

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

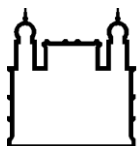
Doutorado em Biologia Celular e Molecular

Trypanosoma cruzi: **Contribuição ao estudo da endocitose dependente e independente de clatrina em formas epimastigotas**

JOSÉ RAIMUNDO CORRÊA

RIO DE JANEIRO

2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOSÉ RAIMUNDO CORRÊA

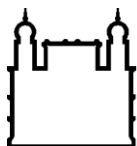
***Trypanosoma cruzi*: Contribuição ao estudo da endocitose
dependente e independente de clatrina em formas
epimastigotas**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências, área de concentração em Biologia Celular.

Orientador: Dr. Maurilio José Soares

RIO DE JANEIRO

2007



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Manguinhos / CICT / FIOCRUZ – RJ

G963

Corrêa, José Raimundo

Trypanosoma cruzi: Contribuição ao estudo da endocitose dependente e independente de clatrina em formas epimastigotas / José Raimundo Corrêa. – Rio de Janeiro, 2007.

ix, 87 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Biologia Celular e Molecular, 2007.

Bibliografia: f. 72-87

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Endocitose. 3. Transferrina. 4. Lipid rafts.
I. Título.

CDD 616.936

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

JOSÉ RAIMUNDO CORRÊA

***Trypanosoma cruzi*: Contribuição ao estudo da endocitose
dependente e independente de clatrina em formas
epimastigotas**

ORIENTADOR: Dr. Maurilio José Soares

EXAMINADORES:

Dra. Andréa Henriques-Pons - IOC/Fiocruz

Dra. Regina Célia Bressan Queiróz de Figueiredo - CPqAM, Recife/Fiocruz

Dra. Narcisa Leal Cunha-e-Silva – Instituto de Biofísica (IBCCF)/UFRJ

Dra. Suzana Corte-Real Faria - IOC/Fiocruz

Dra. Solange Lisboa de Castro - IOC/Fiocruz

Rio de Janeiro, 18 de setembro de 2007.

DEDICATÓRIA

À MINHA FAMÍLIA

Ao meu Pai José Lino de Souza Junior (*In memoriam*),
à minha mãe, Antonieta Santos Souza (*In memoriam*).

À minha esposa Kelly Grace Magalhães.

AGRADECIMENTOS

A minha esposa Kelly Grace Magalhães, pelo seu carinho, compreensão e paciência. Pela sua convivência diária, dedicação (muitas vezes abdicando), por todas as discussões e sugestões profissionais. Sou extremamente grato pela pessoa que você ajudou e ajuda me tornar a cada dia.

É justo e oportuno agradecer ao Dr. Maurilio José Soares (meu orientador) pelo exemplo de competência, dedicação e serenidade. Espero poder ter a mesma atitude profissional, o mesmo senso de dever e ética que o Dr. Maurilio me mostrou ao longo destes anos de convivência.

A Dra. Georgia Corrêa Atella e a Camila Vargas, do Laboratório de Bioquímica Médica do CCS da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pela colaboração inestimável, sugestões e troca de experiências, sem as quais não seria possível alcançar grande parte das metas atingidas neste trabalho.

A Dra. Helene Santos Barbosa pela excelente revisão desta tese de doutorado, contribuindo de forma decisiva para o aprimoramento do texto contido neste documento.

Aos pesquisadores do antigo DUBC, Dra. Andréia Henriques Pons, Dra. Helene Santos Barbosa, Dra. Maria Nazaré Meirelles, Dra. Mirian Cláudia S. Pereira, Dra. Solange Lisboa de Castro, Dra. Suzana Corte-Real, pelo auxílio prestado, dúvidas tiradas e conselhos dados, sempre que necessário.

Gostaria de agradecer ao corpo técnico do antigo Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular pela ajuda que eu recebi durante o desenvolvimento desta tese. Todos sem exceção, não importando seu laboratório de origem foram sempre solícitos comigo. Alanderson Nogueira, André Paulo, Angela dos Santos, Daniele Vicente, Dayse Silva, Genésio Lopes, José Amaro, José Lopes, Levi Marques da Silva, Luciano Batista, Mariele Pereira e Sônia Regina O meu muito obrigado a todos vocês.

Aos colegas do antigo Laboratório de Biologia Celular de Microorganismos: Dra. Carolina Nascimento Spiegel, Dra. Giani França Santoro, Camila Marques Adade, Jorge Bretas e Patrícia Meuser Rego pela troca de experiências diárias dentro do ambiente de trabalho e pela agradável convivência.

Aos colegas do antigo Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Dr. Alexandre Felip, Cláudia Calvet, Dr. Eric Vaz Guimarães, Francisco Odêncio Junior, Kelly Salomão, Marcelo Meuser Batista, Marcos Meuser Batista, Marcos

Moura, Dr. Wagner Baetas, pela amizade e pela troca de experiências profissionais que contribuíram para a minha formação.

Ao Dr. Maurício Paiva, pela amizade, pelo seu bom humor contagiante, pela ajuda profissional principalmente em questões de criação de imagens no Photoshop.

Ao Rubem Figueiredo Sadok Menna-Barreto, pelo coleguismo e amizade, pela troca de experiências profissionais, discussões e colaborações tanto nas questões gráficas, quanto nas questões científicas presentes nos diversos trabalhos que participamos juntos.

Às profissionais do setor administrativo, Maria Aparecida da Rocha, Maria de Lourdes Pereira e Sonia Maria Farias, pelo apoio nas questões burocráticas e pela disposição em sempre tentar ajudar quando solicitadas.

Ao Bruno Ávila pela troca de experiência profissional na área de informática, por sua disposição em sempre me ajudar com as questões da rede do DUBC, as manutenções nos micros do LBCM e a captura digital e tratamento de imagens.

Aos demais colegas de bancada do antigo DUBC: Cristiane França, Denise da Gama, Juliana Dias, Tatiana Galvão, Renata Corrêa Hespanhol, Camila Guerra pelo convívio amistoso e diário neste departamento.

Ao Dr. Henrique Lenzi e Dr. Marcelo Pelajo do antigo Departamento de Patologia do IOC, pela disponibilidade e boa vontade com as questões da microscopia confocal.

A todos que não foram aqui mencionados, mas contribuíram de forma direta ou indireta para a realização desta tese, porque este foi um trabalho de equipe.

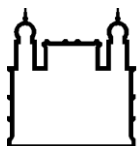
O presente trabalho foi desenvolvido sob a orientação do Dr. Maurilio José Soares, no Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos do Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular do Instituto Oswaldo Cruz, na Fundação Oswaldo Cruz, com o apoio financeiro das seguintes entidades de fomento científico:

- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.
- Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro - FAPERJ.
- Programa Estratégico de Apoio à Pesquisa em Saúde – PAPES III e IV.
- Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz - Fiocruz.

Data de ingresso no Programa de doutorado em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz: Abril de 2004.

ÍNDICE

FICHA CATALOGRÁFICA	II
RESUMO	IX
ABSTRACT.....	X
INTRODUÇÃO	1
1. Endocitose em células eucarióticas	2
1.1 Fagocitose	3
1.2 Pinocitose	4
1.2.1 Macropinocitose	4
2.2.2 A hipótese das “Lipid Rafts”- Jangadas de Lipídio	5
2.2.3 Endocitose mediada por cavéola – Potocitose	7
2.2.4 Endocitose mediada por clatrina	12
2.2.5 Formação de vesículas dependente de dinamina	19
2. Tripanossomatídeos: morfologia, unidades de membrana e endocitose	20
2.1 A endocitose nos <i>Tripanossomas Africanos</i>	24
2.1 A endocitose no <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
OBJETIVOS	34
Artigo 1	37
Artigo 2	44
Artigo 3	51
DISCUSSÃO	61
CONCLUSÕES	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72



Ministério da Saúde

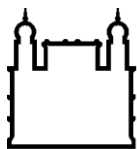
FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

RESUMO

Endocitose em células eucarióticas é o processo de incorporação de macromoléculas por diferentes vias, com diversas proteínas associadas. Este processo ocorre através do brotamento de vesículas na membrana plasmática e endereçamento destas vesículas a compartimentos endossomais no citoplasma. Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados patogênicos de grande importância médica e veterinária que apresentam diferentes formas adaptativas ao longo de seu ciclo de vida. Estes parasitas estão estruturalmente organizados dentro de um arcabouço de microtúbulos subpelículas, o que dificulta invaginações de membrana na maior parte do corpo celular. Entretanto, este arcabouço é descontinuado na região da bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge do corpo. Formas epimastigotas do *Trypanosoma cruzi* apresentam além da bolsa flagelar, uma segunda invaginação de membrana, o citóstoma/citofaringe. Esta estrutura é sustentada por microtúbulos especializados que participam ativamente no processo de endocitose. O objetivo desta tese foi investigar as vias endocíticas presentes nos dois sítios competentes para a captação de nutrientes (bolsa flagelar e citóstoma) de epimastigotas de *T. cruzi*. Após incubação dos parasitas a 28°C com albumina, transferrina e LDL conjugadas a ouro coloidal e posterior processamento para microscopia eletrônica de transmissão (MET), vesículas endocíticas revestidas contendo albumina foram observadas brotando da bolsa flagelar. Através da análise do conteúdo protéico dos protozoários foi detectada a expressão de clatrina, confirmada por citometria de fluxo e análise *in silico* da base de dados genômicos do *T. cruzi*. Por microscopia confocal localizou-se a clatrina na região compreendida entre o núcleo e a bolsa flagelar dos parasitas. Como transferrina foi visualizada em vesículas sem revestimento localizadas majoritariamente no citóstoma, frações de membrana detergente-resistentes foram purificadas por fracionamento celular e o conteúdo lipídico foi analisado por cromatografia, sendo também obtidas as concentrações de proteína e colesterol destas frações de membrana. “Dot blots” das frações foram positivos para marcadores universais de jangadas de lipídios (flotilina-1 e toxina B do cólera). Por imunofluorescência co-localizou-se as marcações de transferrina e flotilina no citóstoma. Assim, propomos que a endocitose de transferrina ocorra principalmente pelo citóstoma através de um domínio de membrana detergente-resistente. Epimastigotas foram pré-tratadas com drogas que inibem seletivamente a endocitose mediada por clatrina e por cavéolas, e por drogas que interferem com o citoesqueleto. Estas células foram avaliadas quanto a sua capacidade de captar transferrina do meio. Dados de MET e citometria de fluxo mostraram que a endocitose de transferrina ocorreu normalmente nas amostras onde o brotamento de vesículas mediado por clatrina foi inibido. Por outro lado, nas amostras onde houve inibição da endocitose por cavéolas, a captação de transferrina foi significativamente reduzida. Análise da curva de crescimento de parasitas tratados demonstrou haver relação entre interferência nos domínios de membrana detergente-resistentes e sobrevivência das células. Este conjunto de dados permitiu elaborar um modelo dos mecanismos de endocitose em epimastigotas de *T. cruzi*.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ABSTRACT

Endocytosis in eukaryotic cells is the incorporation process of macromolecules, through different pathways with different associated proteins, through vesicles budding at the plasma membrane and addressing of these vesicles to cytoplasmic endosomal compartments. Trypanosomatids are pathogenic flagellate protozoa of great medical and veterinary importance that present different evolutive forms along their life cycle. These parasites are structurally organized inside a cage of subpellicular microtubules, what makes it difficult to form membrane invagination along most part of the cell body. However, this cage is missing at the flagellar pocket region, where the flagellum emerges from the cell. Epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* present besides the flagellar pocket a second membrane invagination, the cytostome/cytopharynx. This structure is sustained by specialized microtubules that actively participate in the endocytic process. This thesis has investigated the endocytic pathways at the two competent sites for nutrient uptake (flagellar pocket and cytostome) of *T. cruzi* epimastigotes. After parasites incubation at 28°C with gold-conjugated albumine, transferrin or LDL, followed by processing for transmission electron microscopy (TEM), it was possible to observe coated endocytic vesicles loaded with albumin, budding off from the flagellar pocket. Analysis of the proteic content of epimastigote forms detected the expression of clathrin, confirmed by flow cytometry and in silico analysis of the *T. cruzi* genomic database. Confocal microscopy allowed the visualization of the clathrin expression at the flagellar pocket. As transferrin was seen in uncoated vesicles located mainly in the cytostome, detergent-resistant membrane fractions were purified by cell fractioning and the lipidic contents was analyzed by chromatography, as well as the protein and cholesterol contents in the fractions. Dot blots of such membrane fractions were positive for lipid raft universal labels (flotillin-1 and cholera B toxin). By immunofluorescence microscopy, transferrin and flotillin were co-localized at the cytostome. Thus we propose that endocytosis of transferrin occurs mainly through the cytostome via detergent-resistant membrane domains. Epimastigote forms were pre-treated to specifically hinder clathrin-mediated and caveolae-mediated endocytosis, by using drugs that impair these pathways and interfere with the cell cytoskeleton, followed by incubation with transferrin. Data from TEM and flow cytometry showed that the endocytosis of transferrin occurred normally in samples where budding of clathrin-coated vesicles was hindered, but it was not observed in samples where caveolae-mediated endocytosis was inhibited. Analysis of growth curves of treated parasites showed a relation between interference with detergent-resistant membrane domains and cell surviving. Our data allowed to elaborate a model depicting the endocytic mechanisms in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes.

1. Endocitose em células eucarióticas

Desempenhando um papel chave na manutenção da vida das células estão eventos envolvendo ativas modificações na membrana plasmática que permitem a captação de macromoléculas, através de um conjunto de mecanismos diferentes. Moléculas essenciais como íons, açúcares e aminoácidos atravessam a membrana plasmática pela ação de canais ou bombas constituídos por proteínas integrais de membrana. Por outro lado, macromoléculas são internalizadas por associação a vesículas que brotam da membrana plasmática para o citoplasma, em um processo que é conhecido como endocitose (Conner & Schmid 2003).

A endocitose pode ser dividida em duas grandes categorias: fagocitose, a captação de partículas de grande tamanho ou outros microrganismos, e pinocitose, a captação de moléculas solúveis (Figura 1.1). Dependendo do tipo de partícula e dos receptores envolvidos, muitos modelos morfológicos e funcionais de fagocitose foram identificados. Da mesma forma, quatro mecanismos básicos foram propostos para a pinocitose: (1) macropinocitose, (2) endocitose mediada por clatrina, (3) endocitose mediada por cavéola e (4) endocitose independente de clatrina e cavéola (Conner & Schmid 2003, Soldati & Schliwa 2006, Mayor & Pagano 2007).

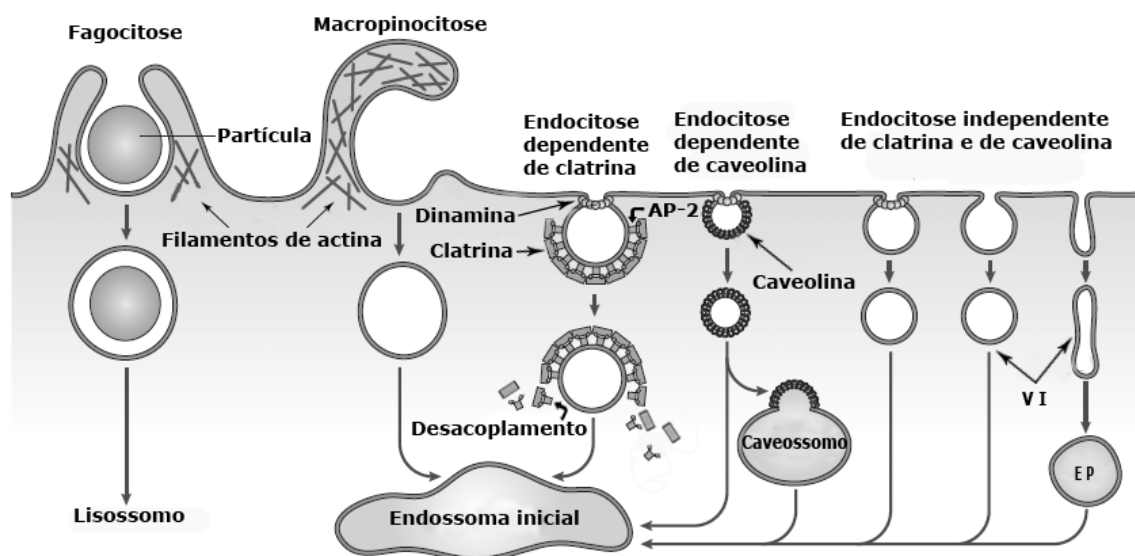


Figura 1.1 - Mecanismos endocíticos observados na maioria das células eucarióticas. VI: vesículas formadas de forma independente de clatrina, caveolina e dinamina; EP: endossoma inicial rico em proteínas ancoradas à membrana via GPI (Modificado de Mayor & Pagano 2007).

1.1. Fagocitose

A fagocitose em células de mamíferos é um evento associado primariamente a células especializadas (macrófagos, monócitos e neutrófilos), cuja principal função é remover grandes patógenos como bactérias e leveduras, ou alternativamente grandes debris celulares e/ou corpos apoptóticos conseqüentes de morte celular ou ainda, depósitos arteriais de lipídios (Aderem & Underhill 1999, Fadok & Chimini 2001). Estes eventos são altamente regulados e envolvem receptores específicos de membrana, além de ser dependentes de cascatas de sinalização mediadas por GTPases da família das proteínas Rho (Hall & Nobes 2000).

Em células fagocíticas a captura de patógenos pode ser guiada pela associação de diversos tipos de moléculas à superfície do patógeno (imunoglobulinas, unidades do sistema do complemento, fibronectina). Em seguida, receptores presentes na superfície da célula fagocítica reconhecem e se associam as moléculas do hospedeiro aderidas ao patógeno (Figuras 1.2 e 1.3). Esta associação promove a expansão da membrana plasmática envolvendo filamentos de actina, na região destas interações, o que culmina com o englobamento do patógeno (Aderem & Underhill 1999, Chimini & Chavrier 2000).

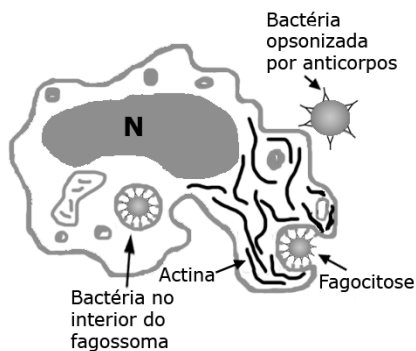


Figura 1.2 - Esquema de um macrófago fagocitando bactérias opsonizadas. N, núcleo.

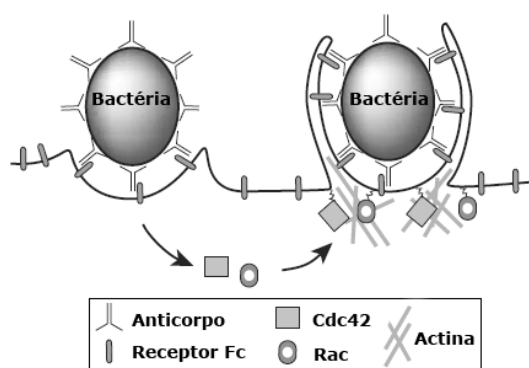


Figura 1.3 - Fagocitose de bactéria. Receptores para região Fc na superfície dos macrófagos ligam-se aos anticorpos aderidos à bactéria. Uma cascata de sinalização envolvendo proteínas Rac e Cdc42, seguida por uma série de cinases citoplasmáticas inicia o rearranjo de moléculas de actina, protrusão da membrana em torno da bactéria e englobamento em um fagossoma (Modificado de Conner & Schmid 2003 a).

1.2. Pinocitose

O termo pinocitose agrega os mecanismos de entrada de moléculas na célula via invaginação da membrana celular. A ingestão de moléculas ocorre por empacotamento em vesículas que brotam da membrana plasmática, com entrega deste conteúdo a compartimentos endossomais específicos. A molécula-carga, o envolvimento ou não de receptores e o tipo de receptor determinam a via pinocítica utilizada (Miaczynska & Zerial 2002, Seabra et al. 2002, Conner & Schmid 2003, Vincent 2003).

Dentre as alternativas de incorporação de macro moléculas, o tráfego mediado por receptores é o fenômeno que proporciona maior eficiência na aquisição destas moléculas. Está normalmente associado à captação de nutrientes essenciais e é conservado nos mais divergentes organismos eucarióticos. A endocitose mediada por receptor requer especificidade de interação, envolvendo reconhecimento e ligação entre estruturas específicas presentes nas moléculas-carga e nas porções extracelulares dos seus receptores na membrana plasmática. Os receptores possuem a propriedade de identificar uma porção definida na molécula-carga e se ligar a este domínio. Na região da membrana plasmática onde ocorrem estas interações podem se iniciar diversos processos de associação de proteínas à face citoplasmática, os quais promovem a invaginação da membrana com conseqüente formação de uma vesícula endocítica contendo em seu interior as moléculas-carga. Por outro lado a formação de vesículas pode também ocorrer de forma independente de qualquer tipo de associação protéica a face citoplasmática da membrana.

1.2.1. Macropinocitose

Ocorre em muitos tipos celulares quando estimulados por fatores de crescimento. Semelhante à fagocitose, a cascata de sinalização que induz a macropinocitose também envolve GTPases da família de proteínas Rho, responsáveis pela ativação de moléculas de actina e formação das protrusões de membrana plasmática. Entretanto, estas protrusões não se associam a nenhum tipo de ligante: a extremidade do prolongamento de membrana simplesmente colapsa e se funde novamente à superfície da célula, gerando uma grande vesícula denominada macropinosoma (Figura 1.1) que contém grande volume de moléculas do meio extracelular (Kruth et al. 2005).

Macropinosomas são estruturas dinâmicas, havendo reciclagem de membrana e seus componentes a partir de organelas internas da célula (Nichols & Lippincott-Schwartz 2001). A composição da membrana dos macropinosomas parece ser semelhante à da membrana de onde se originaram, mas as protruções propriamente ditas podem apresentar composição diferente em relação à membrana plasmática total: fosfolipídios e marcadores específicos de “lipid rafts” foram identificados enriquecidos nestas regiões (Manes et al. 1999, Hurley & Meyer 2001).

Em geral para que a macropinocitose ocorra à célula depende de estímulos exógenos (Norbury 2006). Em células dendríticas ocorrem prolongados eventos de macropinocitose após ativação pela apresentação de antígenos e assim a célula é capaz de incorporar grande quantidade de material extracelular, contribuindo para sua atividade imunológica. Algumas bactérias induzem a ativação de Rho-GTPase através de suas toxinas, promovendo a macropinocitose e conseqüentemente sua incorporação, eventos que garantem a sua sobrevivência e multiplicação dentro da célula hospedeira (Steele-Mortimer et al. 2000, Mellman & Steinman 2001). Embora na macropinocitose ocorra a incorporação de grandes volumes de material extracelular, este processo apresenta uma baixa seletividade: qualquer molécula que se encontre nas imediações da expansão de membrana no momento de seu colapso e fusão será incorporada pela célula.

1.2.2. A hipótese das “lipid rafts” – plataforma de lipídios

Um aspecto novo da estrutura da membrana celular surgiu na década de 1980, com a demonstração de agrupamento e organização dinâmica de moléculas de colesterol e esfingolipídios na membrana plasmática, detectados em fibroblastos humanos e de hamster, como uma matriz detergente-insolúvel rica em glicoproteínas (Carter & Hakomori 1981, Okada et al. 1984). Microdomínios de membrana com composição similar foram identificados também no complexo de Golgi e relacionados com a seleção de esfingomiélna e glicosfingolipídios em células epiteliais polarizadas (Simons & van Meer 1988).

O termo plataforma de lipídio (“lipid raft”) foi proposto (Simons & Ikonen 1997) e assim define coleções de membranas insolúveis em detergentes não-iônicos a 4°C, com uma composição especial de lipídios rica em colesterol, esfingomiélna e glicolipídios semelhantes ao gangliosídeo GM1 (Smart et al. 1999).

Agregados de colesterol formam estruturas menos fluídas (plataformas) que flutuam e se deslocam pela bicamada lipídica mais fluída composta majoritariamente

por fosfolipídios (Figura 1.4). Estas plataformas atuam como plataformas para a ligação de proteínas específicas e estão associadas também à transdução de sinais mediados pela sua internalização (Simons & Ikonen 1997, Simons & Vaz 2004).

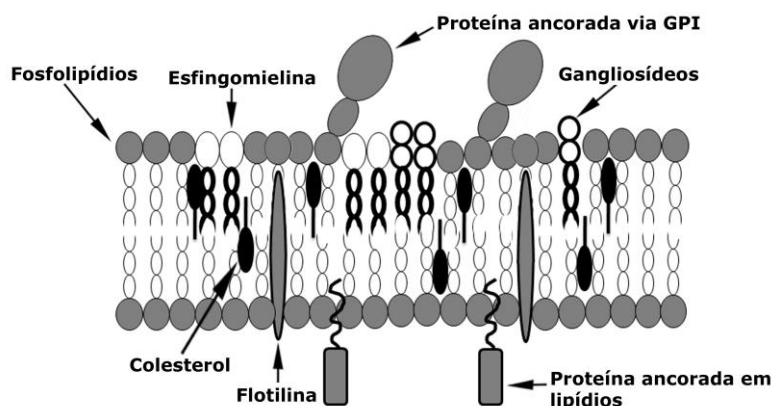


Figura 1.4 - Esquema geral da plataforma de lipídio. As diferentes classes de lipídios estão representadas (Modificado de Nakahata & Ohkubo 2003).

As plataformas de lipídios podem facilitar seletivamente interações do tipo proteína-proteína, incluindo ou excluindo proteínas em sua organização (Hancock 2006). Este mecanismo de seleção vem sendo implicado na estruturação de plataformas de sinalização transitórias e na seleção de proteínas em vias específicas de tráfego endocítico e exocítico (Nabi & Le 2003, Simons & Vaz 2004).

A mobilidade lateral das moléculas de lipídio na membrana está condicionada a dois fatores principais: temperatura e colesterol. A elevação da temperatura afeta de forma diferenciada cada espécie de lipídio e promove sua transição de fase de uma forma ordenada ou gel (S_o) para uma fase líquida desordenada (L_d). A mobilidade lateral dos lipídios, que é altamente limitada na fase (S_o), aumenta e as cadeias laterais acil perdem coesão não podendo mais manter as moléculas juntas em uma estrutura de conformação rígida (S_o). Por outro lado, se a membrana contiver moléculas de colesterol suficientes, uma terceira fase poderá se organizar nas membranas biológicas, o que dará origem a uma nova fase líquida e ordenada (L_o). Esta fase (L_o) apresenta um grau maior de organização das cadeias laterais acil quando comparada com a fase líquida desordenada (L_d). (de Almeida et al. 2003, Almeida et al. 2005). Assim, as fases L_o e L_d podem coexistir em membranas plasmáticas que contenham uma mistura adequada de esfingolipídios, fosfolipídios insaturados e colesterol, legitimando a idéia da presença de plataformas de lipídios em membranas biológicas.

Técnicas de detecção de alta resolução espacial estão sendo empregadas com sucesso para identificar a fase L_o em membranas biológicas. Análises por transferência de energia fluorescente (FRET) mostraram a formação de domínios na bicamada lipídica em nano-escala (10-40 nm) na temperatura de 37°C, o que é fisiologicamente relevante (Feigenson & Buboltz 2001, Silvius 2003). Domínios em escalas de tamanho de 30-80 nm na região de coexistência L_o - L_d vêm sendo identificados com o uso de microscopia de força atômica (AFM) e ressonância magnética nuclear baseada em deutério ($^2\text{H-NMR}$) (Yuan et al. 2002, Veatch et al. 2004, Hsueh et al. 2005, Veatch & Keller 2005).

Proteínas ancoradas à membrana via GPI (glicosil fosfatidil inositol) fornecem evidências de segregação lateral de proteínas no modelo de separação de fases L_o - L_d da membrana plasmática, embora esta segregação não seja total (Dietrich et al. 2001, Kahya et al. 2005). Proteínas com domínios transmembrana também podem ser encontradas segregadas e concentradas em plataformas de lipídios através de seus sítios de ligação a lipídios localizados no núcleo hidrofóbico da bicamada lipídica. Esta localização pode inclusive favorecer interações laterais com outros domínios protéicos na mesma região de membrana.

Sugere-se que plataformas de lipídios sejam formadas em torno de uma âncora de lipídio que serve de estrutura-alvo, permitindo a interação de proteínas que apresentam sítios de interação específicos com estas classes de lipídios (Anderson & Jacobson 2002). A habilidade de esfingolipídios se segregarem neste local parece depender de ligações de átomos de hidrogênio estabelecidas entre eles e o colesterol (Brown 1998, Rietveld & Simons 1998).

Acúmulo de proteínas particulares (receptores) nas plataformas de lipídios contribui para maior eficiência de ligação da célula a determinadas moléculas e simultaneamente, cria regiões específicas de alta concentração de receptores na superfície da membrana plasmática. Se estes receptores estiverem envolvidos na captura de macromoléculas, então teremos a associação das plataformas lipídicas ao fenômeno da endocitose, como já observado em diversos tipos celulares para uma grande variedade de moléculas ligantes (Hanzal-Bayer & Hancock, 2007).

1.2.3. Endocitose mediada por cavéola - Potocitose

Cavéola é a denominação dada ao aspecto morfológico da invaginação de membrana que classicamente apresenta a forma da letra grega ômega invertida e que foi primeiramente observada na superfície de células endoteliais (Palade 1953),

onde são extremamente abundantes. A composição lipídica/protéica das cavéolas é diferente de outros domínios da membrana plasmática, apresentando como núcleo uma região de membrana menos fluída, enriquecida em colesterol, gangliosídeos, esfingolípídios (Brown & Rose 1992), proteínas de membrana ancoradas via GPI (Stahl & Mueller 1995), receptores inositol 1,4,5-trifosfato (Fujimoto et al. 1992) e a integrina caveolina (Rothberg et al. 1992).

Tem sido proposto que a forma e organização estrutural das cavéolas são dadas pela proteína caveolina. Esta proteína se liga ao colesterol inserindo-se como um laço nas camadas da membrana plasmática e se auto-associando para formar um revestimento na face citoplasmática da invaginação da membrana (Anderson 1998). Assim, cavéolas seriam plataformas de lipídio que apresentam a proteína caveolina como parte integrante de sua estrutura (Figura 1.5).

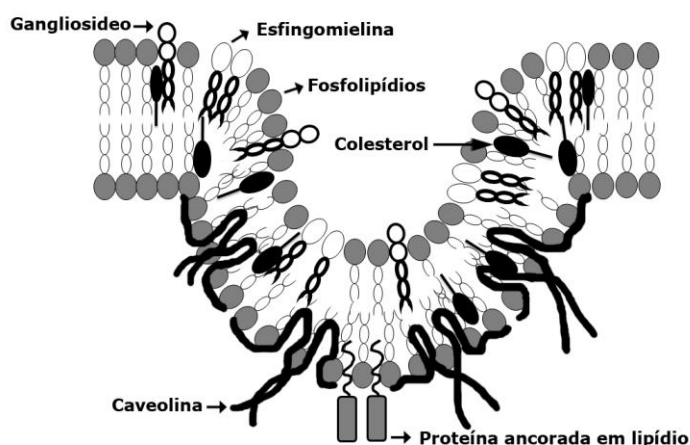


Figura 1.5 - Modelo esquemático da unidade de membrana na região de uma cavéola (Modificado de Nakahata & Ohkubo 2003).

O revestimento das cavéolas dificilmente é observado por microscopia eletrônica de transmissão de rotina (MET). Por esta razão, quando observadas no momento de seu brotamento por MET apresentam a sua superfície citoplasmática lisa, facilmente se diferenciando das vesículas revestidas por clatrina.

Caveolinas são proteínas integrais de membrana que pertencem a uma família de proteínas com massa molecular de 20-24 KDa. Os domínios citosólicos N- e C-terminais estão conectados a seqüências hidrofóbicas inseridas na bicamada lipídica da membrana plasmática (região também hidrofóbica), mas sem atravessar a bicamada para a porção extracelular (Dupree et al. 1993, Monier et al. 1995). Caveolinas são moléculas palmitoiladas na porção C-terminal, podendo ser fosforiladas nos resíduos de tirosina. Ligam-se a moléculas de colesterol e formam dímeros, podendo constituir grandes homo-oligômeros com massa molecular

alcançando 350 kDa, com 14-16 monômeros por oligômero (Glennay 1989, Monier et al. 1995, Murata et al. 1995, Sargiacomo et al. 1995).

Foram identificados três diferentes genes para caveolinas (Cav-1, Cav-2 e Cav-3), codificando quatro diferentes subtipos da proteína: caveolina-1 α , caveolina-1 β , caveolina-2 e caveolina-3 (Williams & Lisanti 2004). Caveolina-1 está distribuída na maioria dos tecidos, caveolina-2 tem distribuição semelhante, sendo mais expressa em tecido nervoso, e caveolina-3 ocorre principalmente em células musculares esqueléticas, cardíacas e lisas (Way & Parton 1995, Scherer et al. 1996, Song et al. 1996).

Caveolinas não têm localização exclusiva na membrana plasmática, já tendo sido identificadas na região Trans do Complexo de Golgi e em caveossomas (estruturas formadas por fusão de vesículas endocíticas originadas a partir de cavéolas). Caveossomas distinguem-se de endossomas iniciais por seu pH neutro, sua composição lipídica e pela presença de caveolina-1 (Pelkmans et al. 2001).

A formação de cavéolas é impedida em células submetidas a tratamentos que promovem a depleção de colesterol ou ainda através da interferência na expressão dos genes da caveolina (Drab et al. 2001, Razani et al. 2002). Células expressando caveolina-2 na ausência de caveolina-1 aparentemente não são capazes de gerar invaginações caveolares visíveis por MET (Scherer et al. 1997). Foi ainda proposto que a manutenção da forma típica e o estado estacionário das cavéolas estão diretamente relacionados com a presença de um citoesqueleto cortical de actina abaixo da vesícula (Nabi & Le 2003).

Na década de 1990 uma nova família de proteínas foi identificada em frações de membrana de células de mamíferos enriquecidas em caveolinas. Estas novas proteínas com cerca de 45 kDa de massa molecular foram inicialmente identificadas como proteínas integrais de membrana com alta homologia em seqüência linear de aminoácidos ao antígeno epidermal de superfície (ESA). Demonstrou-se que estas proteínas eram residentes em cavéolas, sendo denominadas de flotilinas (Bickel et al. 1997). O fato de ESA poder ser purificado de células muito divergentes como queratinócitos, adipócitos e células endoteliais, levou Bickel e colaboradores (1997) a sugerir que: (1) ESA fosse considerado como membro da família gênica das flotilinas; (2) posteriormente ESA fosse reconhecida como flotilina-2 (enquanto a primeira proteína flotilina identificada recebeu a denominação de flotilina-1). Algumas evidências apontam para a atividade de flotilinas como componentes estruturais do arranjo que formaria a arquitetura típica das cavéolas.

A interação da flotilina com a membrana plasmática não ocorre de forma que esta proteína possa ser classificada como uma proteína integral. A associação é restrita à camada lipídica interna da membrana, fazendo com que a flotilina adote uma orientação citoplasmática (Morrow et al. 2002). Na flotilina há um domínio que é o principal sítio de palmitoilação, essencial para sua associação à membrana plasmática, tendo sido sugerido que flotilina é sintetizada como uma proteína solúvel que subsequente se associe à membrana plasmática (Dermine et al. 2001, Morrow et al. 2002).

Flotilinas 1 e 2 apresentam distribuição complementar em diferentes tecidos. Além disto, podem existir como partes de um complexo hetero-oligomérico estável que contém ainda caveolina-1 e caveolina-2. Entretanto, a expressão de flotilinas pode ser regulada de forma independente da expressão de caveolinas e da formação de cavéolas (Volonte et al. 1999).

Recentemente foi descrito o cruzamento entre as vias de endocitose dependente e independente de cavéolas: vesículas caveolares foram encontradas fundindo-se com endossomas tardios, que são compartimentos da via endocítica clássica. Flotilina-1 já foi também encontrada em lisossomos, co-localizada com o marcador lisossomal LAMP-1 (Glebov et al. 2006). Embora se acredite que o brotamento de vesículas caveolares ocorra de forma clatrina-independente ligado a flotilina e caveolina, em células HeLa não foi possível observar co-localização para flotilina-1 e caveolina-1, indicando que flotilina-1 pode estar associada a uma via endocítica independente de clatrina e caveolina-1 (Naslavsky et al. 2004, Kirkham et al. 2005).

Cavéolas são regiões de ocorrência de potocitose na membrana celular. O termo potocitose foi inicialmente usado para denominar o processo de alta afinidade de captação de moléculas de baixa massa molecular essenciais ao metabolismo das células. Proteínas associadas à membrana celular promovem a concentração das moléculas nas cavéolas e uma vez contidas no espaço caveolar, elas se difundem para o citoplasma através de proteínas carreadoras presentes na membrana (Anderson et al. 1992).

Posteriormente foi proposto que o termo potocitose fosse estendido para definir todos os mecanismos pelos quais as células capturam e transportam pequenas e grandes moléculas (ou até mesmo complexos macromoleculares) através de cavéolas (Mineo & Anderson 2001). Desta forma, em células endoteliais observou-se que as cavéolas medeiam, por potocitose, a transcitose de

macromoléculas do lúmen vascular para o espaço subendotelial (Schnitzer et al. 1995). Uma distinção marcante entre a potocitose e a endocitose dependente de clatrina está nas diferentes possibilidades de endereçamento das moléculas capturadas (Figura 1.6).

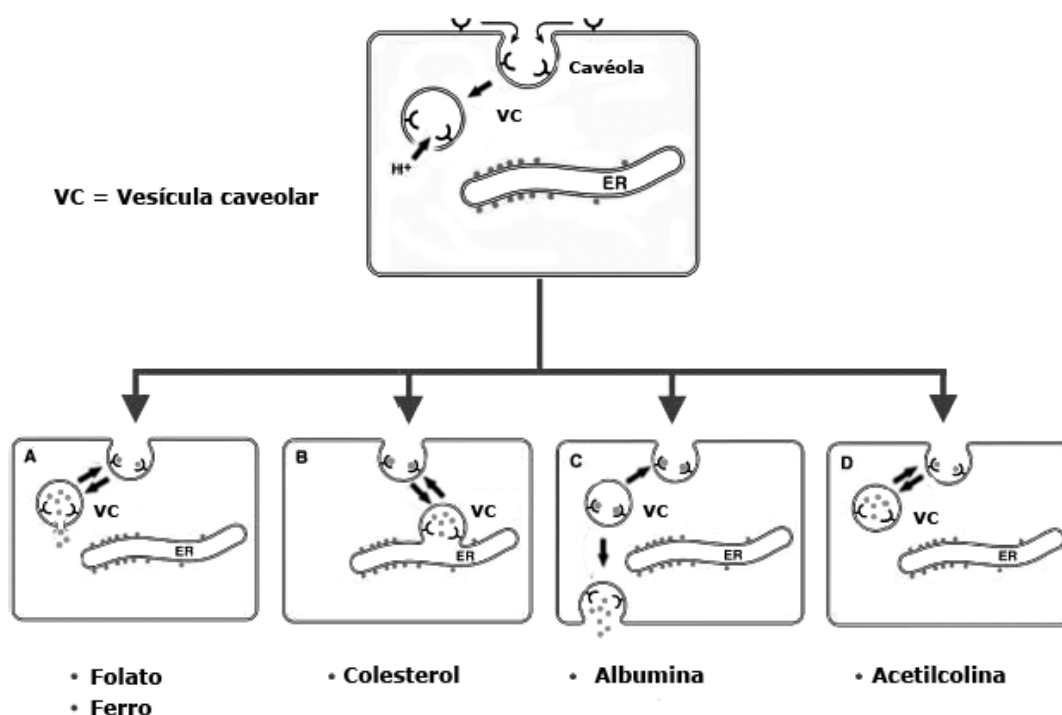


Figura 1.6 Esquema de distintas possibilidades de endereçamento para os receptores e moléculas na potocitose (Modificado de Mineo & Anderson 2001).

A) O ligante é entregue diretamente ao citoplasma e o receptor é reciclado para a membrana da célula. B) O ligante é entregue ao retículo endoplasmático ou outras organelas e o receptor é reciclado para a membrana plasmática. C) Tanto o receptor quanto o ligante são transportados para a extremidade oposta da célula. D) Ligante e receptor são internalizados e mantidos em vesículas até ambos retornarem à superfície da célula.

Regiões identificadas como cavéolas são primariamente plataformas de lipídio, nas quais se encontram inseridas as proteínas caveolina e/ou flotilinas. Embora algumas vesículas sem revestimento sejam derivadas de plataformas de lipídio, o uso generalizado destas terminologias estaria unindo em uma mesma classe todas as vesículas sem revestimento derivadas de plataformas de lipídio. Isto não corresponde à realidade, uma vez que estas vesículas sem revestimento medeiam diferentes processos de endocitose, incluindo aqueles que não se

enquadram na denominação da endocitose mediada por cavéola (Anderson & Jacobson 2002, Nabi & Le 2003).

O termo caveolar foi proposto como descritor morfológico para vesículas endocíticas derivadas de plataformas de lipídio (Nabi & Le 2003). Desta forma, este termo contempla tanto as cavéolas na endocitose em regiões em que a proteína caveolina está presente, como as vesículas transitórias de formas equivalentes a cavéolas oriundas de plataformas de lipídio, porém sem a presença de caveolina. Esta nomenclatura reflete a morfologia similar da invaginação, a composição de lipídios do domínio de membrana e o papel destes domínios na endocitose.

1.2.4. Endocitose mediada por clatrina

Clatrina é uma proteína estrutural de expressão constitutiva, encontrada em todas as células de mamíferos (Brodsky et al. 2001, Aridor & Traub 2002, Conner & Schmid 2003 a,b). Endocitose mediada por clatrina é responsável pela captação de moléculas e íons essenciais, tais como colesterol, através do receptor para LDL (“low density lipoprotein”, lipoproteína de baixa densidade) e ferro, através do receptor para transferrina (molécula transportadora de átomos de ferro). Endocitose mediada por clatrina foi inicialmente denominada de endocitose mediada por receptor, por não se conhecer na época outros eventos de pinocitose envolvendo interações específicas entre ligantes e receptores (Conner & Schmid 2003 b).

A concentração de moléculas por meio de receptores transmembrana de alta afinidade e o brotamento de vesículas com revestimento em sua face citoplasmática formado por um agrupamento de proteínas (sendo principal constituinte a proteína clatrina) estão freqüentemente associados para permitir a endocitose rápida de determinadas moléculas (transferrina, LDL...).

A biogênese das vesículas endocíticas é regulada por proteínas e co-fatores que controlam diferentes passos neste evento. Distintas proteínas podem estar associadas à membrana na região de formação da vesícula endocítica, sem no entanto formar um revestimento externo visível por MET. A associação da clatrina à membrana é que promove o revestimento externo das vesículas detectável por MET. Além disso, a associação da clatrina desencadeia um rápido brotamento da vesícula endocítica. À medida que clatrina vai se associando à membrana plasmática o revestimento formado vai gerando a força necessária para dobrar a membrana (Schekman & Orci 1996, Cosson & Letourneur 1997, Aridor & Traub 2002).

A clatrina está organizada estruturalmente como um trímero de polipeptídeos que se irradia de um ponto focal (Figura 1.7). Este esqueleto é composto de três cadeias pesadas (~180 kDa) associadas a três cadeias leves (~25 kDa) (Kirchhausen & Harrison 1981, Ungewickell & Branton 1981).

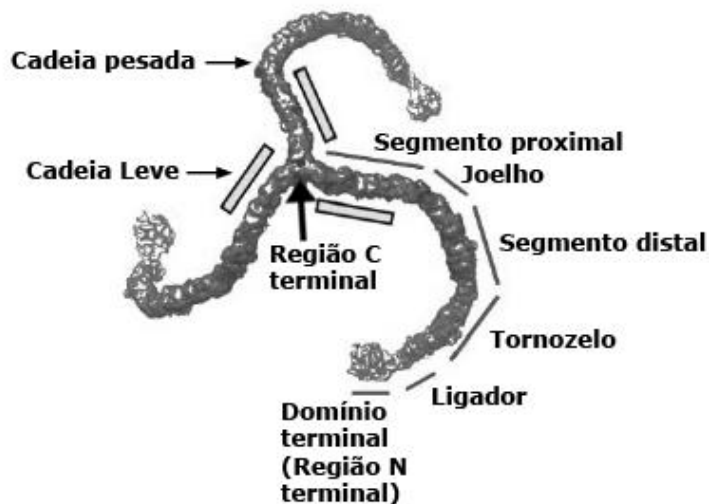


Figura 1.7 - Esqueleto trimérico da clatrina com os respectivos segmentos. A região C-terminal corresponde ao vértice da molécula e a região N-terminal ao domínio terminal (Modificado de Fotin et al. 2004).

A clatrina apresenta em condições não-fisiológicas a propriedade de auto-associação, dando origem a gaiolas fechadas formadas por diversos esqueletos triméricos da proteína. Nestes arranjos os segmentos da proteína se interdigitam formando uma rede de faces abertas pentagonais e hexagonais (Kirchhausen 2000, Brodsky et al. 2001). Dependendo da quantidade de esqueletos triméricos envolvidos (28, 26 ou 60 esqueletos), ocorre a montagem de estruturas com distintas conformações espaciais como: “mini-revestimento”, “barril hexagonal” ou “bola de futebol” (Figura 1.8), sendo o “barril hexagonal” e a “bola de futebol” os poliedros capazes de acomodar uma vesícula de transporte (Crowther et al. 1976, Fotin et al. 2004).



Figura 1.8 - Revestimento de vesículas a partir da associação de clatrina *in vitro*. Para fechamento da estrutura geométrica devem ocorrer ao menos 12 pentágonos. O esqueleto trimérico da clatrina está destacado em vermelho (Modificado de Fotin et al. 2004).

A clatrina não se associa diretamente à membrana das vesículas endocíticas: ela é recrutada por proteínas intermediárias adaptadoras (adaptinas), que se ligam diretamente a cauda citoplasmática de receptores transmembrana específicos. Essa associação determina sua inclusão de forma seletiva na vesícula e forma uma interface entre a clatrina na face interna da membrana e a carga incorporada na face extracelular da bicamada lipídica (Kirchhausen 2000, Brodsky et al. 2001, Conner & Schmid 2003 a).

O termo adaptina abrange diversas proteínas de massa molecular aproximada a 100 KDa, inicialmente isoladas de vesículas com revestimento de clatrina (Pearse 1975). Duas classes de adaptinas com grandes diferenças estruturais e funcionais estão descritas com base na sua capacidade de associação à clatrina: a proteína monomérica AP180 e os complexos multifuncionais heterotetraméricos de proteínas adaptadoras.

A proteína monomérica AP180 não está relacionada com reconhecimento de ligantes na membrana plasmática. É uma proteína diretamente envolvida na reciclagem de vesículas nas regiões de sinapse de neurônios. Entretanto, a identificação de uma isoforma expressa ubiquamente em mamíferos denominada CALM ("Clathrin-assembly lymphoid-myeloid leukemia", proteína de montagem de clatrina na leucemia linfóide-mieloide) levou a se considerar uma função bem mais abrangente do que inicialmente se havia proposto para esta proteína (McMahon 1999, Tebar et al. 1999).

Foram identificados quatro complexos heterotetraméricos de proteínas adaptadoras (AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4) que medeiam o brotamento e a formação de vesículas em diferentes localizações subcelulares. No entanto, apenas as AP-2 estão envolvidas com a formação de vesículas a partir da membrana plasmática, sendo marcadoras de endocitose mediada por clatrina em células eucaróticas superiores (Kirchhausen 1999, Brodsky et al. 2001, Robinson & Bonifacino 2001).

As AP-2 contêm quatro subunidades: duas maiores e estruturalmente relacionadas, denominadas subunidade de adaptina α e β 2 (aproximadamente 105 a 115 kDa), uma subunidade média μ 2 (aproximadamente 50 kDa) e uma subunidade pequena σ 2 (aproximadamente 17 kDa). O complexo AP-2 está organizado em um núcleo em forma de barril constituído pelas porções amino-terminais das grandes subunidades de adaptina (α e β 2) e mais as duas subunidades menores (μ 2 e σ 2). Este núcleo expõe dois apêndices protuberantes formados pelas porções carboxi-terminais das subunidades α e β 2 do complexo adaptador (Figura 1.9). Pela forma

típica da protuberância ele é amplamente citado na literatura como “orelha” (Marsh & McMahon 1999, Brodsky et al. 2001, Collins et al. 2002).

Complexo adaptador 2 - (AP 2)

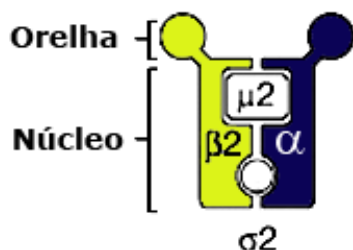


Figura 1.9 - Esquema geral do complexo heterotetramérico adaptador 2. A subunidade $\beta 2$ conecta-se diretamente com a clatrina, enquanto a interação com a face citoplasmática do receptor de membrana ocorre através da subunidade $\mu 2$ (Modificado de Conner & Schmid 2003 a).

As subunidades α - e $\beta 2$ -adaptina especificam o local de formação do arranjo de clatrina, direcionando a associação do complexo AP-2 à membrana plasmática. Atuam também como uma plataforma recrutando outras proteínas acessórias (amfifisina, Eps15, epsina). A fosforilação do complexo AP-2 regula seu recrutamento para a membrana plasmática, sua interação com o receptor transmembrana e sua associação com a clatrina (Fingerhut et al. 2001, Collins et al. 2002, Ricotta et al. 2002).

O fator chave da endocitose mediada por clatrina é a ligação entre a maquinaria endocítica e a molécula-carga (Figura 1.10). Interação direta com arquiteturas protéicas baseadas em tirosina ou di-leucinas em domínios citoplasmáticos dos receptores transmembrana é feita pela subunidade $\mu 2$ -adaptina, afetando assim a concentração de receptores na invaginação de membrana. A subunidade $\sigma 2$ -adaptina estaria relacionada à manutenção da estabilidade do núcleo do complexo adaptador, enquanto a associação direta com a clatrina é feita pela subunidade $\beta 2$ -adaptina (Conner & Schmid 2003 a, Conner et al. 2003).

Esqueleto trimérico da clatrina

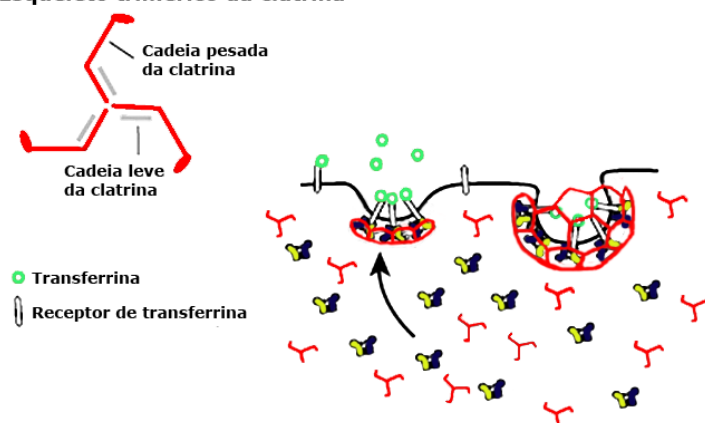


Figura 1.10 - Conjunto de moléculas interagindo de forma coordenada durante a endocitose mediada por clatrina. Os complexos adaptadores fazem a ligação entre a molécula carga (presa em seu receptor) e a clatrina na face citoplasmática da membrana (Modificado de Conner & Schmid 2003 a).

Subunidades divergentes de adaptinas (γ -, σ -, e ϵ -), pertencentes aos complexos AP-1, AP-3 e AP-4 respectivamente, estão relacionadas a outras organelas celulares. O adaptador AP-1 é responsável por brotamento de vesículas a partir da região Trans do Complexo de Golgi. Os adaptadores AP-3 e AP-4 são encontrados próximo a endossomas e à região Trans do Golgi, respectivamente, mas pouco se conhece sobre suas funções (Simpson et al. 1997, Hirst et al. 1999). Embora mais de um adaptador esteja relacionado com brotamento de vesículas a partir do complexo de Golgi, propôs-se que o complexo de proteína de revestimento COP-I regulado por uma pequena GTPase (Arf) é necessário e suficiente para promover o brotamento da vesícula a partir desta organela (Springer et al. 1999).

Diferentes cinases estão associadas à fosforilação das subunidades do complexo AP-2, sugerindo que a interação entre AP-2 e clatrina seja mediada por ciclos de fosforilação e desfosforilação (Wilde & Brodsky 1996, Pauloin et al. 1988, Olusanya et al. 2001). Ensaios *in vitro* demonstraram que a fosforilação da subunidade $\mu 2$ aumenta em até 25 vezes a afinidade do complexo AP-2 por arquiteturas baseadas em tirosina nos receptores transmembrana. Esta adaptina, permite o recrutamento seletivo e aumenta a concentração de moléculas-carga na vesícula revestida por clatrina, melhorando assim a eficiência da endocitose (Umeda et al. 2000, Conner & Schmid 2002, Ricotta et al. 2002, Conner & Schmid 2003 a).

Entretanto, demonstrou-se que a presença da AP-2 não é pré-requisito para a associação e funcionalidade da clatrina na membrana plasmática. O revestimento de clatrina foi observado mesmo em modelos desprovidos de todas as proteínas adaptadoras conhecidas (Huang et al. 1999, Ford et al. 2002, Conner & Schmid 2003 b). Assim AP-2 pode estar mais relacionada com reconhecimento e recrutamento de carga, pela sua associação seletiva a domínios citoplasmáticos de receptores transmembrana específicos (Conner & Schmid 2003 b).

No estágio final da formação da vesícula ocorre associação da proteína dinamina à membrana plasmática, promovendo liberação da vesícula (Figura 1.11).

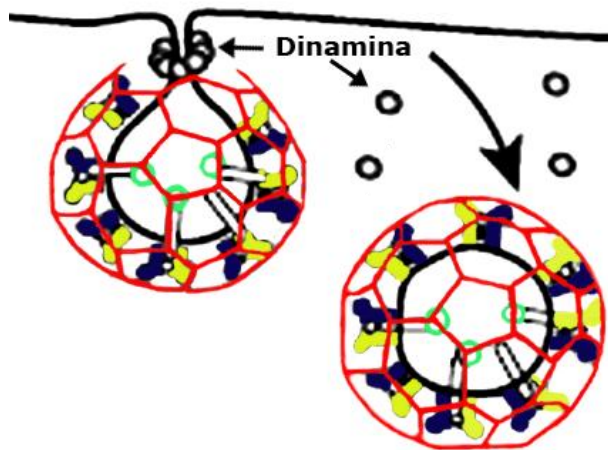


Figura 1.11 - Um dos modelos da atuação da dinamina na liberação da vesícula endocítica dependente de clatrina. Modificado de Conner & Schmid 2003 a.

Após o despreendimento da vesícula endocítica da membrana plasmática e sua localização livre no citoplasma, ocorre a associação das proteínas hsc-70 (“heat shock cognate”, equivalentes à proteína de choque térmico, 70 kDa) ao revestimento de clatrina. Estas proteínas tem atividade ATPase, desativando a cinase AKK1 e permitindo assim a desfosforilação do complexo AP-2 por fosfatases endógenas, desligando o complexo AP-2 da vesícula endocítica e simultaneamente do esqueleto trimérico de clatrina. Desta forma ocorre a desmontagem do revestimento de clatrina da vesícula (Conner & Schmid 2002).

Após a incorporação das vesículas e da perda de seu revestimento de clatrina, estas estruturas fundem-se com endossomas iniciais. Estes compartimentos (endossomas iniciais) apresentam sua membrana composta majoritariamente por fosfatidil-inositol-3-fosfato, e como componente protéico, proteínas com domínio de ligação a fosfatidil-inositol-3-fosfato (Fab1, YOTB, Vac1). Os endossomas iniciais desempenham papel chave na seleção de receptores, os quais podem ser reciclados para a membrana plasmática ou direcionados para endossomas multivesiculares, endossomas tardios ou lisossomos para degradação (Le Roy & Wrana 2005).

Quanto à organização destas vias são propostas duas teorias:

(1) Modelo da maturação (Figura 1.12): vesículas oriundas da membrana plasmática fundem-se no citoplasma dando origem a endossoma inicial temporário, que amadurece basicamente por diminuição de pH e incorporação de enzimas vindas do complexo de Golgi, transformando-se no temporário endossoma tardio por diminuição de pH, que posteriormente chegará a lisossomo (com pH ótimo para atividade lítica das enzimas incorporadas durante a maturação) (Murphy 1991).

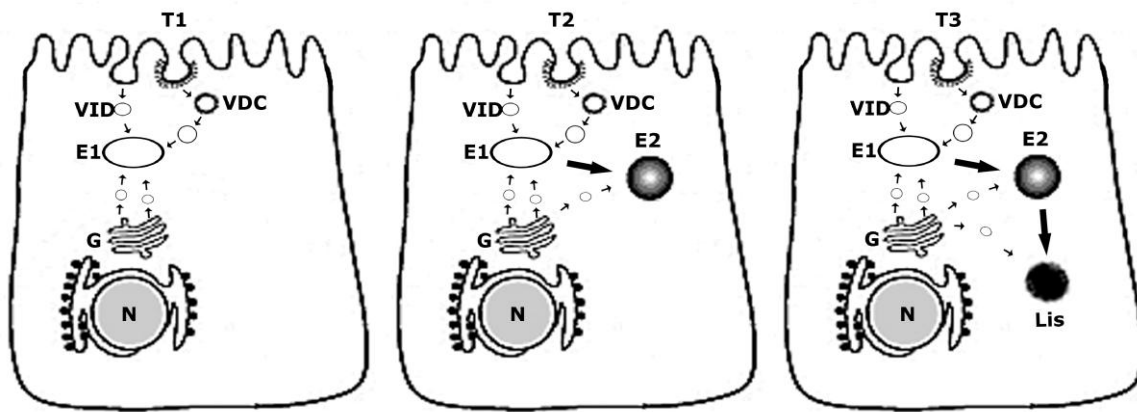


Figura 1.12 - Esquema da via endocítica pela hipótese da maturação de compartimentos. T1, T2 e T3 representam a cinética deste evento. VID e VDC: brotamento de vesículas independente e dependente de clatrina, respectivamente; E1: endossoma inicial; E2: endossoma tardio; LIS: lisossomo; G:, complexo de Golgi; N: núcleo.

(2) Modelo dos compartimentos pré-existentes (Figura 1.13): endossoma inicial, endossoma tardio e lisossomo são compartimentos estáveis entre os quais existem diversas vias de tráfego de vesículas (Griffiths & Gruenberg 1991).

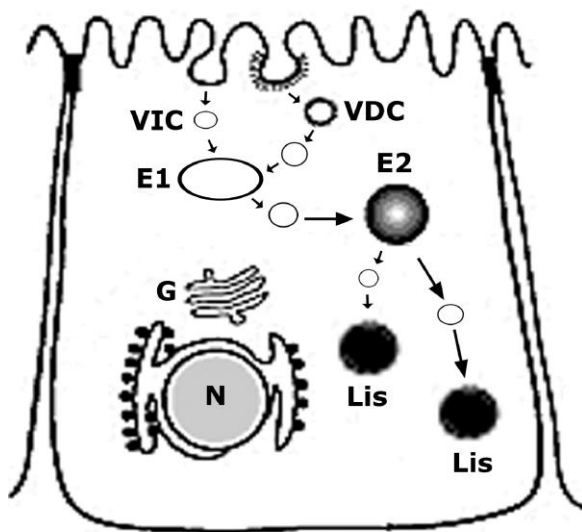


Figura 1.13 - Esquema da via endocítica com compartimentos pré-existentes. VIC e VDC, brotamento de vesículas independente e dependente de clatrina; E1, endossoma inicial; E2, endossoma tardio; Lis, lisossomo; N, núcleo; G, complexo de Golgi. As setas indicam o trajeto das vesículas desde a membrana plasmática até os lisossomos.

1.2.5. Formação de vesículas dependente de dinamina

Dinamina é uma GTPase multifuncional envolvida na liberação de vesículas nas endocitoses independentes ou mediadas por cavéolas e por clatrina, sendo ainda requisitada durante a fagocitose. Assim, é a principal proteína reguladora do tráfego de vesículas a partir da membrana plasmática (Sever et al. 2000, Praefcke & McMahon 2004). A dinamina apresenta um domínio de ligação com fosfatidil-inositol-

4,5-bifosfato (PtdIns(4,5)P₂), dois domínios efetores que permitem sua auto-montagem, o domínio efetor de GTPase (GED: “GTPase effector domain”), o domínio médio de GTPase, e um domínio que promove a interação da dinamina com outros componentes endocíticos (PRD “Proline/arginine-rich domain”: domínio rico em prolina e arginina).

Ocorrem ao menos três dinaminas em mamíferos (dinaminas I, II e III, as dinaminas clássicas) com 79% de identidade entre si, produto de edição alternativa pós-transcricional. Além disto, diferentes isoformas destas moléculas estão largamente distribuídas nas células eucarióticas (Gray et al. 2003). Dinamina II é expressa em todos os tecidos, enquanto dinamina I é expressa majoritariamente em células do sistema nervoso (Sontag et al. 1994). Já dinamina III é encontrada principalmente nos testículos, mas também no cérebro em vesículas pós-sinápticas (Nakata et al. 1993).

Outras isoformas da dinamina que não se enquadram na família das dinaminas clássicas são denominadas de semelhantes à dinamina, estando envolvidas na divisão de organelas como mitocôndrias, cloroplastos e peroxissomos (Praefcke & McMahon 2004, Ingeman et al. 2007).

A função da dinamina melhor entendida é a relacionada com a liberação de vesículas da membrana plasmática na endocitose mediada por clatrina (Praefcke & McMahon 2004, Ungewickell & Hinrichsen 2007).

No estágio final de formação das vesículas há a auto-associação de diversas unidades de dinamina na região entre o segmento plano da membrana e a membrana da vesícula. Em seguida ocorre a constrição desta região, permitindo a liberação da vesícula para o citoplasma (Figura 1.14).

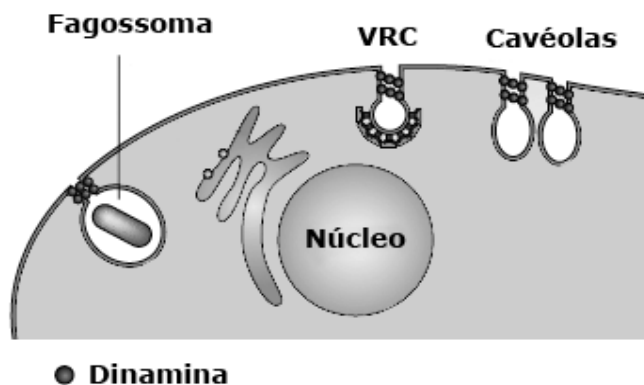


Figura 1.14 - Esquema da liberação de vesículas mediadas pela ação da dinamina. VRC: vesículas revestidas por clatrina (Modificado de Praefcke & McMahon 2004).

Existem dois modelos propostos para a atividade da dinamina: o primeiro defende que a proteína, diferentemente dos outros membros da família das GTPases, atue como enzima químico-mecânica induzindo a formação da vesícula. Esta hipótese se sustenta na observação de que hélices de dinamina tornam-se mais contraídas sob hidrólise de GTP, sugerindo que a associação da dinamina à membrana estaria exercendo a função de um “torniquete molecular” (Sweitzer & Hinshaw 1998).

A segunda proposta apóia o modelo de funcionamento na observação que espirais de dinamina formadas na presença de GDP apresentam uma maior área do que aquelas formadas na presença de GTP, sugerindo que dinamina atue como uma “mola” em torno da porção da invaginação de membrana, ainda associada à porção plana da membrana plasmática. A contração de seu diâmetro interno libera a vesícula para o citoplasma da célula (Stowell et al. 1999).

2. Tripanossomatídeos: morfologia, unidade de membrana e endocitose

Os tripanossomatídeos são protozoários flagelados que apresentam algumas particularidades na sua arquitetura celular quando comparados com as demais células eucarióticas, que se refletem nas vias de captação de nutrientes por estes organismos. Nos tripanossomatídeos a membrana plasmática, que limita o citoplasma da célula, está disposta sobre um arcabouço de microtúbulos, estabilizados por ligações cruzadas e associados com a própria membrana. Este arranjo de microtúbulos é denominado de microtúbulos subpeliculares (Landfear & Ignatushchenko 2001, Morgan et al. 2002 b). Devido à presença deste arcabouço, invaginações de membrana plasmática são dificultadas na maior parte da superfície do protozoário.

No entanto, este arranjo de microtúbulos é descontinuado na porção anterior da célula, onde há uma grande invaginação da membrana plasmática, a bolsa flagelar, de onde o flagelo emerge da célula (Figura 1.15). Todas as modalidades da endocitose bem como a exocitose, em tripanossomatídeos ocorrem exclusivamente neste local, a exceção dos protozoários que apresentam citóstoma e citofaringe (Soares & De Souza, 1991, Webster & Russell 1993, Overath et al. 1997, De Souza 2002, Morgan et al. 2002 b).

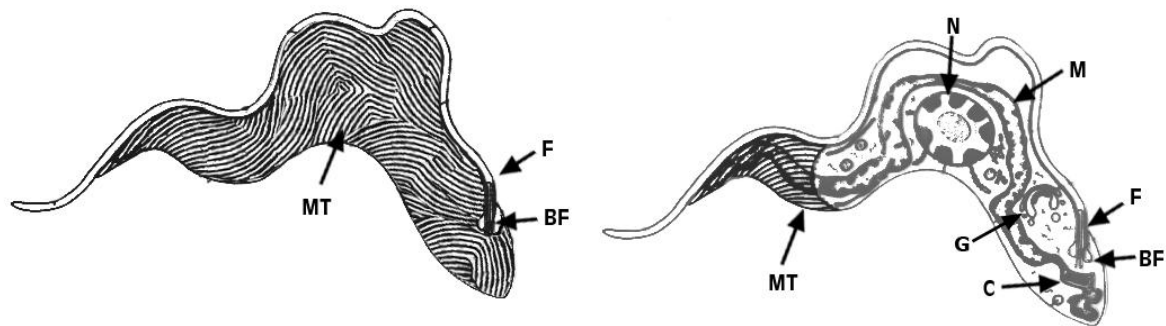


Figura 1.15 - Desenho esquemático do *Trypanosoma brucei*. A esquerda o arranjo de microtúbulos subpeliculares e a direita observa-se os microtúbulos em corte e o conteúdo do citoplasma do protozoário. N, núcleo; M, mitocôndria; F, flagelo; BF, bolsa flagelar; C, cinetoplasto; G, complexo de Golgi, MT, microtúbulos subpeliculares. Modificado de Tropical Diseases Web Ring, 2007: www.icp.ucl.ac.be/~opperd/parasites/afr_sl_siickness.html.

Embora a membrana plasmática no corpo celular destes protozoários não invagine, ela pode conter diversas permeases, como por exemplo, transportadores de glicose (Stack et al. 1990), que medeiam a captação de nutrientes específicos.

A membrana celular dos tripanossomatídeos apresenta-se morfologicamente dividida em três regiões distintas: (1) membrana flagelar, (2) membrana da bolsa flagelar, e (3) membrana plasmática. Cada um destes domínios representa uma porção de unidade de membrana altamente especializada com distintas funções e conteúdo único de lipídios e proteínas (Landfear & Ignatushchenko 2001).

A membrana da bolsa flagelar envolve a base do flagelo e está, na região de sua abertura com o meio externo, circundada por vários complexos juncionais que a unem à membrana do flagelo (Balber 1990, Clayton et al. 1995). Foi proposto que estas junções se relacionem à restrição do fluxo de materiais através da bolsa flagelar, mas no entanto macromoléculas movem-se livremente através deste compartimento (Landfear & Ignatushchenko 2001). Esta membrana representa cerca de 3% do total de membrana da superfície do protozoário, sendo para algumas espécies o único local conhecido para endocitose, secreção de proteínas e adição de proteínas integrais de membrana (Duszenko et al. 1988, Balber 1990, Webster & Russell 1993). Algumas espécies de *Trypanosoma* internalizam toda a área de membrana da bolsa flagelar a cada dois minutos, fazendo desta região um local (ou organela) com a maior atividade endocítica conhecida entre as células eucarióticas (Coppens et al. 1987, Overath et al. 1997).

O citoplasma compreendido entre o núcleo e a bolsa flagelar concentra o complexo de Golgi e uma complexa rede de túbulos e vesículas, além de outras estruturas associadas à bolsa flagelar e relacionadas à osmoregulação. Relacionou-se a concentração deste complexo sistema de membranas nesta região às necessidades funcionais da célula. A curta distância entre esta rede de túbulos e vesículas e a bolsa flagelar permite que vesículas trafeguem rapidamente entre os compartimentos celulares, aumentando a eficiência do transporte (Brickman et al. 1995, Field et al. 1998, Field et al. 2000, Grunfelder et al. 2003, Field et al. 2007).

Em alguns gêneros da família *Trypanosomatidae* concentram-se espécies patogênicas de importância médica e veterinária, incluindo espécies infectivas para plantas. Estes protozoários divergiram remotamente do ramo eucarioto ancestral, o que levou a um grande distanciamento genômico de outros grupos, resultando em vias metabólicas e mecanismos biológicos particulares. No entanto, os mecanismos endocíticos encontrados de forma geral nas células eucarióticas mostram-se extremamente conservados (Field et al. 2007).

As interações observadas entre tripanossomatídeos e seus hospedeiros podem ter contribuído ainda mais para o afastamento entre a fisiologia destas células em relação às demais células eucarióticas. Estes protozoários apresentam ciclo de vida heteroxênico, incluindo pelo menos um estágio de vida em um artrópode vetor e outro em um hospedeiro vertebrado ou planta. Esta transferência entre hospedeiros desencadeia a diferenciação do parasita para adequação de seus ciclos metabólicos e resistência ao novo ambiente (Morgan et al. 2002 a, Field et al. 2007).

O processo de diferenciação promove profundas transformações na morfologia dos parasitas e re-estruturação das proteínas e glicoconjugados na superfície da membrana plasmática. Levando-se em consideração as mudanças morfológicas (como ponto de saída do flagelo no corpo e posição do cinetoplasto), diversas formas adaptativas foram caracterizadas e algumas destas formas são usadas para identificar alguns gêneros. Por exemplo, formas coanomastigotas são exclusivas do gênero *Crithidia*, enquanto formas amastigotas são observadas nos gêneros *Trypanosoma*, *Leishmania* e *Crithidia* (Figura 1.16).

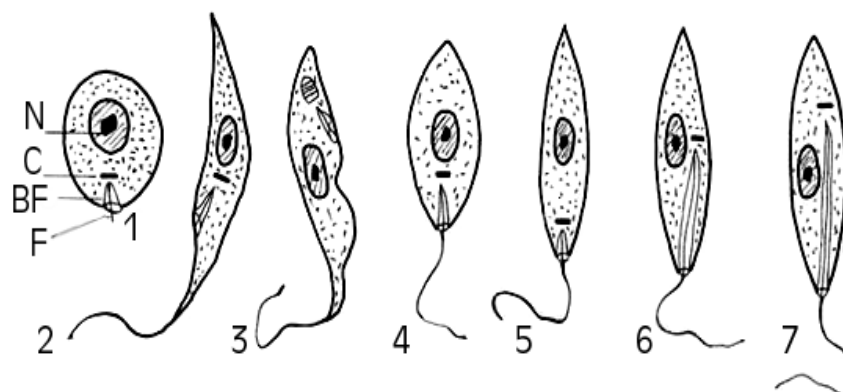


Figura 1.16 - Formas adaptativas dos tripanossomatídeos. 1) amastigota; 2) epimastigota; 3) tripomastigota; 4) coanomastigota; 5) promastigota. 6) paramastigota e 7) opistomastigota. Nas formas epimastigotas e tripomastigotas o flagelo emerge lateralmente ao corpo celular, estando ainda aderido a este corpo. N, núcleo; C, cinetoplasto; BF, bolsa flagelar; F, flagelo. Imagem gentilmente cedida pelo Dr. Maurilio José Soares.

Estas mudanças são a expressão de uma coordenada cascata de ativação e desativação gênica que também afeta o sistema de tráfego de moléculas na célula. Por exemplo, em *Trypanosoma brucei* ocorre grande alteração na taxa de endocitose dependendo da forma evolutiva: em formas sangüíneas a endocitose é cerca de dez vezes mais intensa do que o observado em formas procíclicas (Morgan et al. 2002 b).

Espécies de *Trypanosoma* e *Leishmania* apresentam formas intracelulares obrigatórias (amastigotas) quando em um hospedeiro vertebrado. Para estas formas a habilidade em endocitar nutrientes necessários à sua manutenção dentro da célula hospedeira (estando inseridas em um vacúolo parasitóforo) é um fator crítico para a sobrevivência. Qualquer molécula necessária às formas amastigotas deverá entrar através da membrana do vacúolo parasitóforo, para que em seguida possa ser endocitada através da bolsa flagelar pelo parasita (Russell et al. 1992).

Pouco se sabe sobre os mecanismos endocíticos nos gêneros *Leishmania*, *Phytomonas*, *Herpetomonas* e *Crithidia*. A maioria dos trabalhos com estes protozoários se concentra em *Leishmania* (Denny et al. 2001, Denny et al. 2005, Besteiro et al. 2006, Yoneyama et al. 2006, Field et al. 2007). Estudos morfológicos não publicados do nosso grupo não obtiveram êxito em identificar a captação de macromoléculas por análise por MET em formas promastigotas de *Leishmania* pertencentes tanto ao subgênero *Viannia* quanto ao subgênero *Leishmania*.

2.1. A endocitose nos tripanossomas africanos

Os tripanossomas africanos são protozoários patogênicos transmitidos ao hospedeiro vertebrado através da picada da mosca hematófaga tsé-tsé (*Glossina spp.*). Estes parasitas passam por diferentes ciclos de diferenciação e desenvolvimento tanto no corpo do inseto quanto dentro do hospedeiro vertebrado. Uma das características centrais destas diferenciações é a reestruturação dos glicoconjugados e proteínas da superfície celular externa. As glicoproteínas variantes de superfície (VSG) são as moléculas majoritárias presentes na superfície celular do parasita, sendo encontradas apenas nas formas adaptativas metacíclicas, tanto no hospedeiro artrópode quanto no hospedeiro vertebrado (Webster & Fish 1989). A Figura 1.17 mostra o ciclo de vida do *T. brucei*.

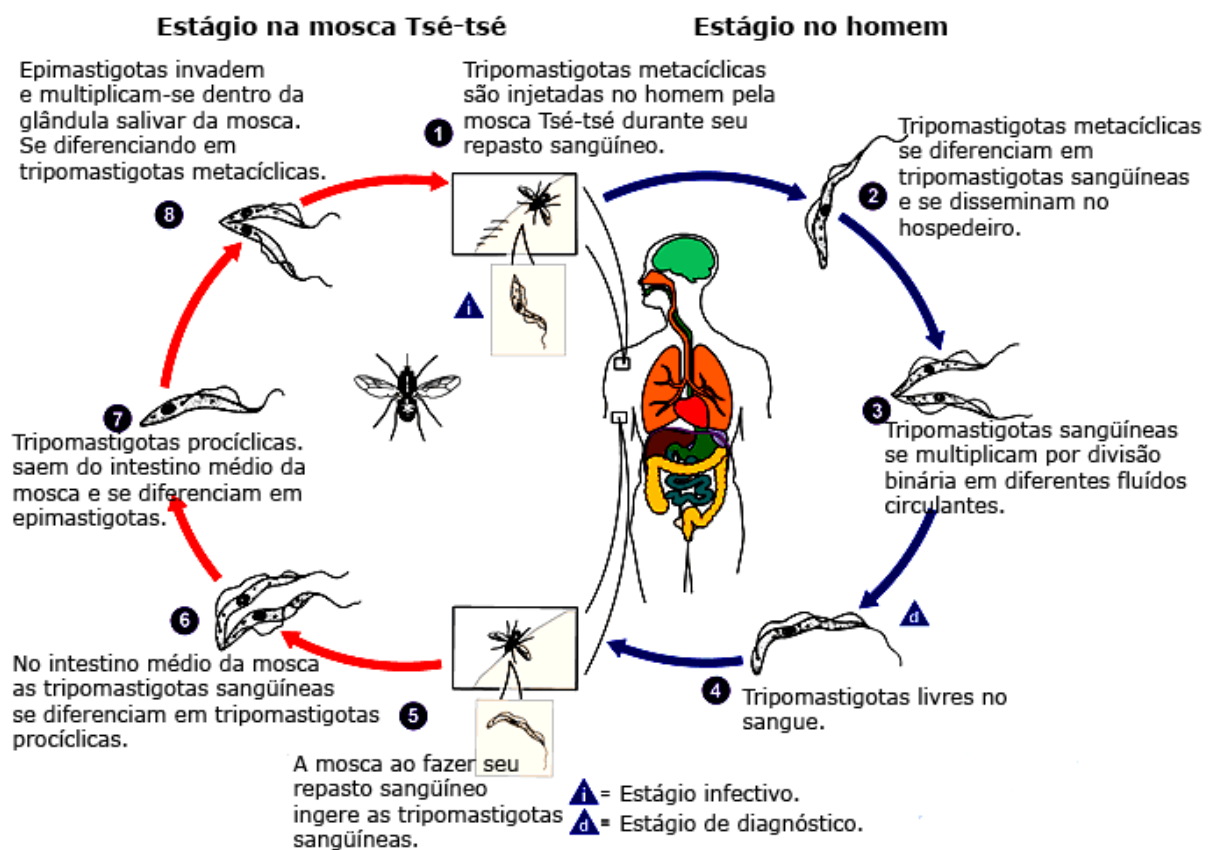


Figura 1.17 - Esquema do ciclo de vida do *T. brucei*. Fonte CDC (Center for Disease Control and Prevention) www.dpd.cdc.gov/dpdx

A reciclagem das VSG na superfície do *T. brucei*, garante ao protozoário, evasão do sistema imune do hospedeiro vertebrado quando opsonizado por

anticorpos ou outros elementos do soro. Este fenômeno se dá através da endocitose das VSG, dependente de clatrina através da bolsa flagelar.

A endocitose de nutrientes nestes tripanossomas vem sendo bastante estudada, empregando-se proteínas como LDL, transferrina e albumina acopladas a ouro coloidal, para se observar a captação destas moléculas. *Trypanosoma brucei*, *T. congolense* e *T. vivax* são os modelos de endocitose mais estudados nestes protozoários (Coppens et al. 1987, Coppens et al. 1988, Webster & Grab 1988, Webster & Fish 1989, Webster & Shapiro 1990, Webster & Russell 1993). A captação de transferrina e albumina pode estar relacionada à forma adaptativa do parasita, não sendo observado experimentalmente a endocitose destes marcadores em formas procíclicas. No entanto, esta observação não indica a ausência de endocitose nesta fase do ciclo de vida do parasita, uma vez que ocorrem proliferação e diferenciação celular (Webster & Fish 1989).

Experimentalmente, com exceção da forma metacíclica, as demais formas diferenciadas no inseto (tripomastigotas procíclicos e epimastigotas) realizam a endocitose em menor escala do que a observada na forma adaptativa do parasita no hospedeiro mamífero (tripomastigota sangüíneo). Sugeriu-se que as formas metacíclicas estariam em um estágio de adaptação para a vida no hospedeiro mamífero, onde os processos de endocitose seriam responsáveis por prover rápida captação de nutrientes e fatores de crescimento que afetariam a diferenciação para as formas proliferativas sangüíneas (Coppens et al. 1987, Webster & Grab 1988, Webster & Fish 1989).

Vesículas com revestimento externo foram morfológicamente identificadas em formas metacíclicas de tripanossomas africanos desde a década de 1960 (Vickerman 1969), época onde pouco se sabia sobre endocitose em protozoários. Mais tarde, demonstrou-se que vesículas revestidas com clatrina originavam-se da membrana plasmática e entregavam seus conteúdos a endossomas (Webster & Grab 1988).

Outra característica destas vesículas revestidas é que em experimentos de marcação simultânea com VSG e proteínas marcadas (LDL, transferrina e albumina), foi observada a co-localização dos marcadores, implicando que a via de entrada e o destino intracelular destas moléculas seriam comuns (Webster & Fish 1989). Tem sido proposto que o sistema de cisternas e vesículas que compõe a via endocítica destes tripanossomas (tanto em formas procíclicas quanto em formas

metacíclicas) apresente grande similaridade com os endossomas de células de mamíferos (Webster & Grab 1988, Webster & Fish 1989).

A ocorrência de endocitose mediada por receptor em *T. brucei* foi demonstrada pela captação de LDL e transferrina (Coppens et al. 1987, Webster & Grab 1988). Outros tipos de receptores, como por exemplo, receptor para HDL (“high density lipoprotein”, lipoproteína de alta densidade) (Black & Vandeweerd 1989, Hajduk et al. 1989) e receptor para EGF (“epidermal growth factor”, fator de crescimento epidermal) (Hide et al. 1989) têm sido demonstrados. No entanto, a presença e função destes receptores tem sido alvo de contestação (Borst & Fairlamb 1998).

Receptores para LDL e transferrina foram purificados e caracterizados em *T. brucei* (Coppens et al. 1988, Steverding et al. 1994, Bastin et al. 1996, Steverding & Overath 1996). Nestes estudos ficaram evidentes as grandes diferenças entre o receptor do protozoário e o das células de mamíferos. Como principal diferença entre o receptor para transferrina de tripanossomas africanos e o de células de mamíferos destaca-se o modo de ancoragem: enquanto em células de mamífero tais moléculas são proteínas transmembrana, nestes parasitas os receptores estão ancorados à membrana plasmática, via âncora de GPI (Ligtenberg et al. 1994, Salmon et al. 1994, Steverding et al. 1994, Steverding et al. 1995). Análise das seqüências gênicas do receptor de transferrina em diferentes espécies destes protozoários demonstraram que estes genes estão amplamente distribuídos (Isobe et al. 2003).

Para entender como a endocitose mediada por receptor ocorre nestes protozoários, técnicas de purificação de vesículas endocíticas revestidas foram desenvolvidas para esclarecer a natureza do revestimento (Shapiro & Webster 1989). Análise por SDS-PAGE de extrato total de proteínas de fração purificada de vesículas revestidas mostrou a presença majoritária de VSG. Este achado atribui ao fenômeno da endocitose uma sólida ligação com o mecanismo de escape do protozoário, frente à opsonização por moléculas circulantes na corrente sangüínea do hospedeiro mamífero (Seyfang et al. 1990, Ghedin et al. 2001).

A partir de tripomastigotas sangüíneos de *T. brucei* obteve-se frações purificadas de vesículas endocíticas com revestimento, das quais foi identificada uma proteína com massa molecular semelhante à da cadeia pesada da clatrina de mamíferos. No entanto, esta proteína não pode ser reconhecida experimentalmente por anticorpos anti-clatrina, cuja origem era de mamíferos, o que impossibilitou a sua

caracterização (Webster & Shapiro 1990). Posteriormente, demonstrou-se a ocorrência da endocitose de transferrina e LDL mediada por clatrina em *T. brucei*. Esta via de captação de macromoléculas tem como destino final o lisossomo, conforme observado em células de mamíferos (Coppens et al. 1987, Grab et al. 1992, Grunfelder et al. 2003).

Surgiu então, uma discrepância relacionada à clatrina na endocitose de transferrina em *T. brucei*: o receptor para esta molécula está ancorado na membrana do protozoário, não possuindo a estrutura citoplasmática necessária para ligação às proteínas adaptadoras que dirigem o acoplamento da clatrina à vesícula. Foi proposta a existência de uma proteína transmembrana secundária responsável pela inclusão da endocitose de transferrina no mecanismo mediado por clatrina, que explicaria também como o receptor de transferrina está restrito à bolsa flagelar do parasita (Borst & Fairlamb 1998).

Em *T. brucei*, a endocitose mediada por clatrina parece ser similar, mas não idêntica à observada em células de mamíferos. Essas vesículas medem cerca de 100 a 150 nm de diâmetro contendo o típico revestimento protéico externo de membrana. No entanto, é consenso que a endocitose mediada por clatrina exclusivamente nas formas sangüíneas de *T. brucei* ocorre de forma independente de dinamina (Field et al. 2007). A expressão de clatrina tanto em formas sangüíneas quanto em formas procíclicas e a letalidade provocada pela ausência da clatrina nestas células, indicam a grande importância funcional desta proteína na manutenção do equilíbrio tanto de fenômenos endocíticos quanto exocíticos dependentes de clatrina (Langreth & Balber 1975, Webster & Shapiro 1990, Morgan et al. 2001, Allen et al. 2003, Field et al. 2007).

Outras integrinas associadas à bolsa flagelar e à endocitose, como CRAM (proteína ácida integral de membrana rica em cisteína), BARP (polipeptídeo de fase sangüínea rico em alanina), ISG100 (glicoproteína de superfície invariante) e adaptinas vêm sendo caracterizadas nos modelos africanos de *Trypanosoma* (Morgan et al. 2002 a). A proteína RAB5 (tbRAB5), uma marcadora de endossomos iniciais, foi identificada associada a vesículas endocíticas de *T. brucei* responsáveis pelo tráfego intracelular da transferrina (Morgan et al. 2002 b).

Microdomínios de membrana enriquecidos em esfingolipídios e colesterol, pobres em proteínas, e que atuam como uma plataforma segregando proteínas ancoradas via GPI e glico-conjugados também já foram identificados em *T. brucei*. A denominação empregada para domínios de membrana similares em células de

mamíferos - plataforma de lipídio - foi usada para denominar esta região de membrana nestes protozoários (Denny et al. 2001). Apesar da controvérsia em torno da existência física das plataformas de lipídio em membranas biológicas, diversas evidências apontam para a sua presença em tripanossomas (Denny et al. 2001, Denny & Smith 2004, Uemura et al. 2004, Yoneyama et al. 2006, Field et al. 2007).

Assim como as plantas, os tripanossomas sintetizam esfingolipídios (principais componentes das plataformas de lipídio) a partir da condensação de L-serina e palmitoil-coenzima A para formar 3-ceto-dihidro-esfinganina (Figura 1.18). A base esfingóide formada é então N-acetilada para formar ceramida no retículo endoplasmático, a qual é convertida em esfingolipídio no complexo de Golgi. Estudos recentes indicam funções para plataformas de lipídios nos tripanossomatídeos relacionadas à proliferação celular e à endocitose (Hanada 2003, Denny & Smith 2004, Sutterwala et al. 2007). No entanto, foi proposto que o impedimento da síntese de esfingolipídios em tripanossomas africanos não afeta o transporte para o interior da célula de proteínas GPI ancoradas à superfície celular.

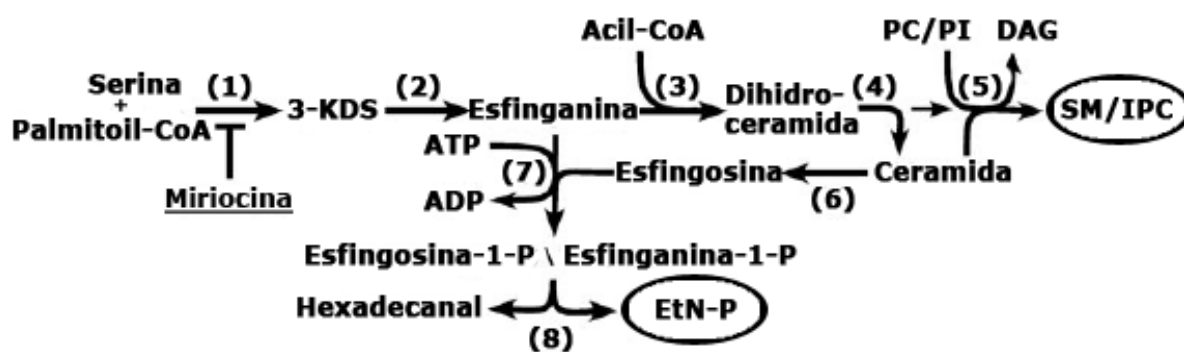


Figura 1.18 - Via de síntese dos esfingolipídios. As enzimas indicadas nos parênteses são: (1) serino palmitoil transferase; (2) 3-ceto-esfingosina redutase; (3) dihidroceramida sintase; (4) dihidroceramida desaturase; (5) esfingolipídio sintase; (6) ceramidase; (7) esfingosina cinase e (8) esfingosina-1-fosfato liase. Os produtos finais são: esfingomielina (SM), inositol fosforilceramida (IPC) e etanolamina fosfato (EtN-P). 3-KDS, 3-cetodihidroesfingosina; PC, fosfatidilcolina; PI, fosfatidilinositol; DAG, diacilglicerol (Modificado de Sutterwala et al. 2007).

Um estudo recente identificou e isolou GM1 e GM3 em *T. Brucei* (Uemura et al. 2004). O número presente na nomenclatura dos gangliosídeos é definido por convenção a partir da subtração do valor fixo 5, do número de açúcares neutros presentes na molécula. Por exemplo, GM1 apresenta quatro resíduos de açúcares neutros enquanto GM3 apresenta dois resíduos.

A molécula GM1 tornou-se um marcador universal para a detecção de plataformas de lipídio e cavéolas, sendo amplamente citada na identificação destes sítios em células de mamíferos (Schroeder et al. 1994, Ahmed et al. 1997, Smart et al. 1999, Pang et al. 2004, Wilson et al. 2004, Chinnapen et al. 2007, Moreno-Altamirano et al. 2007, Ning et al. 2007).

No entanto, a captação de macromoléculas pelos tripanossomas Africanos através de vias independentes de clatrina não pode ser associada à captação por cavéolas, devido à ausência de anotação de proteínas pertencentes às famílias das caveolinas ou das flotilinas nos bancos de dados genômicos destes protozoários. Foi então proposto que esta modalidade de endocitose estaria restrita apenas às células eucarióticas superiores (Field et al. 2007).

2.2. A endocitose no *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* é um organismo divergente das demais células eucarióticas, no qual diferentes características estruturais e vias metabólicas estão presentes, tornando este parasita diferente das demais espécies de tripanossomas africanos.

O *T. cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas na América Latina, sendo um protozoário heteroxênico (com hospedeiros invertebrados e hospedeiros vertebrados), que possui três formas adaptativas distintas (epimastigota, tripomastigota e amastigota). Este parasita é transmitido ao homem através das fezes do hospedeiro invertebrado, que são liberadas pelo inseto no momento de seu repasto sangüíneo, contendo formas tripomastigotas (Figura 1.19).

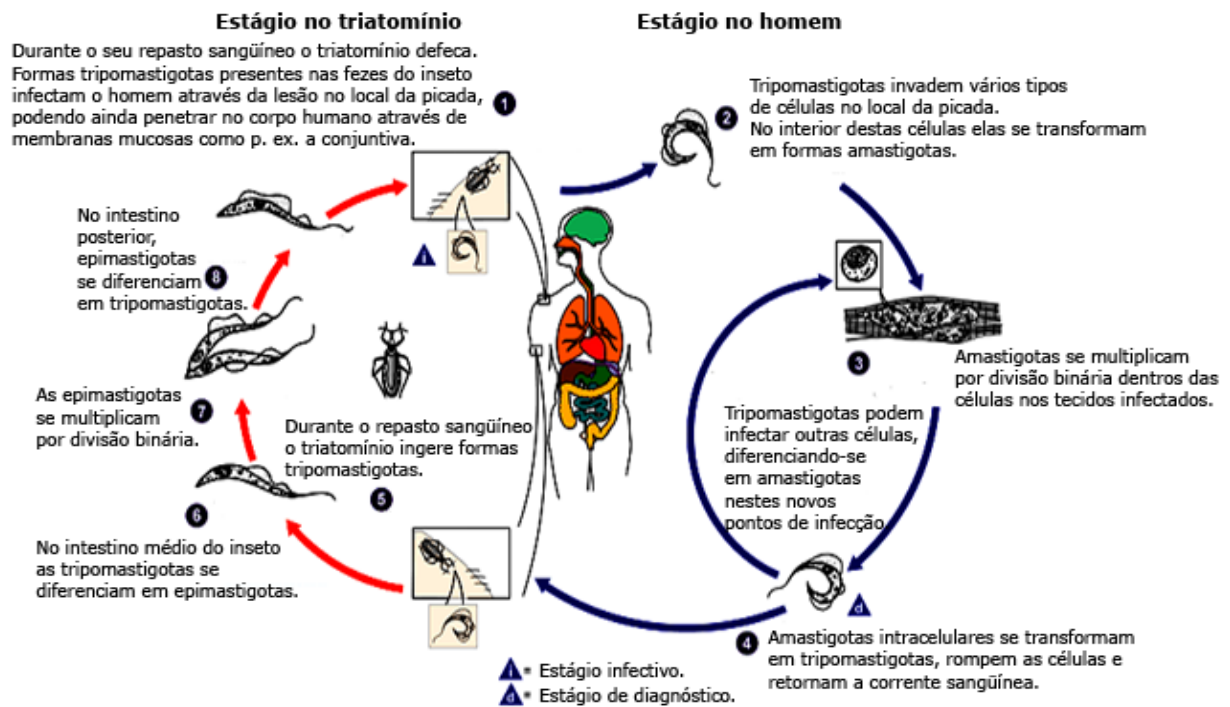


Figura 1.19 - Ciclo de vida do *T. cruzi*. Fonte CDC (Center for Disease Control and Prevention) www.dpd.cdc.gov/dpdx.

As formas adaptativas do *T. cruzi* estão diretamente relacionadas com a necessidade de sobreviver no ambiente onde estão inseridas. A troca de ambiente imposta pelo ciclo de vida do parasita implica em severas modificações no perfil de ativação e desativação gênica, o que acarreta a expressão diferencial de diversas proteínas que atuam tanto internamente no citoplasma quanto fazendo parte do revestimento externo da membrana plasmática em seus diferentes domínios. O sistema de captação de macromoléculas e tráfego de vesículas nestes protozoários também está condicionado à forma adaptativa assumida pelo parasita, de modo a manter a eficiência da captação de moléculas essenciais disponíveis de forma bastante variada nos ambientes ocupados pelo parasita durante o seu ciclo de vida.

Estruturalmente o *T. cruzi* apresenta um corpo celular semelhante aos outros tripanossomas, com o típico arranjo de microtúbulos subpeliculares descontínuos na região da bolsa flagelar. Embora todas as formas adaptativas do *T. cruzi* apresentem flagelo, apenas nas formas móveis (tripomastigotas e epimastigotas) o flagelo é uma estrutura alongada observável por microscopia de luz. Nas formas

amastigotas (intracelulares) o flagelo está restrito à bolsa flagelar, só podendo ser observado por MET.

O *T. cruzi*, ao contrário dos tripanossomas africanos, apresenta uma estrutura típica diretamente envolvida na captação de macromoléculas (além da bolsa flagelar): o citóstoma/citofaringe. Esta estrutura é uma invaginação especializada na membrana plasmática que penetra profundamente no citoplasma terminando na porção posterior da célula após o núcleo. A invaginação (citofaringe) apresenta sua abertura para o meio externo (citóstoma) localizada lateralmente ao corpo da célula, próximo à região da bolsa flagelar (Milder & Deane 1969, de Souza et al. 1978, de Souza 2002). O citóstoma possui uma abertura com cerca de 90 nm de diâmetro.

Estudos morfológicos por microscopia eletrônica de varredura de alta resolução caracterizaram esta região como uma porção de membrana bastante lisa em relação ao restante da membrana plasmática (Vatarunakamura et al. 2005), indicando uma presença diferenciada de proteínas de membrana. A porção de membrana na região de abertura do citóstoma está segregada do restante da membrana plasmática do corpo celular por uma fileira de partículas (Vatarunakamura et al. 2005).

O citóstoma está presente apenas em formas epimastigotas e amastigotas, sendo uma região de grande interesse, uma vez que a maior parte da atividade endocítica no *T. cruzi* ocorre a partir desta estrutura, ao invés de ocorrer via bolsa flagelar (Porto-Carreiro et al. 2000, Vatarunakamura et al. 2005). Assim, o *T. cruzi* se apresenta como uma célula polarizada, com duas estruturas relacionadas à endocitose e exocitose: citóstoma/citofaringe e bolsa flagelar (Figura 1.20).

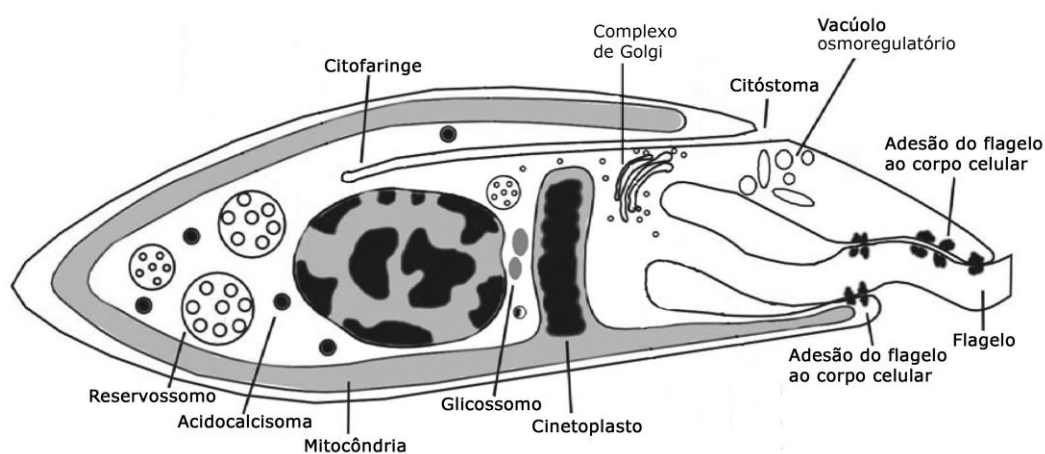


Figura 1.20 Modelo de forma epimastigota de *T. cruzi*. Diferente dos tripanossomas africanos, este protozoário apresenta um citóstoma com citofaringe.

Estas diferenças limitam as extrapolações dos mecanismos de captação de nutrientes observados nos tripanossomas africanos para o *T. cruzi*, e por outro lado justificam melhores análises neste protozoário em relação aos fenômenos relacionados à captação de macromoléculas.

Diversos estudos anteriores mostraram morfológicamente a capacidade de formas epimastigotas de captar proteínas do meio extracelular por endocitose. Diferentes abordagens demonstraram que a captação de LDL e transferrina por *T. cruzi* ocorre por endocitose mediada por receptor e que estas moléculas uma vez no interior do corpo celular se acumulam em uma organela denominada reservosomo, considerada um compartimento pré-lisossomal (Soares & de Souza 1991, Soares et al. 1992, de Figueiredo & Soares 2000, Porto-Carreiro et al. 2000).

Quanto ao caminho percorrido pelas moléculas captadas dentro do corpo destes protozoários, ocorre uma pequena divergência de proposições. Enquanto alguns autores sugerem que moléculas endocitadas pelo *T. cruzi* sejam incorporadas através do citóstoma e bolsa flagelar, transitem por uma rede de endossomas iniciais e finalmente se alojem nos reservosomos (Porto-Carreiro et al. 2000), outros sugerem não haver qualquer ligação entre endossomas e o tráfego de vesículas relacionadas à captação de macromoléculas. As vesículas contendo suas respectivas cargas se fundiriam diretamente aos reservosomos, sem a formação de endossomas iniciais (Soares et al. 1992, de Figueiredo & Soares 2000).

Em formas amastigotas do *T. cruzi* foi detectado um receptor saturável para transferrina após marcação com I¹²⁵ (Lima & Villalta 1990). Este possível receptor não foi até o momento identificado, isolado ou caracterizado. Dados morfológicos obtidos por MET mostraram ligação e captação de transferrina e LDL marcadas com ouro coloidal tanto através da bolsa flagelar quanto através do citóstoma em formas epimastigotas. No entanto, não foi observado nenhum tipo de revestimento na superfície das vesículas contendo tais proteínas. Estabelecendo-se então, que a endocitose em *T. cruzi* ocorre através de vesículas endocíticas desprovidas de revestimento, que brotam a partir de dois distintos sítios e que apresentam como destino final a fusão com o compartimento pré-lisossomal reservosomo (Soares et al. 1992, de Figueiredo & Soares 2000, Porto-Carreiro et al. 2000).

No entanto, as moléculas pertencentes à maquinaria celular responsável pela captação de tais nutrientes e envolvidas nos passos iniciais destes processos não estão identificadas. Além disso, sucessivas observações de vesículas endocíticas

sem revestimento em ensaios de endocitose com o *T. cruzi* levaram a se considerar o não-envolvimento da proteína clatrina na captação de nutrientes pelas formas epimastigotas. Contrariando esta tendência sugeriu-se, com base em dados morfológicos, o envolvimento de clatrina no brotamento de vesículas a partir da região Trans do complexo de Golgi em formas epimastigotas de *T. cruzi* (Sant'Anna et al. 2004).

Recentemente, tanto a proteína clatrina quanto o conjunto completo de proteínas adaptadoras (AP-1, AP-2, AP-3 e AP-4) foram identificadas a partir de diversas abordagens em formas epimastigotas de *T. cruzi*, e associadas aos fenômenos da endocitose e exocitose nestes protozoários (Denny et al. 2005).

A presença de plataformas de lipídios em tripanossomatídeos é um assunto bastante controverso e em intenso debate, mas que pode explicar a endocitose de diferentes proteínas ancoradas via GPI à membrana plasmática. Adicionalmente, tem sido descrito em *T. cruzi* o brotamento de vesículas endocíticas, principalmente a partir do fundo da citofaringe, sem nenhum tipo de revestimento externo à membrana. Embora evidências de domínios de membrana detergente-resistentes tenham sido obtidas em *T. brucei*, não existem na base de dados genômica de *T. brucei* e *T. cruzi*, proteínas anotadas como flotilina ou caveolina. Além disso, em *T. brucei* todas as evidências morfológicas sugerem que proteínas associadas à membrana da bolsa flagelar através de âncoras de GPI são endocitadas por mecanismo dependente de clatrina. Entretanto, como dito acima, as diferenças marcantes na estrutura celular e biologia do *T. cruzi* impedem que sejam feitas extrapolações de observações para este protozoário baseadas nos tripanossomas africanos.

Em resumo, há um peculiar sistema de endocitose e exocitose em *T. cruzi* envolvendo pelo menos dois diferentes mecanismos separados fisicamente em dois domínios de membrana. A endocitose mediada por clatrina estaria restrita à bolsa flagelar, enquanto endocitose independente de clatrina ocorreria majoritariamente pelo citóstoma/citofaringe. Estas observações fazem do *T. cruzi* um excelente modelo para estudos da endocitose, um dos fenômenos mais primitivos e essenciais à manutenção da vida nas células eucarióticas. Embora a endocitose em *T. cruzi* venha sendo estudada há bastante tempo, tais estudos não têm contemplado os eventos iniciais que ocorrem, nos diferentes domínios de membrana deste protozoário.

OBJETIVOS

1) Objetivo geral

Caracterizar os mecanismos de endocitose de nutrientes em formas epimastigotas do *T. cruzi*, a partir da análise dos eventos iniciais que ocorrem nos diferentes domínios de membrana: bolsa flagelar e citóstoma/citofaringe.

2) Objetivos específicos

2.1) Quanto à endocitose dependente de clatrina em *T. cruzi*:

- a) Identificar em formas epimastigotas por análise ultra-estrutural os sítios de entrada na célula de BSA, LDL e transferrina e os diferentes tipos de vesículas envolvidas nesse processo;
- b) Verificar a presença dos genes para clatrina e adaptinas, *in silico*;
- c) Investigar a expressão de clatrina no extrato protéico total de formas epimastigotas;
- d) Localizar a proteína clatrina no corpo celular das formas epimastigotas do *T. cruzi* por imunofluorescência;
- e) Verificar a presença de clatrina nas formas epimastigotas do *T. cruzi* por citometria de fluxo;
- f) Identificar por ultra-estrutura a organela de destino do marcador associado à endocitose mediada por clatrina.

2.2) Quanto à endocitose independente de clatrina em *T. cruzi*:

- a) Produzir frações purificadas de membrana do *T. cruzi*;
- b) Verificar a presença de domínios lipídicos detergente-insolúveis (“lipid rafts”) nas frações purificadas de membrana do *T. cruzi*;
- c) Identificar e quantificar os componentes lipídicos da fração de membrana detergente-insolúvel provenientes das formas epimastigotas do *T. cruzi*;
- d) Quantificar o conteúdo protéico da fração de membrana detergente-insolúvel;
- e) Testar as frações de membrana detergente-insolúvel quanto à presença de marcadores universais para “lipid rafts”: GM1 e flotilina;
- f) Localizar as moléculas endocitadas pela via independente de clatrina simultaneamente com a proteína flotilina (marcador universal de “lipid raft”).

2.3) Quanto à seletividade da endocitose nas formas epimastigotas do *T. cruzi*:

- a) Identificar por análises ultra-estruturais a organela de destino do marcador associado à possível endocitose caveolar;
- b) Avaliar por microscopia eletrônica de transmissão a captação de transferrina em células submetidas a tratamento inibitório específico para endocitose mediada por clatrina (depleção de K^+ , acidificação do meio de cultivo, incubação das células em meio hipertônico), endocitose caveolar (pré-tratamento com filipina e metil-beta-ciclodextrina) ou ainda a influência do citoesqueleto na endocitose (pré-tratamento com citocalasina B);
- c) Quantificar por citometria de fluxo a endocitose de transferrina pelas formas epimastigotas submetidas aos tratamentos propostos no item (b);
- d) Determinar a curva de crescimento das formas epimastigotas do *T. cruzi* sob a influência dos tratamentos propostos no item (b).

ARTIGO 1

Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: In Silico Gene Identification, Isolation, and Localization of Protein Expression Sites

JOSÉ R. CORRÊA,^a GEORGIA C. ATELLA,^b RUBEM S. MENNA-BARRETO^a and MAURILIO J. SOARES^{a,c}

^aLaboratório de Biologia Celular de Microrganismos, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and

^bInstituto de Bioquímica Médica, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil, and

^cInstituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Prof. Algacyr Munhoz Maeder 3.775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, PR, Brazil

ABSTRACT. Clathrin is a scaffold protein found in different types of coated vesicles in most eukaryotic cells. Major forces that drive clathrin coat formation are the adaptor protein complexes. *Trypanosoma cruzi* is a flagellate protozoan that ingests macromolecules through receptor-mediated endocytosis, but the molecules involved in this process are still poorly known. Bioinformatics was used to identify proteins in the *T. cruzi* genome database, permitting discrimination of the genes involved in clathrin coat assembly. Clathrin expression was demonstrated in *T. cruzi* epimastigotes by using several experimental approaches. Western blot analysis showed a single 180-kDa protein band, which corresponds to the molecular mass of mammalian clathrin heavy chain. A flow cytometry assay demonstrated that the clathrin heavy chain was expressed in 97.74% of the cell population analyzed, with a high-fluorescence signal. Immunofluorescence observation showed labeling clustered at the flagellar pocket and Golgi complex region. Coated vesicles budding off from the flagellar pocket and the trans Golgi network membranes were identified by transmission electron microscopy. Our data demonstrate the expression of clathrin in *T. cruzi* epimastigotes and show the association of this polypeptide with the parasite endocytic and exocytic pathways.

Key Words. Adaptin, endocytosis, flagellar pocket, in silico, protein expression.

EUKARYOTIC cells have an elaborate membrane system that allows ingestion of macromolecules by endocytosis. There is a continuous and regulated capture of cargo into vesicles that bud off from the plasma membrane, followed by delivery of the vesicle contents to receiving endosomal compartments (Miaczynska and Zerial 2002; Seabra, Mules, and Hume 2002; Vincent 2003). Trafficking of ingested material requires specific recognizing interactions between sorting motifs in the cargo molecules and receptors in the vesicle membrane, with or without the participation of vesicular surface coat components. Cargo concentration and vesicle coat formation are frequently linked in most eukaryotic cells to allow endocytosis of specific molecules (Kirchhausen, Bonifacino, and Riezman 1997; Orth and McNiven 2003).

The biogenesis of endocytic vesicles is regulated by specific proteins and co-factors that control different steps, such as budding, docking, and fusion with target membranes. Distinct coat proteins mediate the budding event, by coating the membranes and generating the forces necessary to bend a flat membrane into a vesicle (Aridor and Traub 2002; Cosson and Letourneur 1997; Schekman and Orci 1996). Clathrin is a scaffold protein found in different types of coated vesicles in most eukaryotic cells (Aridor and Traub 2002; Brodsky et al. 2001). The major forces that drive clathrin coat formation are the adaptor protein (AP) complexes, and four different heterotetrameric AP complexes are known (Boehm and Bonifacino 2002; Kirchhausen et al. 1997). Clathrin plays an important role in receptor-mediated endocytosis at the plasma membrane when associated with AP2 adaptors, while it is associated with AP1 adaptors in transport from the trans Golgi network (TGN) to endosomes.

Trypanosomatid protozoa are eukaryotic cells that have developed unusual features in metabolic pathways and cell biology mechanisms. Some trypanosomatids are parasites of vertebrates and plants, and thus are of medical, veterinary, and economical interest. The epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease in South America, appears as an

interesting model for studies on endocytosis, as its polarized endocytic apparatus is concentrated at only two specific membrane sites: the flagellar pocket and the cytostome (Morgan et al. 2002a). These structures are specialized plasma membrane invaginations located at the anterior end of the cells (De Souza 2002).

Previous studies have shown that *T. cruzi* epimastigotes are able to ingest proteins through receptor-mediated endocytosis (Figueiredo and Soares 2000; Porto-Carreiro et al. 2000; Soares and De Souza 1991), but the molecules involved in the initial steps of this process are still poorly known. Uncoated vesicles have been observed budding from the flagellar pocket membrane (Soares, Souto-Pradón, and De Souza 1992) and the cytostome/cytopharynx (Figueiredo and Soares 2000). These results generated a long-lasting belief in the absence of clathrin-coated vesicles in *T. cruzi* epimastigotes. However, coated vesicles have been recently observed close to the Golgi complex of these forms (Sant'Anna, De Souza, and Cunha-e-Silva 2004), thus suggesting the synthesis of clathrin by this parasite. The hypothesis that clathrin coats are assembled in the epimastigotes was consistent with data from a recent study on the *T. cruzi* genome data bank that has demonstrated the occurrence of a full complement of four β -adaptins, as well as the other subunits required to form four AP complexes (Denny et al. 2005). The hypothesis was further supported by bioinformatic and molecular analyses performed on other heteroxenic trypanosomatids, showing the presence of clathrin and adaptors in *Leishmania major* (Denny et al. 2005) and in *Trypanosoma brucei* (Morgan et al. 2001, 2002b).

Our morphological and biochemical data reveal new aspects on the endocytic process in *T. cruzi* epimastigotes. In this work we demonstrate the occurrence of clathrin expression at the protein level. Furthermore, we also show evidences for the localization of clathrin at the flagellar pocket and membranes of the TGN.

MATERIALS AND METHODS

Parasites. Epimastigotes forms of *T. cruzi*, Y and Dm28 strains, were maintained axenically at 28 °C by weekly transfers in Liver Infusion Tryptose (LIT) medium (Camargo 1964) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal calf serum (CultiLab Ltda., São Paulo, Brazil). Five-day-old epimastigotes, at the mid-log phase of growth, were used for all experiments.

Corresponding Author: M. Soares, Laboratório de Biologia Celular de Microrganismos, Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 21040-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil—Telephone number: +55 41 33163230; FAX number: +55 41 33163267; e-mail: maurilio@ioc.fiocruz.br

Antibodies. Polyclonal goat anti-bovine clathrin heavy chain antibody and horseradish peroxidase-conjugated cholera toxin B subunits (HRP-CtxB) were purchased from Sigma (Sigma Co., St. Louis, MO). Monoclonal rabbit anti-goat Alexa Fluor 568 antibody was purchased from Molecular Probes (Carlsbad, CA).

In silico. A BLAST search was performed in the *T. cruzi* genome project database (<http://www.genedb.org/genedb/tcruzi>) at the National Institute of Allergy and Infectious Diseases (NIAID, Bethesda, MD) to find annotated gene sequences to clathrin heavy chain, all subunits of adaptor complexes 1 and 2, and dynamin. In this search we have used as templates the *Homo sapiens* gene sequences. Use of the *Bos taurus* clathrin heavy chain polypeptide in the BLAST search in the *T. cruzi* genome data bank was made to support the experiments where *T. cruzi* clathrin heavy chain was detected by using an antibody against bovine clathrin heavy chain. The corresponding sequences found in the *T. cruzi* genome database for all polypeptides were also used to perform new BLAST submissions in the *L. major* and *T. brucei* genome databases (<http://www.genedb.org/>).

Uptake of albumin-gold complexes. Colloidal gold particles (5 nm diam.) were prepared according to Slot and Geuze (1985). Bovine serum albumin (BSA) (Sigma Chemical Co.) was coupled to gold particles as described elsewhere (Bendayan, Nanci, and Kan 1987). Epimastigotes of *T. cruzi* were collected by centrifugation at 1,500 g, washed twice in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, to remove the culture medium, and incubated for 30 min at 28 °C with the gold-labeled protein solution diluted 1:1 in PBS. The cells were then processed for transmission electron microscopy.

Transmission electron microscopy. After the endocytosis assays, the parasites were rinsed with PBS, fixed for 1 h at room temperature with 2.5% (v/v) glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), rinsed in phosphate buffer, and then post-fixed for 30 min with 1% (w/v) osmium tetroxide/0.8% (w/v) potassium ferricyanide/5 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). Thereafter, the parasites were rinsed in cacodylate buffer, dehydrated in a graded acetone series, and embedded in Poly/Bed 812 resin (Polysciences, Warrington, PA). Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and then observed in a Zeiss (Oberkochen, Germany) EM10C transmission electron microscope.

Clathrin heavy chain purification. Clathrin-coated vesicles were isolated from bovine brain in Mes [2-(*N*-Morpholino) ethanesulfonic acid] buffer at pH 6.5 (0.1 M Mes, 1 mM EGTA, 0.5 mM MgCl₂, 3 mM Na₃N₃), according to a previously described protocol (Nandi et al. 1982). The clathrin-enriched suspension was dialyzed with three changes against a buffer (10 mM Tris, 3 mM Na₃N₃, pH 8.0) for 12 h at 4 °C and then centrifuged at 150,000 g for 1 h. The supernatant, containing native clathrin heavy chain, was used as a standard for the Western blot experiments.

SDS-PAGE and Western blot. The parasites were washed in PBS and TNE buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml aprotinin, 1 mM Na₃VO₄, and 1 mM NaF). Aliquots of 5 × 10¹⁰ cells were then lysed in TNE buffer and centrifuged at 20,000 g. The supernatant or soluble protein fraction was collected, and the pellet was discarded. The soluble fraction was separated by using 10% (w/v) SDS-PAGE polyacrylamide gels (Laemmli 1970) at 200 V. Western blotting was performed by transferring the gels to nitrocellulose membranes at 400 mA for 90 min. The membranes were blocked with 5% (w/v) non-fat dry milk and probed with a polyclonal antibody against bovine clathrin heavy chain at a 1:1,000 dilution. Blots were developed with a chemiluminescence assay using the ECL System (Amersham Biosciences, São Paulo, SP, Brazil).

Flow cytometry. Epimastigotes of *T. cruzi* (5 × 10⁶ cells) were fixed for 20 min at 4 °C with 1% (w/v) paraformaldehyde,

Table 1. Predicted polypeptides of AP complex 1, AP complex 2, clathrin heavy chain (CHC), and dynamin in the *Trypanosoma cruzi* genome data bank.

<i>T. cruzi</i> predicted polypeptide	<i>Leishmania major</i>	<i>Trypanosoma brucei</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Bos taurus</i>
γ-AP1	36 (56)	36 (53)	37 (55)	nd
β'-AP1	36 (55)	38 (60)	40 (60)	nd
μ (AP47)-AP1	43 (64)	48 (65)	47 (68)	nd
σ (AP19)-AP1	51 (73)	55 (75)	52 (74)	nd
α-AP2	36 (56)	—	36 (55)	nd
β-AP2	32 (52)	—	38 (59)	nd
μ (AP50)-AP2	35 (57)	—	40 (64)	nd
σ (AP17)-AP2	51 (78)	—	56 (78)	nd
CHC	65 (82)	71 (85)	39 (62)	39 (62)
Dynamin	70 (70)	69 (69)	55 (55)	nd

The percent of amino acid identity and sequence similarity (in parentheses) is given against ortholog sequences in *L. major*, *T. brucei*, and *H. sapiens*. *B. taurus* was used to validate our antibody in CHC detection assays.

AP1, adaptor 1 protein sub-unit; AP2, adaptor 2 protein sub-unit; CHC, clathrin heavy chain; nd, not done.

washed 3 times with PBS containing 5% (v/v) fetal calf serum, and resuspended for 20 min in permeabilizing buffer 1 (PBI: PBS with 0.2% [w/v] saponine, 1% [w/v] BSA). The parasites were incubated for 20 min at room temperature with a primary polyclonal antibody against bovine clathrin heavy chain, diluted at 1:300 in PB. After washing, the cells were incubated for 20 min at room temperature with an Alexa Fluor 568 antibody solution, diluted at 1:900, and then resuspended in PBS. Positive control was obtained by labeling mouse thymocytes with the same protocol, while negative controls were obtained by incubating the protozoa or the thymocytes only with the secondary antibody or with no antibodies. Data acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) equipped with the Cell Quest software (Scripps Research Institute, La Jolla, CA).

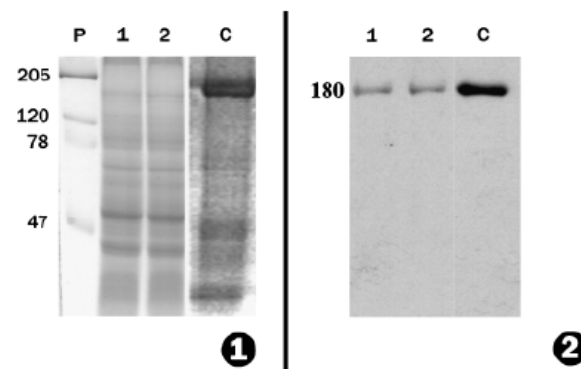


Fig. 1, 2. Clathrin heavy chain expression in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. 1. SDS-PAGE of total proteins from a soluble fraction. Lane P: Molecular mass marker. Lane 1: soluble proteins of *T. cruzi* Y strain epimastigotes. Lane 2: soluble proteins of *T. cruzi* Dm28 strain epimastigotes. Lane C: purified bovine clathrin (positive control). 2. Western blot analysis. Lane 1: positive clathrin heavy chain detection in *T. cruzi* Y strain. Lane 2: positive clathrin heavy chain detection in *T. cruzi* Dm28 strain. Lane C: bovine clathrin as positive control. Molecular weight as indicated, 180 kDa.

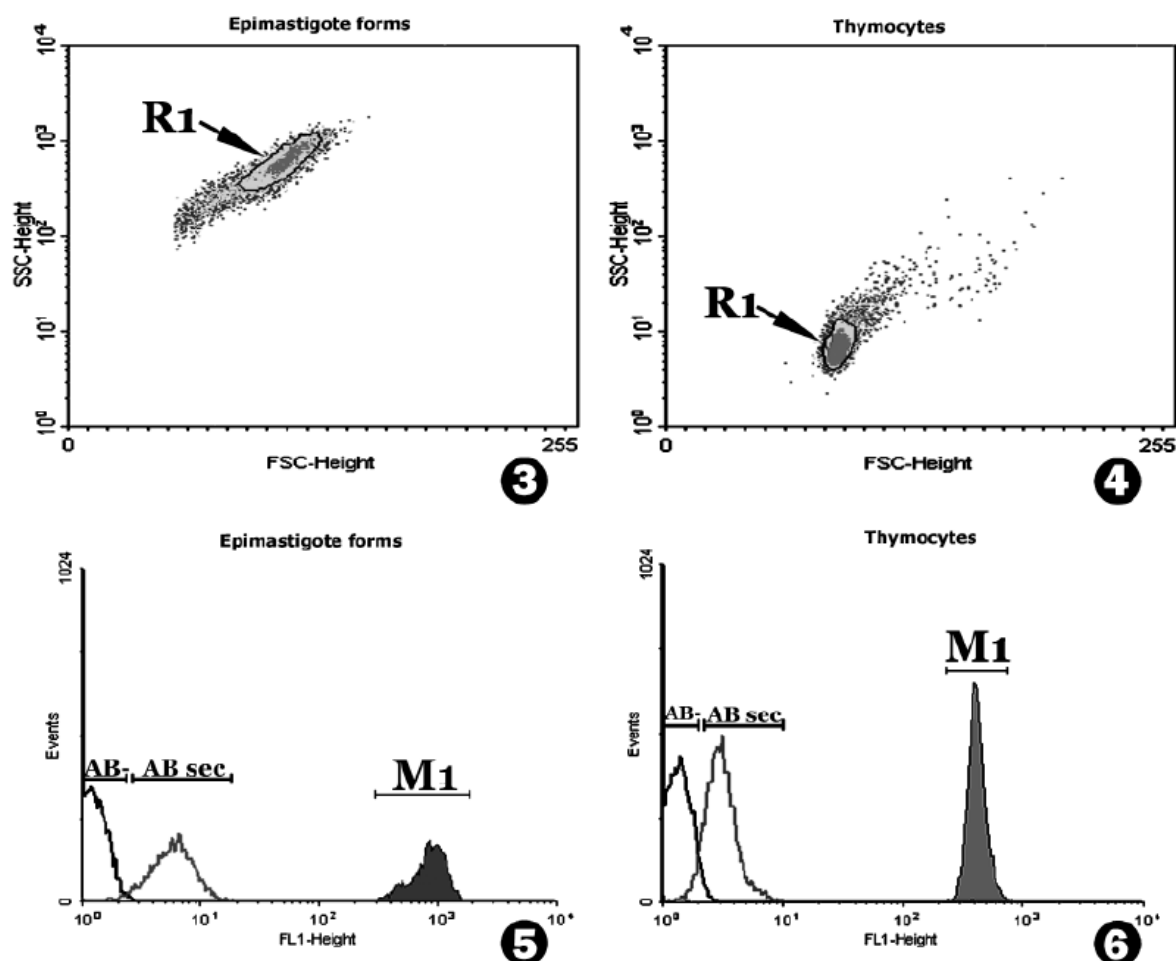


Fig. 3–6. Flow cytometry analysis of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes (3, 5) and thymocytes (4, 6). 3, 4. Distribution of the assayed cell population, according to the cell size and granularity. The R1 region represents a section with a very high density of morphologically similar, viable cells. All analyses were performed with cells from this region. 5, 6. Overlay of positive results (filled peak: cells with fluorescence) and negative controls (the two empty peaks, cells with no fluorescence). AB peak: negative control with cells incubated with no antibody; AB sec peak: control cells incubated with the secondary antibody only; M1 peak: fluorescent cells after incubation with anti-clathrin heavy chain antibody and then with a secondary Alexa Fluor 568 antibody.

Immunofluorescence assay. For clathrin detection, whole epimastigotes were adhered to 0.1% (w/v) poly-L-lysine-coated slides and then fixed for 20 min on ice with 4% (w/v) paraformaldehyde diluted in PBS. After incubation for 20 min at room temperature with permeabilizing buffer 2 (PB2: PBS with 0.2% [w/v] saponin, 1% [w/v] BSA, 5% [v/v] fetal calf serum), the slides were blocked for 1 h at room temperature with 4% (w/v) BSA in PBS solution (blocking buffer), and then incubated for 1 h at room temperature with a primary polyclonal antibody against bovine clathrin heavy chain, diluted at 1:300 in blocking buffer. The slides were washed with a 1% (w/v) BSA in PBS solution before incubation with the secondary Alexa Fluor 488 antibody. The cells were then stained with 0.5 μ g/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Sigma Chemical Co.) and examined in a Zeiss CLSM 510-meta confocal laser scanning microscope. Digital images were acquired and edited (color

balance adjustment) using Adobe Photoshop 7.0.1 (Adobe Systems Incorporated, Denver, CO).

RESULTS AND DISCUSSION

Search by BLAST submission in the *T. cruzi* genome database using *H. sapiens* and *B. taurus* genes as samples detected a similar polypeptide, corresponding in amino acid number to that described for the mammal clathrin heavy chain (CHC) subunit (Accession nos. Tc00.1047053506167.50). Furthermore, search by BLAST submission in the *T. cruzi* genome database using *H. sapiens* genes as samples permitted identification of the following predicted polypeptides: Adaptor complex-1 (γ , β' , AP47 and AP19 adaptins; corresponding to Accession nos. Tc00.1047053508257.260, Tc00.1047053506247.200, Tc00.10470535-10533.40, and Tc00.1047053509623.19, respectively); Adaptor

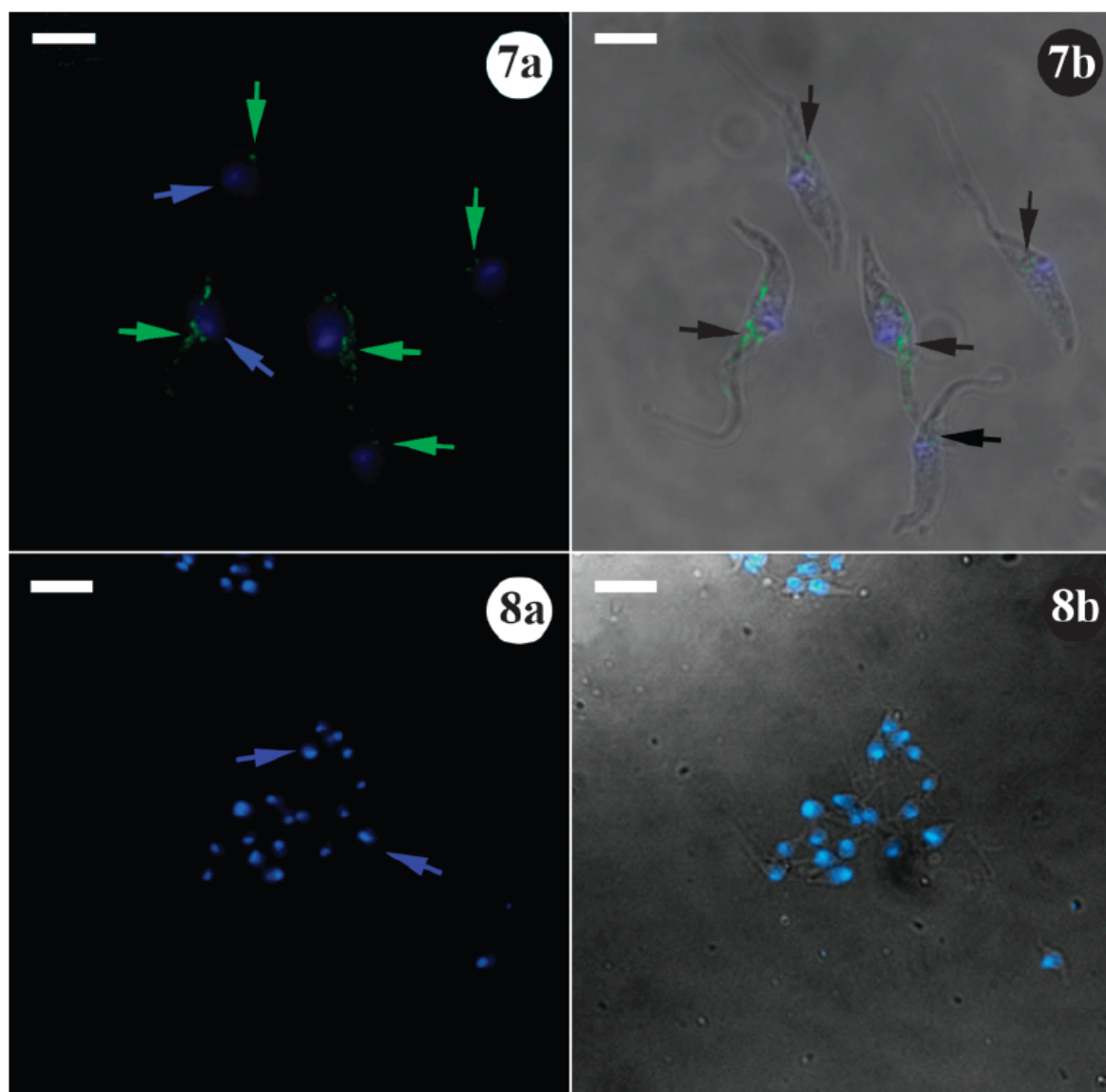


Fig. 7–8. Confocal laser microscopy of clathrin heavy chain labeling in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **7a.** Green fluorescence labeling for clathrin heavy chain (green arrows) is mostly located close to the nuclear/kinetoplast region (both organelles stained blue with DAPI, blue arrows), as small clusters that represent the bottom of the flagellar pocket and the Golgi complex region. **7b.** Combined phase contrast (cell body) and confocal (blue and green fluorescence) images. Black arrows show the clathrin fluorescence signal. **8a.** Confocal laser microscopy of negative control. No green fluorescence signal is seen in samples incubated with the secondary antibody only. The blue arrows indicate the nuclear/kinetoplast region, both organelles stained blue with DAPI. **8b.** Combined phase contrast (cell body) and confocal (blue fluorescence) images. Fig. 7(A) and (B): scale bar = 5 μm ; Fig. 8(A) and (B): scale bar = 15 μm .

complex-2 (α , β , AP50 and AP17 adaptins; corresponding Accession nos. Tc00.1047053511391.140, Tc00.1047053506247.200, Tc00.1047053510105.30, and Tc00.1047053506559.330, respectively); and dynamin (Accession nos. Tc00.1047053508153.20).

The identified genes for clathrin heavy chain, adaptin subunits, and dynamin matched with the correct set of polypeptides necessary for the assembly and budding of clathrin-coated vesicles in

T. cruzi, either from the plasma membrane (i.e. adaptin complex AP2) or from the Golgi complex (i.e. adaptin complex AP1). The high sequence similarity and modest amino acid identity between *B. taurus* and *T. cruzi* clathrin heavy chain (CHC) genes, about 62% and 39%, respectively, validated our assays using an antibody against bovine CHC (Table 1).

Expression of the clathrin heavy chain in *T. cruzi* epimastigotes was demonstrated by Western blot. Our results revealed the

expression of clathrin heavy chain in *T. cruzi*, in both parasite strains tested (Fig. 1, 2). A single band of 180 kDa was detected in the Western blot analysis, which corresponds to the molecular mass described for the homologous mammalian clathrin heavy chain (Fig. 2). Detection of clathrin, AP1 and AP2 complexes, and dynamin in the parasite genome, together with the occurrence of clathrin expression in the epimastigotes clearly demonstrate that clathrin-coated vesicles are part of the endocytic and exocytic pathways in epimastigote forms of *T. cruzi*.

Expression of clathrin heavy chain in *T. cruzi* epimastigotes (Y strain) was also investigated by flow cytometry. Distribution of the analyzed population was first graphically plotted by cell size and granularity (Fig. 3, 4). Intensity of fluorescence signal associated with positive clathrin expression was then determined in parasites from the region corresponding to the cell population with similar size and density: the R1 region includes cells with normal morphology. The data demonstrated a high level of clathrin expression in both epimastigotes (Fig. 5) and thymocytes (Fig. 6). Clathrin heavy chain protein was positively expressed in about $97.74\% \pm 0.5\%$ of the epimastigotes within the R1 region of the cell population, as determined in three independent experiments. About 10,000 events were acquired in the R1 region.

Whole parasites (Y strain) immunolabeled with a polyclonal antibody against bovine clathrin heavy chain showed positive, punctate fluorescence signals mostly located close to the nucleus and the kinetoplast (both stained blue with DAPI) at the anterior part of the cell, a region that corresponds to the flagellar pocket (endocytosis) and the Golgi complex (exocytosis) localization (Fig. 7, 8).

Morphological analysis by transmission electron microscopy demonstrated gold-labeled albumin molecules associated with a coated vesicle budding off from the flagellar pocket membrane (arrowheads, Fig. 9). Furthermore, coated vesicles could be also detected associated to the TGN (Fig. 9). Thus, our ultrastructural data demonstrate that *T. cruzi* epimastigotes express the clathrin heavy chain at the protein level. The difficulty in finding budding endocytic clathrin-coated vesicles in *T. cruzi* epimastigotes may be explained by the fact that these vesicles are rare, because (a) they are formed at only a very small, specific portion of the plasma membrane, that is, at the flagellar pocket membrane, and (b) the budding phenomenon is fast, and thus it must be luckily preserved during the fixation for TEM. Furthermore, ultra-thin sections of the parasites must be made for observation in the TEM, what decreases the chance of finding this rapid phenomenon. However, it was easier to find coated vesicles in the cytoplasm close to the flagellar pocket or Golgi complex, although they are also rare. Most of them were associated with the Golgi complex.

The occurrence of clathrin-mediated endocytosis in other trypanosomatids has been already demonstrated in *L. major* (Denny et al. 2005) and *T. brucei* (Shapiro and Webster 1989; Webster and Shapiro 1990). Molecular biology and morphological data revealed clathrin-coated vesicles arising from both the endocytic pathway and the Golgi complex of *T. brucei* (Morgan et al. 2001). However, Morgan et al. (2002b) were unable to demonstrate homologues of AP2 in *T. brucei*, the adaptin complex that is needed for clathrin assembly in endocytic vesicles at the plasma membrane.

Our data demonstrate that there are clathrin-dependent endocytic and exocytic pathways in *T. cruzi*, with clathrin-coated vesicles budding off at the flagellar pocket and TGN membranes, respectively. Formation of endocytic clathrin-coated vesicles at the bottom of the flagellar pocket can be a mechanism whereby trypanosomes could avoid exposing their endocytic apparatus proteins to the host immune system. However, comparisons between *T. brucei* and *T. cruzi* should be made with caution. The few works on endocytosis in *T. cruzi* bloodstream trypomastigotes (non-replicative forms) failed to demonstrate ingestion of gold-

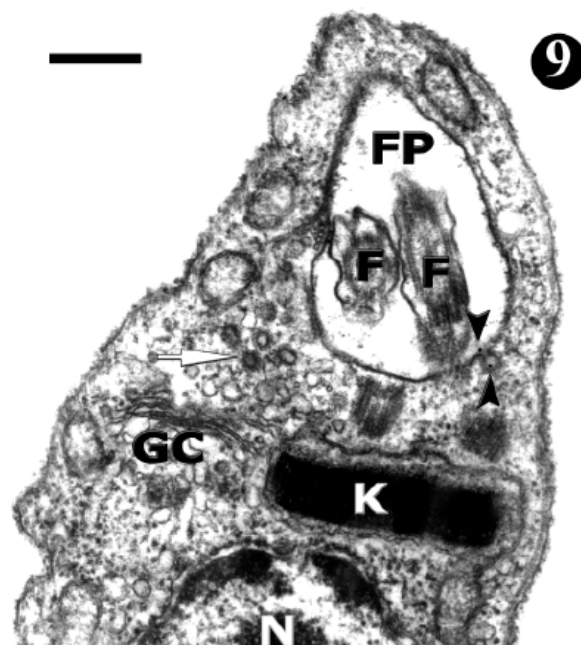


Fig. 9. Ultrastructural analysis of gold-labeled albumin uptake by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes at 28 °C. Two markers (arrowheads) can be found inside and at the opening of a coated endocytic vesicle. A coated vesicle (white arrow) is seen at the Trans Golgi Network region (GC). F, flagellum; K, kinetoplast; N, nucleus. Scale bar = 0.2 μ m.

labeled proteins (Corrêa, Andrade, and Soares 2002; Soares and De Souza 1991), and the single morphologically visualized coated vesicle appeared to be associated with the Golgi complex (Sant'Anna et al. 2004). Either *T. cruzi* trypomastigotes ingest nutrients through a very fast endocytic process at the flagellar pocket membrane, which is difficult to observe, or they use an alternative mechanism to obtain energy, such as transport through the plasma membrane.

Most studies on endocytosis in *T. cruzi* were performed with epimastigote forms (reviewed in De Souza 2002), which present a cytostome where intense receptor-mediated endocytosis of transferrin occurs through uncoated vesicles (Figueiredo and Soares 2000; Porto-Carreiro et al. 2000). Our data indicate that in *T. cruzi* epimastigotes the clathrin-coated endocytic pathway at the flagellar pocket membrane evolved to a secondary endocytic site. Detection of ingested albumin and transferrin in the reservosomes (reviewed in De Souza 2002) show that both endocytic pathways converge to these pre-lysosomal compartments.

Our results allow a better understanding of the particular mechanisms of endocytosis in *T. cruzi* epimastigotes, and bring a perspective of additional studies to elucidate the uptake of molecules in this protozoan parasite. It has been proposed that clathrin ablation in *T. brucei* is lethal and it has been postulated that endocytosis of glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins in this organism must occur through a clathrin-mediated mechanism at the flagellar pocket (Allen, Goulding, and Field 2003). Glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins have been recently characterized in *T. cruzi* (Añez-Rojas et al. 2006) and thus, further studies would help to clarify whether in this organism GPI-anchored proteins are ingested through clathrin-coated vesicles at

the flagellar pocket or through uncoated vesicles at the cytostome, its main endocytic site.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Ms. Patrícia Meuser Rego for technical assistance, and Dr. Marcelo Pelajo Machado and Pedro Paulo de A. Manso (Departamento de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil) for the help with the confocal microscopy. This work was supported by CNPq, FAPERJ, FIOCRUZ, PAPES IV-FIOCRUZ, and the International Foundation for Sciences (IFS).

LITERATURE CITED

- Allen, C. L., Goulding, D. & Field, M. C. 2003. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J.*, **22**:4991–5002.
- Añez-Rojas, N., Garcia-Lugo, P., Crisante, G., Rojas, A. & Añez, N. 2006. Isolation, purification and characterization of GPI-anchored membrane proteins from *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop.*, **97**:140–145.
- Aridor, M. & Traub, L. M. 2002. Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. *Traffic*, **3**:537–546.
- Bendayan, M., Nanci, A. & Kan, F. W. 1987. Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J. Histochem. Cytochem.*, **35**:983–996.
- Boehm, M. & Bonifacino, J. S. 2002. Genetic analyses of adaptin function from yeast to mammals. *Gene*, **286**:175–186.
- Brodsky, F. M., Chen, C. Y., Knuehl, C., Towler, M. C. & Wakeham, D. E. 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **17**:517–568.
- Camargo, E. P. 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, **12**:93–100.
- Corrêa, A. F., Andrade, L. R. & Soares, M. J. 2002. Elemental composition of acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi* bloodstream trypomastigote forms. *Parasitol. Res.*, **88**:875–880.
- Cosson, P. & Letourneur, F. 1997. Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**:484–487.
- De Souza, W. 2002. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol. Res.*, **88**:1013–1025.
- Denny, P. W., Morgan, G. W., Field, M. C. & Smith, D. F. 2005. *Leishmania major*: clathrin and adaptin complexes of an intra-cellular parasite. *Exp. Parasitol.*, **109**:33–37.
- Figueiredo, R. C. & Soares, M. J. 2000. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol. Res.*, **86**:413–418.
- Kirchhausen, T., Bonifacino, J. S. & Riezman, H. 1997. Linking cargo to vesicle formation: receptor tail interactions with coat proteins. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **9**:488–495.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**:680–685.
- Miaczynska, M. & Zerial, M. 2002. Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp. Cell Res.*, **272**:8–14.
- Morgan, G. W., Allen, C. L., Jeffries, T. R., Hollinshead, M. & Field, M. C. 2001. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J. Cell Sci.*, **114**:2605–2615.
- Morgan, G. W., Hall, B. S., Denny, P. W., Carrington, M. & Field, M. C. 2002a. The Kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol.*, **18**:491–496.
- Morgan, G. W., Hall, B. S., Denny, P. W., Field, M. C. & Carrington, M. 2002b. The endocytic apparatus of the Kinetoplastida. Part II: Machinery and components of the system. *Trends Parasitol.*, **18**:540–546.
- Nandi, P. K., Prasad, K., Lippoldt, R. E., Alfsen, A. & Edelhoch, H. 1982. Reversibility of coated vesicle dissociation. *Biochemistry*, **21**:6434–6440.
- Orth, J. D. & McNiven, M. A. 2003. Dynamin at the actin-membrane interface. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **15**:31–39.
- Porto-Carreiro, I., Attias, M., Miranda, K., De Souza, W. & Cunha-e-Silva, N. 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur. J. Cell Biol.*, **79**:858–869.
- Sant'Anna, C., De Souza, W. & Cunha-e-Silva, N. 2004. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc. Microanal.*, **10**:637–646.
- Schekman, R. & Orci, L. 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science*, **271**:1526–1533.
- Seabra, M. C., Mules, E. H. & Hume, A. N. 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol. Med.*, **8**:23–30.
- Shapiro, S. Z. & Webster, P. 1989. Coated vesicles from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: purification and characterization. *J. Protozool.*, **36**:344–349.
- Slot, J. W. & Geuze, H. J. 1985. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur. J. Cell Biol.*, **38**:87–93.
- Soares, M. J. & De Souza, W. 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, **77**:461–468.
- Soares, M. J., 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.
- Vincent, J. P. 2003. Membranes, trafficking, and signaling during animal development. *Cell*, **112**:745–749.
- Webster, P. & Shapiro, S. Z. 1990. *Trypanosoma brucei* a membrane-associated protein in coated endocytic vesicles. *Exp. Parasitol.*, **70**:154–163.

Received: 08/09/06, 10/18/06, 02/15/07; accepted: 01/15/07

ARTIGO 2

Transferrin uptake may occur through detergent-resistant membrane domains at the cytopharynx of *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms

José R Corrêa, Georgia C Atella*, Camila Vargas*, Maurilio J Soares**/+

Laboratório de Ultra-estrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz-Fiocruz, Rio de Janeiro, RJ, Brasil *Instituto de Bioquímica Médica, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil **Instituto de Biologia Molecular do Paraná-Fiocruz, Rua Prof. Algacyr Munhoz Maeder 3775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, PR, Brasil

Uptake of transferrin by epimastigote forms of the protozoan Trypanosoma cruzi occurs mainly through a cytosome/ cytopharynx, via uncoated endocytic vesicles that bud off from the bottom of the cytopharynx. We have here examined whether detergent-resistant membrane (DRM) domains might be involved in this process. Purified whole cell membrane fractions were assayed for cholesterol levels and used in dot blot analyses. Detergent-resistant membrane markers (cholera B toxin and anti-flotillin-1 antibody) presented positive reaction by dot blots in cholesterol-rich/ protein-poor membrane sub-fractions. The positive dot blot fraction was submitted to lipid composition analysis, showing composition similar to that of raft fractions described for other eukaryotic cells. Immunofluorescence assays allowed the localization of punctual positive signal for flotillin-1, matching the precise cytosome/ cytopharynx location. These data were confirmed by immunofluorescence assays with the co-localization of flotillin-1 and the transferrin uptake site. Our data suggest that DRM domains occur and are integrated at the cytosome/ cytopharynx of T. cruzi epimastigotes, being the main route for transferrin uptake.

Key words: cytopharynx - detergent-resistant membrane - endocytosis - *Trypanosoma cruzi* - ultrastructure

The lipid raft model proposes that cholesterol and sphingolipids of the plasma membrane outer leaflet are not randomly distributed, but rather clustered into micro-domains that float in the lipid bilayer, characterizing detergent-resistant membrane (DRM) domains in eukaryotic cells (Rietveld & Simons 1998, Hancock 2006). Transmembrane proteins (receptors, adhesion molecules, and enzymes) in the lipid bilayer would either reside in, and thus become sorted into transport vesicles, or be excluded from the rafts, depending on partitioning imparted by their physical properties (Harder et al. 1998, Simons & Vaz 2004).

Lipid rafts play a role in a wide range of important biological processes, including signal transduction pathways, apoptosis, cell adhesion and migration, organization of the cytoskeleton and protein sorting during both exocytosis and endocytosis (Simons & Toomre 2000, Harris & Siu 2002).

Flotillins are cholesterol-binding proteins that associate with a subset of rafts named caveolae, and are frequently used as raft markers. The flotillin protein family consists of the small (45 kDa) proteins flotillin-1 and flotillin-2/ ESA (a close homologue of the epidermal

surface antigen). These proteins induce caveolae formation, bind cholesterol, and interact with signaling molecules (Anderson 1998, Kiss et al. 2004). Lipid rafts can exist independently of caveolae, but they must exist prior to formation of caveolae for proper insertion of flotillin into membranes (Graf et al. 1999, Ikonen 2001).

Trypanosomatid protozoa have a particular cell body array that allows uptake of nutrients only at a specific membrane site: the flagellar pocket (Morgan et al. 2001). *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease in Latin America, appears as an attractive model for studies to elucidate the occurrence of lipid rafts and their probable participation in endocytic processes, as *T. cruzi* epimastigotes have a second specialized endocytic site, the cytosome/ cytopharynx. This is a plasma membrane invagination located at the anterior cell end, which penetrates deeply into the cytoplasm towards the nucleus (Milder & Deane 1969). Uncoated vesicles have been observed budding off from the flagellar pocket membrane (Soares et al. 1992) and the bottom of the cytopharynx (Figueiredo & Soares 2000), thus demonstrating the occurrence of endocytosis by uncoated vesicles in *T. cruzi* epimastigotes. Protein uptake through receptor-mediated endocytosis also occurs (Soares & De Souza 1991, Figueiredo & Soares 2000), with ingestion of transferrin mainly through the cytosome (Porto-Carreiro et al. 2000). The molecules involved in vesicle budding remain poorly known, but recent studies indicate a functional role for lipid rafts in trypanosomatids (Denny & Smith 2004). Here we identify in *T. cruzi* epimastigotes some lipid rafts landmarks and present evidences for the presence of a DRM site involved in endocytosis at the cytosome/ cytopharynx.

Financial support: CNPq, Faperj, Papes IV-Fiocruz, International Foundation for Sciences (IFS).

*Corresponding author: maurilio@tecpar.br

Received 6 July 2007

Accepted 6 October 2007

MATERIALS AND METHODS

Parasites - Epimastigote forms of *T. cruzi*, strain Y, were kept axenically at 28°C by weekly transfers in liver infusion tryptose medium (Camargo 1964) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (CultiLab, São Paulo, Brazil). Five-day-old epimastigotes, at the mid-log phase of growth, were used for the experiments.

DRM purification - The parasites were washed in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2) and TNE buffer (25 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0.2 mM PMSF, 1 µg/ml leupeptin, 1 µg/ml pepstatin, 1 µg/ml aprotinin, 1 mM Na₃VO₄, and 1 mM NaF).

Aliquots of 5 x 10⁹ cells in TNE buffer were carefully disrupted on ice with a Branson Sonifier Cell disruptor B15 (Sonifier Cell Disruptors, Danbury, CT, USA) using a standard probe (13 mm radiating diameter) operating at 15% of total amplitude, with 5 cycles of 30 s and with 1 s rest between cycles, yielding a total homogenate. This homogenate was centrifuged at 20,000 g and the supernatant was incubated for 20 min at 4°C in TNE buffer containing 1% Triton X-100. After incubation, the sample was mixed 1:1 with 80% sucrose (w/v) in TNE buffer and transferred to a Beckman SW40 centrifuge tube (Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA). This mixture was first overlaid with 35% sucrose, followed by 5% sucrose, and centrifuged at 100,000 g for 16 h at 4°C (Chung et al. 2005). Twelve 1-ml fractions could be sequentially collected from the top. Raft cholesterol was measured with a sensitive cholesterol oxidase-based fluorometric assay (Amplex Red cholesterol kit) purchased from Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Cholesterol content of purified lipid rafts was normalized to total protein fraction.

Cholera B toxin and anti-flotillin-1 dot blotting - About 0.1 ml from each gradient fraction was diluted to 1 ml with PBS and adsorbed onto a nitrocellulose filter using a dot-blot apparatus (Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA). Membranes were blocked with 5% non-fat dry milk and probed with a Horse Radish Peroxidase-Cholera B Toxin (HRP-CtxB) conjugate (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) or else with anti-flotillin-1 antibody (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA) for 1 h at room temperature. Blots were developed using a chemiluminescence assay (Pierce, Rockford, IL, USA).

Lipid analysis - Cholera B toxin positive fractions (4 to 6) were pooled and lipids were extracted (Bligh & Dyer 1959) for 2 h in a stoppered tube containing 5 ml of a chloroform-methanol-water solution (2:1:0.8, v/v), with intermittent agitation. After centrifugation, the supernatant was collected and the pellet subjected to a second lipid extraction for 1 h. The amount of total lipids was determined gravimetrically. Extracted lipids were analyzed by one-dimensional high performance thin-layer chromatography (HPTLC) for neutral lipids (Vogel et al. 1962), or by two-dimensional thin-layer chromatography (TLC) for phospholipids (Yavin & Zutra 1977). Sphingolipids were identified by mild alkaline hydrolysis of the total lipid extract for 1 h at 80°C in methanolic 2.5 M KOH. Neutral lipids were visualized by charring

(10 min at 110°C) after submersion of the plates for 10 s in 3% CuSO₄ in 8% H₃PO₄. Lipids were globally quantified from HPTLC plates by densitometric scanning. Each lipid spot was identified by comparing to lipid standards (Sigma) run in parallel. A lipid mass curve was made to convert the densitometric values into µg of each lipid on the HPTLC plate.

Uptake of transferrin-gold complexes - Colloidal gold particles (15 nm in diameter) were prepared as described (Slot & Geuze 1985). Human holo-transferrin (Sigma) was coupled to gold particles as described elsewhere (Bendayan et al. 1987). *T. cruzi* epimastigotes were collected by centrifugation at 1,500 g, washed twice in PBS to remove the culture medium, and incubated for 30 min at 28°C with gold-labeled protein solutions diluted 1:1 in PBS. The cells were then processed for transmission electron microscopy.

Transmission electron microscopy - After the endocytosis assays, the parasites were rinsed with PBS, fixed for 1 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), rinsed in phosphate buffer, and then post-fixed for 30 minutes with 1% osmium tetroxide/ 0.8% potassium ferricyanide/ 5 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). Thereafter, the parasites were rinsed in cacodylate buffer, dehydrated in a graded acetone series, and embedded in Poly/Bed 812 resin (PolySciences, Warrington, PA, USA). Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate and observed in a Zeiss (Oberkochen, Germany) EM10C transmission electron microscope.

Immunofluorescence assays - For the double fluorescence assay, epimastigotes were harvested, washed three times with PBS and incubated for 15 min at 28°C with 1 mg/ml TRITC (Tetramethyl Rhodamine Iso-Thiocyanate)-labeled transferrin (Sigma). The cells were then adhered at 4°C to 0.1% poly-L-lysine-coated slides and fixed for 20 min on ice with methanol at minus 20°C. Thereafter, the slides were incubated for 10 min at room temperature with permeabilizing buffer [PBS with 0.2% (w/v) saponin, 1% (w/v) bovine serum albumin, 5% (v/v) fetal calf serum], blocked for 1 h at room temperature with blocking buffer [4% (w/v) bovine serum albumin in PBS], and then incubated for 1 h at room temperature with primary antibody against flotillin-1 diluted at 1:200 in blocking buffer.

The slides were washed with 1% bovine serum albumin in PBS, prior to incubation with a secondary AlexaFluor-488 (Invitrogen) antibody. The cells were then stained with 0.5 µg/ml DAPI and examined by confocal laser scanning microscopy.

RESULTS

Detection of lipid raft markers in detergent-insoluble membrane fractions - DRM extracts prepared with Triton X-100 were first used to analyze the distribution of cholesterol in sucrose density gradients after equilibrium centrifugation, as compared to the protein amounts. The DRM fractions were identified in the sucrose gradients as white-tan cloudy layers of material just above the middle of the gradient tub. Fractions 4 to

6, but mainly fraction 5, showed enrichment in cholesterol with a low content of proteins, as described for lipid rafts in mammal cells (Fig. 1A).

Lipid raft markers (cholera B toxin reaction and flotillin-1) were detected in the gradient fractions by dot-blot analysis. The flotillin-1 positive fractions matched with the cholera B toxin positive fractions, and both markers matched with the cholesterol-rich fractions 4 to 6 (Fig. 1B).

Lipid analysis was undertaken to quantify the distribution of lipid classes in the DRM fractions 4 to 6. As expected for lipid raft sub-domains, cholesteryl ester comprised about 45% of the total lipids, while ergosterol and triacylglycerol were the major neutral lipids (Fig. 2A). Furthermore, analysis of the polar lipid composition in these fractions showed that sphingolipids were highly enriched, whereas phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine were found in minor amounts (Fig. 2B).

Ultrastructure of budding endocytic vesicles - Morphological analysis by transmission electron microscopy of parasites incubated with gold-labeled transferrin showed the marker located along and at the bottom of the cytopharynx (Fig. 3A). The cytopharynx is a long tube that extends toward the posterior region of the cell, frequently ending past the nucleus, close to the reservosomes (Fig. 3B).

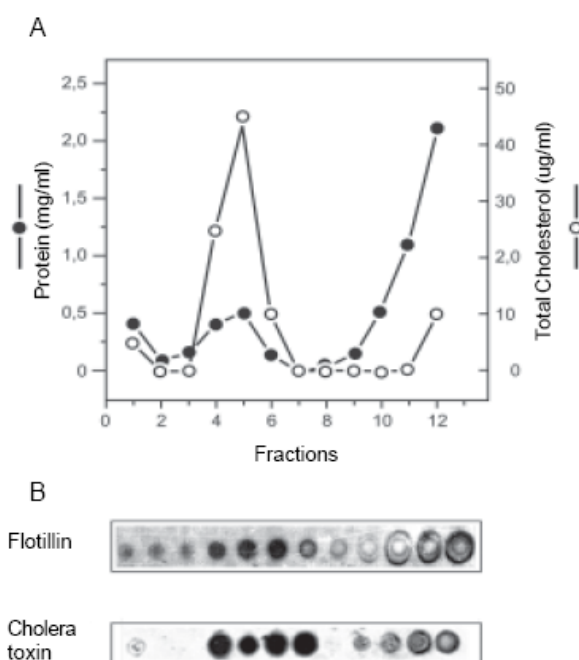


Fig. 1: total cholesterol/ proteins concentration and detection of raft markers in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. A: in detergent-resistant membrane fractions, cholesterol was enriched in sub-fractions 4 to 6, which present a poor protein concentration; B: presence of raft markers flotillin-1 and GM1 was determined in each sub-fraction by dot blotting. Both markers were also enriched in fractions 4 to 6, as expected for lipid raft domains.

Gold particles were located bound to uncoated vesicles budding off from the bottom of the cytopharynx (Fig. 3A). These data indicated that a DRM site could be located at the cytotome/ cytopharynx, related to endocytosis of proteins.

Flotillin-1 detection and co-localization with the transferrin uptake site by immunofluorescence microscopy - Immunolabeled parasites showed positive, punctual flotillin-1 fluorescence signals in the vicinity of the

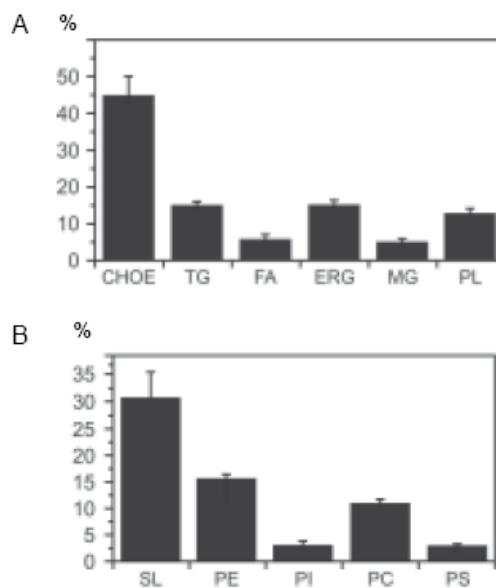


Fig. 2: lipid analysis of detergent-resistant membrane domains in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Total lipids from fractions 4-6 were determined gravimetrically and the extracted lipids were then analyzed. Data are expressed as lipid component percentage. Results are the mean \pm standard deviation of three experiments. A: analysis by one-dimensional high performance thin-layer chromatography (HPTLC) for neutral lipids. CHOE: cholesterol ester; ERG: ergosterol; FA: free fatty acids; MG: monoacylglycerol; PL: phospholipids; TG: triacylglycerol. B: analysis by two-dimensional thin-layer chromatography (TLC) for phospholipids. PC: phosphatidylcholine; PE: phosphatidylethanolamine; PI: phosphatidylinositol; PS: phosphatidylserine; SL: sphingolipids.

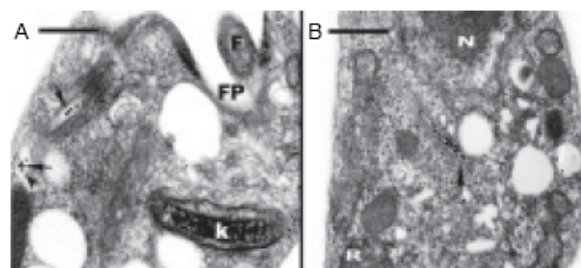


Fig. 3: ultrastructure of the uptake of gold-labeled transferrin by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes at 28°C. A: gold label (arrows) is found inside the cytopharynx and associated to an uncoated vesicle formed at its bottom (arrowhead); B: gold label is located along the cytopharynx (arrow) at the posterior region of the cell, past the nucleus (N) and close to the reservosomes (R). F: flagellum; FP: flagellar pocket; K: kinetoplast. Bar = 0.2 μ m.

kinetoplast (stained blue with DAPI), at the posterior part of the cell (Fig. 4A-D). This region corresponds precisely to the cytostome opening in epimastigotes. Strong labeling was also located along and at the bottom (Fig. 4A-D) of the cytopharynx.

Association of transferrin uptake regions and flotillin-1 positive sites was visualized by co-localization of flotillin-1 fluorescent signals (green) and TRITC-

labeled transferrin (red). Merged fluorescence of both markers at the cytostome bottom resulted in yellow color (Fig. 4A-D). Control parasites incubated with TRITC-labeled transferrin and AlexaFluor-488 secondary antibody only (omission of the flotillin-1 antibody incubation step), showed no green or yellow fluorescence (Fig. 4E, F). Cells incubated with the secondary antibody alone showed no fluorescence signal, except for DAPI-stained nuclei and kinetoplasts (Fig. 4G, H).

DISCUSSION

Incubation of *T. cruzi* epimastigotes with gold-labeled proteins at 4°C demonstrated the occurrence of receptor-mediated endocytosis of transferrin through uncoated vesicles at the cytostome/ cytopharynx (Soares & De Souza 1991, Figueiredo & Soares 2000, Porto-Carreiro et al. 2000). Formation of such uncoated vesicles, associated to the detection of typical lipid raft markers in epimastigotes, suggests that endocytosis of nutrients through the cytostome occurs via DRM domains and indicate that the cytostome/ cytopharynx is a distinct membrane sub-domain that may account for different mechanisms of recognition and receptor-mediated uptake of macromolecules.

The cytostome/ cytopharynx of *T. cruzi* is a plasma membrane invagination that penetrates deeply into the cytoplasm towards the nucleus (Milder & Deane 1969). Fluid-phase pinocytosis of peroxidase and receptor-mediated endocytosis of transferrin occur through this structure, resulting in accumulation of ingested proteins in organelles called reservosomes (Soares & De Souza 1988, Soares et al. 1992, Porto-Carreiro et al. 2000). Our biochemical analysis of a DRM fraction allowed the detection of flotillin-1 and a singular *T. cruzi* glycolipid that positively reacts with cholera B toxin, both labels considered as lipid raft markers (Nguyen & Hildreth 2000, Seveau et al. 2004). Furthermore, we have also obtained immunofluorescence co-localization for flotillin-1 and TRITC-labeled transferrin in a region corresponding to the cytostome/ cytopharynx. Although no flotillin-1 gene has been found in the *T. cruzi* genome database (El-Sayed et al. 2005), the punctual positive reaction for flotillin-1 at the cytostome/ cytopharynx suggests that a similar protein might be present at this site, although the possibility of cross-reactivity with a non-related protein can not be excluded. Recent data from HeLa and MEF cells have shown that coassembly of flotillin-1 and flotillin-2 into micro-domains induced membrane curvature, formation of plasma-membrane invaginations morphologically similar to caveolae, and the accumulation of intracellular vesicles. These microdomains are distinct from caveolin1-positive caveolae, are dynamic, and bud into the cell. It has been proposed that flotillin proteins are defining structural components of the machinery that mediates a clathrin-independent endocytic pathway (Frick et al. 2007).

Our morphological and biochemical data indicate that receptor-mediated endocytosis of transferrin by *T. cruzi* epimastigotes occurs through a DRM domain at the bot-

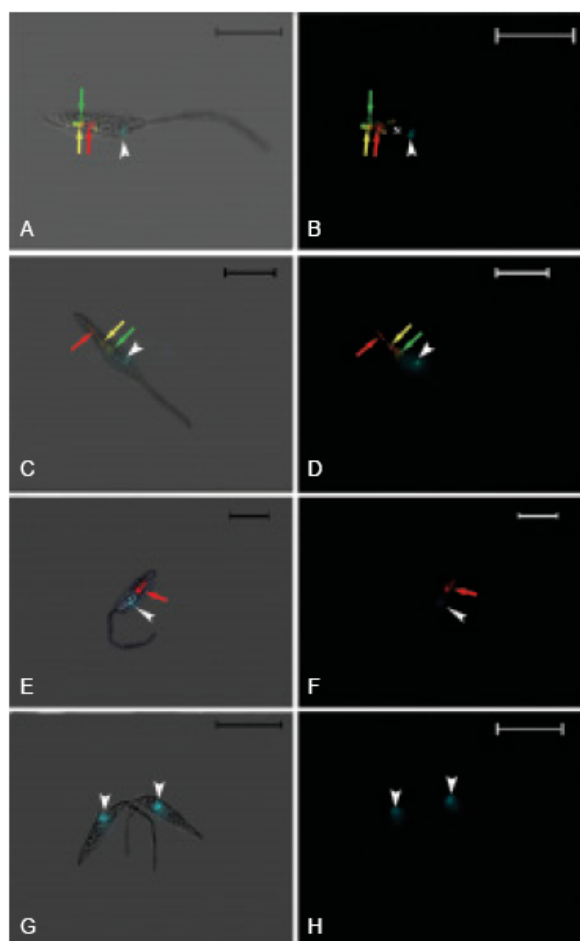


Fig. 4: immunofluorescence co-localization of TRITC-labeled transferrin and flotillin-1 in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. A, C: combined phase contrast image (cell body) and the confocal fluorescence images shown in B and D. The kinetoplast (arrowhead) is stained blue with DAPI. Co-localization of flotillin-1 (green arrow) and TRITC-labeled transferrin (red arrow) signals resulted in yellow color labeling (yellow arrow); B, D: confocal fluorescence images. The green arrow indicates the flotillin-1 location (green spots) at the middle and bottom portions of the cytopharynx. The red arrow shows TRITC-labeled transferrin (red spots) in the cytopharynx at the posterior end of the cell. The yellow arrow shows the merging of the two fluorescence signals (yellow spots) at the cytopharynx bottom. The kinetoplast/ nuclear region (arrowhead) stained blue with DAPI; E - H: as negative controls, parasites were either first incubated with TRITC-labeled transferrin and then with the secondary antibody (E, F), or else they were incubated with the secondary antibody alone (G, H). The red arrow shows transferrin inside the cell; arrowheads show the kinetoplast/ nuclear region. Bar = 10 μ m.

tom of the cytopharynx. Cross-reactivity between GM1 and *T. cruzi* epimastigote DRMs suggests that *T. cruzi* has a not yet identified GM1-homologue glycolipid. A previous study has demonstrated binding of GM1-reactive antibodies to *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigotes (Avila et al. 1998), with identification of gangliosides by HPTLC revealing in trypomastigote extracts the presence of GM1 (Rf 0.36) with molar ratio of Gal:Glc:GalNac:NeuAc of 1:1:0:1. Our experimental conditions for parasite growth and processing for lipid analysis avoided any contamination with exogenous GM1. Further studies are ongoing in our laboratory with a purified *T. cruzi* glycolipid fraction, in order to characterize this membrane compound.

The process of transferrin uptake has been extensively analyzed in *Trypanosoma brucei* (Morgan et al. 2002), but this trypanosome species lacks a cytostome. In *T. brucei* transferrin is ingested by receptor-mediated endocytosis via clathrin-coated vesicles formed at the flagellar pocket membrane (Coppens et al. 1987, Ligtenberg et al. 1994). As *T. cruzi* and *T. brucei* present different life cycles, it is possible that they have developed distinct endocytic mechanisms to exploit they invertebrate and vertebrate hosts.

Endocytosis by lipid rafts represents a clathrin-independent, dynamin-dependent endocytic route (Parton et al. 1994, Nabi & Le 2003). Raft-related micro-domains are dramatically enriched in cholesterol, sphingolipids, GPI-anchored proteins, and lipid-modified signaling molecules (Simons & Ikonen 1997, Tagawa et al. 2005). Our lipid analysis demonstrated that such micro-domains are present in *T. cruzi* epimastigotes. The presence of lipid raft domains has been previously suggested in trypanosomatids (Nolan et al. 2000, Denny et al. 2001, Denny & Smith 2004). Studies with *Leishmania major* and *T. brucei* have shown lipid rafts as a feature of these parasites (Denny et al. 2001).

The transferrin receptor is a GPI-anchored molecule in *T. brucei* (Steverding 2000), but there is still no biochemical evidence on transferrin receptors in *T. cruzi*. A morphological study using freeze-fracture showed absence of integral membrane proteins from the plasma membrane at the cytostome opening (VataruNakamura et al. 2005). Based on these findings, together with our analysis of lipid membrane composition, positive flotillin-1 detection by dot blot in DRM fractions, and mainly the positive co-localization by immunofluorescence of flotillin-1 and TRITC-labeled transferrin at the cytostome/ cytopharynx, it is plausible to suppose that the transferrin receptor in *T. cruzi* is also GPI-anchored, which would strength our evidence that DRM domains in this parasite can be accepted as lipid raft-like systems.

In *T. cruzi* epimastigotes, ingested transferrin is transported to and stored at the reservosomes (Soares & De Souza 1991, De Souza 2002). These organelles are prelysosomal compartments (Soares et al. 1992), and our data suggest that uncoated vesicles budding off from the long cytopharynx are directed to them. Thus, reservosomes may represent late endocytic compartments with DRM domains. If the reservosome is a meeting point of endosomes and DRM domains, we expect that future

analyses of purified reservosome membrane fractions may show the presence of the same markers shown here.

ACKNOWLEDGEMENTS

To Dr Marcelo Pelajo Machado and Pedro Paulo de A Manso, from Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, for the help with the confocal microscopy.

REFERENCES

- Anderson RGW 1998. The caveolae membrane system. *Ann Rev Biochem* 67: 199-225.
- Ávila JL, Rojas M, Avila A 1998. Increase in asialoganglioside- and monosialoganglioside-reactive antibodies in chronic Chagas disease patients. *Am J Trop Med Hyg* 58: 338-342.
- Bendayan M, Nanci A, Kan FW 1987. Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *J Histochem Cytochem* 35: 983-996.
- Bligh EG, Dyer WJ 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can J Biochem Physiol* 37: 911-917.
- Camargo EP 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 12: 93-100.
- Chung CS, Huang CY, Chang W 2005. Vaccinia virus penetration requires cholesterol and results in specific viral envelope proteins associated with lipid rafts. *J Virol* 79: 1623-1634.
- Coppens I, Opperdoes FR, Courtoy PJ, Baudhuin P 1987. Receptor-mediated-endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool* 34: 465-473.
- De Souza W 2002. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res* 88: 1013-1025.
- Denny PW, Field MC, Smith DF 2001. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett* 491: 148-153.
- Denny PW, Smith DF 2004. Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. *Mol Microbiol* 53: 725-733.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Åslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, Silveira JF, Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
- Figueiredo RCB, Soares MJ 2000. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitol Res* 86: 413-418.
- Frick M, Bright NA, Riento K, Bray A, Merrified C, Nichols BJ 2007. Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding. *Curr Biol* 17: 1151-1156.

- Graf GA, Connell PM, Van der Westhuyzen DR, Smart EJ 1999. The class B, type I scavenger receptor promotes the selective uptake of high-density lipoprotein cholesterol esters into caveolae. *J Biol Chem* 274: 12043-12048.
- Handcock JF 2006. Lipids rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nature* 7: 456-462.
- Harder T, Scheiffele P, Verkade P, Simons K 1998. Lipid domain structure of the plasma membrane revealed by patching of membrane components. *J Cell Biol* 141: 929-942.
- Harris TJ, Siu CH 2002. Reciprocal raft-receptor interactions and the assembly of adhesion complexes. *Bioessays* 24: 996-1003.
- Ikonen E 2001. Roles of lipid rafts in membrane transport. *Curr Opin Cell Biol* 13: 470-477.
- Kiss AL, Botos E, Turi A, Mullner N 2004. Okadaic acid treatment causes tyrosine phosphorylation of caveolin-2 and induces internalization of caveolae in rat peritoneal macrophages. *Micron* 35: 707-715.
- Ligtenberg MJ, Bitter W, Kieft R, Steverding D, Janssen H, Calafat J, Borst P 1994. Reconstitution of a surface transferrin binding complex in insect form *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 13: 2565-2573.
- Milder R, Deane MP 1969. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini*. *J Protozool* 16: 730-737.
- Morgan GW, Allen CL, Jeffries TR, Hollinshead M, Field MC 2001. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 114: 2605-2615.
- Morgan GW, Hall BS, Denny PW, Carrington M, Field MC 2002. The Kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defenses. *Trends Parasitol* 18: 491-496.
- Nabi IR, Le PU 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 161: 673-677.
- Nguyen DH, Hildreth JE 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol* 74: 3264-3272.
- Nolan DP, Jackson DG, Biggs MJ, Brabazon ED, Pays A, Van Laethem F, Paturiaux-Hanocq F, Elliott JF, Voorheis HP, E Pays 2000. Characterization of a novel alaninerich protein located in surface microdomains in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 275: 4072-4080.
- Parton RG, Joggerst B, Simons K 1994. Regulated internalization of caveolae. *J Cell Biol* 127: 1199-1215.
- Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur J Cell Biol* 79: 858-869.
- Rietveld A, Simons K 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* 1376: 467-479.
- Seveau S, Bierne H, Giroux S, Prevost MC, Cossart P 2004. Role of lipid rafts in Ecadherin-and HGF-R/Met-mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol* 166: 743-753.
- Simons K, Ikonen E 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
- Simons K, Toomre D 2000. Lipid rafts and signal transduction. *Nature Rev Mol Cell Biol* 1: 31-39.
- Simons K, Vaz W 2004. Model systems, lipid raft and cell membrane. *Ann Rev Biophys Biomol Struct* 33: 269-295.
- Slot JW, Geuze HJ 1985. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur J Cell Biol* 38: 87-93.
- Soares MJ, De Souza W 1988. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *J Submicrosc Cytol Pathol* 20: 349-361.
- Soares MJ, De Souza W 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 77: 461-468.
- 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.
- Steverding D 2000. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Int* 48: 191-198.
- Tagawa A, Mezzacasa A, Hayer A, Longatti A, Pelkmans L, Helenius A 2005. Assembly and trafficking of caveolar domains in the cell: caveolae as stable, cargo-triggered, vesicular transporters. *J Cell Biol* 170: 769-779.
- VataruNakamura 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: 227-230.
- Vogel WC, Doizaki WM, Zieve L 1962. Rapid thin-layer chromatographic separation of phospholipids and neutral lipids of serum. *J Lipid Res* 3: 138-140.
- Yavin E, Zutra A 1977. Separation and analysis of ³²P-labeled phospholipids by a simple and rapid thin-layer chromatographic procedure and its application to cultured neuroblastoma cells. *Anal Biochem* 80: 430-437.

ARTIGO 3



ELSEVIER

Available online at www.sciencedirect.com



Experimental Parasitology xxx (2008) xxx–xxx

Experimental
Parasitology

www.elsevier.com/locate/yexpr

Transferrin uptake in *Trypanosoma cruzi* is impaired by interference on cytotome-associated cytoskeleton elements and stability of membrane cholesterol, but not by obstruction of clathrin-dependent endocytosis

José R. Corrêa^a, Georgia C. Atella^b, Marcelo M. Batista^c, Maurilio J. Soares^{d,e,*}

^a Laboratório de Ultra-estrutura Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Instituto de Bioquímica Médica, CCS, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Cidade Universitária, 21941-590 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^c Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^d Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Prof. Algacyr Munhoz Maeder 3.775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, P.R, Brazil

^e Fundação Oswaldo Cruz, 21045-900 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Received 20 June 2007; received in revised form 22 October 2007; accepted 20 December 2007

Abstract

Transferrin uptake by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes occurs mainly through the cytotome/cytopharynx. Here, we present evidences for the association of sterol-rich membrane domains with the transferrin endocytic site. Assays using pharmacological treatments to disrupt clathrin-coated pits and hinder caveolae formation showed no association between transferrin uptake and clathrin-dependent endocytosis, but indicated that cholesterol stability in membrane domains is essential for the endocytosis of transferrin. Furthermore, it was observed a connection between the integrity of cytoskeleton elements at the cytopharynx and the function of the cytotome. Our data show that *T. cruzi* epimastigotes depend on a specialized pathway for transferrin uptake, which is cholesterol-dependent, clathrin-independent, and closely associated with the structural stability of the cytotome/cytopharynx cytoskeleton.

© 2008 Published by Elsevier Inc.

Index Descriptors and Abbreviations: Cholesterol-rich membrane domain; Cytotome; Endocytosis; Transferrin; *Trypanosoma cruzi*; Trypanosomatidae; PBS, phosphate-buffered saline; MBCD, methyl- β -cyclodextrin; DMSO, dimethylsulfoxide; LIT, liver infusion tryptose; FCS, fetal calf serum; TEM, transmission electron microscopy

1. Introduction

Iron is an essential element for diverse cellular processes, as a critical component of functional groups of several enzymes and proteins involved in vital constitutive functions (Cheng et al., 2004; Raje et al., 2007). Practically all extracellular iron (as Fe^{+3}) is found associated with transferrin, an abundant and ubiquitous protein with high iron affinity, which delivers its cargo to cells via the endocytic

pathway after binding to transferrin receptors (Enns et al., 1996).

For most eukaryotic cells iron uptake engages the same basic steps: (1) binding of holo-transferrin (iron-loaded) to the correspondent receptor in the cell surface; (2) recruiting of adaptor proteins to the cytoplasmic tail of the transferrin receptor, after holo-transferrin binding; (3) clathrin mobilization and assembly to adaptor proteins; (4) budding of coated vesicles from the cell membrane; (5) delivery of the iron cargo to early endosomes; (6) apotransferrin (iron-free) remains bound to the transferrin receptor and is returned to the cell surface (Enns et al., 1996; Gunshin et al., 1997; Lawrence et al., 1999; Cheng et al., 2004).

* Corresponding author. Address: Instituto de Biologia Molecular do Paraná, Rua Prof. Algacyr Munhoz Maeder 3.775, Cidade Industrial, 81350-010 Curitiba, PR, Brazil. Fax: +55 41 3316 3267.

E-mail address: maurilio@tepar.br (M.J. Soares).

Trypanosomatid protozoa are eukaryotic cells that also require iron for growth and division. Most trypanosomatid protozoa have a particular cell body array that allows uptake of nutrients only at a specific membrane site: the flagellar pocket (Morgan et al., 2001; Hung et al., 2004). This structure is a cell membrane invagination at the anterior end of the parasites, from which the flagellum emerges. The flagellar pocket membrane serves as an endocytic and exocytic site and represents about 2–3% of the total plasma membrane (Balber, 1990; Webster and Russell, 1993; Hung et al., 2004).

Trypanosoma brucei internalizes host holo-transferrin by receptor-mediated endocytosis through the flagellar pocket, which involves a GPI-anchored trypanosomal transferrin receptor, with formation of spiny-coated vesicles of 100–150 nm in diameter. *In vitro* assays suggest that in *T. brucei* the transferrin receptor and GPI-anchored proteins can be endocytosed by a clathrin-dependent mechanism (Schell et al., 1991; Steverding, 2000; Morgan et al., 2001; Hung et al., 2004). On the other hand, *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease in Latin America, is an attractive model for transferrin uptake studies due to morphological differences in structures associated with molecule uptake: epimastigote forms are able to ingest macromolecules at two distinct sites: the flagellar pocket and the cytostome/cytopharynx.

The cytostome of *T. cruzi* epimastigotes is a plasma membrane invagination at the anterior cell end, which penetrates deeply into the cytoplasm (forming the cytopharynx) towards the nucleus (Milder and Deane, 1969). Uncoated vesicles have been observed budding off from the bottom of the cytopharynx (Figueiredo and Soares, 2000), thus indicating uptake of molecules by a clathrin-independent endocytic pathway. Indeed, morphological data suggested that transferrin uptake occurs by receptor-mediated endocytosis mainly through the cytostome (Soares and De Souza, 1991; Figueiredo and Soares, 2000; Porto-Carreiro et al., 2000).

We have here performed endocytic inhibitory assays, quantitative analysis of transferrin uptake by flow cytometry, and morphological observations of transferrin ingestion by transmission electron microscopy. Our data demonstrate no involvement of clathrin coat assembly in transferrin uptake by *T. cruzi* epimastigotes, differently from what is observed in *T. brucei*.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

Epimastigote forms of *T. cruzi*, Y strain, were maintained axenically at 28 °C by weekly transfers in LIT medium (Camargo, 1964) supplemented with 10% heat inactivated fetal calf serum (CultiLab Ltda., São Paulo, Brazil). Five-day-old epimastigotes, at the mid-log phase of growth, were used for the experiments.

2.2. Gold and fluorescent probes

Colloidal gold particles, 15 nm in diameter, were prepared according to Slot and Geuze (1985). Human holo-transferrin (Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA) was coupled to the gold particles as described elsewhere (Bendayan et al., 1987). Human holo-transferrin and bovine albumin conjugated to AlexaFluor 488 fluorescence dye were purchased from Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA).

2.3. Interference on transferrin endocytosis

Parasites were washed three times in PBS (pH 7.2) at room temperature, counted in Neubauer hemocytometer and distributed in 5×10^6 cells/ml samples. The cells were maintained for 15 min at 28 °C in PBS and then submitted to the following pre-treatments for 15–30 min at 28 °C (all reagents diluted in LIT medium): (1) 0.45 mM sucrose (Heuser and Anderson, 1989) and (2) 10 mM acetic acid pH 5.0 (Ramoino et al., 2002), in order to impair the clathrin coat formation; (3) 0.1 mg/ml filipin (Ramoino et al., 2002) and (4) 2.5 mM MBCD (Musch et al., 2004), to disrupt cholesterol-rich membrane domains; (5) 0.3 mM cytochalasin B (Ramoino et al., 2002), as actin depolymerization agent; (6) 1 μ M okadaic acid, a universal phosphatase inhibitor; (7) 100 μ M genistein, a kinase inhibitor. Filipin, cytochalasin B, okadaic acid and genistein were previously diluted in DMSO, so that the final concentration of DMSO in the culture medium never exceeded 0.01%.

To analyze the effect of K^+ depletion, which arrests clathrin coat formation at the cell membrane (Larkin et al., 1983), parasites were first washed once with potassium-free buffer (140 mM NaCl, 1 mM $CaCl_2$, 1 mM $MgCl_2$, 1 mg/ml D-glucose, 20 mM Hepes pH 7.4), then with hypotonic buffer (potassium-free buffer diluted 1:1 with water), followed by 3 washes with potassium-free buffer. The cells were then maintained in potassium-free buffer for 60 min.

All treated parasites were finally incubated for 30 min at 28 °C with gold-labeled transferrin. Two positive controls were used: (a) parasites without pre-treatment, or (b) parasites pre-incubated with only 0.01% DMSO in LIT medium. Negative control for transferrin uptake was performed by pre-incubating parasites for 30 min at 4 °C. All samples were then processed for routine TEM (see below). All above mentioned tests were performed in three independent experiments.

2.4. TEM procedures

After the endocytosis assays, the parasites were rinsed with PBS, fixed for 1 h at room temperature with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2), rinsed in phosphate buffer and then post-fixed for 30 min with 1% osmium tetroxide/0.8% potassium ferricyanide/5 mM

CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer (pH 7.2). Thereafter, the parasites were rinsed in cacodylate buffer, dehydrated in graded acetone series and embedded in Poly/Bed 812 resin (Polysciences, Warrington, PA, USA). Ultra-thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and then observed in a Zeiss (Oberkochen, Germany) EM10C transmission electron microscope.

2.5. Flow cytometry analysis

Treatments to induce interference on transferrin endocytosis, as well as positive controls, were performed as described above. Uptake of AlexaFluor 488-labeled holotransferrin was evaluated after incubation with the dye for 30 min at 28 °C. Heat-killed parasites were used as negative controls.

As a control for clathrin-mediated endocytosis, five parasite samples (5×10^6 cells/ml each) were submitted to the clathrin interference assays mentioned above (K⁺-depleted LIT medium, LIT medium plus 0.45 mM sucrose or LIT plus 10 mM acetic acid pH 5.0) and then incubated with AlexaFluor 488-conjugated albumin for 30 min at 28 °C, as albumin is a protein shown to be associated with clathrin-mediated endocytosis in *T. cruzi* (Corrêa et al., 2007).

All cell samples were washed three times in PBS or potassium-free buffer before flow cytometry evaluation. Data acquisition and analyses were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton–Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA) equipped with the Cell Quest software (Scripps Research Institute, La Jolla, CA, USA). Differences between the different experimental data sets were statistically evaluated by using the Student's *T* test.

2.6. Growth curve of drug-treated epimastigotes

Five-day-old epimastigotes were harvested, rinsed in PBS, counted in Neubauer chamber and distributed in samples (5×10^5 cells/ml each) in LIT medium supplemented with 10% FCS. Growth was estimated by daily counting in triplicate of cultures treated with 0.1 mg/ml filipin in 0.01% DMSO or with 2.5 mM MBCD. Furthermore, cells were grown in hypertonic (Heuser and Anderson, 1989) or in acidic (Ramóino et al., 2002) LIT medium.

As positive control, cells were maintained in LIT medium supplemented with 10% FCS, or LIT medium supplemented with 10% FCS containing 0.01% DMSO. All assays were performed at 28 °C. Viability of the parasites was accessed by light microscopy examination of cell motility and by the Trypan blue exclusion test.

3. Results

3.1. Interference on transferrin endocytosis—TEM analysis

Ultrastructural analysis showed that transferrin uptake by *T. cruzi* epimastigotes was not impaired when parasites

were submitted to classical methods that interfere with clathrin-mediated endocytosis. Gold-labeled transferrin was observed in several cytoplasmic vesicles and accumulated in reservosomes in all samples submitted to cytosol acidification, hypertonic medium or K⁺ depletion (Figs. 1, 2, and 3). Similar morphological aspects of transferrin uptake were observed in positive control parasites (Fig. 4). In negative controls assayed at 4 °C gold-labeled transferrin molecules were found adhered occasionally to the cytopharynx bottom (Fig. 5) and to the cytosome opening (Fig. 6). No transferrin-loaded cytoplasmic vesicles could be observed.

Samples incubated with filipin showed complete abolishment of transferrin uptake, with absence of labeled molecules either bound to the cell surface or inside the cell body (Fig. 7). MBCD-treated parasites showed a decrease in transferrin uptake, but endocytosis was not blocked: a few loaded cytoplasmic vesicles could be observed by TEM (data not shown).

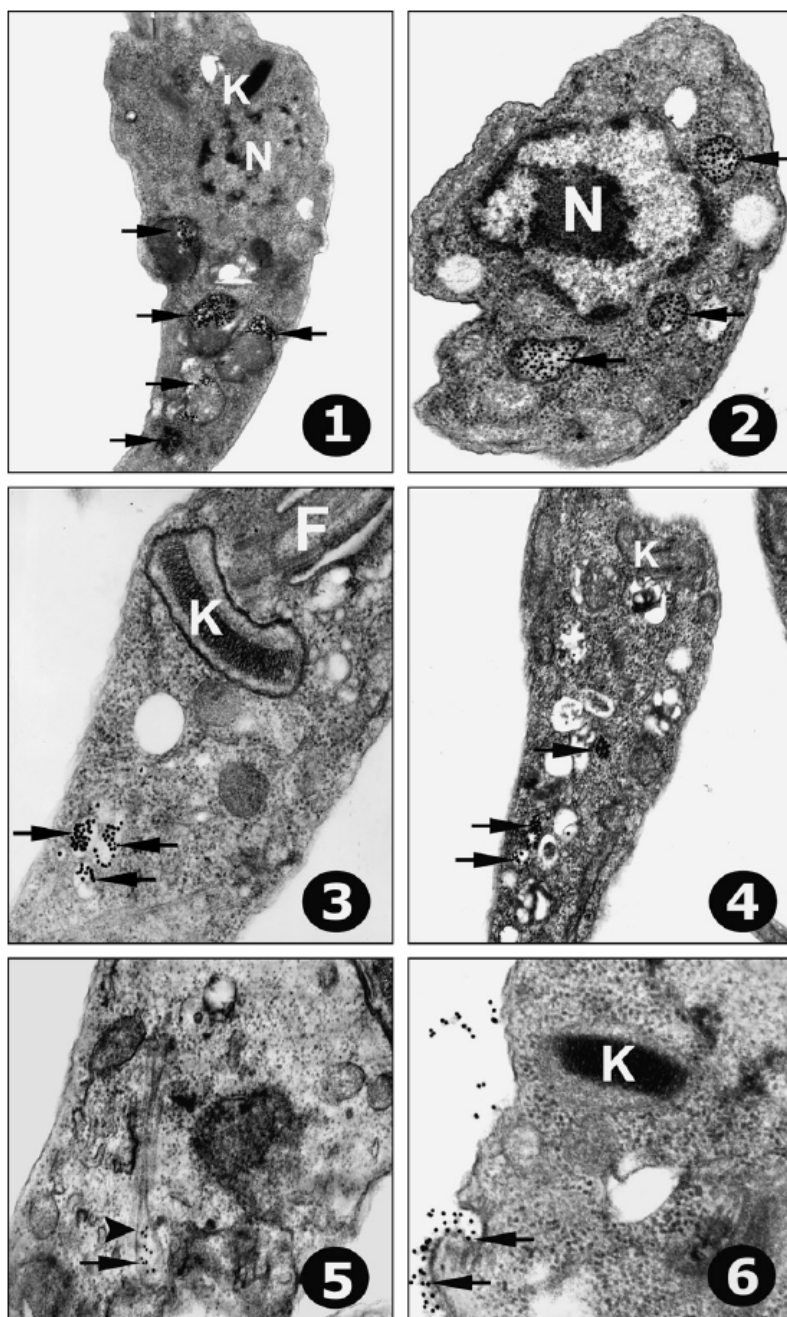
Cells submitted to cytochalasin B treatment showed morphological alterations in the cytosome/cytopharynx. The cytopharynx-associated microtubules showed a shorter length in all analyzed samples, thus affecting the organelle size and organization (Fig. 8). All cytochalasin B-treated samples showed fragmentation of the cytopharynx inner membrane, which could be collapsed into several small vesicles (Fig. 8). There was frequent formation of a line of vesicles associated to the cytopharynx, either inside or laterally to it (Fig. 9). Few gold-labeled transferrin could be found inside cytoplasmic vesicles (data not shown). Bound tracers were occasionally found adhered to the fragments of cytopharynx membrane that remained associated with the cytopharynx cytoskeleton (Fig. 9).

Transferrin uptake was apparently not affected in parasites treated with genistein or okadaic acid. Gold-labeled transferrin was loaded in several cytoplasmic vesicles and adhered to the cytosome/cytopharynx in both experimental conditions (data not shown).

3.2. Interference on transferrin endocytosis, quantitative analysis by flow cytometry

Results by flow cytometry on the uptake of AlexaFluor-labeled transferrin (Figs. 10 and 11) matched those obtained by TEM. The data were first plotted by population density and then all analyzes were performed in the region corresponding to the highest cell density (data not shown). Negative control cells showed no significant fluorescence signal, with a low number of labeled cells (Fig. 10). On the other hand, most positive control cells (97.53%) were able to internalize transferrin molecules.

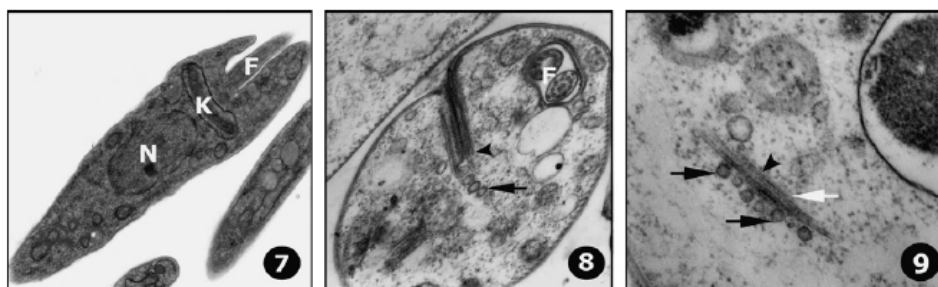
Transferrin uptake was largely inhibited in parasites submitted to MBCD and filipin treatment (Figs. 10 and 11). Genistein-treated cells showed a decrease of transferrin uptake, while no interference on protein ingestion was observed in parasites treated with okadaic acid. Parasites incubated at low pH (acidic medium) or hypertonic



Figs. 1–6. Transmission electron microscopy of gold-labeled transferrin uptake by *T. cruzi* epimastigotes submitted to different drug treatments. Fig. 1. Cytosol acidification, 18,200 \times . Fig. 2. Hypertonic medium, 31,500 \times . Fig. 3. K^+ depletion, 36,000 \times . Fig. 4. Positive control, 25,000 \times . Figs. 5–6. Negative control cells, 34,000 \times and 50,000 \times , respectively. Figs. 1–4 show gold-labeled transferrin (arrows) loaded in reservosomes and several cytoplasmic vesicles. Fig. 5 shows gold-labeled transferrin (arrow) inside a large vesicle forming at the cytopharynx bottom (arrowhead). Fig. 6 shows labeled transferrin (arrows) adhered to the cytotome opening and to the electron-dense coat associated to the cytotome membrane. F, flagellum; K, kinetoplast; N, nucleus.

condition showed a slight decrease in transferrin uptake (Figs. 10 and 11 ~~toat~~), while cells incubated in K^+ -depleted medium showed no alteration in the profile of transferrin uptake.

Cytochalasin B-treated parasites presented an enhanced reduction in transferrin uptake. Drug treatment schemes, associated effects, and observed results are summarized in Table 1.



Figs. 7–9. Transmission electron microscopy of gold-labeled transferrin uptake by *T. cruzi* epimastigotes submitted to different drug treatments. Fig. 7. Filipin, 13,000 \times . Figs. 8 and 9. Cytochalasin B, 32,800 \times and 41,600 \times , respectively. Fig. 7 shows absence of tracer in the cell cytoplasm. Fig. 8 shows that the microtubules of the cytopharynx (arrowhead) do not fully polymerize and do not form the long cytopharynx tube. The cytopharynx membrane disrupts and reseals forming several small vesicles (arrow). Fig. 9 shows a disrupted cytopharynx with several small vesicles (arrows) associated to the remaining microtubules (arrowhead). Gold-labeled transferrin (white arrow) can be occasionally found inside the altered cytopharynx. F, flagellum; K, kinetoplast; N, nucleus.

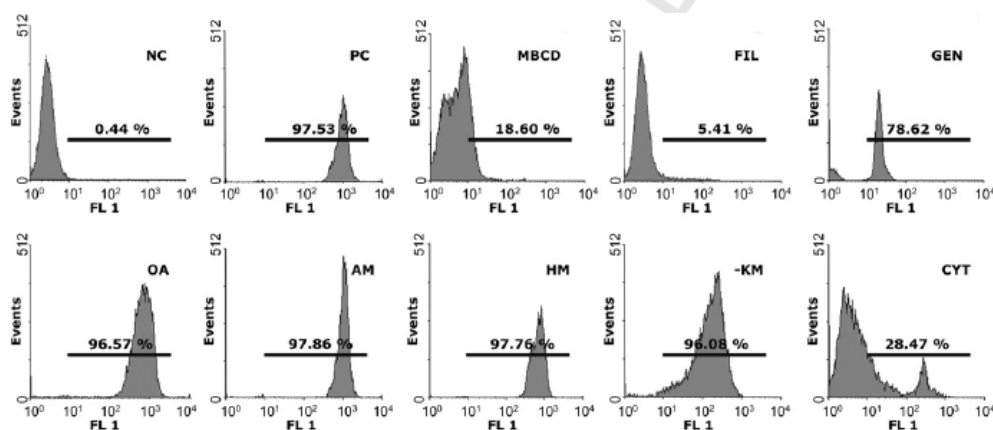


Fig. 10. Quantitative analysis of the interference on transferrin endocytosis. The graphics are histograms of fluorescence signal associated with the labeled-transferrin ingested by the parasites. The y and x axes represent number of events and fluorescence intensity log (FL1), respectively. The percentage of positively labeled cells is indicated above the black lines. Drugs used for each assay are indicated at the top right of each histogram. Data were normalized by the negative control. NC, negative control; PC, positive control; MBCD, methyl- β -cyclodextrin; FIL, filipin; GEN, genistein; OA, okadaic acid; AM, acidic medium; HM, hypertonic medium; -KM, K^+ depleted medium; CYT, cytochalasin B.

3.3. Interference on albumin endocytosis, quantitative analysis by flow cytometry

Results by flow cytometry of cells incubated with Alexa-Fluor 488-labeled albumin showed that albumin uptake was impaired under conditions that inhibit clathrin-coated assembly (Figs. 13 and 14). Parasites incubated at low pH (acidic medium) showed a high decrease in albumin uptake, while cells incubated in hypertonic condition showed a slight decrease in protein uptake (Fig. 14). Cells incubated in K^+ -depleted medium showed no alteration in the profile of albumin uptake (Fig. 14).

3.4. Growth curve profile

Data from the growth curves indicated that membrane cholesterol disturbing is a critical event for the viability

of *T. cruzi* epimastigotes. Filipin-treated parasites were unable to proliferate, most cells dying after the first 24 h of drug incubation. Cells at this time showed a round cell body and absence of flagellar mobility. On the other hand, MBCD-treated cells were able to survive under the experimental conditions. MBDC treatment induced a statistically significant cell death in the first 24 h, but this event did not involve 100% of the population. After 24 h live cells showed normal morphological aspects and flagellar mobility, being able multiply, and the cell number increased after 48 h of cultivation (Fig. 12).

Cells submitted to medium acidification or hypertonic medium showed no alteration in morphology or flagellar mobility. Growth profiles of these samples were very similar to that of positive controls. No alterations in morphology and growth profile were observed in samples incubated with 0.01% DMSO only.

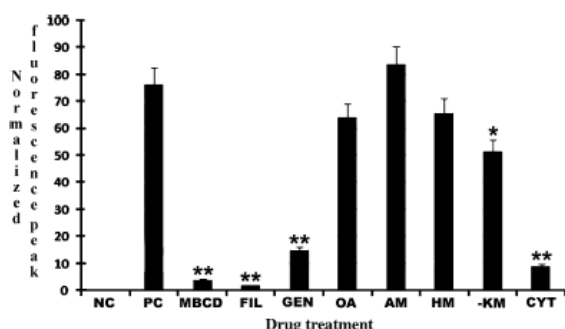


Fig. 11. Quantitative analysis by fluorescence intensity of the interference on transferrin endocytosis. Bars represent fluorescence intensity (mean ± standard deviation) acquired from histogram data. Each drug treatment was normalized by the negative control. *: statistically significant ($p < 0.05$); **: statistically significant ($p < 0.01$); NC, negative control; PC, positive control; MBCD, methyl-β-cyclodextrin; FIL, filipin; GEN, genistein; OA, okadaic acid; AM, acidic medium; HM, hypertonic medium; -KM, K⁺ depleted medium; CYT, cytochalasin B.

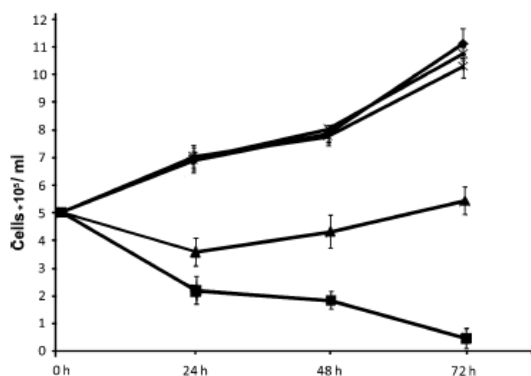


Fig. 12. Growth curves of treated parasites. (◆), positive control; (■), filipin; (▲), methyl-β-cyclodextrin; (X), Hypertonic medium; (*): acidic medium. Each point represents the mean and standard deviation of three different experiments.

4. Discussion

In this work, we have addressed the correlation between transferrin uptake and a specific endocytic pathway in

T. cruzi epimastigotes. Furthermore, we have investigated whether interference in transferrin uptake could affect cell viability and proliferation in axenic media.

Uptake of transferrin in African trypanosomes occurs at the flagellar pocket, while in epimastigote forms of *T. cruzi* it occurs through a cytosome (Soares and De Souza, 1991; Ligtenberg et al., 1994; Steverding et al., 1995; Figueiredo and Soares, 2000; Porto-Carreiro et al., 2000). Receptor-mediated endocytosis of transferrin in the *Trypanosoma* genus was demonstrated by identification of a transferrin receptor in *T. brucei*, which differs in primary structure, subunit organization and mode of membrane anchorage from the human counter-part (Steverding, 2000). No other proteins operating in transferrin uptake have been found in bloodstream forms of trypanosomes (Steverding, 2000). However, the transferrin receptor in *T. cruzi* epimastigotes remains to be identified.

Data from *T. cruzi* epimastigotes showed that in these adaptative forms the uptake of holo-transferrin occurs mostly through the cytosome/cytopharynx (Soares and De Souza, 1991; Figueiredo and Soares, 2000; Porto-Carreiro et al., 2000). Our data suggest the possible involvement of cholesterol-rich membrane domains located at the cytosome and cytopharynx as pivotal membrane structures related to holo-transferrin uptake in *T. cruzi* epimastigotes. Membrane subsets known as detergent resistant membranes (DRMs) have been demonstrated in *T. brucei*, *Leishmania major* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* (Nolan et al., 2000; Denny et al., 2005; Yoneyama et al., 2006), but in these works it was not proposed an association between lipidic micro-domains and endocytic pathways.

Our results demonstrate a dramatic reduction in transferrin uptake in parasites submitted to filipin or MDCD treatment. Filipin is long known as a sterol-binding drug, interacting with unesterified cholesterol to produce filipin-cholesterol complexes, while MDCD is widely used as a cholesterol depleting agent (Schnitzer et al., 1994; Musch et al., 2004; Tallima and El Ridi, 2005). These drugs affect the membrane dynamics in cholesterol-rich micro-domains and the cell treatments used in our work are widely used to demonstrate the presence of lipid rafts and caveolae-dependent endocytosis of several molecules in different eukaryotic cell models (Rothberg et al., 1992; Schnit-

Table 1 Drug treatment and effect observed by transmission electron microscopy or flow cytometry on transferrin uptake by *T. cruzi* epimastigotes

Treatment	Concentration	Treatment time (min)	Potential function	Observed effect on transferrin uptake
MBCD	2.5 mM	30	Cholesterol solubilizing agent	Partial impairment
Filipin	0.1 µg/ml	15	Sterol-binding drug	Total abolishment
Genistein	100 µM	30	Tyrosine/serine/threonine protein kinases inhibitor	Partial impairment
Okadaic acid	1 µM	60	Protein phosphatase inhibitor	No effect
Acetic acid	10 mM	15	Clathrin-dependent endocytosis inhibitor	No effect
Sucrose	0.45 M	15	Clathrin-dependent endocytosis inhibitor	No effect
K ⁺ depletion	—	60	Clathrin-dependent endocytosis inhibitor	No effect
Cytochalasin B	0.3 mM	30	Affects actin cytoskeleton	Significant impairment
Temperature (4 °C)	—	30	Inhibits vesicular transport	Total abolishment

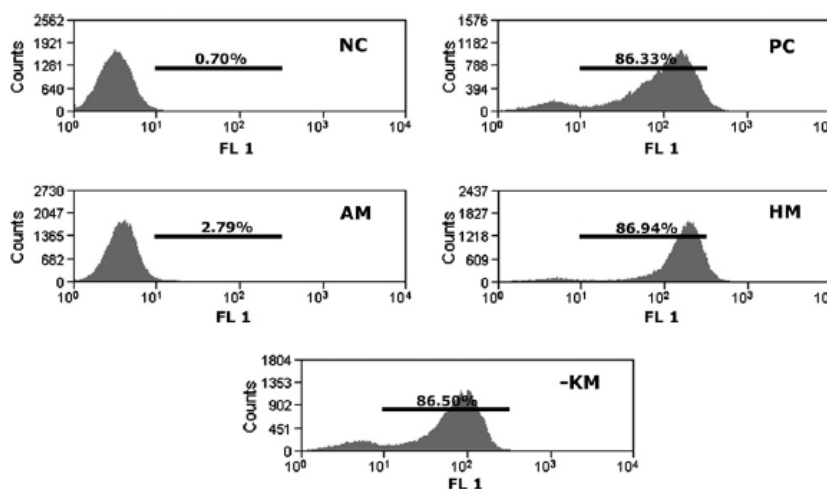


Fig. 13. Quantitative analysis of the interference on albumin endocytosis. The graphics are histograms of fluorescence signal associated with the labeled-albumin ingested by the parasites. The y and x axes represent number of events (cell counts) and fluorescence intensity (FL1), respectively. The percentage of positively labeled cells is indicated above the black lines. Treatment schemes for each assay are indicated at the top right of each histogram. Data were normalized by the negative control. NC, negative control; PC, positive control; AM, acidic medium; HM, hypertonic medium; -KM, K⁺ depleted medium.

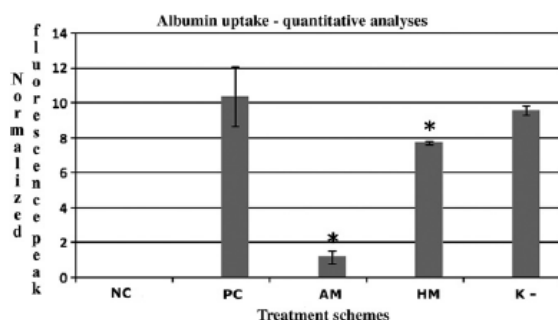


Fig. 14. Quantitative analysis by fluorescence intensity of the interference on albumin endocytosis. Bars represent fluorescence intensity (mean \pm standard deviation) acquired from histogram data. Each treatment was normalized by the negative control. *: statistically significant ($p < 0.05$); NC, negative control; PC, positive control; AM, acidic medium; HM, hypertonic medium; K-, K⁺-depleted medium.

zer et al., 1994; Orlandi and Fishman, 1998; Kee et al., 2004; Xu et al., 2007).

Our results from parasites treated with genistein and okadaic acid support the evidence that holo-transferrin uptake in *T. cruzi* epimastigotes occurs at sterol-rich membrane sites. Genistein-treated parasites showed a statistically significant ($p < 0.05$) reduction in holo-transferrin uptake, while okadaic acid-treated parasites showed a slight decrease in holo-transferrin internalization. Ingestion of molecules at eukaryotic cell raft domains is repressed by kinase inhibitors such as genistein, but is enhanced by phosphatase inhibitors such as okadaic acid (Pelkmans et al., 2001; Mundy et al., 2002; Pelkmans and Helenius, 2002; Thomsen et al., 2002). Internalization of raft ligands

can occur independently of the expression of caveolin, a protein associated to raft domains (Orlandi and Fishman, 1998; Benlimame et al., 1998; Nichols, 2002) that is not found in the *T. cruzi* genome database. Taken together, our data from filipin, MBCD, genistein and even okadaic acid treatments support our hypothesis that holo-transferrin uptake occurs through sterol-rich membrane domains in *T. cruzi* epimastigotes.

Cytochalasin B-treated parasites showed morphological alterations in the cytosome/cytopharynx, associated with a statistically significant reduction ($p < 0.01$) in transferrin internalization. The formation of a line of small vesicles associated to the cytopharynx could be due to the Cytochalasin B action, which causes depolymerization of the actin cytoskeleton. Although the presence of intermediate filaments or microfilaments is subject of intense debate in the *T. cruzi* model, actin has been already described (Mortara, 1989). Our morphological observations in control cells showed an electron-dense region associated to the cytopharynx microtubules (data not shown), which is not present in Cytochalasin B-treated cells. Further studies are needed to associate this specific region with the stability of the cytopharynx array, as well as to identify the molecules present in this site.

Microtubules guide the cytopharynx penetration deeply into the cell cytoplasm (Okuda et al., 1999), and there is a close association between cytopharynx structure and microtubules. The linear array of small vesicles associated to the cytosome remnants, observed in our experiments after Cytochalasin B treatment, can be consequence of interference on the cytopharynx array (for instance, disturbance on microtubule-associated actin or other unknown proteins), followed by instability of the cytopharynx mem-

brane. It may follow membrane disruption and resealing of the broken membrane segments into small vesicles, which remain associated to the vestigial cytostome cytoskeleton. Our results demonstrate that the cytopharynx stability depends on cytoskeleton integrity. Thus, any perturbation in the cytostome/cytopharynx structure would affect the endocytosis of transferrin by *T. cruzi* epimastigotes.

Clathrin-mediated endocytosis has been already demonstrated in trypanosomatids, based on ultrastructural and biochemical approaches (Coppens et al., 1987; Grab et al., 1992; Grunfelder et al., 2003; Corrêa et al., 2007). Transferrin uptake by coated vesicles at the flagellar pocket, and delivery of these vesicles to pleomorphic intracellular endocytic organelles, has been described in *Trypanosoma congolense* and *T. brucei* (Grab et al., 1992). Assays with bloodstream forms of *T. brucei* have demonstrated the involvement of clathrin assembly in the process of receptor-mediated endocytosis of transferrin. It has been also demonstrated that GPI-anchored proteins can be endocytosed by a clathrin-dependent mechanism in trypanosomes (Steverding, 2000; Morgan et al., 2001). Clathrin suppression by use of interference RNA resulted in lethality to the *T. brucei* bloodstream stage, thus demonstrating the relevance of this protein for this parasite form (Allen et al., 2003). On the other hand, our results suggest that there is no association between transferrin uptake and clathrin-mediated endocytosis in *T. cruzi* epimastigote forms. All experiments performed here aiming to impair clathrin coat assembly did not interrupt the transferrin endocytosis by *T. cruzi* epimastigotes.

Expression of clathrin has been recently demonstrated in *T. cruzi* epimastigotes (Corrêa et al., 2007). It is possible that clathrin-mediated endocytosis may be a vestigial process linked to the flagellar pocket in *T. cruzi* epimastigotes, and that these evolutive forms evolved to a more efficient clathrin-independent endocytic pathway at the cytostome/cytopharynx. Parasite–host adaptation and the wide host range of *T. cruzi* could had a role in the selective process that has driven *T. cruzi* to polarize transferrin uptake at one specific site, the cytostome. We may also speculate that this mechanism may more efficiently direct molecules to cytoplasmic targets. The clathrin-dependent molecule uptake in *T. cruzi* may be a secondary endocytic process, since disruption of this pathway did not collapse cell proliferation. On the other hand, transferrin uptake is a vital event for epimastigotes, as observed by the high level of molecule internalization by each cell.

Epimastigotes were unable to ingest albumin when incubated in acidified medium, a condition that impairs clathrin coat assembly, while transferrin uptake was unaffected with this treatment. Reducing the internal pH of cultured cells blocks clathrin-mediated endocytosis by altering the structure of clathrin lattices in the cell cytoplasm: lattices curve inward until they become almost spherical, but they remain attached to the membrane (Heuser and Anderson, 1989). Our assays showed that transferrin uptake does not depend on clathrin-mediated endocytosis in *T. cruzi* epimastigotes.

The slight effect on clathrin-mediated uptake of albumin observed with the hypertonic medium and K^+ depletion assays can be due to cell regulation mechanisms operated via the osmoregulation vacuole and the acidocalcisomes. These later organelles are involved in osmotic balance in *T. cruzi* epimastigotes (DoCampo and Moreno, 2001; Rohloff et al., 2004) and could stabilize the cytoplasmic K^+ concentration under the experimental conditions.

Further studies are ongoing in your laboratory to characterize the lipid and protein components of the cytostome/cytopharynx membrane, in an attempt to elucidate the endocytic pathways occurring in this particular cell site.

Acknowledgments

This work was supported by CNPq, FAPERJ, Fiocruz and PAPES-IV/Fiocruz.

References

- Allen, C.L., Goulding, D., Field, M.C., 2003. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal* 22, 4991–5002.
- Balber, A.E., 1990. The pellicle and the membrane of the flagellum, flagellar adhesion zone, and flagellar pocket: functionally discrete surface domains of the bloodstream form of African trypanosomes. *Critical Reviews in Immunology* 10, 177–201.
- Bendayan, M., Nanci, A., Kan, F.W., 1987. Effect of tissue processing on colloidal gold cytochemistry. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry* 35, 983–996.
- Benlimame, N., Le, P.U., Nabi, I.R., 1998. Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Molecular Biology of the Cell* 9, 1773–1786.
- Camargo, E.P., 1964. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 12, 93–100.
- Cheng, Y., Zak, O., Aisen, P., Harrison, S.C., Walz, T., 2004. Structure of the human α_2 receptor–transferrin complex. *Cell* 116, 565–576.
- Corrêa, J.R., Atella, G.C., Menna-Barreto, R.S., Soares, M.J., 2007. Clathrin in *Trypanosoma cruzi*: in silico gene identification, isolation, and localization of protein expression sites. *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 54, 297–302.
- Denny, P.W., Morgan, G.W., Field, M.C., Smith, D.F., 2005. *Leishmania major*: clathrin and adaptin complexes of an intra-cellular parasite. *Experimental Parasitology* 109, 33–77.
- DoCampo, R., Moreno, S.N., 2001. The acidocalcisome. *Molecular and Biochemical Parasitology* 114, 151–159.
- Enns, C.A., Rutledge, E.A., Williams, A.M., 1996. The transferrin receptor. *Biomembranes* 4, 255–287.
- Figueiredo, R.C., Soares, M.J., 2000. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Research* 86, 413–418.
- Grab, D.J., Wells, C.W., Shaw, M.K., Webster, P., Russo, D.C., 1992. Endocytosed transferrin in African trypanosomes is delivered to lysosomes and may not be recycled. *European Journal of Cell Biology* 59, 398–404.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U.V., Gunshin, Y., Romero, M.F., Boron, W.F., Nussberger, S., Gollan, J.L., Hediger, H.A., 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature* 388, 482–488.
- Heuser, J.E., Anderson, R.G., 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *The Journal of Cell Biology* 108, 389–400.

- Hung, C.H., Qiao, X., Lee, P.T., Lee, M.G., 2004. Clathrin-dependent targeting of receptors to the flagellar pocket of procyclic-form *Trypanosoma brucei*. *Eukaryotic Cell* 3, 1004–1014.
- Kee, S.H., Cho, E.J., Song, J.W., Park, K.S., Baek, L.J., Song, K.J., 2004. Effects of endocytosis inhibitory drugs on rubella virus entry into VeroE6 cells. *Microbiology and Immunology* 48, 823–829.
- Larkin, J.M., Brown, M.S., Goldstein, J.L., Anderson, R.G., 1983. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell* 33, 273–285.
- Lawrence, C.M., Ray, S., Babyonyshev, M., Galluser, R., Borhani, D.W., Harrison, S.C., 1999. Crystal structure of the ectodomain of human transferrin receptor. *Science* 286, 779–782.
- Ligtenberg, M.J., Bitter, W., Kieft, R., Steverding, D., Janssen, H., Calafat, J., Borst, P., 1994. Reconstitution of a surface transferrin binding complex in insect form *Trypanosoma brucei*. *The EMBO Journal* 13, 2565–2573.
- Milder, R., Deane, M.P., 1969. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *Tconorhini*. *The Journal of Protozoology* 16, 730–737.
- Morgan, G.W., Allen, C.L., Jeffries, T.R., Hollinshead, M., Field, M.C., 2001. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *Journal of Cell Science* 114, 2605–2615.
- Mortara, R.A., 1989. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. *The Journal of Protozoology* 36, 8–13.
- Mundy, D.I., Machleidt, T., Ying, Y.S., Anderson, R.G., Bloom, G.S., 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *Journal of Cell Science* 15, 4327–4339.
- Musch, M.W., Koornaa, D.L.T., Goldstein, L., 2004. Hypotonicity-induced exocytosis of the skate anion exchanger skAEL: role of lipid raft regions. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 39447–39453.
- Nichols, B.J., 2002. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nature Cell Biology* 4, 374–378.
- Nolan, D.P., Jackson, D.G., Biggs, M.J., Brabazon, E.D., Pays, A., Van Laethem, F., Paturiaux-Hanocq, F., Elliott, J.F., Voorheis, H.P., Pays, E., 2000. Characterization of a novel alanine-rich protein located in surface microdomains in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Biological Chemistry* 275, 4072–4080.
- Okuda, K., Esteva, M., Segura, E.L., Bijovsky, A.T., 1999. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is associated with the flagellar complex. *Experimental Parasitology* 92, 223–231.
- Orlandi, P.A., Fishman, P.H., 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *The Journal of Cell Biology* 141, 905–915.
- Pelkmans, L., Helenius, A., 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3, 311–320.
- Pelkmans, L., Kartenbeck, J., Helenius, A., 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nature Cell Biology* 3, 473–483.
- Porto-Carreiro, I., Attias, M., Miranda, K., De Souza, W., Cunha-e-Silva, N., 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *European Journal of Cell Biology* 79, 858–869.
- Raje, C.I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J.S., Raje, M., 2007. The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 3252–3261.
- Ramoino, P., Fronte, P., Fato, M., Beltrame, F., Diaspro, A., 2002. Mapping cholesterol ester analogue uptake and intracellular flow in *Paramecium* by confocal fluorescence microscopy. *Journal of Microscopy* 208, 167–176.
- Rohloff, P., Montalvetti, A., Docampo, R., 2004. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 52270–52281.
- Rothberg, K.G., Heuser, J.E., Donzell, W.C., Ying, Y.S., Glenney, J.R., Anderson, R.G., 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68, 673–682.
- Schell, D., Borowy, N.K., Overath, P., 1991. Transferrin is a growth factor for the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology Research* 77, 558–560.
- Schnitzer, J.E., Oh, P., Pinney, E., Allard, J., 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *The Journal of Cell Biology* 127, 1217–1232.
- Slot, J.W., Geuze, H.J., 1985. A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *European Journal of Cell Biology* 38, 87–93.
- Soares, M.J., De Souza, W., 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 77, 461–468.
- Steverding, D., Stierhof, Y.D., Fuchs, H., Tauber, R., Overath, P., 1995. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *The Journal of Cell Biology* 131, 1173–1182.
- Steverding, D., 2000. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitology International* 48, 191–198.
- Tallima, H., El Ridi, R., 2005. Methyl-beta-cyclodextrin treatment and filipin staining reveal the role of cholesterol in surface membrane antigen sequestration of *Schistosoma mansoni* and *S. haematobium* lung-stage larvae. *The Journal of Parasitology* 91, 720–725.
- Thomsen, P., Roepstorff, K., Stahlhut, M., Van Deurs, B., 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Molecular Biology of the Cell* 13, 238–250.
- Webster, P., Russell, D.G., 1993. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitology Today* 9, 201–206.
- Xu, Y., Henning, R.H., van der Want, J.J., van Buiten, A., van Gilst, W.H., Buikema, H., 2007. Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO- as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. *Life Sciences* 80, 1678–1685.
- Yoneyama, K.A., Tanaka, A.K., Silveira, T.G., Takahashi, H.K., Straus, A.H., 2006. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. *Journal of Lipid Research* 47, 2171–2178.

DISCUSSÃO

No presente trabalho, foram investigados os eventos iniciais que ocorrem na membrana da bolsa flagelar e do citóstoma/citofaringe durante a captação de albumina, transferrina e LDL por epimastigotas do *T. cruzi*. Nossos dados indicam a presença de vias endocíticas mediadas por clatrina e cavéolas associadas à bolsa flagelar e ao citóstoma/citofaringe, respectivamente (Correa et al. 2007, artigos 2 e 3 desta tese).

A endocitose mediada por receptores ocorre no gênero *Trypanosoma* conforme demonstrado nos modelos de tripanossomas africanos para os marcadores LDL e transferrina. Nestes protozoários, além do isolamento e caracterização dos receptores para LDL e transferrina, foi também amplamente caracterizada a via endocítica percorrida por estas moléculas, sendo propostos diversos modelos para as diferentes formas adaptativas dos parasitas (Coppens et al. 1987, Coppens et al. 1988, Webster & Fish 1989, Ligtenberg et al. 1994, Steverding et al. 1994, Steverding et al. 1995, Bastin et al. 1996, Steverding & Overath 1996, Borst & Fairlamb 1998, Isobe et al. 2003, Field et al. 2007). A análise morfológica da captação de nutrientes pelo *T. cruzi* demonstraram de forma indireta a ocorrência da endocitose mediada por receptores neste protozoário. A incubação das células com LDL, transferrina e albumina conjugados a ouro coloidal resultou na adesão, acúmulo e incorporação destas moléculas de forma específica à bolsa flagelar e ao citóstoma do parasita (Soares & de Souza 1991, de Figueiredo & Soares 2000, Porto-Carreiro et al. 2000).

Estudos do processo de endocitose nos tripanossomas africanos revelaram diversas proteínas que, de forma similar ao que ocorre em eucariontes superiores, estão associadas ao brotamento de vesículas. No entanto, devido à arquitetura celular específica destes protozoários, com ausência de citóstoma, estas proteínas estão localizadas exclusivamente na região da bolsa flagelar. A descrição do processo de endocitose mediada por clatrina em tripanossomas africanos percorreu um longo caminho, tendo sido iniciada a partir da morfologia de vesículas contendo revestimento, seguida da purificação destas vesículas e finalmente a identificação da cadeia pesada de clatrina como uma das proteínas associadas a estas vesículas revestidas (Grab et al. 1992, Clayton et al. 1995, Borst & Fairlamb 1998, Morgan et al. 2001, Morgan et al. 2002 a,b). Nossas análises ultra-estruturais de albumina marcada com ouro coloidal permitiram identificar o brotamento de vesículas contendo o típico revestimento externo que em outros modelos celulares tem sido

descrito como de clatrina. Após consulta à base de dados genômicos do *T. cruzi* identificamos a presença do conjunto completo de genes necessários a expressão das proteínas que medeiam o brotamento de vesículas revestidas por clatrina nestes parasitas. Além dos dados computacionais, dados experimentais identificaram a expressão e localização da proteína clatrina em formas epimastigotas do parasita (Correa et al. 2007, artigo 1 desta tese). Adicionalmente, nossos estudos morfológicos demonstraram que: (1) estas vesículas estavam majoritariamente associadas à bolsa flagelar, não sendo observadas associadas ao fundo do citóstoma (citofaringe), sugerindo que os receptores envolvidos na captura de albumina estejam restritos à bolsa flagelar no *T. cruzi*; (2) A visualização de vesículas revestidas associadas à região do complexo de Golgi, sugere que o brotamento de vesículas mediado por clatrina possa fazer parte de uma das vias exocíticas em *T. cruzi* (Sant'Anna et al. 2004, Correa et al. 2007, artigo 1 desta tese).

A viabilidade do *T. brucei* é dependente dos níveis citoplasmáticos normais da proteína clatrina. A supressão da expressão de clatrina levou a uma forma anômala e morte celular tempo dependente destes parasitas (Allen et al. 2003). Análises *in silico* da base de dados do *T. brucei* apoiaram os resultados experimentais, confirmando a existência do conjunto de proteínas adaptadoras necessárias à montagem do revestimento de clatrina em vesículas endocíticas. No entanto, diferente de outras células eucariontes, o *T. brucei* não apresenta a proteína adaptadora 2 (AP-2) (Morgan et al. 2002 a, Allen et al. 2003). Por outro lado, em epimastigotas de *T. cruzi* nossos resultados indicam que a supressão do brotamento de vesículas mediado por clatrina, através da incubação dos parasitas com meios acidificados, hipertônico ou sem potássio (Heuser & Anderson 1989, Ramoino et al. 2002, Larkin et al. 1983), não afeta nem a viabilidade das células, nem a captação de transferrina.

Um aspecto peculiar da endocitose em *T. brucei*, é a captação de transferrina mediada por clatrina através de um receptor (Coppens et al. 1987), que neste parasito é uma molécula ancorada à membrana via GPI. Na nossa avaliação, uma proteína ancorada via GPI está em desacordo com a necessidade de um domínio citoplasmático presente no receptor envolvido na endocitose mediada por clatrina. Este domínio citoplasmático é essencial para que ocorra a associação das adaptinas ao receptor que é o passo fundamental para a interação da clatrina que levará ao brotamento da vesícula endocítica. No entanto, tem sido sugerido que os receptores de transferrina em *T. brucei* podem estar associados a proteínas transmembrana, as

quais fariam a interface entre o receptor e as adaptinas presentes no citoplasma da célula, permitindo assim o brotamento de vesículas dependente de clatrina (Coppens et al. 1987, Borst & Fairlamb 1998). Já tem sido sugerido, a partir de dados morfológicos, que a captação de transferrina por formas epimastigotas do *T. cruzi* ocorre através de vesículas sem revestimento (Soares & de Souza 1991, Soares et al. 1992, de Figueiredo & Soares 2000, Porto-Carreiro et al. 2000). No presente trabalho, demonstramos por diversas linhas de evidências que a captação de transferrina não está associada à endocitose mediada por clatrina em epimastigotas de *T. cruzi*. As conclusões obtidas com os modelos africanos limitam a extrapolação para o *T. cruzi* devido às diferenças relativas à sua estrutura celular e seus ciclos de vida.

A partir da análise ultra-estrutural da captação de nutrientes pelo *T. cruzi* observamos que apenas vesículas sem revestimento brotam da citofaringe. Além disto, ficou evidente que a entrada de transferrina para o citoplasma do *T. cruzi* ocorre majoritariamente por vesículas que brotam a partir do fundo da citofaringe, como já demonstrado anteriormente (Soares & De Souza 1991, de Figueiredo & Soares, 2000, Porto-Carreiro et al. 2000). A endocitose de transferrina observada em *T. brucei* ocorre através da bolsa flagelar e é mediada por brotamento de vesículas revestidas com clatrina, embora o receptor de transferrina tem sido identificado como uma molécula ancorada à membrana via GPI (Coppens et al. 1987, Ligtenberg et al. 1994, Steverding 2000). Esses dados reforçam nossa hipótese do distanciamento entre as vias de captação de nutrientes entre esses grupos de parasitas.

Embora não haja evidência bioquímica da presença de um receptor de transferrina em *T. cruzi*, dados morfológicos mostram que a captação desta molécula ocorre mediada por receptor (Soares & de Souza 1991, de Figueiredo & Soares 2000, Porto-Carreiro et al. 2000). Neste contexto, nossos dados indicam que o citóstoma/citofaringe de epimastigotas de *T. cruzi* possa ser uma região onde estão restritos estes receptores, além de possuir uma membrana rica em domínios detergente-resistentes. Desta forma, a endocitose de transferrina poderia estar ocorrendo por um mecanismo caveolar.

Micro-domínios de membrana relacionados às cavéolas vêm sendo descritos como regiões da membrana plasmática enriquecidas em colesterol, esfingolipídios e proteínas ancoradas via GPI (Nabi & Le 2003, Pang et al. 2004). Além disto, moléculas como o gangliosídeo GM1 e as proteínas caveolina e/ou flotilinas têm se constituído como marcadores universais de jangadas de lipídios, sendo amplamente

utilizados para a identificação da endocitose mediada por cavéolas (Nguyen & Hildreth 2000, Seveau et al. 2004). No entanto, tais proteínas não estão anotadas na base de dados genômicos do *T. cruzi* (El-Sayed et al. 2005). Moléculas que se ligam às jangadas de lipídios podem ser incorporadas pelas células sem a necessidade da expressão de caveolina, uma das proteínas associadas a estes domínios (Orlandi & Fishman 1998, Benlimame et al. 1998, Nichols 2002). Por fracionamento celular e análise bioquímica do conteúdo de membrana de epimastigotas de *T. cruzi* encontramos fortes indícios da presença de domínios de membrana detergente-resistentes, através da composição de lipídios e concentração de proteínas totais nestas frações de membrana. Além disto, obtivemos a identificação por “dot blot” (nestas mesmas frações de membrana) de moléculas que reagem aos marcadores caveolares universais (anticorpo anti-flotilina e toxina B do cólera). Por imunofluorescência observamos a co-localização de transferrina e flotilina na região do citóstoma/citofaringe, durante a endocitose de transferrina nestes protozoários. Embora o conceito “jangada de lipídios” ainda esteja sob intenso debate, a presença de jangada de lipídios em tripanossomatídeos tem sido sugerida (Nolan et al. 2000, Denny et al. 2001, Denny & Smith 2004) e demonstrada em *L. major*, *L. braziliensis* e *T. brucei* (Nolan et al. 2000, Denny et al. 2005, Yoneiama et al. 2006). Neste trabalho, com o uso de marcadores universais para jangadas de lipídios e através de análises do conteúdo lipídico das frações de membrana detergente-resistentes, fomos capazes de demonstrar a presença de domínios lipídicos em formas epimastigotas do *T. cruzi*, com o mesmo perfil daqueles estabelecidos como jangadas de lipídio em células de mamíferos (artigo 2 desta tese).

Tratamentos que afetam de forma seletiva o funcionamento das vias dependentes de clatrina e de jangadas de lipídios em tripanossomatídeos têm sido aplicados na identificação destas vias nestes protozoários (Denny et al. 2001, Denny & Smith 2004). Neste trabalho, o emprego dessas estratégias metodológicas foi capaz de interferir a endocitose de transferrina em epimastigotas de *T. cruzi*. Esse dado nos permite sugerir que a captação desta molécula ocorra através de um mecanismo dependente de jangadas de lipídios.

Diversos modelos celulares quando submetidos a um pré-tratamento que interfere com a endocitose mediada por cavéolas, como as drogas filipina e MBCD, exibem uma acentuada redução na taxa de captação de moléculas por esta via. Esta abordagem vem sendo amplamente empregada como indicadora da associação de endocitose caveolar na captação de determinadas moléculas (Rothberg et al. 1992,

Schnitzer et al. 1994, Orlandi and Fishman, 1998, Kee et al. 2004, Xu et al. 2007). Da mesma forma, o uso de drogas como o ácido ocadáico (um inibidor universal de fosfatase) aumenta a capacidade endocítica via cavéolas, enquanto genisteína (inibidor de cinase) reduz a taxa da captação de moléculas por esta via (Pelkmans et al. 2001, Mundy et al. 2002, Pelkmans and Helenius 2002, Thomsen et al. 2002). Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento de formas epimastigotas do *T. cruzi* com filipina, MBCD, ácido ocadáico e genisteína, influencia o processo endocítico de transferrina. Estes dados reforçam nossa hipótese de que a captação de transferrina em formas epimastigotas de *T. cruzi* possa ser mediada por jangada de lipídio (artigo 3 desta tese). Análises das amostras por microscopia eletrônica de transmissão (permitindo visualizar a presença ou ausência da transferrina marcada com ouro coloidal) e por citometria de fluxo (permitindo quantificar a endocitose da transferrina pelas células) confirmaram as observações feitas através de ensaios bioquímicos e por imunofluorescência, indicando a ocorrência de domínios de membrana com características de jangadas de lipídios nestas formas adaptativas do parasita.

Endocitose de transferrina em *T. brucei* ocorre exclusivamente pela bolsa flagelar, com brotamento de vesículas revestidas por clatrina (Grab et al. 1992, Steverding, 2000; Morgan et al., 2001, Field et al. 2007). Para excluir a possibilidade de que a endocitose da transferrina em epimastigotas de *T. cruzi* estivesse ocorrendo através de brotamento de vesículas dependentes de clatrina, submetemos os parasitas a condições que inibem o brotamento de vesículas com clatrina (Heuser & Anderson 1989, Ramoino et al. 2002, Larkin et al. 1983). Assim, as células foram submetidas à acidificação do meio de cultivo, a meio hipertônico e a meio sem potássio. Nenhum destes tratamentos comprometeu de forma significativa a captação de transferrina por epimastigotas do *T. cruzi* demonstrando assim a independência do envolvimento de clatrina nesta via.

Como a endocitose de transferrina em *T. cruzi* está relacionada ao citóstoma/citofaringe, utilizamos citocalasina B (agente que afeta a polimerização de moléculas de actina), para testar a influência do citoesqueleto na captação de transferrina. Embora a ocorrência de filamentos intermediários em *T. cruzi* ainda esteja sob discussão, a presença de actina já foi descrita neste organismo (Mortara 1989). Nossos resultados mostraram que citocalasina B comprometeu a organização do citóstoma/citofaringe. Este efeito resultou no rompimento da membrana da citofaringe, o que pode justificar a significativa redução na captação de transferrina

observada através da análise das células por citometria de fluxo. Nossos dados indicam que a estabilidade do arranjo de microtúbulos presente na citofaringe, pode estar associada à integridade da actina ou de alguma molécula sensível a citocalasina B (semelhante à actina) ainda não identificada, repercutindo assim na capacidade endocítica via citóstoma/citofaringe de epimastigotas de *T. cruzi*.

Para testar se o impedimento da endocitose da transferrina poderia afetar a proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*, determinou-se a curva de crescimento de parasitas submetidos aos pré-tratamentos com filipina, MBCD, meio de cultivo acidificado e meio hipertônico. Observou-se um grande declínio no número de células apenas em amostras submetidas a tratamentos que interferem com domínios de membrana caracterizados como jangadas de lipídios (filipina e MBCD). Estes dados são de difícil interpretação pelo desconhecimento de outros possíveis efeitos promovidos pelas condições de tratamento.

Nossos dados sugerem que a endocitose em formas epimastigotas de *T. cruzi* ocorra via bolsa flagelar e via citóstoma, por diferentes mecanismos especificamente associados a estas regiões. A endocitose de transferrina acontece majoritariamente pelo citóstoma via jangadas de lipídio, enquanto outras moléculas podem ser captadas por uma via dependente de clatrina através da bolsa flagelar.

Acreditamos ainda que nas duas regiões (citóstoma e bolsa flagelar) deve ocorrer adicionalmente, a captação de moléculas de forma independente de clatrina ou de jangadas de lipídios. De acordo com o observado por análise ultra-estrutural da endocitose de LDL, esta molécula é captada tanto pela bolsa flagelar como pelo citóstoma/citofaringe, através de vesículas desprovidas de revestimento corroborando dados da literatura (Soares & De Souza 1991).

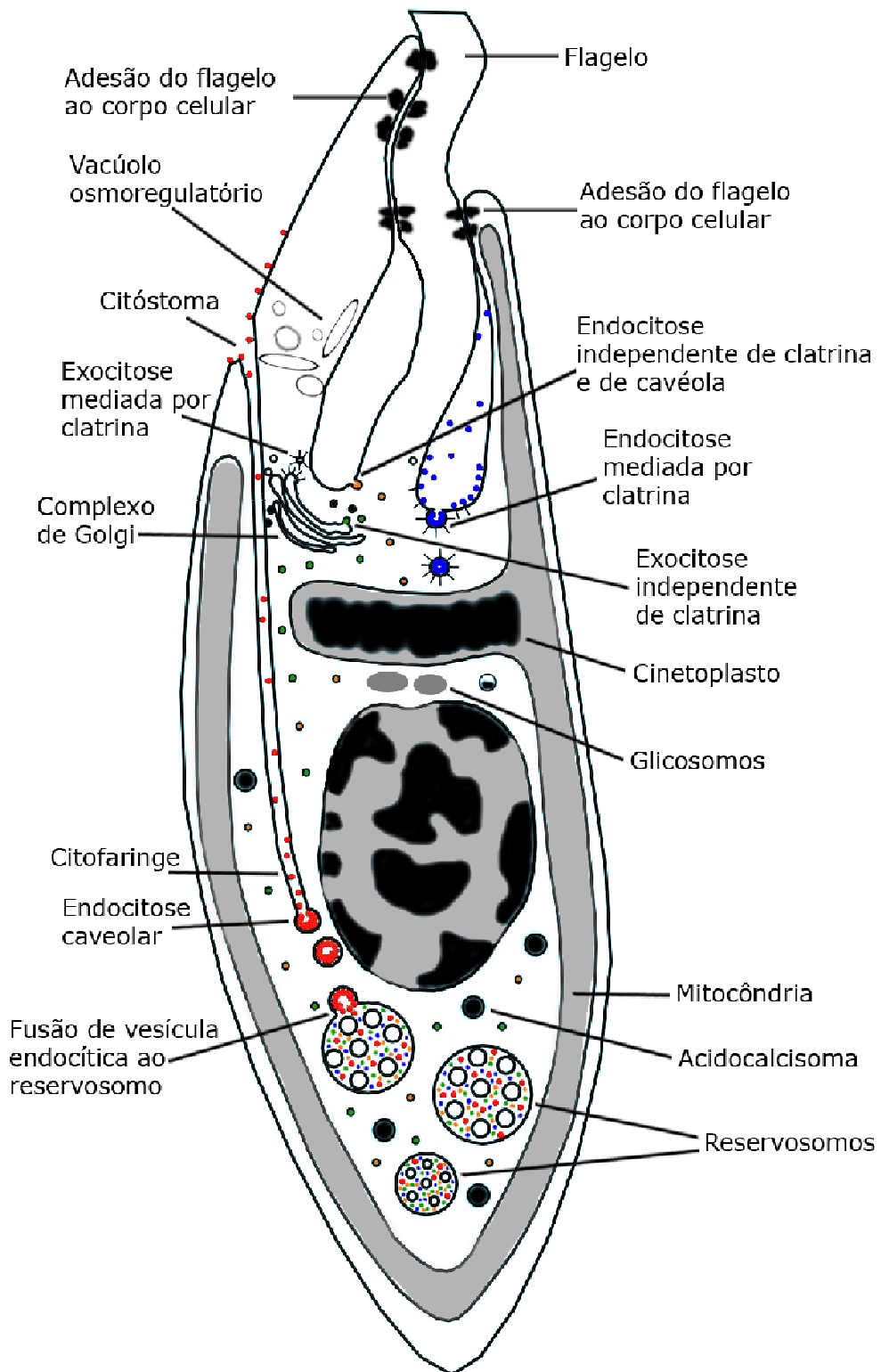
O citóstoma/citofaringe em epimastigotas de *T. cruzi* é uma estrutura alongada cuja porção final atinge a região do citoplasma posterior ao núcleo. O posicionamento da citofaringe na célula, em particular sua proximidade com os reservosomos, nos permite sugerir que durante a endocitose de transferrina não ocorre o trânsito da macromolécula via endossomas inicial e tardio. A vesícula endocítica, após brotar do fundo da citofaringe, se fundiria diretamente aos reservosomos, estruturas caracterizadas como compartimento pré-lisossomais (Soares and De Souza 1991, Soares et al. 1992, De Souza 2002). Vesículas de origem caveolares podem ser encontradas fundindo-se com compartimentos endossomais (Pelkmans et al. 2004) e assim, os reservosomos poderiam ser consideradas organelas receptoras de vesículas oriundas da citofaringe,

apresentando desta maneira características híbridas de compartimento pré-lisossomal e caveossomo.

Em resumo, nossos resultados permitiram uma atualização no modelo esquemático proposto por Figueiredo et al. (2004) para a endocitose em formas epimastigotas do *T. cruzi*.

CONCLUSÕES

- O *T. cruzi* apresenta em seu genoma o conjunto completo de genes que codificam as proteínas necessárias ao brotamento e liberação das vesículas endocíticas e exocíticas através do mecanismo dependente de clatrina, o que subsidia um dos conjuntos de dados apresentados neste trabalho;
- Formas epimastigotas do *T. cruzi* expressam a proteína clatrina. Esta proteína é observada concentrada no citoplasma na região anterior da célula, reforçando a idéia de sua participação no brotamento de vesículas nesta região;
- A visualização de vesículas revestidas associadas à região do complexo de Golgi, sugere que estas vesículas façam parte de uma via exocítica mediada por clatrina em *T. cruzi*;
- A análise ultra-estrutural demonstrou vesículas revestidas contendo albumina associadas à bolsa flagelar, não sendo observadas no fundo do citóstoma (citofaringe). Estas observações sugerem que os receptores envolvidos na captura de albumina estejam mais restritos à bolsa flagelar em epimastigotas de *T. cruzi*;
- A endocitose de transferrina por formas epimastigotas de *T. cruzi* ocorre majoritariamente pelo citóstoma/citofaringe através de vesículas sem revestimento. A presença do fundo da citofaringe em regiões posteriores ao núcleo sugere a possibilidade de fusão destas vesículas diretamente aos reservosomos;
- O perfil lipídico e protéico encontrado em frações de membrana detergente-resistentes obtidas de formas epimastigotas do *T. cruzi* reforça a hipótese da presença de jangadas de lipídios em tripanossomatídeos;
- A visualização simultânea de transferrina e de flotilina na região do citóstoma/citofaringe e o uso de drogas que atuam sobre o colesterol inibindo a captação de transferrina, corroboram a hipótese de endocitose caveolar de transferrina, via citóstoma em formas epimastigotas do *T. cruzi*;
- Nossos resultados nos permitiram propor um novo modelo esquemático para a endocitose e exocitose do *T. cruzi*.



REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aderem A, Underhill DM 1999. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 17: 593-623.
- Ahmed SN, Brown DA, London E 1997. On the origin of sphingolipid/cholesterol-rich detergent-insoluble cell membranes: physiological concentrations of cholesterol and sphingolipid induce formation of a detergent-insoluble, liquid-ordered lipid phase in model membranes. *Biochemistry* 36: 10944-10953.
- Allen CL, Goulding D, Field MC 2003. Clathrin-mediated endocytosis is essential in *Trypanosoma brucei*. *Embo J* 22: 4991-5002.
- Almeida PF, Vaz WL, Thompson TE 2005. Lipid diffusion, free area, and molecular dynamics simulations. *Biophys J* 88: 4434-4438.
- Anderson RG 1998. The caveolae membrane system. *Annu Rev Biochem* 67: 199-225.
- Anderson RG, Jacobson K 2002. A role for lipid shells in targeting proteins to caveolae, rafts, and other lipid domains. *Science* 296: 1821-1825.
- Anderson RG, Kamen BA, Rothberg KG, Lacey SW 1992. Potocytosis: sequestration and transport of small molecules by caveolae. *Science* 255: 410-411.
- Aridor M, Traub LM 2002. Cargo selection in vesicular transport: the making and breaking of a coat. *Traffic* 3: 537-546.
- Balber AE 1990. The pellicle and the membrane of the flagellum, flagellar adhesion zone, and flagellar pocket: functionally discrete surface domains of the bloodstream form of African trypanosomes. *Crit Rev Immunol* 10: 177-201.
- Bastin P, Stephan A, Raper J, Saint-Remy JM, Opperdoes FR, Courtoy PJ 1996. An M(r) 145,000 low-density lipoprotein (LDL)-binding protein is conserved throughout the Kinetoplastida order. *Mol Biochem Parasitol* 76: 43-56.
- Benlimame N, Le PU, Nabi IR 1998. Localization of autocrine motility factor receptor to caveolae and clathrin-independent internalization of its ligand to smooth endoplasmic reticulum. *Mol Biol Cell*. 9: 1773-1786.
- Besteiro S, Coombs GH, Mottram JC 2006. The SNARE protein family of *Leishmania major*. *BMC Genomics* 7: 250.
- Bickel PE, Scherer PE, Schnitzer JE, Oh P, Lisanti MP, Lodish HF 1997. Flotillin and epidermal surface antigen define a new family of caveolae-associated integral membrane proteins. *J Biol Chem* 272: 13793-13802.
- Black S, Vandeweerd V 1989. Serum lipoproteins are required for multiplication of *Trypanosoma brucei brucei* under axenic culture conditions. *Mol Biochem Parasitol* 37: 65-72.

- Borst P, Fairlamb AH 1998. Surface receptors and transporters of *Trypanosoma brucei*. *Annu Rev Microbiol* 52: 745-778.
- Brickman MJ, Cook JM, Balber AE 1995. Low temperature reversibly inhibits transport from tubular endosomes to a perinuclear, acidic compartment in African trypanosomes. *J Cell Sci* 108 (Pt 11): 3611-3621.
- Brodsky FM, Chen CY, Knuehl C, Towler MC, Wakeham DE 2001. Biological basket weaving: formation and function of clathrin-coated vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol* 17: 517-568.
- Brown DA, Rose JK 1992. Sorting of GPI-anchored proteins to glycolipid-enriched membrane subdomains during transport to the apical cell surface. *Cell* 68: 533-544.
- Brown RE 1998. Sphingolipid organization in biomembranes: what physical studies of model membranes reveal. *J Cell Sci* 111 (Pt 1): 1-9.
- Carter WG, Hakomori S 1981. A new cell surface, detergent-insoluble glycoprotein matrix of human and hamster fibroblasts. The role of disulfide bonds in stabilization of the matrix. *J Biol Chem* 256: 6953-6960.
- Chimini G, Chavrier P 2000. Function of Rho family proteins in actin dynamics during phagocytosis and engulfment. *Nat Cell Biol* 2: E191-196.
- Chinnapen DJ, Chinnapen H, Saslowsky D, Lencer WI 2007. Rafting with cholera toxin: endocytosis and trafficking from plasma membrane to ER. *FEMS Microbiol Lett* 266: 129-137.
- Clayton C, Hausler T, Blattner J 1995. Protein trafficking in kinetoplastid protozoa. *Microbiol Rev* 59: 325-344.
- Collins BM, McCoy AJ, Kent HM, Evans PR, Owen DJ 2002. Molecular architecture and functional model of the endocytic AP2 complex. *Cell* 109: 523-535.
- Conner SD, Schmid SL 2002. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 156: 921-929.
- Conner SD, Schmid SL 2003 a. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422: 37-44.
- Conner SD, Schmid SL 2003 b. Differential requirements for AP-2 in clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 162: 773-779.
- Conner SD, Schroter T, Schmid SL 2003. AAK1-mediated micro2 phosphorylation is stimulated by assembled clathrin. *Traffic* 4: 885-890.

- Coppens I, Opperdoes FR, Courtoy PJ, Baudhuin P 1987. Receptor-mediated endocytosis in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. J Protozool 34: 465-473.
- Coppens I, Baudhuin P, Opperdoes FR, Courtoy PJ 1988. Receptors for the host low density lipoproteins on the hemoflagellate *Trypanosoma brucei*: purification and involvement in the growth of the parasite. Proc Natl Acad Sci U S A 85: 6753-6757.
- Cosson P, Letourneur F 1997. Coatamer (COPI)-coated vesicles: role in intracellular transport and protein sorting. Curr Opin Cell Biol 9: 484-487.
- Crowther RA, Finch JT, Pearse BM 1976. On the structure of coated vesicles. J Mol Biol 103: 785-798.
- de Almeida RF, Fedorov A, Prieto M 2003. Sphingomyelin/phosphatidylcholine/cholesterol phase diagram: boundaries and composition of lipid rafts. Biophys J 85: 2406-2416.
- de Figueiredo RC, Soares MJ 2000. Low temperature blocks fluid-phase pinocytosis and receptor-mediated endocytosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Parasitol Res 86: 413-418.
- de Souza W 2002. Special organelles of some pathogenic protozoa. Parasitol Res 88: 1013-1025.
- de Souza W, de Carvalho TU, Benchimol M, Chiari E 1978. *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. Exp Parasitol 45: 101-115.
- Denny PW, Field MC, Smith DF 2001. GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. FEBS Lett 491: 148-153.
- Denny PW, Smith DF 2004. Rafts and sphingolipid biosynthesis in the kinetoplastid parasitic protozoa. Mol Microbiol 53: 725-733.
- Denny PW, Morgan GW, Field MC, Smith DF 2005. *Leishmania major*: clathrin and adaptin complexes of an intra-cellular parasite. Exp Parasitol 109: 33-37.
- Dermine JF, Duclos S, Garin J, St-Louis F, Rea S, Parton RG, Desjardins M 2001. Flotillin-1-enriched lipid raft domains accumulate on maturing phagosomes. J Biol Chem 276: 18507-18512.
- Dietrich C, Bagatolli LA, Volovyk ZN, Thompson NL, Levi M, Jacobson K, Gratton E 2001. Lipid rafts reconstituted in model membranes. Biophys J 80: 1417-1428.
- Drab M, Verkade P, Elger M, Kasper M, Lohn M, Lauterbach B, Menne J, Lindschau C, Mende F, Luft FC, Schedl A, Haller H, Kurzchalia TV 2001. Loss of caveolae,

- vascular dysfunction, and pulmonary defects in caveolin-1 gene-disrupted mice. *Science* 293: 2449-2452.
- Dupree P, Parton RG, Raposo G, Kurzchalia TV, Simons K 1993. Caveolae and sorting in the trans-Golgi network of epithelial cells. *EMBO J* 12: 1597-1605.
- Duszenko M, Ivanov IE, Ferguson MA, Plesken H, Cross GA 1988. Intracellular transport of a variant surface glycoprotein in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 106: 77-86.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN, Ghedin E, Worthey EA, Delcher AL, Blandin G, Westenberger SJ, Caler E, Cerqueira GC, Branche C, Haas B, Anupama A, Arner E, Aslund L, Attipoe P, Bontempi E, Bringaud F, Burton P, Cadag E, Campbell DA, Carrington M, Crabtree J, Darban H, da Silveira JF, de Jong P, Edwards K, Englund PT, Fazelina G, Feldblyum T, Ferella M, Frasch AC, Gull K, Horn D, Hou L, Huang Y, Kindlund E, Klingbeil M, Kluge S, Koo H, Lacerda D, Levin MJ, Lorenzi H, Louie T, Machado CR, McCulloch R, McKenna A, Mizuno Y, Mottram JC, Nelson S, Ochaya S, Osoegawa K, Pai G, Parsons M, Pentony M, Pettersson U, Pop M, Ramirez JL, Rinta J, Robertson L, Salzberg SL, Sanchez DO, Seyler A, Sharma R, Shetty J, Simpson AJ, Sisk E, Tammi MT, Tarleton R, Teixeira S, Van Aken S, Vogt C, Ward PN, Wickstead B, Wortman J, White O, Fraser CM, Stuart KD, Andersson B 2005. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409-415.
- Fadok VA, Chimini G 2001. The phagocytosis of apoptotic cells. *Semin Immunol* 13: 365-372.
- Feigenson GW, Buboltz JT 2001. Ternary phase diagram of dipalmitoyl-PC/dilauroyl-PC/cholesterol: nanoscopic domain formation driven by cholesterol. *Biophys J* 80: 2775-2788.
- Field H, Farjah M, Pal A, Gull K, Field MC 1998. Complexity of trypanosomatid endocytosis pathways revealed by Rab4 and Rab5 isoforms in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem* 273: 32102-32110.
- Field H, Sherwin T, Smith AC, Gull K, Field MC 2000. Cell-cycle and developmental regulation of TbRAB31 localisation, a GTP-locked Rab protein from *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol* 106: 21-35.
- Field MC, Natesan SK, Gabernet-Castello C, Koumandou VL 2007. Intracellular trafficking in the trypanosomatids. *Traffic* 8: 629-639.

- Figueiredo RC, Rosa DS, Gomes YM, Nakasawa M, Soares MJ 2004. Reserosome: an endocytic compartment in epimastigote forms of the protozoan *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae). Correlation between endocytosis of nutrients and cell differentiation. *Parasitol* 129: 431-438.
- Fingerhut A, von Figura K, Honing S 2001. Binding of AP2 to sorting signals is modulated by AP2 phosphorylation. *J Biol Chem* 276: 5476-5482.
- Ford MG, Mills IG, Peter BJ, Vallis Y, Praefcke GJ, Evans PR, McMahon HT 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* 419: 361-366.
- Fotin A, Cheng Y, Sliz P, Grigorieff N, Harrison SC, Kirchhausen T, Walz T 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* 432: 573-579.
- Fujimoto T, Nakade S, Miyawaki A, Mikoshiba K, Ogawa K 1992. Localization of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-like protein in plasmalemmal caveolae. *J Cell Biol* 119: 1507-1513.
- Ghedin E, Debrabant A, Engel JC, Dwyer DM 2001. Secretory and endocytic pathways converge in a dynamic endosomal system in a primitive protozoan. *Traffic* 2: 175-188.
- Glebov OO, Bright NA, Nichols BJ 2006. Flotillin-1 defines a clathrin-independent endocytic pathway in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8: 46-54.
- Glennay JR, Jr. 1989. Tyrosine phosphorylation of a 22-kDa protein is correlated with transformation by Rous sarcoma virus. *J Biol Chem* 264: 20163-20166.
- Grab DJ, Wells CW, Shaw MK, Webster P, Russo DC 1992. Endocytosed transferrin in African trypanosomes is delivered to lysosomes and may not be recycled. *Eur J Cell Biol* 59: 398-404.
- Gray NW, Fourgeaud L, Huang B, Chen J, Cao H, Oswald BJ, Hemar A, McNiven MA 2003. Dynamin 3 is a component of the postsynapse, where it interacts with mGluR5 and Homer. *Curr Biol* 13: 510-515.
- Griffiths G, Gruenberg J 1991. The arguments for pre-existing early and late endosomes. *Trends Cell Biol* 1: 5-9.
- Grunfelder CG, Engstler M, Weise F, Schwarz H, Stierhof YD, Morgan GW, Field MC, Overath P 2003. Endocytosis of a glycosylphosphatidylinositol-anchored protein via clathrin-coated vesicles, sorting by default in endosomes, and exocytosis via RAB11-positive carriers. *Mol Biol Cell* 14: 2029-2040.

- Hajduk SL, Moore DR, Vasudevacharya J, Siqueira H, Torri AF, Tytler EM, Esko JD 1989. Lysis of *Trypanosoma brucei* by a toxic subspecies of human high density lipoprotein. *J Biol Chem* 264: 5210-5217.
- Hall A, Nobes CD 2000. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 355: 965-970.
- Hanada K 2003. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1632: 16-30.
- Hancock JF 2006. Lipid rafts: contentious only from simplistic standpoints. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 456-462.
- Hanzal-Bayer MF, Hancock JF 2007. Lipid rafts and membrane traffic. *FEBS Lett.* 581: 2098-2104.
- Heuser JE, Anderson RG 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol.* 108: 389-400.
- Hide G, Gray A, Harrison CM, Tait A 1989. Identification of an epidermal growth factor receptor homologue in trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol* 36: 51-59.
- Hirst J, Bright NA, Rous B, Robinson MS 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* 10: 2787-2802.
- Hsueh YW, Gilbert K, Trandum C, Zuckermann M, Thewalt J 2005. The effect of ergosterol on dipalmitoylphosphatidylcholine bilayers: a deuterium NMR and calorimetric study. *Biophys J* 88: 1799-1808.
- Huang KM, D'Hondt K, Riezman H, Lemmon SK 1999. Clathrin functions in the absence of heterotetrameric adaptors and AP180-related proteins in yeast. *EMBO J* 18: 3897-3908.
- Hurley JH, Meyer T 2001. Subcellular targeting by membrane lipids. *Curr Opin Cell Biol* 13: 146-152.
- Ingerman E, Meeusen S, Devay R, Nunnari J 2007. *In vitro* assays for mitochondrial fusion and division. *Methods Cell Biol* 80: 707-720.
- Isobe T, Holmes EC, Rudenko G 2003. The transferrin receptor genes of *Trypanosoma equiperdum* are less diverse in their transferrin binding site than those of the broad-host range *Trypanosoma brucei*. *J Mol Evol* 56: 377-386.
- Kahya N, Brown DA, Schwille P 2005. Raft partitioning and dynamic behavior of human placental alkaline phosphatase in giant unilamellar vesicles. *Biochemistry* 44: 7479-7489.

- Kee SH, Cho EJ, Song JW, Park KS, Baek LJ, Song KJ 2004. Effects of endocytosis inhibitory drugs on rubella virus entry into VeroE6 cells. *Microbiol Immunol*. 48: 823-829.
- Kirchhausen T 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15: 705-732.
- Kirchhausen T 2000. Clathrin. *Annu Rev Biochem* 69: 699-727.
- Kirchhausen T, Harrison SC 1981. Protein organization in clathrin trimers. *Cell* 23: 755-761.
- Kirkham M, Fujita A, Chadda R, Nixon SJ, Kurzchalia TV, Sharma DK, Pagano RE, Hancock JF, Mayor S, Parton RG 2005. Ultrastructural identification of uncoated caveolin-independent early endocytic vehicles. *J Cell Biol* 168: 465-476.
- Kruth HS, Jones NL, Huang W, Zhao B, Ishii I, Chang J, Combs CA, Malide D, Zhang WY 2005. Macropinocytosis is the endocytic pathway that mediates macrophage foam cell formation with native low density lipoprotein. *J Biol Chem* 280: 2352-2360.
- Landfear SM, Ignatushchenko M 2001. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol* 115: 1-17.
- Langreth SG, Balber AE 1975. Protein uptake and digestion in bloodstream and culture forms of *Trypanosoma brucei*. *J Protozool* 22: 40-53.
- Larkin JM, Brown MS, Goldstein JL, Anderson RG 1983. Depletion of intracellular potassium arrests coated pit formation and receptor-mediated endocytosis in fibroblasts. *Cell*. 33: 273-285.
- Le Roy C, Wrana JL 2005. Signaling and endocytosis: a team effort for cell migration. *Dev Cell* 9: 167-168.
- Ligtenberg MJ, Bitter W, Kieft R, Steverding D, Janssen H, Calafat J, Borst P 1994. Reconstitution of a surface transferrin binding complex in insect form *Trypanosoma brucei*. *EMBO J* 13: 2565-2573.
- Lima MF, Villalta F 1990. *Trypanosoma cruzi* receptors for human transferrin and their role. *Mol Biochem Parasitol* 38: 245-252.
- Manes S, Mira E, Gomez-Mouton C, Lacalle RA, Keller P, Labrador JP, Martinez AC 1999. Membrane raft microdomains mediate front-rear polarity in migrating cells. *EMBO J* 18: 6211-6220.
- Marsh M, McMahon HT 1999. The structural era of endocytosis. *Science* 285: 215-220.

- Mayor S, Pagano RE 2007. Pathways of clathrin-independent endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*.
- McMahon HT 1999. Endocytosis: an assembly protein for clathrin cages. *Curr Biol* 9: R332-335.
- Mellman I, Steinman RM 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106: 255-258.
- Miaczynska M, Zerial M 2002. Mosaic organization of the endocytic pathway. *Exp Cell Res* 272: 8-14.
- Milder R, Deane MP 1969. The cytostome of *Trypanosoma cruzi* and *T. conorhini*. *J Protozool* 16: 730-737.
- Mineo C, Anderson RG 2001. Potocytosis. Robert Feulgen Lecture. *Histochem Cell Biol* 116: 109-118.
- Monier S, Parton RG, Vogel F, Behlke J, Henske A, Kurzchalia TV 1995. VIP21-caveolin, a membrane protein constituent of the caveolar coat, oligomerizes *in vivo* and *in vitro*. *Mol Biol Cell* 6: 911-927.
- Moreno-Altamirano MM, Aguilar-Carmona I, Sanchez-Garcia FJ 2007. Expression of GM1, a marker of lipid rafts, defines two subsets of human monocytes with differential endocytic capacity and lipopolysaccharide responsiveness. *Immunology* 120: 536-543.
- Morgan GW, Allen CL, Jeffries TR, Hollinshead M, Field MC 2001. Developmental and morphological regulation of clathrin-mediated endocytosis in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Sci* 114: 2605-2615.
- Morgan GW, Hall BS, Denny PW, Carrington M, Field MC 2002 a. The kinetoplastida endocytic apparatus. Part I: a dynamic system for nutrition and evasion of host defences. *Trends Parasitol* 18: 491-496.
- Morgan GW, Hall BS, Denny PW, Field MC, Carrington M 2002 b. The endocytic apparatus of the kinetoplastida. Part II: machinery and components of the system. *Trends Parasitol* 18: 540-546.
- Morrow IC, Rea S, Martin S, Prior IA, Prohaska R, Hancock JF, James DE, Parton RG 2002. Flotillin-1/reggie-2 traffics to surface raft domains via a novel golgi-independent pathway. Identification of a novel membrane targeting domain and a role for palmitoylation. *J Biol Chem* 277: 48834-48841.
- Mortara RA 1989. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. *J Protozool* 36: 8-13.

- Mundy DI, Machleidt T, Ying YS, Anderson RG, Bloom GS 2002. Dual control of caveolar membrane traffic by microtubules and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci.* 115: 4327-4339.
- Murata M, Peranen J, Schreiner R, Wieland F, Kurzchalia TV, Simons K 1995. VIP21/caveolin is a cholesterol-binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 10339-10343.
- Murphy RF 1991. Maturation models for endosome and lysosome biogenesis. *Trends Cell Biol* 1: 77-82.
- Nabi IR, Le PU 2003. Caveolae/raft-dependent endocytosis. *J Cell Biol* 161: 673-677.
- Nakahata N, Ohkubo S 2003. [Lipid rafts and their analytical methods]. *Nippon Yakurigaku Zasshi* 122: 419-425.
- Nakata T, Takemura R, Hirokawa N 1993. A novel member of the dynamin family of GTP-binding proteins is expressed specifically in the testis. *J Cell Sci* 105 (Pt 1): 1-5.
- Naslavsky N, Weigert R, Donaldson JG 2004. Characterization of a nonclathrin endocytic pathway: membrane cargo and lipid requirements. *Mol Biol Cell* 15: 3542-3552.
- Nichols BJ, Lippincott-Schwartz J 2001. Endocytosis without clathrin coats. *Trends Cell Biol* 11: 406-412.
- Nichols BJ 2002. A distinct class of endosome mediates clathrin-independent endocytosis to the Golgi complex. *Nat Cell Biol* 4: 374-378.
- Ning Y, Buranda T, Hudson LG 2007. Activated epidermal growth factor receptor induces integrin alpha2 internalization via caveolae/raft-dependent endocytic pathway. *J Biol Chem* 282: 6380-6387.
- Nolan DP, Jackson DG, Biggs MJ, Brabazon ED, Pays A, Van Laethem F, Paturiaux-Hanocq F, Elliott JF, Voorheis HP, Pays E 2000. Characterization of a novel alanine-rich protein located in surface microdomains in *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 275: 4072-4080.
- Norbury CC 2006. Drinking a lot is good for dendritic cells. *Immunology* 117: 443-451.
- Nguyen DH, Hildreth JE 2000. Evidence for budding of human immunodeficiency virus type 1 selectively from glycolipid-enriched membrane lipid rafts. *J Virol.* 74: 3264-3272.
- Okada Y, Mugnai G, Bremer EG, Hakomori S 1984. Glycosphingolipids in detergent-insoluble substrate attachment matrix (DISAM) prepared from substrate

- attachment material (SAM). Their possible role in regulating cell adhesion. *Exp Cell Res* 155: 448-456.
- Olusanya O, Andrews PD, Swedlow JR, Smythe E 2001. Phosphorylation of threonine 156 of the mu2 subunit of the AP2 complex is essential for endocytosis in vitro and in vivo. *Curr Biol* 11: 896-900.
- Orlandi PA, Fishman PH 1998. Filipin-dependent inhibition of cholera toxin: evidence for toxin internalization and activation through caveolae-like domains. *J Cell Biol.* 141: 905-915.
- Overath P, Stierhof YD, Wiese M 1997. Endocytosis and secretion in trypanosomatid parasites tumultuous traffic in a pocket. *Trends Cell Biol* 7: 27-33.
- Palade GE 1953. Fine Structure of Blood Capillaries. *Journal of Applied Physics* 24: 1424-1424.
- Pang H, Le PU, Nabi IR 2004. Ganglioside GM1 levels are a determinant of the extent of caveolae/raft-dependent endocytosis of cholera toxin to the Golgi apparatus. *J Cell Sci* 117: 1421-1430.
- Pauloin A, Thuriéau C, Jolles P 1988. Cyclic phosphorylation/dephosphorylation cascade in bovine brain coated vesicles. *Biochim Biophys Acta* 968: 91-95.
- Pearse BM 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol* 97: 93-98.
- Pelkmans L, Kartenbeck J, Helenius A 2001. Caveolar endocytosis of simian virus 40 reveals a new two-step vesicular-transport pathway to the ER. *Nat Cell Biol* 3: 473-483.
- Pelkmans L, Helenius A 2002. Endocytosis via caveolae. *Traffic* 3: 311-320.
- Pelkmans L, Burli T, Zerial M, Helenius A 2004. Caveolin-stabilized membrane domains as multifunctional transport and sorting devices in endocytic membrane traffic. *Cell* 118: 767-780.
- Porto-Carreiro I, Attias M, Miranda K, De Souza W, Cunha-e-Silva N 2000. *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytosome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. *Eur J Cell Biol* 79: 858-869.
- Praefcke GJ, McMahon HT 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5: 133-147.
- Ramoino P, Fronte P, Fato M, Beltrame F, Diaspro A 2002. Mapping cholesteryl ester analogue uptake and intracellular flow in Paramecium by confocal fluorescence microscopy. *J Microsc.* 208: 167-176.

- Razani B, Woodman SE, Lisanti MP 2002. Caveolae: from cell biology to animal physiology. *Pharmacol Rev* 54: 431-467.
- Ricotta D, Conner SD, Schmid SL, von Figura K, Honing S 2002. Phosphorylation of the AP2 mu subunit by AAK1 mediates high affinity binding to membrane protein sorting signals. *J Cell Biol* 156: 791-795.
- Rietveld A, Simons K 1998. The differential miscibility of lipids as the basis for the formation of functional membrane rafts. *Biochim Biophys Acta* 1376: 467-479.
- Robinson MS, Bonifacino JS 2001. Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* 13: 444-453.
- Rothberg KG, Heuser JE, Donzell WC, Ying YS, Glenney JR, Anderson RG 1992. Caveolin, a protein component of caveolae membrane coats. *Cell* 68: 673-682.
- Russell DG, Xu S, Chakraborty P 1992. Intracellular trafficking and the parasitophorous vacuole of *Leishmania mexicana*-infected macrophages. *J Cell Sci* 103 (Pt 4): 1193-1210.
- Salmon D, Geuskens M, Hanocq F, Hanocq-Quertier J, Nolan D, Ruben L, Pays E 1994. A novel heterodimeric transferrin receptor encoded by a pair of VSG expression site-associated genes in *T. brucei*. *Cell* 78: 75-86.
- Sant'Anna C, de Souza W, Cunha-e-Silva N 2004. Biogenesis of the reservosomes of *Trypanosoma cruzi*. *Microsc Microanal* 10: 637-646.
- Sargiacomo M, Scherer PE, Tang Z, Kubler E, Song KS, Sanders MC, Lisanti MP 1995. Oligomeric structure of caveolin: implications for caveolae membrane organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 9407-9411.
- Schekman R, Orci L 1996. Coat proteins and vesicle budding. *Science* 271: 1526-1533.
- Scherer PE, Okamoto T, Chun M, Nishimoto I, Lodish HF, Lisanti MP 1996. Identification, sequence, and expression of caveolin-2 defines a caveolin gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 131-135.
- Scherer PE, Lewis RY, Volonte D, Engelman JA, Galbiati F, Couet J, Kohtz DS, van Donselaar E, Peters P, Lisanti MP 1997. Cell-type and tissue-specific expression of caveolin-2. Caveolins 1 and 2 co-localize and form a stable hetero-oligomeric complex in vivo. *J Biol Chem* 272: 29337-29346.
- Schnitzer JE, Oh P, Pinney E, Allard J 1994. Filipin-sensitive caveolae-mediated transport in endothelium: reduced transcytosis, scavenger endocytosis, and capillary permeability of select macromolecules. *J Cell Biol* 127: 1217-1232.

- Schnitzer JE, Liu J, Oh P 1995. Endothelial Caveolae Have the Molecular-Transport Machinery for Vesicle Budding, Docking, and Fusion Including Vamp, Nsf, Snap, Annexins, and Gtpases. *Journal of Biological Chemistry* 270: 14399-14404.
- Schroeder R, London E, Brown D 1994. Interactions between saturated acyl chains confer detergent resistance on lipids and glycosylphosphatidylinositol (GPI)-anchored proteins: GPI-anchored proteins in liposomes and cells show similar behavior. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 12130-12134.
- Seabra MC, Mules EH, Hume AN 2002. Rab GTPases, intracellular traffic and disease. *Trends Mol Med* 8: 23-30.
- Seveau S, Bierne H, Giroux S, Prevost MC, Cossart P 2004. Role of lipid rafts in E-cadherin-- and HGF-R/Met--mediated entry of *Listeria monocytogenes* into host cells. *J Cell Biol.* 166: 743-753.
- Sever S, Damke H, Schmid SL 2000. Garrotes, springs, ratchets, and whips: putting dynamin models to the test. *Traffic* 1: 385-392.
- Seyfang A, Mecke D, Duszenko M 1990. Degradation, recycling, and shedding of *Trypanosoma brucei* variant surface glycoprotein. *J Protozool* 37: 546-552.
- Shapiro SZ, Webster P 1989. Coated vesicles from the protozoan parasite *Trypanosoma brucei*: purification and characterization. *J Protozool* 36: 344-349.
- Silvius JR 2003. Role of cholesterol in lipid raft formation: lessons from lipid model systems. *Biochim Biophys Acta* 1610: 174-183.
- Simons K, van Meer G 1988. Lipid sorting in epithelial cells. *Biochemistry* 27: 6197-6202.
- Simons K, Ikonen E 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 387: 569-572.
- Simons K, Vaz WL 2004. Model systems, lipid rafts, and cell membranes. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 33: 269-295.
- Simpson F, Peden AA, Christopoulou L, Robinson MS 1997. Characterization of the adaptor-related protein complex, AP-3. *J Cell Biol* 137: 835-845.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP 1999. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol Cell Biol* 19: 7289-7304.
- Soares MJ, de Souza W 1991. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 77: 461-468.
- Soares MJ, Souto-Padron T, De Souza W 1992. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 102 (Pt 1): 157-167.

- Soldati T, Schliwa M 2006. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 897-908.
- Song KS, Scherer PE, Tang Z, Okamoto T, Li S, Chafel M, Chu C, Kohtz DS, Lisanti MP 1996. Expression of caveolin-3 in skeletal, cardiac, and smooth muscle cells. Caveolin-3 is a component of the sarcolemma and co-fractionates with dystrophin and dystrophin-associated glycoproteins. *J Biol Chem* 271: 15160-15165.
- Sontag JM, Fykse EM, Ushkaryov Y, Liu JP, Robinson PJ, Sudhof TC 1994. Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J Biol Chem* 269: 4547-4554.
- Springer S, Spang A, Schekman R 1999. A primer on vesicle budding. *Cell* 97: 145-148.
- Stack SP, Stein DA, Landfear SM 1990. Structural isoforms of a membrane transport protein from *Leishmania enriettii*. *Mol Cell Biol* 10: 6785-6790.
- Stahl A, Mueller BM 1995. The urokinase-type plasminogen activator receptor, a GPI-linked protein, is localized in caveolae. *J Cell Biol* 129: 335-344.
- Steele-Mortimer O, Knodler LA, Finlay BB 2000. Poisons, ruffles and rockets: bacterial pathogens and the host cell cytoskeleton. *Traffic* 1: 107-118.
- Steverding D, Stierhof YD, Chaudhri M, Ligtenberg M, Schell D, Beck-Sickingher AG, Overath P 1994. ESAG 6 and 7 products of *Trypanosoma brucei* form a transferrin binding protein complex. *Eur J Cell Biol* 64: 78-87.
- Steverding D, Stierhof YD, Fuchs H, Tauber R, Overath P 1995. Transferrin-binding protein complex is the receptor for transferrin uptake in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 131: 1173-1182.
- Steverding D, Overath P 1996. *Trypanosoma brucei* with an active metacyclic variant surface gene expression site expresses a transferrin receptor derived from esag6 and esag7. *Mol Biochem Parasitol* 78: 285-288.
- Steverding D 2000. The transferrin receptor of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol Int.* 2000 48:191-198.
- Stowell MH, Marks B, Wigge P, McMahon HT 1999. Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* 1: 27-32.
- Sutterwala SS, Creswell CH, Sanyal S, Menon AK, Bangs JD 2007. De novo sphingolipid synthesis is essential for viability, but not for transport of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins, in African trypanosomes. *Eukaryot Cell* 6: 454-464.

- Sweitzer SM, Hinshaw JE 1998. Dynamin undergoes a GTP-dependent conformational change causing vesiculation. *Cell* 93: 1021-1029.
- Tebar F, Bohlander SK, Sorkin A 1999. Clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) protein: localization in endocytic-coated pits, interactions with clathrin, and the impact of overexpression on clathrin-mediated traffic. *Mol Biol Cell* 10: 2687-2702.
- Thomsen P, Roepstorff K, Stahlhut M, van Deurs B 2002. Caveolae are highly immobile plasma membrane microdomains, which are not involved in constitutive endocytic trafficking. *Mol Biol Cell* 13: 238-250.
- Uemura A, Watarai S, Kushi Y, Kasama T, Ohnishi Y, Kodama H 2004. Isolation and characterization of gangliosides from *Trypanosoma brucei*. *J Parasitol* 90: 123-127.
- Umeda A, Meyerholz A, Ungewickell E 2000. Identification of the universal cofactor (auxilin 2) in clathrin coat dissociation. *Eur J Cell Biol* 79: 336-342.
- Ungewickell E, Branton D 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature* 289: 420-422.
- Ungewickell EJ, Hinrichsen L 2007. Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Curr Opin Cell Biol*.
- Vatarunakamura 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: 227-230.
- Veatch SL, Polozov IV, Gawrisch K, Keller SL 2004. Liquid domains in vesicles investigated by NMR and fluorescence microscopy. *Biophys J* 86: 2910-2922.
- Veatch SL, Keller SL 2005. Miscibility phase diagrams of giant vesicles containing sphingomyelin. *Phys Rev Lett* 94: 148101/1-148101/4.
- Vickerman K 1969. On the surface coat and flagellar adhesion in trypanosomes. *J Cell Sci* 5: 163-193.
- Vincent JP 2003. Membranes, trafficking, and signaling during animal development. *Cell* 112: 745-749.
- Volonte D, Galbiati F, Li S, Nishiyama K, Okamoto T, Lisanti MP 1999. Flotillins/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form a hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo. Characterization and epitope-mapping of a novel flotillin-1 monoclonal antibody probe. *J Biol Chem* 274: 12702-12709.

- Xu Y, Henning RH, van der Want JJ, van Buiten A, van Gilst WH, Buikema H 2007. Disruption of endothelial caveolae is associated with impairment of both NO- as well as EDHF in acetylcholine-induced relaxation depending on their relative contribution in different vascular beds. *Life Sci.* 80:1678-1685.
- Way M, Parton RG 1995. M-caveolin, a muscle-specific caveolin-related protein. *FEBS Lett* 376: 108-112.
- Webster P, Fish WR 1989. Endocytosis by African trypanosomes. II. Occurrence in different life-cycle stages and intracellular sorting. *Eur J Cell Biol* 49: 303-310.
- Webster P, Grab DJ 1988. Intracellular colocalization of variant surface glycoprotein and transferrin-gold in *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol* 106: 279-288.
- Webster P, Shapiro SZ 1990. *Trypanosoma brucei*: a membrane-associated protein in coated endocytotic vesicles. *Exp Parasitol* 70: 154-163.
- Webster P, Russell DG 1993. The flagellar pocket of trypanosomatids. *Parasitol Today* 9: 201-206.
- Wilde A, Brodsky FM 1996. In vivo phosphorylation of adaptors regulates their interaction with clathrin. *J Cell Biol* 135: 635-645.
- Williams TM, Lisanti MP 2004. The Caveolin genes: from cell biology to medicine. *Ann Med* 36: 584-595.
- Wilson BS, Steinberg SL, Liederman K, Pfeiffer JR, Surviladze Z, Zhang J, Samelson LE, Yang LH, Kotula PG, Oliver JM 2004. Markers for detergent-resistant lipid rafts occupy distinct and dynamic domains in native membranes. *Mol Biol Cell* 15: 2580-2592.
- www.dpd.cdc.gov/dpdx 2007. Center for disease control and prevention.
- Yoneyama KA, Tanaka AK, Silveira TG, Takahashi HK, Straus AH 2006. Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. *J Lipid Res* 47: 2171-2178.
- Yuan C, Furlong J, Burgos P, Johnston LJ 2002. The size of lipid rafts: an atomic force microscopy study of ganglioside GM1 domains in sphingomyelin/DOPC/cholesterol membranes. *Biophys J* 82: 2526-2535.