



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
INSTITUTO DE BIOFÍSICA CARLOS CHAGAS FILHO

Miria Gomes Pereira

**Membranas resistentes a detergente em reservossomos de
epimastigotas de *Trypanosoma cruzi***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA À UNIVERSIDADE
FEDERAL DO RIO DE JANEIRO VISANDO À OBTENÇÃO DO GRAU
DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOFÍSICA)

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Rio de Janeiro
2007

Trabalho desenvolvido no laboratório de Ultra-estrutura Celular Hertha Meyer, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob orientação da Dra. Narcisa Leal da Cunha e Silva, com auxílios financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ).

Pereira, Miria Gomes
Membranas resistentes a detergente em reservossomos de
epimastigotasde *Trypanosoma cruzi* / Miria Gomes Pereira.
Rio de Janeiro, 2007.

xiii, 112fl.

Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Biofísica) –
Universidade Federal do Rio de Janeiro,
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2007.

Orientador: Narcisa Leal da Cunha e Silva

1 Domínios resistentes a detergente. 2. Reservossomos
3. *Trypanosoma cruzi* – Teses. I. Cunha-e-Silva, Narcisa (Orient.)
II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica
Carlos Chagas Filho III. Título.

Aos meus pais, Edílson e Lúcia, que proveram tudo que um filho poderia ter,
Aos meus irmãos queridos, Fernanda e Vinícius que são minha fonte de inspiração,

Ao Leo pelo amor e apoio incondicional,
Ao Funf, que eu tanto amo,
E ao meu “irmão de criação” Augustinho, por sua motivação constante.

AGRADECIMENTOS

Não há palavras. São vagas ou pouco expressivas num turbilhão de pensamentos, numa mistura de sentimentos que só o coração é capaz de dizer. Sinto-me como que completamente inebriada numa estrada sem fronteiras em que escolhi para viver. E me levanto, todos os dias na certeza de que tenho tudo que preciso e tenho todos ao meu redor. Confortando-me, amparando-me, alguns muito gentis, outros mais calados. E são eles todos os dias que preenchem minha vida não apenas de alegria, mas invadem meu mundo de sonhos, resgatando-me do impossível ou me lançando mais e mais.

Vejo-os todos os dias, estão por toda parte, ao meu lado, pelos corredores querendo saber dos mínimos detalhes, imprimindo novas idéias, um conselho, ou às vezes, olhando-me desconfiados para meus olhos tão expressivos e, deveras, passionais, perguntando bem baixinho o motivo do meu silêncio.

Sinto-me maravilhada. Sinto-me num carrossel de temperamentos, no modo de fazer ciência, na lógica desse pequeno trecho de minha própria vida, com suas virtudes e nos momentos de desalento. E não estou só. E gostaria de poder dizer todos os dias o quão importantes vocês foram nas poucas palavras ou no discurso para uma vida inteira.

A todos vocês muito obrigada pelos ensinamentos prestados, pelas dúvidas esclarecidas, pelos momentos compartilhados.

Ciência é viver e ciência é feita por pessoas.

A Deus por permitir que eu chegasse até aqui.

À minha família querida, a minha Vó Luiza e minha tia Edna e ao sogrão Miguel por estarem sempre presentes.

Ao Leo, pois sem você, amor, eu não teria conseguido! Você é um exemplo de motivação e de profissionalismo para mim.

Ao Bosco, meu primeiro professor aqui no lab, uma pessoa querida e amiga. Você é maravilhoso e um exemplo de profissional. Sou feliz por ter podido compartilhar tantos anos ao seu lado.

Ao melhor grupo de pesquisa: Narcisa (obrigada por tudo que me ensinou, pela confiança, pelo carinho e amizade nessa jornada de 7 anos. Eu não seria o que sou hoje sem você por trás), Celso (você é brilhante; será um excelente orientador, tem entusiasmo e dedicação. Obrigada pela atenção dispensada e por todas as discussões científicas), André Jeovânio (você caiu de pára-quadras aqui no lab e mostrou o seu valor. Sou feliz hoje por ser sua amiga!), Daniela (obrigada pelo apoio nos momentos difíceis e não desista nunca!), Sarah, Mariana Hammes, Juliana (obrigada pelo apoio, especialmente nesses últimos meses) Bel e Catarina (minhas primeiras companheiras de lab e que me ensinaram muito). Vocês fomentam as minhas idéias e impulsionam minha vida.

Profª. Geórgia (Instituto de Bioquímica Médica) que foi uma das peças essenciais para a realização desse trabalho. Gê, obrigada por me acolher e me ensinar dia-a-dia como os lipídios são maravilhosos!

Aos amigos sempre queridos: André Luiz, Mariana Farias, Mariana Frossard e Priscila. Cada um de vocês escreveria um inimaginável livro de histórias!!!! Adoro vocês!

A minha super amiga Érica, aquela que sei que posso contar, que sempre me apoiará e que carregarei no coração por toda vida.

Ao casal mais gente boa da UFRJ: Joana (sabe-tudo) e Leandro (eu quero ser igual a você quando crescer!). Agradeço a vocês por serem estarem dispostos a me ajudar.

Juju, você é uma ótima cientista. Confia e segue em frente que seu caminho é longo!

Emile obrigada pelas discussões científicas e pela amizade que se desenvolveu entre nós!

Ju, e agora, é *raft* ou não é?! Obrigada pelos *papers*, pelas conversas e discussões.

À Márcia, à Cris, à Tecia, à Sônia, a Thaís e ao Wanderley de Souza por compartilharem comigo suas experiências científicas, auxiliando na minha formação.

Ao Lúcio, ao Marcel e ao Rodrigo que são os cientistas mais cuca-fresca que eu conheço!!!! Lucio, não há nada melhor que um bom gato morto no lab para animar o pessoal, né?! Rsrrsr

À Rossiane, por sua paciência, seus ensinamentos (científicos e de vida), ensinando-me todos os dias ao ver o lado bom das coisas.

Ao Gustavo, ao Thiago Manchester, ao Thiago Luiz, ao Julio (obrigada pelos bate-papos filosóficos), à Iamara, ao Allan, ao Paulo, ao Deda (obrigada por tantos quebragalhos), ao Kildare, à Karlinha, à Mariana, à Tati, à Gisele, à Loraine, Letícia, à Renata, à Noêmia, a Ana Cristina e à Cazuzá.

À Aline, à Nuccia, à Nicole, ao David, ao Felipe, a Lívia e aos Allans (Bioquímica): por terem me recebido com carinho, pelo que tanto me ajudaram e por fazerem com que eu me sentisse sempre à vontade.

Aos professores José Osvaldo e Lúcia Previato por me ajudarem, pacientemente, com os “glicoconjugados”.

Nete, você é dez! Musa do biotério! Mãezona dos alunos do laboratório!

Ao CEHA: por todos os preciosos valores adquiridos.

RESUMO

PEREIRA, Miria Gomes. Membranas resistentes a detergente em reservossomos de *Trypanosoma cruzi*. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Biofísica)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Os reservossomos são organelas presentes nas formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e em outras espécies do sub-gênero *Schizotrypanum*. A principal função desta organela é a de armazenar lipídios, proteínas e outras substâncias que são continuamente endocitadas a partir da bolsa flagelar e do citóstoma. O citóstoma é uma invaginação da membrana plasmática que possui uma considerável quantidade de glicoproteínas e glicolipídios na sua entrada, constituindo uma região especializada nos epimastigotas. Baseado na possibilidade de que a composição bioquímica da membrana dos reservossomos seja resultado, em parte, da composição da membrana do citóstoma, resolvemos investigar a presença de microdomínios resistentes ao tratamento com Triton X-100 a 4°C e vimos que os reservossomos apresentam membranas resistentes ao tratamento com detergente. Além disso, essas membranas apresentam o aspecto planar, sendo muito semelhantes às membranas internas observadas *in situ* e nas organelas isoladas que foram analisadas em cortes ultrafinos ou por contrastação negativa. A análise dos lipídios revelou que essas membranas apresentam uma alta concentração de ergosterol e significativas quantidades de diacilglicerol, fosfoinositídeos e inositolfosforilceramida, o que denota um possível papel nas rotas de sinalização celular. Ademais, tanto as membranas dos reservossomos como a dos epimastigotas mostraram resultados positivos para a ligação da toxina do cólera e, possivelmente, algum glicoconjugado com o mesmo sítio de reconhecimento de GM₁ está presente na entrada do citóstoma, alcançando os reservossomos por endocitose. Por último, resolvemos investigar a presença de flotilina 2 nessas organelas e vimos que epimastigotas expressam uma proteína que apresenta reação cruzada com o anticorpo para flotilina 2. A marcação positiva para flotilina 2 nas membranas obtidas, mais o fato de que nos reservossomos isolados a ligação é observada nas membranas internas dessas estruturas levanta a hipótese de que as membranas internas constituem um domínio especializado nessas organelas.

ABSTRACT

PEREIRA, Miria Gomes. Detergent resistant membranes in reservosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas- Biofísica)- Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

Reservosomes are organelles present in epimastigote forms from *Trypanosoma cruzi* and other species from *Schizotrypanum* sub-genus. The main function of this organelle is storing lipids, proteins and other molecules that are constitutively uptaken from flagellar pocket and cytostome. The cytostome is a plasma membrane invagination that presents a considerable amount of glycoproteins and glycolipids at its entrance, creating a large specialized region in epimastigotes. Based on the possibility that the biochemical composition of reservosomes membrane is, at least in part, a result of cytostome membrane composition, we investigated the presence of Triton X-100-resistant microdomains. We observed that reservosomes present detergent-resistant membranes. Furthermore, these membranes are flat and akin to internal membranes observed *in situ* and in isolated organelles in ultrathin sections or by negative staining. Lipid analysis revealed that these membranes present high contents of ergosterol and significant quantities of diacylglycerol, phosphoinositides and inositolphosphorylceramide, which denotes a possible role on signaling routes. Moreover, both reservosome membranes and epimastigotes showed positive results to cholera toxin binding and possibly some glycoconjugate with a similar binding site to GM₁ are present in cytostome entrance, reaching reservosomes through endocytosis. Finally, we investigated the presence of flotillin 2 in these organelles and we observed that epimastigotes present crossing reaction with this antibody. Positive reaction for flotillin 2 in recovered membranes and the fact that in isolated reservosomes the binding is observed in internal membranes launch the hypothesis that internal membranes constitute a specialized domain in these organelles.

ABREVIATURAS

AEP	aminoetilfosfonato
BARP	Proteína rica em alanina do estágio sanguíneo (<i>bloodstream stage alanine-rich protein</i>)
BSA	albumina de soro bovino (<i>bovine serum albumine</i>)
CHAPS	3-[(3-colamidopropil)-dimetil-amônio]-1-propanosulfonato
CHO	Células de ovário de hamster chinês (<i>Chinese Hamster Ovary</i>)
CEMs	membranas enriquecidas em colesterol (<i>cholesterol-enriched membranes</i>)
CT-B	toxina do cólera subunidade B
DAG	diacilglicerol
DAMP	3-(2,4-dinitroanilino)3' amino-N-metil-di-propilamina
cDNA	DNA complementar
DIGs	membranas enriquecidas em glicosfingolípídios resistentes a detergente (<i>detergent-insoluble glycosphingolipid-enriched membranes</i>)
DNA	ácido desoxirribonucléico
DOPC	dióleilfosfatidilcolina
DPPC	dipalmitoilfosfatidilcolina
DRMs	membranas resistentes a detergente (<i>detergent-resistant membranes</i>)
ESA	antígeno de superfície epidermal (<i>epidermal surface antigen</i>)
EtNP	etanolaminafosfato
FITC	isotiocianato de fluoresceína (<i>fluorescein isothiocyanate</i>)

FRAP	recuperação da fluorescência após a foto-extinção (<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>)
FRET	Transferência de energia de ressonância fluorescente (<i>Fluorescent Resonance Energy Transfer</i>)
G _α	subunidade alfa da proteína G heterotrimérica
β-Galf	galactofuranose
β-Galp	galactopiranosose
GEMs	membranas enriquecidas com glicosfingolipídios (<i>glycosphingolipid-enriched membranes</i>).
GlcN	N-acetilglicosamina
GPI	glicosilfosfatidilinositol
GIPLs	glicoinositol fosfolipídios
GP	glicoproteína
GTP	guanina trifosfato
GTPase	Proteína que hidrolisa GTP
HRP	peroxidase de rabanete (<i>horseradish peroxidase</i>)
IgE	imunoglobulina classe E
IPC	inositolfosforilceramida
IP ₃	inositol 1,4,5-trifosfato
ISP-1	miriocina/termozimocidina
LAMP1	proteína lisossomal tipo 1 associada à membrana (<i>lysosomal-associated membrane protein 1</i>)
LAMP2	proteína lisossomal tipo 2 associada à membrana (<i>lysosomal-associated membrane protein 2</i>)
l _d	fase líquida cristalina
LDL	lipoproteína de baixa densidade (<i>low density lipoprotein</i>)
lgp120	glicoproteína de membrana lisossomal de 120 kDa (<i>lysosomal glycoprotein</i>)
LIT	Infusão de fígado e triptose (<i>Liver Infusion Tryptose</i>)
l _o	fase líquida ordenada
LPPG	lipopeptidofosfoglicana

Man	manose
MDCK kidney)	células de rim de cachorro Madin–Darby (Madin–Darby canine kidney)
MHC - II	complexo principal de histocompatibilidade classe 2
M6P	manose-6-fosfato
NANA	ácido N-acetil neuranímico
NP-40	Nonidet P-40
PBS	Salina tamponada com fosfato (<i>phosphate buffered saline</i>)
D-PDMP	D- treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol
PC-12	células de feocromocitoma (<i>pheochromocitoma</i>)
PI	fosfatidilinositol
PIP ₂	fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato
PKC	proteína cinase C (<i>protein kinase C</i>)
PVA	ácido polivinílico
RNA	ácido ribonucléico
RPMI	Meio de cultivo desenvolvido por Moore e cols. no Instituto Memorial Roswell Park (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SFB	soro fetal bovino
SNAP	proteína solúvel de adesão à NSF (soluble NSF attachment protein)
SNAREs	receptor solúvel da proteína de adesão à NSF (soluble NSF attachment protein receptor)
SPFH	estomatina-proibitina-flotilina- HflK/C (<i>Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C</i>)
SPT	serina palmitoil transferase
NSF	Fator sensível à N-etil-maleimida (<i>N-ethylmaleimide sensitive factor</i>)
TLC	cromatografia de camada fina (<i>thin layer chromatography</i>)
TNG -	rede trans-Golgi (<i>trans-Golgi network</i>)
UDP	uridina difosfato
VIP21	proteína de membrana vesicular integral (<i>vesicular integral membrane protein</i>)
VSG	glicoproteína variante de superfície (<i>variant surface glycoprotein</i>)

SUMÁRIO

I. Introdução	1
I.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
I.2. Reservossomos	5
I.3. Aspectos ultra-estruturais da membrana plasmática do <i>T. cruzi</i>	8
I.3.1. Os glicoconjugados	9
I.3.2. Composição lipídica	11
I.4. A membrana plasmática e as <i>lipid rafts</i>	12
I.4.a. Cavéolas e Caveolinas	15
I.4.b. Aspectos funcionais das cavéolas	18
I.4.b. Flotilinas	18
I.5. Metodologias empregadas no estudo das <i>lipid rafts</i>	21
I.6. Ocorrência de <i>lipid rafts</i> em tripanossomatídeos	24
I.7. Por que os reservossomos teriam <i>lipid rafts</i> ?	25
II. Objetivos	30
II.1. Objetivo geral	30
II.2. Objetivos específicos	30
III. Material e Métodos	31
III.1. Cultivo dos parasitos	32
III.2. Isolamento dos reservossomos	32
III.3. Isolamento das membranas dos reservossomos em gradiente de sacarose	33
III.4. Microscopia Eletrônica de Transmissão	34
III.5. Detecção de glicoconjugados	34
III.5.1. <i>Dot blot</i> das frações do gradiente de sacarose	35
III.5.2. Fluorescência de parasitos inteiros	35
III.6. Imunomarcagem com flotilina 2	35
III.6.1. <i>Dot blot</i> das frações do gradiente de sacarose	36
III.6.2. Contrastação Negativa	36
III.6.3 Imunofluorescência	37

III.7. Dosagem de Proteínas	38
III.8. Análise de Lipídios	38
III.8.1. Extração Lipídica	38
III.8.2. Dosagem de Esterol	38
III.8.3. Cromatografia de Camada Fina (TLC)	39
IV.Resultados	40
IV.1. Aspectos ultraestruturais dos reservossomos	41
IV.2. Perfil do gradiente de sacarose obtido após a centrifugação do material tratado com detergente	41
IV.3. Reservossomos acumulam glicoconjugados semelhantes a GM ₁	46
IV.3.a. Os glicoconjugados não estão presentes em todas as frações do gradiente	46
IV.3.b. Glicoconjugados da superfície celular são internalizados e acumulados nos reservossomos	47
IV.4. A marcação com o anticorpo anti-flotilina 2 corrobora a presença de domínios de membrana nos reservossomos	48
IV.4.a. Reservossomos tratados com detergente	48
IV.4.b. Epimastigotas	54
IV.4.c. Reservossomos isolados	54
IV.5. Aspectos ultra-estruturais das frações resistentes a detergente	59
IV.6 Determinação da concentração de proteínas	62
IV.7 Determinação do conteúdo de esterol nas frações do gradiente de sacarose	63
IV.8. Análise dos lipídios neutros	64
IV.9. Análise de fosfolipídios	66
V. Discussão	68
VI. Conclusões	83
VII.Referências bibliográficas	84

Introdução

I. INTRODUÇÃO

1. *O Trypanosoma cruzi*:

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas (Chagas, 1909); enfermidade cuja área endêmica abrange quase todo o continente americano, desde o sul dos Estados Unidos até a região sul da Argentina e do Chile (De Souza, 2000). Na verdade, por ter sido muito estudado devido sua importância como agente causador de uma grave doença, acabou se tornando um interessante modelo de estudo em biologia celular e molecular.

Taxonomicamente, podemos enquadrar o parasito dentro da classe Kinetoplastidea e ordem Kinetoplastida, que engloba a família Trypanosomatidae. Nesse grupo, encontramos, por exemplo, protozoários dos gêneros *Leishmania*, *Phytomonas*, *Endotrypanum* e o próprio *Trypanosoma*. Dentro do gênero *Trypanosoma*, podemos ainda destacar o *Trypanosoma brucei* *gambiense* e o *Trypanosoma brucei rhodesiense*, agentes causadores da doença do sono, enquanto que *Trypanosoma brucei brucei*, *Trypanosoma equiperdum* e *Trypanosoma equinum* são responsáveis pelas patologias em animais (De Souza, 2000).

De caráter heteroxênico, uma vez que alterna seu ciclo evolutivo entre o hospedeiro invertebrado (o inseto vetor, popularmente conhecido como barbeiro) e o hospedeiro vertebrado (mamíferos como o homem, cães, gatos, roedores e marsupiais), o *T. cruzi* apresenta três formas no seu ciclo de vida: amastigota, tripomastigota e epimastigota. A caracterização dessas formas se deve à i) forma geral da célula, ii) posição relativa do núcleo e do cinetoplasto e iii) ponto do qual o flagelo emerge (De Souza, 2000). Dessa maneira, as formas intracelulares do hospedeiro vertebrado ou amastigotas são células esféricas, com capacidade de divisão, cinetoplasto em formato de bastão, anterior ao núcleo e um flagelo curto que emerge da bolsa flagelar, centralmente localizada ao corpo. As formas infectantes, os tripomastigotas, apresentam formato alongado, não se dividem, o cinetoplasto em formato de cesta, posterior ao núcleo e flagelo

saindo lateralmente à bolsa flagelar e ao corpo. Por último, as formas presentes no tubo digestivo do inseto vetor, epimastigotas, com capacidade de divisão, alta atividade endocítica, apresentam formato piriforme, cinetoplasto com forma de bastão posicionado antero-lateralmente ao núcleo, e flagelo emergindo lateralmente ao corpo celular (Figura 1).

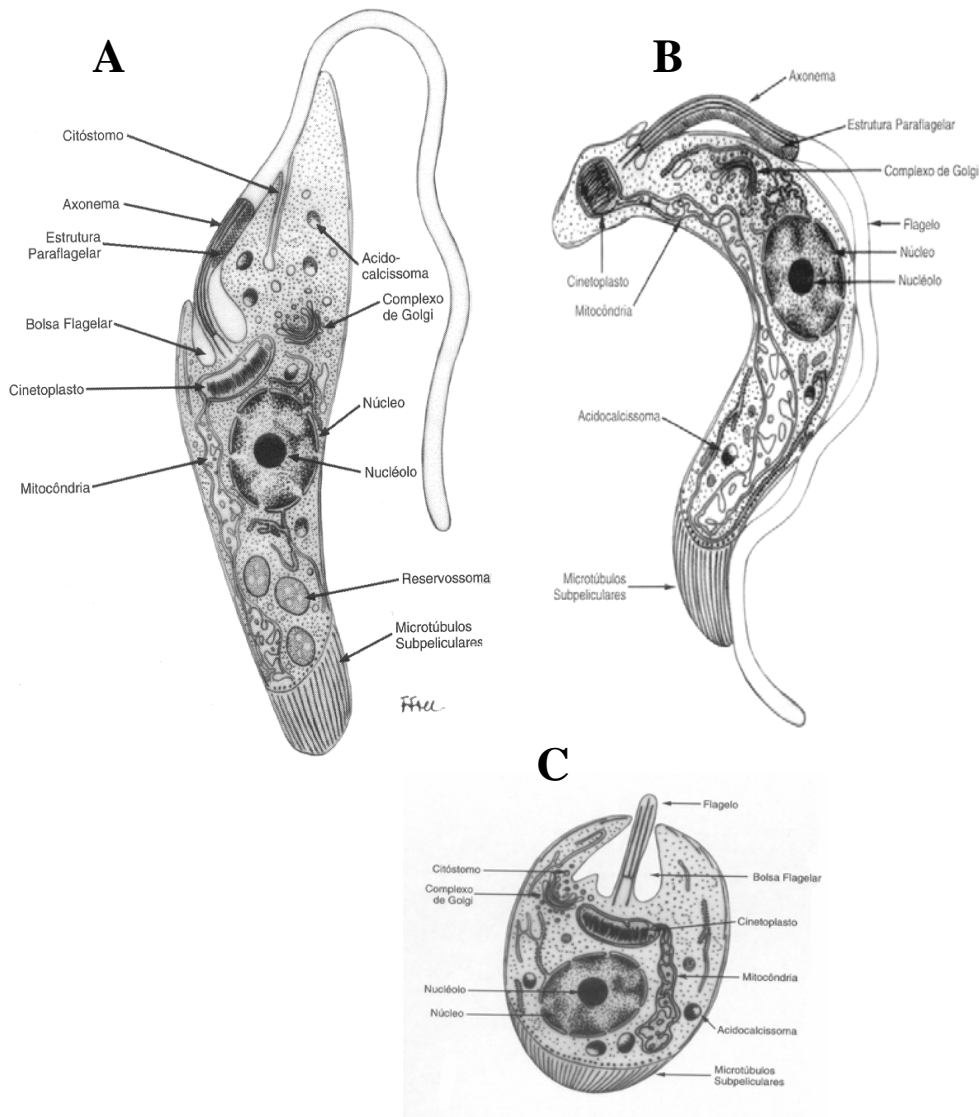


Figura 1 - Esquema dos aspectos morfológicos gerais das formas epimastigotas (A), tripomastigotas (B), e amastigotas (C) do *Trypanosoma cruzi* (De Souza, 2000).

Os tripanossomatídeos, em geral, são conhecidos por apresentarem um único flagelo, uma mitocôndria única, ramificada e que concentra parte do seu material genético numa região especializada conhecida como cinetoplasto. Além disso, vale ressaltar a presença dos glicossomos e acidocalcissomas.

Os glicossomos são organelas semelhantes aos peroxissomos de outros tipos celulares, devido à presença de enzimas de rotas metabólicas como as da biossíntese de éter lipídios (di-hidroxiacetona fostato aciltransferase, acil-CoA redutase ou ainda a NADP oxidoreductase), algumas enzimas da β -oxidação, como a 2-enoil CoA hidratase e o transportador carnitina acetil transferase. Além disso, os tripanosomatídeos concentram quase que 90% das enzimas da via glicolítica nos glicossomos, daí o nome. Todavia, não foi detectada a presença de catalase, o marcador de peroxissomos nestes organismos, com exceção da *Crithidia luciliae*, *Phytomonas* sp e *Trypanoplasma borelli* (Parsons, 2004; Michel *et al*, 2006).

Os acidocalcissomos, por sua vez, são organelas acidificadas por duas bombas de prótons: V-H⁺-PPase e V-H⁺-ATPase (Scott & Docampo, 1998) localizadas na sua membrana, e constituem o principal reservatório de alguns íons importantes no interior da célula, como cálcio, magnésio, sódio e zinco (Docampo *et al*, 1995), além de estocarem pirofosfato e polifosfatos (Urbina *et al*, 1999). Além disso, os acidocalcissomas apresentam um trocador de Na⁺/H⁺ e um Ca²⁺/H⁺ (Docampo & Moreno, 1999; Scott & Docampo, 2000). Logo, já foram sugeridas algumas funções para esses compartimentos nas células, como um possível reservatório de íons, atuando na homeostase de cálcio e do pH intracelular, e na própria osmorregulação quando os parasitos estão submetidos ao estresse osmótico, por exemplo (Docampo *et al*, 2005).

Finalmente, uma das estruturas mais interessantes presentes nas formas epimastigotas do *T. cruzi* são os reservossomos. Tais organelas são encontradas somente no subgênero *Schizotripanum* (Soares & De Souza, 1988).

2. Reservossomos

A primeira descrição da organela foi realizada por De Souza e colaboradores em 1978, em ensaios de citoquímica, utilizando HRP (*horseradish peroxidase*). O grupo observou que as formas epimastigotas endocitavam altas concentrações de HRP a partir da bolsa flagelar e do citóstoma. Próximo ao citóstoma, vesículas pinocíticas, com um diâmetro médio de 80 nm, podiam ser visualizadas apresentando marcação positiva para HRP e que se fundiam originando as estruturas multivesiculares na região posterior da célula. Além disso, ensaios para a determinação de carboidratos, pela técnica de Thiéry (1967), demonstraram que, além da superfície celular dos epimastigotas, as estruturas multivesiculares também apresentavam resultado positivo para o ensaio.

A utilização de tetróxido de ósmio em tampão imidazol, que aumenta o contraste de lipídios (Angermüller & Fahimi, 1982), ensaios positivos para proteínas básicas e a ausência de fosfatase ácida demonstraram que tais corpos multivesiculares também eram o sítio de acúmulo de lipídios (ou lipoproteínas), e que as proteínas do lúmen poderiam representar um material de reserva nesses organismos (Soares & De Souza, 1988). Ainda nesse trabalho, os autores afirmam que não foi possível visualizar unidades de membrana envolvendo as inclusões no interior das organelas, levando a conclusão que as inclusões lipídicas e as proteínas provenientes do processo de endocitose são secretadas diretamente para o interior da organela, o que tornou o termo multivesicular impróprio, e fez surgir o termo reservossomo.

Por estudos estereológicos, pôde-se observar que os reservossomos das formas epimastigotas vão gradativamente desaparecendo, havendo uma redução do volume da organela,

durante o processo de metaciclo gênese (Soares *et al.*, 1989). Neste trabalho, os autores propuseram que os parasitos utilizam o material estocado nos reservossomos como fonte de energia durante a metaciclo gênese.

Posteriormente, o *binding* de LDL e transferrina em experimentos a 4°C e a conseqüente internalização dos ligantes a 28°C sugeriram que o *T.cruzi* apresente receptores para esses ligantes tanto no citóstoma como na bolsa flagelar, num mecanismo de endocitose mediada por receptor (Soares & De Souza, 1991). A determinação do pH 6 pela técnica de DAMP (Anderson & Orci, 1988), uma base fraca que se acumula em compartimentos ácidos, a localização da cisteína protease (cruzipaína) em reservossomos por anticorpos por ensaios de imunocitoquímica (Souto-Padron *et al.*, 1990), o fato da cruzipaína não apresentar resíduos de manose fosforilados, o que sugere que o endereçamento da proteína não ocorre através de um receptor para manose-6-fosfato (M6P), bem como a ausência de marcadores lisossomais, como LAMP1, LAMP2, lgp 120 ou fosfatase ácida, levou a classificação dos reservossomos à categoria de compartimentos pré-lisossomais (Soares *et al.*, 1992), ainda que marcadores típicos de endossomas tardios ainda não tenham sido identificados nessas organelas.

Recentemente, Santos e colaboradores (2005) demonstraram a presença do inibidor natural da cruzipaína, chagasina, uma proteína de, aproximadamente, 12 kDa (Monteiro *et al.*, 2001), que modula a ação da cisteína protease nesses protozoários, nos reservossomos e no complexo de Golgi de *T.cruzi*.

Diferentemente dos eucariotos superiores, a acidificação dos reservossomos se deve à ação da H⁺-ATPase do tipo P, típica de membrana plasmática de plantas e fungos (Vieira *et al.*, 2005). Duas isoformas desta bomba de prótons foram identificadas no *T. cruzi*: TcHA1 e TcHA2. A primeira apresenta localização na membrana plasmática, citóstoma e vesículas endossomais, além de reservossomos, enquanto que a TcHA2 tem localização apenas nos reservossomos.

O processo de fusão de vesículas originárias da via endocítica ainda é pouco conhecido nesses protozoários. Sabe-se apenas que os dois principais portais de entrada são o citóstoma e a bolsa flagelar. De lá vesículas brotam e se fundem a uma rede túbulo-vesicular, formando uma estrutura ramificada, que se origina na região perinuclear se estendendo até a região posterior da célula, onde se fundem aos reservossomos (figura 2). Tais estruturas foram caracterizadas por Porto-Carreiro e colaboradores (2000) através de ensaios de cinética de endocitose com transferrina ou albumina conjugadas a ouro, utilizando cloreto de amônio, uma base fraca conhecida por bloquear a fusão de vesículas. Nos epimastigotas, a base foi capaz de retardar os eventos de fusão, permitindo que o grupo visualizasse a rede túbulo-vesicular desde a região anterior até a fusão com os reservossomos, localizados na região posterior. Tanto a detecção do pH ácido por laranja de acridina quanto a cinética foram importantes para se evidenciar que essas estruturas podem constituir os endossomas iniciais em epimastigotas.

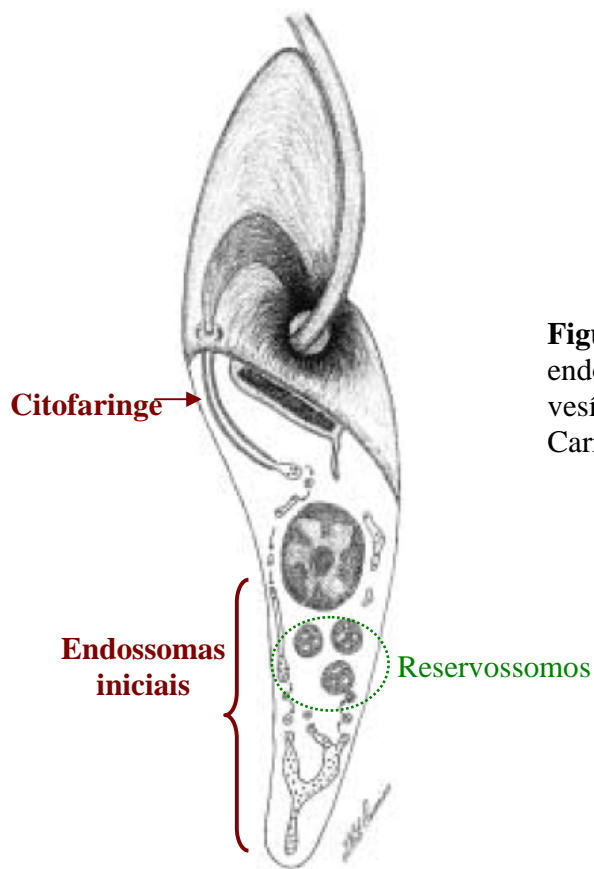


Figura 2: Desenho esquemático mostrando os endossomas iniciais nos epimastigotas e a fusão de vesículas com os reservossomos, proposto por Porto-Carreiro e colaboradores (2000).

Diferentemente das células de mamíferos, as proteínas que participam da maquinaria de fusão no *T. cruzi* não foram ainda caracterizadas, embora as seqüências para a transcrição dos genes para SNAREs e SNAP já se encontram anotadas no genoma do *T. cruzi* (El-Sayed *et al*, 2005).

3. Aspectos ultra-estruturais da membrana plasmática do *T. cruzi*

A membrana plasmática do *T. cruzi* pode ser dividida em várias regiões distintas. Podemos separá-las, didaticamente, em quatro regiões de membrana: i) a membrana do corpo celular, ii) aquela que reveste o flagelo, cuja principal característica é a baixa quantidade de partículas intramembranas (exceto pela região de adesão do flagelo à bolsa flagelar), iii) a membrana da

bolsa flagelar, constituindo a única região do parasito desprovida dos microtúbulos subpeliculares com um perfil de distribuição de partículas intramembranas diferente da membrana flagelar, inclusive quanto à composição, uma vez que a proteína melhor caracterizada é uma glicoproteína de 84 kDa, ancorada por uma âncora de GPI (glicosilfosfatidilinositol) (revisto por De Souza, 2000) e, finalmente, por se comportar como uma região de intenso tráfego endocítico tanto no *T. cruzi* como em *T. brucei* e *Leishmania* sp., onde o processo de exocitose também está bem caracterizado (De Souza, 2002). Além destas três regiões, podemos destacar na forma epimastigota iv) a região do citóstoma, que é revestida por uma cobertura mais densa (22 nm) de mucopolissacarídeos ácidos e que apresentam ligação com a lectina concanavalina A, o que demonstra a existência de uma significativa rede de glicoconjugados ricos em manose e glicose (Martinez-Palomo *et al*, 1976). Por outro lado, não apresenta partículas intramembranas ou proteínas integrais de membrana quando analisado pela técnica de criofratura. Mas pela técnica de *fracture-flip*, em que é possível se observar a face da membrana voltada para o meio extracelular, Pimenta e colaboradores (1989) observaram uma região de aspecto bem rugoso, que não era visto por criofratura, sendo posteriormente sugerido que as proteínas estivessem ancoradas por GPI.

3.1. Os glicoconjugados:

Assim como em outros eucariotos, a membrana plasmática do *T. cruzi* apresenta um denso glicocálix (Buscaglia *et al*, 2006), constituído especialmente por glicoproteínas semelhantes a mucinas e GIPLs (glicoinositol fosfolipídios) ancorados por GPI (Man α 1-2Man α 1-2Man α 1-6Man α 1-4GlcN α 1-6-*myo*-inositol-1-PO $_4^-$) (Previato *et al*, 1995). As mucinas são moléculas polianiónicas altamente glicosiladas, que respondem por 60% do peso de carboidratos (Serrano *et al*, 2001).

A principal diferença entre as mucinas nos tripanossomatídeos daquelas encontradas nos vertebrados é que as glicanas são ligadas à cadeia protéica por *N*-acetilglicosamina, em vez de *N*-acetilgalactosamina (Serrano *et al*, 2001; Agrellos *et al*, 2003).

Além disso, a própria composição das glicanas das mucinas varia nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasito e entre as cepas também. Nos epimastigotas da cepa Y, as substituições podem ocorrer as unidades 2 e 4 da cadeia de manose da GlcNAc por galactose piranose. Já nos epimastigotas da cepa G, essa variação se dá entre as unidades 3 e 6 (Previato *et al*, 1994, 1995). Ou ainda, a substituição de GlcNAc por unidades de β -Gal f (galactofuranose) nas cepas G e Dm28c e β -Gal p (galactopiranose) nas cepas Y e CL-Brener (Jones *et al*, 2004). Ademais, as mucinas das formas epimastigotas apresentam ainda resíduos de ácido siálico que são incorporados à cadeia a partir do soro de cultivo devido à presença de uma trans-sialidase (Previato *et al*, 1985; Shenkmann *et al*, 1991).

Entre os estágios evolutivos, também se verificam modificações na cadeia, uma vez que nos tripomastigotas sanguíneos esta pode ser maior, pela adição de um ramo de resíduos de galactose (Serrano *et al*, 2001) e pela transferência do ácido siálico da célula hospedeira para o próprio parasito, constituindo uma etapa determinante na adesão e invasão da célula (Ferguson, 1999).

A lipopeptidofosfoglicana (LPPG) foi a primeira GIPL de um tripanosomatídeo a ser caracterizado como uma molécula ancorada por GPI (Lederkremer *et al*, 1976). As GIPLs possuem variações na cadeia também, como a adição de β -Gal f lateral ou terminalmente à cadeia (Dos Reis *et al*, 2002), a presença de substituintes fosforilados (AEP- 2-aminoetilfosfato e EtNP-etanolaminafosfato). Os motivos lipídicos podem ser de ceramida ou alquil-acilglicerol, mas

existem variações entre as cepas. As cepas Y e G apresentam ceramida e a CL Brener uma mistura de ceramida e alquil-acilglicerol (DosReis *et al*, 2002).

3.2. Composição lipídica

Nos eucariotos superiores, o principal tipo de lipídeo neutro nas membranas celulares é o colesterol, que representa aproximadamente 65-80% do colesterol não esterificado nas células (Liscum & Munn, 1999; Printz, 2002). Já nos tripanossomatídeos e fungos, o esterol majoritário é o ergosterol, que está presente em todas as formas do ciclo evolutivo destes protozoários. Esses parasitos sintetizam ergosterol, mas não colesterol (Korn *et al*, 1969). Porém, são capazes de endocitar ésteres de colesterol do meio externo a partir da endocitose de LDL do soro e incorporar o colesterol nas suas membranas (Soares & De Souza, 1991; Coppens & Courtoy, 2000). Nestes organismos, o ergosterol desempenha funções similares a do colesterol em outras células como, por exemplo, a de controlar a fluidez da membrana plasmática, estando presente em maior quantidade nesta do que nas membranas internas.

Fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilinositol são os principais fosfolipídios nas formas epimastigotas de *T.cruzi* (Oliveira *et al*, 1977; Franco da Silveira & Colli, 1981). Curiosamente, diferente do que se observa em mamíferos e *Plasmodium*, os tripanosomatídeos, leveduras e plantas não apresentam esfingomielina e sim esfingolipídios de inositol fosforilceramida (IPC) (Lester & Dickson, 1993).

4. A membrana plasmática e as lipid rafts

O conceito de fluidez da membrana plasmática vem sendo modificado desde que Singer e Nicholson propuseram o modelo do mosaico fluido em 1972. Neste modelo, os lipídios são vistos

como um mar no qual as proteínas monoméricas flutuam sem impedimento (revisto por Engelman, 2005) (Figura 3).

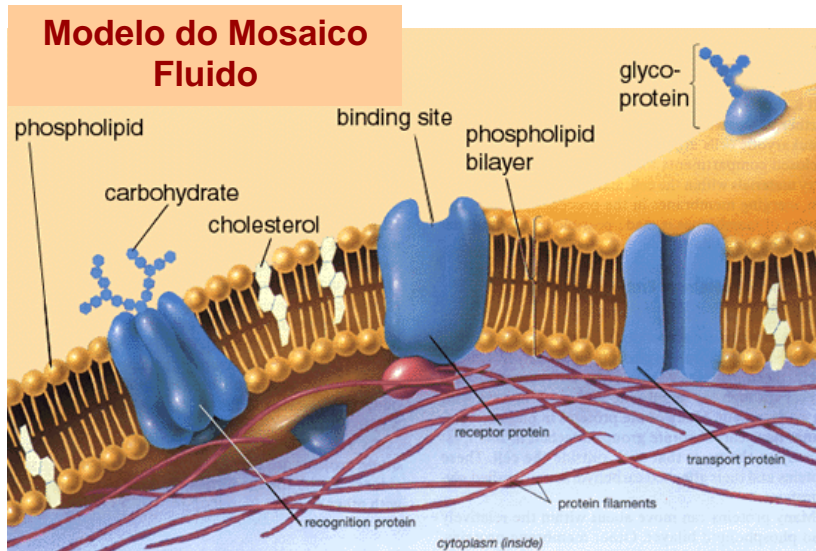


Figura 3: Modelo esquemático de Singer e Nicholson (1972) mostrando as diferentes proteínas inseridas na membrana plasmática, composta por fosfolípidios, colesterol, esfingolípídios e glicoproteínas (Fonte:www.ehu.es.).

Desde então, esse modelo tem sido revisto, especialmente porque a idéia de que as proteínas estão distribuídas randomicamente não é uma regra. A distribuição planar é incompatível com as diferentes energias de interação de uma proteína sozinha ou com os lipídios ou com outras proteínas. Além disso, já é conhecida a existência de verdadeiros complexos protéicos, em áreas lipídicas separadas e em regiões funcionais especializadas das membranas (Engelman, 2005). Em 1996, Grigorieff e colaboradores mostraram em *Halobacterium salinarium* que lipídios podem formar estruturas cristalinas através da formação de complexos especializados com proteínas; e, ainda, distorções na espessura da membrana devido a interações lipídio-proteína criariam regiões de pressão nesses complexos.

Além disso, Brown e Rose (1992) revelaram uma nova característica da membrana plasmática quando demonstraram a existência de microdomínios na própria bicamada lipídica, insolúveis ao tratamento com Triton X-100 1% a 4°C, nos quais âncoras de GPI estavam presentes. Posteriormente, muitos trabalhos demonstraram que esses domínios eram enriquecidos de 3 a 5 vezes em relação à membrana plasmática total em colesterol e esfingolípídios (Brown & Rose, 1992; Prinetti *et al*, 2000). Além disso, de 10-20% da composição total do domínio é de glicoesfingolípídios, como cerebrosídeos e gangliosídeos. Fosfolípídios, por sua vez, compreendem menos do que 30% da composição lipídica total (revisto por Pike, 2004).

Isto é um dado interessante, pois Pike e Casey (1996) observaram que, em linhagens de células A431, nos domínios cavéola havia uma concentração maior de fosfoinositídeos e lisofosfoinositídeos, especialmente PIP₂. Nesse trabalho, elas sugeriram que as cavéolas pudessem atuar no transporte de fosfoinositídeos desde o retículo endoplasmático até a membrana plasmática, onde provavelmente eles seriam fosforilados e usados na sinalização.

Não é para menos que esses domínios tenham recebido diferentes nomenclaturas, tais como:

- I. Membranas resistentes a detergente (**DRMs** – *d*etergent-*r*esistant *m*embranes);
- II. Membranas enriquecidas com colesterol (**CEMs**- *c*holesterol-*e*nriched *m*embranes);
- III. Membranas enriquecidas em glicoesfingolípídios insolúveis a detergente (**DIGs**-*d*etergent-*i*nsoluble, glycosphingolipid-enriched membranes); ou,
- IV. Membranas enriquecidas em glicoesfingolípídios (**GEMs**- glycosphingolipid-*e*nriched *m*embranes).

Os termos DRM e DIG refletem a propriedade que esses domínios possuem que é a de não se solubilizarem em detergentes não iônicos, como o Triton X-100, resultado do estado altamente empacotado das cadeias acila dos lipídios (revisto por Pike, 2004).

Em 1997, Simons e Ikonem trouxeram uma nova terminologia para esses domínios, denominando-os como *lipid rafts* ou jangadas lipídicas, justamente por funcionarem como verdadeiras plataformas para a ancoragem de proteínas, sejam aquelas ancoradas por GPI (para as proteínas ancoradas pelo folheto externo), sejam proteínas aciladas via N-miristoilação ou S-palmitoilação (proteínas ancoradas pelo folheto interno da membrana) (Moffett *et al*, 2000; revisto por Pike, 2004; Thomas *et al*, 2004), ou ainda porque muitas são proteínas transmembrana envolvidas nos fenômenos de endocitose ou de transdução de sinal (Figura 4).

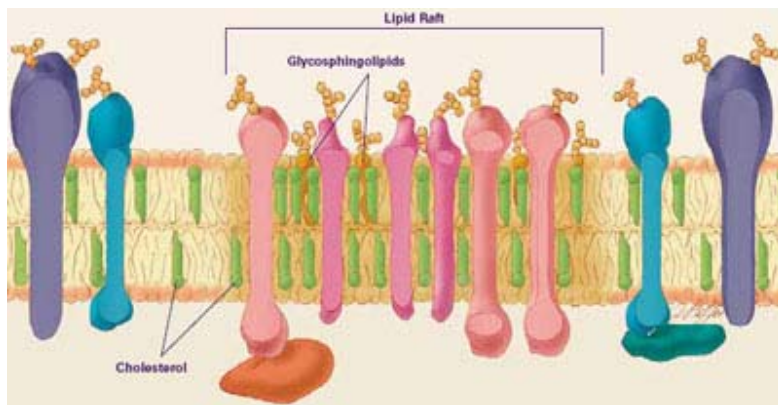


Figura 4: Desenho esquemático de uma *lipid raft*, mostrando as principais moléculas frequentemente encontradas, como glicolipídios, glicoproteínas, colesterol, esfingolipídios e proteínas.
(Fonte: www.publications.nigms.nih.gov/.../ch2_lipidraft.jpg)

O conjunto formado pelo esterol, pelos esfingolipídios, glicoconjugados, pelas proteínas e ácidos graxos interagem mutuamente num estado de fase líquida ordenada (l_o). A fase l_o é uma fase intermediária entre gel e fase fluida, na qual as cadeias aciladas estão estendidas (ou seja, ordenadas), mas carecem de um arranjo lateral hexagonal de moléculas e apresentam difusão rápida (Heerklotz, 2002). Além disso, a fase l_o é facilitada pela intercalação de uma molécula de colesterol (ou ergosterol) rígida e achatada entre as cadeias dos fosfolipídios que são mais flexíveis (Lichtenberg *et al*, 2005). Este arranjo permite que a esfingomielina, provavelmente, interaja com a hidroxila do colesterol (3β -OH) através de uma ligação de hidrogênio e este com o grupamento carbonila da esfingomielina (Veiga *et al*, 2001). Devido a essas interações, não

encontramos ésteres de colesterol associados a tais domínios, uma vez que as hidroxilas estão substituídas.

Os gangliosídios, por exemplo, apresentam várias unidades de açúcar. A base da esfingosina é saturada e os esfingolipídios são geralmente acilados com ácidos graxos saturados. Um dos aspectos mais relevantes da estrutura dos esfingolipídios é a presença de duas longas cadeias saturadas do tipo alquila. É justamente por este fato que as cadeias podem ser condensadas pela presença do esterol a fim de se formar a fase líquida ordenada. Isso aparentemente ganha importância quando se avalia a estabilidade do gangliosídeo GM₁ acilado por cadeias saturadas na *raft*, sendo possível recuperá-lo nas frações resistentes a detergente, enquanto que aqueles que contêm ácidos graxos insaturados não particionam nas *lipid rafts* (Panasiewicz *et al*, 2003).

Vale ainda ressaltar que essa interação de colesterol e esfingolipídios está caracterizada no folheto externo da membrana plasmática, mas a caracterização do folheto interno ainda se encontra incompleta. Provavelmente, ele é rico em fosfolipídios com ácidos graxos saturados e colesterol. Acredita-se que as longas cadeias de ácidos graxos dos esfingolipídios no folheto externo alcancem o citoplasmático e criem interdigitações. Propriedade esta que seria auxiliada pela presença de proteínas transmembrana que estabilizariam o domínio (revisto por Simons & Toomre, 2000).

Além da modulação ocasionada pelos lipídios, as *lipid rafts* são afetadas pelo seu conteúdo protéico. Tratando-se de proteínas freqüentemente encontradas nos domínios *raft*, podemos destacar as caveolinas e as flotilinas, entre outras, que exercem suas funções biológicas nesses microdomínios de membrana.

4.a. Cavéolas e Caveolinas

As caveolinas são proteínas que participam da formação de microdomínios especializados, denominados cavéolas, as quais apresentam uma morfologia singular quando observadas pela microscopia eletrônica (Palade, 1953, Yamada *et al*, 1955). As cavéolas podem ser vistas como pequenas cavidades de 50-100 nm na membrana plasmática da célula (Shin e Abraham, 2001) e se caracterizam, principalmente, por não apresentarem o revestimento de moléculas de clatrina, de onde podem brotar vesículas pinocíticas (Rothberg *et al*, 1992), as quais podem se fundir posteriormente aos endossomos, ou à membrana do lado oposto em uma célula polarizada (transcitose) (Rothberg *et al*, 1992) (Figura 5).

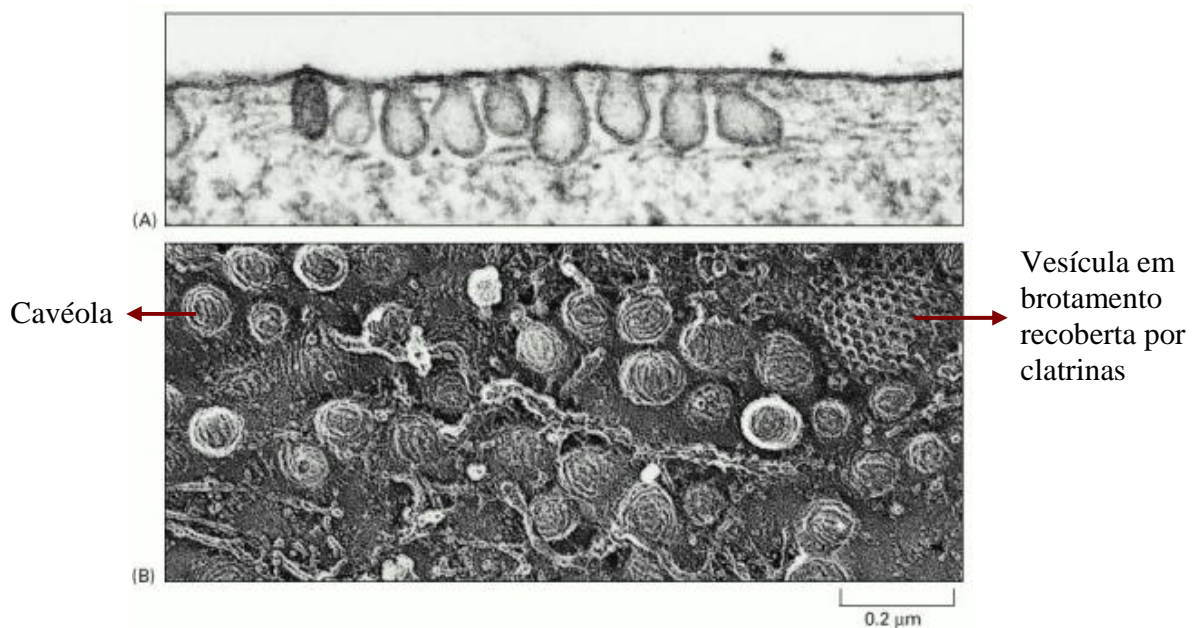


Figura 5: Micrografia eletrônica mostrando cavéolas em fibroblastos;

(A) Corte ultrafino, onde não se observa qualquer revestimento citoplasmático; (B) Réplica da face citoplasmática obtida por congelamento rápido por alta pressão seguido de *deep-etching*, mostrando várias cavéolas, com seu aspecto rugoso característico, e ainda uma vesícula em processo de brotamento revestida por clatrininas. (adaptado de Alberts e colaboradores, 2002).

Até o momento foram identificados três tipos de caveolinas:

- i) caveolina 1 _ originalmente conhecida como VIP 21-caveolin (*vesicular integral membrane protein*), por constituir o principal componente das vesículas originadas na rede trans-Golgi (TNG) e que foram posteriormente isoladas na fração resistente a detergente. Presumivelmente, a caveolina 1 trafega entre o complexo de Golgi e a superfície celular (Dupree *et al*, 1993). Tem peso molecular de 21 kDa, e é a principal proteína caveolar (Parton, 1996), pois é a responsável pela estrutura da cavéola dada a formação de oligômero de caveolinas. A caveolina polimerizada apresenta mais afinidade pelas moléculas de colesterol do que a caveolina em monômeros ou em oligômeros pequenos (Murata *et al*, 1995) e, provavelmente, é esta cobertura de caveolinas que proporciona o micro-ambiente da *lipid raft* no qual mais moléculas de colesterol e esfingolípídios particionam (Bauer & Pelkmans, 2006).
- ii) caveolina 2 _ é uma proteína muito similar à caveolina 1, incluindo sua ocorrência, embora seja mais abundante no tecido adiposo. Apresenta peso molecular de 20 kDa;
- iii) caveolina 3 _ originalmente conhecida como M-caveolina, devido a sua distribuição de forma específica no tecido muscular. A caveolina 3 parece substituir a caveolina 1 neste tecido (revisto por Parton, 1996), e apresenta peso molecular de 18 kDa.

Todas as isoformas de caveolina são integrais. No entanto, não atravessam a membrana, formam uma alça em formato de grampo (*hairpin loop*) dentro da bicamada, e as regiões carboxi e amino terminais ficam voltadas para o lado citosólico. Além disso, parte da cadeia polipeptídica pode ser palmitoilada, o que auxilia na sua inserção na membrana plasmática, e a caveolina-1 apresenta um domínio conservado de 20 aminoácidos denominado *caveolin-scaffolding domain*, cujos resíduos são os aminoácidos 82-101 (Shin & Abraham, 2001). (Figura 6).

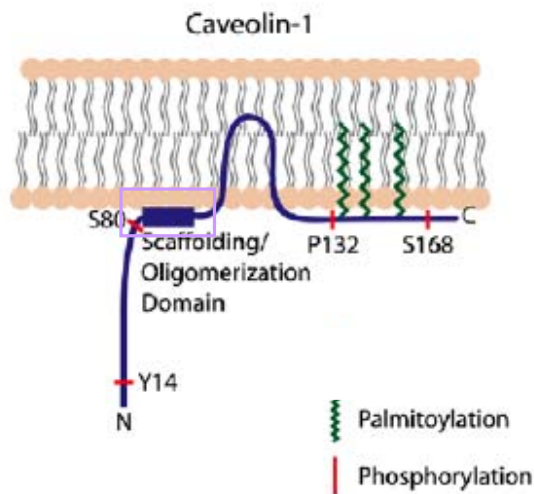


Figura 6: Desenho esquemático mostrando uma bicamada lipídica e a alça da caveolina 1 inserida parcialmente na membrana (azul), enquanto que em verde, observam-se os sítios de palmitoilação da proteína. Em destaque (lilás), podemos ver ainda o domínio onde a oligomerização ocorre. (Bauer & Pelkmans, 2006)

4.b. Aspectos funcionais das cavéolas:

As cavéolas estão associadas a vários fenômenos biológicos, dentre tantos, podemos destacar: i) a sinalização celular, uma vez que vários elementos de cascata de sinalização celular estão concentrados nesses domínios: receptores para vários fatores de crescimento, para hormônios, os quais podemos incluir o fator de crescimento epidermal, o fator de crescimento derivado de plaquetas e insulina (revisto por Shin & Abraham, 2001). Além disso, vale ressaltar ii) sua associação com os receptores acoplados à proteína G, os receptores para tirosina cinases, e outras cinases e fosfatases assim como isoformas das proteínas cinases C (revisto por Shin & Abraham, 2001). Dentre outros aspectos interessantes, Anderson (1998) propôs que iii) a entrada de alguns ligantes ocorreria por um fenômeno chamado de potocitose, no qual as cavéolas se fechariam temporariamente e não se moveriam da membrana, o que aconteceria sem o envolvimento do sistema endossomal. De lá pequenas moléculas e íons do meio extracelular seriam transportados para o interior da célula, como o mecanismo de captação de folato nas células, que se dá através de receptores ancorados a GPI, concentrados nas cavéolas e ausentes nas vesículas revestidas com clatrina (Parton, 1996).

4.c. Flotilinas

As flotilinas são proteínas descritas há pouco mais de uma década (Duvic *et al*, 1994). Contudo, foram caracterizadas independentemente por três grupos distintos, recebendo assim, denominações diferentes. Em 1994, o grupo de Madeleine Duvic, utilizando hibridomas desenvolvidos contra uma cultura de queratinócitos humanos, obtiveram um anticorpo monoclonal (mAb), ESC-1, que reagia com uma proteína de superfície de 41,7 kDa obtida a partir da epiderme do prepúcio de neonatos e de uma cultura de queratinócitos nos ensaios de *western blotting*. *In vitro*, o reconhecimento pelo anticorpo ocasionava um destacamento da cultura, sugerindo um possível papel do antígeno do ESC-1 na adesão celular. Além disso, estudos com o anticorpo anti ESC-1, possibilitou identificar cDNA e caracterizar o ligante reconhecido por esse anticorpo. Esse estudo mostrou que o ligante era o ESA (*epidermal surface antigen*), cujos níveis de RNA mensageiro eram bastante significativos na epiderme, melanomas e linhagens de células tumorais, de cópia única, muito conservado em células de mamífero, mas ausente em anfíbios e insetos.

A análise da seqüência de polipeptídeos indicava que a proteína não continha um peptídeo sinal, região transmembrana ou sítios potenciais de glicosilação. Mas apresentava potenciais sítios de reconhecimento para proteínas cinases dependentes de GMPc, sítios de fosforilação para caseína cinase 2, para a fosforilação da proteína cinase C e para resíduos de tirosina.

Três anos depois, Bickel e colaboradores, utilizando o sobrenadante obtido a partir da centrifugação em gradiente de sacarose de fibroblastos tratados com Triton X-100 a 1% e 4°C, descreveram duas novas proteínas integrais de membrana presentes em cavéolas: flotilina e ESA. Flotilina e ESA co-localizam nas mesmas frações do gradiente que a caveolina 1, localizada em células da linhagem 3T3-L1 tratadas ou não com detergentes. Caveolina e flotilina apresentavam a mesma distribuição tecidual, com exceção do cérebro, em que a flotilina era facilmente

detectável e caveolina não. Sendo assim, a flotilina se tornou um novo marcador de *lipid rafts* em cérebro. Além disso, a homologia entre ESA e flotilina e a co-purificação com caveolina 1 sugerem que essas duas proteínas são membros próximos da mesma família de genes. Outra coisa é que ESA parecia ser um nome inapropriado, uma vez que é expressa em outros tipos celulares e não apenas em queratinócitos, adipócitos e células endoteliais. Os autores propuseram uma nova terminologia, ou seja, que flotilina viesse a se chamar flotilina-1 e que ESA recebesse o nome de flotilina-2 (Bickel *et al*, 1997).

Na tentativa de se caracterizar proteínas envolvidas com o processo de regeneração de axônios, Schulte e colaboradores (1997) descreveram duas novas proteínas: *reggie* 1 e 2. O nome vem do termo em inglês “regeneration”. Todavia, a expressão dessas proteínas também não se limitava a um único tipo celular. As *reggies* também foram identificadas nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e na pele.

Por outro lado, o grupo de Stuermer (1998) demonstrou a presença de *reggie* 1 e 2 em microdomínios de membrana, diferentes das cavéolas, em neurônios de ratos. Anticorpos anti-*reggie* 1 e 2 revelaram pequenos *clusters* (grumos) na membrana plasmática e que ocorriam nos gânglios da raiz dorsal, gânglio da retina, nas células PC-12 (feocromocitoma) e em células não neuronais.

Recentemente, Langhorst e seu grupo (2006) demonstraram que as flotillinas formavam uma plataforma de iniciação para a agregação de receptores em células T, o que seria essencial para o processo de apresentação de antígenos. Além disso, com o uso da técnica de recuperação da fluorescência após a foto-extinção (FRAP- *fluorescence recovery after photobleaching*), foi possível demonstrar que essas plataformas eram muito estáveis. Estruturalmente, as flotilinas pertencem à superfamília SPFH (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/HflK/C), na qual os membros compartilham um domínio com seqüências similares na região amino terminal, mas de função

desconhecida (revisto por Langhorst *et al*, 2005). Já a região carboxi terminal das flotilinas é idêntica, caracterizada por seqüências repetidas de ácido glutâmico e alanina (Schroeder *et al*, 1994; Bickel *et al*, 1997, revisto por Langhorst *et al*, 2005).

Assim como as caveolinas, as flotilinas não apresentam um domínio transmembrana. Tanto as regiões C e N terminais estão voltadas para o lado citossólico. Suas regiões hidrofóbicas aparentemente interagem com a membrana, mas não a atravessam (revisto por Langhorst *et al*, 2005). Flotilina 1 (*reggie-2*) é palmitoilada (Morrow *et al*, 2002), enquanto que flotilina 2 (*reggie-1*) é miristoilada e palmitoilada (Neumann-Giesen *et al*, 2004; Bauer & Pelkmans, 2006), o que as torna, dessa maneira, associadas à membrana (Figura 7).

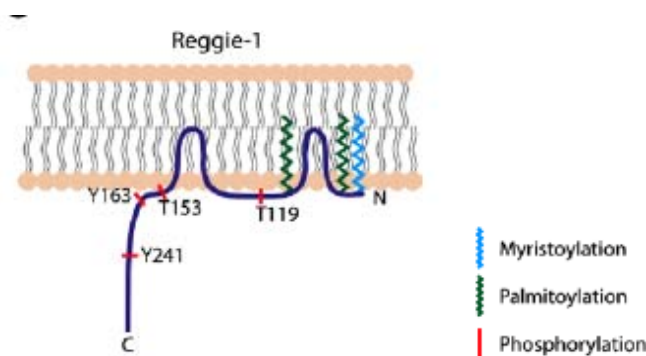


Figura 7: Desenho esquemático mostrando uma bicamada lipídica e as alças da flotilina 2 (*reggie-1*) inseridas parcialmente na membrana (azul escuro), enquanto que em verde, observam-se os sítios de palmitoilação da proteína, e em azul claro os de miristoilação. Em vermelho, podemos ver ainda os sítios de fosforilação.(Bauer & Pelkmans, 2006).

5. Metodologias empregadas no estudo das Lipid Rafts:

5.1 Gradientes: A primeira metodologia desenvolvida para o estudo das *lipid rafts* é proveniente do tratamento com detergentes não iônicos (Brown & Rose, 1992), como o Triton X-100, NP-40, Lubrol, Brij 58, Brij 98, a 4 °C (Schuck *et al*, 2003). Neste método,

as *rafts* flutuam em baixa densidade num gradiente de sacarose ou OptiPrep (Chmelar & Nathanson, 2006). Apresenta a vantagem ser de fácil execução e constituiu o método mais comum. Contudo, não utiliza células vivas, o que permite a ocorrência de artefatos. Além disso, associações fracas de proteínas, lipídios ou outras moléculas com *rafts* são mais difíceis de detectar. Por último, mudanças no tipo de detergente empregado e a concentração micelar crítica podem levar a resultados distintos (revisado por Simons & Toomre, 2000);

5.2. Fluorescência: Outra metodologia que auxilia na identificação das *rafts* é a imunofluorescência resultante do *patching* de anticorpos contra proteínas presentes nesses domínios. São melhores na detecção de interações fracas com as *rafts* e apenas trazem a informação de identificar prováveis associações com *rafts* (revisado por Simons & Toomre, 2000). Por outro lado, fluoróforos utilizados por Schutz e colaboradores (2000) possibilitaram o monitoramento da difusão e da dinâmica de proteínas e lipídios nas *rafts* e fazem uso de células vivas. Tal metodologia pode ser aplicada, uma vez que tais domínios l_o são sensíveis ao uso de sondas lipídicas que apresentam caudas aciladas saturadas. Além disso, o grupo demonstrou que as propriedades observadas com tal metodologia são compatíveis com as observadas nas membranas resistentes a detergentes (DRMs). Já a toxina do cólera, tradicional marcador para *lipid rafts*, se liga ao gangliosídeo GM₁, ancorado à face externa da membrana (Cuatrecasas, 1973). Apresenta a desvantagem de marcar apenas os domínios que contêm os sítios de ligação de GM₁;

5.3. Desestabilizantes de *rafts*: Moléculas desestabilizadoras de *rafts* são bastante úteis na detecção de regiões altamente enriquecidas em colesterol, como é o caso do antibiótico filipina, que se liga irreversivelmente a esteróis, levando a formação de pequenas ondulações na membrana, visíveis ao microscópio eletrônico; ou o uso de surfactantes

como a metil β -ciclodextrina, que extrai o colesterol nas membranas (revisado por Simons & Toomre, 2000). Como resultado, eventos endocíticos e processos de sinalização celular dependentes da integridade dos domínios *raft* podem ser avaliados dentro de uma faixa específica de ação do surfactante;

5.4. Imunocitoquímica: A imunocitoquímica em microscopia eletrônica, por sua vez, permite localizar os perfis de membrana das células que apresentam domínios *raft*. (revisado por Simons & Toomre, 2000);

5.5. Inibidores enzimáticos: Os inibidores metabólicos também constituem boas ferramentas no estudo das *lipid rafts*. Por exemplo, podemos citar aqueles envolvidos com a biossíntese de esfingolipídios, de ceramidas e glicosfingolipídios. A ISP-1 (miriocina/termozimocidina) é extraída do fungo *Isalia sinclairii* é um seletivo inibidor da SPT (serina palmitoil transferase), que atua na condensação da serina e do palmitoil CoA, constituindo a primeira etapa na síntese de esfingolipídios. Além da ISP-1, a sulfamisterina (extraída do fungo *Pycnidiella* sp) vem apresentando excelentes resultados na inibição de esfingolipídios em células CHO (Chinese Hamster Ovary) e em leveduras. Ambos são análogos da esfingosina. Além disso, o $_D$ -PDMP ($_D$ - treo-1-fenil-2-decanoilamino-3-morfolino-1-propanol) é um conhecido inibidor da UDP-glicose:ceramida glicosiltransferase, que participa do primeiro passo da via de formação de glicosfingolipídios (revisado por Kobayashi *et al*, 2006).

5.6. Microscopia de força fotônica: permite determinar a difusão contínua, o tamanho e a dinâmica de *rafts* individuais. Uma micro-esfera ligada à proteína de interesse fica confinada numa armadilha de laser e as flutuações das posições termais da esfera podem ser rastreadas numa resolução de subnanômetros e microsegundos (Pralle *et al*, 2000). A

presença de proteínas transmembrana e ancoradas por GPI ocasiona uma difusão mais lenta do que o resto da bicamada não *raft*. Além disso, a depleção de colesterol leva a um aumento da difusão. Tem como vantagem o uso de células vivas; porém, requer elevado conhecimento da técnica e tempo de análise (revisto por Simons & Toomre, 2000);

6. Ocorrência das *lipid rafts* nos tripanossomatídeos:

No *Trypanosoma cruzi*, ainda não foi demonstrada a ocorrência de *lipid rafts*, mas os estudos acerca dessas estruturas já se encontram adiantados em outros membros da família. No *T. brucei*, por exemplo, o isolamento de domínios resistentes a detergentes (DRMs) levou à caracterização de uma proteína de superfície rica em resíduos de alanina, denominada BARP (*bloodstream stage alanine-rich protein*), ancorada por GPI. Curiosamente, o principal glicoconjugado nestes organismos, a VSG (*variant surface glycoprotein*) não participou nos DRMs, mostrando-se distribuída homogeneamente na superfície da célula, (Nolan *et al*, 2000). Contudo, diferentemente da VSG, que está envolvida no processo de virulência do protozoário, a função da BARP ainda não foi elucidada.

Por outro lado, em protozoários do gênero *Leishmania*, Denny e colaboradores (2001) mostraram que em *L. major*, domínios enriquecidos com inositolfosforilceramida e esteróis estavam presentes nas frações resistentes a detergente, enquanto que a maior parte das GIPLs solubilizaram frente ao tratamento com detergente. Além disso, as principais glicoproteínas ancoradas por GPI em *Leishmania*, a metaloprotease GP63 (ou leishmanolisina) e a LPG (lipofosfoglicana) foram extraídas nos DRMs. Fisiologicamente, tais glicoconjugados estão envolvidos com os eventos de patogenia, uma vez que a GP63 hidrolisa enzimas presentes no trato digestivo do inseto vetor e aquelas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado (revisto por Alexander *et al*, 1999). A LPG mostra-se igualmente importante no estágio intracelular do

parasito, ou seja, no processo de invasão e sobrevivência no interior do vacúolo parasitóforo em macrófagos (Rasmusson & Descoteaux, 2004).

7. Por que os reservossomos teriam lipid rafts?

Embora a caracterização dessas organelas tenha começado há quase duas décadas, poucos trabalhos nesses anos contribuíram para uma melhor elucidação do papel que essas estruturas desempenham nos epimastigotas. A ausência de marcadores endossomais conhecidos em células de mamífero que o caracterizariam como compartimentos pré-lisossomais e a presença de um marcador de compartimentos de reciclagem apenas ressaltam a importância que essas estruturas desempenham no parasito. A ultra-estrutura da organela levanta muitos outros questionamentos. Os reservossomos acumulam uma grande quantidade de lipídios, que provavelmente são decorrentes, em sua maioria ou completamente, do processo endocítico. Tais corpos lipídicos podem ser visualizados como estruturas elétron-lucentes (claras) após o processamento do material para microscopia eletrônica de transmissão e se apresentam com o aspecto retangular ou amorfo. Além disso, uma excepcional quantidade de membranas internas aparentemente planares com um perfil de distribuição aleatório muito frequente. E mais, vesículas internas são pouco perceptíveis (Figuras 8a e 8b). Os trabalhos anteriores de Soares e De Souza e de Porto-Carreiro e colaboradores (vide seção I.2) demonstraram claramente o papel que o reservossomo possui: receber e armazenar o material proveniente do processo endocítico.

O material endocitado precisa e é processado dentro ou em parte nos reservossomos. Tanto a acidificação por uma bomba de prótons que mantém o pH ideal para a atuação das enzimas da organela quanto a grande quantidade de cisteína protease (cruzipaína) corroboram esse fato. Mas como? E o resto? Quais seriam as seqüências de eventos que controlariam os processos bioquímicos no interior dos reservossomos? Como a sinalização celular estaria

integrada? Por que *lipid rafts* estariam presentes? Já é sabido que as *lipid rafts* estão envolvidas nessa rede de eventos, seja modulando processos de endocitose, seja no tráfego intracelular e, em especial, nos eventos de sinalização que coordenam esses fenômenos em células de mamíferos (Brown, 2006). Um processo bastante explorado nestes tipos celulares, mas insipiente nos protozoários. A literatura corrente sustenta esses fatos, como é o caso da internalização da toxina do cólera por cavéolas e o seu acúmulo em endossomas iniciais, num processo independente do revestimento por clatrininas (revisto por Parton & Richards, 2003) (figura 8c). Além disso, glicosfingolipídios são internalizados a partir da membrana plasmática por um processo independente de clatrininas e depois transportados para os endossomas iniciais. De lá, duas rotas podem ser tomadas: ou eles são direcionados para o Golgi passando pelos endossomas tardios ou são reciclados novamente para a membrana (revisto por Helms & Zurzolo, 2004). Ou ainda, podemos relacionar os casos das proteínas ancoradas por GPI, que utilizam a plataforma formada pelas caveolinas, e de lá são entregues tanto aos endossomas iniciais quanto aos endossomas de reciclagem e à superfície celular (revisto por Parton & Richards, 2004). A existência de domínios enriquecidos com esteróis e esfingolipídios encontra-se atualmente atrelada a duas situações: i) síndrome de Niemann Pick, no qual nos tipos A e B, há um acúmulo de esfingolipídios, enquanto que no C, eleva-se a concentração de colesterol (Simons & Gruenberg, 2000) e ii) nas membranas internas dos corpos multivesiculares (revisto por Helms & Zurzolo, 2004).

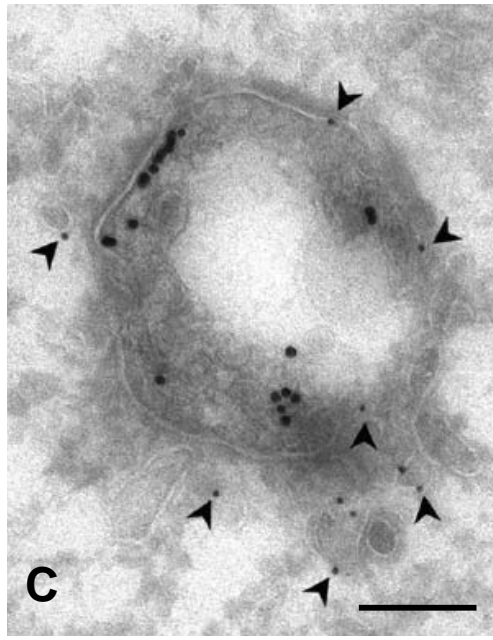
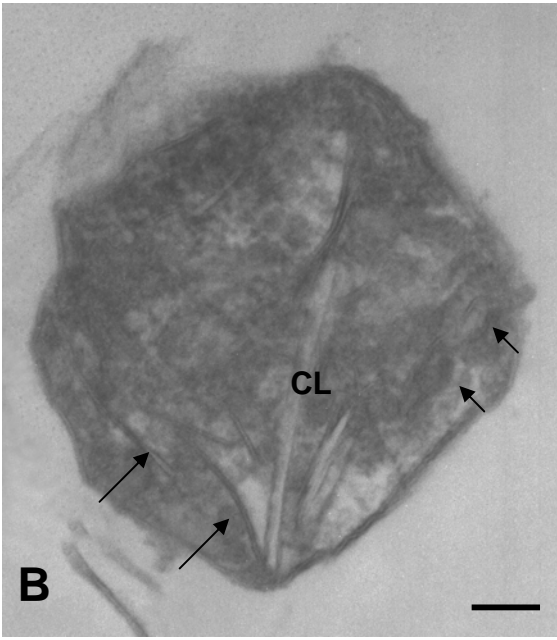
Em linfócitos B humanos da linhagem RN existe um verdadeiro gradiente de colesterol ao longo do sistema endossomal. Mais de 60% do colesterol se encontra concentrado nos corpos multivesiculares, participando de domínios de membrana na via endocítica (Möbius *et al*, 2003).

As flotilinas, por sua vez, também estão envolvidas em domínios além daqueles presentes na membrana plasmática. Elas podem ser encontradas na região pericentrossomal, em lisossomos e também em corpos multivesiculares (Gagescu *et al*, 2000; Solomon *et al*, 2002). Em exossomos

de reticulócitos, GM₁, Lyn, flotilina 1 e moléculas de MHC- II co-localizaram na fração resistente ao tratamento com Triton X-100, sugerindo uma possível participação desses domínios na resposta imune (de Gassart *et al*, 2003). Ainda assim, pouco se sabe a respeito de flotilinas no tráfego vesicular. Elas ainda não foram localizadas em endossomos iniciais (revisito por Langhorst *et al*, 2005) e sabe-se apenas que são co-purificadas com outras moléculas, em especial as que atuam na sinalização celular, estomatina, proteínas G_α, entre outras (Foster *et al*, 2003).

A presença de domínios enriquecidos em esteróis e esfingolipídios nos reservossomos não elucidaria completamente os eventos bioquímicos que a organela estaria envolvida. Mas, certamente, contribuiria sobremaneira para a caracterização desses tipos de domínios em organelas da via endocítica, em especial, nos compartimentos de protozoários. Ademais, esclareceria que estas organelas exercem um papel muito mais dinâmico e integrado na biologia celular dos epimastigotas do que simples organelas de estoque e degradação do material endocitado.

Figura 8: (A) Corte longitudinal de epimastigota de *T.cruzi* mostrando na região posterior reservossomos (R) e suas inclusões lipídicas (elétron-lucentes). A seta aponta para um corpo lipídico retangular. Núcleo (N); (B) Reservossomo isolado apresentando vários perfis de membrana (setas grandes), um corpo lipídico retangular (CL) e duas vesículas (setas pequenas); (C) Endossoma inicial de fibroblastos mostrando a co-localização de EEA+ (*early endosome antigen*) com caveolina, marcados com anticorpos conjugados a partículas de ouro coloidal de 14 e 10 nm, respectivamente. Extraído de Parton & Richards, 2003. Barras: 200 nm.



II. OBJETIVOS

1. Objetivo geral:

Avaliar a presença de microdomínios de membrana nos reservossomos das formas epimastigotas de *T.cruzi*.

2. Objetivos específicos:

- Averiguar se os reservossomos apresentam membranas resistentes a detergente;
- Identificar quais perfis de membrana na organela, as internas ou a membrana que delimita o compartimento, são as resistentes a detergente;
- Avaliar a composição lipídica das membranas resistentes a detergente;
- Avaliar a presença de glicoconjugados nas frações resistentes a detergente.

Material e Métodos

III. MATERIAL E MÉTODOS

1. Cultivo dos parasitos

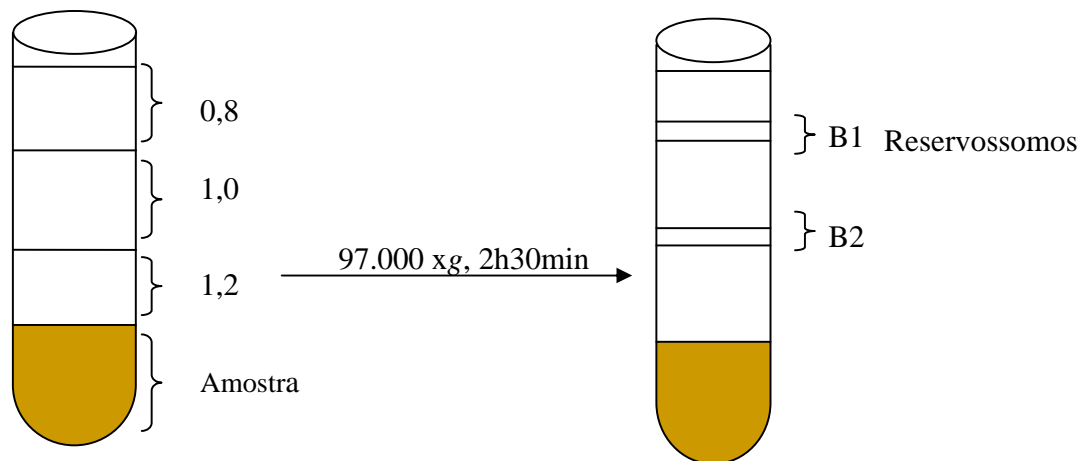
Epimastigotas da cepa Y foram cultivados em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) (Camargo, 1964), suplementado com SFB (soro fetal bovino) a 10% por 4 a 5 dias a 28°C para os ensaios de fluorescência ou para se obter, aproximadamente, $3,0 \times 10^{10}$ células em 3L de meio de cultivo necessário para o ensaio de isolamento dos reservossomos.

Coanomastigotas de *Crithidia deanei* foram cultivados em meio Warren (1960) suplementado com SFB 5% por 2 dias a 28°C.

2. Isolamento dos reservossomos

Reservossomos foram purificados através do protocolo desenvolvido por nós (Cunha e Silva *et al.*, 2002). Resumidamente, os parasitos foram lavados 1 vez em tampão TMS (Tris-HCl 20 mM pH 7,3 + MgCl₂ 2 mM + sacarose 250 mM), ressuspensos no mesmo tampão e sonificados a 10% da amplitude total no ultra-sonicador (Ultrasonic sonicator) para se romper as células. O homogeneizado obtido foi, então, centrifugado a 2450 xg e o sobrenadante pós-nuclear foi recolhido e misturado na proporção de 1:1 com uma solução de sacarose 2,3 M em tampão Tris-HCl 20 mM pH 7,3 + MgCl₂ 2 mM, de forma que a concentração final fosse de 1,27 M. A amostra foi colocada no fundo de um gradiente de sacarose, cujas concentrações são 1,2 M, 1,0 M e 0,8 M. O conjunto foi centrifugado a 97.000 xg por 2 h 30 min no rotor SW28 e na centrífuga Beckman (L8-70M Ultracentrifuge), como mostrado no esquema 1.

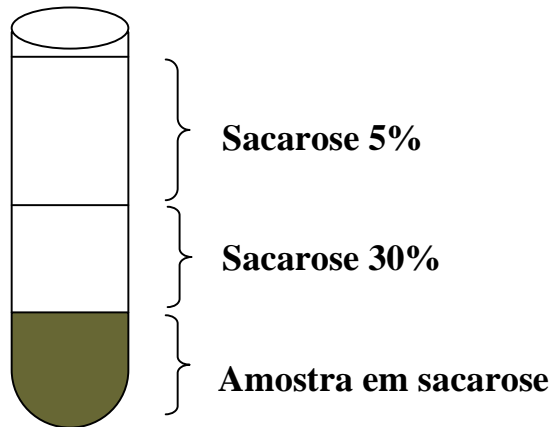
Esquema 1:



3. Isolamento das membranas resistentes a detergente dos reservossomos:

A fração de reservossomos isolados foi avolumada para 1mL com tampão TNE (Tris-HCl 25mM pH 7,3 + NaCl 150mM + EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) 5mM e sonicada 10% da amplitude total do aparelho (Branson Sonifier 250) por 3 ciclos de 10s e intervalo de 3s. Ao término, o material foi tratado com Triton X-100 1% em tampão TNE por 20 minutos a 4°C. Finalizado o tratamento, a amostra foi misturada com um tampão de sacarose 80% (2,3 M) em TNE na proporção de 1:1, de forma que a concentração resultante da amostra fosse de 40 %. Assim como no gradiente anterior, a amostra também foi depositada no fundo de um gradiente de sacarose, cujas concentrações finais foram de 30% (0,88 M) e 5% (0,15 M), e centrifugadas por 20-22 h a 300.000 xg no rotor SW40Ti na centrífuga Beckman (Optima LE-80K Ultracentrifuge), como mostrado no esquema 2. Ao término, 14 alíquotas de 1 mL foram recolhidas do topo para o fundo do gradiente, diluídas em tampão TNE e centrifugadas por 20 h a 182.000 xg no rotor SW40Ti na centrífuga Beckman (Optima LE-80K Ultracentrifuge) para a diluição da sacarose e remoção do material.

Esquema 2:



4. Microscopia Eletrônica de Transmissão (M.E.T.)

Epimastigotas inteiros, reservossomos isolados e das frações do gradiente de sacarose foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M por 1h a temperatura ambiente, lavados 3 vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1 M pH 7,2, pós-fixados em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2 acrescido de tetróxido de ósmio 1% + ferrocianeto de potássio 0,8% + cloreto de sódio 5 mM por 45 min no escuro. As amostras foram lavadas mais 3 vezes em tampão cacodilato de sódio, desidratadas em série crescente de acetona (50, 70, 90 e 100%) por 10 min cada e incluídas em resina Epon: acetona (1:1) por 16h. Em seguida, as amostras foram incluídas em resina pura por 6h à temperatura ambiente e colocadas para polimerizar por 48h a 60°C. Secções ultrafinas foram obtidas do material e contrastadas com acetato de uranila 5% em água por 45 min, citrato chumbo por 5 min e examinadas ao microscópio eletrônico JEOL 1200 operando a 80 kV.

5. Detecção de glicoconjugados:

A literatura corrente associa, freqüentemente, a presença de glicoconjugados, como o gangliosídeo GM₁ e aqueles ancorados por GPI aos domínios do tipo *lipid raft*. Desta maneira, resolvemos utilizar a toxina do cólera subunidade B (CT-B) conjugada à FITC (*fluorescein isothiocyanate*) ou a HRP (*horseradish peroxidase*) para a detecção de glicoconjugados semelhantes GM₁.

5.1. Dot blot das frações do gradiente de sacarose

Alíquotas do gradiente de sacarose foram aplicadas diretamente sobre uma membrana de nitrocelulose, bloqueadas com TBS-Tween-BSA (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 0,05% e BSA 3%) por 1h a temperatura ambiente. Em seguida, CT-B conjugada à peroxidase (1: 20.000) diluída no mesmo tampão foi adicionada por 3h à temperatura ambiente. Ao término, a toxina foi removida e a membrana foi lavada 5 vezes de 5min em TBS. O sistema foi revelado pelo Kit ECL da Amershan segundo as especificações do fabricante.

5.2. Fluorescência de parasitos inteiros

A presença de domínios lipídicos semelhantes a “lipid rafts” presentes em epimastigotas vivos e nas formas coanomastigotas de *Crithidia deanei* foi detectada utilizando toxina do cólera subunidade B (CT-B) conjugada a FITC. Para tanto, as células previamente resfriadas em meio RPMI por 15 min a 4°C foram incubadas com a toxina (100 µg/mL) em meio RPMI a 4°C, donde uma alíquota foi retirada e fixada em formaldeído 4% em PBS para observação no microscópio. O restante foi lavado em PBS para se remover o excesso do marcador não ligado incubado por 30 min a 28°C, de forma a propiciar que o conteúdo que se ligou à membrana plasmática pudesse ter alcançado os reservossomos. Finalmente, as células foram lavadas 2 vezes em PBS e fixadas para

observação no microscópio, montadas em lamínulas revestidas com poli-lisina L 0,1%, cobertas com n-propil galato 0,2 M em glicerol:PBS (9:1) e observadas no microscópio Axioplan (Zeiss) acoplado a uma câmara digital Hamamatsu color chilled 3000 (C5810).

6. Imunomarcção para flotilina 2:

6.1. *Dot blot* das frações do gradiente:

Assim como no ensaio para detecção de glicoconjugados, as frações do gradiente foram aplicadas diretamente na membrana de nitrocelulose, bloqueadas com tampão TBS + Tween + leite desnatado (Tris-HCl 25 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, Tween 0,05% + leite desnatado 5%) e incubadas com o anticorpo anti flotilina 2 (Santa Cruz Biotechnology (sc-16645)) por 1h à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi lavada em tampão de bloqueio (5 lavagens de 5 min) e incubada com o anticorpo secundário (anti-goat IgG) conjugado à peroxidase. O conjunto foi revelado pelo Kit ECL da Amershan de acordo com as especificações do fabricante.

6.2. Contrastação Negativa

Reservossomos isolados foram depositados sobre uma grade de níquel revestida com Formvar/carbono por 25 min. Em seguida, o material foi fixado por inversão sobre uma gota de formaldeído 2% em PBS por 30 min à temperatura ambiente e depois lavado duas vezes em PBS por 3 min. O material foi, então, incubado em PBS + glicina 100 mM para que houvesse o bloqueio dos grupamentos aldeídos não específicos por quatro vezes de 3 min. Ao término, o conjunto foi bloqueado com BSA 3% em PBS por 10 min e permeabilizado, posteriormente, com BSA 1% + saponina 0,1% em PBS por 20 min.

O material foi incubado com o anticorpo anti-flotilina 2 (anticorpo primário) (Santa Cruz Biotechnology (sc-16645) na diluição de 1:10 no mesmo tampão de permeabilização por 30 min à temperatura ambiente. A lavagem do material foi realizada em BSA 0,2% + saponina 0,1% em

PBS por seis vezes de 3 min. Posteriormente, um anticorpo secundário anti-goat (1:200 em BSA 0,2% + saponina 0,1% em PBS) foi incubado por 25 min, tendo como objetivo funcionar como ponte para a posterior marcação com a proteína A ligada a ouro coloidal. O material foi lavado em BSA 0,2% + saponina 0,1% em PBS por seis vezes de 3 min. e incubado com proteína A ligada a ouro coloidal de 10 nm na diluição de 1:50 em BSA 1% + saponina 0,1% em PBS por 20 min. O material foi lavado oito vezes em PBS por 2 min e fixado em glutaraldeído 1% em PBS por 5 min e lavado mais oito vezes em água por 2 min.

A contrastação do material foi realizada com uranila 2% em água pH 4/PVA (ácido polivinílico) (1:9) em gelo por 10 min. Ao término, as grades foram secas com papel de filtro e examinadas ao microscópio eletrônico JEOL 1200 operando a 80 kV.

O controle negativo foi realizado sem a adição do anticorpo primário.

6.3. Imunofluorescência

Epimastigotas foram lavados em meio LIT sem soro duas vezes, fixados em formaldeído 4% em PBS e aderidos em lamínulas revestidas com poli L-lisina 0,1% por 20 min à temperatura ambiente. Os parasitos não aderidos foram removidos por uma lavagem em PBS. Os parasitos foram incubados em 50 mM de cloreto de amônio em PBS por 30 min, a fim de bloquear os grupamentos aldeídicos livres. As células foram permeabilizadas com NP-40 0,5% em PBS por 5 minutos e lavadas novamente com PBS. Os parasitos foram posteriormente incubados com o tampão de bloqueio BSA 3% em PBS por 30 min e o anticorpo policlonal flotilina 2 (Santa Cruz Biotechnology (sc-16645) (1:25) diluído no mesmo tampão de bloqueio foi adicionado por 1h. Ao término, 5 lavagens de 5 min em tampão de bloqueio foram realizadas para a remoção do anticorpo primário. O anticorpo secundário anti-goat IgG Alexa 488 (Molecular Probes-Invitrogen) foi utilizado na diluição de 1:800 em tampão de bloqueio e incubado por mais 1h. A

remoção do anticorpo secundário foi realizada em 6 lavagens de 5 min. com PBS. Todo o ensaio foi realizado à temperatura ambiente.

7. Dosagem de Proteínas:

Das frações recolhidas no gradiente, 50 μ L foram retirados e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Lowry *et al* (1951), utilizando BSA (fração V) como padrão para análise da concentração protéica.

8. Análise Lipídica

8.1. Extração Lipídica

As frações do gradiente recolhidas foram submetidas à extração lipídica de acordo com o método de Bligh e Dyer (1959) em clorofórmio/metanol/água 2:1:0,8 (v/v), cujo volume final era de 1 mL, sob agitação de 5 em 5 min por 1h, centrifugados por 20 min em centrífuga clínica a 1500 xg . O sobrenadante foi separado do *pellet* protéico e este submetido mais uma vez à extração lipídica sob as mesmas condições. Ao término, os sobrenadantes foram combinados e novamente submetidos ao tratamento com clorofórmio/água (2:1) (v/v), no volume final de 1 mL, homogeneizados e centrifugados por 30 min a 1500 xg . A fase orgânica (inferior) apresentando os lipídios foi seca em vapores de nitrogênio gasoso.

8.2. Dosagem de Esterol:

Lipídios extraídos das frações do gradiente de sacarose, como descrito no item 8.1, foram quantificados quanto ao seu conteúdo de esterol pelo método de Zlatkis e colaboradores (1953). As amostras foram ressuspensas em 750 μ L de ácido acético glacial e, em seguida, foram adicionados 500 μ L da solução de $FeCl_3$ 0,2% em H_3PO_4 85% e H_2SO_4 concentrado. As amostras

foram lidas a 550 nm no espectrofotômetro Ultrospec 1000 UV/Visible Spectrophotometer (Amershan Pharmacia Biotech), utilizando colesterol (Sigma Chemical Co, St Luis, MO) como padrão para a análise da concentração de esterol.

8.3. Cromatografia de Camada Fina (TLC)

Extraídos os lipídios como descrito na seção 8.1, partimos para a análise da composição lipídica das frações resistentes ao detergente e aquelas presentes em outras frações do gradiente. Os lipídios secos por nitrogênio gasoso foram ressuspensos num volume de clorofórmio apropriado e aplicados numa placa de sílica (60F254, Merck). Para a TLC de lipídios neutros, utilizamos o sistema de solventes hexano: éter etílico: ácido acético 60:40:1 (v/v/v); (Kawooya & Law, 1988), por aproximadamente 40 min de corrida.

Para a análise de fosfolipídios, utilizamos o sistema de solventes clorofórmio: acetona: metanol: ácido acético: água (40:15:13:12:8) (v/v) (Ruiz & Choa, 1997) por aproximadamente 2h e 30 min. O sistema foi revelado utilizando reagente de *charring* (CuSO₄ 10% em H₃PO₄ 8%) por 10 minutos a 100°C (Bitman & Wood, 1982) ou com iodo sublimado (I₂).

Os *spots* obtidos foram submetidos à análise densitométrica utilizando o programa Image Master Total Lab versão 1.11 da Amershan-Pharmacia Biotechnology.

Resultados

IV. RESULTADOS

1. Aspectos ultraestruturais dos reservossomos

As micrografias eletrônicas dos reservossomos isolados e *in situ* revelam perfis de membrana muito singulares. Alguns parecem se posicionar perpendicularmente à membrana que delimita a organela, enquanto que outros aparentemente se encontram dispersos randomicamente no interior da mesma, ou com o aspecto de “soltos” no interior da organela (figuras 9A-B e 10C). Além disso, é comum se observar a presença de corpos lipídicos retangulares, elétron-lucentes, delimitados por uma unidade de membrana. Já nos epimastigotas, detectamos o possível momento de internalização de vesículas nos reservossomos (figuras 10A e 10B), como também a presença de vesículas no interior dos mesmos (figura 10C).

2. Perfil do gradiente de sacarose obtido após a centrifugação do material tratado com detergente:

Após a centrifugação dos reservossomos tratados com o detergente não iônico a 1% pudemos observar que, na altura da interface de 5-30% do gradiente de sacarose, a presença de um material branco-leitoso em suspensão, posicionado verticalmente, era visualizado algumas vezes. Além disso, nas concentrações de sacarose mais densas, um material mais escuro em relação às demais frações se formou, seguido do pellet (figura 11):

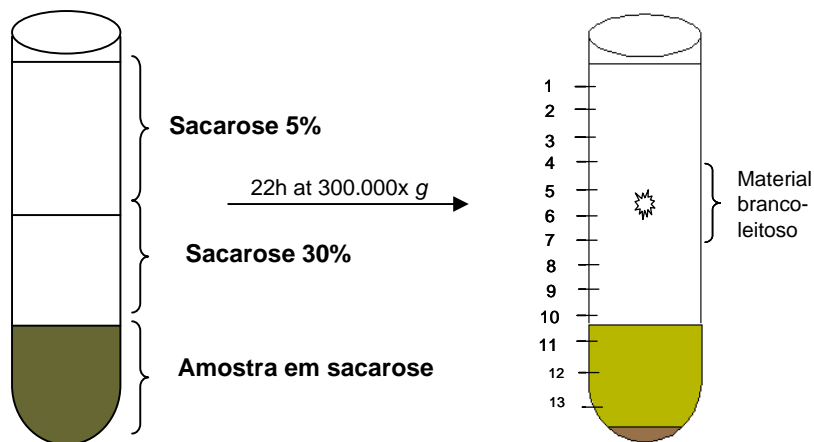


Figura 11: Resultado do gradiente de sacarose, mostrado à direita da figura. Evidencia-se o material branco-leitoso flutuando na interface das sacaroses 5-30%. Em verde, o material mais denso, posicionado acima do pellet (marrom). À esquerda do tubo estão indicadas as frações recolhidas.

Deste gradiente, treze alíquotas de 1mL mais o pellet foram recolhidas e analisadas, como poderá ser visto nos resultados a seguir.

3. Reservossomos acumulam glicoconjugados semelhantes a GM_1 em domínios de membrana determinados

3.a) Os glicoconjugados não estão presentes em todas as frações do gradiente

A análise dos glicoconjugados detectados pela toxina do cólera nas frações do gradiente pela técnica de *dot blot* revelou que sua presença não é homogênea em todas as frações do gradiente (Figura 12).

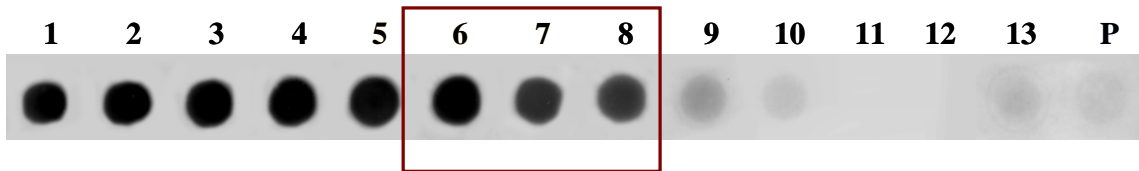


Figura 12: Frações do gradiente de sacarose de reservossomos submetidos ao *dot blot* com a subunidade B da toxina do cólera conjugada a HRP, mostrando uma intensidade maior nas regiões menos densas do gradiente, desde a primeira fração até a oitava, decaindo a partir da nona, tornando-se quase que nula nas demais. Em evidência na caixa estão as frações 5, 6 e 7, nas quais o material flutuante se encontrava.

Esse resultado aponta para a provável existência de domínios distintos nas membranas dos reservossomos enriquecidos com glicoconjugados semelhantes a GM_1 que apresentam o mesmo sítio de ligação para a subunidade B da toxina do cólera.

3.b) Glicoconjugados da superfície celular são internalizados e acumulados nos reservossomos

A presença de glicoconjugados semelhantes a GM_1 em algumas frações do gradiente nos motivou a analisar os epimastigotas inteiros. A primeira alternativa foi a realização de um experimento de ligação nos epimastigotas a $4^\circ C$, de forma a permitir que a toxina somente se ligasse aos seus sítios de interação, sem que ocorresse qualquer tipo de internalização da toxina. Em

seguida, realizamos o mesmo experimento, porém as células foram lavadas para que ocorresse a remoção da toxina não ligada, colocamos as células a 28°C permitindo assim que ocorresse a endocitose dos glicoconjugados marcados com a toxina do cólera.

Quando observamos a ligação desses glicoconjugados nos epimastigotas inteiros, evidenciamos uma marcação homogênea por toda a superfície do parasito, incluindo o flagelo, quando as células foram incubadas a 4 °C (figuras 13A e 13B). Ao colocarmos as células na temperatura ideal para o seu crescimento, e deixarmos que os eventos de tráfego se normalizassem, fomos capazes de evidenciar uma marcação mais fraca na região posterior do protozoário, justamente onde os reservossomos se localizam (figuras 13C e 13D).

Quando este ensaio foi repetido em coanomastigotas de *C. deanei* e em epimastigotas de *T. cruzi*, além de obtermos o mesmo resultado visto no ensaio anterior para os epimastigotas, pudemos ver uma intensa marcação no citóstoma e nos reservossomos do parasito nessas células. Mas não obtivemos o mesmo resultado quando tratamos as formas coanomastigotas de *C. deanei* nem na temperatura de 4°C nem na temperatura de crescimento natural das células (figuras 14 e 15).

O ensaio com *C. deanei*, em conjunto com epimastigotas de *T. cruzi*, nos foi útil, pois as formas coanomastigotas nos serviram como controle negativo para a presença de ácido siálico, que pode ser o resíduo responsável pela ligação com toxina do cólera.

4. A marcação com o anticorpo anti flotilina 2 corrobora a presença de domínios de membrana nos reservossomos

4.a. Reservossomos tratados com detergente

O *dot blot* para a detecção de flotilina 2 mostrou que, ao longo do gradiente, existem domínios distintos, visto que não evidenciamos marcação nas quatro primeiras frações e, em seguida, vimos um sinal nas frações 5, 6 e 7 do gradiente. A partir da oitava, a intensidade dos *spots* revelados decai, aumentando nas frações 13 e 14 (*pellet*). O curioso é que essa marcação se sobrepõe àquela encontrada para glicoconjugados semelhantes a GM₁. Além disso, a quinta, sexta e sétima frações são justamente aquelas em que o material branco leitoso se situava. Isso demonstrou que há diferenças na composição protéica das membranas dos reservossomos, que se expressa mais claramente em domínios de membrana com composição lipídica especial (figura 16).

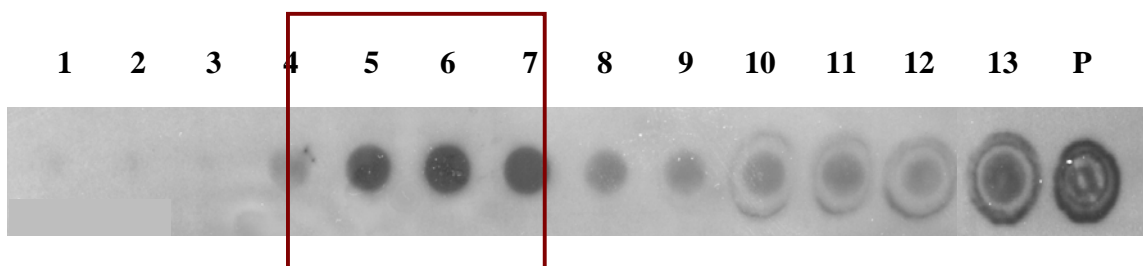


Figura 16: *Dot blot* para flotilina 2 nas frações do gradiente de sacarose. Em destaque, as frações 5, 6 e 7 que co-localizam com a marcação obtida com a toxina do cólera.

4.b. Epimastigotas

Quando a imunofluorescência para flotilina 2 foi realizada nos epimastigotas inteiros, permeabilizados, não apenas foi possível se visualizar o sinal obtido nos reservossomos como também na região anterior da célula, possivelmente no complexo de Golgi e/ou bolsa flagelar (figura 17).

4.c. Reservossomos isolados

A imunocitoquímica na técnica de contrastação negativa em reservossomos isolados revelou-se uma das ferramentas mais úteis na determinação de quais perfis de membrana apresentavam resultado positivo para o anticorpo anti-flotilina.

Como apresentado nas figuras 18A e 18B podemos ver claramente que ocorre uma predominância de marcação nas membranas internas dos reservossomos. O perfil dessas membranas parece ser o de uma distribuição completamente irregular e se voltarmos às figuras 9 e 8B (vide Introdução, seção 7) veremos que semelhante ao observado na contrastação negativa, reservossomos isolados e *in situ* apresentam perfis de membrana aparentemente planares (de distribuição irregular) e algumas vesículas em seu interior.

5. Aspectos ultra-estruturais das frações resistentes a detergente:

As membranas obtidas após o tratamento com detergente foram separadas em grupos de acordo com os resultados obtidos tanto para a marcação de flotilina 2 quanto para o glicoconjugado. Separamos as frações 5, 6 e 7 do gradiente das quatro primeiras frações, uma vez que estas apresentaram resultado negativo para flotilina 2 e positivo para o glicoconjugado, e dividimos as demais em grupos de três, deixando o pellet separado dos demais. Decidimos excluir a fração 8 do grupo 5, 6 e 7, ainda que tenha apresentado resultado positivo para a toxina do cólera e uma marcação fraca para flotilina. Justamente essa fração já se localizava na região do gradiente de concentração mais densa e escura, provavelmente apresentando o material resultante da endocitose e de degradação da célula. Dessa maneira, obtivemos cinco grupos (figuras 19):

Frações 1,2,3,4 - Grupo A

Frações 5, 6 e 7 - Grupo B

Frações 8, 9 e 10 - Grupo C

Frações 11, 12 e 13 - Grupo D

Pellet - Grupo E

Podemos notar que a fração B (figura 19A) apresenta uma alta concentração de membranas, especialmente planares, e de tamanho curto. Além disso, foi necessário fazer cortes ainda mais finos (25 nm) que os de rotina para que as membranas pudessem ser melhor visualizadas.

As membranas da fração C possuem aspecto vesicular, algumas formando estruturas concêntricas, outras de aspecto planar e a ocorrência de material amorfo e estruturas pouco elétrondensas, semelhantes às inclusões lipídicas encontradas na organela intacta (figuras 19B e *inset*). Já no grupo seguinte (grupo D), é possível observar que existe uma significativa diminuição do material membranar, dando lugar à ocorrência de estruturas semelhantes aos corpos lipídicos observados nos reservossomos intactos, alguns perfis de membranas planares isolados e uma grande quantidade de material granular (figura 19C).

Por último, o pellet do gradiente apresentando perfis de membrana mais raros e de aspecto planar, enquanto o material granular constituía a maioria (figura 19D).

6. Determinação da concentração de proteínas nas frações recolhidas do gradiente de sacarose:

Do conteúdo das amostras recolhidas do gradiente de sacarose, podemos observar que a quantidade de proteínas nas frações vai aumentando gradativamente ao longo do gradiente (figura 20).

7. Determinação do conteúdo de esteróis nas frações do gradiente de sacarose:

A determinação do conteúdo de esteróis nas frações do gradiente de sacarose constitui uma das metodologias mais importantes na determinação dos domínios *rafts*, pois é sabido que estes

domínios são particularmente enriquecidos com esteróis. Diferentemente do esperado, as frações mais ricas em esterol são justamente aquelas mais densas do gradiente (frações 9-13), enquanto que as frações 5, 6 e 7 não apresentavam mais do que 60 $\mu\text{g/mL}$ de esterol. Ademais, não existem diferenças estatísticas significativas entre essas frações, e entre as 10, 11 e 12 como esquematizado na figura 21.

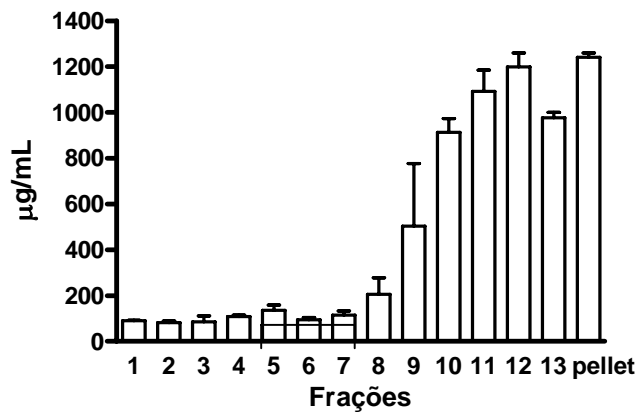


Figura 20: Dosagem de proteínas das frações do gradiente pelo método de Lowry e cols. (1951). Assim como pode ser visto nas micrografias das frações (seção 4), o conteúdo protéico é maior nas últimas, ainda que as frações tenham sido separadas em grupos. Em destaque, as frações 5, 6 e 7 que aparecem, nas micrografias eletrônicas enriquecidas em membranas. Cada fração representa a média e o desvio padrão de 2 experimentos diferentes feitos em duplicata.

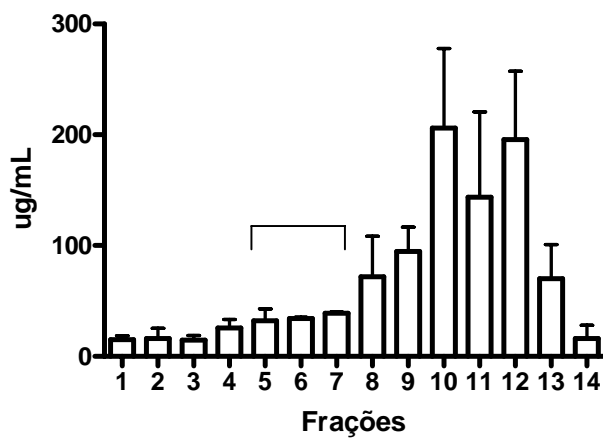


Figura 21: Dosagem de esteróis totais. As frações pelletadas após o gradiente de sacarose tiveram seu conteúdo lipídico avaliado após a extração lipídica de acordo com Bligh & Dyer (1959). As frações mais enriquecidas com esterol são as mais densas do gradiente (9-13) e não aquelas que apresentaram marcação para glicoconjugados semelhantes a GM₁ ou para flotilina 2. Cada fração representa a média e o desvio padrão de 2 experimentos diferentes.

8. Análise dos Lipídios Neutros

A caracterização da natureza dos lipídios neutros nas frações do gradiente de sacarose foi realizada para todos os grupos determinados e veio explicar o motivo pelo qual observamos uma alta concentração de esteróis nas últimas frações pelo ensaio realizado no item 6 (figura 22)

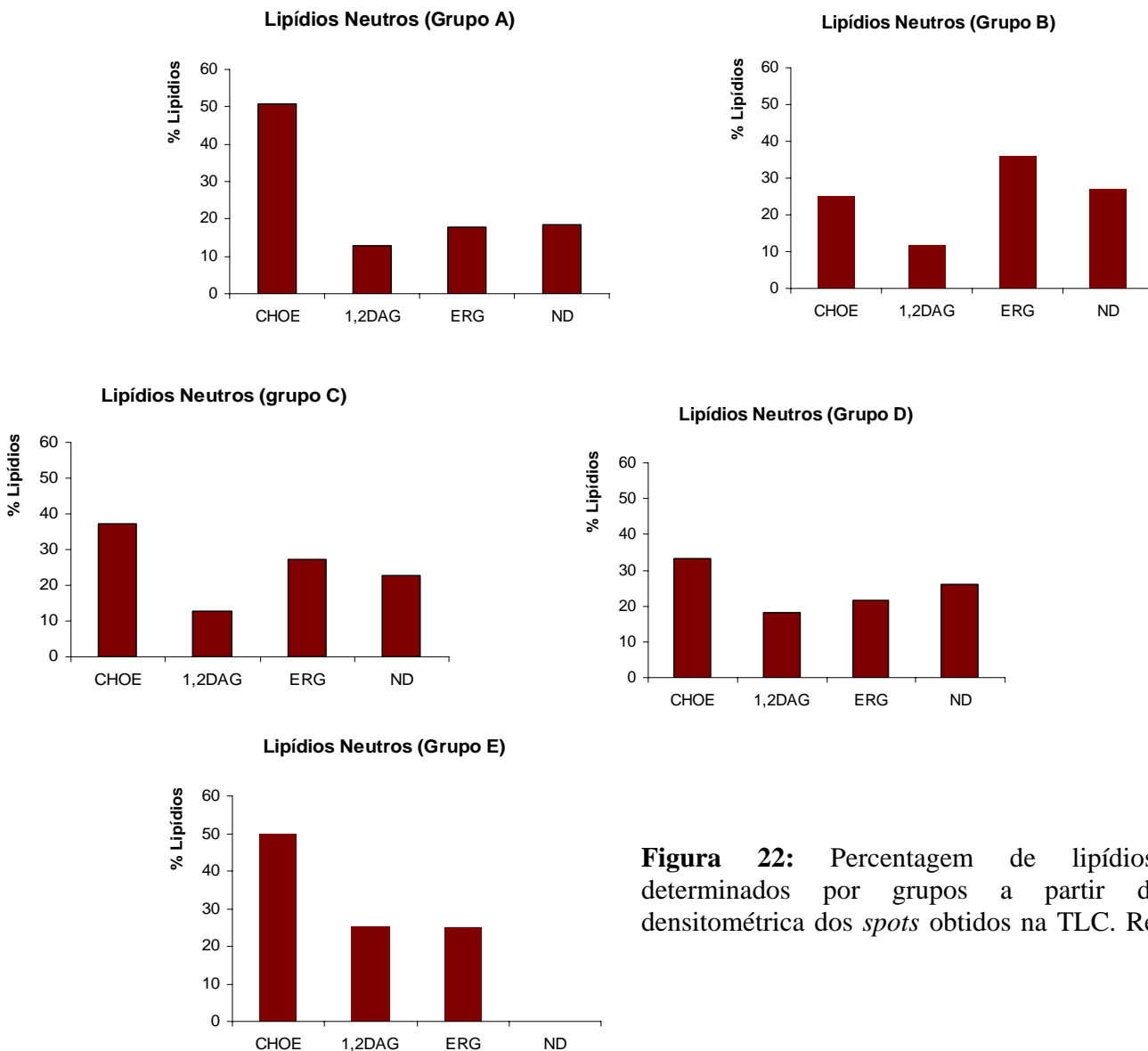


Figura 22: Percentagem de lipídios neutros determinados por grupos a partir da análise densitométrica dos *spots* obtidos na TLC. Resultado de

1 experimento. **CHOE**- éster de colesterol; **DAG**- diacilglicerol; **ERG**- ergosterol; **ND**- não determinado.

Pela análise dos lipídios neutros, observamos que em todas as frações do gradiente, ésteres de colesterol representam o tipo de lipídio mais abundante, chegando a atingir proporções de 50% nos grupos A e E.

Ergosterol, o esterol sintetizado pelos tripanossomatídeos, encontra-se em maior proporção no grupo B. Esse resultado corrobora as micrografias eletrônicas obtidas para as frações 5, 6 e 7, em que o perfil de membranas planares encontra-se evidente. Além disso, ainda nessas frações uma concentração significativa de ésteres de colesterol foi encontrada (~25%), seguida de DAG, com quase 12% e um lipídio de natureza ainda não determinada (ND), representando 27% do total.

Nas frações 1-4 existe uma predominância de ésteres de colesterol, contabilizando aproximadamente 50%, enquanto que as demais espécies, como o próprio ergosterol, não atingem nem 20% dos lipídios neutros. Isso denota a baixa concentração de membranas nessas frações, que pode ser ainda interpretada pela baixa concentração de esteróis, como visto pela dosagem.

O grupo C apresenta como principal lipídio neutro o éster de colesterol, aproximadamente 37% do mesmo, o que dá 1,5x mais do que no grupo B. Analogamente, o grupo D, com os corpos lipídicos retangulares observados nas micrografias, apresenta aproximadamente 33% de ésteres de colesterol. Ademais, no grupo C, o ergosterol atinge quase que 30% do total de lipídios neutros e, como visto nas micrografias eletrônicas, ainda existe uma boa quantidade de perfis de membrana. Mas esta proporção diminui no grupo D, que junto com o grupo E, deve apresentar a menor quantidade relativa de membranas.

O interessante é que, com exceção do grupo E, os grupos apresentam um lipídio de natureza desconhecida (ND) com uma proporção significativa nesses grupos, em média 25,5%.

Por último, o grupo E, pellet do gradiente apresentando um perfil nitidamente enriquecido em ésteres de colesterol (~50%) de um total de 25ug/mL de esterol total, seguido de ergosterol e 1,2DAG com 25 % cada um.

9. Análise de Fosfolipídios

A análise dos fosfolipídios foi determinada apenas no grupo B (frações 5, 6 e 7) e os resultados estão reunidos na figura 25.

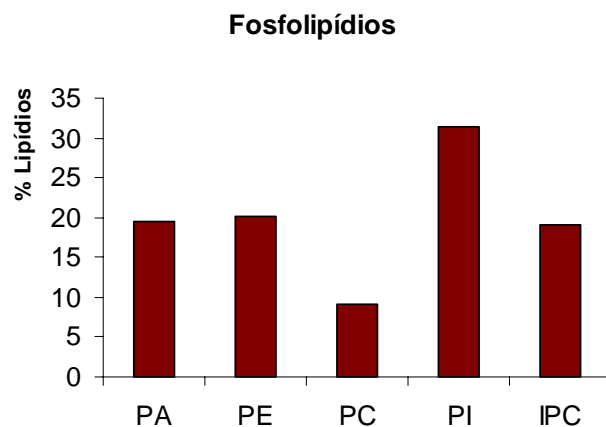


Figura 23: Percentagem de fosfolipídios do grupo B determinada a partir da análise densitométrica dos *spots* obtidos na TLC. Resultado de 1 experimento. **PA**- ácido fosfatídico; **PE**-fosfatidiletanolamina; **PC**-fosfatidilcolina- **PI**-fosfatidilinositol-**IPC**-inositolfosforilceramida.

Como pode ser visto no gráfico acima, o principal fosfolipídio nas membranas resistentes a detergente é o fosfatidilinositol, com 31%; seguido de fosfatidiletanolamina (20%), inositolfosforilceramida (20%) e ácido fosfatídico (19%). Fosfatidilcolina, um dos principais fosfolipídios de membrana plasmática, contabiliza menos que 10% da fração total.

Discussão

5. DISCUSSÃO

HETEROGENEIDADE DE DOMÍNIOS

Por um longo tempo, a simples flotação em um gradiente de sacarose após o tratamento com um detergente não iônico foi o suficiente para que muitos grupos considerassem as membranas recolhidas como *lipid rafts*. Não foram poucos os trabalhos que apontaram para a existência desses domínios em modelos variados, como em células de mamífero (linfócitos, neurônios e fibroblastos), mas também em vegetais, protozoários e fungos (Denny & Smith, 2004; Borner *et al*, 2005, Wachtler & Balasubramanian, 2006). Todos tinham algo em comum: o enriquecimento de esteróis e esfingolipídios nas frações de membrana menos densas do gradiente e a baixa concentração de proteínas. Ou seja, a insolubilidade dos lipídios e proteínas frente ao tratamento com detergente os definia como um domínio especializado. Isso parecia bastante satisfatório especialmente para as cavéolas, uma vez que a utilização de um lisado celular e o tratamento com Triton X-100 % a 4°C produzia uma fração de membrana enriquecida com caveolinas, proteínas ancoradas por GPI e glicoconjugados, que flutuava num gradiente de sacarose entre 5-30% (Brown & Rose, 1992). A “certeza” de que a insolubilidade era um pré-requisito para a formação de uma *lipid raft* veio ainda a ser corroborada com o fato de que um domínio cavéola é relativamente fácil de identificar em cortes ultrafinos, devido ao seu formato característico, como também por técnicas de imunocitoquímica que mostram a co-localização de caveolinas com outras proteínas co-purificadas.

Por outro lado, o mesmo não se pode dizer de um domínio planar. E por quê? Porque no primeiro caso, as cavéolas são formadas pelas proteínas caveolinas que apresentam a característica de formar oligômeros (vide Introdução, seção I.4a). Os oligômeros formados possivelmente selecionam os lipídios para sua proximidade por apresentarem sítios de

ligação, criando e estabilizando as fases líquidas ordenadas (l_o) nas membranas (Helms & Zurzolo, 2004). Tais fases l_o apresentam uma difusão lateral tão rápida como uma fase líquida cristalina (l_d) (ou fase desordenada) e desta maneira, as *rafts* planares foram encaradas como pequenas entidades móveis na membrana. Por isso, quando a extração se dá num domínio planar existe uma maior heterogeneidade a respeito das proteínas, glicoproteínas e lipídios. A exemplo, podemos citar a grande quantidade de trabalhos em células T e B, os trabalhos envolvendo proteínas que participam em processos de sinalização celular, como as proteínas G, fosfatases, PIP₂ etc (revisto por Brown, 2006; revisto por Shaw, 2006). Estes e outros trabalhos levaram a um sério questionamento sobre o uso de detergentes na extração e determinação de uma *lipid raft*. De fato, variando o detergente utilizado, foi possível mostrar que as *rafts* de células MDCK e de Jurkat obtidas após o tratamento com Triton X-100 e com CHAPS são mais enriquecidas com esfingolipídios e colesterol quando comparadas à membrana total, mas a extração com Tween 20, Brij 58 ou Lubrol WX apresentava-se menos enriquecidas nesses lipídios (Schuck *et al*, 2003). Baseado nesses resultados, não seria ilógico pensar que os detergentes pudessem selecionar um determinado subgrupo de proteínas e/ou lipídios de acordo com suas propriedades físico-químicas intrínsecas. Isso colocaria em prova a fidedignidade da composição original da *raft* e da fração DRM obtida. Daí, vários estudos se iniciaram, na tentativa de se comparar a composição lipídica das *rafts* obtidas após um tratamento com detergente com aquelas recolhidas por métodos como sonicação, seguido de flotação num gradiente de sacarose. Neste último, vê-se que existe um enriquecimento de glicerolipídios que não é comum nas frações obtidas pelo método do detergente. Desta maneira, supõe-se que os domínios obtidos pelo tratamento sem detergente apresentem uma composição mais próxima ao sistema *in vivo* do que com este (revisto por Pike, 2004).

Isso foi crucial para se colocar em prova a diferença entre uma *lipid raft* e um DRM. E aí, surge a seguinte pergunta: de que maneira essas informações afetariam os resultados obtidos pelo nosso grupo na atual dissertação?

Na verdade, embora o Triton X-100 apresente indícios de alterar as propriedades físico-químicas da membrana, criando ou selecionando domínios, a existência de um domínio naturalmente resistente a detergente não será alterado à primeira vista. Já uma *lipid raft* é uma entidade na célula, com proteínas e lipídios específicos que participam de uma determinada função.

Pike (2004) já alertou sobre a possibilidade de haver *rafts* heterogêneas nas células. Tipos celulares diferentes apresentam composição de *rafts* diferentes também. De mais a mais, não é completamente absurdo haver *rafts* distintas numa mesma célula. Caso contrário, a existência de uma *lipid raft* estaria atrelada a uma função única e universal em todos os tipos celulares. Isso responderia a muitos questionamentos, como a própria obtenção de DRMs de composições distintas, assim como de se isolar DRMs mais ou menos susceptíveis ao tratamento com outros detergentes diferentes do Triton.

UM MOSAICO DE MEMBRANAS

Se formos analisar cuidadosamente as micrografias obtidas dos reservossomos isolados, veremos, primeiramente, que os reservossomos apresentam um perfil de membranas internas muito pouco comum. Isto é, são várias membranas “soltas” no seu interior, de aspecto, à primeira vista, planar. Outras se posicionam perpendicularmente à membrana da organela e em perfis mais discretos. Também evidenciamos algumas que parecem sobrepostas uma à outra (figs. 1B e 1C, seção IV).

Quando observamos os reservossomos nos epimastigostas fomos capazes ainda de flagrar uma membrana planar e três vesículas aparentemente adentrando a organela. E mais, ao procurarmos em outras células, vimos ainda um reservossomo em contato com outra organela e apresentando algumas vesículas (figura 10c) no seu interior, o que sugere que, tal como um endossoma tardio, o reservossomo apresente membranas internas. De fato, a visualização das vesículas endocíticas em micrografias eletrônicas de transmissão de *T. cruzi* é menos evidente do que nas células dos eucariotos superiores. Isso pode ser devido ao fato de que os reservossomos apresentam uma alta densidade de partículas decorrentes do processo endocítico ou das vesículas provenientes do complexo de Golgi, que tornam as vesículas observadas menos visíveis. Além disso, não podemos deixar de considerar que talvez não consigamos ver estas vesículas porque a sua quantidade no interior dos reservossomos seja pequena. Daí, uma seção da organela não mostraria facilmente sua ultra-estrutura. Apenas uma análise morfológica mais acurada dessas vesículas, de forma a estabelecer informações a respeito do diâmetro, espessura e número médio por organela nos forneceria dados mais precisos sobre essas estruturas.

O mais interessante é o fato de que as membranas obtidas após o tratamento com detergente no grupo B (frações 5, 6 e 7) apresentavam um perfil planar, o que não é visto com enriquecimento nos demais grupos do gradiente. Possivelmente, as membranas obtidas em B são as mesmas visualizadas nos reservossomos inteiros que se apresentam aparentemente planares também. Contudo, apenas ensaios de imunocitoquímica nas frações de membrana de reservossomos obtidas após o gradiente de sacarose, nos reservossomos isolados e/ou nos epimastigotas intactos nos confirmariam ou não essa suposição. Ao contrário, no grupo C, observa-se um perfil essencialmente vesicular, o que pode refletir diferenças na composição fosfolipídica entre os grupos B e C. Isso porque a estrutura molecular dos lipídios determina as propriedades físicas da membrana. O formato da membrana dependerá do tamanho relativo das cabeças polares e das caudas apolares. Dessa maneira, membranas enriquecidas em fosfatidilcolina e fosfatidilserina tendem a ser menos curvilíneas. Lipídios como fosfatiletanolamina e liso-fosfatidilcolina apresentam formato de cone, e as porções da membrana enriquecidas nesses dois fosfolipídios apresentam-se mais curvilíneas. Isso se mostra importante no papel fisiológico desempenhado pelos lipídios no processo de brotamento de vesículas e durante a fusão membranar (Sprong *et al*, 2001).

No grupo D a predominância é de estruturas muito semelhantes aos corpos lipídicos retangulares observados nos reservossomos intactos. Já em E, raros perfis de membrana são vistos. Na realidade, perfis de membrana estão presentes em todas as frações do gradiente, estando mais enriquecidos nos grupos B e C.

Estes resultados ganham mais importância quando analisamos não apenas a concentração protéica e a quantidade de esteróis nas frações como também investigamos a natureza dos lipídios nas frações (tabela 1).

Grupos	A	B	C	D	E
Proteínas (µg/mL)	80-110	90-135	200-900	980-1200	1240
Esteróis totais (µg/mL)	20-35	40-60	90-270	120-260	30
Éster de colesterol (%)	50	25	37	33	50
Ergosterol (%)	18	36	27	22	25
Aspectos ultra-estruturais	---	Membranas planares.	Membranas curvilíneas e corpos lipídicos.	Raros perfis de membranas, corpos lipídicos retangulares.	Raros perfis de membrana, material granular.

Tabela 1: Compilação comparativa das análises bioquímicas e morfológicas das frações de membrana dos reservossomos. As dosagens de proteína e de esteróis totais mostram a variação da concentração nas frações agrupadas.

A determinação da concentração de proteínas nos informa que não mais que 140 µg/mL estão presentes no grupo B. A literatura aponta para resultados variados. Em domínios insolúveis a detergente de extratos de mielina bovina (Arvanitis *et al*, 2005), as frações resistentes a detergente apresentavam quase que 300 µg/mL de proteína. Por outro lado, em células leucêmicas basofílicas de rato (linhagem RBL-2H3), a quantidade de proteínas nos extratos tratados com Triton X-100 não ultrapassava 20 µg/mL (Radeva & Sharom, 2004). O que demonstra que, de fato, existe uma diferença significativa da composição protéica desses domínios em diferentes tipos celulares.

Nos demais grupos do gradiente, a quantidade de proteína é extremamente alta, chegando a atingir 1,2 mg/mL nas últimas frações. Possivelmente, a maior parte desse conteúdo deve ser resultado da endocitose. Vale ainda ressaltar que as frações de maior conteúdo protéico estão localizadas na região mais densa do gradiente e mais escura também, como discorrido na seção IV. 2. Além disso, conforme a concentração protéica aumenta menos membranas temos nessas frações. Isso parece ser contraditório com o

resultado da concentração de esterol nessas últimas frações. Ou seja, pela dosagem obtida, vê-se que nas últimas frações chega-se a, aproximadamente, 275 µg/mL de esterol (vide seção IV). Desta maneira, é importante ressaltar que o método utilizado por Zlatkis e colaboradores (1953) foi desenvolvido para a análise de colesterol total do sangue e, desta forma, não discrimina os ésteres de colesterol da forma livre (Kenny, 1952). Além disso, devido à grande semelhança estrutural do colesterol com o ergosterol, este método acabou sendo importante para quantificar o ergosterol, que é o principal esterol nos tripanossomatídeos, mas não excluiu os ésteres de colesterol que são captados do meio pela endocitose de LDL (Soares & De Souza, 1991). Nas frações 5, 6 e 7 (grupo B) existe uma significativa quantidade de ésteres de colesterol (~25%), como pode ser visto no resultado obtido da TLC (vide seção IV.7). Tais estruturas originaram os corpos lipídicos observados nas micrografias eletrônicas dos reservossomos que se apresentam mais enriquecidos nas últimas frações do gradiente. Por outro lado, é justamente no grupo B que mais ergosterol está presente, 36% do total.

Como visto nos resultados da TLC para lipídios neutros, os ésteres de colesterol representam, aproximadamente, 37% do total no grupo C e 33% no grupo D. Com relação à proporção de ergosterol nestes dois grupos, no grupo C temos 27% e no D 21%, respectivamente. Ainda que a fração B seja a fração com maior enriquecimento de membrana, não há dúvidas que em todas as frações existam perfis de membrana também, que podem ser vistas nas micrografias e pela detecção de ergosterol a partir da TLC, pois não evidenciamos ésteres de ergosterol em grupo algum. Cabe ainda aqui comentar que na primeira caracterização bioquímica dos reservossomos observamos uma excepcional quantidade de ésteres de colesterol na organela intacta, somando quase que 55% do total de

lipídios neutros, enquanto que ergosterol não ultrapassava 25% (Cunha-e-Silva *et al*, 2002). Esse dado provavelmente explica o motivo pelo qual temos uma alta concentração de esterol, em especial, ésteres de colesterol, nas frações mais densas do gradiente.

Por último, temos os grupos A e E do gradiente. São os que apresentam a menor quantidade de esterol na dosagem; não mais que 30 µg/mL, em média, e encontram-se enriquecidos, especialmente, em ésteres de colesterol (~50% do conteúdo total de lipídios neutros). Não fomos capazes de conseguir um pellet do material do grupo A, possivelmente, devido à pouca quantidade da amostra. O grupo E, por sua vez, sendo o pellet do gradiente, foi diretamente fixado e preparado para microscopia eletrônica e para as análises bioquímicas, daí ter sido possível realizar os demais ensaios. O grupo E apresentava raros perfis de membrana (vide figura 20D), mas uma quantidade elevada de proteínas (~1,2 mg/mL).

É importante ressaltar que as análises bioquímicas resultam de poucos experimentos e necessitam que sejam repetidos para confirmação dos dados.

A presença de ésteres de colesterol ao longo de um gradiente de sacarose já foi avaliada em outros tipos celulares, como de endossomas tardios de fibroblatos e células do ovário de hamster chinês (CHO) (Lusa *et al*, 2001). Na tentativa de avaliar o papel da proteína NPC (*Niemann-Pick disease type C*), que está envolvida no controle da quantidade de colesterol em endossomos tardios, o grupo observou que as frações resistentes a detergente são as que menos apresentavam colesterol livre e ésteres de colesterol. Ao contrário, eram as frações mais densas do gradiente que apresentavam as maiores quantidades dos esteróis. Além disso, nas células deficientes em NPC, havia um aumento da quantidade de colesterol nas frações DRMs, em paralelo com o seqüestro de

glicosíngolipídios e a formação de endossomas tardios multilamelares, que são semelhantes às membranas de aspecto lamelar observadas nos reservosomas intactos (vide figura 19).

Outro aspecto interessante na análise lipídica foi a presença de fosfatidilinositol (PI) e inositolfosfoceramida (IPC) e diacilglicerol nas frações 5, 6 e 7. Isso porque PI e IPC, em conjunto com fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina, são as principais classes de lipídios presentes na membrana plasmática de epimastigotas e são precursores do motivo lipídico das âncoras de GPI de glicoproteínas (Bertello *et al*, 1995), como o antígeno Ssp4 de amastigotas ou a *trans*-sialidase de tripomastigotas (Salto *et al*, 2003). O único GIPL com ceramida é a LPPG de epimastigotas (De Lederkremer *et al*, 1993). Além disso, IPC está presente em *Sacharomyces cerevisiae*, *Dictiostelium discoideum* e em *Leishmania*, mas ausentes em mamíferos (Bertello *et al*, 2004), constituindo bons alvos para a quimioterapia. Aliás, a presença de IPC e ergosterol nas frações resistentes a detergente de *L.major* já foram estudadas por Denny e colaboradores (2001).

A ação da IPC sintase sobre o PI faz com que o fosfato do inositol seja transferido para a ceramida, originando IPC (Figueiredo *et al*, 2005). Tanto o PI quanto o IPC são alvo para a ação da fosfolipase C (PI-PLC), o que sugere tal como em células de mamífero, que esfingolipídios atuam na formação de mensageiros secundários, e no processo de diferenciação de tripomastigotas para amastigotas (Salto *et al*, 2002, 2003).

A ação da PI-PLC sobre o PIP₂ (fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato) leva à formação de IP₃ (1,4,5-trifosfato de inositol) e DAG. O IP₃ atua na liberação intracelular de cálcio, enquanto que o DAG ativa a PKC (proteína cinase C) (revisto por Ghosh *et al*, 1997).

A proteína cinase C é um membro da família de serina/treonina fosfotransferases envolvida na fosforilação de uma variedade de proteínas, como aquelas que participam da

proliferação, diferenciação, apoptose, adesão, migração ou secreção de íons, ativando-as ou não e desta forma, modulando a resposta celular (revisto por Corbalán-Garcia & Gómez-Fernández, 2006). Isso pode vir a ser interessante numa organela da via endocítica do epimastigota, que, certamente, deve apresentar um rígido controle de fusão e sinalização.

Se os esfingolipídios exercem um papel na sinalização celular em reservossomos ou se o conteúdo membranar do citóstoma encontra-se em vias de reciclagem é um tema que merece ser explorado.

FORMANDO DOMÍNIOS

A determinação de um domínio de membrana requer, além da análise lipídica de uma fração, a identificação de proteínas específicas, glicoproteínas e/ou glicolipídios, que em conjunto venham a desempenhar uma função específica numa célula ou num compartimento.

Com o objetivo de avaliar a possível existência de uma *lipid raft* em epimastigotas de *T.cruzi*, enriquecida em glicoconjugados e proteínas marcadoras desses domínios, iniciamos dois ensaios de *dot-blot* nas frações coletadas do gradiente. Desses resultados, concluímos que as frações 5, 6 e 7 são únicas que apresentam co-localização tanto para a marcação com a toxina do cólera como para o anticorpo anti-flotilina 2.

A toxina do cólera é uma toxina liberada pelo *Vibrio cholera* formada por uma subunidade A (catalítica) e cinco subunidades B que são as responsáveis pelo reconhecimento e ligação à célula-alvo. A subunidade B reconhece o motivo pentassacarídeo do gangliosídeo GM₁ e como mencionado anteriormente (seção I.6), a presença de GM₁ tem sido largamente utilizada para a identificação específica desse gangliosídeo de nas *lipid rafts* de células de mamíferos. Contudo, não existem relatos na

literatura acerca da presença de GM₁ nos tripanossomatídeos. Dessa maneira como explicar a nítida marcação observada tanto no *dot blot* quanto nos ensaios de fluorescência? Na verdade, não existe uma especificidade pelo GM₁ e sim uma afinidade maior, visto que Kuziemko e colaboradores (1996) demonstraram que a toxina também é capaz de se ligar a outros gangliosídeos, na seguinte ordem de afinidade: GM₁ > GM₂ > GD_{1A} > GM₃ > GT_{1B} > GD_{1B} > asialo-GM₁. Além disso, a ligação da subunidade B está alocada nos resíduos de ácido siálico (43% das interações), de galactose (39%) e N-acetilgalactosamida (17%) (Merritt *et al*, 1994), e a maioria das interações é realizada por ligações de hidrogênio estabelecidas pelos grupamentos hidroxila dos açúcares. Isso se mostrou importante para explicar o mimetismo molecular realizado pela *Campylobacter jejuni* (cepa HS:19), a bactéria responsável pela síndrome de Guillain-Barré (neuropatia autoimune) que apresenta na sua superfície lipossacarídeos como principais fatores de virulência. O lipo-oligosacarídeo (LOS) de *C. jejuni* apresenta resíduos de ácido siálico (NANA- ácido N-acetil neuranímico) ligados terminal ou lateralmente a resíduos de galactose do motivo oligossacarídeo, que o torna muito semelhante aos gangliosídeos humanos, tal como o GM₁ (Xiang *et al*, 2006).

Epimastigotas de *T. cruzi*, por sua vez, apresentam glicoproteínas semelhantes a mucinas (TcMUC) na sua superfície contendo resíduos de ácido siálico, como por exemplo GP24, GP31 e GP37 de 43 kDa e aqueles com 38/43 kDa (revisto por Serrano *et al*, 2001). É provável que a marcação observada seja consequência da ligação da subunidade B da toxina do cólera aos ácidos siálicos das mucinas. Foi por esse motivo que realizamos um ensaio de fluorescência em células de *C. deanei*, pois este modelo não apresenta resíduos de ácido siálico na sua superfície.

Embora esses resultados não nos confirmem que as mucinas sejam, de fato, responsáveis pela marcação observada tanto nas frações resistentes a detergente (com 36% de ergosterol), quanto nos ensaios de fluorescência, o interessante foi o fato de podermos observar nos epimastigotas a internalização dos glicoconjugados e seu conseqüente acúmulo nos reservossomos.

As mucinas são glicoproteínas ancoradas por GPI. Desta forma, encontram-se inseridas à membrana plasmática pelo seu folheto externo. Se a marcação da fluorescência com a toxina pôde ser vista em toda superfície do parasito, como poderíamos aferir que existiria um domínio *in vivo*? O epimastigota apresenta um glicocálix que reveste todo o corpo do parasito, isso não exclui a possibilidade de haver domínios, especialmente porque existe uma região especializada em que esse glicocálix encontra-se mais denso e repleto de proteínas ancoradas por GPI, a entrada do citóstoma (Martinez–Palomo *et al*, 1976). Levando-se em consideração que as caudas do fosfolípídio da GPI, na face externa da membrana interagem com os enfingolípídios e ergosterol e que o citóstoma é o principal sítio de entrada de moléculas nas formas epimastigotas (Porto-Carreiro *et al*, 2000) não é impossível que a dinâmica da membrana plasmática do epimastigota favoreça a seleção de algumas proteínas e/ou lipídios para esse domínio.

Esse resultado aponta para o fato de que a composição bioquímica da membrana do reservossomo é gerada tanto pelo material endocitado a partir da superfície do epimastigota quanto pelas vesículas que brotam do complexo de Golgi, como já sugerido por Sant’Anna e colaboradores (2004).

Certamente, uma maneira de averiguar se as proteínas ancoradas por GPI e o próprio domínio lipídico da membrana do citóstoma chegam ainda organizados aos reservossomos ou se este domínio por si só é importante para a caracterização da organela, pode ser

determinada pela caracterização bioquímica do citóstoma e a comparação entre os dois sistemas. Ademais, se a origem for endocítica, as *rafts* estariam nas rotas de degradação ou reciclagem e seus componentes não seriam desarranjados na membrana plasmática ou nos endossomas iniciais; ao contrário, chegariam intactos aos reservossomos. Por outro lado, se residentes, seriam organizados nos reservossomos ou em compartimentos anteriores da via biossintética, como o Retículo Endoplasmático e o Golgi? Precisariam passar pela membrana plasmática? Quais as funções que se atribuiriam a esses domínios nesses compartimentos?

O uso de marcadores e precursores radioativos e/ou fluorescentes auxiliaria bastante nessas questões, ainda mais quando se conjuga a possibilidade de identificação do glicoconjugado que se acumula nas membranas dos reservossomos e a realização de uma imunocitoquímica de forma a localizar em quais membranas esses glicoconjugados se acumulam; ou se co-localizam com as membranas (internas) marcadas com anticorpo anti-flotilina-2.

Por outro lado, nem a caveolina nem a flotilina 2 (*reggie 1*) estão anotadas no genoma do *T. cruzi*. Na verdade, a procura da proteína com o epítipo para anticorpo anti-flotilina 2 revelou a presença de uma proteína hipotética com baixa taxa de conservação e similaridade; fato incomum entre as proteínas da família, que apresentam cerca de 64% de homologia entre mosca e homem, por exemplo (revisto por Langhorst, 2005). Além disso, embora as flotilinas tenham sido inicialmente caracterizadas nos eucariotos superiores, recentemente foi demonstrada a presença de uma proteína com alto grau de homologia a flotilina 1 de humanos, AtFlot1, com 50% de similaridade com a flotilina 1 em *Arabidopsis thaliana* (Borner *et al*, 2005). Esses estudos levaram à procura de proteínas semelhantes às flotilinas e aquelas com domínio semelhante ao SPFH em eucariotos inferiores, procariotos

e fungos através de estudos filogenéticos (Rivera-Milla *et al*, 2006). A ampla distribuição evolutiva dessas proteínas semelhantes às *reggies*, presentes no urocordado *Ciona intestinalis*, no equinodermo *Strongylocentrotus purpuratus*, em mosquitos, abelhas (todos com alta similaridade) e além do reino animal, como também em fungos e vegetais superiores (< 22% de similaridade), indicam que existem proteínas com funções similares às *reggies* já descritas.

Ademais, proteínas que são membros da superfamília SPFH, como a proibitina e a estomatina, já foram descritas em muitos outros organismos, como no nematódio *Caenorhabditis elegans* e identificadas no genoma do próprio *T. cruzi* sugerindo um ancestral comum e uma homologia de função de todas as proteínas com o domínio SPFH (El-Sayed *et al*, 2005; Rivera-Milla *et al*, 2006).

Devido aos estudos filogenéticos terem excluído nosso modelo de estudo (*T. cruzi*), não sabemos se a marcação observada tanto na região posterior (reservossomos) dos epimastigotas quanto na anterior (bolsa flagelar ou complexo de Golgi), nas frações do gradiente e nos reservossomos isolados sejam apenas uma reação inespecífica ou se, de fato, o anticorpo foi capaz de reconhecer um conjunto de aminoácidos conservados, indicando uma proteína semelhante à flotilina. Apenas a caracterização dessa proteína isolada nos proveria informações mais consistentes acerca desses resultados.

Em conjunto, tais fatores sugerem que os reservossomos possam constituir não apenas um sítio de acúmulo de nutrientes, cuja hidrólise possa ser modulada de acordo com as necessidades metabólicas da célula ou no processo de metaciclogênese, em que tais lipídios e proteínas servem de esqueletos energéticos. Mas certamente, podem ainda exercer um papel na reciclagem ou degradação de receptores. Dessa forma, não é de se surpreender que a existência de algumas proteínas, glicoconjugados e lipídios (ergosterol e

IPC) da superfície celular formando domínios possam se apresentar nos reservossomos, seja como resultado da endocitose, seja porque se encontram em processo de reciclagem na célula ou de degradação.

Conclusões

VII. CONCLUSÕES

1. Foram observados perfis de membrana no interior dos reservossomos após a análise por M.E.T.;
2. Reservossomos apresentam membranas resistentes a detergente;
3. As membranas resistentes a detergentes do gradiente de sacarose apresentam um perfil planar (frações 5, 6 e 7) ou um perfil curvilíneo (frações 8, 9 e 10);
4. As frações positivas para marcadores de *lipid rafts* apresentam em sua maioria perfis de membrana planares, como os observados no interior da organela;
5. As frações positivas para marcadores de *lipid rafts* apresentam alta concentração de ergosterol, fosfatidilinositol e inositolfosforilceramida, indicando a possibilidade da presença de microdomínios de membrana nos reservossomos.

Referências

VII. REFERÊNCIAS:

- AGRELLOS OA, JONES C, TODESCHINI AR, PREVIATO JO, MENDONCA-PREVIATO L (2003) A novel sialylated and galactofuranose-containing O-linked glycan, Neu5Acalpha2-->3Galpbeta1-->6(Galfbeta1-->4)GlcNAc, is expressed on the sialoglycoprotein of *Trypanosoma cruzi* Dm28c. **Mol Biochem Parasitol.** 126 (1):93-6.
- ALBERTS B, JOHNSON A, J LEWIS, RAFF M, ROBERTS K, WALTER P (2002) **Molecular Biology of the Cell**, 4th Edition. Copyright by Garland Science Taylor & Francis Group, Chapter 13, page 749.
- ALEXANDER J, SATOSKAR AR, RUSSELL DG (1999) Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci.** 112 Pt 18:2993-3002..
- ALMEIDA IC, GAZZINELLI RT (2001) Proinflammatory activity of ycosylphosphatidylinositol anchors derived from *Trypanosoma cruzi*: structural and function alanalyses. **J Leukoc Biol;** 70(4):467-77.
- ANDERSON R G. W. & ORCI L (1988) A View of Acidic Intracellular Compartments. **The Journal of Cell Biology**, Volume 106, 1988 539-543.
- ANDERSON R G. W (1998) The caveolae membrane system. **Annu Rev Biochem.**67:199-225.
- ANGERMULLER S & FAHIMI HD (1982). Imidazole-buffered osmium tetroxide: an excellent stain for visualization of lipids in transmission electron microscopy. **Histochem J.** 14 (5):823-35.
- ARVANITIS DN, MIN W, GONG Y, HENG YM, BOGGS JM. (2005) Two types of detergent-insoluble, glycosphingolipid/cholesterol-rich membrane domains from isolated myelin. **J Neurochem.** 94(6):1696-710.

- BAUER M, PELKMANS L (2006) A new paradigm for membrane-organizing and -shaping scaffolds. **FEBS Lett.** 580(23):5559-64.
- BERTELLO LE, GONCALVEZ MF, COLLI W, DE LEDERKREMER RM. (1995) Structural analysis of inositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms. **Biochem J.** 15; 310 (Pt 1):255-61.
- BERTELLO LE, ALVES MJ, COLLI W, DE LEDERKREMER RM. (2004) Inositolphosphoceramide is not a substrate for the first steps in the biosynthesis of lycoinositolphospholipids in *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** 133 (1):71-80.
- BICKEL PE, SCHERER PE, SCHNITZER JE, OH P, LISANTI MP, LODISH HF (1997) Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. **J Biol Chem.** 272 (21):13793-802.
- BITMAN, J & WOOD D. L. (1982). An improved copper reagent for quantitative sensitometric thin-layer chromatography of lipids. **J. Liquid Chromatogr.** 5 1155-1 162.
- BLIGH, E.G. AND DYER, W.J. (1959) A rapid method of total lipid extraction and purification. **Can. J. Biochem. Physiol.** 37, 911-913.
- BORNER GH, SHERRIER DJ, WEIMAR T, MICHAELSON LV, HAWKINS ND, MACASKILL A, NAPIER JA, BEALE MH, LILLEY KS, DUPREE P (2005) Analysis of detergent-resistant membranes in *Arabidopsis*. Evidence for plasma membrane lipid rafts. **Plant Physiol.** 137 (1):104-16.
- BROWM D (2006) Lipid rafts, detergent-resistant membranes and raft targeting signals. **Physiology** 21:430-439.
- BROWN DA, ROSE JK. (1992) Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. **Cell.** 68 (3):533-44.

- BUSCAGLIA CA, CAMPO VA, FRASCH AC, DI NOIA JM (2006) *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nat Rev Microbiol.** 4(3): 229-36. Review.
- CAMARGO, E. P. 1964. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I – Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 6: 93-100.
- COPPENS I, COURTOY PJ (2000) The adaptative mechanisms of *Trypanosoma brucei* for sterol homeostasis in its different life-cycle environments. **Annu Rev Microbiol.** 54:129-56.
- CORBALÁN-GARCÍA S & GÓMEZ-FERNÁNDEZ J (2006) Protein kinase C regulatory domains: The art of decoding many different signals in membranes **Biochimica et Biophysica Acta** 1761 633–654.
- CUATRECASAS P (1973) *Vibrio cholerae* cholera toxin. Mechanism of inhibition of cholera toxin action. **Biochemistry.** 12(18):3577-81.
- CUNHA-E-SILVA NL, ATELLA GC, PORTO-CARREIRO IA, MORGADO-DIAZ JA, PEREIRA MG, DE SOUZA W. 2002. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol Lett.** 214:7-12.
- DE GASSART A, GEMINARD C, FEVRIER B, RAPOSO G, VIDAL M. (2003) Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. **Blood.** 102(13):4336-44.
- DE LEDERKREMER RM, ALVES MJ, FONSECA GC, COLLI W (1976) A lipopeptidophosphoglycan from *Trypanosoma cruzi* (epimastigote). Isolation, purification and carbohydrate composition. **Biochim Biophys Acta.** 444(1):85-96.
- DE LEDERKREMER RM, BERTELLO LE (2001) Glycoinositolphospholipids, free and as anchors of proteins, in *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des.** 7(12):1165-79. Review.

- DE LEDERKREMER RM, LIMA CE, RAMIREZ MI, GONCALVEZ MF, COLLI W (1993) Hexadecylpalmitoylglycerol or ceramide is linked to similar glycoposphoinositol anchor-like structures in *Trypanosoma cruzi*. **Eur J Biochem.** 218(3):929-36.
- DENNY PW, FIELD MC, SMITH DF (2001) GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. **FEBS Lett.** 491(1-2):148-53.
- DENNY, PW & SMITH, D. (2004) Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. **Mol Microbiol.** 53(3):725-33. Review.
- DE SOUZA W, DE CARVALHO TU, BENCHIMOL M AND CHIARI E. (1978) *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. **Exp. Parasitol.** 45,101-15.
- DE SOUZA, W, CARVALHO, TU, BENCHIMOL, M (1978). *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. **Exp. Parasitol.**, 45: 101-115.
- DE SOUZA, W. 2000 – O parasito e Sua Interação com os Hospedeiros. In: *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, capítulo 7, Brener, Z. Barral, M., Andrade, Z.(eds), 2 ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan S. A., p. 88-126.
- DE SOUZA (2002) Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr Pharm Des.** 8 (4):269-85.
- DOCAMPO, R, SCOTT, DA, VERCESI, AE, MORENO, SNJ (1995) Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J.** 310 (Pt 3):1005-12.
- DOCAMPO R, MORENO SN. (1999) Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol Today.** (11):443-8.

- DOCAMPO R, DE SOUZA W, MIRANDA K, ROHLOFF P, MORENO SN (2005) Acidocalcisomes-conserved from bacteria to man. **Nat Rev Microbiol.**(3):251-61.
- DOSREIS GA, PECANHA LM, BELLIO M, PREVIATO JO, MENDONCA-PREVIATO L (2002) Glycoinositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* transmit signals to the cells of the host immune system through both ceramide and glycan chains. **Microbes Infect.** 4 (9):1007-13.
- DUPREE P, PARTON RG, RAPOSO G, KURZCHALIA TV, SIMONS K (1993) Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. **EMBO J.**12(4):1597-605.
- DUVIC M (1994) Cloning and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA).**J Biol Chem.** 269(31):19983-91.
- EL-SAYED E COLABORADORES (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science.** 309(5733):409-15.
- ENGELMAN, D M (2005) Membranes are more mosaic than fluid Nature. 1;438(7068):578-80.
- FERGUSON MA (1999) The structure, biosynthesis and functions of glycosylphosphatidylinositol anchors, and the contributions of trypanosome research. **J Cell Sci.** 112 (Pt 17):2799-809.
- FIGUEIREDO JM, DIAS WB, MENDONCA-PREVIATO L, PREVIATO JO, HEISE N (2005) Characterization of the inositol phosphorylceramide synthase activity from *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J.** 387(Pt 2):519-29.
- FRANCO DA SILVEIRA J, COLLI W (1981) Chemical composition of the plasma membrane from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. **Biochim Biophys Acta.** 1981;644(2):341-50.

- GAGESCU R, DEMAUREX N, PARTON RG, HUNZIKER W, HUBER LA, GRUENBERG J (2000) The recycling endosome of Madin-Darby canine kidney cells is a mildly acidic compartment rich in raft components. **Mol Biol Cell.** 11(8):2775-91.
- CHMELAR RS, NATHANSON NM. (2006) Identification of a novel apical sorting motif and mechanism of targeting of the M2 muscarinic acetylcholine receptor **J Biol Chem.** 281(46):35381-96.
- FOSTER LJ, DE HOOG CL, MANN M (2003) Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. **Proc Natl Acad Sci** 100(10):5813-8.
- GHOSH S, STRUM JC, BELL RM (1997) Lipid biochemistry: functions of glycerolipids and sphingolipids in cellular signaling. **FASEB J.** 11(1):45-50.
- GRIGORIEFF, N., CESKA, T. A., DOWNING, K. H., BALDWIN, J. M. & HENDERSON, R. (1996). Electron crystallographic refinement of the structure of bacteriorhodopsin. **J. Mol. Biol.** 259, 393–421.
- HELMS, JB, ZURZOLO, C (2004) Lipid as targeting signals: lipid rafts and intracellular trafficking. **Traffic**, 5:247-254.
- HEERKLOTZ H (2002) Triton promotes domain formation in lipid raft mixtures. **Biophys J.** 83(5):2693-701.
- JONES C, TODESCHINI AR, AGRELLOS OA, PREVIATO JO, MENDONCA-PREVIATO L.(2004) Heterogeneity in the biosynthesis of mucin O-glycans from *Trypanosoma cruzi* tulahuen strain with the expression of novel galactofuranosyl-containing oligosaccharides. **Biochemistry.** 43(37):11889-97.
- KAWOOYA, J.K. AND LAW, J.H. (1988) Role of lipophorin in lipid transport to the insect egg. **J. Biol. Chem.** 263, 8748-8753.

- KENNY AP (1952) The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard reaction. **Biochem J.** 52(4):611-9.
- KOBAYASHI T, TAKAHASHI M, NAGATSUKA Y, HIRABAYASHI Y (2006) Lipid rafts: new tools and a new component. **Biol Pharm Bull.** 29(8):1526-31.
- KORN ED, VON BRAND T, TOBIE EJ (1969) The sterols of *Trypanosoma cruzi* and *Crithidia fasciculata*. **Comp Biochem Physiol.** 30(4):601-10.
- KUZIEMKO GM, STROH M, STEVENS RC. (1996) Cholera toxin binding affinity and specificity for gangliosides determined by surface plasmon resonance. **Biochemistry.** 35(20):6375-84.
- LANG DM, LOMMEL S, JUNG M, ANKERHOLD R, PETRAUSCH B, LAESSING U, WIECHERS F, PLATTNER H, STUERMER CA. (1998) Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasma membrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. *J Neurobiol.* 37(4):502-23.
- LANGHORST MF, REUTER A, STUERMER CA (2005) Scaffolding microdomains and beyond: the function of reggie/flotillin proteins. **Cell Mol Life Sci.** 62(19-20):2228-40.
- LESTER RL, DICKSON RC (1993) Sphingolipids with inositolphosphate containing head groups. **Adv Lipid Res.** 26: 253-74.
- LISCUM L, MUNN NJ (1999) Intracellular cholesterol transport **Biochim Biophys Acta.** 1438 (1):19-37.
- LICHTENBERG D, GONI FM, HEERKLOTZ H (2005) Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. **Trends Biochem Sci.** 30(8):430-6.

- LONDON E, BROWN DA (2000) Insolubility of lipids in triton X-100: physical origin and relationship to sphingolipid/cholesterol membrane domains (rafts). **Biochim Biophys Acta.** 1508(1-2):182-95.
- LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.R. AND RANDALL, R.J. (1951) Protein measurements with the Folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** 193, 265-270.
- LUSA S, BLOM TS, ESKELINEN EL, KUISMANEN E, MANSSON JE, SIMONS K, IKONEN E (2001) Depletion of rafts in late endocytic membranes is controlled by NPC1-dependent recycling of cholesterol to the plasma membrane. **J Cell Sci.** 114(Pt 10):1893-900.
- MARTINEZ-PALOMO A, DE SOUZA W, GONZALEZ-ROBLES A (1976) Topographical differences in the distribution of surface coat components and intramembrane particles. A cytochemical and freeze-fracture study in culture forms of *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Biol.** 69(2):507-13.
- MERRITT EA, SARFATY S, VAN DEN AKKER F, L'HOIR C, MARTIAL JA, HOL WG (1994) Crystal structure of cholera toxin B-pentamer bound to receptor GM1 entasaccharide. **Protein Sci.** 3(2):166-75.
- MITCHELS, P.A.M, BRINGAUD, F, HERMAN, M, HANNAERT, V (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochimica et Biophysica Acta** 1763(12):1463-77.
- MOBIUS W, VAN DONSELAAR E, OHNO-IWASHITA Y, SHIMADA Y, HEIJNEN HF, SLOT JW, GEUZE HJ (2003) Recycling compartments and the internal vesicles of multivesicular bodies harbor most of the cholesterol found in the endocytic pathway. **Traffic.** 4(4):222-31.

- MOFFETT S, BROWN DA, LINDER ME (2000) Lipid-dependent targeting of G proteins into rafts. **J Biol Chem.** 275(3):2191-8.
- MONTEIRO AC, ABRAHAMSON M, LIMA AP, VANNIER-SANTOS MA, SCHARFSTEIN J (2001) Identification, characterization and localization of chagasin, a tight-binding cysteine protease inhibitor in *Trypanosoma cruzi*. **J Cell Sci.** 114(Pt 21):3933-42.
- MORROW IC, REA S, MARTIN S, PRIOR IA, PROHASKA R, HANCOCK JF, JAMES DE, PARTON RG (2002) Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation **J Biol Chem.** 277(50):48834-41
- MURATA M, PERANEN J, SCHREINER R, WIELAND F, KURZCHALIA TV, SIMONS K (1995) VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92(22):10339-43.
- NEUMANN-GIESEN C, FALKENBACH B, BEICHT P, CLAASEN S, LUERS G, STUERMER CA, HERZOG V, TIKKANEN R. (2004) Membrane and raft association of reggie-1/flotillin-2: role of myristoylation, palmitoylation and oligomerization and induction of filopodia by overexpression. **Biochem J.** 378 (Pt 2):509-18.
- NOLAN DP, JACKSON DG, BIGGS MJ, BRABAZON ED, PAYS A, VAN LAETHEM F, PATURIAUX-HANOCQ F, ELLIOTT JF, VOORHEIS HP, PAYS E (2005) Characterization of a novel alanine-rich protein located in surface microdomains in *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem** 280(35):31340.
- OLIVEIRA MM, TIMM SL, COSTA SC (1977) Lipid composition of *Trypanosoma cruzi*. **Comp Biochem Physiol B.** 58(2):195-9.

- PALADE, GE. (1953) Fine structure of blood capillaries. **J Appl Phys**; 24:1424.
- PANASIEWICZ M, DOMEK H, HOSER G, KAWALEC M, PACUSZKA T (2003) Structure of the ceramide moiety of GM1 ganglioside determines its occurrence in different detergent-resistant membrane domains in HL-60 cells. **Biochemistry**. 42(21):6608-19.
- PARSONS, M (2004) Glycosomes: parasites and the divergence of peroxisomal purpose. **Molecular Microbiology** 53 (3), 717-724.
- PARTON RG (1996) Caveolae and caveolins. **Curr Opin Cell Biol**. 8(4):542-8. Review.
- PARTON RG, RICHARDS AA (2003) Lipid rafts and caveolae as portals for endocytosis: new insights and common mechanisms. **Traffic**. 4(11):724-38.
- PIKE L, CASEY L (1996) Localization and Turnover of Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate in Caveolin enriched Membrane Domains **J. Biol Chem** 271, 43, 26453–26456.
- PIKE, L. (2004) Lipid rafts: heterogeneity on the high seas. **Biochem J**. 378 (Pt 2):281-92.
- PIMENTA PF, DE SOUZA W, SOUTO-PADRON T, PINTO DA SILVA P.(1989) The cell surface of *Trypanosoma cruzi*: a fracture-flip, replica-staining label-fracture survey. **Eur J Cell Biol** 50(2):263-71.
- PRINETTI, A., CHIGORNO, V., TETTAMANTI, G. AND SONNINO, S. (2000) Sphingolipid-enriched membrane domains from rat cerebellar granule cells differentiated in culture: a compositional study. **J. Biol. Chem**. 275, 11658–11665.

- PRALLE A, KELLER P, FLORIN EL, SIMONS K, HORBER JK (2000) Sphingolipid-cholesterol rafts diffuse as small entities in the plasma membrane of mammalian cells. **J Cell Biol.** 148(5):997-1008.
- PRINTZ W (2002) Cholesterol trafficking in the secretory and endocytic systems. **Cell & Developmental Biology** 13:197-203.
- PORTO CARREIRO, I.A., MIRANDA, K., ATTIAS, M., DE SOUZA, W & CUNHA-E-SILVA, NL (2000) *Trypanosoma cruzi* epimastigotes endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before reservome storage. **Eur. J. Cell Biol.**, 79: 858-869.
- PREVIATO JO, ANDRADE AF, PESSOLANI MC, MENDONCA-PREVIATO L. (1985) Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route. **Mol Biochem Parasitol.** 16(1):85-96.
- PREVIATO JO, JONES C, GONCALVES LP, WAIT R, TRAVASSOS LR, MENDONCA-PREVIATO L.(1994) O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J.** 301 (Pt 1):151-9.
- PREVIATO JO, JONES C, XAVIER MT, WAIT R, TRAVASSOS LR, PARODI AJ, MENDONCA-PREVIATO L (1995) Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **J Biol Chem.** 270 (13):7241-50.
- RADEVA G, SHAROM FJ (2004) Isolation and characterization of lipid rafts with different properties from RBL-2H3 (rat basophilic leukaemia) cells. **Biochem J.** 380(Pt 1):219-30.

- RASMUSSEN B, DESCOTEAUX A (2004) Contribution of electron and confocal microscopy in the study of *Leishmania*-macrophage interactions **Microsc Microanal.** 10(5):656-61.
- RIVERA-MILLA E, STUERMER CA, MALAGA-TRILLO E (2006) Ancient origin of reggie (flotillin), reggie-like, and other lipid-raft proteins: convergent evolution of the SPFH domain. **Cell Mol Life Sci.** 63 (3):343-57.
- ROTHBERG KG, HEUSER JE, DONZELL WC, YING YS, GLENNEY JR, ANDERSON RG (1992) Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. **Cell.** 68 (4):673-82.
- RUIZ, J. I., AND OCHOA, B. (1997) Quantification in the subnanomolar range of phospholipids and neutral lipids by monodimensional thin-layer chromatography and image analysis. **J. Lipid Res.** 38, 1482–1489.
- SALTO ML, FURUYA T, MORENO SN, DOCAMPO R, DE LEDERKREMER RM (2002).The phosphatidylinositol-phospholipase C from *Trypanosoma cruzi* is active on inositolphosphoceramide. **Mol Biochem Parasitol.** 119(1):131-3.
- SALTO ML, BERTELLO LE, VIEIRA M, DOCAMPO R, MORENO SN, DE LEDERKREMER RM (2003) Formation and remodeling of inositolphosphoceramide during differentiation of *Trypanosoma cruzi* from trypomastigote to amastigote. **Eukaryot Cell.** Aug;2(4):756-68.
- SANT'ANNA C, DE SOUZA W, CUNHA-E-SILVA N. 2004. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. **Microsc Microanal.** 10:637-46.
- SANTOS CC, SANT'ANNA C, TERRES A, CUNHA-E-SILVA NL, SCHARFSTEIN J, DE A LIMA AP. (2005). Chagasin, the endogenous cysteine-protease inhibitor of

Trypanosoma cruzi, modulates parasite differentiation and invasion of mammalian cells. *J Cell Sci.* 118:901-15.

- SCHENKMAN S, JIANG MS, HART GW, NUSSENZWEIG V (1991) A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell.* 65(7):1117-25.
- SCHROEDER WT, STEWART-GALETKA S, MANDAVILLI S, PARRY DA, GOLDSMITH L, DUVIC M. (1994) Cloning and characterization of a novel epidermal cell surface antigen (ESA). *J Biol Chem.* 269(31):19983-91
- SCHUCK S, HONSHO, M, EKROOS, K, SHEVCHENKO A, SIMONS, K (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. *PNAS.* 100:5795-5800.
- SCHULTE T, PASCHKE KA, LAESSING U, LOTTSPREICH F, STUERMER CA (1997) Reggie-1 and reggie-2, two cell surface proteins expressed by retinal ganglion cells during axon regeneration. *Development.* (2):577-87.
- SCHUTZ GJ, KADA G, PASTUSHENKO VP, SCHINDLER H (2000) Properties of lipid microdomains in a muscle cell membrane visualized by single molecule microscopy. *EMBO J.* 2000 19(5):892-901.
- SCOTT, D, DE SOUZA, W, BENCHIMOL, MI, ZHONG, L LU, HG, MORENO SNJ, DOCAMPO R (1998) Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 273(34):22151-8.
- SCOTT, D, DOCAMPO R (1998) Two types of H⁺-ATPase are involved in the acidification of internal compartments in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 331 (Pt 2):583-9.

- SCOTT DA, DOCAMPO R.(2000) Characterization of isolated acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem.** 275(31):24215-21;
- SERRANO AA, SCHENKMAN S, YOSHIDA N, MEHLERT A, RICHARDSON JM, FERGUSON MA (1995) The lipid structure of the glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like sialic acid acceptors of *Trypanosoma cruzi* changes during parasite differentiation from epimastigotes to infective metacyclic trypomastigote forms. **J Biol Chem.** 270 (45):27244-53.
- SERRANO AA, ALMEIDA IC, FREITAS-JUNIOR LH, YOSHIDA N, SCHENKMAN S (2001) The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol Biochem Parasitol.** 114(2):143-50.
- SHAW, A. (2006). Lipid rafts: now you see them, now you don't. **Nat Immunol.** 7(11):1139-42.
- SCHUCK S, HONSHO M, EKROOS K, SHEVCHENKO A, SIMONS K (2003) Resistance of cell membranes to different detergents. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 100 (10):5795-800.
- SHIN JS, ABRAHAM SN (2001) Caveolae as portals of entry for microbes. **Microbes Infect** 3(9):755-61.
- SINGER, S. J. & NICOLSON, G. L. (1972).The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. **Science** 175, 720–731.
- SIMONS, K. & IKONEN, E. (1997). Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387, 569–572.
- SIMONS K, GRUENBERG J (2000) Jamming the endosomal system: lipid rafts and lysosomal storage diseases. **Trends Cell Biol.** (11):459-62.

- SIMONS K, TOOMRE D (2001) Lipid rafts and signal transduction. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2(3):216.
 - SPRONG H, VAN DER SLUIJS P, VAN MEER G (2001) How proteins move lipids and lipids move proteins. **Nat Rev Mol Cell Biol**; 2(9):698.
- SOARES, MJ, DE SOUZA, W. 1988. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids. A cytochemical and stereological study. **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 20: 349-363.
- SOARES, MJ, SOUTO-PADRÓN, T, BONALDO, MC, GOLDENBERG, S, DE SOUZA, W. 1989. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, 75: 522-527.
- SOARES, MJ, DE SOUZA, W 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.** 77: 461-469.
- SOARES, MJ, SOUTO-PADRÓN, T, DE SOUZA W. (1992) Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoan *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell Sci.** 102: 157-167.
- SOLOMON S, MASILAMANI M, RAJENDRAN L, BASTMEYER M, STUERMER CA, ILLGES H (2002) The lipid raft microdomain-associated protein reggie-1/flotillin-2 is expressed in human B cells and localized at the plasma membrane and centrosome in PBMCs. **Immunobiology.** 205 (1):108-19.
- SOUTO-PADRON T, CAMPETELLA OE, CAZZULO JJ, DE SOUZA W (1990) Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. **J Cell Sci.** 96 (Pt 3):485-90.

- LANG DM, LOMMEL S, JUNG M, ANKERHOLD R, PETRAUSCH B, LAESSING U, WIECHERS MF, PLATTNER H, STUERMER CA (1998) Identification of reggie-1 and reggie-2 as plasmamembrane-associated proteins which cocluster with activated GPI-anchored cell adhesion molecules in non-caveolar micropatches in neurons. **J Neurobiol.** 37(4):502-23.
- THOMAS S, KUMAR RS, BRUMEANU TD (2004) Role of lipid rafts in T cells. **Arch Immunol Ther Exp (Warsz).** 52 (4):215-24.
 - THIERY, JP (1967) Mise em evidence des polysacharides sur coupes fines em microscopie electronique. **J. Microscopic.** 6: 987-1018.
- URBINA JA, MORENO B, VIERKOTTER S, OLDFIELD E, PAYARES G, SANOJA C, BAILEY BN, YAN W, SCOTT DA, MORENO SN, DOCAMPO R (1999) *Trypanosoma cruzi* contains major pyrophosphate stores, and its growth in vitro and in vivo is blocked by pyrophosphate analogs. **J Biol Chem.** 274(47):33609-15.
- VEIGA MP, ARRONDO JL, GONI FM, ALONSO A, MARSH D (2001) Interaction of cholesterol with sphingomyelin in mixed membranes containing phosphatidylcholine, studied by spin-label ESR and IR spectroscopies. A possible stabilization of gel-phase sphingolipid domains by cholesterol. **Biochemistry.** 40(8):2614-22.
- VIEIRA M, ROHLOFF P, LUO S, CUNHA-E-SILVA NL, DE SOUZA W, DOCAMPO R. 2005. Role for a P-type H⁺-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem J.** 392:467-74.
- WACHTLER, V E BALASUBRAMANIAN, MK (2006) Yeast lipid rafts? An emerging view. **Trends Cell Biol.** Jan;16(1):1-4.
- WARREN LG (1960) Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **J Parasitol.** 46:529-39.

- XIANG SL, ZHONG M, CAI FC, DENG B, ZHANG XP (2006) The sialic acid residue is a crucial component of C. jejuni lipooligosaccharide ganglioside mimicry in the induction Guillain-Barre syndrome. **J Neuroimmunol.** 174(1-2):126-32.
- YAMADA, E. (1955) The fine structure of the gall bladder epithelium of the mouse. **J. Cell Biol.**, 1: 445 - 458.
- ZLATAKIS A, ZAK B, BOYLE AJ. (1953) A new method for the direct determination of serum cholesterol. **J Lab Clin Med.** 41(3):486-92.

SITES CONSULTADOS EM MARÇO DE 2007:

- www.ehu.es
- www.publications.nigms.nih.gov/?...?ch2_lipidraft.jpg

Figura 9: (A) Epimastigota de *T. cruzi* mostrando na região posterior um reservossomo (R), núcleo (N) e cinetoplasto (K) com aspecto e localização típicos; (B) Fração de reservossomos isolados com corpos lipídicos (CL) e perfis de membrana (seta). (C) Reservossomo isolado apresentando perfis de membrana pouco comuns, posicionadas perpendicularmente à membrana da organela (setas) e corpos lipídicos retangulares (CL). Barras: 220 nm.

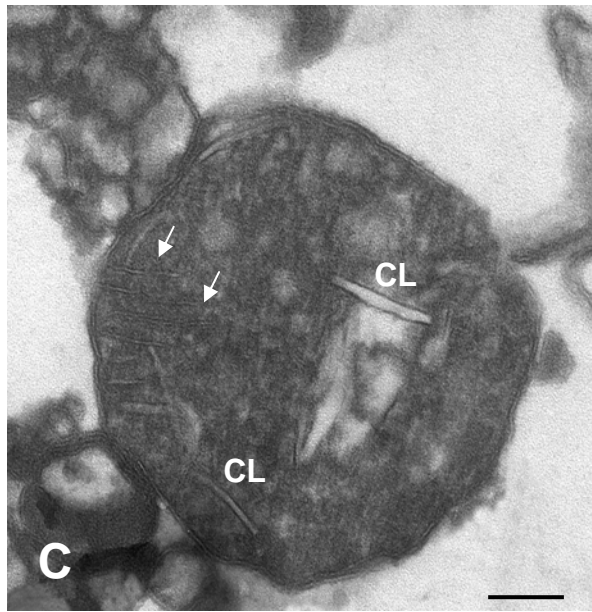
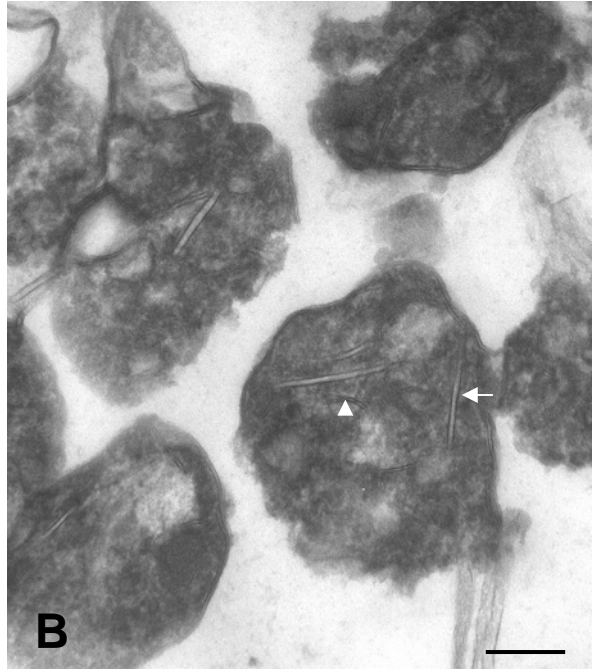
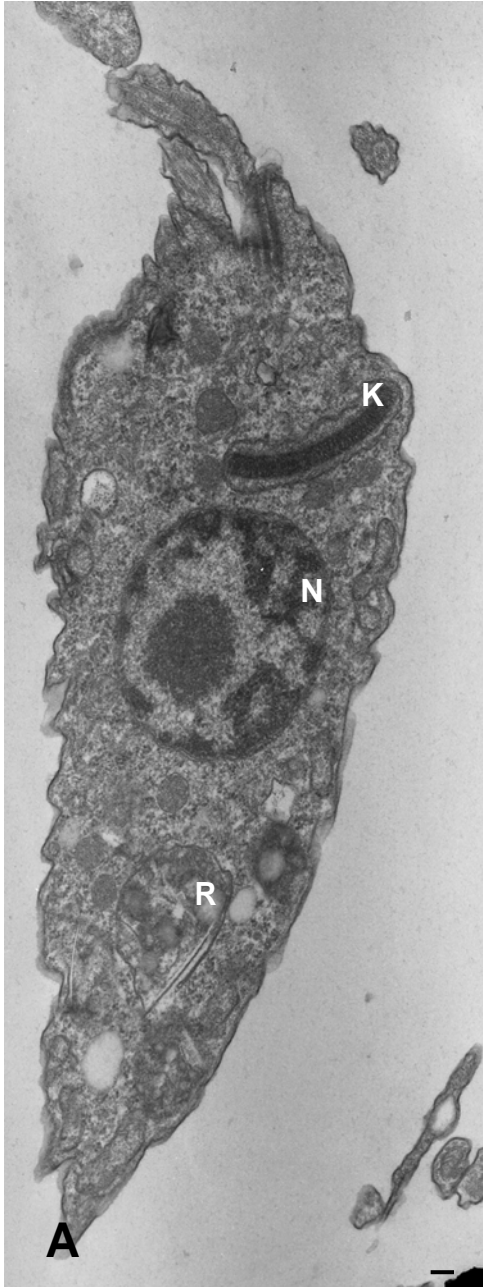
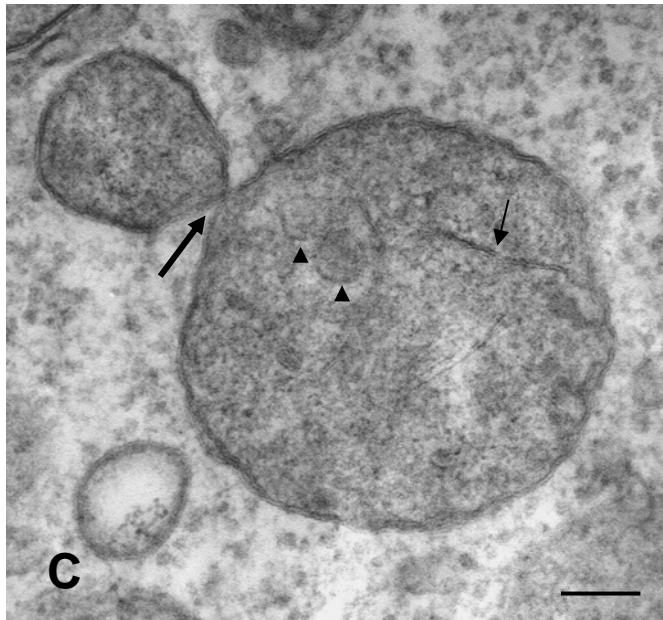
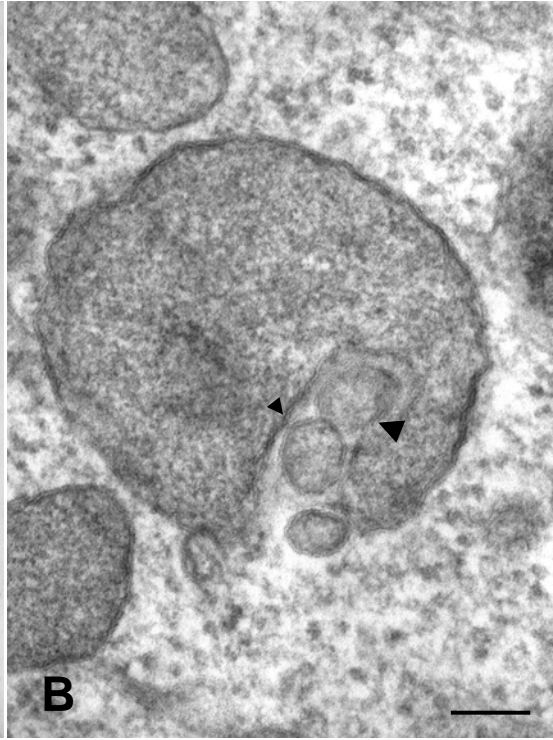
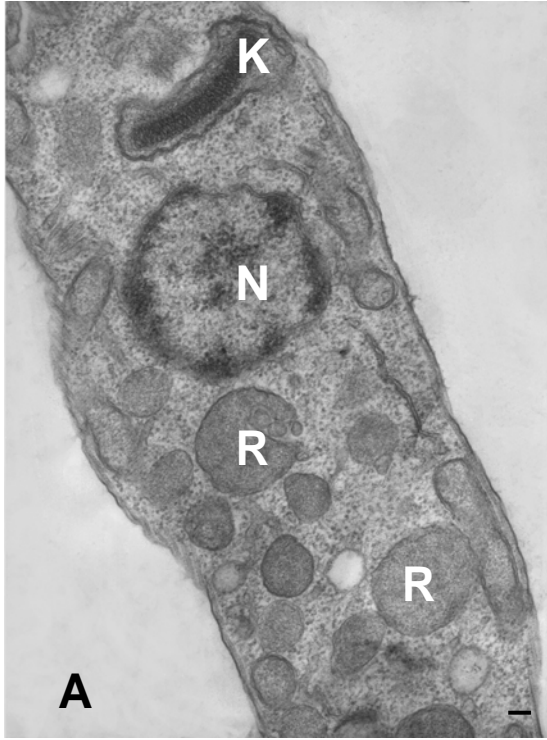


Figura 10: (A) Corte longitudinal de epimastigota de *T. cruzi* mostrando núcleo (N) e cinetoplasto (K); na região posterior reservossomos (R). (B) Em maior aumento, reservossomo e três possíveis vesículas intimamente associadas (cabeças de seta). (C) Reservossomo *in situ* apresentando vesículas no seu interior (cabeças de seta), uma membrana planar (seta pequena) e em contato com outro compartimento (seta grande). Barras: 150 nm.



10

Figura 13: Microscopia ótica de fluorescência de epimastigotas incubados na presença de toxina do cólera subunidade B conjugada à FITC. **(A)** Marcação observada por toda superfície do parasito a 4°C. **(B)** Contraste diferencial interferencial dos epimastigotas tratados a 4°C. **(C)** Reservossomos positivos para a marcação com a toxina do cólera (setas) quando colocados para endocitar a 28°C. **(D)** Contraste diferencial interferencial dos epimastigotas tratados a 28°C. Barras: 10 µm.

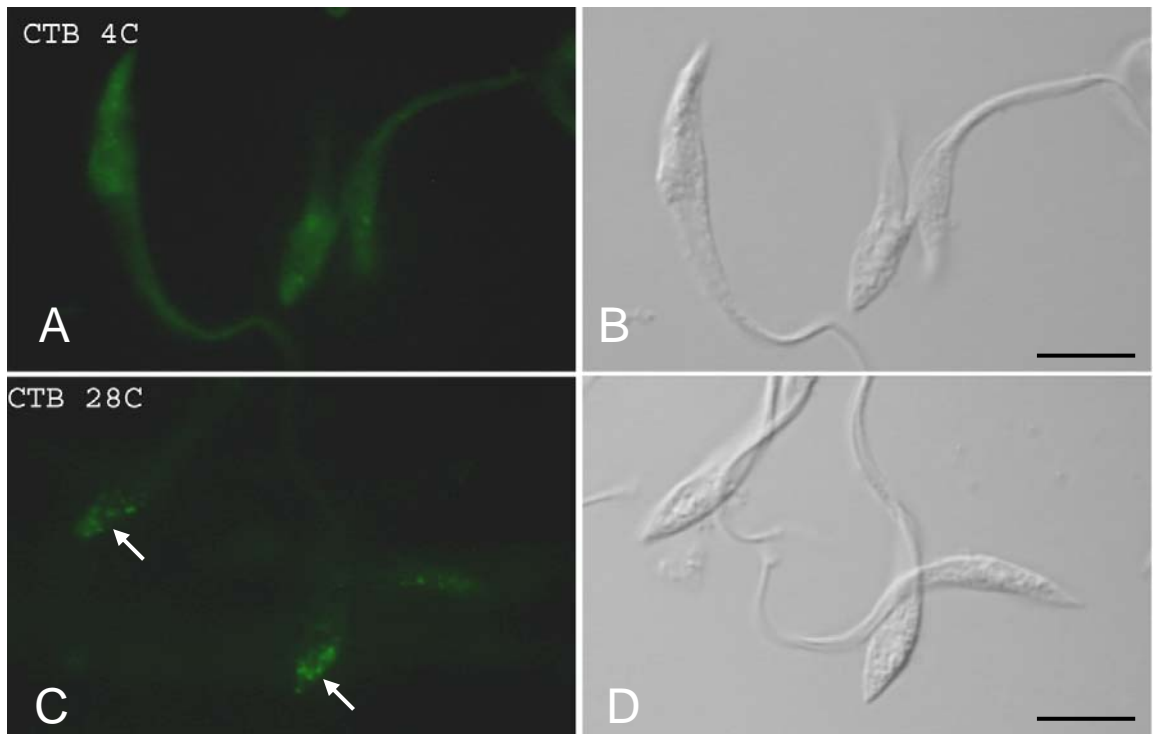


Figura 14: Microscopia ótica de fluorescência de epimastigotas e coanomastigotas de *C. deanei* incubados na presença de toxina do cólera subunidade B conjugada à FITC a 28°C. **(A)** Observe a marcação nos reservossomos e ao longo do citóstoma (seta). A fluorescência da imagem foi artificialmente intensificada de forma a mostrar a marcação do citóstoma. **(B)** Contraste diferencial interferencial dos epimastigotas tratados. **(C)** As formas coanomastigotas também apresentaram resultado negativo para este ensaio, mostrando que não são capazes de endocitar a toxina solúvel. **(D)** Contraste diferencial interferencial dos coanomastigotas tratados. Barras: 5 μm .

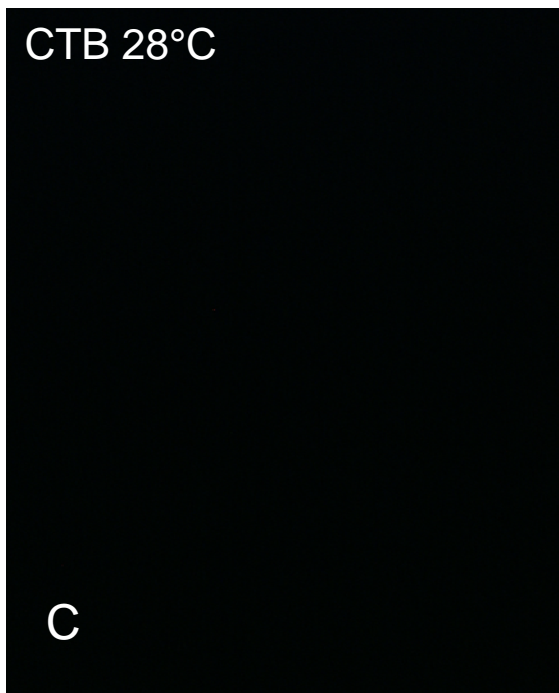
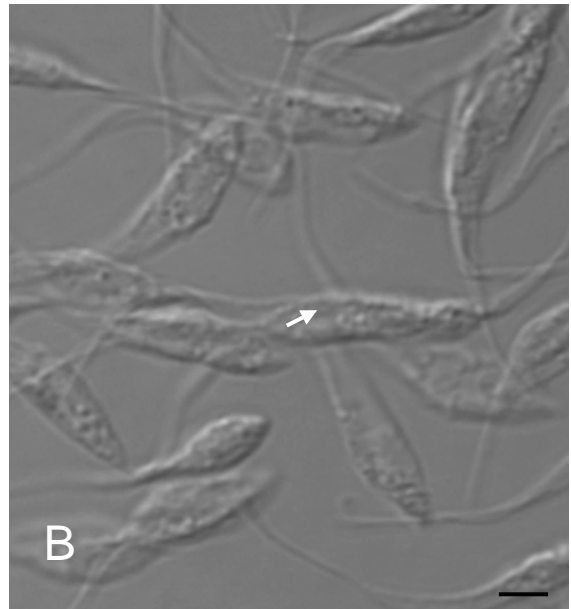
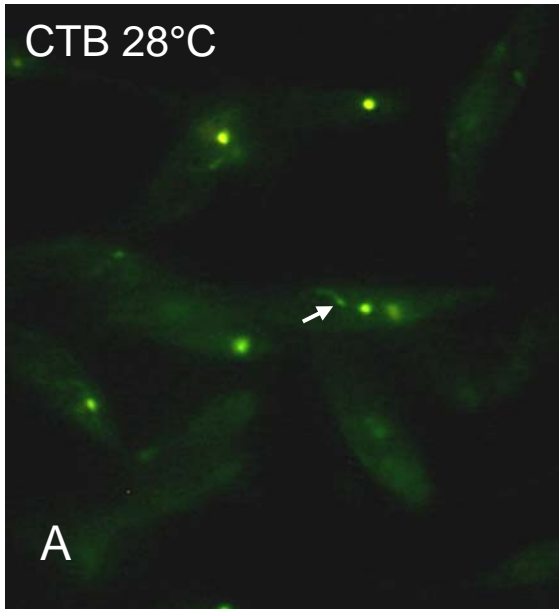


Figura 15: Microscopia ótica de fluorescência de epimastigotas e coanomastigotas de *C. deanei* incubados na presença de toxina do cólera subunidade B conjugada à FITC a 4°C. **(A)** Marcação por toda superfície do epimastigota. **(B)** Contraste diferencial interferencial dos epimastigotas tratados. **(C)** As formas coanomastigotas apresentaram resultado negativo para o ensaio. **(D)** Contraste diferencial interferencial dos coanomastigotas tratados. Barras: 5 μm .

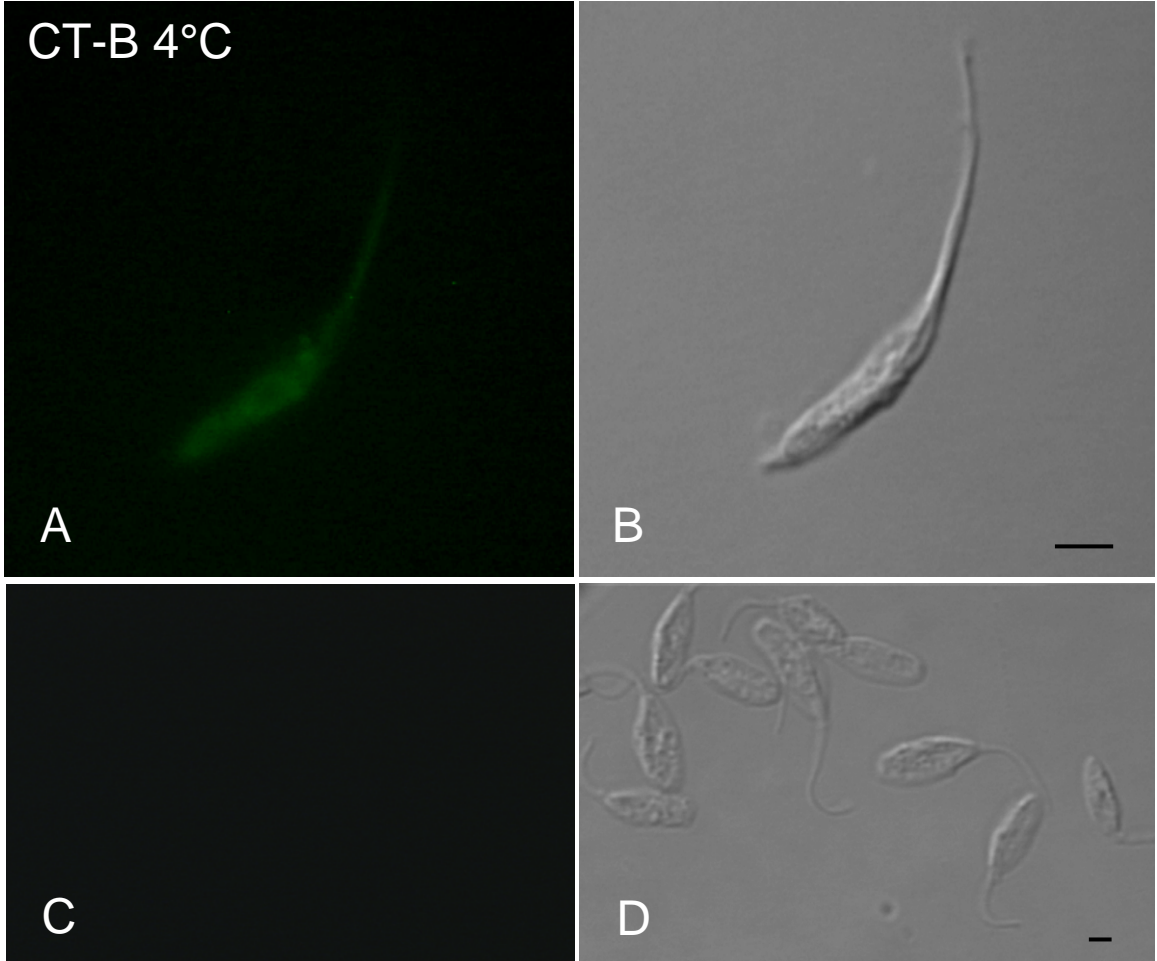


Figura 17: Imunofluorescência de epimastigotas com anticorpo anti-flotilina 2.

(A) Foram observadas duas regiões positivas para o ensaio na célula. Uma é a região posterior, onde os reservossomos se localizam (seta grande) e outra é a região anterior da célula, possivelmente bolsa flagelar ou Golgi (seta pequena). (B) Contraste diferencial interferencial dos epimastigotas tratados. Barra: 5 μm .

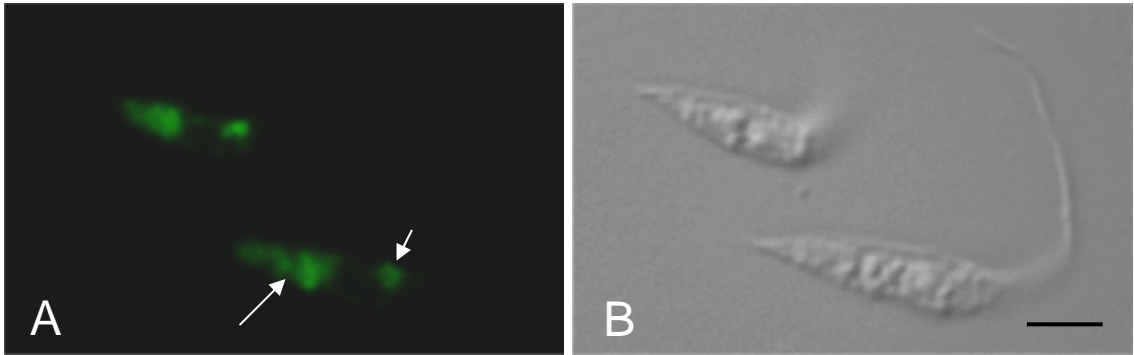


Figura 18: Imunocitoquímica por contrastação negativa em reservossomos isolados. (A) e (B) mostram dois reservossomos e a ligação do anticorpo nas membranas internas dos reservossomos (setas). Barras: 200 nm.

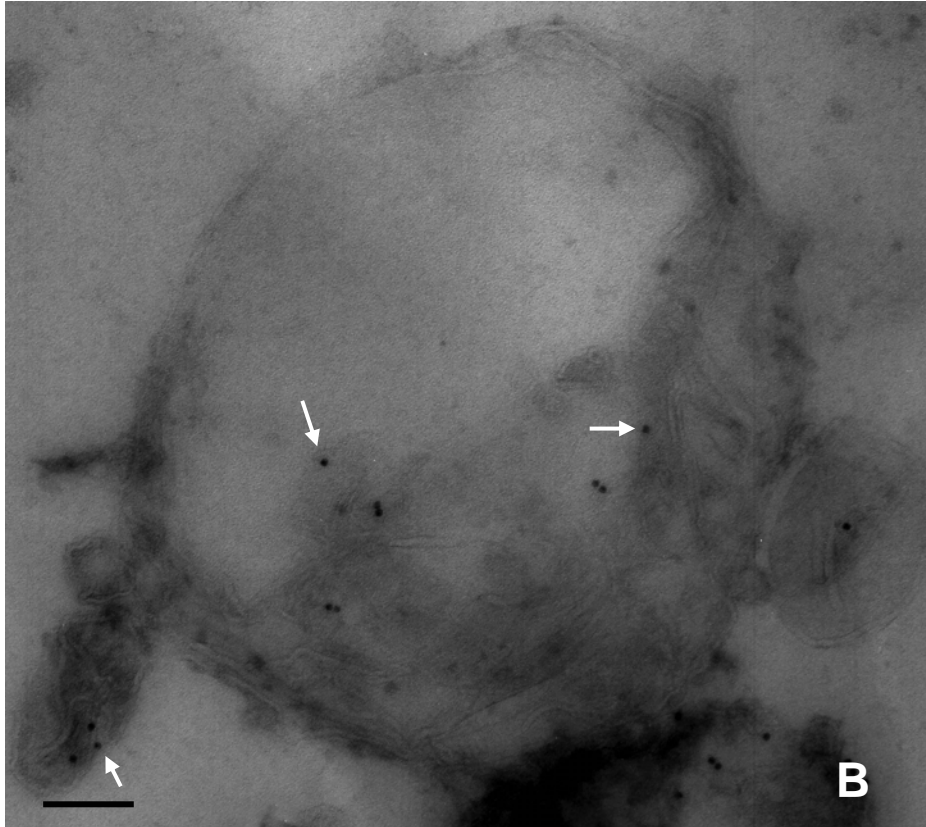
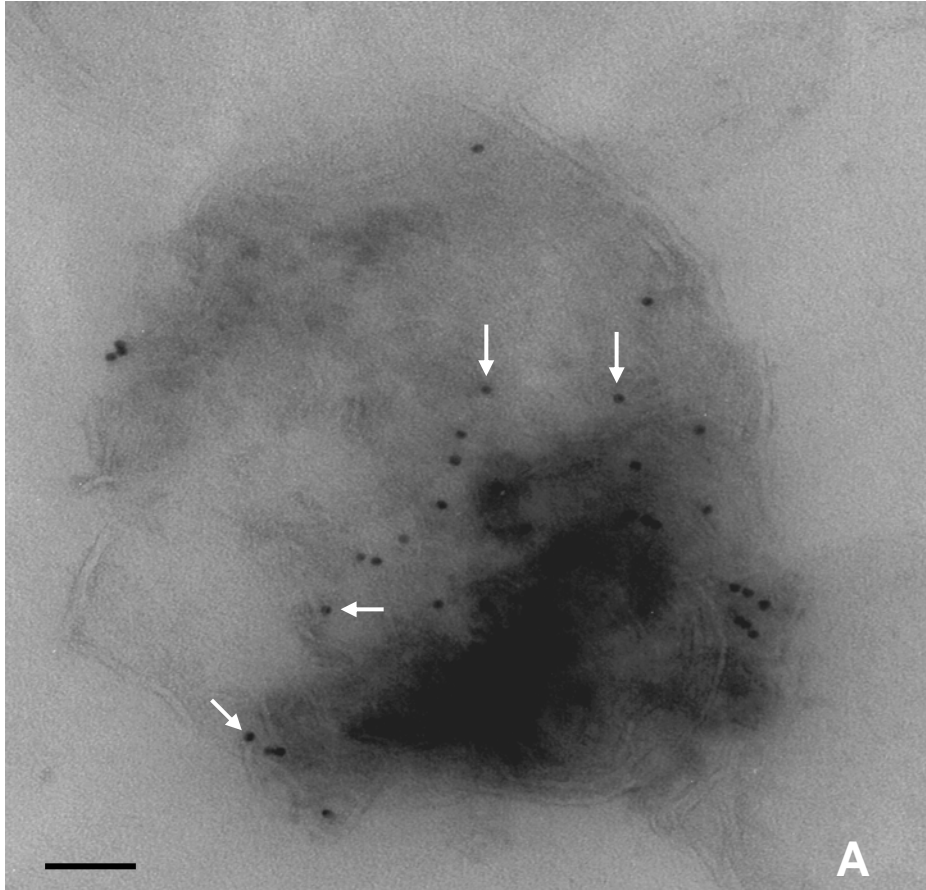
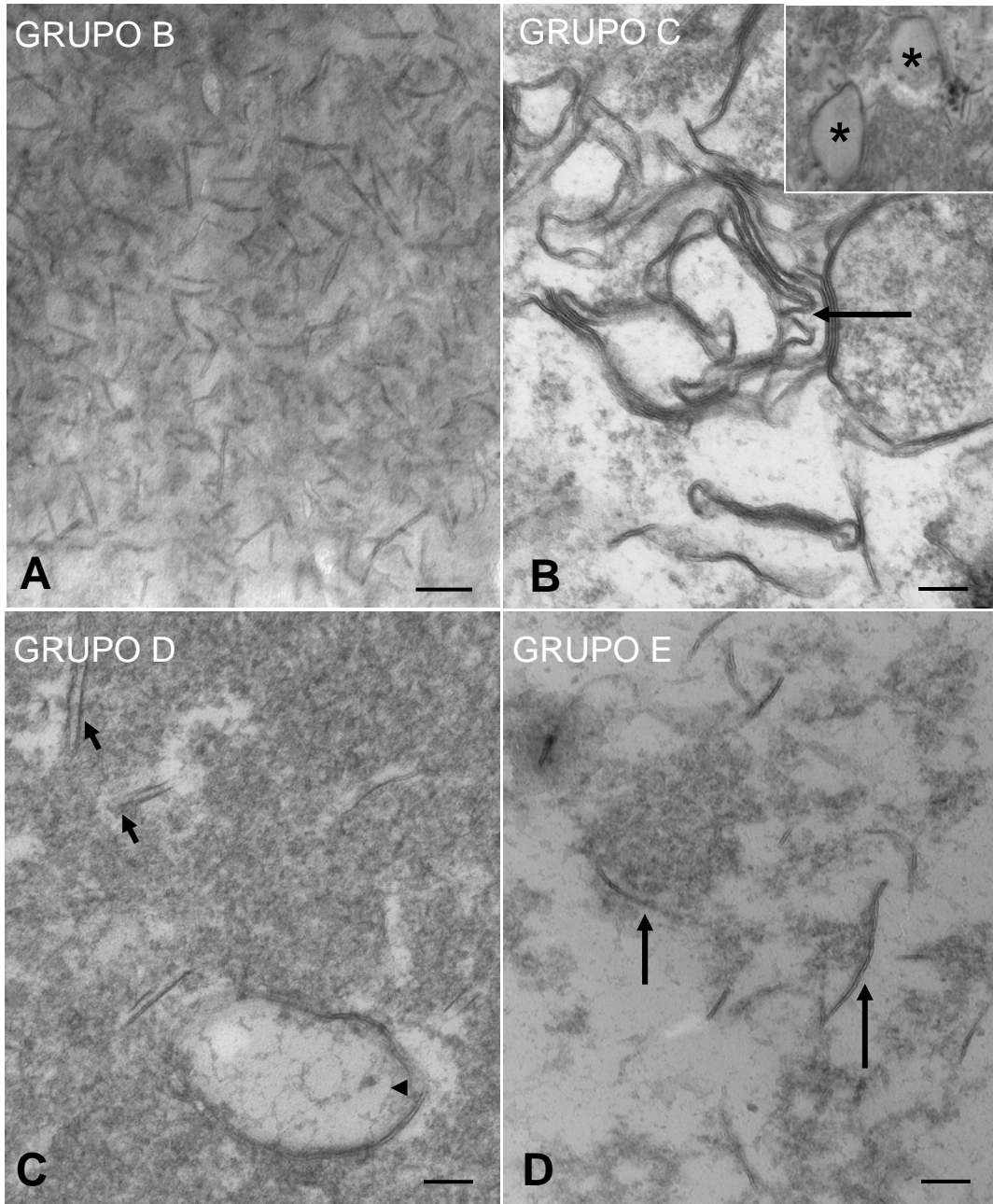


Figura 19: Micrografias eletrônicas das frações recolhidas do gradiente de sacarose. (A) Grupo B mostrando perfis de membrana planares enriquecidos. (B) Grupo C cujas membranas adotam um perfil curvilíneo longo (seta). *Inset:* duas inclusões lipídicas (asterisco). (C) Grupo D enriquecido com material granular e apresentando corpos lipídicos retangulares (setas pequenas) e alguns perfis de membrana associados (seta pequena). (D) Grupo E apresentando perfis de membrana planares e material granular. Barras: 100 nm.



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)