonagem e são selecionadas para serem confirmadas por PCR de colônia. A PCR de colônia difere de uma PCR comum já descrita apenas pelo DNA molde, que é obtido pela palitagem da colônia a ser testada no fundo do tubo de reação.

3.9 PURIFICAÇÃO DOS PLASMÍDEOS OBTIDOS – MINIPREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS

As colônias positivas foram propagadas em 10mL de meio LB contendo o antibiótico de resistência e cultivadas *overnight* a 37°C sob agitação constante de 200rpm. As células obtidas foram centrifugadas a 9.000rpm por 3 minutos e seguiram para extração do plasmídeo seguindo o protocolo do fabricante do QIAprep Spin Miniprep KIT. Além disso, após a obtenção da miniprep de cada clone selecionado, realizou-se a confirmação por PCR utilizando a miniprep como molde de DNA e os oligonucleotídeos específicos para a

sequência de interesse. O resultado foi analisado em eletroforese de gel de agarose 1%, com aplicação de 5uL de cada reação de PCR.

3.10 TRANSFECCÃO DE *T. cruzi* COM OS CASSETES

Os plasmídeos recombinantes foram utilizados como molde em reação PCR para obtenção dos cassetes contendo as regiões intergênicas do gene além de marcadores de seleção (Figura 3.4).

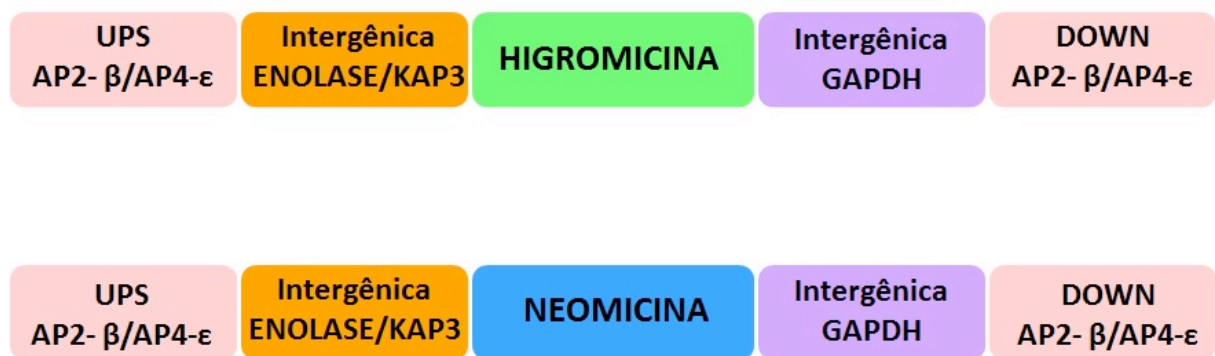


Figura 3.4 – Esquemas dos cassetes para nocaute gênico. O primeiro e o segundo cassete contém as regiões intergênicas do gene de interesse (*upstream* e *downstream*), as regiões intergênicas que são expressas constitutivamente em *T. cruzi* e o marcador de seleção que confere resistência aos antibióticos higromicina e G418, respectivamente.

O cassete contendo o primeiro marcador de seleção foi transfectado em formas epimastigotas usando o procedimento descrito por Souza et al. (2010)¹. Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram coletadas por centrifugação a 6.000xg por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado, o sedimento celular foi lavado duas vezes em 1mL de PBS estéril e as células foram coletadas novamente por centrifugação nas mesmas condições anteriores. Os parasitas foram então ressuspensos em 1mL de tampão para eletroporação (NaCl 140 mM, Hepes 25 mM, pH 7,5, Na₂HPO₄ 0,74 mM) e 400ul de cada suspensão celular foram misturados com 10 µg do cassete em questão em uma cubeta de eletroporação de 0,2 mm de gap (BIORAD). Uma alíquota da suspensão de parasitas na qual

¹ Como norma vigente do Instituto Carlos Chagas/FioCruz-PR, alunos de Iniciação Científica não são autorizados a realizar atividades que envolvam o contato com parasitas. Nesse caso, a parte deste projeto que envolve a transfecção de parasitas foi, preferencialmente, realizada pela colaboradora Me. Claudia Maria do Nascimento Moreira.

não foi adicionado o cassete também foi submetida à eletroporação sendo, portanto, o controle negativo. As amostras foram submetidas a dois pulsos de 450 volts e 500 μ F em eletroporador GenePulser II (BioRad) e posteriormente inoculadas em 10mL de meio LIT contendo 1000 unidades de penicilina e 10 μ g de streptomina. As culturas foram mantidas a 28°C em estufa BOD. Após 24 horas de cultivo, foram adicionados 500 μ g/mL do antibiótico higromicina para seleção da população resistente. As culturas transfectadas foram mantidas em meio LIT com higromicina de 7 a 10 dias. Após este tempo, foram diluídas (1:4) em 10mL desse mesmo meio e incubadas de 5 a 8 dias a 28°C. Esse procedimento é repetido até que o controle negativo (células transfectadas sem cassete) não apresente crescimento.

A confirmação do nocaute será feita através de PCR utilizando o DNA total dos parasitas resistentes ao marcador de juntamente com os oligonucleotídeos externos ao cassete para confirmação da integração deste nos loci correspondentes.

4 RESULTADOS

4.1 DESENHO DOS OLIGONUCLEOTÍDEOS ESPECÍFICOS

Os oligonucleotídeos específicos desenhados (Tabela 4.1) contêm sítios para as enzimas de restrição KpnI e SalI para as regiões *upstream* aos genes e BamHI e XbaI para as regiões *downstream* aos genes de interesse AP2- β e AP4- ϵ . Os fragmentos amplificados têm em torno de 400pb para o complexo AP2- β e em torno de 650pb para o complexo AP4- ϵ . Nas Figuras 4.1 e 4.2 é possível observar, esquematicamente, a posição de cada primer desenhado em relação ao gene de interesse.

Gene	Oligonucleotídeos	Enzimas de Restrição	Tamanho
AP2β (<i>upstream</i>)	F5'GGGGGGTACCAAGGGCTAAAAACAACAACGCGG ATTG3' R5'CACGAACTATCGTCGAcTCAAACGCACGACTAAA3' EXTF5'TGGTTGCAGTCACGGCGATCCATCCCTTTG3'	KpnI SalI	391pb
AP2β (<i>downstream</i>)	F5'GGTGCAAAGACCCGCAGGATCCACCTGTTTTGGCG3' R5'TTTCGAATGTTGAATCTAGATTGGTCAAATAAACAAG CAGGAA3' EXTR5'CCTTCATGTCGCGATTGCCGTCAGCCTTCT3'	BamHI XbaI	383pb
AP4ϵ	F5'GGGGGGTACCGTTACTGACGGGAGCGATGAAGAGGAA GAAA3'	KpnI	

(upstream)	R5'GCGTCTTCCTCCTGCGTCTGACTTGGACTCCCCACG3' EXTF5'GAAGAAATTCGAGAGACGCCTTTGGAAGAAAAA3'	SalI	649pb
AP4ε (downstream)	F5'GGGGGTACCGTACGGGCAGATGACAAGGGATTTGCG GC3' R5'GAAATCTAGACCGCCTGCTTCCTCAGTTCCTTGTGTCTA ACACC3' EXTR5'CCTGCATAGTTTCACTCGGGGCAAACGC3'	BamHI XbaI	626pb

Tabela 4.1 - Oligonucleotídeos específicos para AP2-β e AP4-ε. Para cada subunidade foram desenhados oligonucleotídeos para as regiões intergênicas *upstream* e *downstream*, contendo sítios para enzimas de restrição. Primers externos (EXT), primers diretos (F), primers reversos (R).

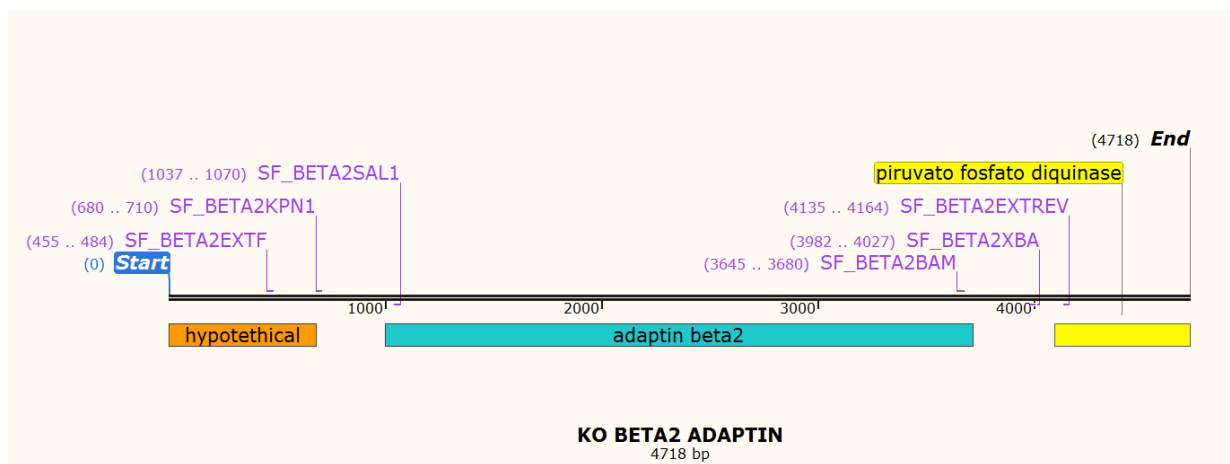


Figura 4.1 – Esquema dos oligonucleotídeos produzidos para a subunidade β do complexo AP-2.

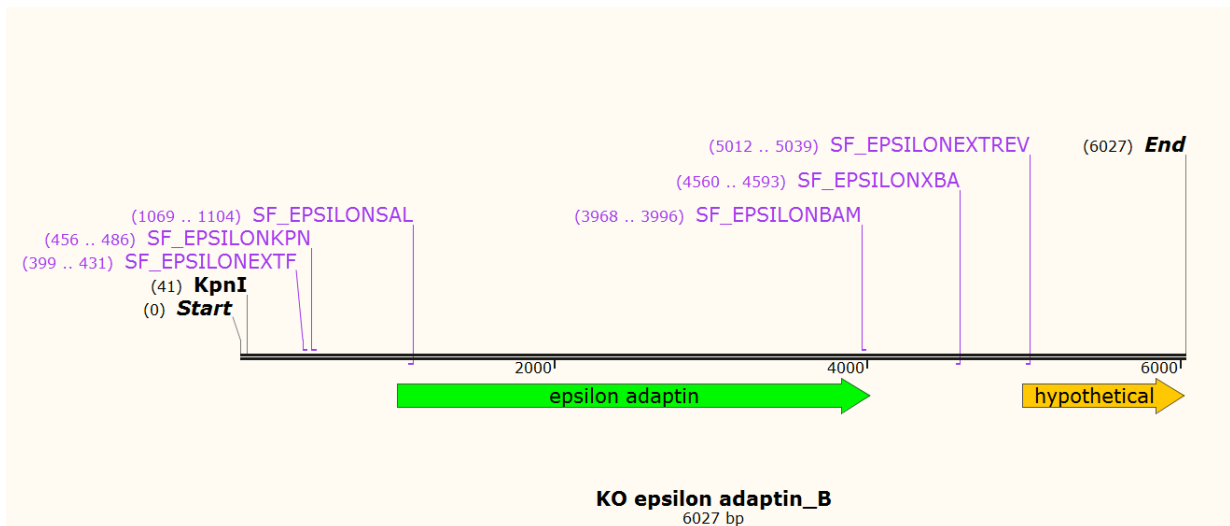


Figura 4.2 - Esquema dos oligonucleotídeos produzidos para a subunidade ε do complexo AP-4.

4.2 NOCAUTE GÊNICO AP4- ϵ

Para o adaptador AP4- ϵ , optou-se por iniciar a amplificação pela região intergênia *upstream*. Uma reação de PCR foi realizada a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, e o resultado (Figura 4.3) confirma a amplificação do fragmento de interesse no tamanho previsto de acordo com a Tabela 4.1.

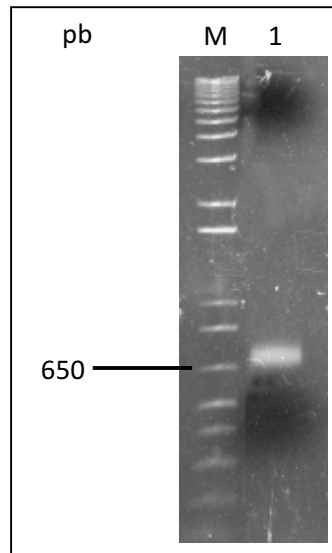


Figura 4.3 - Amplificação da região intergênia *upstream* do gene AP4- ϵ . M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1- amplificação da região *upstream* ~650pb.

Depois de purificado, o fragmento *Ups* e o vetor pHIGRO2 foram digeridos, primeiramente, com a enzima KpnI, em tampão NEB1 e BSA, *overnight* a 37°C e depois com a enzima Sall, em tampão NEB4, *overnight* a 37°C. A confirmação da digestão se deu comparando o vetor circularizado com o linearizado e analisando a especificidade da digestão pelo inserto (Figura 4.4).

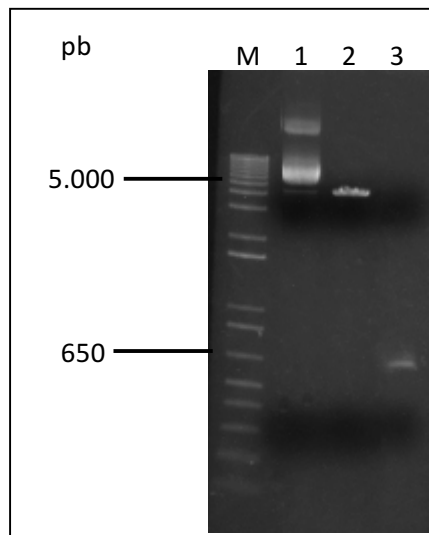


Figura 4.4 – Digestão pHIGRO2 e AP4- ϵ *ups*. M – Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – pHIGRO2 não digerido; 2 – pHIGRO2 digerido; 3 - AP4- ϵ *ups* digerido.

O inserto foi ligado ao vetor e transformado em bactérias quimiocompetentes TOP10. A confirmação desta clonagem se deu primeiramente pela técnica do Toothpick (Figura 4.5A) e, após seleção de clones 53 e 55 e minipreparação de plasmídeos, por PCR, utilizando os oligonucleotídeos específicos para a região *Ups* (Figura 4.5B).

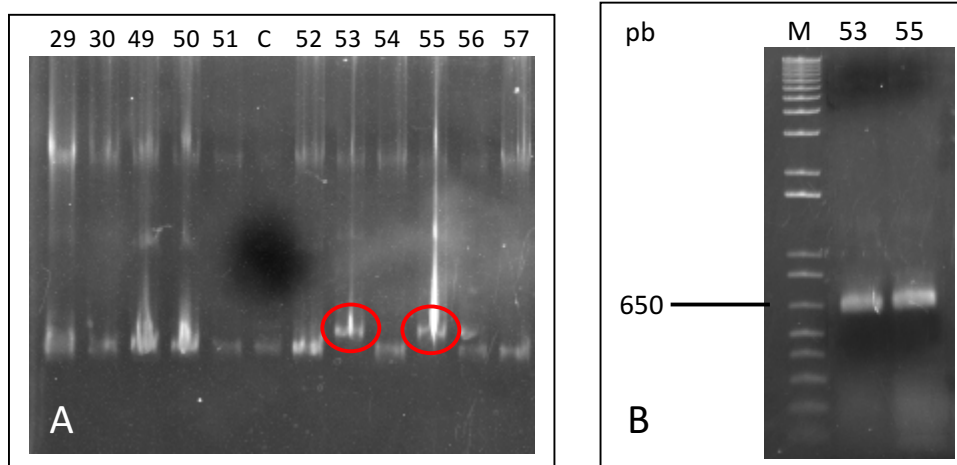


Figura 4.5 - Confirmação da Clonagem. **A** - Análise dos clones obtidos na clonagem de AP4- ϵ *ups* em pHIGRO2. Os números indicam os clones testados e C o controle do vetor circularizado. Os clones positivos apresentam uma altura superior ao controle. Escolha dos clones 53 e 55. **B** - PCR de colônia dos clones 53 e 55 AP4- ϵ *ups* em pHIGRO2. M – Marcador 1kb Plus DNA Ladder; Clones 53 e 55 positivos ~650pb.

Os clones se confirmaram positivos, uma vez que amplificaram no tamanho previsto de em torno de 650pb. Após confirmação da clonagem da região *Ups* em pHIGRO2, iniciaram-se as etapas para clonagem da região *Down* nesse plasmídeo. A PCR realizada para amplificar este fragmento utilizando os oligonucleotídeos específicos apresentou um rendimento bom, conforme demonstrado no resultado da Figura 4.6.

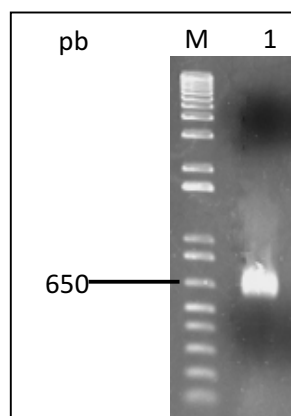


Figura 4.6 – Amplificação da região intergênica *downstream* do gene AP4-ε. M – Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – amplificação da região *downstream* ~650pb.

Após purificação desta PCR, o inserto AP4-ε *downstream* e o plasmídeo 53 referente à recombinação AP4-ε *upstream* em pHIGRO2 foram digeridos; primeiramente com a enzima BamHI, na presença do tampão NEB3 e BSA e, posteriormente, com a enzima XbaI em tampão NEB4 e BSA. A confirmação da digestão se deu comparando o plasmídeo circularizado com o linearizado (Figura 4.7).

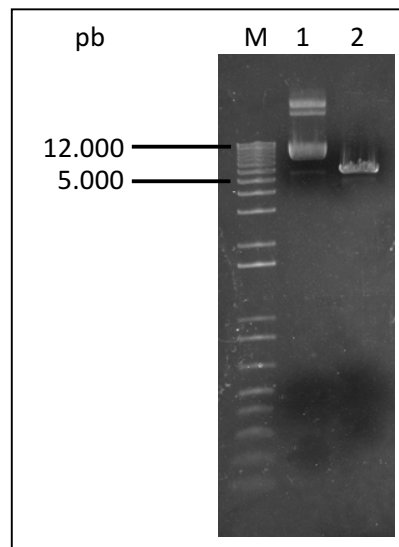


Figura 4.7 – Digestão da construção AP4-ε *ups* + pHIGRO2 e AP4-ε *down*. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – construção não-digerida; 2 – construção digerida.

O inserto foi ligado ao plasmídeo e transformado em bactérias quimiocompetentes TOP10. A confirmação desta clonagem se deu primeiramente pela técnica do Toothpick que, após a análise de muitos clones, apenas o primeiro apresentou um tamanho superior em relação ao controle (Figura 4.8A). Este clone seguiu para confirmação por PCR de colônia, utilizando os oligonucleotídeos específicos para amplificar todo o cassette (Figura 4.8B).

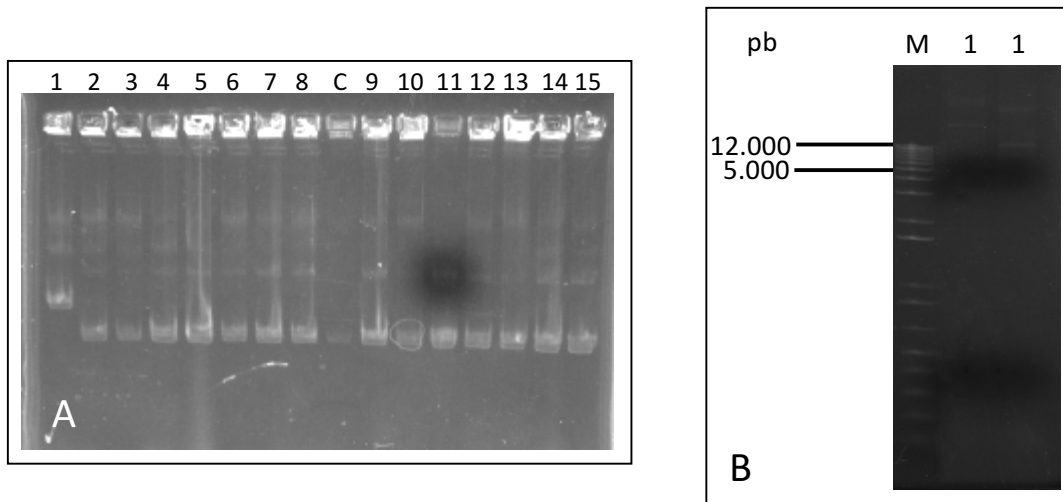


Figura 4.8 – Confirmação da Clonagem. **A** - Análise dos clones obtidos na clonagem de AP4- ϵ *down* em AP4- ϵ *ups* + pHIGRO2. Os números indicam os clones testados e C o controle, a construção anterior. Os clones positivos apresentam um tamanho superior ao controle. Escolha do clone 1. **B** - PCR de colônia do clone 1. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – amplificação do cassete do clone 1 em duplicata

É possível observar que o cassete não foi amplificado. Foram realizados alguns testes na tentativa de obter o cassete e confirmar a clonagem, dentre eles: digestão da construção com as enzimas KpnI e XbaI a fim de liberar o fragmento de interesse e amplificá-lo com maior facilidade posteriormente, diferentes temperaturas e concentrações do DNA molde. Sem sucesso, uma PCR foi realizada para verificar a clonagem isolada da região *Ups* e da região *Down* na construção. O resultado (Figura 4.9) comprova a clonagem apenas da região *Ups*.

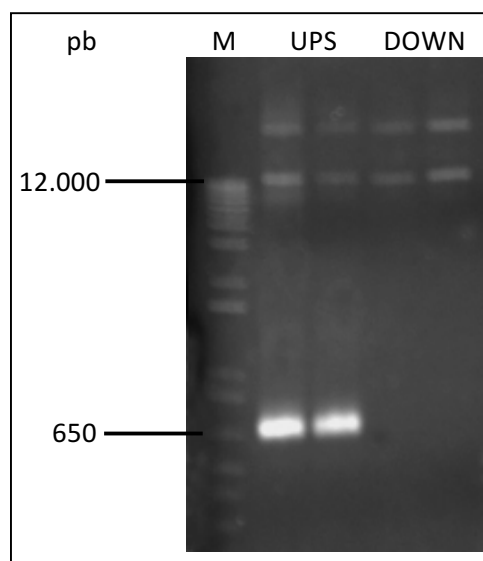


Figura 4.9 – Teste de amplificação da região intergênica *upstream* e *downstream* na construção do gene AP4- ϵ Higo. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; UPS representa a amplificação dessa região ~650pb; DOWN representa que não esta região não foi clonada na construção .

Todas as etapas foram realizadas novamente, mas não houve sucesso na clonagem do fragmento ao vetor. Uma estratégia utilizada foi de clonar a região *downstream* primeiramente no vetor pGEM-T Easy e, posteriormente, digerir desse para clonar em pHIGRO2. A ligação se deu na proporção 3:1, utilizando tampão e enzima próprios desse vetor, *overnight* a 4°C e transformada em bactérias quimiocompetentes TOP10. Nesse sistema de clonagem é possível diferenciar os clones negativos dos positivos através da coloração azul. Dessa forma, as colônias brancas foram selecionadas para confirmação da inserção da sequência ao vetor através de PCR de colônia utilizando os primers específicos para a região *Down* (Figura 4.10).

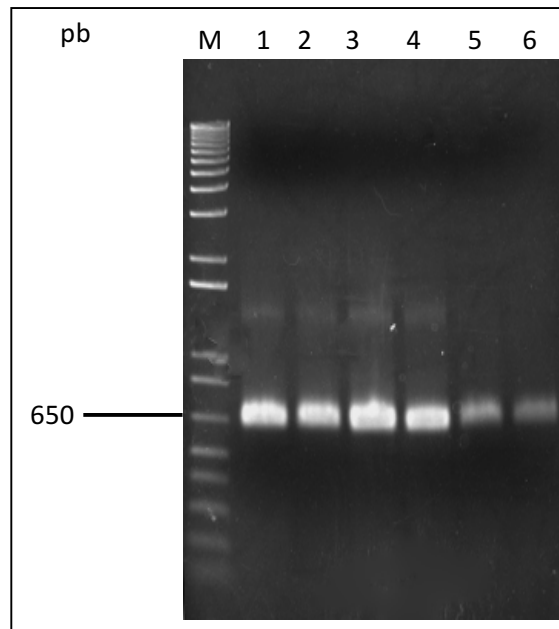


Figura 4.10 – Clonagem do AP4- ϵ *down* em pGEMT-easy. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; Os números indicam os clones selecionados, positivos para a clonagem ~650pb.

Todos os clones amplificaram no tamanho correspondente ao inserto *Down*. Foi realizada a minipreparação de plasmídeos do clone 2 e esta construção foi, primeiramente, digerida com a enzimas BamHI, por 2h a 37°C (Figura 4.11).

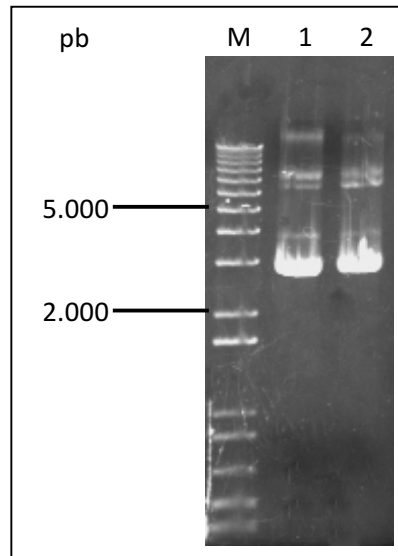


Figura 4.11 – Digestão da construção AP4- ϵ down em pGEMT-easy com BamHI. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – plasmídeo não digerido; 2 – plasmídeo digerido com a enzima BamHI.

É possível observar pelo perfil de bandas que a digestão com BamHI não foi totalmente eficaz. Após algumas tentativas sem sucesso de melhorar a especificidade, optou-se por digerir com XbaI, a fim de liberar o fragmento de interesse e extraí-lo do gel para purificação. O resultado (Figura 4.12) mostra que não houve liberação do inserto (esperado no tamanho de aproximadamente 650pb) após digeri-lo com ambas as enzimas de restrição necessárias.

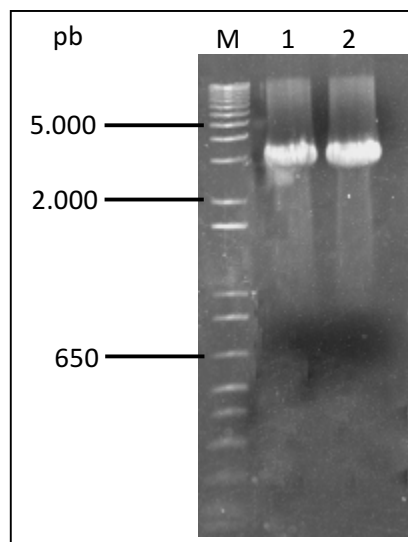


Figura 4.12 – Digestão da construção AP4- ϵ down em pGEMT-easy com XbaI. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 e 2 representam o plasmídeo digerido. No tamanho de 650pb não há a presença do fragmento de interesse.

Devido à limitação do tempo de realização do projeto, a obtenção deste nocaute teve que ser interrompida nesta etapa.

4.3 NOCAUTE GÊNICO AP2- β

As ampliações das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* do adaptador AP2- β foram realizadas a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, e o resultado (Figura 4.13) confirma a amplificação dos fragmentos nos tamanhos previstos de acordo com a Tabela 4.1.

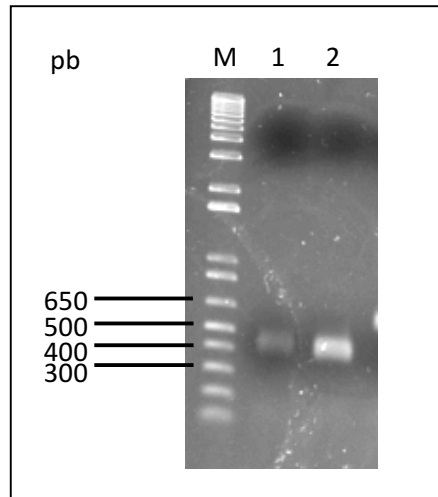


Figura 4.13 – Amplificação das regiões intergênicas *upstream* e *downstream* do gene AP2- β . M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – amplificação da região *upstream*; 2 – amplificação da região *downstream*. 1 e 2 ~400pb.

Depois de purificado, o fragmento da intergênica *downstream* e o vetor pHIGRO2 foram digeridos duplamente com as enzimas BamHI e XbaI, em tampão NEB2, por 2h a 37°C. A confirmação da digestão se deu comparando o vetor fechado com o linealirizado. O inserto *down* foi também submetido à eletroforese a fim de observar a especificidade da digestão (Figura 4.14).

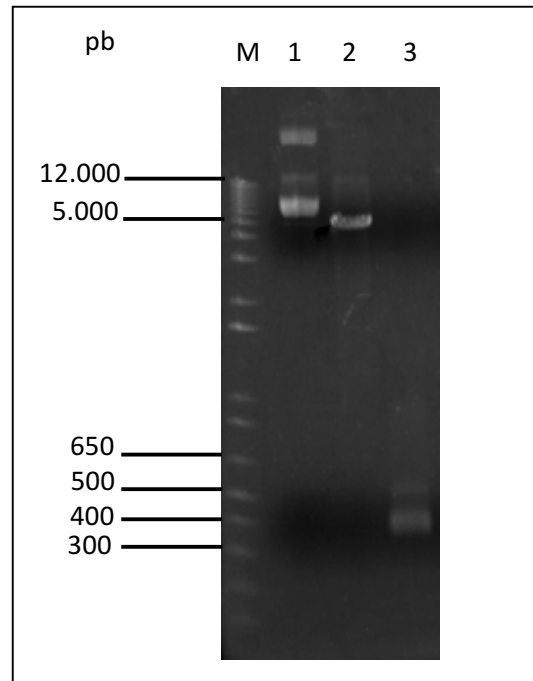


Figura 4.14 – Digestão pHIGRO2 e AP2-β *down*. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – pHIGRO2 não-digerido; 2 – pHIGRO2 digerido; 3 – AP2-β *down* digerido.

O inserto foi ligado ao vetor e transformado em bactérias quimiocompetentes DH5α. A confirmação desta clonagem se deu primeiramente pela técnica de Toothpick (Figura 4.15A) seguido pela minipreparação de plasmídeos dos clones positivos 7 e 17. A clonagem foi confirmada por PCR usando como molde os plasmídeos recuperados assim como os oligonucleotídeos específicos para a região *downstream* (Figura 4.15B).

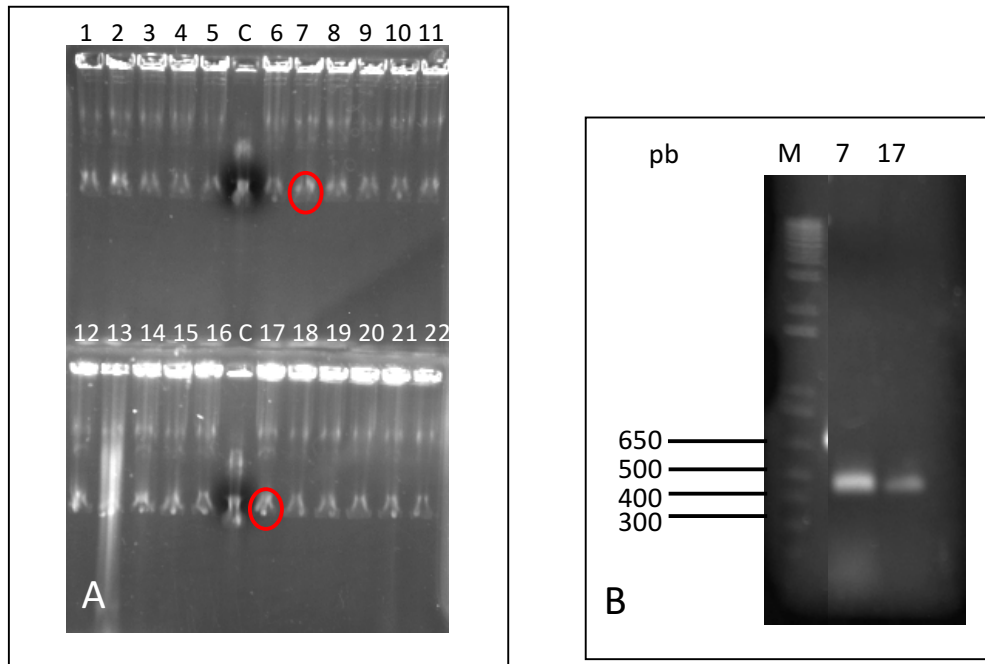


Figura 4.15 – Confirmação da Clonagem. **A** - Análise dos clones obtidos na clonagem de AP2- β *down* em pHIGRO2. Os números indicam os clones testados e C o controle do vetor circularizado. Os clones positivos apresentam um tamanho superior ao controle. Escolha dos clones 7 e 17. **B** – PCR de colônia dos clones 7 e 17 AP2- β *down* em pHIGRO2. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; Clone 7 e 17 positivos ~400pb.

Após confirmação da clonagem da região intergênica *downstream* no vetor pHIGRO2, iniciaram-se as etapas para a clonagem da região intergênica *upstream* a este plasmídeo. Como observado na Figura 4.16, o rendimento de amplificação da intergênica *ups* estava muito baixo. Após algumas tentativas de aumentar este rendimento alterando algumas condições da PCR, foi optado em realizar uma reação no total de 500uL. O resultado confirma a amplificação, apesar do baixo rendimento (Figura 4.16).

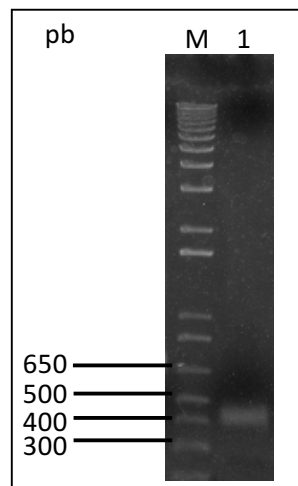


Figura 4.16 – Amplificação da região intergênia *upstream* do gene AP2- β . M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – amplificação da região *upstream* ~400pb.

Depois de purificado, o fragmento *ups* e o plasmídeo 17 referente à construção pHIGRO2+*down* foram digeridos com a enzima KpnI em tampão NEB1 e BSA e, posteriormente, com a enzima Sall-HF em tampão NEB4. A confirmação da digestão se deu comparando o plasmídeo circularizado com o linealizado e analisando a especificidade da digestão do inserto (Figura 4.17).

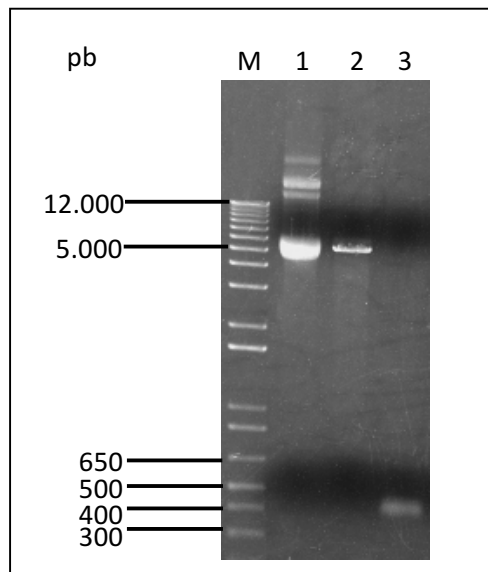


Figura 4.17 – Digestão construção AP2- β *down* + pHIGRO2 e AP2- β *ups*. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 – construção não-digerida; 2 – construção digerida; 3 – AP2- β *ups* digerido.

O inserto foi ligado ao plasmídeo e transformado em bactérias quimiocompetentes TOP10. A confirmação desta clonagem se deu primeiramente pela técnica do Toothpick (Figura 4.18A) e, após seleção dos clones 21 e 28 e minipreparação de plasmídeos, por PCR utilizando os oligonucleotídeos específicos para amplificar somente a região *Ups*, somente a região *Down* e todo o cassete (Figura 4.18B).

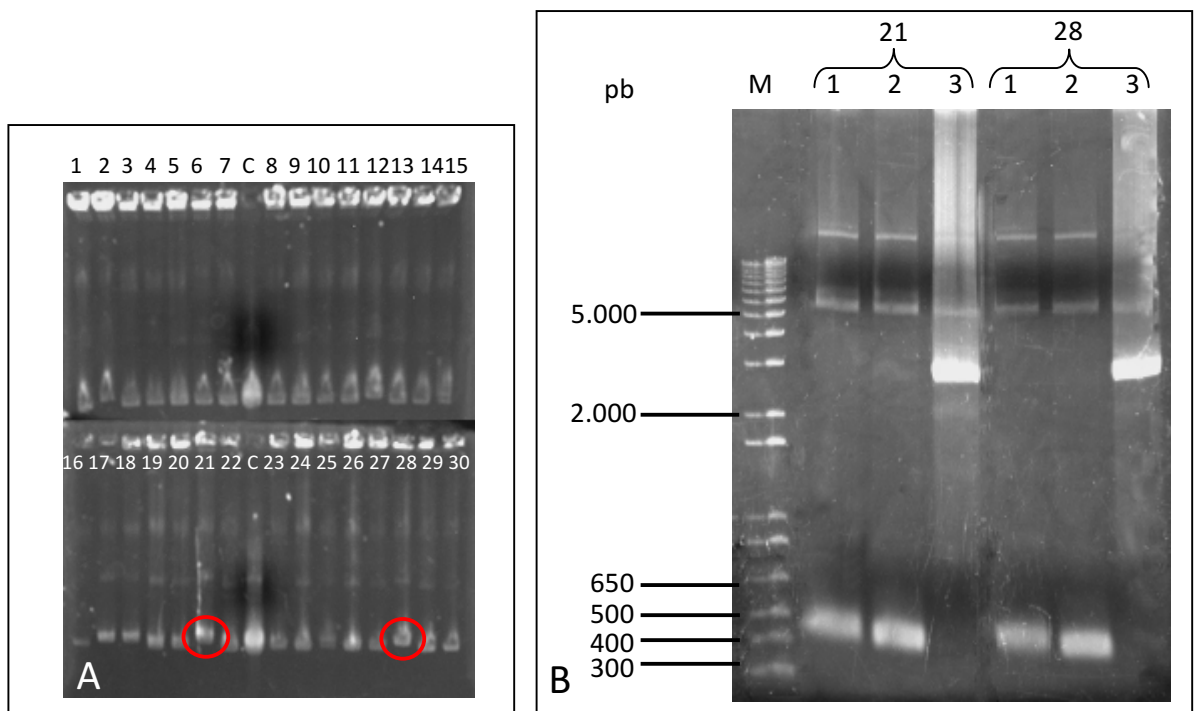


Figura 4.18 – Confirmação da Clonagem. **A** - Análise dos clones obtidos na clonagem de AP2- β *ups* em AP2- β *down* pHIGRO2. Os números indicam os clones testados e C o controle, a construção anterior. Os clones positivos apresentam um tamanho superior ao controle. Escolha dos clones 21 e 28. **B** - PCR de colônia dos clones 21 e 28 AP2- β *ups* *down* em pHIGRO2. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; 1 - Amplificação da região *ups* ~400pb. 2 - Amplificação da região *down* ~400pb. 3 - Cassete amplificado ~3.000pb. Clones 21 e 28 positivos.

O tamanho dos fragmentos indica que houve a amplificação do cassete, ou seja, ambas as regiões *Ups* e *Down* estão clonadas em pHIGRO2. A fim de melhorar a especificidade (diminuir o arrastado nas bandas do gel), realizaram-se alguns testes com outras condições de amplificação. Primeiramente foi testada uma menor concentração de DNA (10ng) utilizado como molde para a PCR nas temperaturas de anelamento de 55°C, 57°C e 60°C. Conforme a Figura 4.19, em menor concentração de DNA e maior temperatura de anelamento há uma maior especificidade na amplificação.

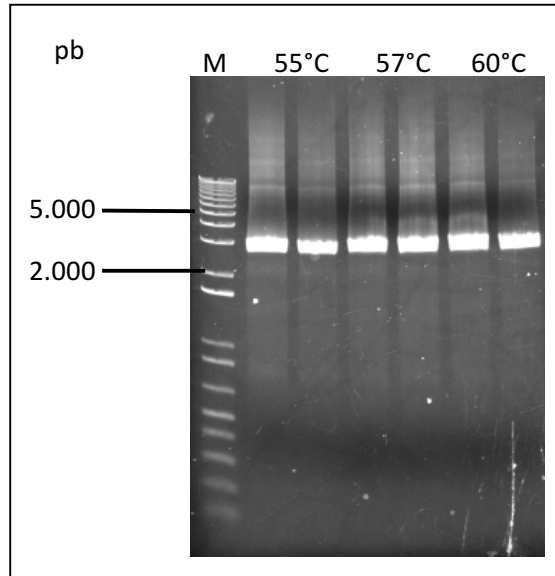


Figura 4.19 – Teste de condições para amplificar o cassete AP2- β Higromicina. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; Os valores em °C representam as diferentes condições de temperatura de anelamento testadas.

Outras condições foram testadas, alterando a concentração de DNA para 2ng, 5ng e 10ng na temperatura de anelamento de 62°C. O resultado obtido (Figura 4.20) indica que a 2ng a amplificação foi mais específica, e estas condições foram, então, as escolhidas para a amplificação em grande escala do cassete, num total de 1mL de reação.

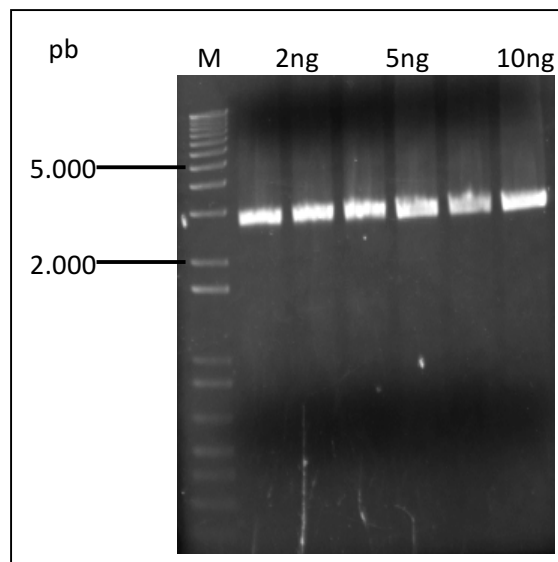


Figura 4.20 – Teste de condições para amplificar o cassete AP2- β Higromicina. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; Os valores em ng representam as diferentes concentrações de DNA testadas numa temperatura de anelamento de 62°C.

Após confirmação da amplificação da reação em larga escala, esta foi purificada *overnight*, a fim de aumentar o rendimento final, e o DNA precipitado foi ressuspensionado num total final de 90uL de *Elution Buffer*.

A fim de obter o segundo cassete, contendo o marcador de seleção Neomicina, optamos por trocar a sequência que codifica para o gene de resistência à higromicina pelo de neomicina. Para isso a miniprep referente ao cassete AP2- β com as intergênicas *upstream* e *downstream* clonadas em pHIGRO2 e o vetor pNEO2 foram digeridos com as enzimas EcoRI e HindIII para liberar o fragmento correspondente ao gene de resistência à Higromicina (~1100pb) e obter o plasmídeo para clonagem do fragmento do gene de resistência à Neomicina (~800pb) (Figura 4.21).

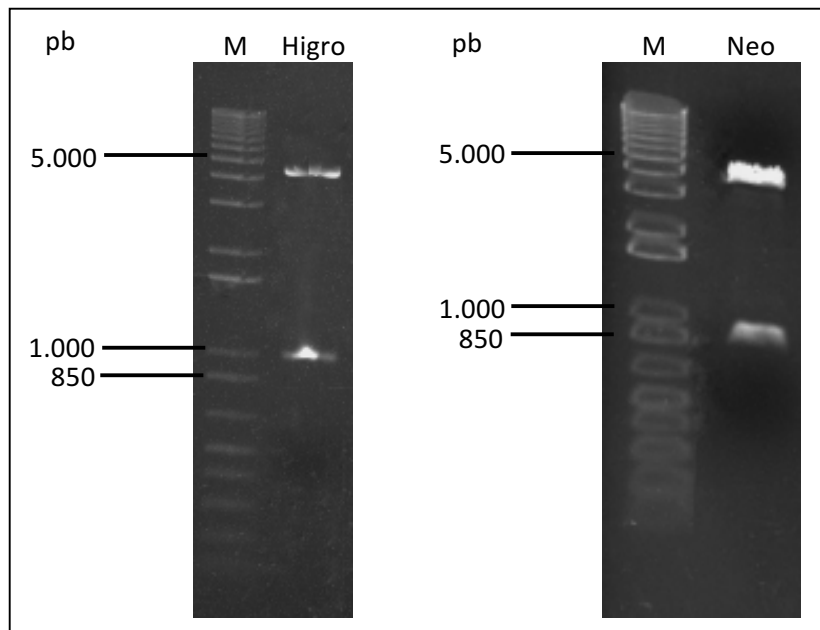


Figura 4.21 – Digestão AP2- β *ups-down* Higro e pNEO2. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; Higro – construção digerida com liberação do plasmídeo na altura ~4.000pb e gene de resistência à Higromicina ~1000pb; Neo – pNEO2 digerido com liberação do plasmídeo na altura ~4.000pb e gene de resistência à Neomicina ~850pb.

Os fragmentos de interesse, o plasmídeo sem o gene de resistência à higromicina e o gene de resistência à neomicina, foram extraídos do gel de agarose com auxílio de lâmina de bisturi e purificados com o KIT. O inserto foi ligado ao plasmídeo e transformado em bactérias quimiocompetentes TOP10. A confirmação desta clonagem se deu primeiramente pela técnica de Toothpick (Figura 4.22A) e, após seleção dos clones 6 e 20 e minipreparação de plasmídeos, por PCR de colônia (Figura 4.22B), utilizando oligonucleotídeos específicos para amplificar somente a região referente ao gene de resistência à Neomicina e todo o cassete.

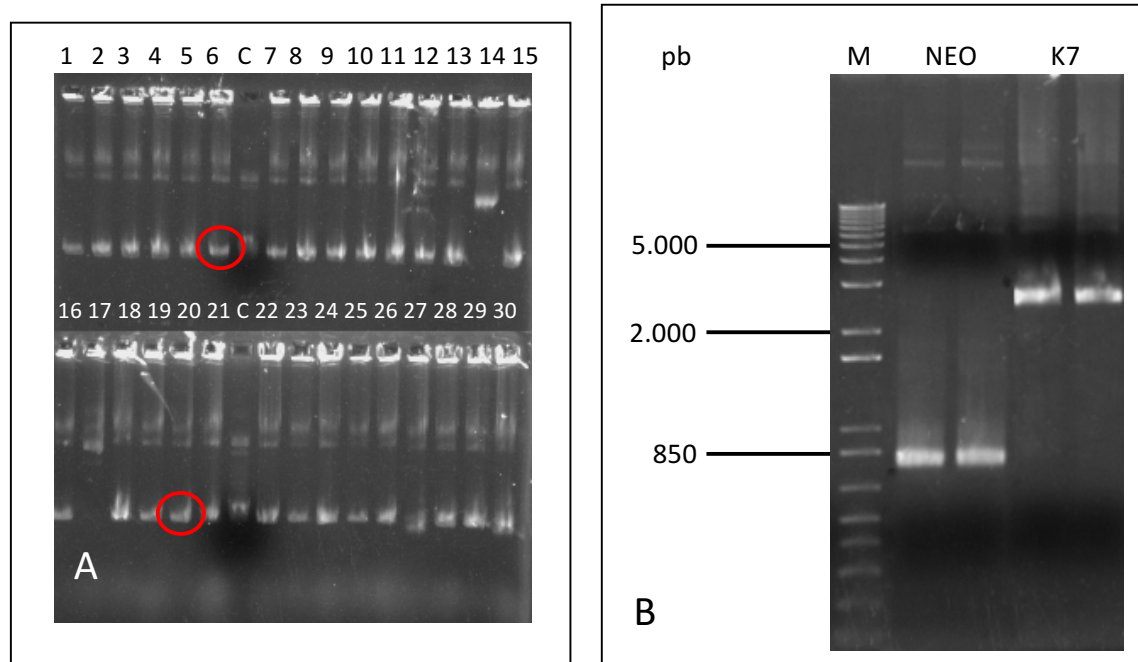


Figura 4.22 – Confirmação da Clonagem. **A** - Análise dos clones obtidos na clonagem de AP2- β *ups-down* com o gene de resistência à Neomicina. Os números indicam os clones testados e C o controle do vetor circularizado. Os clones positivos apresentam um tamanho inferior ao controle, pois o gene de resistência à Neomicina é menor que o gene de resistência à Higromicina. Escolha dos clones 6 e 20. **B** - PCR de colônia dos clones 6 e 20 AP2- β *ups-down* com o gene de resistência à Neomicina. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; NEO indica amplificação da região do gene de resistência à Neomicina em ambos os clones ~850pb; K7 indica amplificação do cassete em ambos os clones ~3.000pb.

Após confirmação da clonagem do gene de resistência à Neomicina no plasmídeo e confirmação da amplificação do segundo cassete, foram realizados alguns testes a fim de melhorar a especificidade da amplificação. As concentrações de DNA molde para as PCRs foram de 2ng, 5ng e 10ng nas temperaturas de anelamento de 60°C e 62°C cada. O resultado (Figura 4.23) mostra que, a 60°C, em qualquer concentração de DNA analisada houve um maior rendimento na amplificação. Já a especificidade é melhor nas concentrações menores e, por isso, a condição de 5ng de DNA molde e temperatura de anelamento de 60°C foi a escolhida para amplificar o cassete em larga escala, num total de 1mL de reação.

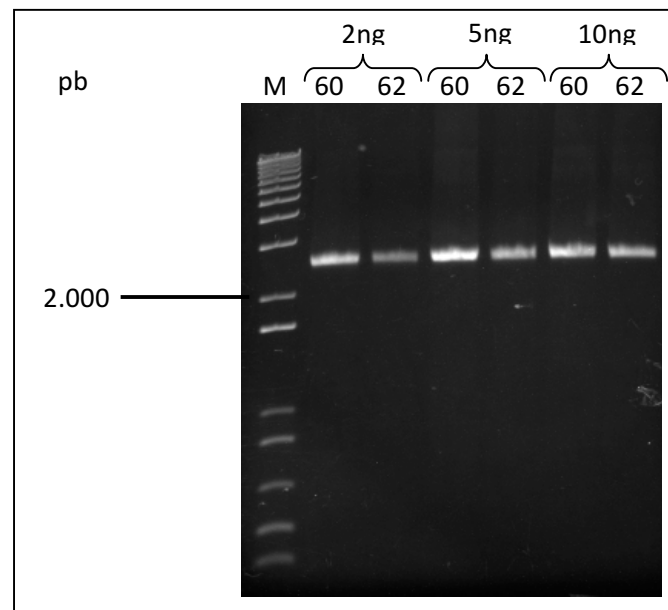


Figura 4.23 - Teste de condições para amplificar o cassete AP2- β com o gene de resistência à Neomicina. M - Marcador 1kb Plus DNA Ladder; Os valores em $^{\circ}\text{C}$ representam as diferentes temperaturas de anelamento para cada concentração em ng testadas.

Após confirmação da amplificação da reação em larga escala, esta foi purificada *overnight*, a fim de aumentar o rendimento final, e o DNA precipitado foi ressuspensionado num total final de 100 μL de Elution Buffer.

Parasitas de *T. cruzi* Dm28c foram transfectados com o primeiro cassete, contendo o marcador de seleção Higromicina e os parasitas mutantes estão sendo selecionados. Após a seleção, os parasitas terão o DNA genômico extraído para análise por PCR da correta inserção do cassete no locus correto para então ser transfectado o segundo cassete.

5 DISCUSSÃO

Vesículas com revestimento proteico de clatrina são especializadas no transporte de moléculas de forma seletiva a partir da Rede trans-Golgi ou da membrana plasmática com destino ao sistema endossomal (Kirchhausen, 2000). Nessa forma de transporte, as moléculas são capturadas através de receptores localizados em membranas celulares que por sua vez, são reconhecidos através de sua porção citoplasmática e segregados pelos complexos adaptadores. Estes, em seguida, recrutam a clatrina e diversas outras proteínas para acessórias para a vesícula (Brodsky et al., 2001).

Já foram descritos cinco complexos adaptadores (AP-1 ao AP-5), sendo que o AP-1 e o AP-2 são os mais bem caracterizados (Boehm and Bonifacino, 2001; Hirst et al., 2012). O complexo AP-2 está envolvido na formação de revestimento de clatrina na membrana

plasmática no processo de endocitose e o AP-4 está localizado na rede trans-Golgi, mas ainda com função não totalmente esclarecida (Park, 2014).

Há poucos estudos referentes ao complexo AP-4, quando comparados aos outros complexos. Já foi descrita sua localização na rede trans-Golgi no tráfego de vesículas entre este compartimento e os endossomos ou membrana basolateral, de forma dependente de clatrina (Park, 2014). Uma função conhecida deste adaptador é de mediar o transporte seletivo da proteína precursora de amiloide por endossomo ao invés de exocitá-la (Burgos et al., 2010). Algumas espécies provenientes de um ancestral comum, como *Leishmania* e *Phytomonas* não possuem o complexo AP-4 em seu genoma. Como simplificação no processo de transporte pós-Golgi, *T. congolense* também não apresenta o complexo AP-4 (Manna et al., 2013). Em *T. cruzi*, uma das subunidades do complexo AP-4 foi encontrada na proteômica do vacúolo contrátil (Ulrich et al., 2014). Também foi sugerido, com base na análise por proteômica da imunoprecipitação da clatrina, que essa proteína interage com AP-4 nesse parasita (Kalb et al., 2016). É possível que em *T. cruzi*, diferentemente do que acontece com a maioria dos eucariotos, AP-4 se associe com clatrina e possa atuar na membrana do vacúolo carreando moléculas deste para a membrana plasmática.

Para elucidar a função desse adaptador nesse organismo, optamos por deletar o gene que codifica a subunidade épsilon de seu genoma. Por homologia com os demais complexos melhores caracterizados, a subunidade AP4- ϵ seria a que caracteriza o complexo definindo seu local de montagem (Wang et al., 2003; Robinson, 2015). Entretanto, até o momento, só foi possível clonar a intergênica *upstream* no vetor pHIGRO2. Algumas tentativas foram realizadas, como a clonagem da intergênica *downstream* no vetor pGEM-T Easy. Esse vetor é linear e possui uma deoxitimidina (T) em cada uma de suas extremidades 3' que aumentam a eficiência da ligação do produto de PCR aos plasmídeos, pois a re-circularização do vetor é evitada. Devido a dificuldades apresentadas durante a clonagem e a limitação do tempo, essa parte do projeto parou nessa etapa. Uma possível alternativa para este projeto é verificar os oligonucleotídeos específicos por meio de sequenciamento a fim de testar a sua eficiência e correto funcionamento.

O complexo AP-2 está envolvido na formação de revestimento de clatrina na membrana plasmática no processo de endocitose. 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 (DeSouza, 2002; Morgan et al., 2002). Já foi demonstrado que em *T. brucei* a deleção da clatrina causa severas alterações na membrana da bolsa flagelar levando o parasita à morte (Allen et al., 2003). Entretanto, não foi encontrado no genoma dessa parasita o conjunto de genes que formam o complexo AP-2. O motivo dessa diferença ainda não é claro, entretanto a ausência do complexo AP-2 no sistema endocítico de *T. brucei* foi atribuída a uma diferenciação da via que permite uma endocitose rápida por VSGs (glicoproteínas variáveis de superfície) e anticorpos (Allen et al., 2003; McGregor & Matthews, 2008). O *T. cruzi* além da bolsa flagelar possui uma segunda região de endocitose, o complexo citósma/citofaringe (Portocarrero, et al., 2000). Já foi demonstrado que a clatrina é expressa e localiza-se em região da bolsa flagelar e complexo de Golgi nesse parasita (Kalb et al., 2014). Porém, em trabalho de imunoprecipitação de clatrina, mostrou que essa proteína interage com os complexos AP-1 e AP-4, mas surpreendentemente, não com AP-2 (Kalb et al., 2016). Nesse trabalho, construímos ferramentas para elucidar o papel de AP-2 em *T. cruzi*, pois se este adaptador não está se associando com clatrina na bolsa flagelar, poderia estar atuando independentemente no complexo citóstoma/citofaringe?

O presente projeto obteve sucesso na construção de ferramenta de genética reversa, para estudo do complexo AP-2 em *T. cruzi*. Esse organismo, além de grande importância em saúde pública, também é um excelente modelo de estudo de processos biológicos como endocitose e tráfego de vesículas. As ferramentas obtidas nesse estudo serão úteis para construção de conhecimento acerca desses processos nesse parasita.

6 CONCLUSÃO

Como conclusão deste trabalho, foi possível obter a ferramenta de nocaute gênico para estudo da função e caracterização do gene AP2- β em *T. cruzi*, cumprindo todas as etapas descritas no tópico 2.2 dos objetivos. Com relação ao gene AP4- ϵ em *T. cruzi* não foi possível finalizar, uma vez que o projeto apresentou dificuldades na realização da clonagem de uma das intergênicas e, conseqüentemente, da amplificação de todo o cassete.

REFERÊNCIAS

- ALLEN RD, NAITOH Y. **Osmoregulation and contractile vacuoles of protozoa.** *Int Rev Cytol* 215: 351-394, 2002.
- ALLEN CL, LIAO D, CHUNG WL, FIELD MC. **Dileucine signal-dependent and AP-1-independent targeting of a lysosomal glycoprotein in *Trypanosoma brucei*.** *Molecular and biochemistry parasitology* 156: 175-90, 2007.
- ALSFORD S, KELLY JM, BAKER N, HORN D. **Genetic dissection of drug resistance in trypanosomes.** *Parasitology* 140:1478-1491, 2013.
- ARIDOR M, TRAUB LM. **Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat.** *Traffic* 3: 537-546, 2002.
- BAISA AG, MAYERS RJ, BEDNAREK. **Budding and breaking news about clathrin-mediated endocytosis.** *Current Opinion in Plant Biology* v. 16 i.6 Dezembro, 2013, p 718-725.
- BATISTA, M.; MARCHINI, K. F.; CELEDON, P. AF.; FRAGOSO, P. S.; PROBST, M. C.; PRETI, H.; OZAKI, S. L.; BUCK, A. G.; GOLDENBERG, S.; KRIEGER, A. M. **A high-throughput cloning system for reverse genetics in *Trypanosoma cruzi*.** *BMC Microbiology*, 10:259, 2010.
- BERRIMAN M, GHEDIN E, HERTZ-FOWLER C, BLANDIN G, RENAULD H, BARTHOLOMEU DC, LENNARD NJ, CALER E, HAMLIN NE, HAAS B et al. **The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*.** *Science* 309: 416-422, 2005.
- BOEHM, M.; BONIFACINO, J. S. **Adaptins: The Final Recount.** *Molecular biology of the cell*, v. 12, p. 2907-2920, 2001.
- BONIFACINO, J. S.; LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. **Coat proteins: shaping membrane transport.** *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, v. 4, p. 409-414, 2003.
- BRAULKE T, BONIFACINO JS. **Sorting of lysosomal proteins.** *Biochim Biophys Acta* 1793:605-614, 2009
- BRODSKY, F. M.; CHIEN, 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.
- BURGOS, P. V.; MARDONES, G. A.; ROJAS, A. L.; daSILVA, L. L.; PRAHBU, Y.; HURLEY, J. H.; BONIFACINO, J. S. **Sorting of Alzheimer's disease amyloid precursor protein mediated by the AP-4 complex.** *Dev Cell*, 18(3):425-36, 2010.

CANAGARAJAH, B. J.; REN, X.; BONIFACINO, J. S.; HURLEY, J. H. **The clathrin adaptor complexes as a paradigm for membrane-associated allostery.** *Protein Sci*, 22(5):517-29, 2013.

CAVALIER-SMITH, T. **Kingdoms protozoa and chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree.** *Biology Letters*, v. 6, p. 342-345, 2010.

CLAYTON CE. **Genetic manipulation of kinetoplastida.** *Parasitol Today*. 1999;15(9):372-378

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.

DELL'ANGELICA EC, OHNO H, OOI CE, RABINOVICH E, ROCHE KW, BONIFACINO JS. **AP-3: an adaptor-like protein complex with ubiquitous expression.** *EMBO J* 16: 917-928, 1997.

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.

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.

DOCAMPO, R.; DE SOUZA, W.; MIRANDA, K.; ROHLOFF, P.; MORENO, S. N. J. **ACIDOCALCISOMES — CONSERVED FROM BACTERIA TO MAN.** *Nat Rev Microbiol.*, vol. 3, n. 3, p. 251-261, 2005.

DOCAMPO R, MORENO SN. **Acidocalcisomes.** *Cell Calcium* 50: 113-119, 2011.

EDELING MA, SMITH C, OWEN D. **Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 32-44, 2006.

FIELD MC, GABERNET-CASTELLO C, DACKS JB. **Reconstructing the evolution of the endocytic system: insights from genomics and molecular cell biology.** *Adv Exp Med Biol.* 607:84–96, 2007.

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.

GOKOOL S. **Sigma 1- and mu 1-Adaptin homologues of Leishmania mexicana are required for parasite survival in the infected host.** *The Journal of biological chemistry* 278: 29400-9, 2003.

GRAVOTTA, D., CARVAJAL-GONZALEZ, J. M., MATTERA, R., DEBORDE, S., BANFELDER, J. R., BONIFACINO, J. S. and RODRIGUEZ-BOULAN, E. **The clathrin adaptor AP-1A mediates basolateral polarity.** *Dev. Cell* 22, 811–823, 2012.

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.

HIRST J, BARLOW LD, FRANCISCO GC, SAHLENDER DA, SEAMAN MN, DACKS JB, ROBINSON MS. **The fifth adaptor protein complex.** *PLoS Biol* 10:3, 2012.

JACKSON, L. P.; KÜMMEL, D.; REINISCH, K. M.; OWEN, D. J. **Structures and mechanisms of vesicle coat components and multisubunit tethering complexes.** *Curr Opin Cell Biol* 24:475-483, 2012.

KALB, L. C.; FREDERICO, Y. C.; BOEHM C.; MOREIRA, N. M. C.; SOARES, M. J.; FIELD, M. C. **Conservation and divergence within the clathrin interactome of Trypanosoma cruzi.** *Scientific Reports* 6, 31212, 2016.

KALB, L. C.; FREDERICO, Y. C.; BATISTA, C. M.; EGER, I.; FRAGOSO, S. P.; SOARES, M. J. **Clathrin expression in Trypanosoma cruzi.** *BMC Cell Biol*, doi: 10.1186/1471-2121-15-23, 2014.

KIRCHHAUSEN T. **Clathrin.** *Annu Rev Biochem* 69: 699-727, 2000.

LE BORGNE, R.; HOFACK, 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.

MANNA, P.T.; KELLY, S.; FIELD, M. C. **Adaptin evolution in kinetoplastids and emergence of the variant surface glycoprotein coat in African trypanosomatids.** *Mol Phylogenet Evol* 67:123-8, 2013.

MAYOR, S.; PAGANO, R. E. **Pathways of clathrin-independent endocytosis.** Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v.8, p. 1-10, 2007.

MCMAHON H. T.; BOUCROT E. **Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis.** Nat Rev Mol Cell Biol. 22:517-33. 2011;

MOREIRA, CMNM. **Identificação, Expressão e Localização do Complexo Adaptador 1 em *Trypanosoma cruzi*.** Curitiba, No prelo. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-graduação em Biociências do Instituto Carlos Chagas / Fiocruz-PR, 2013.

NEVIN W.D.; DACKS, J. B. **Repeated secondary loss of adaptin complex genes in the *Apicomplexa*.** Parasitology International. 58:86–94. doi: 10.1016/j.parint.2008.12.002, 2009.

OPPERDOES FR, MICHELS PAM. **The evolutionary origin of glicosomes.** Parasitol Today 7: 150-109, 1991.

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.; 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.

PARK, S.Y., GUO, X. **Adaptor protein complexes and intracellular transport.** Biosci. Rep. 34(4), art:e00123.doi:10.1042/BSR20140069, 2014.

PEREIRA MG, NAKAYASU ES, SANT`ANNA C, DE CICCIO NN, ATELLA GC, DE SOUZA, ALMEIDA IC, CUNHA-E-SILVA NL. **Trypanosoma cruzi epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions.** PLoS One 6:e22359. doi: 10.1371/journal.pone.0022359, 2011.

PORTO-CARREIRO, I.; ATTIAS, M.; MIRANDA, K.; DE SOUZA, W.; CUNHA-E-SILVA, N. **Trypanosoma cruzi epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes.** European Journal of Cell Biology, v. 79, p. 858-869, 2000.

REIDER A, WENDLAND B. **Endocytic adaptors - social networking at the plasma membrane.** J Cell Sci124: 1613-22, 2011.

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.

- RODRIGUES JC, GODINHO JL, DE SOUZA W. **Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, lifecycle and ultrastructure.** Subcell Biochem 74:1-42, 2014.
- 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.
- SANT'ANNA C, PARUSSINI F, LOURENÇO D, DE SOUZA W, CAZZULO JJ, CUNHA-E- SILVA NL. **All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles.** Histochem Cell Biol 6:1187-1198, 2008.
- SCHARFSTEIN J. **Trypanosoma cruzi Cysteines Proteases, Acting at the Interface Between the Vascular and Immune Systems, Influence Pathogenic Outcome in Experimental Chagas Disease.** Op Parasitol J 4: 60-71, 2010.
- SCHEKMAN R, ORCI L. **Coat protein and vesicle budding.** Science 271:1526-533, 1996.
- SCHLIWA, M.; SOLDATI, T. **Powering membrane traffic in endocytosis and recycling.** Nature Reviews. Molecular Cell Biology, v. 7, p. 473-83, jul. 2006.
- SCOTT CC, VACCA F, GRUENBERG J. **Endosome maturation, transport and functions.** Semin Cell Dev Biol 4:1084-9521, 2014.
- SOARES MJ, DE SOUZA W. **Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study.** J Submicrosc Cytol Pathol 20: 349-361, 1988.
- 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*.** Eukaryot Cell, doi: 10.1128/EC.00156-09, 2009.
- 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.
- WANG, Y. J.; WANG, J.; SUN, H. Q.; MARTINEZ, M.; SUN, Y. X.; MARCIA, E.; KIRCHHAUSEN, T.; ALBANESI, J. P.; ROTH, M. G.; YIN, H. L. **Phosphatidylinositol 4 phosphate regulates targeting of clathrin adaptor AP-1 complexes to the Golgi.** Cell. 8;114(3):299-310, 2003.

World Health Organization (2016) Chagas disease (American trypanosomiasis) fact sheet (updated Março 2016). <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acessado em 19/06/2016.