

JULIANA CUNHA VIDAL

**Observação morfológica da relação entre a via
endocítica e o citoesqueleto de epimastigotas de
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação submetida à Universidade Federal do Rio de Janeiro –
UFRJ

Visando a obtenção do grau de mestre em ciências



Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Juliana Cunha Vidal

Observação morfológica da relação entre a via endocítica e o citoesqueleto de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário para a obtenção do título Mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Orientador:

Narcisa Leal Cunha e Silva

Rio de Janeiro

2010

Vidal, Juliana Cunha

Rio de Janeiro, 2010.

Observação morfológica da relação entre a via endocítica e o citoesqueleto de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Juliana Cunha Vidal. Rio de Janeiro. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas, Biofísica) – Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, 2010.

Orientadora: Narcisa Leal Cunha e Silva

VIII; 116.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Citoesqueleto. 3. Via endocítica.

I. Cunha e Silva, Narcisa Leal (orientadora). II. Universidade Federal do Rio de Janeiro. Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho. III. Observação morfológica da relação entre a via endocítica e o citoesqueleto de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*.

Juliana Cunha Vidal

Observação morfológica da relação entre a via endocítica e o citoesqueleto de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biofísica), Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como requisito necessário à obtenção do título de mestre em Ciências Biológicas (Biofísica).

Dra. Narcisa Leal Cunha e Silva, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Orientadora

Dra. Ana Paula Cabral de Araujo Lima, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Ângela Hampshire de Carvalho Santos Lopes,
Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes,
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Rosane Silva, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho,
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Dra. Thaís Souto Padrón, Instituto de Microbiologia Prof. Paulo de Góes, revisor
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, pertencente ao Programa de Biologia Celular e Parasitologia, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, sob a orientação da Dra. Narcisa Leal Cunha e Silva, com auxílios financeiros cedidos pela:

- Fundação de Amparo à Pesquisa Carlos Chagas Filho do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ)
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Programas de Núcleos de Excelência (PRONEX)
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)

**Dedico esta dissertação aos meus
pais por todo carinho e incentivo.
Muito obrigado por tudo, amo muito vocês.**

Agradecimentos:

Aos **meus pais** que me ensinaram o valor que o estudo tem e que sempre me incentivaram a lutar pelos meus objetivos sem desanimar nos obstáculos.

Ao **Guilherme** por ter me ajudando a superar o estresse, sempre disposto a dar um passeio para me descontrair. Também agradeço pelo incentivo constante, paciência e compreensão. Além de namorado, amigo pra todas as horas!

À tia **Nereida** pela torcida mais que animada!

À **Narcisa** por ter me acolhido sem hesitar, pelas horas de conversas científicas, guiando meus pensamentos e me ensinando a desenvolver meus raciocínios científicos. Nossas conversas sempre enriquecem muito meu aprendizado! Muito obrigada pela paciência e carinho.

Ao **prof. Wanderley**, que sempre muito objetivo, consegue dizer em uma frase o que falta ser feito para o trabalho ficar completo. As reuniões de resultados sempre nos ajudam a direcionar melhor nossos trabalhos.

À **Carol Alcântara** pela ajuda incansável, pelo bom-humor, pelo companherismo, pelas conversas e pela ajuda em coisas que os biofísicos sabem muito melhor que os biólogos! Espero poder te ajudar tanto quanto você me ajudou durante meu mestrado. Você é uma aluna exemplar e tem um futuro brilhante pela frente! Eu adoooro você!

À **Silvia** por me ouvir, pelas sugestões dadas e pela troca de experiências. Apesar da correria, sempre temos longas conversas sobre experimentos, sobre as pessoas e a vida... Muito bom ter você por perto!

À **Miria** sempre pronta para ouvir minhas preocupações com experimentos. Dando sugestões e me animando quando a coisa tava preta. Você é essencial para o dia-a-dia naquele subsolo!

Ao **Celso Sant'Anna** por todo o apoio, pelas discussões e ajuda nas metodologias que não dominava. Isso tudo sempre com muito bom-humor, usando o mantra do “muito amor”.

À **Iara** não só pelas discussões científicas, mas também por todas as outras conversas... É muito bom ter você por perto e saber que posso contar com você. Muito obrigada por toda a ajuda (criativa) durante a confecção desta dissertação!

À **Emile** pelos inúmeros puxões de orelha (com carinho). Por fazer as perguntas mais difíceis na hora certa! Não poderia deixar de agradecer pelas longas conversas durante os engarrafamentos.

Ao **Kildare** que, com toda a paciência e bom-humor do mundo me ensinou a utilizar o microscópio 200Kv TECNAI. Esta microscopia irá me render bons frutos! Ao **Wendell**, sempre disposto a tirar minhas dúvidas sobre o microscópio e sobre os softwares de alinhamento.

À **Cris Motta**, pelos papos nos corredores do laboratório, seja sobre a vida científica ou sobre os grandes baratos da vida. Sempre me incentivando a dar o melhor de mim e viver o melhor da vida!

À **Técia, Márcia, Rossiane e Juliany** que sempre ajudaram a polir meus projetos, dando sugestões e fazendo perguntas do tipo “advogado do diabo”, mas que me ajudaram muito no meu progresso e sei que continuarão a ajudar. Não posso esquecer de agradecer pelas

matérias de “tirar o fôlego”, que depois do sofrimento percebemos como foram enriquecedoras.

A **Renata, Ana Paula, Karina e Flávia**, pela amizade desde a UERJ. Primeiramente a Flávia, que me escolheu como sua estagiária. Aprendi muito com ela, passei tardes inteiras contando células e contando a vida para ela! A Re, Ana e Ka pela paciência durante meus surtos de retiro durante a escritura da dissertação. Não poderia deixar de agradecer pelas terças nobres, dia necessário para a manutenção da sanidade mental ou não.... Dia esse que planejamos tudo que nunca será feito! Tenho certeza que vocês são para sempre!

À **Thais Souto-Padrón** por aceitar o convite de revisar esta dissertação e fazê-lo com tanto bom-humor!!

À **banca examinadora** oportunidade de enriquecer este trabalho e compartilhar conhecimento.

À **Carol Catta Preta, Érica, Lissa, Thiago Luiz, Gustavo, Tati, Karla, Jose e Lia** pelo companherismo, amizade e descontração!

A **Nete** que nos atura o dia inteiro com bom-humor!

Aos amigos do laboratório Hertha Meyer, pela troca de experiências e pela diversão no mêsão.

Abreviações:

4MT- Quarteto de microtúbulos

Cy- citofaringe

DAB- Diaminobenzidina

DNA- Ácido desoxirribonucleico

FAZ- Zona de adesão flagelar

FITC- Fluoresceína isotiocianato

GFP- Green fluorescent protein

HRP- Horseradish peroxidase

K-DNA- Ácido desoxirribonucleico do cinetoplasto

LDL- Lipoproteína de baixa densidade

LRO- Organelas relacionadas à reservossomos

MAP- Proteínas associadas aos microtúbulos

MARP- Proteínas repetitivas associadas aos microtúbulos

MET- Microscopia eletrônica de transmissão

M β CD- Metil beta-ciclodextrina

PFR- estrutura paraflagelar

PHEM- PIPES, HEPES, EGTA e Magnésio

RNA- Ácido ribonucléico

SPMT- microtúbulos subpeliculares

Tf-Au – transferrina conjugada a ouro

Tf-FITC- transferrina complexada à fluoresceína isotiocianato

TcHA- Próton ATPase de *T.cruzi*

SFB- soro fetal bovino

Observação morfológica da relação entre a via endocítica e o citoesqueleto de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Os tripanosomatídeos requerem nutrientes exógenos e fatores de crescimento essenciais para sua sobrevivência e divisão. Os epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* são capazes de endocitar macromoléculas através do citóstoma e da bolsa flagelar, ambos localizados na região anterior do parasita. Depois de passar pela rede túbulo-vesicular, o material endocitado é entregue aos reservossomos, organelas relacionadas a lisossomos, localizadas na região posterior. Não existem relatos sobre o papel do citoesqueleto em orientar e dar suporte aos compartimentos endocíticos nesta via longa e polarizada. No presente estudo, foi realizada uma detalhada análise ultraestrutural sobre a associação do citoesqueleto com a bolsa flagelar, citóstoma-citofaringe e reservossomos utilizando técnicas de microscopia eletrônica, *western blot*, imunofluorescência e imunocitoquímica. Em *T. brucei*, a bolsa flagelar é o único sítio de endocitose e exocitose, estando todos os compartimentos endocíticos posicionados na mesma região. Recentemente, uma nova proteína, BILBO-1, foi descrita como um componente do citoesqueleto abaixo da membrana da bolsa flagelar, que é essencial para a formação desta estrutura. Utilizamos o anticorpo policlonal anti-BILBO1 que reconheceu uma proteína de 62 kDa no extrato total de epimastigotas e por imunofluorescência marcou fortemente a bolsa flagelar destas formas. A bolsa flagelar de tripomastigotas e amastigotas não foi reconhecida. O anticorpo também reconheceu toda a extensão do flagelo de epimastigotas e tripomastigotas. Estes resultados foram confirmados por imunocitoquímica. Assim como *T. brucei*, epimastigotas de *T. cruzi* também apresentam em sua bolsa flagelar os quatro microtúbulos especializados próximos ao corpúsculo basal e material elétron-denso na região da saída do flagelo da bolsa flagelar. A análise detalhada do citóstoma mostrou filamentos elétron-densos logo abaixo da membrana que parecem sustentar a abertura desta estrutura. Observamos em muitos parasitos uma protrusão na abertura do citóstoma que apresenta glicocálice típico deste domínio de membrana e tal protrusão possui material citoplasmático. Um grupo de 7-8 microtúbulos foi observado ao longo de toda a citofaringe e parece dar suporte a esta invaginação até a sua região mais profunda. Cortes ultrafinos longitudinais e tomografia eletrônica revelaram a presença de vesículas alinhadas ao longo da citofaringe com íntima associação com a face citoplasmática da membrana.

O papel do citoesqueleto no direcionamento do material endocitado até os reservossomos também foi investigado. Foi possível visualizar vesículas contendo traçador associadas a trilhos, além de conexões entre reservossomos e microtúbulos subpeliculares. Experimentos de lise celular não romperam esta associação. Um anticorpo monoclonal (mAb 3G4) que foi produzido contra uma fração de citoesqueleto de epimastigotas surpreendentemente reconheceu somente os reservossomos. O epítipo do anticorpo foi mapeado, tal análise constatou que a β -tubulina é a proteína reconhecida. Através da imunocitoquímica, mostramos que além dos reservossomos, endossomos e vesículas próximas também são reconhecidas. Estes dados contribuem para o melhor conhecimento da organização ultraestrutural da bolsa flagelar e do complexo citóstoma-citofaringe e reforça a sugestão de que o citoesqueleto tem papel importante na via endocítica de *T. cruzi*.

Morphological observation of the relationship between the cytoskeleton and endocytic pathway in *Trypanosoma cruzi*.

Trypanosomatids require essential exogenous nutrients and growth factors in order to survive and divide. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to acquire exogenous macromolecules by endocytosis via the cytostome and the flagellar pocket, both localized at the parasite's anterior region. After passing through a branched network of tubules and vesicles, endocytic cargo reaches reservosomes that are lysosomes related organelles localized at the posterior region. There's no information about the role of the cytoskeleton in guiding and supporting endocytic compartments in this long and polarized pathway. In this study, we performed a detailed ultrastructural analysis of the association of the cytoskeleton with the flagellar pocket, cytostome and reservosomes by electron microscopy, western blotting, immunofluorescence and immuno-electron microscopy. In *T. brucei* the flagellar pocket is the unique site of endocytosis and exocytosis and all endocytic compartments are positioned at the same cell region. Recently, a new protein, BILBO1, was described as a component of the cytoskeletal framework underneath the flagellar pocket membrane that it is essential to its formation. We have used a polyclonal antibody anti-BILBO1 that recognized a protein of 62 kDa in whole epimastigote protein extracts and stained strongly the flagellar pocket of these *T. cruzi* forms. Surprisingly, trypomastigote and amastigote flagellar pockets were not recognized. The antibody also bound along all the flagellum length of both epimastigote and trypomastigote forms. These results were confirmed by immunocytochemistry. Similar to *T. brucei* trypomastigotes, *T. cruzi* epimastigote flagellar pocket also presents the four special microtubules near the basal body and an electrondense material at the site where flagellum exits the pocket. A careful examination of the cytostome showed electrondense filaments just beneath the plasma membrane of the parasite that seems to maintain cytostome aperture. In many parasites we have observed a protrusion at the aperture of the cytostome that presents the glycocalyx typical of this membrane domain and is filled with cytoplasmic material. A group of 4-5 microtubules was observed along all the cytopharynx length that seems to sustain it until the deeper portion of its invagination. Longitudinal ultrathin sections and electron tomograms revealed the presence of vesicles aligned along the cytopharynx and closely associated to its side membrane.

We investigated the cytoskeleton role in driving endocytic cargo to reservosomes. It was possible to visualize vesicles with tracer associated with rails besides connections between reservosomes and subpellicular microtubules. Cell lysis experiments did not disrupt this association. A monoclonal antibody (mAb 3G4) that had been produced against an epimastigote cytoskeleton fraction surprisingly recognized only reservosomes. Antibody characterization mapped the epitope and found that antibody 3G4 recognized a β -tubulin. Using immunoelectron microscopy, we showed here that besides reservosomes, endosomes and nearby vesicles were recognized too. Taken together, these data contributes to a better understanding of the ultrastructural organization of both flagellar pocket and cytostome-cytopharynx complex and reinforces the suggestion that the cytoskeleton plays an important role in the endocytic pathway of *T. cruzi*.

Índice

1- Introdução	1
1.1- Doença de Chagas	1
1.2- <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.3- Ciclo biológico.....	4
1.4- Citoesqueleto peculiar dos tripanosomatídeos.....	6
1.4.1- Flagelo e a estrutura paraflagelar.....	6
1.4.2- Microtúbulos subpeliculares.....	7
1.5- Bolsa flagelar de <i>T.brucei</i>	11
1.6-Portais de endocitose em <i>T.cruzi</i>	15
1.6.1- Bolsa flagelar.....	15
1.6.2- Citóstoma-citofaringe.....	19
1.7- Endocitose em <i>T. cruzi</i>	24
2- Objetivos	37
3- Material e Métodos	38
3.1- Parasitas.....	38
3.2-Ensaio de endocitose.....	38
3.2.1- Transferrina-ouro e transferrina-FITC.....	38
3.2.2- Peroxidase.....	39
3.3- Ensaio lise por congelamento.....	39
3.4- Anticorpos primários.....	39
3.5- Microscopia óptica- Imunofluorescência indireta.....	40
3.6- Imunocitoquímica.....	40
3.6.1- Em contrastação negativa.....	40
3.6.2- Em cortes ultrafinos de resinas hidrofílicas.....	41
3.6.3- Imunocitoquímica pré- embbeding do anticorpo 3G4.....	42
3.7 - Microscopia eletrônica de transmissão.....	42

3.8- Isolamento de reservossomos.....	44
3.9- Obtenção do extrato protéico e dosagem de proteína.....	44
3.10- SDS-PAGE e Western Blot.....	44
4-Resultados.....	46
4.1-Bolsa flagelar.....	46
4.1.1- Proteína Bilbo-1.....	46
4.1.2- Quatro microtúbulos da bolsa flagelar.....	54
4.2- Ultraestrutura do complexo citóstoma-citofaringe.....	57
4.4- Citoesqueleto e o material endocitado.....	71
4.5- Localização do anticorpo 3G4.....	81
5- Discussão.....	95
5.1- Bolsa flagelar.....	95
5.2- Complexo citóstoma-citofaringe.....	97
5.3- Citoesqueleto e os reservossomos.....	100
6-Resultados mais relevantes desta dissertação.....	106
7-Conclusões.....	106
8- Referências.....	107

1- Introdução

1.1- Doença de Chagas

Em 1909, ocorreu um marco na história da medicina. O pesquisador brasileiro, Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas descreveu uma doença que levou o seu nome (Doença de Chagas), o vetor, o agente etiológico, a forma de transmissão e o ciclo de vida do protozoário causador. O protozoário foi nomeado *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz.

A doença de Chagas é uma das patologias de mais larga distribuição no continente americano, 90 milhões de pessoas estão expostas à doença. Estima-se que sejam 15 milhões de pessoas infectadas (Dias, 2007). Originalmente os casos de doença de Chagas se encontravam confinados em áreas rurais da América do Norte, Central e América do Sul. Mais recentemente, o número de casos se tornou significativo nos Estados Unidos, Canadá, algumas regiões da Europa e no oeste do Pacífico devido à forte imigração dos países originalmente endêmicos para estes (Fig.: 1) (Rassi, *et al.*, 2010)

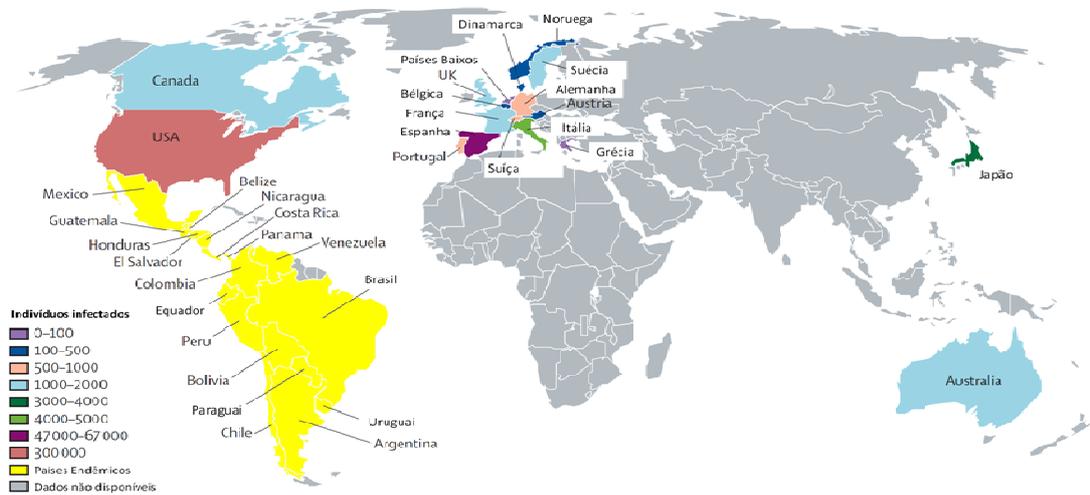


Figura 1: Epidemiologia da doença de Chagas (Adaptado de Rassi, A.J. *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que o triatomíneo, o inseto vetor do *T. cruzi*, vivia restrito às florestas silvestres, infectando mamíferos do ambiente natural. Foi o homem que invadiu este ambiente fazendo dele moradia e através do desmatamento acabou por se incluir no ciclo epidemiológico da doença de Chagas (Rassi *et al.*, 2010).

A transmissão pode ocorrer das seguintes formas: através do triatomíneo, que ao fazer o repasto sanguíneo, acaba por liberar junto com as fezes as formas infectivas do protozoário que penetram pelo ferimento da picada; por transfusão sanguínea; transplantes de órgãos; por acidentes de laboratório e mais recentemente descrito, por transmissão oral, como o caso de contaminação através do açaí e da cana-de-açúcar. (Pereira *et al.*, 2010).

1.2- *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae (Chagas, 1909). Os tripanosomatídeos são células eucariotas e como tal apresentam organelas que são típicas de organismos eucariotos como mitocôndria, peroxissomos, lisossomos e retículo endoplasmático, enquanto outras são peculiares a esta família (Fig.: 2).

A superfície de protozoários intracelulares, como o *T. cruzi*, precisa interagir inicialmente com a superfície celular do hospedeiro vertebrado. É também através da superfície celular que o protozoário interage com as células epiteliais do hospedeiro invertebrado (De Souza, 2009). Entre as diversas moléculas encontradas na superfície do *T. cruzi* estão: mucinas, transialidases e as glicoproteínas Tc85. Diversos estudos demonstraram que tais moléculas influenciam na virulência (revisito por Mendonça-Previato, *et al.*, 2005, Dias, *et al.*, 2008).

A ordem destes protozoários foi nomeada Kinetoplastida tendo em vista uma característica única dos tripanosomatídeos, a presença do cinetoplasto, constituído de DNA mitocondrial. O cinetoplasto está localizado na porção da mitocôndria mais próxima à base do flagelo. Visto por microscopia eletrônica de transmissão, apresenta material elétron-denso, que já foi descrito como um tipo diferente de DNA, o K-DNA. Outra característica importante é a mitocôndria única e ramificada, também presente nos protozoários do filo Apicomplexa.

Dois estudos relataram estruturas filamentosas conectando cinetoplasto e o corpúsculo basal do flagelo (Souto-Padron *et al.* 1984 e Ogbadoiry *et al.* 2003). Recentemente, uma proteína (p166) foi identificada e se mostrou presente entre o cinetoplasto e o flagelo.

Deste modo, é provável que esta proteína seja uma das responsáveis pela íntima ligação destas estruturas. (Zhao *et al.* 2008).

O acidocalcissomo é uma organela acídica densa e apresenta alta concentração de fósforo, na forma de pirofosfato e polifosfato complexado a cálcio e outros elementos. (Docampo *et al.* 2005).

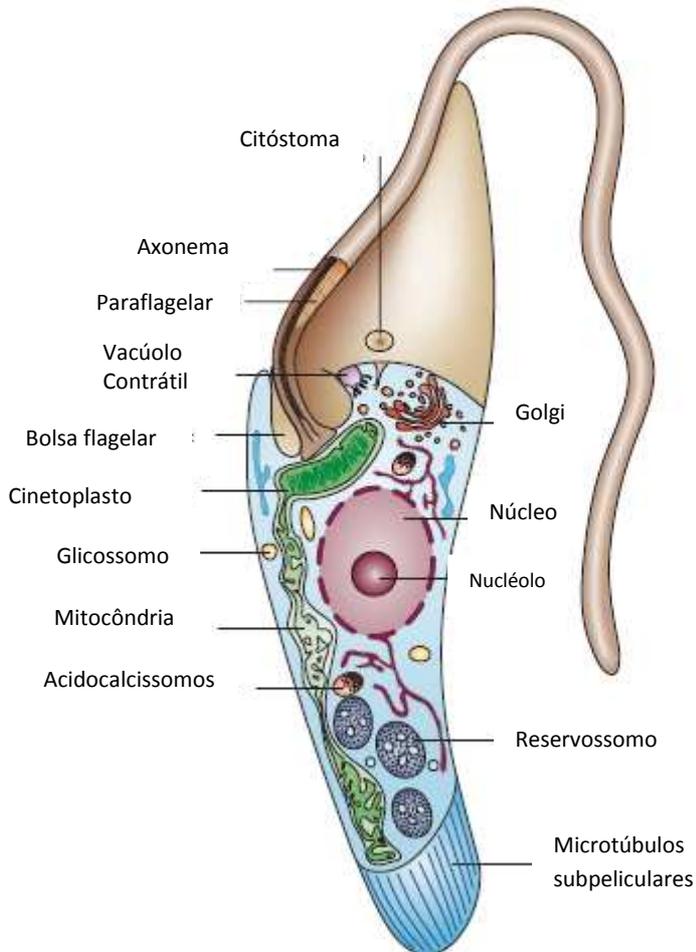


Figura 2: Esquema dos aspectos morfológicos gerais das formas epimastigotas. O esquema mostra organelas comuns aos eucariotos e outras peculiares à família dos tripanosomatídeos. (Adaptado de Docampo *et al.*, 2005).

1.3- Ciclo biológico

O *T. cruzi* é um protozoário heteroxênico, pois alterna o seu ciclo biológico entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado. A primeira caracterização morfológica

das diferentes formas de desenvolvimento de *T.cruzi* tinha como base o formato celular deste protozoário, a localização do cinetoplasto em relação ao núcleo e a região de onde o flagelo emerge da bolsa flagelar. A forma epimastigota tem formato alongado e cinetoplasto anterior ao núcleo e em forma de bastão quando observado em cortes ultrafinos. Os epimastigotas possuem capacidade replicativa e estão presentes no intestino médio do barbeiro. A forma tripomastigota apresenta corpo afilado, é a forma infectiva que se encontra nas fezes do barbeiro e na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado. Esta célula possui flagelo que emerge da bolsa flagelar pela lateral do corpo celular e tem extensa porção aderida ao corpo pela FAZ (“*flagellar attachment zone*”, zona de adesão flagelo corpo). O cinetoplasto do tripomastigota possui forma arredondada. É importante ressaltar que os tripomastigotas não são capazes de se dividir. A forma amastigota é ovalada, possui um flagelo muito curto, que não emerge da bolsa flagelar, por isso o nome “a- mastigota” que significa sem flagelo. No entanto, após observações de cortes ultrafinos, foi demonstrado que o amastigota possui flagelo bem curto.

O ciclo biológico pode ser acompanhado a partir do momento que o inseto vetor e hospedeiro invertebrado, conhecido por barbeiro, realiza o repasto sanguíneo e ingere tripomastigotas presentes no sangue do hospedeiro vertebrado infectado. No lúmen do aparelho digestivo do barbeiro, os tripomastigotas sanguíneos diferenciam-se em epimastigotas que se multiplicam por fissão binária média do trato digestivo do barbeiro migrando posteriormente para a porção final onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Durante um novo repasto sanguíneo, o barbeiro elimina os tripomastigotas metacíclicos junto às fezes. Estes tripomastigotas chegam ao ambiente intercelular, estando aptos a infectar uma variada gama de tipos celulares nucleados. Uma vez dentro da célula, se diferenciam em amastigotas, os responsáveis pela multiplicação do parasito no hospedeiro vertebrado. Os amastigotas escapam do vacúolo parasitóforo e dividem-se inúmeras vezes e rediferenciam-se em tripomastigotas, devido ao dano, a lise da célula ocorre e isso possibilita que os tripomastigotas cheguem novamente no espaço intercelular, podendo infectar novas células ou, ainda, alcançar a corrente sanguínea e serem ingeridos pelo hospedeiro invertebrado durante um novo repasto sanguíneo (Tyler & Engman,2001)(Fig.:3)

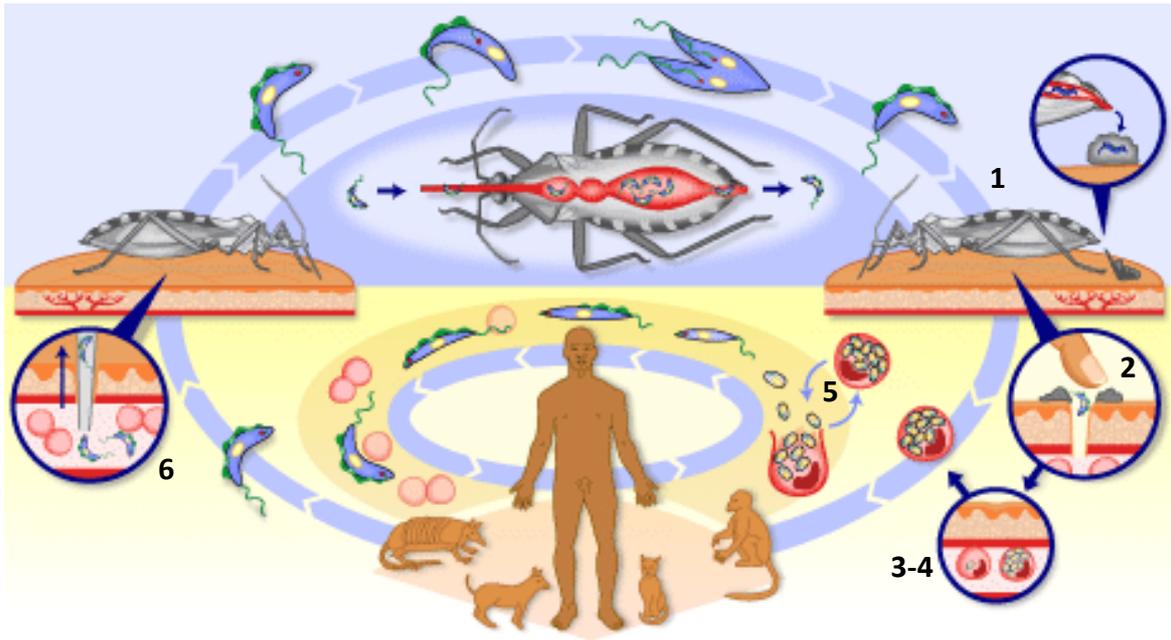


Figura 3: Ciclo biológico do *T. cruzi*. **1-** Ao realizar o repasto sanguíneo, o inseto vetor libera as fezes que contêm as formas tripomastigotas de *T. cruzi*. **2-** O ato de coçar a picada, possibilita que o protozoário entre em contato com as células do hospedeiro, estando apto a infectá-las. **3 e 4-** No interior celular, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas. Estes sofrem diversas divisões, se rediferenciam em tripomastigotas e rompem a célula hospedeira, ganhando a corrente sanguínea. Estes tripomastigotas são capazes de infectar outras células (**5**) ou serem captados durante novo repasto sanguíneo (**6**). (Fonte: WHO TDR Wellcome Trust <http://apps.who.int/tdr/svc/diseases/chagas> acessado em 1 de setembro de 2010.

1.4- Citoesqueleto peculiar dos tripanosomatídeos

1.4.1- Flagelo e a estrutura paraflagelar

Uma estrutura importante nos tripanosomatídeos é o flagelo, único, que emerge do corpo a partir de uma invaginação da membrana plasmática denominada bolsa flagelar (Revisto por Webster & Russell, 1993). A bolsa flagelar é um sítio de endocitose e

exocitose e será discutida com mais detalhes posteriormente. A extremidade da célula a partir da qual o flagelo torna-se livre do corpo é considerada a extremidade anterior. O axonema do flagelo é formado por nove pares de microtúbulos periféricos (dubletes) e um par central (singletes), caracterizando o arranjo 9+2. Os flagelos surgem nos corpúsculos basais, que se constituem de cilindros de nove triplete de microtúbulos presentes no citoplasma da célula com a função de direcionar a polimerização de tubulina, que é a unidade básica formadora de microtúbulos. Ao lado do axonema há uma estrutura em forma de treliça que tem sido chamada de estrutura paraflagelar (PFR), também referida como paraxial ou paraxonemal (Vickerman, 1962 e Farina *et al.*, 1986). A PFR é uma estrutura presente em Euglenóides e Cinetoplastídeos (Ordem Kinetoplastida, famílias Trypanosomatidae e Bodonidae), exceto naqueles que possuem bactéria endossimbionte (Freytmüller & Camargo, 1981). A estrutura paraflagelar é um arranjo elegante de filamentos do citoesqueleto composto de duas proteínas majoritárias, PFR1 e PFR2, e várias minoritárias as quais estão distribuídas ao longo de três porções da paraflagelar: a proximal e a distal são compostas de densas placas de filamentos de 7 nm e por filamentos duplos de 25 nm; a porção intermediária é composta por filamentos de 5 nm que ligam a porção proximal à distal (Farina *et al.*, 1986). A PFR é necessária para plena mobilidade em cinetoplastídeos (Bastin *et al.*, 1998) e serve de suporte para reguladores metabólicos mediados por cálcio que podem influenciar o batimento flagelar (D'Angelo *et al.*, 2002). A PFR tem relevância imunológica, já que suas proteínas são reconhecidas por soro chagásico (Piras *et al.*, 1981) e tanto as proteínas PFR nativas (Wrightsmann *et al.*, 1995) como as recombinantes (Luhers *et al.*, 2003) protegem contra desafio posterior com tripomastigotas infectivos.

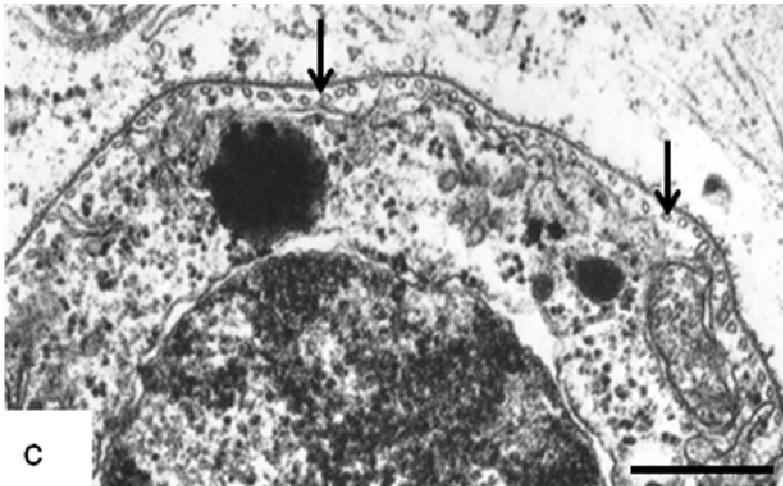
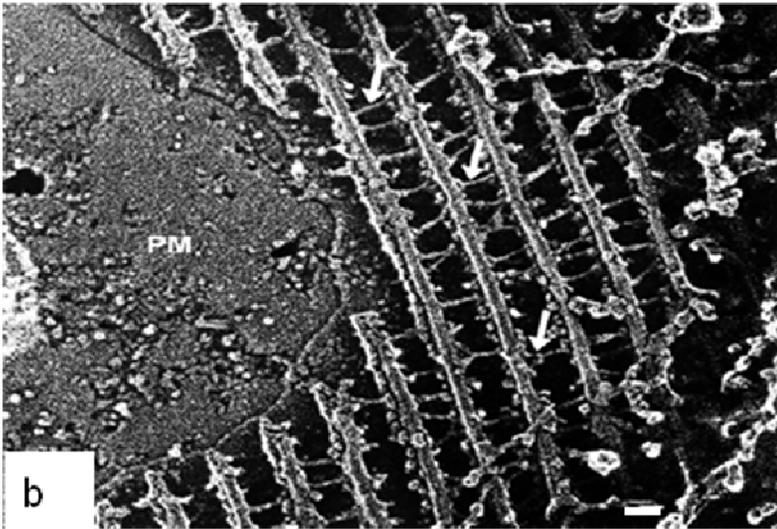
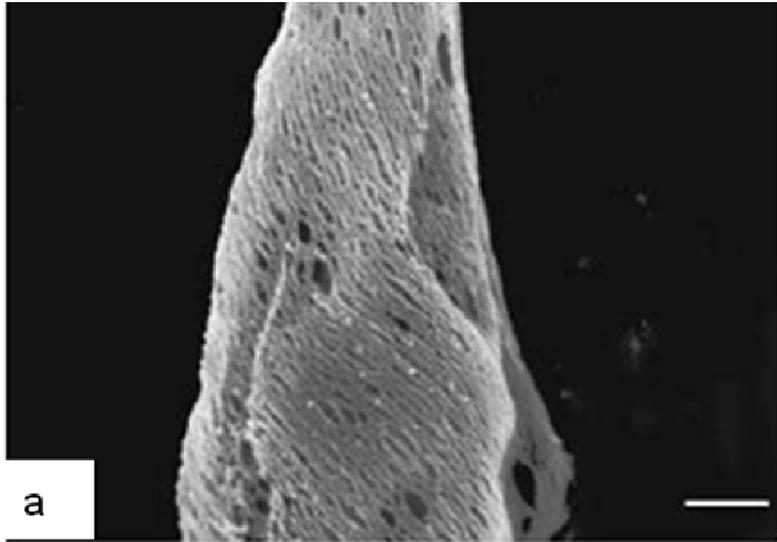
1.4.2- Microtúbulos subpeliculares

Na maioria das células eucarióticas é bem estabelecido que microtúbulos e microfilamentos possuem uma associação à membrana plasmática, no entanto, em nenhum outro tipo celular tal associação é tão forte quanto nos apicomplexa e tripanosomatídeos. O formato celular dos tripanosomatídeos é mantido por microtúbulos de 24nm de diâmetro que formam um arranjo helicoidal ao longo de toda a célula (Fig. 4a), que são ligados uns aos outros com espaço intermicrotúbulos regulares de 18-22 nm e também à membrana plasmática, por isso, receberam o nome de microtúbulos

subpeliculares (SPMT). Estruturas filamentosas conectam microtúbulos subpeliculares entre si (Fig. 4b) e com a membrana plasmática, formando uma verdadeira rede cortical (Meyer & De Souza, 1976; Souto-Pádrón *et al.*, 1984). Esta ligação entre os microtúbulos é tão forte que estes componentes continuam unidos após lise da célula e isolamento da fração enriquecida em membrana (revisto de De Souza, 2002). Na verdade, considera-se que a membrana plasmática e os microtúbulos subpeliculares formem uma unidade estrutural e funcional, o periplasto (Vickerman, 1962). Responsável pela manutenção do formato característico da célula (Fig. 4c) e por todas as atividades que competem à interface entre o protozoário e o meio externo (Hemphill *et al.*, 1991a). Esta rede cortical de microtúbulos reforça internamente toda a superfície celular exceto na região da bolsa flagelar (De Souza, 1984).

A organização aparentemente simples da rede de microtúbulos subpeliculares dos tripanosomatídeos contrasta com a complexa rede de microtúbulos citoplasmáticos de células de organismos superiores. De fato, as propriedades dos subpeliculares são diferentes daquelas observadas em mamíferos. Os microtúbulos subpeliculares são resistentes a baixas temperaturas e não sofrem despolimerização expressiva quando tratados com potentes desestabilizadores de microtúbulos de mamíferos, apesar de não serem insensíveis a estas drogas (Ono & Nakabayashi, 1979; Baum *et al.*, 1981; Ürményi *et al.*, 1992; Souto-Padrón *et al.*, 1993; Grellier *et al.*, 1999). A estabilidade desta rede cortical permite que após extração da membrana com detergentes não-iônicos, o citoesqueleto dos tripanosomatídeos seja recuperado intacto, mantendo inclusive o formato.

Figura 4: Microtúbulos subpeliculares dos tripanosomatídeos. a) Microscopia eletrônica de varredura de alta resolução de *Herpetomonas megaseliae* extraída com detergente. Podemos observar que os microtúbulos subpeliculares são os responsáveis por manter o formato característico dos tripanosomatídeos. (Barra: 3,5 μm). Sant'Anna *et al.*, 2005). **b)** *Deep-etching* de epimastigota de *T. cruzi* revelando estruturas ligando microtúbulos adjacentes. Barra: 100 nm (Souto-Padron *et al.* 1984). **c)** Microscopia eletrônica de transmissão de corte ultrafino de epimastigota de *T. cruzi*. Note que o corte transversal possibilita a visualização de cada microtúbulo que compõe os subpeliculares (Meyer & De Souza, 1976). Barra: 1 μm .



A composição dos microtúbulos subpeliculares com diferentes isoformas de tubulina reflete as peculiaridades deste citoesqueleto cortical. Nos tripanosomatídeos examinados até o momento, foi mostrado que os microtúbulos subpeliculares contêm grande quantidade da isoforma acetilada de α -tubulina, que foi denominada de $\alpha 3$ (Souto-Padrón *et al.*, 1993) e também α -tubulina tirosinada (Sherwin & Gull, 1989). Alguns estudos mostraram que o pólo posterior da célula é uma região de intensa adição de monômeros de tubulina, o que é condizente com o fato de estarem nele localizadas as pontas positivas dos microtúbulos (Sherwin & Gull, 1989; Robinson *et al.*, 1995). Neste contexto, vale mencionar que os tripanosomatídeos possuem β -tubulina em seu pólo anterior, onde se encontram as pontas negativas dos microtúbulos subpeliculares (Scott *et al.*, 1997).

As pontes que conectam os microtúbulos subpeliculares entre si e com a membrana plasmática assemelham-se ultraestruturalmente às MAPs (*microtubule associated proteins*) de organismos superiores, cuja função é predominantemente estrutural (Souto-Padrón *et al.*, 1984). Estas proteínas apresentam alta massa molecular e apresentam seqüências de aminoácidos repetidas em seus domínios de ligação a microtúbulos, tendo recebido a denominação de MARPs (*microtubule associated repetitive proteins*). As MARPs de *Trypanosoma brucei* estão localizadas na região dos microtúbulos subpeliculares que fica voltada para a membrana plasmática (Hemphill *et al.*, 1991b), o que indica a sua provável participação na ligação dos microtúbulos à membrana plasmática.

1.5- Bolsa flagelar de *T.brucei*

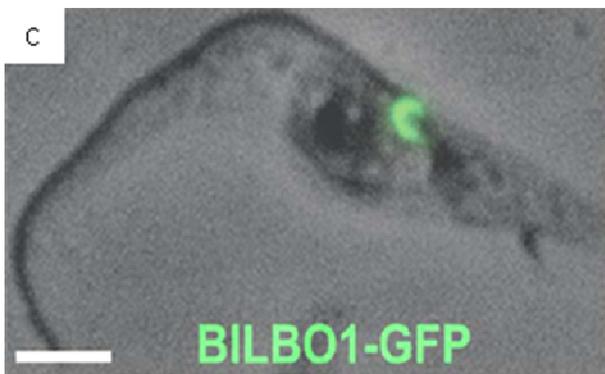
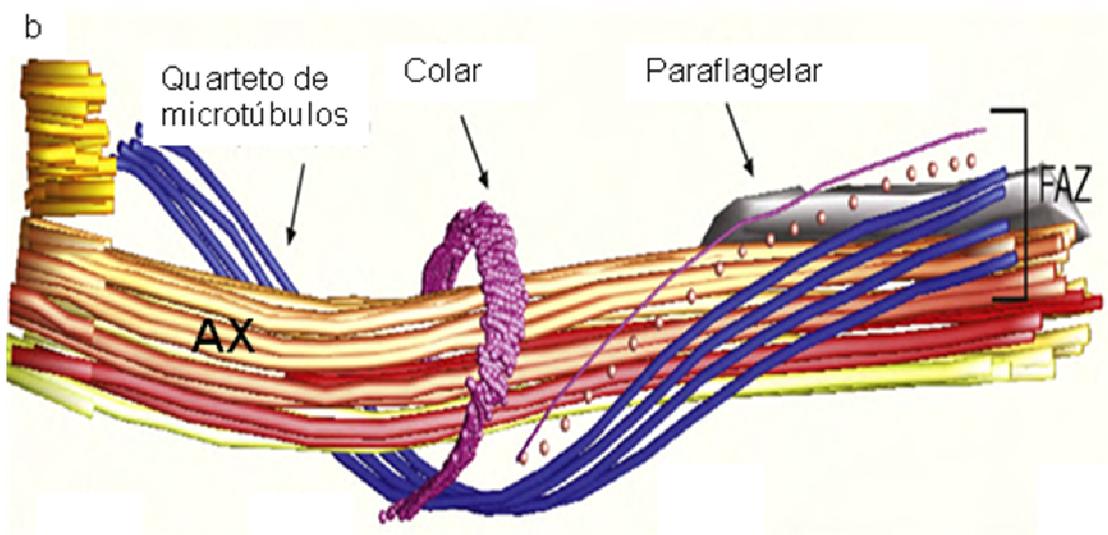
A bolsa flagelar é formada por uma invaginação do corpo do parasita. Apesar de sua membrana ser contínua à do corpo celular, apresenta características distintas, constituindo assim um dos diferentes domínios da membrana plasmática dos tripanosomatídeos. Duas barreiras definem a bolsa flagelar e permitem a diferença de composição desta estrutura. Ao redor da zona de transição do corpúsculo basal existe uma divisa que define a zona de entrada do axonema na bolsa flagelar. No ponto em que o flagelo sai da bolsa flagelar existe uma íntima ligação entre a membrana deste e a membrana da bolsa flagelar, denominada colar (Fig: 5a-c). Recentemente um estudo

muito interessante identificou a proteína BILBO1, que foi localizada através da técnica de fusão com GFP, no colar da bolsa flagelar (Fig: 5b); a imunocitoquímica confirmou este dado (Fig: 5c). Experimentos de RNA de interferência revelaram que esta proteína é crucial na biogênese da bolsa durante a divisão e deste modo, essencial para que a atividade endocítica e exocítica de *T.brucei* ocorra (Bonhivers *et al.*,2008). O gene da proteína BILBO1 foi identificado e pesquisas em bancos genômicos revelaram que ele possui ortólogos em outros protozoários, dentre eles *T.cruzi* e *L.major*. Porém, a presença de ortólogos representa somente a possibilidade da proteína também ser expressa nestes protozoários, deste modo se faz necessário um estudo que revele se tal proteína é realmente expressa e sua localização.

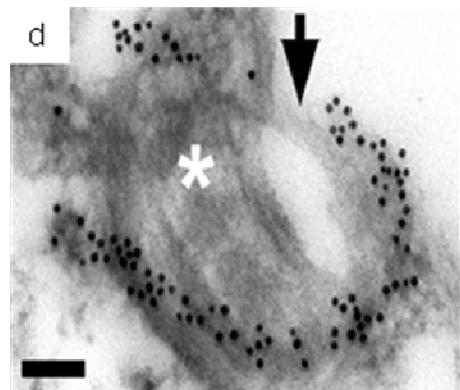
Figura 5: A bolsa flagelar de *T.brucei*. e a localização da proteína BILBO1. **a)** Microscopia eletrônica de transmissão. A cabeça de seta indica a zona de transição do axonema e a seta grande o colar da bolsa flagelar. A seta indica a região do colar. (Landfear *et al.*,2001) Barra:100nm. **b)** Bolsa flagelar de *T.brucei* através de tomografia eletrônica. A reconstrução mostra axonema (Ax) acompanhado pelo quarteto de microtúbulos. O sítio de constrição do flagelo na saída da bolsa flagelar, chamado de colar. Note que após a saída do flagelo da bolsa flagelar e estrutura paraflagelar surge, assim como a zona de adesão flagelar (FAZ) (Lacomble *et al.*,2009) **c)** Sobreposição do contraste de fase e da fluorescência mostrando a localização da proteína Bilbo-1 acoplada à GFP. Barra: 2,5 μ m **d)** Imunocitoquímica revelando a localização da proteína no colar da bolsa flagelar (Seta). Asterisco: axonema. Barra:100nm. (Bonhivers,*et al.*, 2008)



a



c



d

1.6- Portais de endocitose em *T.cruzi*

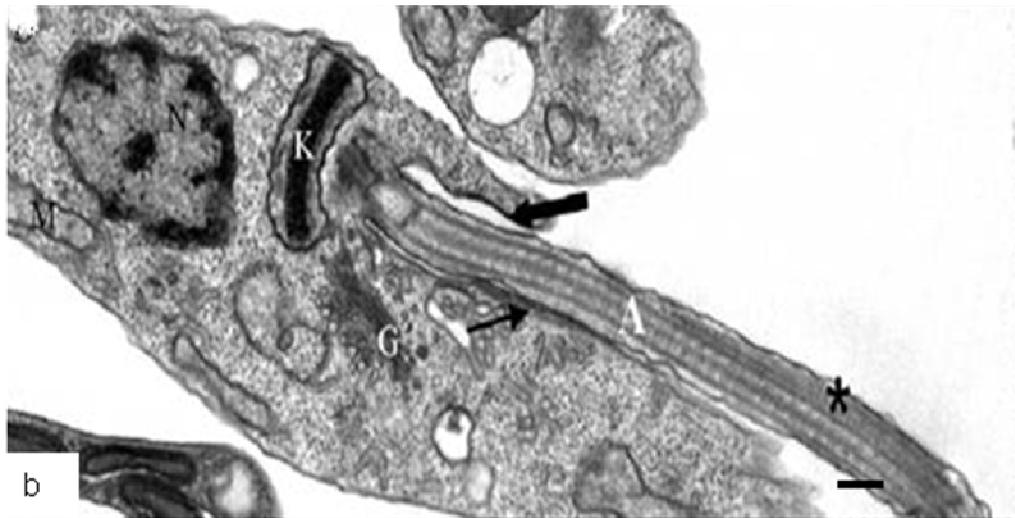
A maioria dos tripanosomatídeos possui um único sítio de entrada de nutrientes, a bolsa flagelar. Porém, os parasitas do grupo estercorária, como o *T. cruzi*, possuem duas regiões especializadas na ingestão dos nutrientes: a bolsa flagelar e o complexo citóstoma-citofaringe. É importante ressaltar que o processo endocítico do *T.cruzi* é altamente polarizado. O material é endocitado na região anterior do parasita e precisa ser transportado através de endossomos até as organelas finais da via endocítica, os reservossomos que estão localizados na região posterior do corpo celular.

1.6.1- Bolsa flagelar

A membrana da bolsa flagelar é uma região especializada da membrana plasmática, pois apresenta elementos que a diferenciam tanto da membrana do corpo celular quanto da membrana do flagelo (De Souza, 2002). Estudos morfológicos e citoquímicos mostraram que a junção entre a membrana flagelar e a membrana do corpo na saída da bolsa flagelar se parece com a junção do tipo hemi-desmossomo, uma vez que tal junção agrega partículas intramembranares, como foi visto por réplicas de criofratura (Souto-Padron e De Souza, 1979). Os microtúbulos subpeliculares estão ausentes nesta área (Landfear & Ignatushchenk, 2001), característica esta que permite que esta estrutura seja um sítio de endocitose e exocitose. Porém, em *T.brucei* quatro microtúbulos especializados foram identificados 4MT (*subflagellar quartet*) e estão associados à membrana da bolsa flagelar. Tais microtúbulos se originam próximo ao corpúsculo basal e correm por toda a bolsa flagelar e se inserem entre os microtúbulos subpeliculares (Gadelha *et al.*, 2009).

A invaginação que constitui a bolsa flagelar define um pequeno ambiente celular voltado para o meio extracelular (Fig.: 6a). No ponto onde o flagelo emerge da bolsa flagelar, a assemelha às junções do tipo hemi-desmossomo. Esta junção daria origem a um ambiente relativamente fechado e limitaria o acesso de moléculas ao lúmen da bolsa flagelar (Fig.: 6b).

Figura 6: Bolsa flagelar do *T.cruzi*. a) Micrografia eletrônica de transmissão mostrando a invaginação da bolsa flagelar. Na imagem também é possível observar o flagelo emergindo e o colar ciliar (seta branca) (De Souza *et al.*, 1978) **b)** A imagem revela a íntima ligação entre a membrana da bolsa flagelar e o flagelo (seta grossa), assim como a zona da adesão flagelar (FAZ) (seta fina). Asterisco: axonema. (Rocha *et al.*, 2010). Barras: 100 nm. BF- bolsa flagelar, A-axonema, G- Golgi, K-cinetoplasto, N-núcleo, M- mitocôndria.



1.6.2- Citóstoma-citofaringe

Somente os membros do subgênero *Schizotrypanum* da família Trypanosomatidae apresentam citóstoma, o restante só possui a bolsa flagelar como sítio para endocitose. A presença exclusiva do citóstoma-citofaringe nestes protozoários é um fato relevante e pode ser considerado um alvo potencial para quimioterapia, por estar ausente em outros eucariotos. O complexo citóstoma-citofaringe é encontrado nas formas epimastigotas e amastigotas do *T. cruzi*. Como mencionado anteriormente, nesta última forma evolutiva nenhuma atividade endocítica foi demonstrada até então. A atividade endocítica de amastigotas é raramente observada. Utilizando melanócitos infectados com amastigotas, observou grânulos de pigmentos sendo endocitados através do citóstoma. (Meyer & De Souza, 1973)

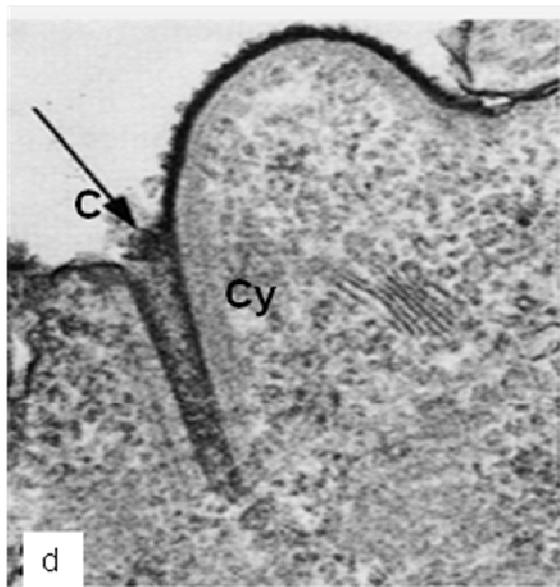
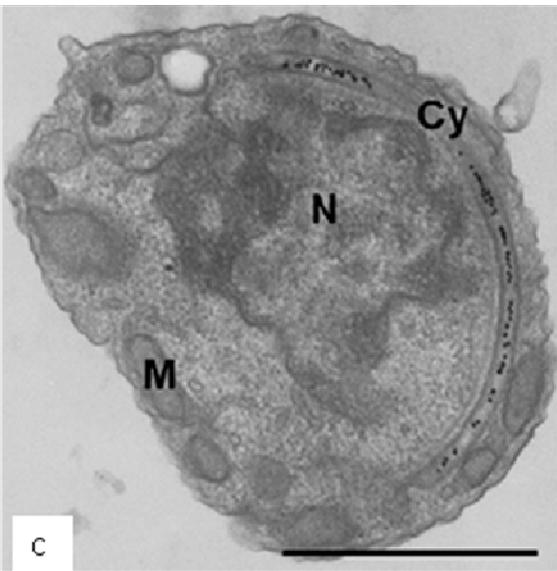
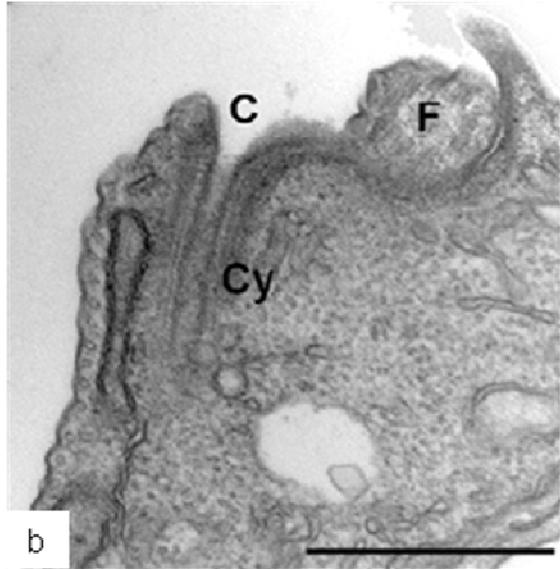
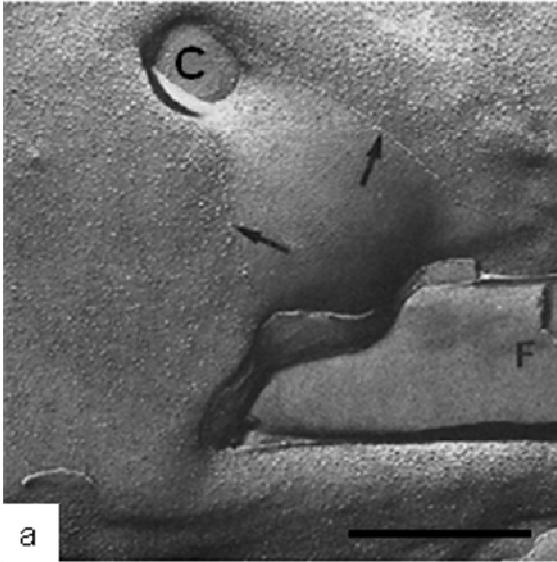
Por microscopia eletrônica de transmissão (MET) foi demonstrado que o complexo citóstoma-citofaringe é uma invaginação de membrana (Fig.: 7a), que possui morfologia em formato de funil (Fig.: 7b), no qual a abertura está localizada na superfície do parasita (citóstoma) e uma invaginação de membrana se aprofunda no interior do corpo celular alcançando a região perinuclear (citofaringe) (Fig.:7c). Esta invaginação é sempre acompanhada por um conjunto de microtúbulos e vesículas, de função ainda não determinada (Milder & Deane, 1969).

A morfologia do citóstoma de formas epimastigotas do *T. cruzi* foi obtida por análises de cortes ultrafinos de parasitos, incubados com vermelho de rutênio e através da criofatura realizados por Martínez-Palomo e colaboradores em 1976. Estes estudos demonstraram que a região da membrana do corpo do parasito localizada próximo à saída da bolsa flagelar possui com revestimento ou glicocálice mais espesso, cerca de 22nm de espessura, do que outras áreas de membrana. A marcação com vermelho de rutênio (Fig.:7d) indicou alta concentração de mucopolissacarídeos ácidos e que ligam especificamente a lectina Concanavalina A detectando desta forma uma grande quantidade de resíduos de manose e glicose. Outros estudos mostraram que receptores endocíticos também estão presentes neste domínio de membrana (Soares & De Souza, 1991; Porto-Carreiro, *et al.*, 2000; Vataru-Nakamura *et al.*, 2005).

Duas metodologias distintas de microscopia eletrônica foram utilizadas para determinar o diâmetro médio da abertura do citóstoma. Através da técnica de criofratura, Martinez-Palomo e colaboradores (1976), determinaram que o citóstoma apresenta o diâmetro de 130nm. No entanto, VataruNakamura e colaboradores (2005) utilizando a microscopia de varredura de alta resolução, onde as células são fixadas quimicamente, desidratadas e secas por ponto crítico, mostraram que o citóstoma possui 90 nm de diâmetro. Estes resultados sugerem que a diferença no diâmetro está relacionada ao tipo de metodologia aplicada para a determinação desta medida. No entanto, é possível que os dois grupos tenham analisado parasitos em diferentes condições fisiológicas que levem à variação do diâmetro de abertura do citóstoma.

Experimentos onde formas epimastigotas foram incubadas na presença de laranja de acridina, resultaram na observação de acúmulo deste corante na citofaringe, sugerindo um possível caráter ácido desta organela (Porto-Carreiro *et al.*, 2000). Foi demonstrada a presença de uma próton ATPase do tipo P na citofaringe de epimastigotas (Vieira *et al.*, 2005), reforçando ainda mais um possível caráter ácido desta estrutura. Utilizando as técnicas de contrastação negativa (Okuda *et al.*, 1999) e rotina em cortes ultrafinos em microscopia eletrônica de transmissão (Porto-Carreiro *et al.*, 2000) foi mostrado que a membrana que reveste a região do citóstoma é contínua com a membrana da bolsa flagelar (Fig.:7b). O complexo citóstoma-citofaringe está exclusivamente relacionado ao processo de captação de nutrientes presentes no meio externo sendo este complexo o sítio majoritário de ingestão de nutrientes (Porto Carreiro *et al*, 2000) e nenhuma atividade exocítica tem sido atribuída a esta estrutura.

Figura 7: Morfologia de complexo citóstoma-citofaringe. a) Microscopia eletrônica de transmissão da criofratura de epimastigota de *T.cruzi* revela a abertura do citóstoma. Setas: Partículas intramembranaras delimitam este domínio de membrana. CB- Corpo celular. Barras: 0.5 μm . (De Souza *et al.*, 1978) **b)** Por microscopia eletrônica de transmissão de corte ultrafino, o complexo formado por citóstoma (C) e citofaringe (Cy) apresenta formato de funil. F- flagelo (Cunha e Silva, *et al.*, 2010). **c)** Por ser uma longa invaginação pode ser vista em diferentes planos de cortes, esta micrografia mostra transferrina complexada a ouro sendo endocitada.. Barras: 0.5 μm . **d)** Através da técnica de vermelho de rutênio podemos observar o rico glicocálice na superfície e invaginação desta estrutura. Seta: material elétron-denso na abertura do citóstoma (De Souza *et al.*, 1975). C- citóstoma, Cy-citofaringe, F- flagelo, N- núcleo, M-mitocôndria.



A participação da actina em endocitose de células de mamíferos já está bem estabelecida. O primeiro indicativo de participação da actina na endocitose em epimastigotas do *T. cruzi* foi resultado de estudos realizados por Bogitsh e colaboradores (1995), onde, após tratamento dos parasitos com citocalasina B, foi observada a inibição de cerca de 40% da endocitose de HRP (Horse Radish Peroxidase). Corrêa e colaboradores (2008) demonstraram que a endocitose é parcialmente ou totalmente abolida após tratamento de epimastigotas com MBCD (metil beta ciclodextrina), agente que solubiliza colesterol; filipina, droga que desfaz acúmulos de esteróis e citocalasina B. Tais dados destacam a importância das *lipid rafts* e actina na endocitose de *T. cruzi*.

A busca pela detecção e localização de actina em tripanosomatídeos tem sido amplamente realizada. Estudos utilizando *Leishmania donovani*, demonstraram que a actina presente nestes protozoários está localizada em pequenos *patches* no corpo celular (Sahasrabudde *et al.*, 2004), completamente diferente do padrão observado em eucariotos superiores e não são reconhecidos por anticorpos produzidos contra seus ortólogos.

A pesquisa em banco genômico com o objetivo de procurar proteínas ligadoras de actina revelou que, quando comparados com eucariotos superiores, os tripanosomatídeos possuem poucas proteínas ligadoras de actina, mas estas são suficientes para a polimerização e despolimerização de microfilamentos. Tais proteínas são totalmente ou parcialmente conservadas (De Mello, *et al.* 2008). Ao buscar no BLAST proteínas relacionadas à indução de polimerização, o complexo Arp2/3 foi encontrado. Utilizando anticorpo monoclonal específico para TcActina, a localização da actina foi revelada e se mostrou em forma de *patches* dispersos no citoplasma, como visto em *L. donovani*, *T. brucei* e *S. cerevisiae*. A comparação do genoma do *T. cruzi* com o dos outros tripanosomatídeos revelou semelhanças e diferenças nos genes que codificam proteínas relacionadas à actina. A presença da miosina I é comum entre eles e outros eucariotos. Surpreendentemente o estudo comparativo apontou a presença de genes em *T. cruzi* que codificam algumas miosinas exclusivas desta espécie. Os próprios autores sugeriram ser provável que esta diferença esteja associada ao complexo citóstoma-citofaringe (El-Sayed, *et al.*, 2005b), já que o *T. cruzi* é o único dos tripanosomatídeos comparados que

possui esta estrutura. Este dado pode ser um indício de que a actina esteja relacionada com a capacidade do citóstoma de acomodar partículas maiores que seu próprio diâmetro (Jeovanio-Silva, 2006). Tais constatações são corroboradas pelos trabalhos que demonstraram que drogas que afetam microfilamentos diminuem drasticamente a endocitose. Os resultados obtidos (Bogish *et al.*, 1995, Porto-Carreiro *et al.*, 2004, Corrêa, *et al.*, 2008), demonstraram que o traçador de endocitose ficava retido na entrada do citóstoma. Estes dados são fortes indícios da presença e importância da actina para a endocitose destes protozoários.

1.7- Endocitose em *T. cruzi*

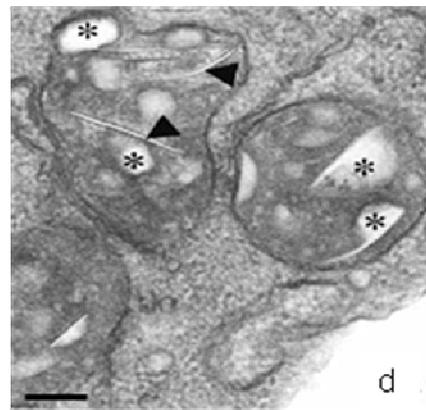
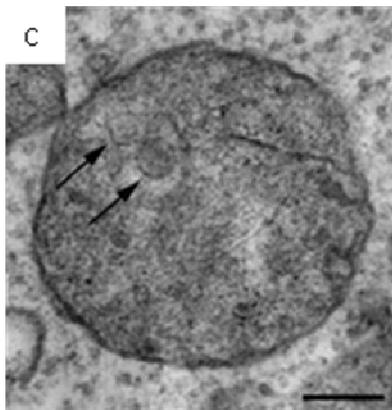
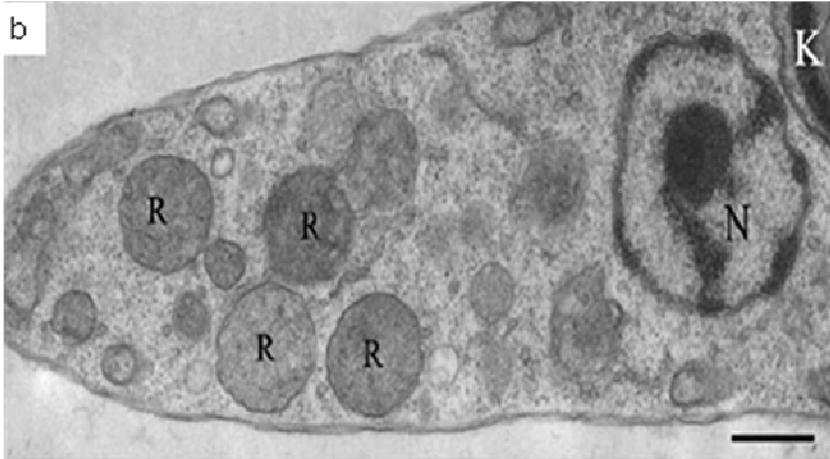
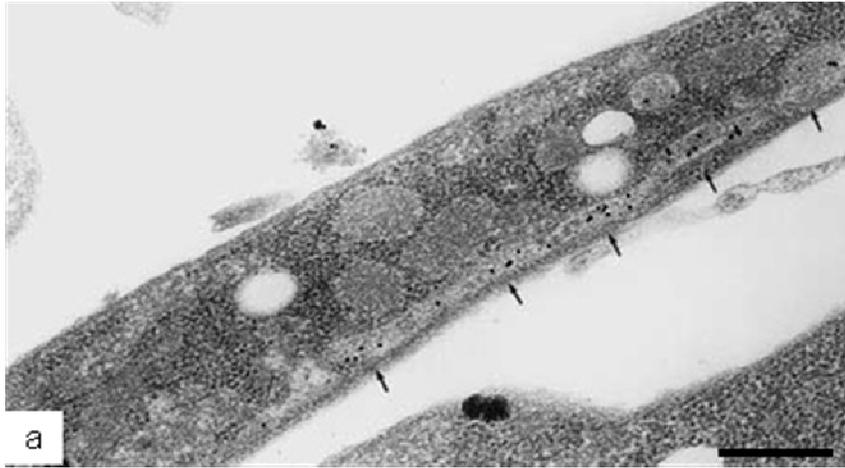
Um aspecto importante para o entendimento da biologia celular do *T. cruzi* é o estudo da obtenção de nutrientes por estas células, pois tal processo constitui um dos principais desafios encontrados por este parasita durante seu complexo ciclo vida, além de ser necessário à sua diferenciação e desenvolvimento. Tem sido demonstrado que o processo endocítico no *T. cruzi* está exclusivamente relacionado às formas epimastigotas, sendo ausentes nas formas tripomastigotas e amastigotas (Soares *et al.*, 1989; De Souza, *et al.*, 2009).

Os primeiros estudos sobre a via endocítica do *T. cruzi* usaram HRP como traçador (De Souza *et al.* 1978). Grande parte dos estudos que caracterizaram a via endocítica de *T. cruzi* baseou-se no artigo (Soares & De Souza, 1991) que demonstrou que macromoléculas como transferrina, albumina e LDL conjugadas a ouro podiam ser utilizadas como traçadores da via endocítica e que se acumulavam nos reservossomos. Soares e colaboradores (1991) demonstraram que os mesmos compartimentos que eram positivos para cruzipaina possuíam também traçadores de endocitose. Este mesmo estudo demonstrou, através de imunocitoquímica, que estes compartimentos tem pH 6, não possuem fosfatase ácida, por isso seriam compartimentos pré-lisossomais. Anos depois, Vieira e colaboradores (2005) descreveram as ATPases do tipo P como as responsáveis pelo pH ácido dos reservossomos. A partir de então, vários estudos foram feitos; dentre eles, um que demonstrou que vesículas que brotam da bolsa flagelar e do complexo citóstoma-citofaringe fundem-se com o primeiro compartimento da via

endocítica das formas epimastigotas, a rede túbulo-vesicular que se estende da região perinuclear até a parte posterior do protozoário (Porto-Carreiro *et al.* 2000) (Fig:8a). Por possuírem caráter ácido, foram caracterizadas como endossomos iniciais das formas epimastigotas. Ainda não foi descrito nenhum marcador molecular para esta organela. Uma proteína candidata é a TcRab5, homóloga à GTPase marcadora de endossomos iniciais em células de mamífero, cujo gene foi clonado e seqüenciado e a expressão desta foi encontrada nas três formas evolutivas do *T. cruzi* (Araripe *et al.*, 2005), mas a localização ainda não foi determinada.

No final do processo endocítico, as vesículas que brotam dos endossomos fundem-se com as organelas finais da via endocítica de epimastigotas, os reservossomos (Porto-Carreiro *et al.*, 2000), que são localizados na região posterior do corpo celular (Fig.: 8b). As análises de cortes ultrafinos de epimastigotas e de reservossomos isolados demonstraram a presença de perfis laminares de membranas internas dispersos pelo lúmen dos reservossomos. Estes perfis de membranas internas possuem a estrutura similar à das membranas que circundam a organela. Também, no lúmen de alguns reservossomos foram observadas vesículas internas envoltas por unidade de membrana (Fig.: 8c) e grandes bastões elétron-lucentes (Fig.: 8d).

Figura 8: Organelas da via endocítica. a) Rede de endossomas leva material endocitado da região anterior até a região posterior do protozoário Barra: 0,5 μm .(Porto-Carreiro, *et al.*,2000). **b)** Na região posterior, estão localizados os reservossomos últimas organelas da via endocítica (Sant'Anna, *et al.*, 2008b). Barra: 0,5 μm . **c)** Os reservossomos podem apresentar vesículas internas e **d)** membranas planares (cabeças de seta) e inclusões lipídicas (asteriscos). (Cunha e Silva, *et al.*, 2006). Barras: 0,5 μm .



Nos reservossomos é acumulada a cruzipaína, uma cisteína protease, a hidrolase lisossomal de maior atividade proteolítica no *T. cruzi* (Souto-Padrón *et al.*, 1990; Soares *et al.*, 1992; Engel *et al.*, 1998; 2000). A cisteína protease do *T. cruzi* não apresenta resíduos de manose 6-fosfato (Cazzulo *et al.*, 1990), que destina algumas enzimas provenientes do complexo de Golgi para os endossomos tardios de células de mamífero. Engel e colaboradores (1999) demonstraram que a região pro da enzima é responsável pelo seu endereçamento para os reservossomos. A presença de chagasina, um inibidor natural da cruzipaína, foi demonstrada e se encontra acumulada nos reservossomos, possivelmente fazendo a modulação da atividade da cruzipaína (Santos *et al.*, 2005). Além disso, foi descrita a glicoproteína serino carboxipeptidase, uma hidrolase lisossomal que pertence ao grupo C das serino carboxipeptidases, dentro da família da serino peptidase S10, também localizada nos reservossomos (Parussini *et al.*, 2003, Sant'Anna *et al.* 2008b). Portanto, os reservossomos, assim como os lisossomos em células de mamíferos, são um sítio de acúmulo e atividade de hidrolases lisossomais.

Estudos estereológicos sugeriram que estas organelas estocam nutrientes (proteínas e lipídeos) (Soares & De Souza, 1988) que serão degradados durante a metaciclógênese (Soares *et al.*, 1989), processo pelo qual os epimastigotas, replicativos e não infectivos diferenciam-se em tripomastigotas infectivos e que não possuem capacidade de replicação (Figueiredo *et al.* 1994).

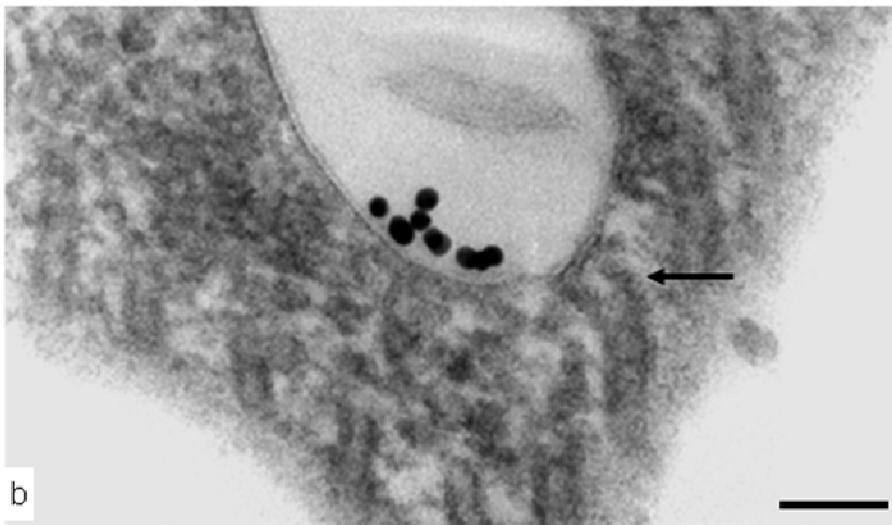
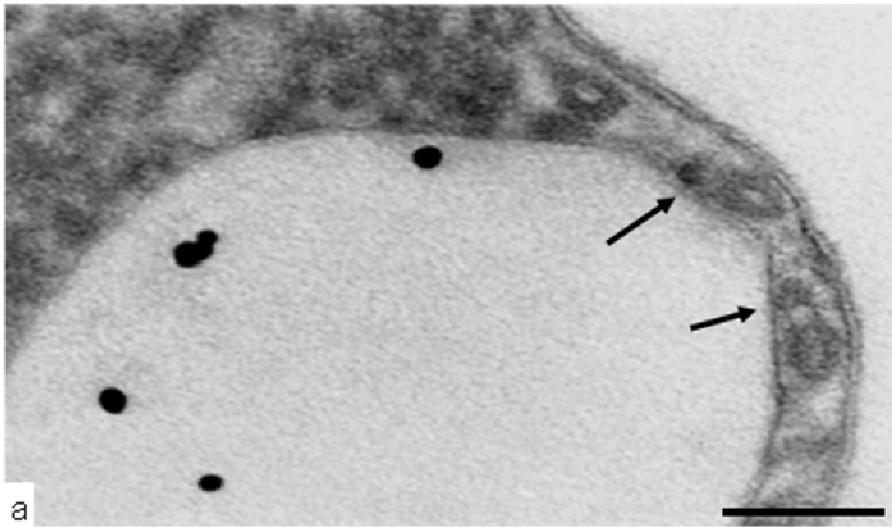
Em 2008 nosso grupo caracterizou organelas nas formas tripomastigota e amastigota de *T. cruzi* que, assim como os reservossomos de epimastigotas, foram classificadas como organelas relacionadas a lisossomos (LRO). As análises de imunofluorescência e imunocitoquímica demonstraram que estas organelas, distintas dos reservossomos por não conterem material endocitado, eram positivas para cruzipaína, chagasina, para serino carboxipeptidase, assim como para H⁺-ATPase do tipo P. As LROs tinham matriz menos elétron-densa que aquelas observadas nos reservossomos de epimastigotas e apresentam inclusões lipídicas e vesículas internas, assim como os reservossomos dos epimastigotas (Sant'Anna, *et al.*, 2008a). No entanto, amastigotas e tripomastigotas não possuem capacidade endocítica, por isso estas organelas não podem ser denominadas reservossomos, pois este nome só é utilizado para organelas de estocagem de material endocitado e diferem dos lisossomos por não estarem

relacionadas à degradação de material exógeno. A existência de organelas relacionadas aos reservossomos nas formas infectivas do *T. cruzi* abre uma nova possibilidade dos próprios reservossomos serem considerados potenciais alvos para quimioterapia.

Cunha-e-Silva e colaboradores (2002) adicionaram ao estudo de reservossomos técnicas de fracionamento subcelular e técnicas bioquímicas. Além de estabelecer um protocolo para a purificação da organela, este trabalho demonstrou que a cruzipaína localizada nos reservossomos está ativa. Em 2009, foi feita a análise proteômica a partir de uma fração purificada de reservossomos. Foram identificadas 709 proteínas na organela. Os mais altos *hits* correspondem às proteínas: H⁺-ATPase do tipo P e a glicoproteína p67 (Sant'Anna, *et al.*, 2009), que por isso foram sugeridas como prováveis marcadores moleculares para estas organelas. Três isoformas da H⁺-ATPase do tipo P foram identificadas no *T. cruzi*: TcHA1, TcHA2 e TcHA3 (Luo *et al.*, 2002). A primeira está localizada na membrana plasmática, citóstoma e vesículas endossomais, enquanto que a TcHA2 tem localização exclusiva nos reservossomos (Vieira *et al.*, 2005). A isoforma TcHA3, que foi identificada pela análise proteômica da fração isolada da organela está ausente tanto em mamíferos como em fungos; devido a isto, esta bomba poderá ser utilizada com alvo para quimioterapia (Sant'Anna *et al.*, 2009).

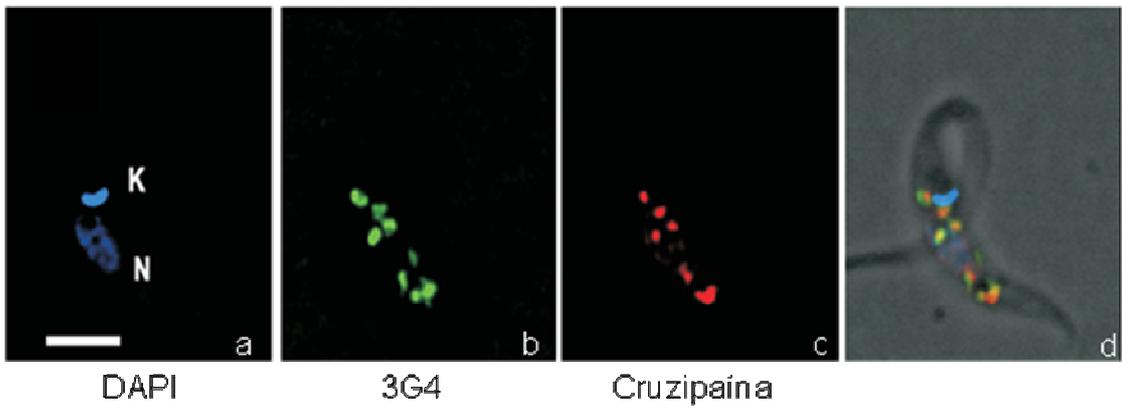
Dados recentes demonstraram que drogas que afetam microtúbulos interferem na endocitose de traçadores endocíticos (Dantas *et al.*, 2003, Porto-Carreiro *et al.*, 2000, Corrêa, *et al.*, 2008). Dantas e colaboradores (2003) relataram que a localização dos reservossomos é afetada pela ação do taxol (droga estabilizadora de microtúbulos). Tais estudos sugerem que há participação de microtúbulos durante a endocitose e também na localização dos reservossomos. Nosso grupo em 2004 realizou um estudo sobre a participação do citoesqueleto na endocitose de epimastigotas de *T. cruzi*. Este estudo flagrou imagens dos reservossomos muito próximos aos microtúbulos subpeliculares, inclusive possibilitou a visualização de estruturas intermediando esta ligação (Fig.: 9 a, b) (Isabel Porto-Carreiro, Tese de doutorado 2004).

Figura 9: Ligação entre reservossomo e microtúbulos subpeliculares. a e b) Em cortes ultrafinos de preparações fixadas com glutaraldeído e ácido tânico, reservossomos contendo traçador endocítico são vistos ligados aos microtúbulos subpeliculares (setas). Barras: 50 nm (Isabel Porto-Carreiro, Tese de doutorado 2004).



Com o intuito de identificar proteínas relacionadas com o citoesqueleto de *T. cruzi*, pesquisadores produziram anticorpos monoclonais usando preparações de citoesqueleto de epimastigotas. Dentre os anticorpos, o 3G4 foi o mais surpreendente, pois a imunofluorescência localizou organelas arredondadas na porção posterior do *T. cruzi* (Fig.: 10a) e devido à co-localização com cruzipaina (Fig.: 10b) confirmou-se que as organelas eram os reservossomos (Cornejo *et al.*, submetido). A imunoprecipitação seguida de espectrometria de massas resultou na identificação do epítipo como uma porção de β -tubulina; tal porção é conservada na maioria dos eucariotos. Porém este anticorpo não reconhecia os microtúbulos subpeliculares, tampouco o flagelo. O *T. brucei* possui cerca de 80% do seu citoesqueleto poli-glutamilado (Schneider, *et al.*, 1997). Por isso, os autores sugeriram que o anticorpo 3G4 pode estar reconhecendo somente o epítipo não glutamilado de algum microtúbulo próximo aos reservossomos. A poli-glutamilação parece estar relacionada à estabilidade dos microtúbulos; logo, o microtúbulo reconhecido seria mais dinâmico, fato muito condizente, já que o reconhecimento é visto em organelas da via endocítica. Deste modo, tal anticorpo reconheceria o epítipo que só seria exposto no momento do tráfego vesicular. Devido ao intrigante reconhecimento do anticorpo 3G4 a um epítipo de β -tubulina, tal anticorpo é uma ótima ferramenta para o estudo da influência dos microtúbulos na endocitose de *T. cruzi*.

Figura 10: Imunofluorescência do anticorpo 3G4 em epimastigotas de *T.cruzi*. **a)** Marcação de DAPI evidenciando núcleo (N) e cinetoplasto (K). **b)** Organelas na região posterior sendo reconhecidas pelo anticorpo monoclonal 3G4. **c)** Cruzipaina também é localizada nestas organelas como podemos confirmar na sobreposição das marcações em **d**. Barra: 2µm.



Justificativa

Como foi exposto até aqui, os epimastigotas de *T. cruzi* possuem estruturas de citoesqueleto características, como por exemplo os microtúbulos subpeliculares, que são estáveis e por isso, parecem não desempenhar papel direto no transporte de organelas citoplasmáticas. Comparando com as funções dos microtúbulos em outros tipos celulares, é pouco provável que não existam microtúbulos citoplasmáticos responsáveis pelo transporte de vesículas e organelas da via endocítica de *T. cruzi*. A distribuição polarizada das organelas da via endocítica, com os sítios de entrada na região anterior e os reservossomos, que são as últimas organelas desta via, localizados na porção posterior, torna este organismo um modelo interessante para investigar a influência do citoesqueleto no tráfego endocítico.

2- Objetivo geral:

Observar interações de citoesqueleto com os elementos da via endocítica de *Trypanosoma cruzi*.

Objetivos específicos:

- Identificar a proteína reconhecida pelo anticorpo anti Bilbo-1 em *T.cruzi* por western blot e localizá-la por, imunofluorescência e imunocitoquímica;
- Analisar a ultraestrutura da bolsa flagelar por microscopia eletrônica de transmissão;
- Estudar a morfologia do complexo citóstoma-citofaringe utilizando diferentes processamentos para microscopia eletrônica de transmissão;
- Analisar possíveis interações entre microtúbulos subpeliculares e reservossomos utilizando diferentes processamentos para microscopia eletrônica de transmissão;
- Elucidar a localização do antígeno do anticorpo 3G4 western blot, imunofluorescência e imunocitoquímica.

3- Material e Métodos:

3.1- Parasitas:

Formas epimastigotas da cepa Y foram cultivados em meio LIT (Difco) (Liver infusion tryptose: NaCl 68 mM, KCl 5mM, Glicose 11 mM, Infusão de fígado 5g/L, NaH₂PO₄ 46 mM) (Camargo *et al.* 1964) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB, Vitrocel, Campinas, SP) por 5 dias a 28 °C.

3.2- Ensaio de endocitose:

3.2.1-Transferrina-ouro e transferrina-FITC:

Formas epimastigotas da cepa Y foram lavadas em PBS (NaCl 150mM em tampão fosfato de sódio 10mM, pH 7,3) e ressuspensas em meio LIT sem soro contendo transferrina conjugada a ouro coloidal (TF-Au) na diluição de 1:20 ou contendo transferrina complexada à molécula fluorescente FITC (Tf-FITC), na mesma diluição utilizada para Tf-Au. Os dois ensaios de endocitose são feitos a 28°C por 30 minutos. Os epimastigotas foram então lavados em PBS para retirada da transferrina não endocitada e então fixadas para microscopia ótica no caso da Tf-FITC e para microscopia eletrônica de transmissão, no caso da Tf-Au.

Foram feitos ensaios de endocitose com Tf-FITC em diferentes dias de cultivo com intuito de analisar a taxa de endocitose. Os epimastigotas do terceiro, quarto e quinto dia de cultivo foram submetidos a endocitose de Tf-FITC por 30 minutos, lavadas com PBS e colocadas em poços de placa de 96 poços. Cada poço da placa foi analisado pela passagem de um feixe de luz que mediu a fluorescência das células. As placas foram lidas a 450nm. Os valores arbitrários foram plotados em gráfico.

3.2.2- Peroxidase:

Formas epimastigotas da cepa Y foram lavadas duas vezes em PBS (50mM NaCl em 10mM tampão fosfato de sódio, pH 7,3) e ressuspensas em meio LIT sem soro contendo 1 mg/ml de HRP (Sigma-Aldrich) e incubadas a 28°C (tempos de 5', 15', 45'). Após os tempos de incubação, os protozoários foram lavados em PBS a 4°C com o intuito de parar a atividade endocítica e fixados com glutaraldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 por 1h. As células fixadas foram lavadas três vezes em tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2. No escuro, os epimastigotas foram expostos por 15 minutos uma solução reveladora (0,5 mg/ml de diaminobenzidina (DAB da Sigma-Aldrich) em Tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,6) e depois adicionamos peróxido de hidrogênio 0,03% (Perdrogen, Merck) e incubamos por mais 15 minutos. Após a revelação lavamos os epimastigotas com tampão cacodilato de sódio 0,1M pH 7,2 e prosseguimos com a pós-fixação e processamento de rotina para microscopia eletrônica de transmissão.

3.3- Ensaio de lise por congelamento

Após a endocitose de transferrina-ouro, os epimastigotas foram lavados em PBS e ressuspensos no mesmo tampão em tubos eppendorfs. Congelamos as células através do contato do eppendorf com o nitrogênio líquido. Uma vez congelado, o tubo eppendorf era colocado em banho-maria a 28°C até descongelar completamente. Repetimos este procedimento por 3 vezes e então fixamos a amostra para microscopia eletrônica de transmissão.

3.4- Anticorpos primários

Os seguintes anticorpos foram usados neste trabalho: a) anticorpo policlonal anti-BILBO1 (diluição 1:250) gentilmente cedido pelo professor Dr. Derrick Robinson, da Universidade de Bordeaux, França, como parte de um projeto de cooperação; b) anticorpo monoclonal 3G4 (diluição 1:250) gentilmente cedido pelo professor Dr. Sérgio Schenkman, da UNIFESP, como parte de um projeto de cooperação; c) anticorpo monoclonal anti-tubulina clone B-5-12 da Sigma-Aldrich, utilizamos a concentração sugerida pelo fabricante (1mg/ml).

3.5- Microscopia óptica- Imunofluorescência indireta:

Os parasitos foram centrifugados a 5.000 rpm por 10 minutos e lavados em PBS e fixados em formaldeído nascente 4% em PBS por 15 minutos. Após fixação, os parasitos foram lavados e colocados para aderir em lamínulas previamente revestidas com poli-L-lisina (Sigma) 0,1% em PBS. Os parasitos que não aderidos foram retirados por sucessivas lavagens com PBS e então a amostra foi incubada com cloreto de amônio 50 mM em PBS por 30 minutos, com o intuito de bloquear os aldeídos livres. A membrana do protozoário foi extraída com Triton-X-100 1% em PBS por 5 minutos. Após esta etapa, a amostra foi incubada com tampão de bloqueio (PBS, pH 8,0 suplementado com albumina bovina 3%, gelatina de peixe 0,5%) por 1 hora. O anticorpo primário foi utilizado na diluição descrita acima em tampão de bloqueio por 1 hora. As lamínulas contendo os parasitos foram então lavadas com tampão de bloqueio e a solução de anticorpo secundário em tampão de bloqueio foi adicionada para uma incubação de 1 hora em temperatura ambiente. As lamínulas foram lavadas novamente e então incubadas com DAPI (4,6-diamidino-2-fenilindol) 5µg/ml por 5 minutos. O DAPI é um intercalante de nucleotídeos, logo, irá corar núcleo e cinetoplasto. Após o tempo de incubação, as lamínulas foram lavadas e montadas com n-propilgalactose 0,2M em glicerol:PBS (9:1) e posteriormente observadas no microscópio de fluorescência Zeiss Axioplan acoplado a uma câmera Olympus AxioCam MR.

3.6- Imunocitoquímica

3.6.1-Em contrastação negativa:

Os epimastigotas foram lavados e aderidos por 20 minutos em grades de níquel previamente revestidas com formvar/carbono. As membranas dos protozoários foram extraídas com a adição de uma solução de 2% de Triton-X-100 a 4°C. Esta solução deve ficar em contato com as células por 10 minutos. Para aumentar a eficiência da extração, trocávamos a gota após 5 minutos de incubação. É importante ressaltar que para a retirada das soluções, encostávamos um papel de filtro embaixo da grade, deste modo o líquido era absorvido e as células continuavam depositadas sobre o filme de formvar.

Após a extração da membrana, lavamos as grades que foram fixadas com 4% de formaldeído em PBS por 10 minutos. Lavamos as grades com PBS e seguimos para o bloqueio de 1 hora, realizado com PBS pH 8 suplementado com 3% de BSA (albumina bovina da Sigma), 0,5% de gelatina de peixe e 0,02% de Tween20. Os parasitas foram então incubados com o anticorpo primário por 1 hora, na diluição 1:250. Após lavagens com tampão de bloqueio as grades foram incubadas também por 1 hora com anticorpo secundário complexado a ouro coloidal de 10nm da Molecular Probes. Lavamos sucessivas vezes com PBS e contrastamos com molibdato de amônio 2% pH 6,8 por 30 segundos, secamos as grades com papel de filtro e esperamos secar para só então observarmos em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200.

3.6.2- Em cortes ultrafinos de resinas hidrofílicas:

Parasitas foram coletados através da centrifugação de 5.000 rpm por 10 minutos, lavados em PBS e fixados em glutaraldeído tipo I 0,2%, formaldeído 4%, ácido pícrico 1%, sacarose 3,5% em tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2 em temperatura ambiente por 1 hora. Após a fixação, os parasitas foram lavados em PBS, desidratados em série de etanol a 4° C e infiltrados em resina LRWhite Medium (Sigma) a -20° C. A polimerização da resina hidrofílica foi realizada a temperatura ambiente. Secções ultrafinas de parasitos incluídas em LRWhite, foram coletadas em grades de níquel e incubadas em 50 mM de cloreto de amônio em PBS por 30 minutos, a fim de bloquear os aldeídos livres. Posteriormente, as grades foram transferidas para PBS suplementado com Tween 20 0,02%, albumina bovina 3%, gelatina de peixe 0.5%, pH 7,4 (tampão de bloqueio) por 1 hora a temperatura ambiente.

As grades contendo as amostras foram incubadas por 1 hora com o anticorpo primário (diluído em tampão de bloqueio). Depois de lavadas em tampão de bloqueio as grades foram incubadas com anticorpos secundários complexados a partículas de ouro coloidal de 10 nm. As secções foram lavadas em PBS e água e então, coradas em acetato de uranila e citrato de chumbo e observadas no microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200.

3.6.3- Imunocitoquímica pré- embedding do anticorpo 3G4:

Os epimastigotas foram lavados em PBS e fixados em solução de formaldeído nascente 4% em PBS por 10 minutos em suspensão. Após este tempo, o tubo eppendorf foi centrifugado a 3.000 rpm por 5 minutos e uma solução de Triton-X-100 a 1% foi adicionada e incubada por 5 minutos. Os epimastigotas foram então lavados e incubados, ainda em tubo eppendorf, em tampão de bloqueio por 1 hora. O tubo eppendorf era novamente centrifugado e os epimastigotas eram ressuspensos em solução de anticorpo primário 3G4 (na diluição citada acima), após 1 hora de incubação, separávamos duas alíquotas. Uma delas seguia para imunofluorescência, logo, os epimastigotas foram colocados para aderir em lamínulas revestidas com poli-L-lisina e incubados com anticorpo secundário conjugado a fluorocromo. A outra alíquota continuou sendo incubada em suspensão com anticorpo secundário complexado a ouro e então, processado como descrito abaixo, para microscopia eletrônica de transmissão.

3.7 - Microscopia eletrônica de transmissão:

Os parasitas foram fixados em glutaraldeído 2,5% em tampão fosfato 0,1M pH 7,2, após uma hora de fixação, as células foram lavadas e pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8%, cloreto de cálcio 5mM em tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,2 por 1 hora, lavados três vezes em tampão cacodilato de sódio. Após a última lavagem as amostras foram desidratadas em séries crescentes de acetona (Merck) por 10 minutos cada série (30%, 50%, 70%, 90% e 100%). A última etapa de desidratação foi repetida três vezes e em seguida, as células foram incluídas em resina epóxi (Polybed 812) a partir de uma mistura contendo uma proporção de 1:1 de acetona absoluta e resina epóxi por doze horas. Após este período, a mistura foi trocada por uma solução de epon puro, após 6 horas os protozoários foram incluídos em resina epon e colocados para polimerizar em estufa de 60°C por 48 horas até total polimerização.

Alternativamente, as células foram fixadas de acordo com Dallai e Afzelius (1990), este protocolo utiliza ácido tânico 0,1% juntamente com glutaraldeído 2,5% suplementado com sacarose 1,8% em tampão fosfato de sódio, deste modo, as proteínas são evidenciadas. Este tipo de fixação não requer pós-fixação. Após 5 dias no fixador a 4°C as células são desidratadas em acetona, infiltradas e incluídas, como de costume, em resina epóxi.

Os blocos polimerizados de resina epon foram piramidados e cortados em ultramicrotomo Reichert na espessura de 70 nm para microscopia eletrônica de transmissão convencional e 200 nm para tomografia eletrônica.

Nestes três tipos de processamento para microscopia eletrônica de transmissão, os cortes foram coletados com grades de cobre e grades de níquel para as resinas hidrofílicas, deste modo evitando a oxidação das grades após as incubações da imunocitoquímica. As seções foram contrastadas com acetato de uranila 5% em água por 40 minutos e citrato de chumbo por 5 minutos e lavados com água destilada (REYNOLDS, 1963). As amostras foram observadas em microscópio eletrônico de transmissão JEOL 1200, operando em 60 KV. No caso da tomografia eletrônica, os cortes obtidos no ultramicrotomo eram de 200nm, após a contrastação, adicionávamos uma solução de ouro em água destilada na diluição de 1:1 em ambos os lados da grade. O ouro servirá como ponto fiducial, uma espécie de referência que auxilia o alinhamento das séries. As grades serão observadas no microscópio 200Kv TECNAI, durante a operação utilizamos inclinações de 65 ângulos positivos e 65 ângulos negativos no eixo X. As séries obtidas serão alinhadas no software Inspect 3D e segmentadas e reconstruídas no Amira.

3.8- Isolamento de reservossomos:

As frações de reservossomos foram obtidas através do protocolo desenvolvido pelo nosso grupo (Cunha e Silva *et al.*, 2002). Os parasitos cultivados em meio LIT suplementado com SFB a 10% foram lavados em tampão TMS (Tris-HCl 20 mM pH 7,3 + MgCl₂ 2 mM + sacarose 250 mM) e ressuspensos no mesmo tampão. Com o intuito de romper as células, as sonicamos a 10% da amplitude no sonicador (Modelo GEX 600, Sigma). O homogeneizado obtido foi centrifugado a 2.450 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 foram 1,2 M, 1,0 M e 0,8 M. Os tubos dos gradientes foram centrifugados a

97.000 xg por 2 h 30 min no rotor SW28 e na centrífuga Beckman (L8-70M Ultracentrifuge).

3.9- Obtenção do extrato protéico e dosagem de proteína (Método DC BioRad):

As formas epimastigotas foram lavadas duas vezes em PBS pH 7,2, ressuspensas no mesmo tampão onde adicionamos o coquetel inibidor de proteases (Sigma-Aldrich) e congelamos. Dosamos as proteínas pelo método DC BioRad (Lowry *et al.*,1951), de acordo com as instruções do fabricante.

3.10- SDS-PAGE e Western Blot:

Os epimastigotas ou a fração de reservossomos foram ressuspensos em tampão 100 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS (v/v), 10% 2- β -mercaptoetanol (v/v), 0.012% glicerol (w/v), azul de bromofenol, pH 7,2 e fervidos por 5 minutos e aplicados (30 μ g de proteína) sobre um mini-gel de SDS-PAGE 7,5% (Laemmli, 1971). Depois de separadas eletroforeticamente, as amostras foram transferidas para membrana de nitrocelulose em cuba semi-seca Bio Rad Trans-blot Cell. A membrana era molhada em tampão Tris-glicina e 20% metanol, e a transferência foi realizada a 15V por 15 minutos. Posteriormente as membranas foram bloqueadas com leite em pó desnatado (Molico) 5% em TBS (Tris-HCl 20mM pH 7,2 e NaCl 150mM) suplementado com Tween 20 a 0.05% e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente com os anticorpos citados anteriormente. As membranas foram lavadas sucessivas vezes e incubadas com o anticorpo secundário conjugado a peroxidase ou a fosfatase alcalina. As membranas incubadas com anticorpo secundário conjugado a peroxidase foram revelada utilizando o kit ECL Plus da GE conforme as instruções do fabricante. As membranas incubadas com anticorpo secundário conjugado a fosfatase alcalina foram reveladas utilizando o método de BCIP/NBT da Bio Rad, de acordo com as instruções do fabricante.

4- Resultados:

Portais de endocitose:

A atividade endocítica da maioria dos eucariotos ocorre na superfície celular. Por outro lado, os protozoários da família Trypanosomatidae possuem atividade endocítica altamente polarizada e ocorre exclusivamente pela bolsa flagelar e pelo citóstoma.

4.1-Bolsa flagelar:

4.1.1- Proteína Bilbo-1:

Recentemente, a proteína Bilbo-1 foi caracterizada e localizada no colar da bolsa flagelar de *T. brucei*. Através da técnica de RNA interferencial foi possível elucidar que esta proteína é essencial na biogênese da bolsa flagelar e que deste modo, influencia diretamente a endocitose. Como já foi citado, o gene desta proteína possui dois ortólogos em *T. cruzi*, porém a proteína resultante deste gene só foi estudada em *T. brucei*. Com o intuito de analisar se o gene ortólogo é expresso, realizamos Western blot, imunofluorescência e imunocitoquímica com o anticorpo policlonal anti-Bilbo1. A análise por Western blot contra a proteína de interesse revelou a marcação de uma única banda com massa molecular de aproximadamente 62 kDa (Fig.: 11).

A presença da proteína já havia sido comprovada pelo western blot, porém desconhecíamos a localização da proteína Bilbo-1 em *T.cruzi*, por isso, realizamos imunofluorescência em epimastigotas. Neste experimento a bolsa flagelar dos epimastigotas de *T.cruzi* foram reconhecidas, como esperado (Fig.: 12a,b). Porém uma marcação adicional foi observada, toda a extensão do flagelo foi reconhecida pelo anticorpo anti-BILBO-1 (Fig.: 12a,b). Realizamos também a imunofluorescência em amastigotas e tripomastigotas. Surpreendentemente não visualizamos nenhuma marcação nos amastigotas. Os tripomastigotas de cultura apresentaram marcação somente no flagelo (Fig.: 12). Para analisar o reconhecimento observado em epimastigotas mais detalhadamente, realizamos a imunocitoquímica em contração negativa. Os epimastigotas foram extraídos com detergentes e postos para aderir em grades de níquel revestidas com formvar. Neste experimento, visualizamos por

microscopia eletrônica de transmissão que as células haviam sido lisadas, restando somente a bolsa flagelar e o flagelo. Mesmo assim, a marcação pode ser observada, e se mostrou similar à imunofluorescência, reconhecendo o corpúsculo basal e o flagelo (Fig.: 13b). Com intuito de confirmar e de visualizar a marcação mais pontualmente, realizamos a imunocitoquímica com cortes de epimastigotas fixados com solução que favorece a preservação dos antígenos e incluídos em resina hidrofílica. Registramos a localização do anticorpo na bolsa flagelar e também no flagelo (Fig.: 13c e d). Fato este que confirma os dados obtidos através de imunofluorescência e imunocitoquímica por contração negativa.

Figura 11: Western Blot do anticorpo policlonal Bilbo-1. As membranas são de extrato total de epimastigotas. 1: Padrão de peso molecular. 2: Extrato total de epimastigotas. A banda reconhecida tem 62 kDa.

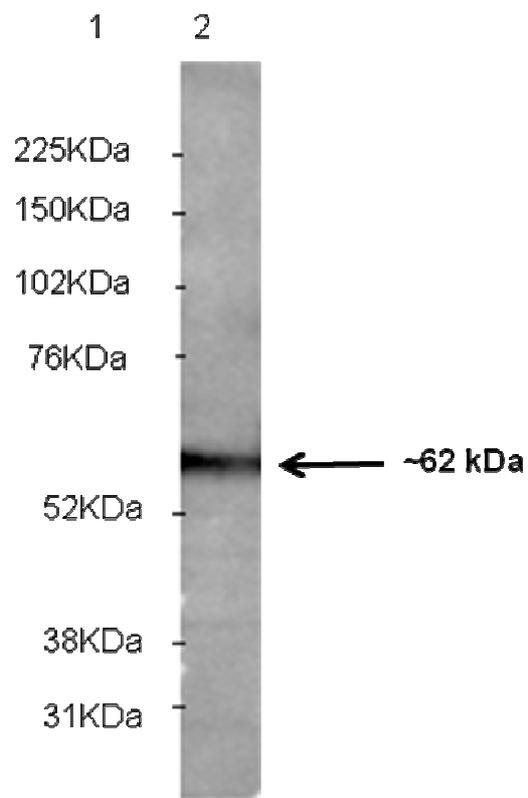


Figura 12: Imunofluorescência de epimastigotas e tripomastigotas de *T.cruzi* com anticorpo policlonal Bilbo-1.

a e b) Visão geral mostrando reconhecimento homogêneo das células . Barras: 0,5 μm ; **c)** Sobreposição do DIC e marcação da proteína Bilbo-1 com anticorpo secundário anti-rabbit Alexa 488. Barra:1 μm . **d)** Sobreposição do DAPI e marcação da proteína com anticorpo secundário Alexa 546. Barra:1 μm . **e)** DIC da forma tripomastigota, **f)** Sobreposição do DAPI e da marcação da proteína Bilbo-1 com anticorpo secundário Alexa 488. Barra: 1 μm

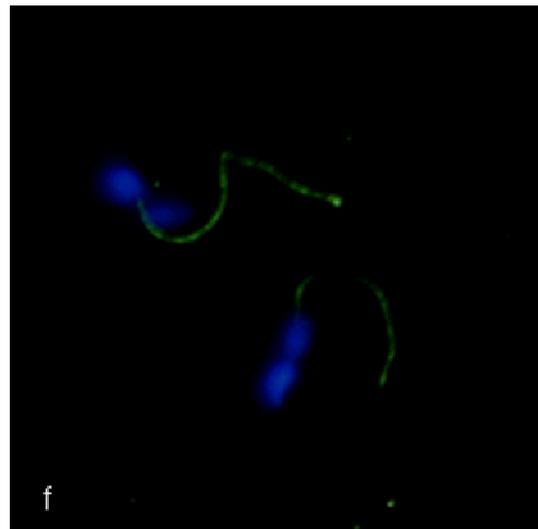
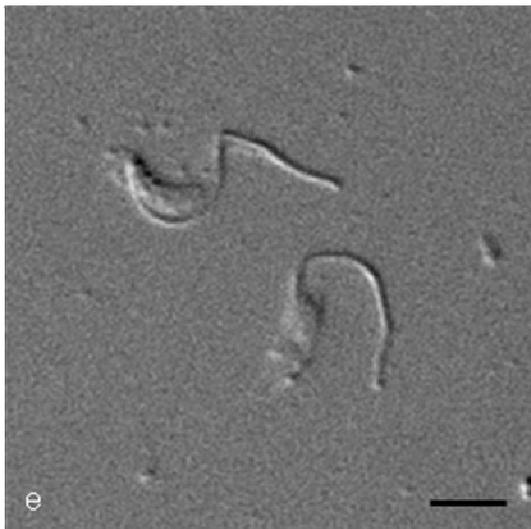
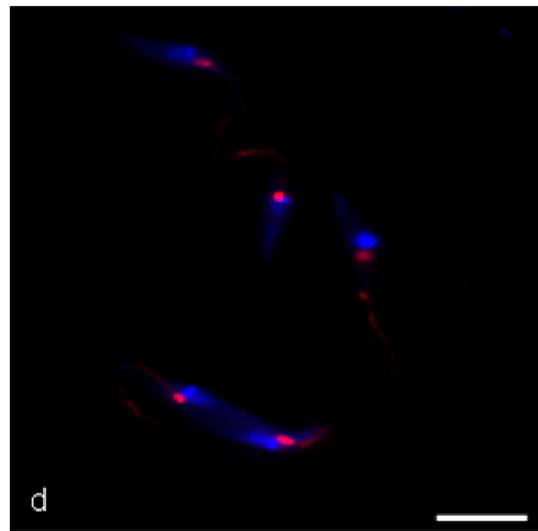
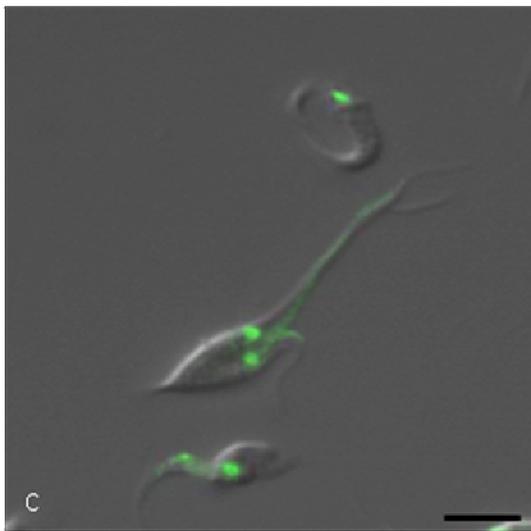
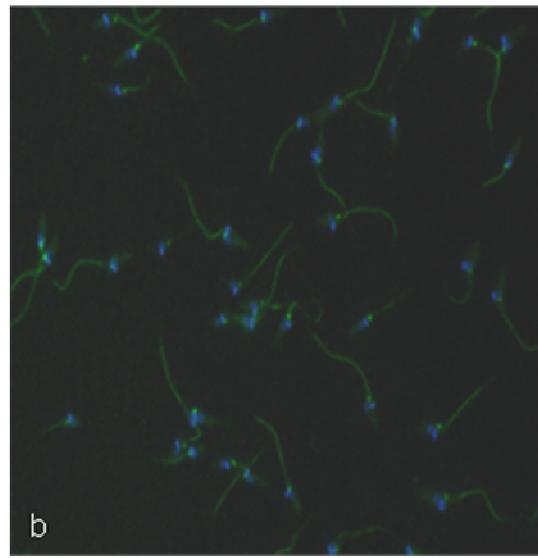
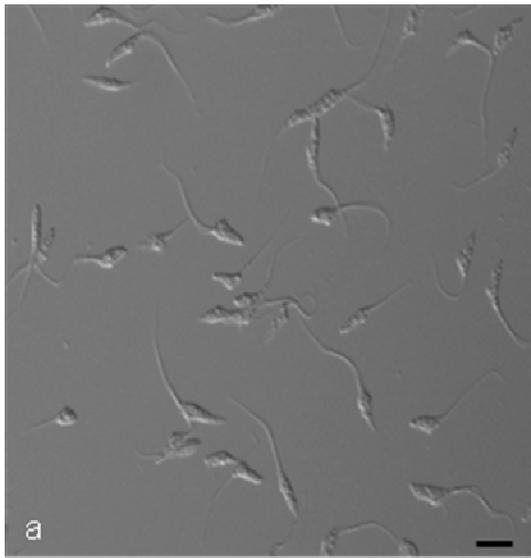
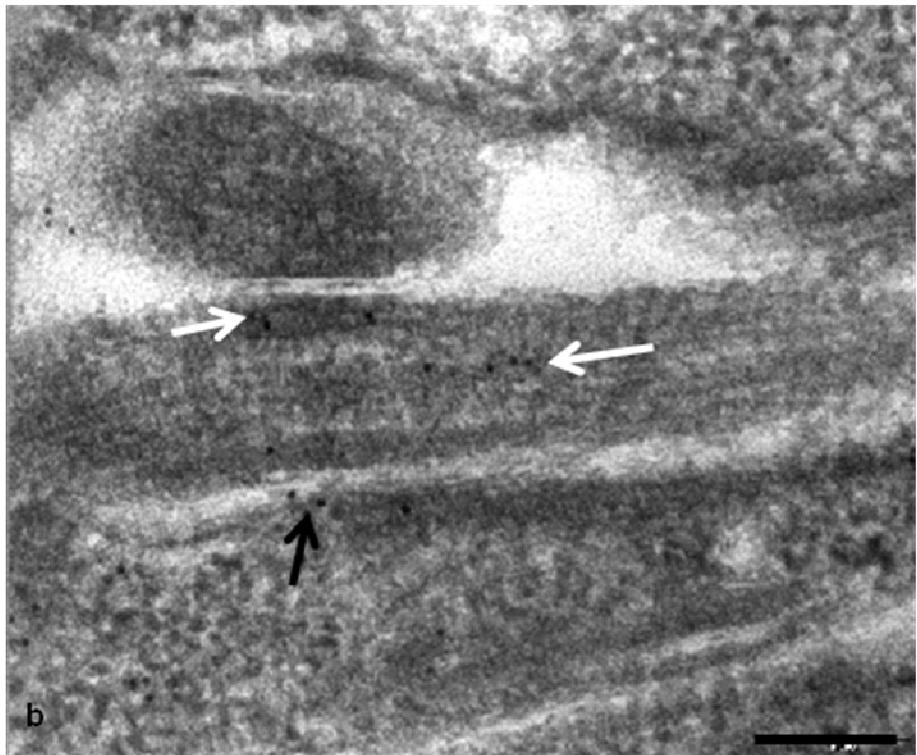
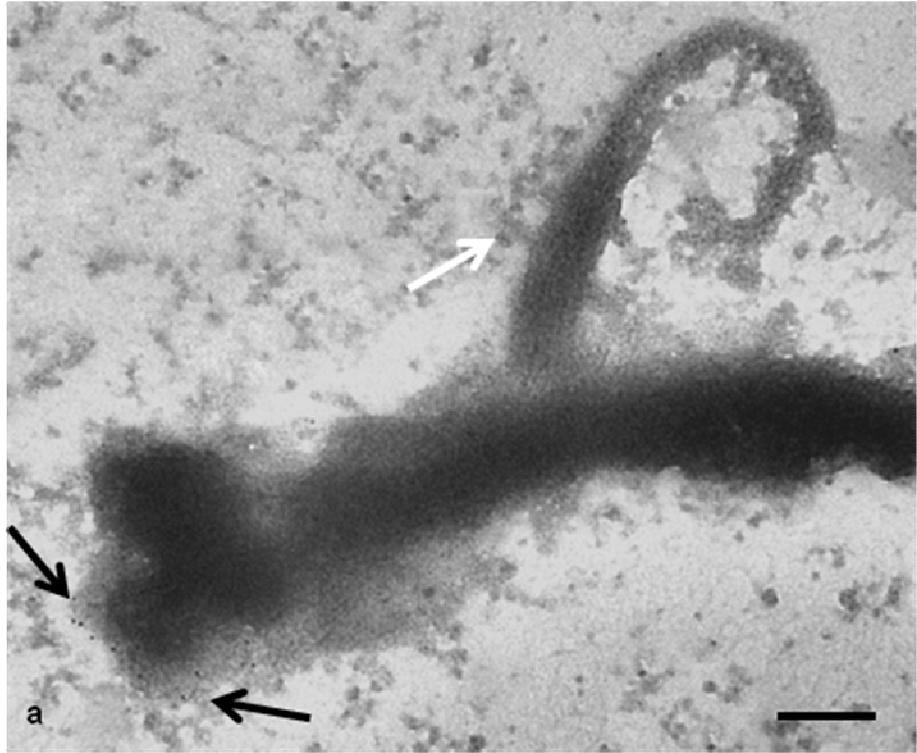


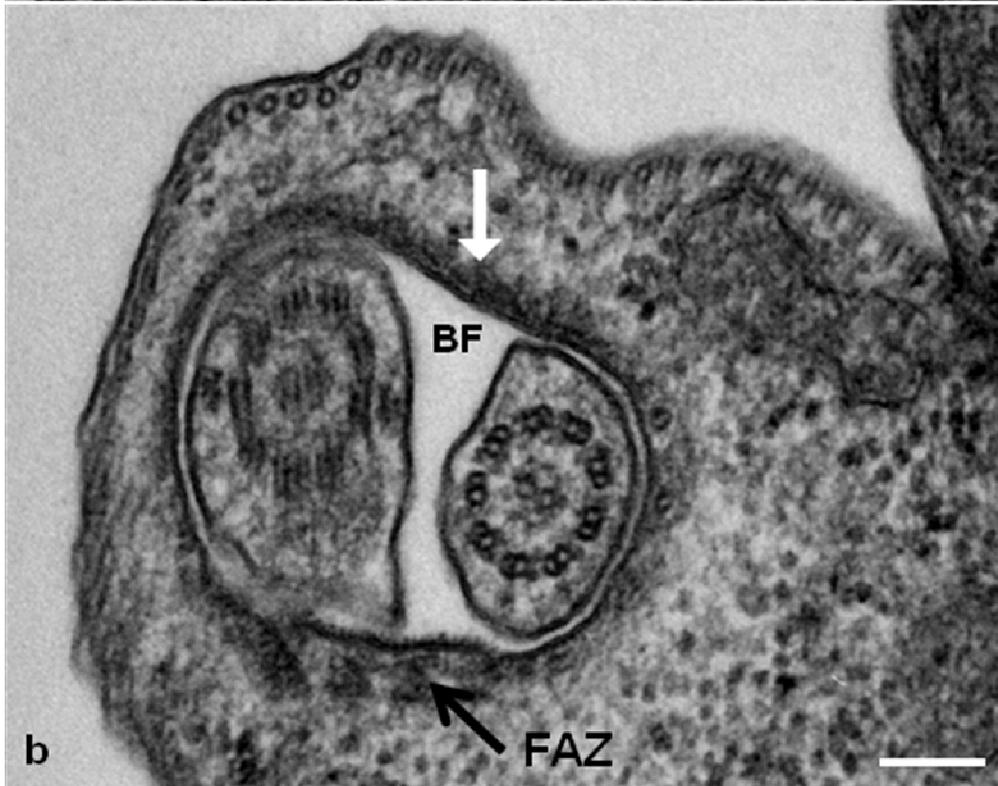
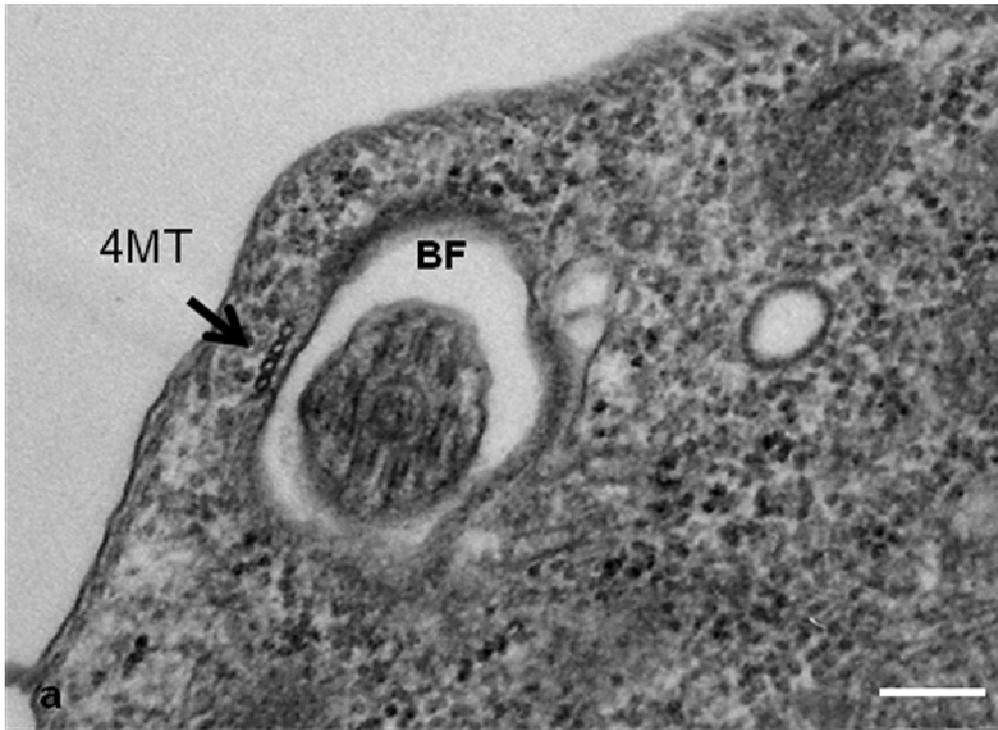
Figura 13: Imunocitoquímica de epimastigotas de *T.cruzi* com anticorpo policlonal Bilbo-1. a) Imunocitoquímica em contrastação negativa. Os epimastigotas se mostraram lisados, mas a marcação pode ser observada. Setas pretas: Reconhecimento do corpúsculo basal. Seta branca: Citóstoma se manteve associado ao flagelo, e não apresentou marcação. b) Imunocitoquímica em cortes de resina hidrofílica. Note o reconhecimento na superfície da bolsa flagelar (seta preta) e também do axonema (setas brancas). Barras: 100nm



4.1.2- Quatro microtúbulos da bolsa flagelar:

Como já foi citado, *T.brucei* possui quatro microtúbulos na altura do colar da bolsa flagelar. Estes quatro microtúbulos (4MT) estão relacionados com a atividade endocítica, visto que traçadores endocíticos são acumulados preferencialmente próximos aos 4MT em experimentos feitos a 4°C (temperatura que inibe a endocitose) (Gadelha, *et al.*, 2009). O colar e os 4MT da bolsa flagelar só foram observados e estudados em *T.brucei*. Através de observações de epimastigotas de *T.cruzi* processados para microscopia eletrônica de transmissão, flagramos os 4MT na altura do corpúsculo basal (Fig:14a). Cortes de uma porção mais acima da bolsa flagelar revelaram a presença de material elétron-denso na região do colar (Fig:14b). Tendo em vista estas observações, podemos concluir que epimastigotas de *T.cruzi* possuem colar similar ao de *T.brucei* e também o quarteto de microtúbulos.

Figura 14: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T.cruzi*. a) Bolsa flagelar (BF) e quarteto de microtúbulos (seta); b) Porção da bolsa flagelar chamada de colar; note material elétron-denso (seta branca) característico desta porção que mantém contato com o flagelo na saída para o meio externo. O protozoário estava em divisão e por isso apresenta dois flagelos. Note a zona de adesão flagelar (FAZ) (seta preta) BF: bolsa flagelar. Barras: 100µm



4.2- Ultraestrutura do complexo citóstoma-citofaringe:

Em nossas observações de microscopia eletrônica de transmissão, flagramos um plano corte interessante (Fig.: 15a) e que provavelmente é semelhante ao responsável pela conclusão de que o citóstoma surgiria a partir da bolsa flagelar; esta hipótese era aceita na década de 80. Em outro corte, visualizamos a proximidade das invaginações do citóstoma-citofaringe com a bolsa flagelar, neste corte já é possível observar de que tais invaginações são muito próximas, porém não estão sobrepostas (Fig.: 15b). Observamos também a proximidade dos elementos do citoesqueleto que compõem estes sítios de endocitose (Fig.: 15c) e serão comentados adiante.

Notamos a presença de um material de origem desconhecida na superfície do protozoário próximo à entrada do citóstoma (Fig.: 16a). Epimastigotas controle e epimastigotas submetidos à endocitose foram analisados. Visualizamos a superfície do citóstoma com glicocálice bem desenvolvido e flagramos inesperadamente a presença de uma espécie de vesícula (Fig.: 16b, c) que também possuía glicocálice (Fig.: 16b). Depois de muitas observações percebemos não se tratava de uma vesícula e sim de uma protrusão de membrana (Fig.: 16 d).

Os epimastigotas de *T.cruzi* foram processados rotineiramente para microscopia eletrônica de transmissão. Apesar de ser um processamento comum, após a análise extensiva, flagramos diversos cortes intrigantes do complexo citóstoma-citofaringe. Cortes transversais nos deram a oportunidade de visualizar microtúbulos perpendiculares à entrada do citóstoma (Fig.: 17a, b), que ainda não tinham sido visualizados e que provavelmente são responsáveis por sustentar a abertura do citóstoma. Nestes cortes também é possível observar a protrusão contendo material citoplasmático (Fig.: 17c). Em cortes tangenciais observamos os microtúbulos que correm longitudinalmente e que sustentam a citofaringe no interior da célula, notamos que o início da citofaringe tem formato que lembra uma fechadura (Fig.: 18a). Cortes transversais da invaginação, na parte anterior do protozoário (Fig.: 18b, c) e na região perinuclear do protozoário nos possibilitou visualizar a região mais final da citofaringe, tal estrutura é parecida com um cocar (Fig.:18d), pois parece possuir microtúbulos somente em um lado. Processamos

epimastigotas para microscopia eletrônica de transmissão utilizando tampão PHEM, conhecido por sua eficiência em preservar citoesqueleto. Este processamento nos possibilitou analisar com maior riqueza os elementos do citoesqueleto que acompanham a citofaringe (Fig.: 19 a). Em cortes longitudinais da citofaringe, notamos que seu lúmen também é bastante elétron-denso (Fig.: 19 b), assim como a abertura do citóstoma. Próximo à abertura do citóstoma existe um material elétron denso logo abaixo da membrana plasmática (Fig.: 19 a, b, asterisco), que parece ser formado por filamentos finos e curtos. Ao lado da citofaringe, foi possível observar vesículas alinhadas contendo material com elétron-densidade parecida com aquela observada no lúmen da citofaringe (Fig.: 19 c, d). Recentemente, o Centro Nacional de Bioimagem da UFRJ (CENABIO) adquiriu um microscópio de tomografia eletrônica FEI Tecnai, que nos permite inclinar cortes espessos em diferentes ângulos (cerca de 140 ângulos), gerando uma série de imagens que dão origem a um volume que pode ser reconstruído com o intuito da obtenção de um modelo 3D. Para observar amostras neste microscópio, processamos as células como de rotina para microscopia eletrônica de transmissão, porém obtivemos cortes espessos de cerca de 200 nm. Os cortes espessos são contrastados como descrito no material e métodos e observados. Obtivemos uma série de imagens muito interessante da longa citofaringe, os microtúbulos que a acompanham, assim como as vesículas de função ainda não determinada (Fig.: 20). Por ser uma metodologia muito recente em nosso laboratório, ainda não terminamos o alinhamento e reconstrução 3D.

Figura 15: Localização do citóstoma-citofaringe em relação à bolsa flagelar de epimastigotas de *T.cruzi*. **a)** Micrografia que induz à dúvida sobre a localização do citóstoma (C). **b)** Micrografia da porção anterior do protozoário, apresentando as invaginações da bolsa flagelar (BF) e citofaringe (Cy) lado a lado. Observe o material elétron-denso sob a membrana da bolsa flagelar (seta). **c)** Esta imagem nos permite observar a proximidade dos elementos do citoesqueleto de ambas estruturas (setas). Barras: 100nm. C-citóstoma, Cy-citofaringe, BF- bolsa flagelar, Ax-axonema

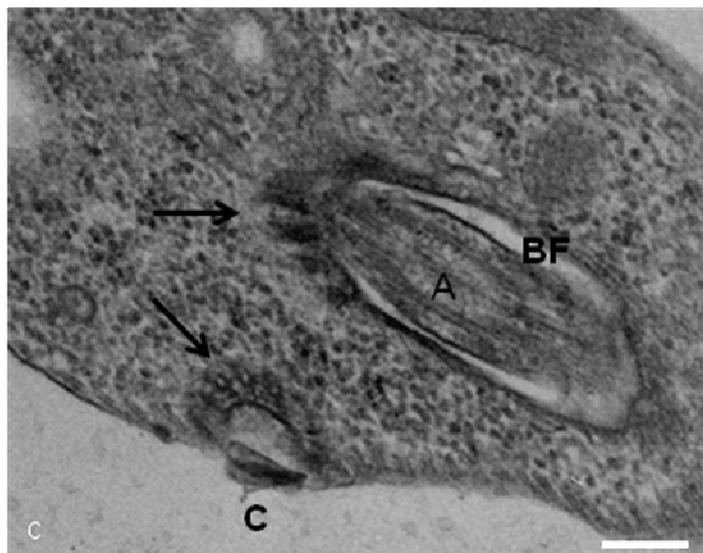
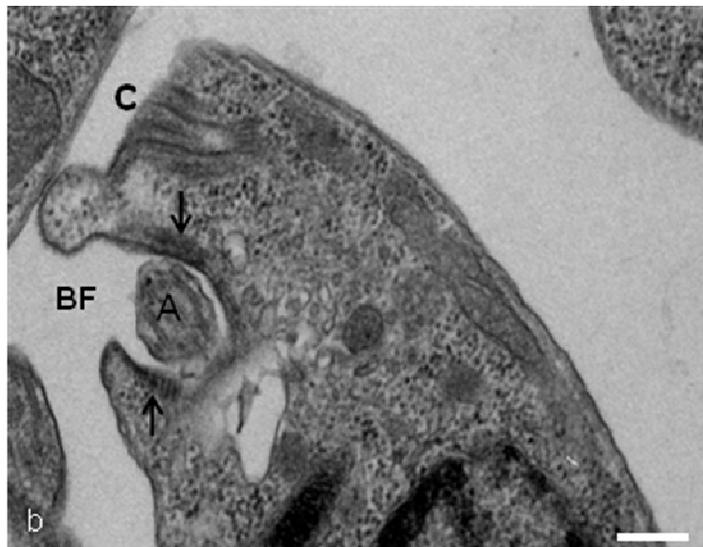


Figura 16: Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T. cruzi*. **a)** Citóstoma-citofaringe em um corte tangencial. Note os microtúbulos (asterisco) que acompanham a invaginação e a proximidade de vesículas (seta branca), como pode ser melhor visualizado no *inset*. Podemos visualizar material próximo à abertura do citóstoma (seta preta). Barra: 0,5 μ m. **b)** A protrusão na superfície apresenta revestimento elétron-denso semelhante ao revestimento da abertura do citóstoma (setas). Barra: 100nm **c)** Nesta micrografia, a protrusão parece ser uma vesícula não associada à célula (seta). Barra: 1 μ m **d)** Em outros cortes, notamos que a protrusão é uma extensão da membrana do protozoário (seta). Barra: 0,2 μ m

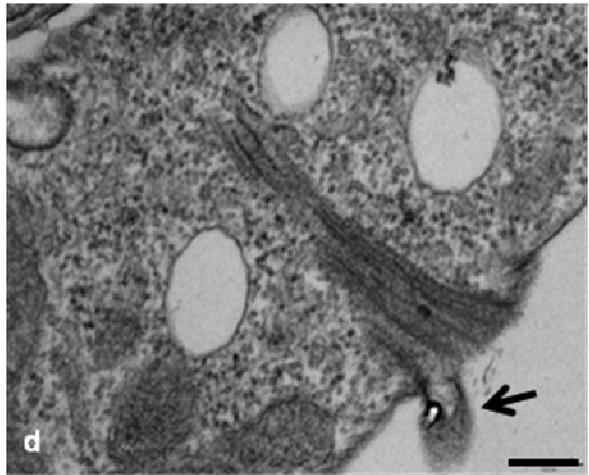
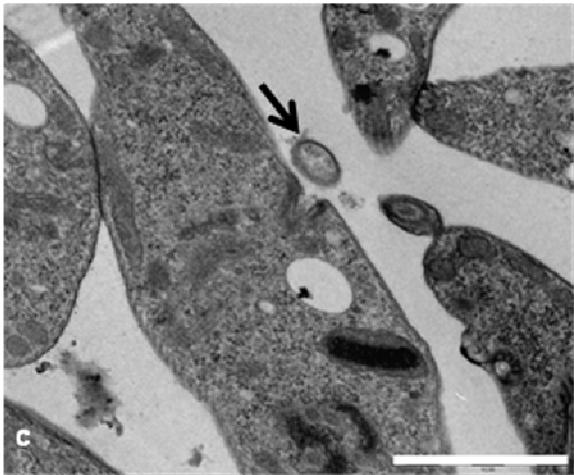
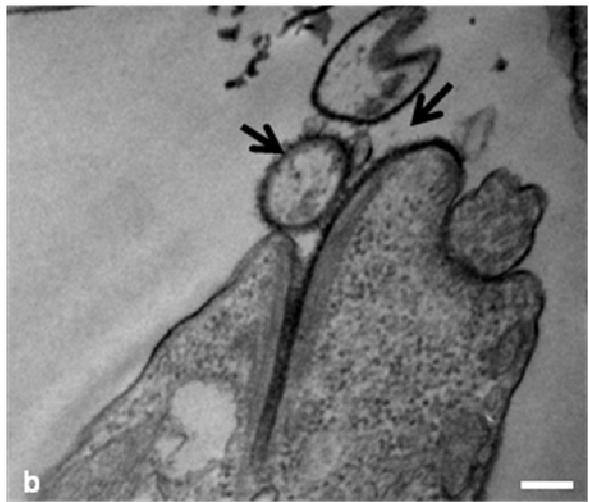
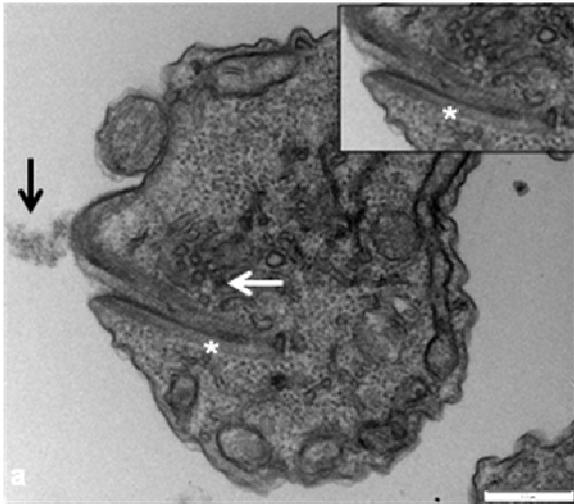


Figura 17: Epimastigotas processados rotineiramente para microscopia eletrônica de transmissão. a e b) Abertura do citóstoma novamente com material elétron-denso e apresenta microtúbulos abaixo da superfície (setas pretas). Note que existe um material ligando os microtúbulos à membrana plasmática. Estas micrografias também possibilitam a visualização parcial da protrusão (setas brancas) Barras: 0,5 μm e 0,2 nm **c)** Imagens dos mesmo elementos visualizados nas outras imagens (seta preta), porém esta micrografia oferece a observação da protrusão na superfície contendo material citoplasmático (asterisco). Nesta mesma micrografia podemos visualizar o citóstoma de outro epimastigota, em outro plano de corte (seta curva). Barra: 0,5 μm . BF- bolsa flagelar, K- cinetoplasto, 4MT- quarteto de microtúbulos

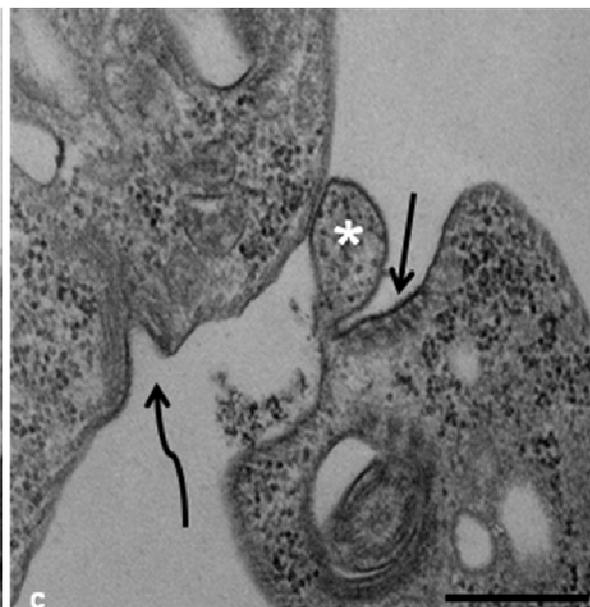
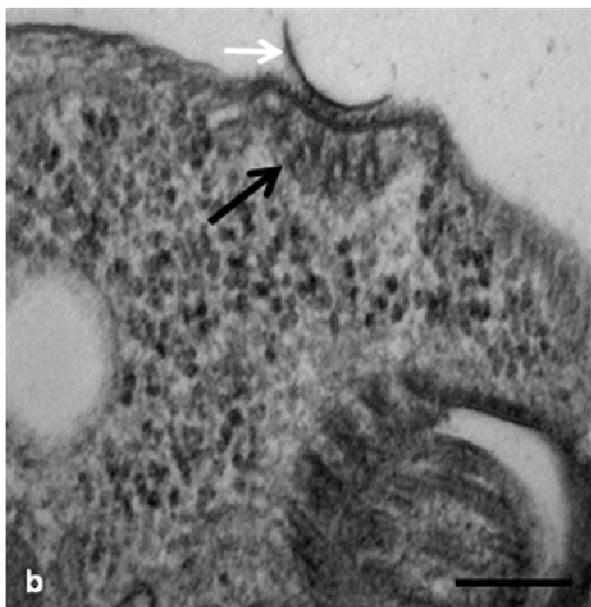


Figura 18: Citofaringe e o citoesqueleto por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas. **a)** Abertura do citóstoma e início da citofaringe apresentando formato de fechadura (asterisco). Seta: citoesqueleto associado. Barra: 0,5 μm . **b)** Imagens de um conjunto de microtúbulos associados à citofaringe. Barra: 0,5 μm . **c)** Maior aumento da região delimitada pelo quadrado da figura b. Note como o lúmen da citofaringe ainda possui o revestimento elétron-denso. Barra: 0,2 μm **d)** Citofaringe na região perinuclear apresentando mesmo padrão de microtúbulos da imagem anterior. Barra: 0,2 μm

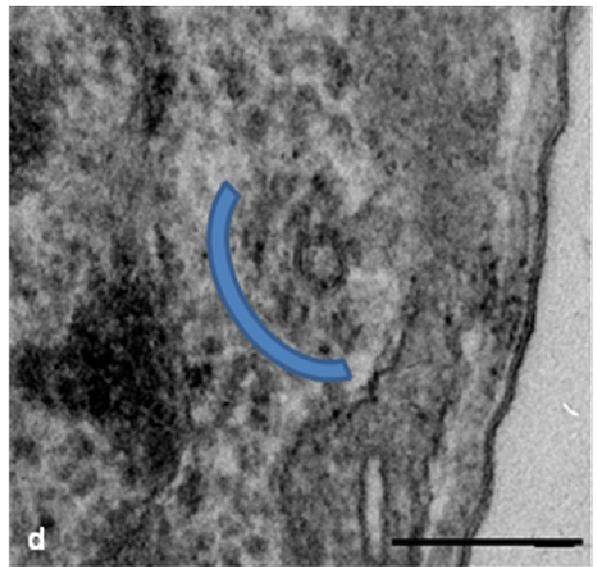
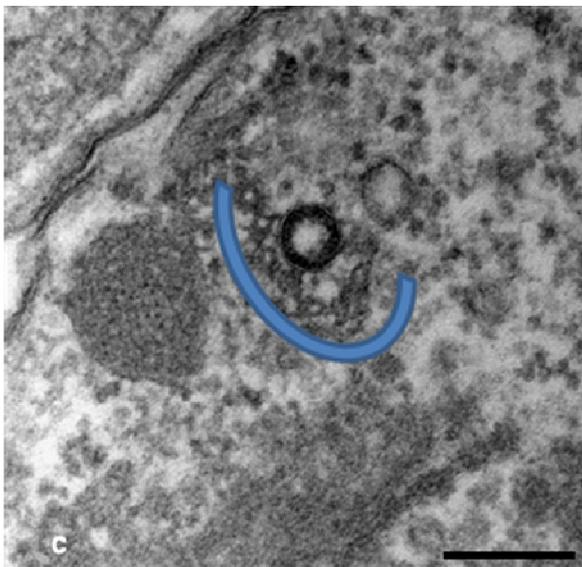
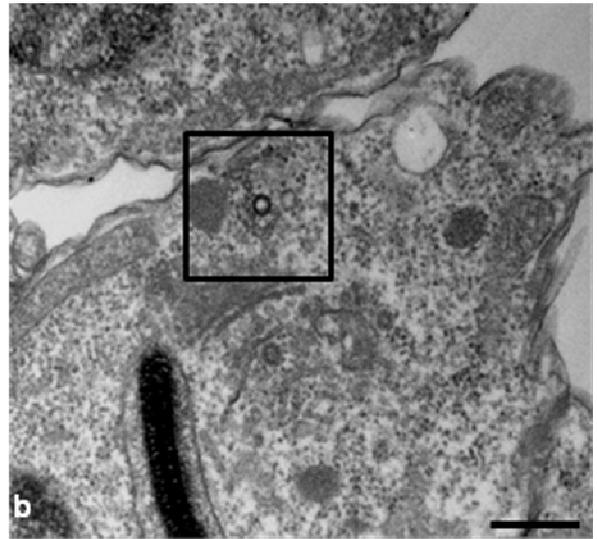
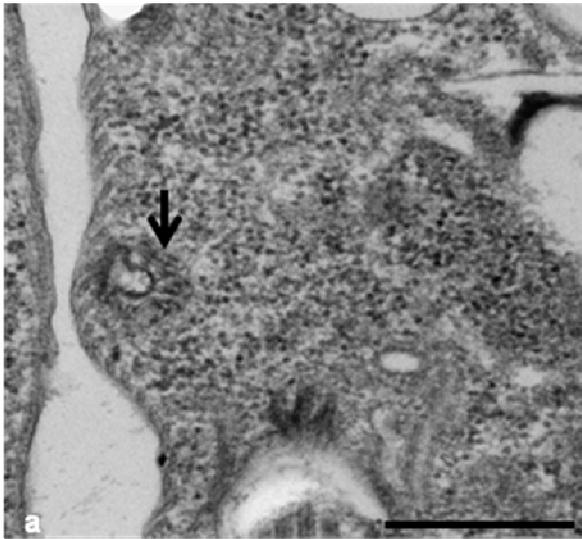


Figura 19: Cortes tangenciais da citofaringe. Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas processados com tampão PHEM. **a, b e c)** Podemos observar que a citofaringe se encontra associada a microtúbulos e também a vesículas. Asterisco: material compacto acompanhando a citofaringe. Seta: vesícula associada. **d)** Maior aumento da figura c. Mostrando a proximidade entre a citofaringe e as vesículas (seta). Note que as vesículas possuem material similar àquele observado no lúmen da citofaringe. Barras: 0,2 μ m

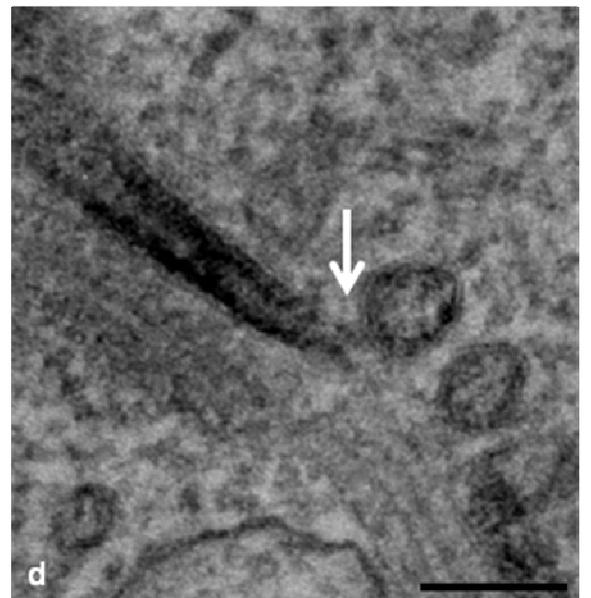
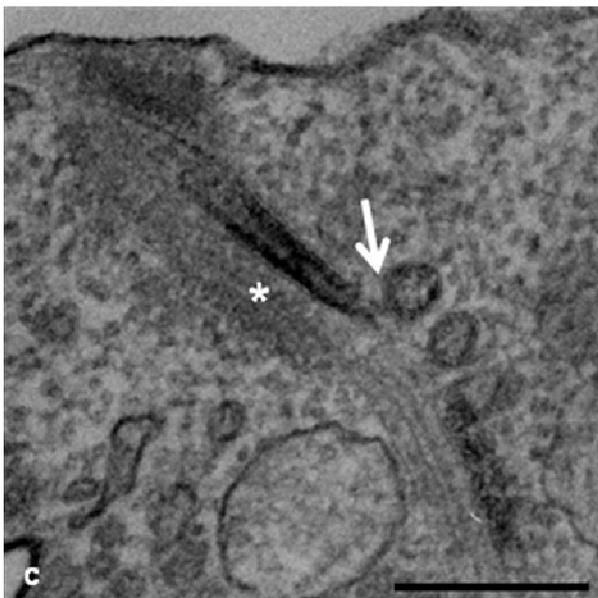
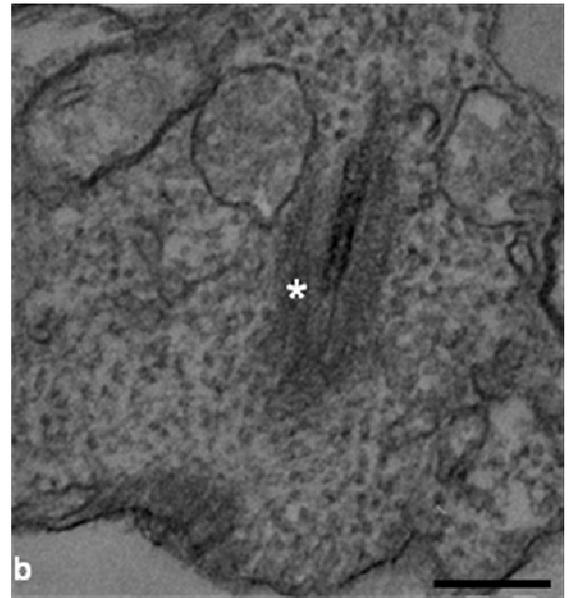
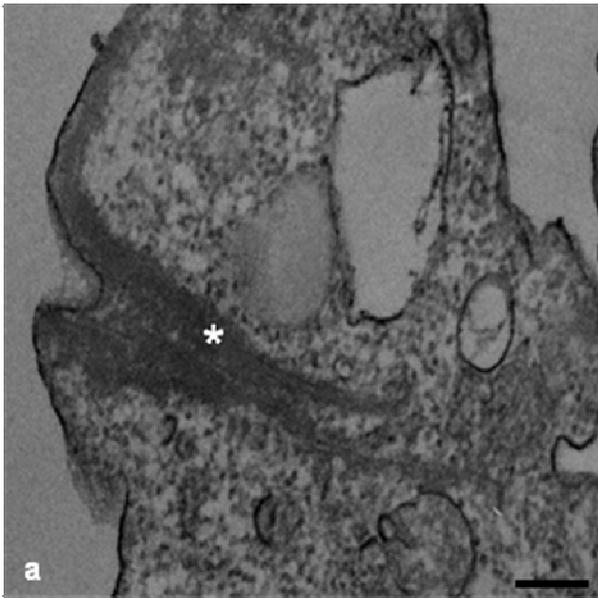
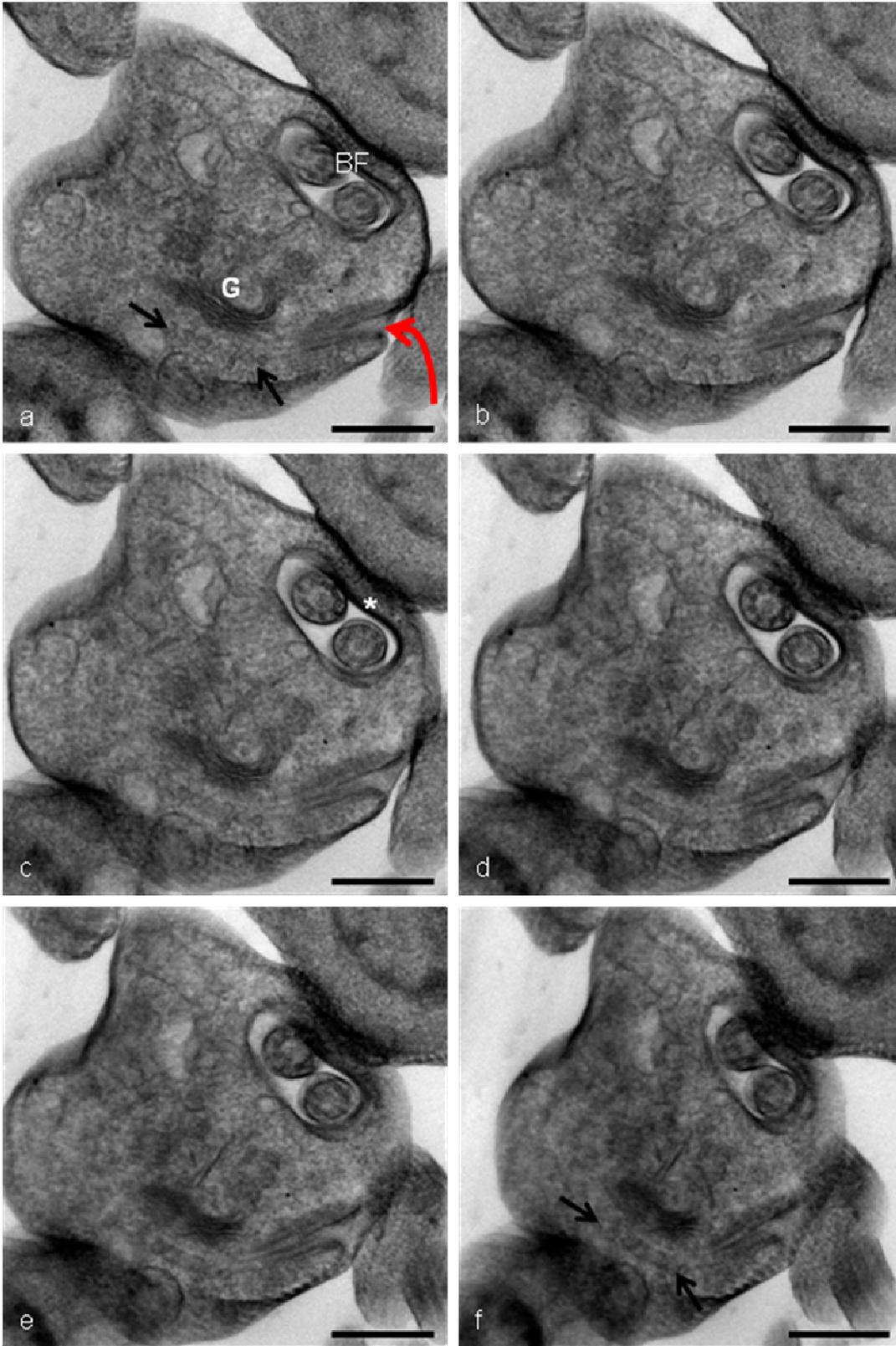


Figura 20: Imagens que integram a série obtida no microscópio de tomografia eletrônica (TECNAI). Note que à medida que os ângulos mudam, conseguimos melhor visualizar vesículas alinhadas com a citofaringe. Observe que a célula estava em divisão e por isso apresenta dois flagelos. Note o espessamento sob a membrana da bolsa flagelar (asterisco) e a ausência da protrusão do citóstoma. BF - bolsa flagelar, G - Golgi. Seta vermelha: abertura do citóstoma. Setas pretas: vesículas . Barras: 200nm



4.4- Citoesqueleto e o material endocitado:

Com o intuito de relacionar microtúbulos e a via endocítica utilizamos um protocolo de processamento de amostras diferenciado, proposto por Dallai e Afzelius (1990), tal protocolo utiliza ácido tânico para impregnação de proteínas, deste modo, o citoesqueleto é evidenciado facilitando a observação dos seus elementos. Os epimastigotas de *T.cruzi* foram submetidos a ensaios de endocitose e processados de acordo com o protocolo de Dallai e Afzelius (1990) e observados por microscopia eletrônica de transmissão. Com este processamento tivemos a rara oportunidade de visualizar trilhos aparentemente de microtúbulos associados a vesículas contendo traçador endocítico (Fig.: 21 a-c).

Com este processamento especial, também analisamos a proximidade dos reservossomos com os microtúbulos subpeliculares. Este processamento nos possibilitou visualizar filamentos conectando os reservossomos aos microtúbulos subpeliculares (Fig.: 22 a). Analisamos também esta íntima ligação em epimastigotas submetidos à endocitose de peroxidase e processados rotineiramente para microscopia eletrônica de transmissão. Notamos que filamentos apresentam subunidades (Fig.: 22 b, c). Os filamentos são curtos e não são observados em todos os epimastigotas, indicando que sua atividade pode ser restrita a alguma etapa da via endocítica. Em cortes em que os microtúbulos subpeliculares não são visualizados com clareza (Fig.: 23 a) as pontes também não são vistas. Porém, notamos um material entre os reservossomos e a membrana plasmática do protozoário (Fig.: 23 b, c).

A área do corpo celular do *T.cruzi* é pequena e os reservossomos representam cerca de 5% do citoplasma destes protozoários. Para evidenciar que a ligação dos reservossomos com os microtúbulos subpeliculares é física e que não ocorre ao acaso, realizamos ensaios de endocitose com Tf-Au e logo em seguida submetíamos estes epimastigotas a ciclos de estresse físico de congelamento e descongelamento sucessivos. Os epimastigotas provenientes deste experimento se mostraram totalmente lisados por microscopia eletrônica de transmissão. Os cortes não favoreciam a visualização dos microtúbulos subpeliculares. Mesmo assim, visualizamos que a associação dos reservossomos carregados de Tf-Au com a membrana subpelicular se

mantinha. Em algumas micrografias o sítio de contato era restrito à pequena área do reservossomo (Fig.: 24 a). Em outras, a área de contato era maior (Fig.: 24 b), inclusive, este contato parece deformar o reservossomo. Na figura 24 c podemos notar a presença de filamentos intermediando esta ligação.

Figura 21: Epimastigotas de *T.cruzi* controle e submetidos a endocitose de transferrina ouro e fixados por 5 dias em solução contendo ácido tânico. a) Vesícula contendo traçador endocítico associadas aos microtúbulos. Barra: 500 nm. b) Vesícula com material endocitado brotando de um caminho de microtúbulos. Note que a vesícula não possui lúmen revestido. Barra: 0,5µm.

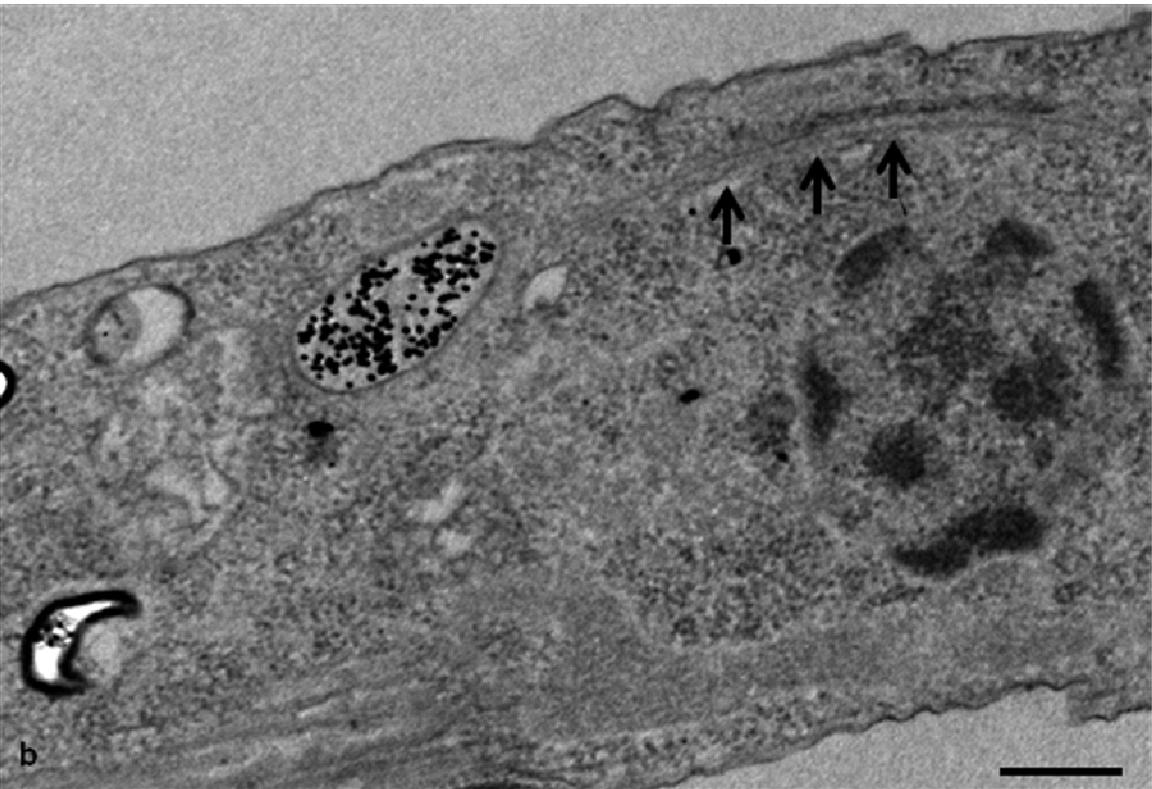
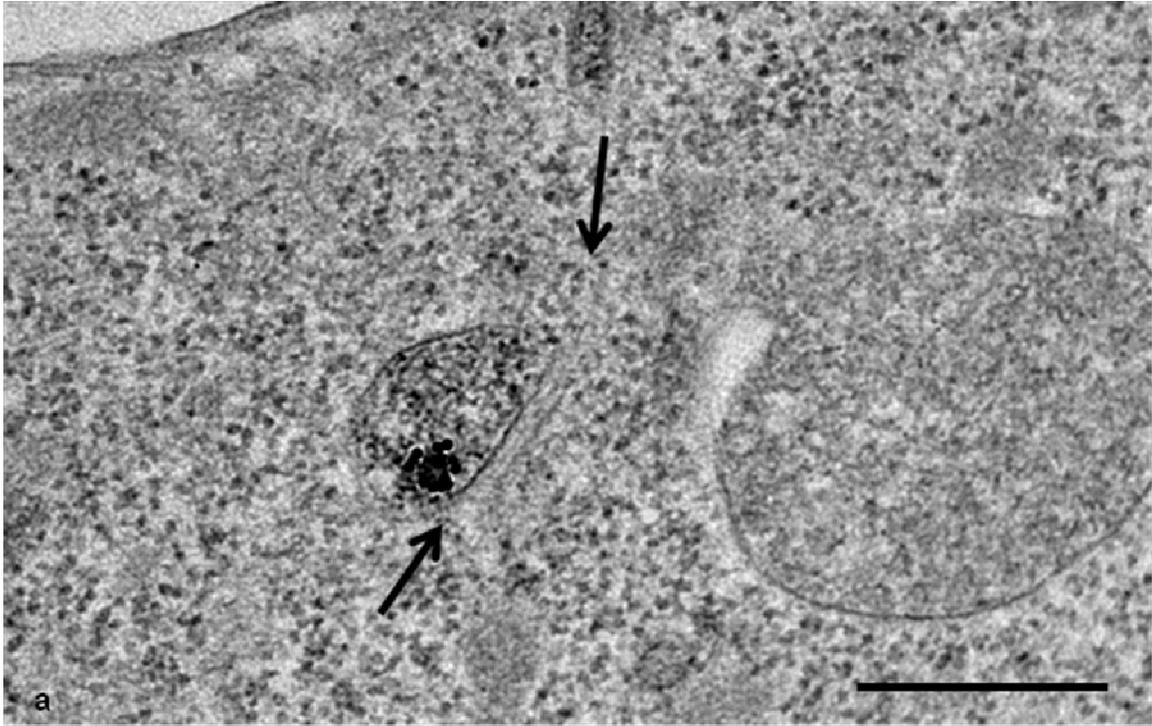


Figura 22: Associação reservossomos - microtúbulos subpeliculares. Microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas provenientes de endocitose de peroxidase. **a)** Em epimastigota controle processado pelo método de Dallai, visualizamos filamentos curvos entre os microtúbulos subpeliculares e o reservossomo (seta preta). Barra: 5 μ m. *Inset:* filamento (seta branca) e microtúbulos em maior aumento. **b e c)** Epimastigotas submetidos à endocitose de peroxidase e processados pelo método convencional apresentando ligação entre os reservossomos e os microtúbulos subpeliculares, nestas micrografias podemos observar várias subunidades formando pontes (setas). Barras: 0,5 μ m e 0,2 μ m.

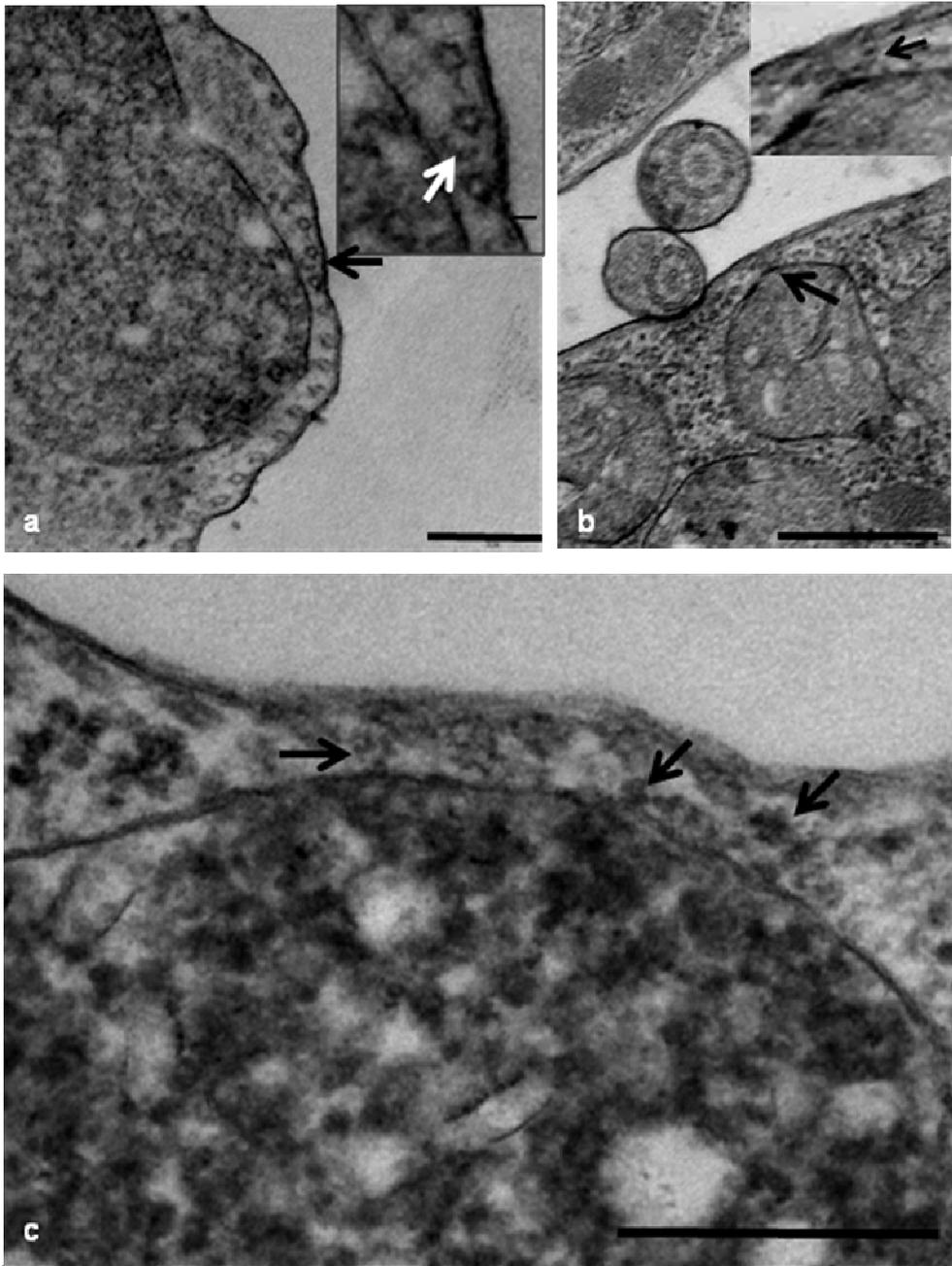


Figura 23: Material elétron-denso entre os reservossomos e os microtúbulos subpeliculares. Epimastigotas submetidos à endocitose de peroxidase e processados pelo método convencional **a)** Podemos notar um reservossomo com formato característico e outro mais alongado Barra: 0,5µm. **b)** Maior aumento do reservossomo arredondado, observe material entre a organela e os microtúbulos. Barra: 0,1µm. **c)** Maior aumento do perfil alongado do reservossomo, note que nesta área também podemos observar material elétron-denso, porém não conseguimos visualizar as pontes. Barra: 0,1µm.

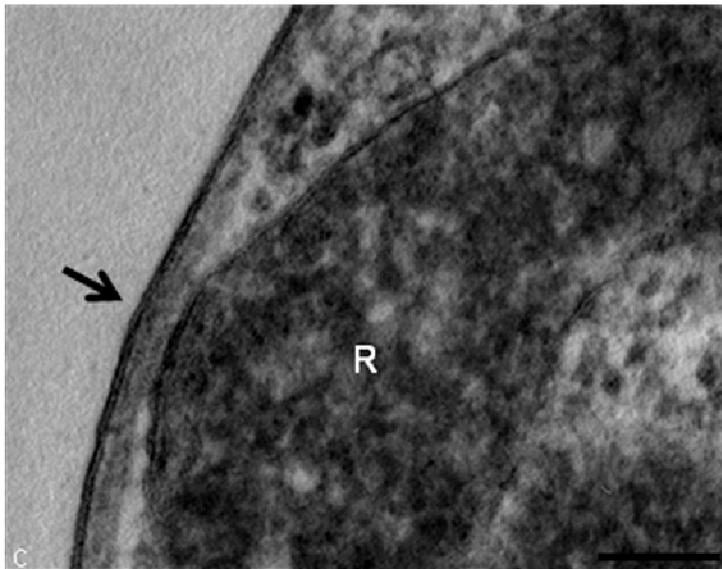
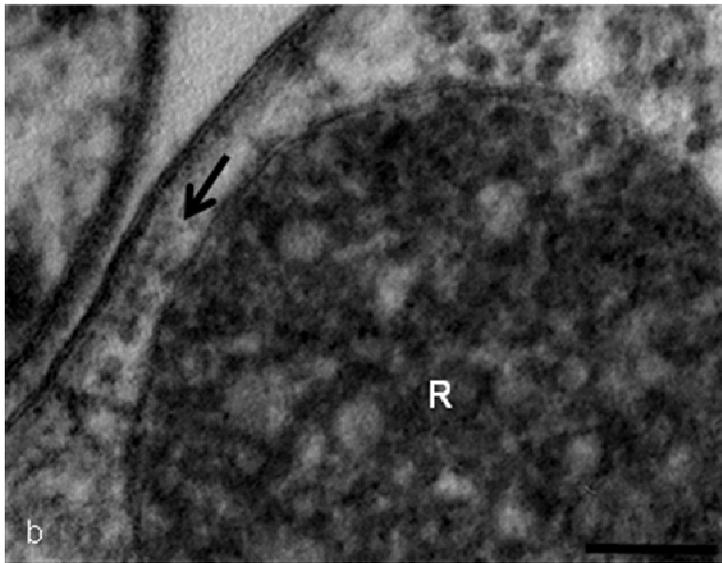
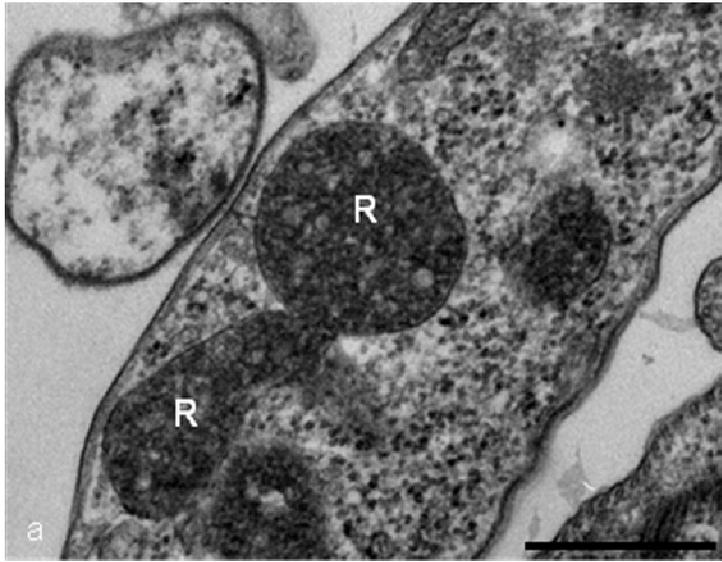
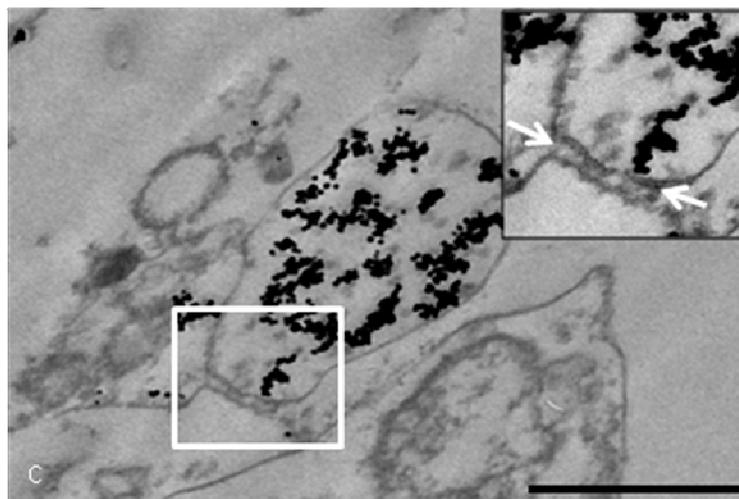
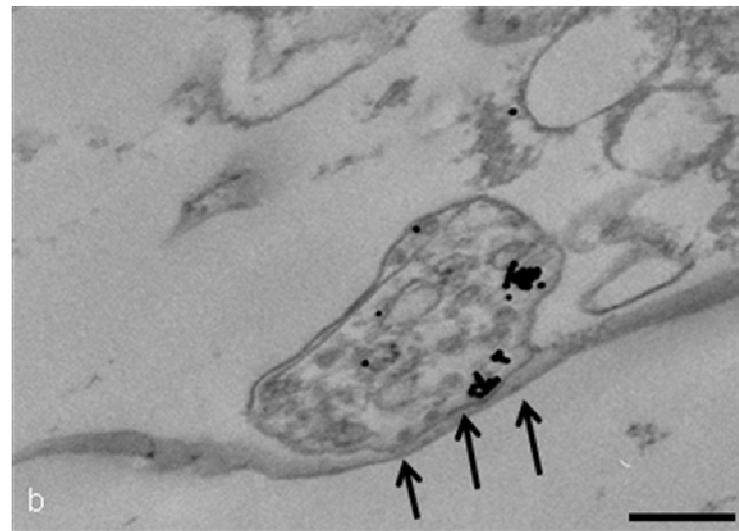
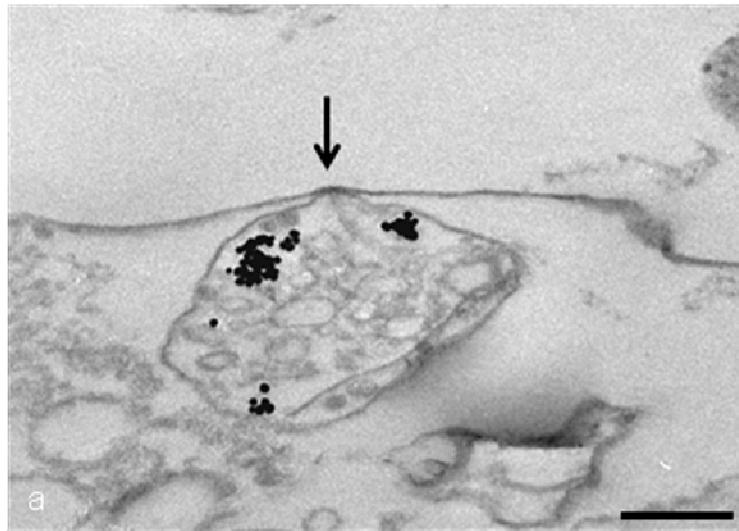


Figura 24: Epimastigotas submetidos à endocitose de Tf-Au e subsequentemente lisados por congelamento. **a)** Reservossomo continua associado à membrana do protozoário por uma pequena porção. **b)** Imagem revela íntima ligação entre reservossomo e a membrana do protozoário (setas pretas). **c)** Note a existência de um material unindo reservossomo e a membrana (setas brancas). Barras: 2µm



4.5- Localização do anticorpo 3G4:

Tendo em vista o epítipo reconhecido pelo anticorpo 3G4 (reconhece β -tubulina), é interessante analisar sua localização e tentar relacionar com a atividade endocítica. Já que a endocitose ocorre somente na porção anterior dos epimastigotas e o material endocitado precisa brotar dos sítios de entrada, fundir-se aos endossomos e finalmente aos reservossomos, é muito provável que esta atividade seja dependente de elementos do citoesqueleto. Na imunofluorescência o anticorpo 3G4 reconheceu os reservossomos localizados em sua posição posterior característica (Fig.: 25). Realizamos também a imunofluorescência de tripomastigotas, porém nenhum sinal foi registrado. O epítipo do anticorpo 3G4 já havia sido identificado como uma região conservada da β -tubulina, no entanto, nossos ensaios de imunofluorescência não reconheceram os microtúbulos subpeliculares tampouco o flagelo do protozoário. Este resultado nos levou à hipótese de que o anticorpo estaria reconhecendo uma porção da tubulina que só seria exposta durante o tráfego dos reservossomos. Com intuito de analisar se tal epítipo só era exposto em determinada etapa do tráfego endocítico e também do ciclo celular do *T. cruzi*, realizamos ensaios de endocitose com epimastigotas de diferentes dias de cultivo, do terceiro dia ao quinto dia. A quantidade de Tf-FITC endocitada aumenta com o dia de cultivo, o quinto dia apresentou maior atividade endocítica (Fig.: 26). Utilizamos estes epimastigotas com endocitose de Tf-FITC para realizarmos um ensaio de imunofluorescência com o anticorpo 3G4. As observações revelaram que o reconhecimento do anticorpo não é restrito a uma determinada etapa, pois tal marcação não dependia do acúmulo de traçador endocítico, sendo similar em todos os dias (Fig.: 27). Realizamos também, a imunofluorescência do 3G4 em reservossomos isolados, porém nenhuma marcação foi revelada (dados não mostrados). A partir da imunolocalização foi possível confirmar a localização reservossomal, mas que tal marcação era perdida quando isolávamos estas organelas. A imunocitoquímica de epimastigotas incluídos em resina hidrofílica revelou uma marcação muito diferente daquela obtida por imunofluorescência. O anticorpo 3G4 reconheceu estruturas localizadas próximas à bolsa flagelar e em vesículas no citoplasma (Fig.: 28 a). Ainda neste material, visualizamos o reconhecimento da membrana dos reservossomos, o lúmen e também o citoplasma do protozoário (Fig.: 28b). Na micrografia de menor aumento, foi possível

visualizar o reservossomo e o citoplasma sendo reconhecidos (Fig.: 28c). Os resultados da imunocitoquímica não condizem com os obtidos através da imunofluorescência, por isso, resolvemos realizar um experimento onde as células foram incubadas com o anticorpo 3G4 em suspensão antes da inclusão. Após permeabilização, bloqueio e incubação com o anticorpo primário, separávamos uma alíquota para imunofluorescência, que era posta para aderir e depois incubada com anticorpo conjugado a fluorocromo. A outra alíquota era incubada com anticorpo conjugado à ouro (ainda em suspensão) e processada para microscopia eletrônica de transmissão. Como esperado, a alíquota observada em microscópio óptico apresentou marcação nos reservossomos (Fig.: 29 a, b). A imunocitoquímica revelou a marcação nos reservossomos, tanto no interior quanto na parte voltada para o citosol (Fig.: 29 c). Também foi possível observar marcações nos endossomos iniciais (Fig.: 29 d) e em vesículas próximas aos reservossomos (Fig.: 29 e).

Utilizamos o protocolo de isolamento de reservossomos estabelecido pelo nosso grupo para obtenção de frações puras destas organelas. Esta fração foi preparada para SDS-PAGE, separadas em gel de poliacrilamida e subsequentemente transferida para folha de nitrocelulose. A incubação com anticorpo 3G4 revelou uma banda (Fig.: 30). Para averiguar se só havia β -tubulina ou somente microtúbulos expondo o epítipo de interesse, também utilizamos o anticorpo B-5-12, que reconhece α -tubulina. A membrana contendo o extrato dos reservossomos isolados também foi reconhecida pelo anticorpo B-5-12 (Fig.: 30). Intrigantemente, tal banda possuía massa molecular similar àquela reconhecida pelo anticorpo 3G4.

Figura 25: Imunofluorescência do anticorpo 3G4. a) Contraste diferencial interferencial (DIC). **b)** Visão geral do sinal do anticorpo 3G4. Barras: 2 μm . **c)** Contraste diferencial interferencial (DIC) de um epimastigota. **d)** Maior aumento mostrando em detalhe a localização. Barras: 10 μm .

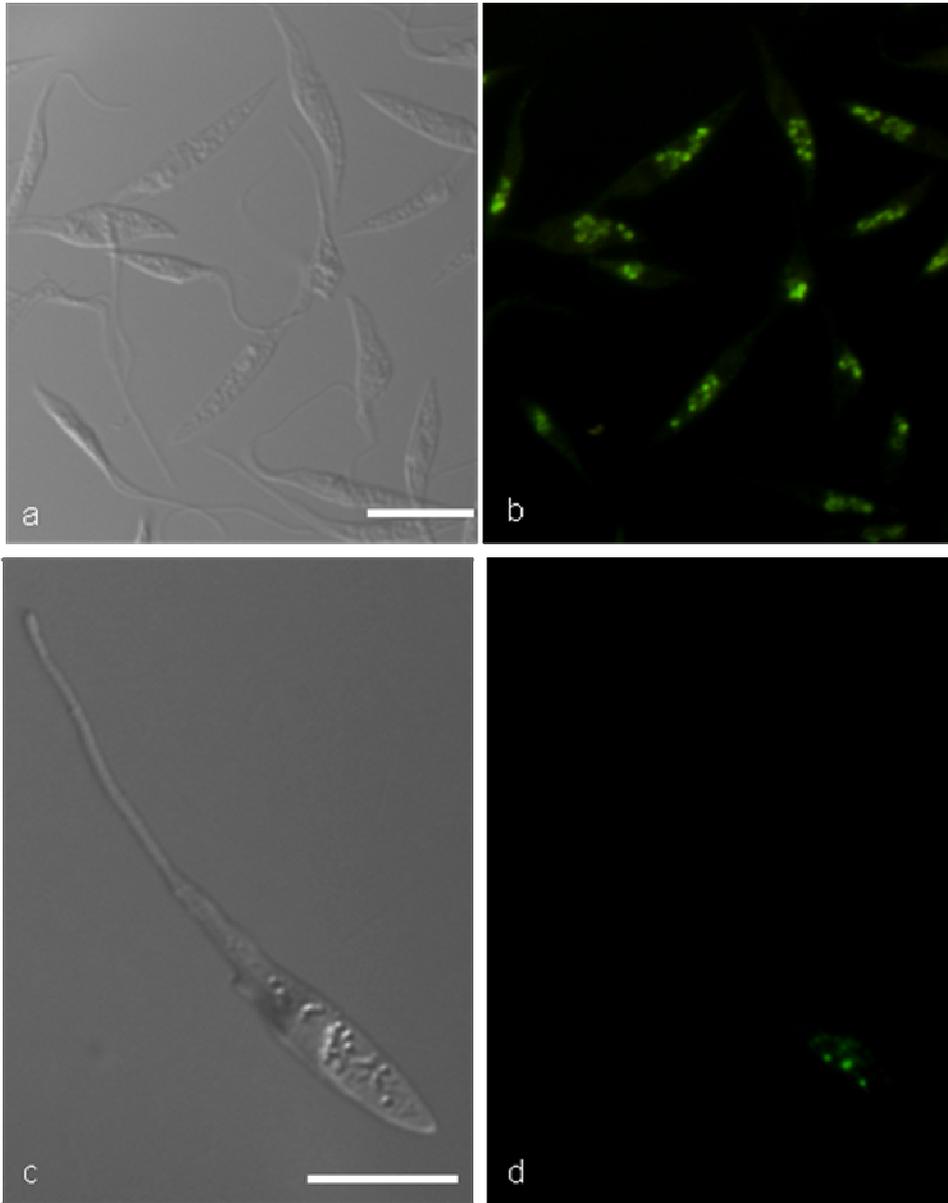


Figura 26: Leitura da fluorescência do traçador Tf-FITC em leitor de placas. As barras representam a fluorescência resultante do acúmulo de traçador. A taxa de endocitose é maior no quinto dia.

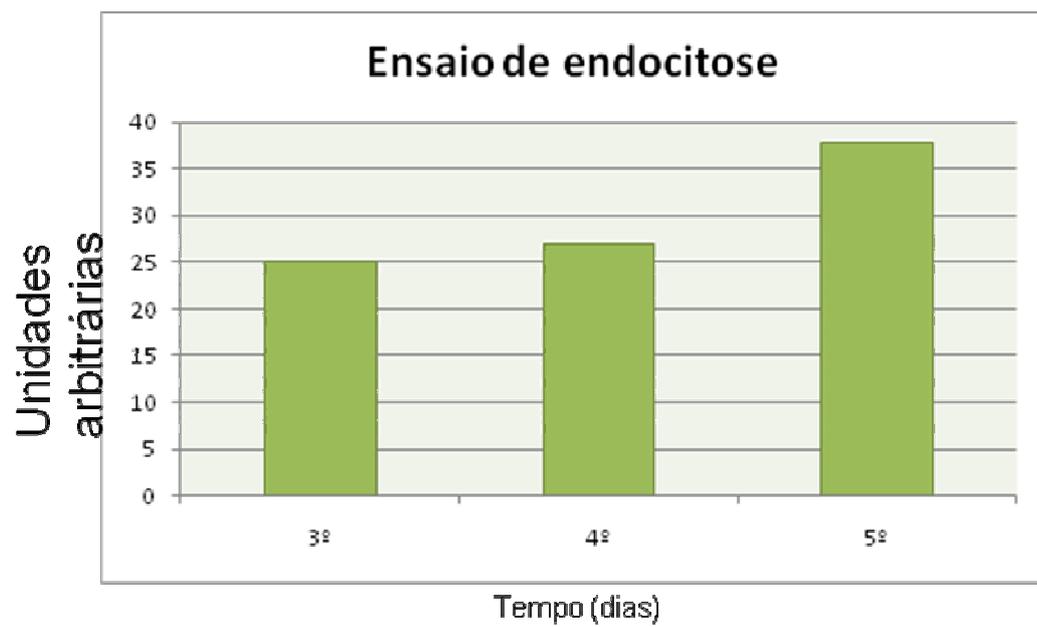


Figura 27: Endocitose de Tf-FITC e imunofluorescência do anticorpo 3G4 no quinto dia de cultivo. a) DIC dos epimastigotas. b) Imagem do traçador endocítico (Tf-FITC). c) Sinal da localização do anticorpo 3G4. Barra: 2µm

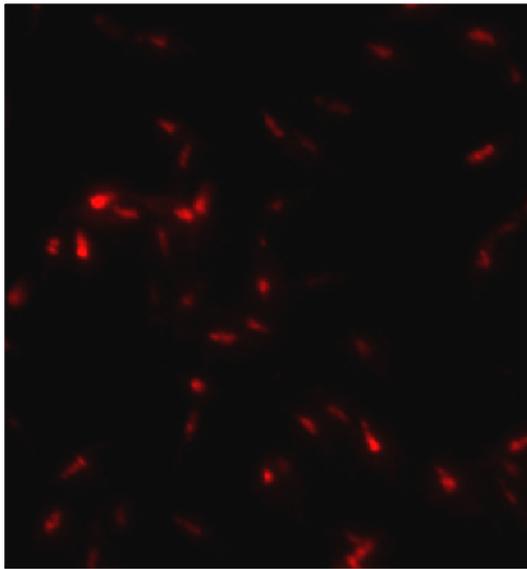
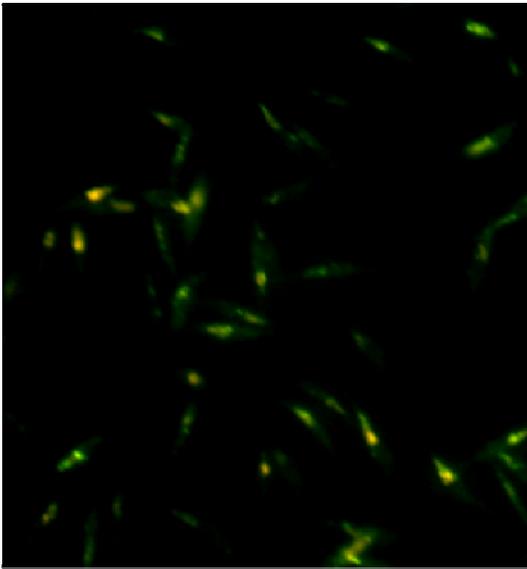
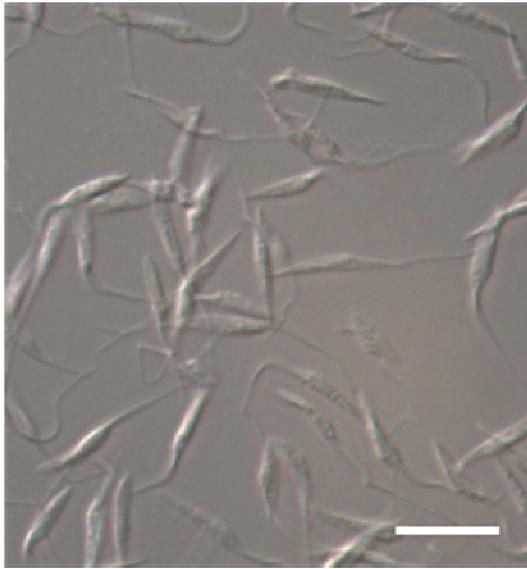


Figura 28: Imunocitoquímica do anticorpo 3G4 em cortes de resina hidrofílica. **a)** Epimastigota exibindo marcação próxima à membrana da bolsa flagelar (seta grossa) e próximas aos endossomas iniciais (seta fina). **b)** Note a presença de marcações no interior dos reservossomos (R) (seta fina), na membrana do reservossomo (seta grossa). **c)** Anticorpo 3G4 reconhecendo reservossomo (seta grossa), endossoma inicial (seta fina) e vesículas (seta branca). N - núcleo. Barras: 0,5µm

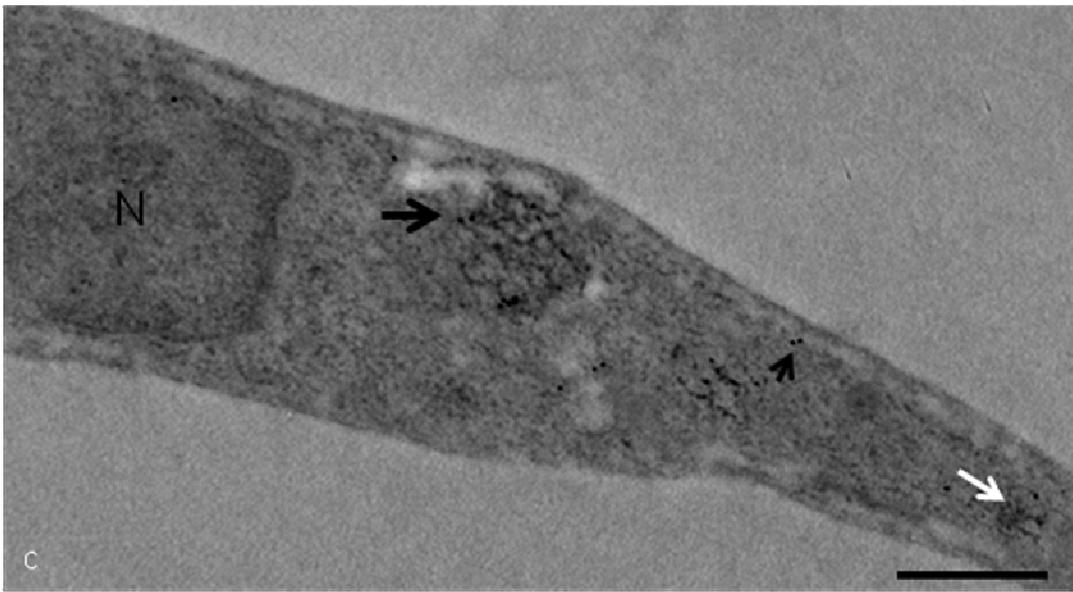
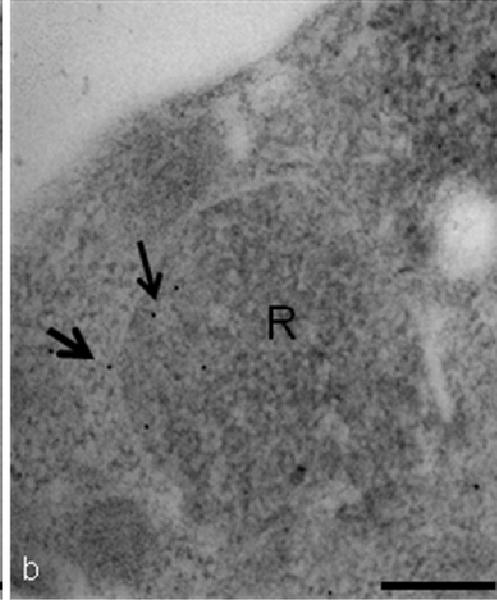


Figura 29: Imunofluorescência e imunocitoquímica pre-embedding do anticorpo 3G4. a) DIC do epimastigota de *T.cruzi*. b) Reconhecimento do anticorpo aos reservossomos. Barra: 2 μm . c) A mesma amostra foi incubada com anticorpo secundário conjugado a ouro e processada para microscopia eletrônica de transmissão. A imagem revela marcação na periferia de um reservossomo (seta). Barra: 0,5 μm d) Também visualizamos marcação nos endossomos iniciais (seta preta) e em vesículas (seta branca). R-reservossomo. Barras: 0,5 μm

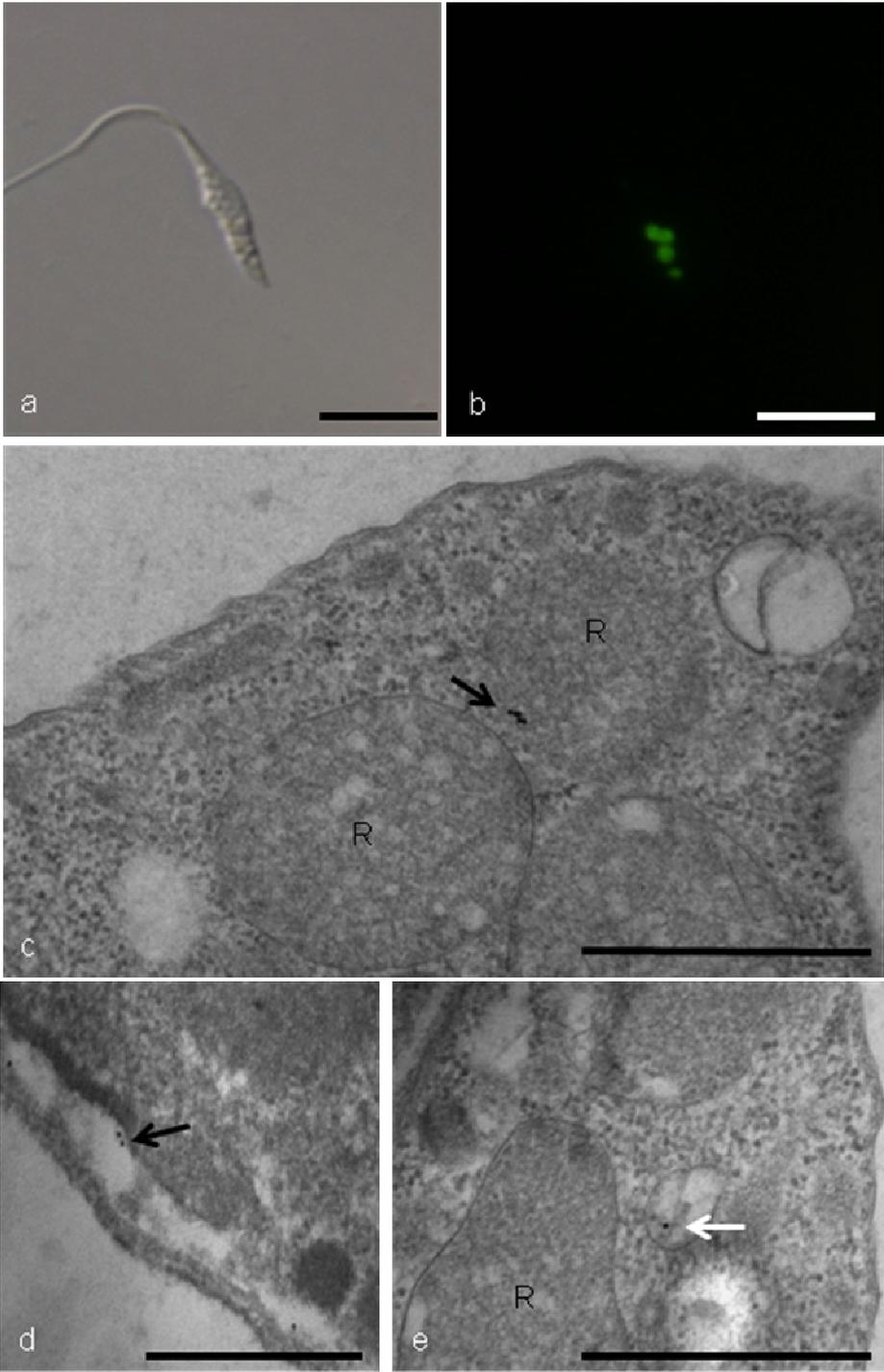
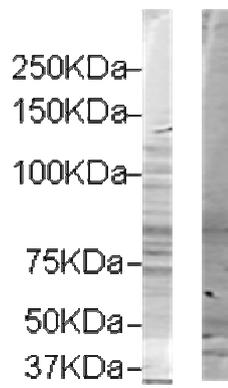


Figura 30: Western Blot do anticorpo monoclonal 3G4. Incubação com o anticorpo monoclonal anti- β - tubulina 3G4: **1**: Padrão de peso molecular. **2**- Extrato total de epimastigotas. **3**- O anticorpo 3G4 reconhece β - tubulina presente na fração de reservossomos. Incubação com o anticorpo monoclonal anti- α - tubulina B-5-12: **1**- Padrão de peso molecular. **2**- Extrato total de epimastigotas. **3**- Fração de reservossomos apresentando uma banda de α -tubulina.

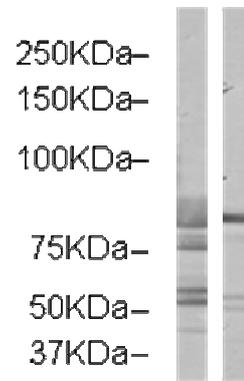
Anticorpo 3G4

1 2 3



Anticorpo B512

1 2 3



5- Discussão:

Um aspecto fundamental para o entendimento da biologia celular do *T.cruzi* é o estudo da captação de nutrientes por estas células, pois tal processo constitui um dos principais desafios encontrados por este parasita durante seu complexo ciclo biológico, sendo essencial para sua diferenciação e desenvolvimento.

Estudos sobre a via endocítica de *T.cruzi* demonstraram que este processo é altamente polarizado e coordenado. O processo inicia-se com vesículas brotando da bolsa flagelar e do complexo citóstoma-citofaringe, o material endocitado funde-se com uma rede túbulo-vesicular de endossomas iniciais. Dos compartimentos endossomais iniciais brotam vesículas que se fundem aos reservossomos (Porto-Carreiro, *et al.* 2000), as organelas finais da via endocítica (Soares & De Souza 1988). Muitas proteínas estão envolvidas neste evento e garantem a eficiência deste processo. Um dos elementos que tem participação fundamental neste evento é o citoesqueleto.

Os tripanosomatídeos possuem um arranjo de microtúbulos muito peculiar, formando uma espécie de gaiola helicoidal logo abaixo da membrana plasmática. Este arranjo difere muito da distribuição radial dos microtúbulos, a partir do centrosomo em direção à periferia, em eucariotos superiores. Devido à presença dos microtúbulos subpeliculares, a endocitose do protozoário *T.cruzi* está restrita aos sítios onde estes microtúbulos estão ausentes: bolsa flagelar e citóstoma.

5.1- Bolsa flagelar:

A bolsa flagelar constitui o único sítio de endocitose e de exocitose em *T. brucei* e por isso tem sido amplamente estudada. Nestes protozoários, a bolsa flagelar apresenta dois domínios de membrana distintos, o colar por onde o flagelo emerge da bolsa e o colar ciliar localizado próximo ao corpúsculo basal na altura onde o flagelo entra na bolsa.

O colar da bolsa flagelar de *T. brucei* é constituído por um anel elétron denso e a proteína BILBO1 foi a única a ser identificada e localizada nesta estrutura (Bonhivers *et al.*, 2008). BILBO1 é essencial para a biogênese da bolsa flagelar. Deste modo, as células resultantes de RNA interferencial possuem flagelo que emerge diretamente da membrana do protozoário (revisto por Field & Carrington, 2009). Além disso, a supressão da proteína

em questão leva ao posicionamento incorreto do novo flagelo durante a citocinese. A ausência da bolsa flagelar acaba por extinguir a endocitose (Bonhivers *et al.*, 2008). Por ser uma proteína relacionada à endocitose, se torna interessante estudar sua localização em *T. cruzi*. Através do western blot (Fig:11) comprovamos a presença da proteína BILBO1 em *T.cruzi*, porém com um massa molecular diferente daquele encontrado em *T.brucei*. A proteína de *T.brucei* possui 67,3 kDa (Bonhivers *et al.*,2008), enquanto o massa molecular predito da proteína de *T.cruzi* é de 66,3 kDa (site TriTrypDB acessado dia 05 de setembro de 2010). Em nosso estudo obtivemos cerca de 62 kDa na avaliação preliminar da massa molecular da proteína reconhecida pelo anticorpo. Para confirmar esta avaliação outros *western blots* serão feitos. Para desvendar a localização da proteína realizamos imunofluorescência das três formas evolutivas de *T.cruzi*. Observamos que a bolsa flagelar e o flagelo dos epimastigotas foram reconhecidos (Fig:12a-d). O reconhecimento do flagelo não ocorre em *T.brucei*. A imunofluorescência sugere que a proteína BILBO1 também é expressa em *T.cruzi*, porém com uma marcação adicional. A forma tripomastigota não apresentou a marcação na bolsa flagelar, mas o flagelo foi reconhecido (Fig:12e-f). Já a forma amastigota não apresentou marcação. Como já foi mencionado, o *T.cruzi* possui 2 genes ortólogos para BILBO1 e possui dois sítios de endocitose, por isso, suspeitávamos que o citóstoma também seria marcado pelo anticorpo. Através da imunofluorescência esta hipótese foi derrubada. A imunocitoquímica de formas epimastigotas tanto por contrastação negativa (Fig:13a) quanto por cortes de resina hidrofílica (Fig:13b e c) confirmou o reconhecimento de bolsa flagelar e flagelo. A proteína Bilbo-1 está exclusivamente localizada na bolsa flagelar de *T.brucei*. Das formas evolutivas de *T.cruzi*, é a que possui atividade endocítica proeminente é a epimastigota, levando este fato em consideração, podemos supor que a proteína Bilbo-1 está de alguma forma envolvida na endocitose. Por outro lado, se pensarmos que somente os flagelos dos epimastigotas e tripomastigotas são reconhecidos, podemos especular que a proteína Bilbo-1 está associada ao transporte intraflagelar, evento crucial para a biogênese e manutenção do flagelo. A proteína pode estar totalmente ausente nos amastigotas ou ser expressa em níveis irrisórios e por isso não apresentam sinal na imunofluorescência. A proteína BILBO1 ainda poderia estar envolvida no deslocamento da bolsa flagelar na diferenciação de epimastigotas para tripomastigota.

No sítio de entrada do flagelo na bolsa flagelar existem quatro microtúbulos (4MT) que parecem participar da endocitose (Gadelha *et al.*, 2009), tais microtúbulos só foram observados em *T.brucei*. No presente trabalho foi possível observar por microscopia eletrônica de transmissão de epimastigotas de *T.cruzi* que os 4MT também estão presentes na bolsa flagelar desde a altura do corpúsculo basal, mas na micrografia aparecem na zona de transição do flagelo (Fig: 14a). Não realizamos experimentos para analisar se nestes protozoários os 4MT também participam na etapa inicial endocitose. Especulamos que estes microtúbulos devem desempenhar papel similar àqueles propostos para *T.brucei*, onde estes microtúbulos delimitariam um canal que seria a interface entre o interior do protozoário e o ambiente, tendo como principal função concentrar os nutrientes a serem endocitados. Também foi possível observar um material elétron denso na região por onde o flagelo emerge da bolsa flagelar (Fig:14b), assim como observado em *T.brucei*. O *T.cruzi* não possui bolsa com formato idêntico ao visto em *T.brucei*; porém, também apresenta espessamento na membrana no sítio de saída do flagelo. Este espessamento pode ocorrer devido à alta concentração de proteínas transmembrana formando junções do tipo hemi-desmossomo, como já foi descrito através de réplicas de criofratura (Souto-Padron e De Souza, 1979).

5.2- Complexo citóstoma-citofaringe:

Os protozoários do grupo estercorária possuem um sítio de endocitose adicional, o complexo citóstoma-citofaringe que é constituído por uma abertura na superfície do protozoário (o citóstoma) seguida de uma invaginação (a citofaringe). Trabalhos sobre a morfologia desta estrutura relatam a existência de microtúbulos e vesículas ao longo da citofaringe, de função ainda não conhecida (Milder & Deane, 1969). Nenhum estudo detalhado da ultraestrutura do complexo citóstoma- citofaringe foi feito. O presente trabalho utilizou epimastigotas processados rotineiramente, com tampão PHEM ou com ácido tânico para microscopia eletrônica de transmissão para realizar análises minuciosas. Na década de 80 foi estabelecido que a invaginação do citóstoma surgia a partir da bolsa flagelar, este fato foi demonstrado através de microscopia eletrônica de transmissão. Anos mais tarde esta hipótese foi derrubada por meio da microscopia eletrônica de varredura de alta resolução (Vataru-Nakamura *et al.* 2005), que mostrou que a abertura do citóstoma é localizada na superfície do protozoário. Observamos um plano

de corte que provavelmente é similar ao responsável pela conclusão de que a abertura do citóstoma surgiria a partir da bolsa flagelar (Fig:15a), mas também obtivemos muitos cortes que evidenciam que o citóstoma surge a partir da superfície do protozoário próximo mas não dentro da bolsa flagelar (Fig: 15b- c). É interessante pensar que estas duas regiões são ricas em glicocálice e receptores e a proximidade poderia otimizar a taxa de endocitose do protozoário.

Durante as análises, supomos que a abertura do citóstoma continha uma vesícula, tal estrutura apresentava glicocálice similar ao visto na abertura (Fig:16a-c). Após observar outros cortes notamos que a superfície do citóstoma possui, na verdade, uma protrusão (Fig:16d), que possui material citoplasmático e também pode ser visualizada na figura 17c. A protrusão na superfície do citóstoma que só tinha sido observada em epimastigotas mutantes de fosfatidilinositol 3- cinase e por isso foi relacionada com a técnica que pode causar mudanças morfológicas na célula alvo (Schoijet *et al.*, 2008). Nossas observações sugerem fortemente que a protrusão faz parte deste sítio de endocitose e poderia estar auxiliando no reconhecimento de partículas a serem endocitadas. Alguns trabalhos relacionaram esta protrusão com o tratamento com drogas que afetam citoesqueleto (Dantas *et al.*, 2003, Porto-Carreiro *et al.*, 2004, Corrêa, *et al.*, 2008). Nestes, a atividade endocítica é inibida, porém a protrusão continua agregando traçadores endocíticos. Este dado corrobora com a nossa hipótese de que a protrusão auxiliaria no reconhecimento de partículas.

Logo abaixo da protrusão está a abertura do citóstoma, que já havia sido amplamente estudada através de técnicas de criofratura dando ênfase às partículas intramembranares presentes nesta região. Poucos estudos foram realizados sobre morfologia do citóstoma-citofaringe por microscopia eletrônica de transmissão. Nossas observações revelaram visões interessantes e até intrigantes desta estrutura. Em nossas micrografias a abertura do citóstoma se mostrou sendo sustentada por elementos do citoesqueleto, que nos cortes, aparecem constituídos de 4-5 microtúbulos ligados à membrana plasmática do protozoário (Fig:17 a, b e c). Flagramos cortes do princípio da citofaringe, onde visualizamos que o começo desta invaginação tem formato de fechadura (Fig:18a). Cortes de regiões mais avançadas do citóstoma apresentam estrutura que lembra um cocar, constituído de 7-8 microtúbulos (Fig:18b e c). Também visualizamos

esta estrutura na região perinuclear (Fig: 18d). Estes dados comprovam que padrão de microtúbulos continua o mesmo até a porção final da citofaringe. A partir de então supomos que os microtúbulos formam uma espécie de calha que orienta e sustenta esta invaginação de membrana. Procuramos nos arquivos de nosso laboratório dados sobre esta estrutura, com intuito de averiguar se um padrão diferente de microtúbulos já havia sido observado. Encontramos uma única imagem contendo a estrutura que lembra um cocar, porém conseguimos distinguir 8 microtúbulos circundando completamente a citofaringe (Wanderley de Souza, tese de doutorado, 1975). Não fomos capazes de visualizar microtúbulos circundando completamente a citofaringe (Fig.: 18c).

Na maioria de nossas observações, pudemos visualizar material elétron-denso (Fig.: 19 a, b) e vesículas muito próximas à citofaringe (Fig.: 19 c, d). Na série obtida através do microscópio de tomografia eletrônica TECNAI, visualizamos toda a extensão que constitui a citofaringe e observamos várias vesículas orientadas na porção final desta invaginação (Fig.: 20). Estudos sobre a influência das drogas que afetam citoesqueleto na endocitose de *T.cruzi* relataram vesículas adjacentes à citofaringe e relacionaram esta ocorrência às drogas utilizadas (Dantas, *et al.*,2003 e Corrêa *et al.*,2008). Nossas observações concluíram que as vesículas estão associadas de alguma forma à citofaringe. Desconhecemos a origem destas vesículas, mas é possível que sejam provenientes de endocitose. Em uma das nossas imagens é possível inclusive observar uma vesícula contendo material com elétron densidade similar àquela observada no lúmen da citofaringe (Fig.: 19 c, d). Este dado corrobora com a hipótese de que as vesículas sejam resultado de atividade endocítica. As vesículas poderiam estar brotando pela lateral desprovida de microtúbulos da citofaringe. Outra hipótese é que as vesículas sejam provenientes do Golgi e estejam fundindo na citofaringe transportando receptores ou ainda a próton-ATPase características desta invaginação (Porto-Carreiro *et al.*,2000 e Vieira *et al.*, 2005).

5.3- Citoesqueleto e os reservossomos:

A polarização das organelas da via endocítica, é um forte indício da participação dos elementos do citoesqueleto para manutenção e eficiência da endocitose em *T.cruzi*. Utilizamos epimastigotas submetidos à endocitose processados rotineiramente ou na presença de ácido tânico. O ácido tânico quando utilizado juntamente com glutaraldeído

impregna proteínas, evidenciando deste modo os elementos do citoesqueleto. Nossas primeiras observações já revelaram um evento muito interessante. Visualizamos vesículas contendo traçador endocítico associadas a trilhos (Fig.: 21a), além de vesículas também com traçador, porém estas pareciam brotar de um caminho de microtúbulos (Fig: 21b e c). Trilhos de microtúbulos só haviam sido visualizados em eucariotos superiores e em estudos de *Leishmania mexicana* utilizando a técnica *freeze substitution* (Weise *et al.*, 2000). Nestas células, o papel dos microtúbulos está muito bem determinado: influenciam no posicionamento adequado das organelas e promovem o movimento de compartimentos intracelulares pelo intermédio de proteínas motoras. Após extensivas observações no microscópio eletrônico de transmissão notamos que alguns reservossomos se encontravam muito próximos aos microtúbulos subpeliculares, com maiores aumentos flagramos filamentos intermediando esta íntima ligação (Fig.: 22a).

Como foi enfatizado, visualizamos pontes como filamentos contínuos (sem subunidades) (Fig:22a) e pontes contendo subunidades (Fig:22b e c). É importante ressaltar que as primeiras são referentes às preparações com ácido tânico e as segundas são resultado de epimastigotas processados rotineiramente para microscopia eletrônica de transmissão. Indagamo-nos o porquê das pontes aparecerem com diferentes aspectos em nossas micrografias. Uma das explicações possíveis para este dado é que o ácido tânico ao impregnar os filamentos acaba por mascarar as subunidades. Outra possibilidade é que os diferentes planos de corte mostrem aspectos diferentes destas pontes. Mas não podemos subestimar a possibilidade de que as pontes de fato assumam diferentes aspectos de acordo com as diferentes etapas do transporte dos reservossomos ao longo dos microtúbulos.

Notamos que a visualização destes filamentos era facilitada em cortes transversais dos epimastigotas. Percebemos inclusive que a presença dos filamentos é mais freqüente na região mediana do corpo celular. Deste modo, uma função hipotética para estas pontes seria “puxar” os reservossomos para a porção mais posterior do protozoário. Por se tratar de cortes não sabemos se as pontes só estão presentes em determinada etapa da via endocítica ou se determinados cortes não favorecem a visualização, como nas figuras 23 (a,b e c). Nas quais não conseguimos visualizar os microtúbulos subpeliculares,

tampouco as pontes, mas notamos a presença de material elétron-denso entre os reservossomos e a membrana plasmática do protozoário.

Dentre as diversas funções desempenhadas pelos microtúbulos podemos citar a participação em transporte de organelas (Vale, *et al.*,1987). A locomoção de organelas da via endocítica também é feita por microtúbulos juntamente às proteínas motoras dineínas e cinesinas, como foi demonstrado para o transporte de lisossomos (Hollenbeck and Swanson, 1990). As pontes podem representar proteínas motoras que interagem com os microtúbulos e com as organelas. Como os microtúbulos subpeliculares possuem o pólo positivo na porção posterior do protozoário (Scott *et al.*, 1997) a proteína motora em questão seria da família das cinesinas. Esta família é composta por proteínas que utilizam energia derivada do ATP para transportar uma variedade de vesículas intracelulares para a região positiva dos microtúbulos. A cinesina-1 tem sido amplamente estudada e possui cadeia pesada com domínio motor no N-terminal. Este domínio motor apresenta atividade catalítica e ligadora de microtúbulos. A região C-terminal possui duas cadeias leves responsáveis pela ligação com as vesículas ou organelas a serem transportadas (Revisto por Gennerich & Vale, 2009). O genoma do *T.cruzi* identificou 79 genes para cinesinas que possuem ortólogos em *L.major* e *T.brucei* (El-Sayed, *et al.*,2005a). As cinesinas possuem cerca de 70 nm e por isso podem ser visualizadas em microscópio eletrônico de transmissão que possuem limite de resolução de 0,2 nm. O que viabiliza nossa hipótese das pontes serem cinesinas que estariam transportando os reservossomos para a extremidade positiva dos microtúbulos que se localiza na região posterior do protozoário. Uma abordagem interessante para estudar o papel das cinesinas na endocitose seria nocautear o gene da proteína de interesse, mas devido a presença de 79 genes em *T.cruzi*, esta metodologia dificilmente teria sucesso. Já que o nocaute de um gene não impossibilitaria a expressão de os outros genes. Recentemente, Sakowicz e colaboradores (2005) sintetizaram um inibidor para cinesina. Futuramente, também utilizaremos inibidores para estudar se o papel das cinesinas é essencial para a atividade endocítica, para a localização dos reservossomos. Tentaremos elucidar se todas as etapas da via endocítica são dependentes destas proteínas e se as pontes observadas nesta dissertação são de fato cinesinas.

Para afastar a possibilidade da ligação entre reservossomos e microtúbulos subpeliculares não existir, ou seja, de estarem próximos por acaso, sem ligação física,

realizamos um ensaio onde os epimastigotas após a endocitose de Tf-Au eram rompidos por congelamento e descongelamento. Este experimento nos permitiu visualizar que mesmo após a lise das células, a ligação reservossomos – microtúbulos se mantém (Fig: 24 a, b e c). Não há nenhum dado na literatura que relate se as ligações das cinesinas às organelas persistem após estresse físico, por isto este experimento serviu somente para evidenciarmos que a associação realmente ocorre.

O anticorpo 3G4 foi produzido a partir de uma fração de citoesqueleto e através de espectrometria de massas foi estabelecido que o epítipo reconhecido é a β -tubulina (Cornejo *et al.*, submetido). Surpreendentemente o antígeno de 3G4 parece estar apenas em reservossomos por imunofluorescência. No presente trabalho, ensaios de imunofluorescência confirmaram que o anticorpo reconhecia os reservossomos (Fig.: 25). Estes dados sugerem que o anticorpo 3G4 estaria reconhecendo β -tubulina ligada aos reservossomos. Com o intuito de avaliar se o reconhecimento da β -tubulina estava relacionado com a atividade endocítica, realizamos um experimento onde epimastigotas de diferentes dias de cultivo eram submetidos à endocitose de Tf-FITC e após esta etapa fazíamos a leitura da fluorescência em leitor de placas, gerando um gráfico que relata a taxa de endocitose (Fig.: 26). Após a endocitose, estes mesmos epimastigotas eram utilizados para imunofluorescência do anticorpo 3G4. Concluímos que o reconhecimento da β -tubulina não depende da taxa de endocitose. Uma vez que o terceiro dia foi o que apresentou menor taxa de endocitose e mesmo assim possuía marcação (dados não mostrados). Estes dados nos levaram a supor que o anticorpo estaria reconhecendo um epítipo que não varia com o dia de cultivo. Para determinarmos se o anticorpo reconhecia alguma tubulina associada à membrana dos reservossomos, realizamos o isolamento de tal organela e as utilizamos para imunofluorescência. Não obtivemos sinal algum, isto pode ter ocorrido devido à manipulação da organela durante o experimento, apesar de termos usado inibidores de protease e trabalhado à baixa temperatura. No entanto, o necessário aumento de força iônica durante o gradiente de purificação pode ter levado à dissociação do antígeno do 3G4 e os reservossomos.

A imunocitoquímica em cortes não foi conclusiva, pois obtivemos marcações nos reservossomos e no citoplasma do protozoário (Fig.: 28). Devido a isto, realizamos um experimento onde os epimastigotas foram fixados brevemente com formaldeído 4%

permeabilizados com Triton-X-100 e incubados com o anticorpo 3G4 em suspensão. Estas células foram separadas em duas alíquotas que foram incubadas com anticorpo secundário conjugado à fluorocromo ou conjugado a ouro coloidal, estas últimas foram processadas para microscopia eletrônica de transmissão. Como esperado, a imunofluorescência localizou os reservossomos (Fig: 29 a e b). A imunocitoquímica localizou reservossomos, endossomos iniciais e vesículas. Este resultado especificamente sugere que a β -tubulina está envolvida no posicionamento tanto de vesículas, endossomas iniciais quanto de reservossomos, mostrando que de alguma forma a tubulina auxiliaria na atividade endocítica.

As análises de imunocitoquímica concluem que o anticorpo 3G4 pode estar realmente reconhecendo β -tubulina, mas se trata de um reconhecimento a todas as tubulinas, já que reconhece citoplasma e flagelo. Diferente do que sugeriram Cornejo e colaboradores (submetido) que relataram que o anticorpo reconhece uma β -tubulina modificada pós-traducionalmente. Afirmam inclusive que esta modificação explicaria porque o anticorpo não reconhece a β -tubulina dos microtúbulos subpeliculares e do flagelo na imunofluorescência. A princípio, o anticorpo 3G4 representava uma ótima ferramenta para estudar influência do citoesqueleto na endocitose, mas devido às discrepâncias de marcações começamos a considerar que a tubulina de alguma forma estava sendo levada para os reservossomos, talvez para a degradação, o que exporia o epítipo do 3G4. Esta hipótese, no entanto, está em desacordo com os dados de Cornejo *et al*, 2010 (submetido) que mapeou a molécula de β -tubulina, determinando que a sequência que o anticorpo reconhece está exposta na superfície do microtúbulo polimerizado.

Os dados provenientes do western blot de reservossomos isolados com 3G4 e anticorpo que reconhece α -tubulina (B-5-12) sugerem que dímeros desta proteína estão presentes na fração de reservossomos (Fig.: 30). Não é a primeira vez que a tubulina foi encontrada na fração de reservossomos isolados. Nosso grupo em 2009, ao realizar a proteômica de frações de reservossomos identificou dentre diversas proteínas a tubulina (Sant'Anna *et al.*, 2009). Não se pode descartar a hipótese desta proteína ser um contaminante do fracionamento celular. Os reservossomos são organelas pré-lisossomais, possuem funções similares às desempenhadas pelos lisossomos. Nosso

grupo tem observado alguns indícios de que os reservossomos participem da autofagia. Os dados do 3G4 podem ser explicados se levarmos em consideração que a tubulina do corpo celular do parasita exponha determinada epítipo no momento de ser “reciclada”. Este epítipo seria o reconhecido pelo 3G4 e estaria localizado nos reservossomos.

Por se tratar de um estudo de microscopia eletrônica de transmissão, as imagens analisadas são provenientes de cortes e por isso as hipóteses propostas aqui foram montadas relacionando as imagens com os conceitos de biologia celular. As nossas hipóteses deverão ser estudadas por outras técnicas. Uma possibilidade é utilizar anticorpos contra as cinesinas, deste modo, acompanharíamos facilmente a participação das cinesinas e microtúbulos durante toda a atividade endocítica.

Continuaremos estudando os ícones da via endocítica do *T.cruzi*: citóstoma-citofaringe e reservossomos. Estudaremos as modificações ultraestruturais da citofaringe após inibição da endocitose com drogas que afetam os microfilamentos, com o intuito de analisar a participação e localização da actina neste sítio. Também analisaremos se a actina influencia no diâmetro da abertura do citóstoma durante a endocitose de microesferas maiores que o seu diâmetro. A localização da TcActina já foi realizada e se mostrou em *patches* dispersos pelo citoplasma do protozoário. Porém nenhuma imunocitoquímica foi realizada para analisar se ocorre uma maior concentração de actina na região do citóstoma e da citofaringe. Pretendemos realizar esta imunocitoquímica e também analisar se ocorre recrutamento de filamentos de actina para a região do citóstoma e da citofaringe durante a endocitose.

Daremos enfoque às mudanças que ocorrem durante a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas de *T.cruzi*. Dando atenção especial para o processo de desmonte do complexo citóstoma-citofaringe e ao desaparecimento dos reservossomos em tripomastigotas.

6- Resultados mais relevantes desta dissertação

- A proteína Bilbo-1 é expressa pelo *T.cruzi* e está localizada na bolsa flagelar e no flagelo de epimastigotas;
- A bolsa flagelar de epimastigotas de *T.cruzi* possui os quatro microtúbulos especializados e a região de espessamento da membrana (colar) descritos em tripomastigotas de *T.brucei*;
- A entrada do citóstoma possui uma protrusão em forma de vesícula que apresenta glicocálice e conteúdo citoplasmático;
- A citofaringe é acompanhada por microtúbulos que cercam metade de seu diâmetro, formando uma espécie de calha de sustentação e por material denso; tal material ainda não foi analisado;
- Vesículas alinhadas à citofaringe podem ser provenientes de endocitose;
- Vesículas contendo traçador podem ser transportadas através de trilhos de microtúbulos;
- Existem pontes entre reservossomos e microtúbulos subpeliculares e estas podem auxiliar no transporte ou manutenção destas organelas na região posterior do protozoário;
- O anticorpo 3G4 reconhece reservossomos, endossomos iniciais e vesículas próximas aos reservossomos;
- A presença de α e β tubulina na fração de reservossomos é um indício que a tubulina pode estar sendo degradada nestas organelas.

7- Conclusões:

As observações morfológicas sistematizadas nesta dissertação abrem novas linhas de investigação sobre o papel do citoesqueleto na via endocítica de epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados aqui mostrados não são conclusivos, mas são fortemente sugestivos de que a ligação física entre os compartimentos endocíticos e o citoesqueleto existe também nestes protozoários e é constituída por filamentos ainda não caracterizados. Novas abordagens nas áreas de microscopia de alta resolução e de biologia molecular deverão trazer novos dados em pouco tempo.

8- Referências bibliográficas:

- ARARIPE J.R., RAMOS F.P., CUNHA E SILVA N.L., URMENYI T.P., SILVA R., LEITE FONTES C.F., DA SILVEIRA J.F., RONDINELLI E. 2005. Characterization of a RAB5 homologue in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 329:638-45.
- BASTIN P., SHERWIN T., GULL K. 1998. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility. *Nature*.5;391(6667):548.
- BAUM SG., WITTNER M., NADLER J., HORWITZ SB, DENNIS JE, SCIFF PB, TANOWITZ MB. 1981. Taxol, A microtubule stabilizing agent, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78: 4571-4579.
- BOGITSH, B.J.; RIBEIRO-RODRIGUES,R.;CARTER,C.E.1995 In vitro effects os mannan and cytochalasin B on the uptake of horseradish peroxidase and 14C sucrose by *Trypanosoma cruzi* epimastigotas. *J.Parasitol.*, 81(2):144-8.
- BONHIVERS M, NOWACKI S, LANDREIN N, ROBINSON D. 2008. Biogenesis of the trypanosome endo-exocytic organelle is cytoskeleton mediated. *PLoS Biol* 6:e105.
- CAMARGO, E. P. 1964. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. I –Origin metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 6: 93-100.
- CAZZULO JJ, CAZZULO FRANKE MC, MARTINEZ J, FRANKE DE CAZZULO BM. 1990. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *Biochim Biophys Acta.* 1037:186-91.
- CHAGAS C 1909. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1: 159-218.
- CORNEJO A.; WURTELE M.; CHUNG J.; HILPERT K.; SANT'ANNA C; CUNHA-E-SILVA N.; SCHENKMAN S. *Submetido*. A unique tubulin structure is present in microtubules associated with endocytic organelles of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol.*
- CORRÊA, J.R.; ATELLA, G.C.;BATISTA,M.M.;SOARES,M.J. 2008 Transferin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytosome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis. *Exp. Parasitology* 118 (58-66).

- CUNHA-E-SILVA N.L., ATELLA G.C., PORTO-CARREIRO I.A., MORGADO-DIAZ J.A., PEREIRA M.G. & DE SOUZA W 2002. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Lett* 7: 149.

- CUNHA-E-SILVA N, SANT'ANNA C, PEREIRA MG, PORTO-CARREIRO I, JEOVANO AL, DE SOUZA W. 2006. Reservosomes: multipurpose organelles? *Parasitol Res.* 2006 99(4):325-7.

- CUNHA-E-SILVA, SANT'ANNA C, PEREIRA MG. 2010. Endocytosis in *Trypanosoma cruzi*. *Submetido*.

- DALLAI R, AFZELIUS BA. 1990. Ultrastructural patterns of the flagellar axoneme in the non-motile part of the mole-cricket sperm. *Biol Cell.* 70:19-26

- DANTAS AP, BARBOSA HS, DE CASTRO SL. 2003. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 35(3):287-94.

- DE MELO LD, SANT'ANNA C, REIS SA, LOURENÇO D, DE SOUZA W, LOPES UG, CUNHA E SILVA NL 2008. Evolutionary conservation of actin-binding proteins in *Trypanosoma cruzi* and unusual subcellular localization of the actin homologue. *Parasitology* 135: 955-965.

- DE SOUZA, Wanderley. Estudo Ultra-estrutural citoquímico e por criofratura da superfície celular do *Trypanosoma cruzi*. 1975. Tese de doutorado (Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho).

- DE SOUZA, W, CARVALHO, TU, BENCHIMOL, M. *Trypanosoma cruzi*: ultraestructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. 1978. *Exp. Parasitol.*, 45: 101-115.

- DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. 1984. *Int Rev Cytol* 86:197-182.

- DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. 2002. *Current Pharmaceutical Design*; 8:269 – 285.

- DE SOUZA, W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. 2009. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 104:89-100.

- DIAS, J.C.P. Globalization, inequity and Chagas disease. 2007. *Caderno de Saúde Pública*; 23: 13-22.

- DIAS WB, FAJARDO FD, GRAÇA-SOUZA AV, FREIRE-DE-LIMA L, VIEIRA F, GIRARD MF, BOUTEILLE B, PREVIATO JO, MENDONÇA-PREVIATO L, TODESCHINI AR. 2008. Endothelial cell signalling induced by trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol.* 10(1):88-99.

- DOCAMPO R, DE SOUZA W, MIRANDA K, ROHLOFF P, MORENO SN. 2005. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nat Rev Microbiol.* 3:251-61.

- EL-SAYED, N. M., MYLER, P. J., BARTHOLOMEU, D. C., NILSSON, D., AGGARWAL, G., TRAN, A. N., GHEDIN, E., WORTHEY, E. A., DELCHER, A. L., BLANDIN, G., WESTENBERGER, S. J., CALER, E., CERQUEIRA, G. C., BRANCHE, C., HAAS, B., ANUPAMA, A., ARNER, E., ASLUND, L., ATTIPOE, P., BONTEMPI, E., BRINGAUD, F., BURTON, P., CADAG, E., CAMPBELL, D. A., CARRINGTON, M., CRABTREE, J., DARBAN, H., DA SILVA, J. F., DE JONG, P., EDWARDS, K., ENGLUND, P. T., FAZELINA, G., FELDBLYUM, T., FERELLA, M., FRASCH, A. C., GULL, K., HORN, D., HOU, L., HUANG, Y., KINDLUND, E., KLINGBEIL, M., KLUGE, S., KOO, H., LACERDA, D., LEVIN, M. J., LORENZI, H., LOUIE, T., MACHADO, C. R., MCCULLOCH, R., MCKENNA, A., MIZUNO, Y., MOTTRAM, J. C., NELSON, S., OCHAYA, S., OSOEGAWA, K., PAI, G., PARSONS, M., PENTONY, M., PETTERSSON, U., POP, M., RAMIREZ, J. L., RINTA, J., ROBERTSON, L., SALZBERG, S. L., SANCHEZ, D. O., SEYLER, A., SHARMA, R., SHETTY, J., SIMPSON, A. J., SISK, E., TAMMI, M. T., TARLETON, R., TEIXEIRA, S., VAN AKEN, S., VOGT, C., WARD, P. N., WICKSTEAD, B., WORTMAN, J., WHITE, O., FRASER, C. M., STUART, K. D. AND ANDERSSON, B. 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309, 409–415.

- EL-SAYED, N. M., MYLER, P. J., BLANDIN, G., BERRIMAN, M., CRABTREE, J., AGGARWAL, G., CALER, E., RENAULD, H., WORTHEY, E. A., HERTZ-FOWLER, C., GHEDIN, E., PEACOCK, C., BARTHOLOMEU, D. C., HAAS, B. J., TRAN, A. N., WORTMAN, J. R., ALSMARK, U. C., ANGIUOLI, S., ANUPAMA, A., BADGER, J., BRINGAUD, F., CADAG, E., CARLTON, J. M., CERQUEIRA, G. C., CREASY, T., DELCHER, A. L., DJIKENG, A., EMBLEY, T. M., HAUSER, C., IVENS, A. C., KUMMERFELD, S. K., PEREIRA-LEAL, J. B., NILSSON, D., PETERSON, J., SALZBERG, S. L., SHALLOM, J., SILVA, J. C., SUNDARAM, J., WESTENBERGER, S., WHITE, O., MELVILLE, S. E., DONELSON, J. E., ANDERSSON, B., STUART, K. D. AND HALL, N. 2005b. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 309, 404–409.

- ENGEL JC, DOYLE PS, PALMER J, HSIEH I, BAINTON DF, MCKERROW JH. 1998. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci.* 111: 597-606.
- ENGEL, JC, GARCÍA, CT, HSIEH, I, DOYLE, P S, MCKERROW, JH. 2000. Upregulation of the secretory pathway in cysteine protease inhibitor-resistant *Trypanosoma cruzi*. *J. Cell Sci.*, 113: 1345-1354.
- FARINA M, ATTIAS M, SOUTO-PADRÓN T, DE SOUZA W. 1986. Further studies on the organization of the paraxial rod of trypanosomatids. *J Protozool* 33:552–7.
- FIELD MC., CARRINGTON M. 2009. The trypanosome flagellar pocket. *Nat.Ver. Microbiol.* Nov;7(11):775-86.
- FIGUEIREDO, RCBQ., STEINDEL M, SOARES MJ., 1994. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during in vitro cultivation. *Parasitol. Res.* 80, 517-522.
- FREYMULLER, E. & CAMARGO, E.P., 1981. Ultrastructural differences between species of trypanosomatids with and without endosymbiont. *J. of Protozool.* 28, 175-182.
- GADELHA, C., STEPHEN, R., MORPHEWC,M., MCINTOSHC, J. R., SEVERSB, N. J., & GULL. K. 2009. Membrane domains and flagellar pocket boundaries are influenced by the cytoskeleton in African trypanosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 106(41):17425-17430.
- GENNERICH A, VALE RD. 2009. Walking the walk: how kinesin and dynein coordinate their steps. *Curr Opin Cell Biol.* 21(1):59-67.
- GRELLIER P, SINO V, GARREAU-DE-LOUBRESSE N, BYLÈN E, BOULARD Y, SCHRÉVEL J. 1999. Selective and reversible effects of vinca alkaloids on *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms: blockage of cytokinesis without inhibition of organelle duplication. *Cell Mot. Cytosk.* 42:36-47.
- HEMPHILL, A.; SEEBECK, T. & LAWSON, D. 1991a.The *Trypanosoma brucei* cytoskeleton: ultrastructure and localization of microtubule-associated and spectrin-like proteins using quick-freeze, deep-etch, immunogold electron microscopy. *Journal of Structural Biology*, 107:211-220.
- HEMPHILL A, LAWSON D, SEEBECK T. 1991b. The cytoskeletal architecture of *Trypanosoma brucei*. *J. Parasitol.*, 77:603-612.

- HOLLENBECK, P.J. E SWANSON, J.A. 1990. Radial extension of macrophages tubular lysosomes supported by kinesin. *Nature (Lond)*. 346:864-866.
- JEOVANO DA SILVA, A. 2006 Endositose de grandes partículas em epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- LANDFEAR SM, IGNATUSHCHENKO M. 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol. Biochem. Parasitol.* 115:1-17.
- LOWRY, O.H, ROSEBROUGH, N.J., FARR, AL., E RANDALL, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- LUHRS K, FOUTS DL, MANNING J. 2003. Immunization with recombinant paraflagellar rod protein induces protective immunity against *Trypanosoma cruzi* infection. *Vaccine* 21:3058-3069.
- LUO S, SCOTT DA, DOCAMPO R. 2002. *Trypanosoma cruzi* H⁺-ATPase 1 (TcHA1) and 2 (TcHA2) genes complement yeast mutants defective in H⁺ pumps and encode plasma membrane P-type H⁺-ATPases with different enzymatic properties. *J Biol Chem.* 277:44497-506 .
- 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.* 69:507-13.
- MEYER H, OLIVEIRA MUSACCHIO M, ANDRADE MENDONÇA I 1958. Electron microscopy study of *Trypanosoma cruzi* in thin sections of infected tissue cultures and blood agar forms. *Parasitology* 48: 1-8.
- MEYER, H. E DE SOUZA, W. 1973. On the fine structure of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures of pigment epithelium from the chick embryo. Uptake of melanin granules by the parasite. *J. Protozool.*, 20(5), 590-593.
- MEYER, H. E DE SOUZA, W. 1976. Electron microscopy Study of *Trypanosome cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangement of the peripheral microtubules in the various forms of the parasite life cycle. *J. Protozool.* 23(3), 385-390.

- MENDONÇA-PREVIATO L, TODESCHINI AR, HEISE N, PREVIATO JO. 2005. Protozoan parasite-specific carbohydrate structures. *Curr Opin Struct Biol.* Oct;15(5):499-505.
- MILDER, R, DEANE, M. P. 1969. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma conorhini*. *J. Protozool.* 16: 730-737.
- OGBADOIRY EO, ROBINSON DR, GULL K 2003. A high-order trans-membrane structural linkage is responsible for mitochondrial genome positioning and segregation by flagellar basal bodies in trypanosomes. *Mol Biol Cell* 14: 1769-1779.
- OKUDA, K, ESTEVA, M, SEGURA, EL, BIJOVSKY. 1999. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. *Exp. Parasitol.*, 92: 223-231.
- ONO T, NAKABAYASHI T. 1979. Studies on the effects of vinblastine and colchicine on *Trypanosoma gambiense*. *Biken J* 22:117- 124.
- PARUSSINI F, GARCIA M, MUCCI J, AGUERO F, SANCHEZ D, HELLMAN U, ASLUND L, CAZZULO JJ. 2003. Characterization of a lysosomal serine carboxypeptidase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 131:11-23.
- PEREIRA KS, SCHMIDT FL, BARBOSA RL, GUARALDO AM, FRANCO RM, DIAS VL, PASSOS LA., 2010. Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by Food. *Adv Food Nutr Res.*;59C:63-85.
- PIRAS MM, DE RODRIGUEZ OO, PIRAS R. 1981. *Trypanosoma cruzi*: antigenic composition of axonemes and flagellar membranes of epimastigotes cultured in vitro. *Exp. Parasitol.*, 84:387-399.
- 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.
- PORTO-CARREIRO, I.A., 2004. Contribuição ao estudo da via endocítica das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado, Instituto de Biofísica Carlos chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- RASSI JR, A.; RASSI, A. & MARIN-NETO, J.A. 2010. Chagas Disease. *The Lancet*, 375:1388-1402.

- REYNOLDS, E.S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *Journal of Cell Biology*, 17:208-212.

- ROBINSON DR, SHERWIN T, PLOUBIDOU A, BYARD EH, GULL K. 1995. Microtubule polarity and dynamics in the control of organelle positioning, segregation, and cytokinesis in the trypanosome cell cycle. *J. Cell Biol.* 128:1163-1172.

- ROCHA GM, SEABRA SH, DE MIRANDA KR, CUNHA-E-SILVA N, DE CARVALHO TM, DE SOUZA W. 2010. Attachment of flagellum to the cell body is important to the kinetics of transferrin uptake by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Int.* In press.

- SAHASRABUDDHE, A.A.; BAJPAI,V.K.;GUPTA,C.M. 2004 A novel form of actin in Leishmania:molecular characterization, subcellular localization and association withsubpellicular microtubules. *Mol. Biochem. Parasitol.*,134(1):105-14.

- SAKOWICZ R, FINER JT, BERAUD C, CROMPTON A, LEWIS E, FRITSCH A, LEE Y, MAK J, MOODY R, TURINCIO R, CHABALA JC, GONZALES P, ROTH S, WEITMAN S, WOOD KW. 2004. Antitumor activity of a kinesin inhibitor. *Cancer Res.* May 1;64(9):3276-80.

- SANT'ANNA C, CAMPANATI L, GADELHA C, LOURENÇO D, LABATI-TERRA L, BITTENCOURT-SILVESTRE J, BENCHIMOL M., CUNHA-E-SILVA NL, DE SOUZA W. 2005. Improvement on visualization of cytoskeletal structures of protozoan parasites using high-resolution fiel emission scanning electron mycroscopy (FESEM). *Histochem. Cell Biol* 124: 87-95.

- SANT'ANNA C, PARUSSINI F, LOURENÇO D, DE SOUZA W, CAZZULO JJ, CUNHA-E-SILVA NL 2008a. All *Trypanosoma cruzi* developmental forms present lysosome-related organelles. *Histochem Cell Biol* 130: 1187-1198.

- SANT'ANNA C, PEREIRA MG, LEMGRUBER L, DE SOUZA W, CUNHA E SILVA NL 2008b. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. *Microsc Res Tech* 71: 599-605.

- SANT'ANNA C, NAKAYASU ES, PEREIRA MG, LOURENCO D, DE SOUZA W, ALMEIDA IC, CUNHANL 2009. Subcellular proteomics of *Trypanosoma cruzi* reservosomes. *Proteomics* 9:1782–1794.

- 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.
- SCHNEIDER, A., PLESSMANN, U. & WEBER, K. 1997. Subpellicular and flagellar microtubules of *Trypanosoma brucei* are extensively glutamylated. *J. Cell Sci.*, 110 (Pt 4):431-7.
- SCHOIJET AC, MIRANDA K, GIRARD-DIAS W, DE SOUZA W, FLAWIÁ MM, TORRES HN, DOCAMPO R, ALONSO GD. 2008. *J. Biol. Chem.* 14;283(46):31541-50.
- SHERWIN T, GULL K. 1989. Visualization of detyrosination along single microtubules reveals novel mechanisms of assembly during cytoskeletal duplication in trypanosomes. *Cell* 57:211-221.
- SCOTT V, SHERWIN T, GULL K. 1997. Gamma-tubulin in trypanosomes: molecular characterisation and localisation to multiple and diverse microtubule organising centres. *J. Cell Sci.* 110:157-68.
- SOARES MJ, DE SOUZA MF, DE SOUZA W. 1987. Ultrastructural visualization of lipids in trypanosomatids. *J Protozool.* 34:199-203.
- SOARES, MJ, DE SOUZA, W. 1988. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids. A cytochemical and stereological study. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.* 20: 349-363.
- SOARES M J, SOUTO-PADRÓN T, BONALDO M C, 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.
- SOUTO-PADRÓN T, DE SOUZA W. 1979. Cytochemical analysis at the fine-structural level of trypanosomatids stained with phosphotungstic acid. *J. Protozool.* 26(4):551-7.
- SOUTO-PADRÓN T, DE SOUZA W, HEUSER JE. 1984. Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. *J Cell Sci* 69:167-178

- SOUTO-PADRÓN, T, CAMPETELLA, OE, CAZZULO, JJ., DESOUZA, W. 1990. Cysteine proteinase in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization and involvement in parasite-host cell interaction. *J. Cell Sci.*, 96: 495-490.
- SOUTO-PADRÓN T, CUNHA-E-SILVA NL & DE SOUZA W. 1993. Acetylated alpha-tubulin in *Trypanosoma cruzi*: immunocytochemical localization. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 88:517-528.
- TYLER, K.M. & ENGMAN, D.M. 2001. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *International Journal for Parasitology*; 3:472 – 481.
- ÜRMÉNYI TP, DE CASTRO F, CARVALHO JFO, DE SOUZA W, RONDINELLI E. 1992. Transcriptional and post-transcriptional control of tubulin gene expression in *Trypanosoma cruzi*. *DNA and Cell Biol.* 11:101-109.
- VALE, R.D. 1987. Intracellular transport using microtubule-based motors. *Annu. Rev. Cell Biol.* 3:347-378.
- VATARU-NAKAMURA C, UEDA-NAKAMURA T, DE SOUZA W. 2005. Visualization of the cytostome in *Trypanosoma cruzi* by high resolution field emission scanning electron microscopy using secondary and backscattered electron imaging. *FEMS Microbiol Lett.* 242:227-30.
- VICKERMAN, K. The mechanism of cyclical development in trypanosomes of *Trypanosoma brucei* sub-group: an hypothesis based on ultrastructural observations. 1962. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v.56, p.487-495.
- 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: 467-474.
- WEISE F, STIERHOF YD, KÜHN C, WIESE M, OVERATH P. 2000. Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J. Cell Sci.* 113 Pt 24:4587-603.
- WRIGHTSMAN RA, MILLER MJ, SABORIO JL, MANNING JE. 1995. Pure flagellar rod proteins protect mice against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun* 62:122-125.
- ZHAO Z, LINDSAY ME, CHOWDHURY AR, ROBINSON DR, ENGLUND PT 2008. p166, a link between the trypanosome mitochondrial DNA and flagellum, mediates genome segregation. *EMBO J* 27: 143-154.

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](#)