



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Cintia Fernandes de Souza

Análise de uma heme oxigenase funcional em *Trypanosoma cruzi*

Rio de Janeiro

2011

Cintia Fernandes de Souza

Análise de uma heme oxigenase funcional em *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Marcia Cristina Paes

Co-orientadora: Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Rio de Janeiro

2011

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

S731 Souza, Cíntia Fernandes de.
Análise de uma heme oxigenase funcional em *Trypanosoma cruzi* / Cíntia Fernandes de Souza. - 2011.
130 f. : il.

Orientadora: Márcia Cristina Paes.

Coorientadora: Marsen Garcia Pinto Coelho.

Tese (Doutorado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Heme - Teses. 3. Heme oxigenase - Análise - Teses. I. Paes, Márcia Cristina. II. Coelho, Marsen Garcia Pinto. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 576.893.161.13

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Cintia Fernandes de Souza

Análise de uma heme oxigenase funcional em *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 21 de fevereiro de 2011.

Orientadores:

Prof.^a Dra. Marcia Cristina Paes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Maria Augusta Borges Cursino de Freitas Arruda
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Georgia Correa Atella
Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ

Prof.^a Dra. Clarissa Menezes Maya Monteiro
Fundação Oswaldo Cruz - IOC

Prof.^a Dra. Marcia Cristina Paes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2011

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, por estarem sempre do meu lado, me dando amor, carinho e tudo mais que eu preciso. À todos da minha família, que são muito importantes para mim e que me ajudam mesmo sem saber. Amo vocês!

À minha orientadora, Marcia, por todos esses anos juntas, por continuar acreditando em mim...por ser também uma grande amiga. Obrigada por tudo!

À prof^ª Marsen, pela co-orientação, por ter sido fundamental no meu ingresso ao doutorado, e por toda a ajuda oferecida em todos esses anos de laboratório.

À prof^ª Kátia Sabino, por ter aceitado ser minha referee, e pela atenciosa revisão desta tese.

Ao prof Richard Hemmi Valente, grande colaborador desta tese, meu quase orientador também, que esteve tão presente e abriu as portas do seu laboratório para mim. A todos os integrantes desse laboratório que me ajudaram de alguma forma na realização deste trabalho.

Aos professores Rafael Mesquita e Rubem Menna-Barreto, por serem importantes colaboradores dessa tese, emprestando suas expertises para o enriquecimento do trabalho.

Aos meus amigos do grupo “cruzi”, que estão sempre presentes na minha vida, dentro e fora do lab: Nat, grande amiga desde os tempos de faculdade, grande companheira de lab em todos os momentos; Maurício, amigo querido, que faz toda a diferença no dia a dia do lab, fazendo a gente morrer de rir; Gustavo, por ser o braço direito do grupo e sempre perguntar se a gente acha ou tem certeza; Jessica, minha aluna de iniciação científica e veterana do prêmio sem noção; Francis, por inserir seu vocabulário tão rico no nosso dia a dia; e Josias, o mais novo integrante do grupo. Adoro vocês!

À todos integrantes do laboratório 2, professor Sergio Dalmau (Pardal), os técnicos Beto, Paulinho (quem eu adoro perturbar) e Shirley (figuraa); e todos os alunos, Gleison (o implicante mais adorável), Thiaguinho, Wanderson, Fabi (jararadadá), Dani, Girlaine, Nathália, Mariana, Fernanda, Denilson, Rachel, pela convivência diária, por serem meus amigos, e pela ajuda direta ou indireta na realização desse trabalho. Adoro vocês! Obrigada por tudo!

Aos amigos do departamento, Amanda (amiga de todas as horas), Sandra, Davy, Tati, João Roberto, Santiago (sempre nos atualizando no youtube), Fred, Dudu, Rafael, Arhur, Aline.

Obrigada a todos pelo carinho e amizade. À todos os demais do departamento de bioquímica da UERJ.

Aos ex-integrantes do laboratório, que seguiram outros caminhos, mas continuam no meu coração, Cris, Lú, Pedrinho, Paty e Moniquete.

A todos os meus demais amigos, vocês são muito importantes na minha vida! Carlucha, Bia, Carol, Anna, Simone, Sabrina, Lú, Lia, Cherie, impossível citar todo mundo. Obrigada pela amizade, por me proporcionarem tantos momentos de alegria! Amo vocês! Amigos de faculdade, mestrado, apesar de não nos encontrarmos mais com tanta frequência, sei que podemos contar uns com os outros. Adoro vocês e espero que nossa amizade se mantenha sempre forte!

A todos que fizeram parte da minha vida todos esses anos e a todos aqueles que de alguma forma me ajudaram na realização desta tese. Muito obrigada!

RESUMO

SOUZA, Cintia Fernandes. *Análise de uma heme oxigenase funcional em Trypanosoma cruzi*. 2010. 130f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2011.

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas, transmitida através de insetos vetores triatomíneos durante a alimentação no hospedeiro vertebrado. Os triatomíneos ingerem numa única alimentação cerca de 10 mM de heme ligado à hemoglobina. O heme é uma importante molécula no metabolismo dos organismos. Um mecanismo intracelular importante no controle de sua homeostase é a degradação enzimática pela Heme Oxigenase (HO) formando biliverdina (Bv), monóxido de carbono e ferro. Como esta enzima não está presente no genoma de *T. cruzi*, esse trabalho tem por objetivo identificar uma atividade funcional de HO neste parasito, uma vez que dados do nosso laboratório mostram a presença de biliverdina nas incubações dessas células com heme. No presente trabalho testamos o efeito do SnPPIX (inibidor da HO-1), CoPPIX (indutor da HO-1) e Bv sobre a proliferação da forma epimastigota do parasito. A adição de SnPPIX diminuiu a proliferação do parasito na tanto na ausência quanto na presença de heme. Quando a Bv foi adicionada à cultura esse efeito foi revertido; a Bv aumenta a proliferação celular na presença de heme. Por outro lado, a adição de CoPPIX não interferiu na proliferação. Posteriormente, mostramos através da técnica de *immunoblotting*, utilizando anticorpo monoclonal contra a HO-1, um aumento da expressão de uma proteína em resposta ao heme. Diferentemente das HO-1 já descritas que possuem massa molecular de 32 kDa, a única banda reconhecida pelo anticorpo apresenta 45 kDa. Analisamos também a expressão da HO-1 na presença de CoPPIX, SnPPIX e biliverdina, e somente o CoPPIX foi capaz de modular os níveis de expressão da HO-1. A análise estrutural através da técnica de imunocitoquímica mostrou uma maior expressão da enzima na presença de heme, e que a HO-1 de *T. cruzi* pode ter mais de uma localização, apresentando marcação citoplasmática e glicossomal. A fim de investigar a sequência da HO-1 de *T. cruzi*, o DNA genômico foi extraído para amplificação por PCR do gene da HO-1 utilizando oligonucleotídeos desenhados no genoma de *T. cruzi*. Os dois pares de oligonucleotídeos utilizados não foram capazes de amplificar uma sequência equivalente a uma HO. Em seguida, utilizamos a técnica de imunoprecipitação, seguida de *immunoblotting*, com anticorpo anti-HO-1, com objetivo de concentrar a proteína alvo, e observamos um aumento significativo do imunocomplexo nas células tratadas com heme 300 µM, cerca de 2 vezes em relação ao controle. Dando seguimento à tentativa de identificação da HO-1 de *T. cruzi*, utilizamos a técnica de espectrometria de massa a partir de eletroforese unidimensional, que mostrou uma grande alteração do perfil protéico na presença de heme, mas futuros experimentos são necessários, como eletroforese 2D, para a identificação da proteína alvo.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Heme. Heme oxigenase-1.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is transmitted through triatomine vectors during their blood-meal on vertebrate host. These hematophagous insects ingest blood about 6 to 12 times its original weight, reaching in a single meal about 10 mM heme bound to hemoglobin. Heme (iron protoporphyrin IX) is an important molecule in metabolism of all living organisms. One important intracellular mechanism to control heme homeostasis is its enzymatic degradation by heme oxygenase (HO). HO catalyzes the degradation of heme to biliverdin (Bv), carbon monoxide and iron. HO is absent in *T. cruzi* genome, thus we have been investigating the presence of a functional HO in this parasite, since our previous results showed a presence of biliverdin in heme-treated epimastigotes. In the present work, we evaluated the effect of SnPPIX, a HO-1 inhibitor, CoPPIX, a HO inducer, and Bv upon *T. cruzi* epimastigotes proliferation. The addition of SnPPIX decreased the parasite proliferation in the absence or in the presence of heme. When Bv was added to the culture this effect was reversed; Bv increases the parasite proliferation in the presence of heme. On the other hand, CoPPIX did not interfere on proliferation. Furthermore, we showed through immunoblotting, using an anti-HO-1 monoclonal antibody, an increase in the protein expression in heme-treated epimastigotes. Differently of described HO-1 that has a mass molecular of a 32 kDa, we showed a 45 kDa protein, the only band recognized by the HO-1 antibody. HO-1 expression analysis in the presence of CoPPIX, SnPPIX and biliverdin, showed that only CoPPIX was able to modulate its expression level. Ultrastructural immunocytochemistry analysis suggests a higher expression of the enzyme in heme-treated epimastigotes, and that *T. cruzi* HO-1 might have a dual distribution, since the anti-HO-1 antibody labeled both cytosol and glycosomes. In order to investigate the *T. cruzi* HO-1 gene sequence, we isolated genomic DNA from *T. cruzi* for PCR amplification using primers designed as from the parasite genome. Unfortunately, the two pairs of the designed oligonucleotides tested were unable to amplify a sequence equivalent to a HO-1. In order to isolate the target protein, immunoprecipitation was performed and subsequently immunoblotted with anti-HO-1 antibody. The immunocomplex level was two-fold higher in heme-treated cells. Following the attempt to identify a HO-1 in *T. cruzi*, we used mass spectrometry from unidimensional electrophoresis. We showed a significant protein profile modification in heme-treated epimastigotes, but further experiments will be necessary, such as mass spectrometry from bidimensional electrophoresis, for identification of the target protein.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Heme. Heme oxygenase-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Ciclo Evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	17
Figura 2	Esquema dos aspectos morfológicos gerais das formas evolutivas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
Figura 3	Distribuição e migração da doença de Chagas.....	24
Figura 4	Triatomíneos antes (A) e depois (B) do repasto sanguíneo.....	34
Figura 5	Estrutura química do Heme (Fe-protoporfirina IX).....	35
Figura 6	Via de degradação do heme em mamíferos.....	38
Figura 7	Regulação do gene Heme Oxigenase.....	44
Figura 8	Seqüência de reações catalisadas pelas Heme Oxigenases.....	46
Figura 9	Via proposta para a degradação de heme em <i>R. prolixus</i>	49
Figura 10	Mecanismo proposto da síntese de Bilirrubina IX α a partir de heme mediado pela PfHO.....	50
Figura 11	Efeito do SnPPIX na cinética de proliferação da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	66
Figura 12	Efeito do SnPPIX, na presença de heme, na proliferação da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	67
Figura 13	Efeito da biliverdina após pré-tratamento com SnPPIX na proliferação da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	68
Figura 14	Efeito da biliverdina na proliferação da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	69
Figura 15	Efeito sinérgico de biliverdina e heme na proliferação da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	70
Figura 16	Efeito do CoPPIX na proliferação da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	71
Figura 17	Análise dos níveis de expressão da HO-1 em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após tratamento com heme.....	72
Figura 18	Análise dos níveis de expressão da HO-1 em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após diferentes tratamentos.....	74

Figura 19	Imunocitoquímica ultra-estrutural de HO-1 em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	75
Figura 20	Esquema do desenho de oligonucleotídeos para o possível gene da HO de <i>T. cruzi</i>	78
Figura 21	Análise dos produtos de PCR com o primeiro par de oligonucleotídeos para o gene da HO-1.....	79
Figura 22	Análise dos produtos de PCR com o segundo par de oligonucleotídeos para o gene da HO-1.....	80
Figura 23	Blastx.....	81
Figura 24	Eletroforese unidimensional do extrato proteico total de <i>T. cruzi</i>	82
Figura 25	Imunoprecipitação e análise da expressão da HO-1 em epimastigotas tratados com heme.....	85
Figura 26	Eletroforese unidimensional do imunoprecipitado de <i>T. cruzi</i> com anticorpo anti-HO-1.....	86
Figura 27	Diagrama de Venn indicando o número de classes de proteínas encontradas em cada estado por 1D PAGE LC-ESI-Linear trap/Orbitrap.....	94
Figura 28	Imunocitoquímica ultra-estrutural em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> com hexoquinase como marcador glicossomal.....	96

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Sequência dos oligonucleotídeos senso e anti-senso para a HO-1 utilizados na técnica de PCR, temperatura de anelamento de cada oligonucleotídeo e número de ciclos.....	63
Quadro 2	Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas por nanoLC-ESI-ION TRAP, com o número total de espectros MS/MS associados à cada proteína identificada e o número de peptídeos únicos entre parênteses	82
Tabela 1	Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas apenas na condição A (sem heme) por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap.....	87
Tabela 2	Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas apenas na condição B (heme 300 μ M) por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap.....	88
Tabela 3	Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas em ambas as condições por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap com o número total de espectros MS/MS associados à cada identificação e o número de peptídeos únicos entre parênteses.....	91
Tabela 4	Lista de proteínas identificadas em ambas as espectrometrias de massa (LC-ESI-ION TRAP e LC-ESI-Linear trap/Orbitrap).....	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AEBSF	4-(2-Aminoetil) benzenosulfonil fluoreto
Ala	Alanina
ATP	Adenosina tri-fosfato
BHI	Infusão de cérebro e coração
BR	Bilirrubina
BV	Biliverdina
BVR	Biliverdina redutase
CaMKII	Proteína quinase dependentes de Ca^{2+} /CaM II
ChIP	Imunoprecipitação de cromossomos
CO	Monóxido de carbon
CoPPIX	Co-protoporfirina IX
DmHO	Heme Oxigenase de <i>Drosophila melanogaster</i>
DMSO	Dimetilssulfóxido
DNA	Ácido desoxi ribonucleico
DTT	Ditiotreitol
ECL	Intensificação de quimioluminescência pelo luminol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetracético
EGTA	Ácido etilenoglicol tetracético
eIF2 α	Fator de iniciação da síntese proteica de eucarioto sensível a heme
Fd	Ferredoxina reduzida
GMPc	Guanosina monofosfato cíclica
gp	Glicoproteína
HAPs	Proteína antisense de HIV
HIFs	Fatores indutores de hipóxia
His	Histidina
Hmu O	Heme Oxigenase de <i>Corynebacterium diphtheriae</i>
HO	Heme Oxigenase
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
Hsp32	Proteína <i>heat shock</i> 32
HSP70	Proteína <i>heat shock</i> 70

IEF	Focalização isoelétrica
kDNA	DNA do cinetoplasto
MARE	Elemento de reconhecimento de Maf
MnHO	Heme Oxigenase de <i>Neisseriae meningitidis</i>
MS	Espectrometria de massa
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida
NF-E2	Fator de transcrição específico de eritrócito
NO	Óxido nítrico
PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida
<i>pa</i> -HO	Heme Oxigenase de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PBS	Tampão fosfato de potássio 100 mM NaCl 150 mM pH 7,4
PCR	Reação de polimerização em cadeia
PfHO	Heme Oxigenase de <i>Plasmodium falciparum</i>
PK	Piruvato quinase
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
RpBV	Biliverdina de <i>Rhodnius prolixus</i>
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro fetal bovino
SIDA	Síndrome da imunodeficiência adquirida
SnPPIX	Sn-protoporfirina IX
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina
Tris	Tris-(hidroximetil)-amino metano
UV	Ultravioleta
ZI	Zimodema I
ZII	Zimodema II
ZIII	Zimodema III

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	14
1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.1.1 <u>Ciclo de vida e Transmissão</u>	16
1.1.2 <u>Taxonomia e Aspectos morfológicos</u>	19
1.2 A doença de Chagas	23
1.3 Genoma do <i>T. cruzi</i>	28
1.4 Transcrição e Expressão Gênica em <i>T. cruzi</i>	29
1.5 Os vetores da doença de Chagas	32
1.6 Heme - estrutura e papel celular	35
1.7 Heme Oxigenase	37
1.7.1 <u>Isoformas de Heme Oxigenases</u>	40
1.7.2 <u>Regulação do gene Heme Oxigenase-1 (<i>HO-1</i>)</u>	42
1.7.3 <u>HO - Mecanismo de catálise</u>	45
1.7.4 <u>HO em insetos hematófagos e parasitos - Vias alternativas de degradação de heme</u>	47
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	52
2.1 Reagentes	52
2.2 Parasitos	52
2.3 Preparação dos parasitos para os ensaios de proliferação	53
2.4 Efeito do SnPPIX na proliferação do parasito	53
2.5 Efeito da biliverdina na proliferação do parasito	53
2.6 Efeito do CoPPIX na proliferação do parasito	54
2.7 Preparo das amostras para <i>Immunoblotting</i>	54
2.8 Dosagem de proteína	54
2.9 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)	55
2.10 <i>Immunoblotting</i>	55
2.11 <i>Stripping</i>	56

2.12	Imunoprecipitação	56
2.13	Imunocitoquímica	57
2.14	Fixação e coloração por Coomassie coloidal (G-250)	57
2.15	Digestão <i>in gel</i>	58
2.16	Espectrometria de Massa LC-ESI-ION TRAP	59
2.17	Espectrometria de Massa LC-ESI-Linear trap/Orbitrap	59
2.18	Busca em banco de dados (LC-ESI-ION TRAP)	60
2.19	Busca em banco de dados (LC-ESI-Linear trap/Orbitrap)	60
2.20	Identificação de proteínas (LC-ESI-ION TRAP)	61
2.21	Identificação de proteínas (LC-ESI-Linear trap/Orbitrap)	61
2.22	Extração e quantificação de DNA	62
2.23	Reação de polimerização em cadeia (PCR)	62
2.24	Análise dos Produtos da PCR	63
2.25	Purificação dos produtos da PCR	63
2.26	Sequenciamento	64
2.27	Análise estatística	64
3	RESULTADOS	65
4	DISCUSSÃO	97
5	CONCLUSÃO	106
	REFERÊNCIAS	107

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pelo parasita *Trypanosoma cruzi*, transmitida através de insetos vetores triatomíneos durante a alimentação no hospedeiro vertebrado. É reconhecida pela organização mundial de saúde como uma das principais doenças negligenciadas do mundo. Atualmente, estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas correm o risco de infecção. Em 2008, cerca de 10.000 pessoas morreram tendo como causa a doença de Chagas (WHO, 2010).

A doença de Chagas, mesmo hoje, após mais de 100 anos de sua descoberta, não apresenta uma quimioterapia satisfatória. Não existem vacinas e o medicamento disponível atualmente é tóxico e pouco eficaz em estágios avançados da doença (fase crônica). O fato da fase aguda ser em muitos casos assintomática, dificulta o tratamento. É importante então a descoberta de novos medicamentos, que sejam mais específicos para o parasita e portanto menos tóxico para o hospedeiro. Nessa tese, foi estudada a presença da enzima heme oxigenase-1 (HO-1), responsável pela detoxificação de heme, na forma epimastigota do parasito. A literatura demonstra a ausência da via completa da biossíntese de heme em *T. cruzi* (Lombardo *e cols.*, 2003; El-Sayed *e cols.*, 2005), tornando a molécula de heme essencial para esse parasito. Essa porfirina encontra-se presente em abundância na biologia das formas epimastigotas de *T. cruzi* e seu processo de internalização foi demonstrado pelo nosso grupo (Lara *e cols.*, 2007).

A enzima heme oxigenase constitui um mecanismo intracelular importante de controle da homeostase do heme. Há diferentes isoformas de HO, identificadas em diversos organismos. A isoforma objeto de nosso estudo é a HO-1, que tem sua expressão induzida em situações de estresse, como na presença de metais pesados, radiação UV, espécies reativas de oxigênio e pelo seu substrato heme. O sistema de degradação enzimática do heme em parasitas protozoários é desconhecida. Foi mostrado recentemente uma HO de *Plasmodium falciparum*, protozoário do filo Apicomplexa, a PfHO (Okada, 2009). Apesar de não ter sido encontrada nenhuma típica sequência de HO no genoma de *Trypanosoma cruzi* (El-Sayed *e cols.*, 2005a), resultados iniciais do nosso laboratório demonstram a presença de biliverdina, principal metabólito de heme, neste protozoário, através de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta performance (HPLC). A existência da molécula de biliverdina em *T. cruzi* sugere fortemente a existência de uma

atividade funcional de Heme Oxigenase. Deste modo, demonstrar a existência desta proteína tão característica do parasito, é de grande importância, visto seu grande potencial como alvo quimioterápico.

Sendo assim, visto o pouco conhecimento sobre o mecanismo de degradação de heme em protozoários, e o caráter essencial da molécula de heme para o *T. cruzi*, o objetivo geral dessa tese foi investigar a presença da enzima Heme Oxigenase, ou de uma proteína com atividade funcional de degradação da molécula de heme em *T. cruzi*, e os objetivos específicos foram:

- Analisar o efeito do inibidor da atividade enzimática (SnPPIX) e do indutor da expressão gênica (CoPPIX) de HO-1 sobre a proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- Analisar o efeito da biliverdina, produto de degradação do heme pela HO, sobre a proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi*;
- Verificar *através de immunoblotting* a presença da HO-1 nas formas epimastigotas de *T. cruzi* e analisar seu nível de expressão no tratamento com heme, CoPPIX, SnPPIX e biliverdina;
- Utilizar a técnica de imunoprecipitação para parcial purificação da HO-1 a partir do extrato proteico total do parasito;
- Investigar a localização celular da enzima HO-1 em *T. cruzi*, utilizando a técnica de imunocitoquímica, e analisando seu nível de expressão no tratamento com heme;
- Amplificar por PCR um fragmento correspondente ao possível gene da HO-1, utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir do genoma de *T. cruzi*;
- Analisar as sequências protéicas de *T. cruzi* reconhecidas pelo anticorpo HO-1 através de espectrometria de massa;

1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 *Trypanosoma cruzi*

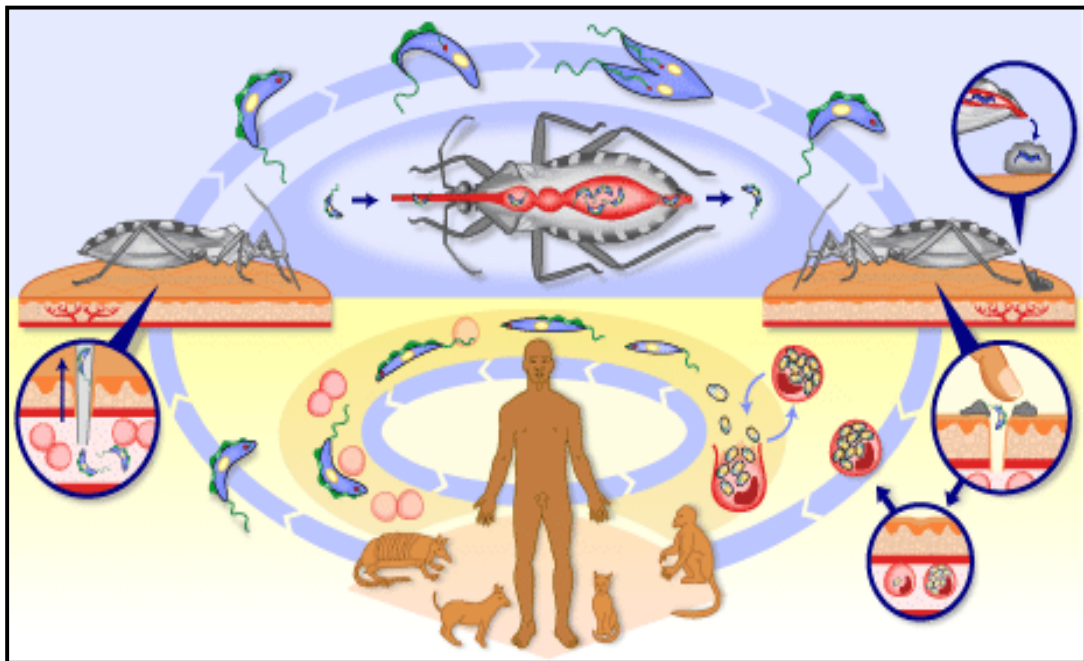
1.1.1 Ciclo de vida e Transmissão

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanossomíase Americana ou doença de Chagas (Chagas, 1909), a qual é um grande problema de saúde pública na América Latina. O *Trypanosoma cruzi* é transmitido através de vetores triatomíneos, insetos hematófagos conhecidos popularmente como barbeiros, durante sua alimentação no hospedeiro vertebrado. O ciclo biológico do *T. cruzi* é complexo, do tipo heteroxênico, passando por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (mamíferos, incluindo humanos) e extracelular no hospedeiro invertebrado (insetos triatomíneos), possuindo quatro estágios distintos de desenvolvimento (isto é, epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos) (Rey, 2001; Lima e cols., 2010).

Ao sugar o sangue de um vertebrado contaminado, o barbeiro ingere os tripomastigotas da corrente sanguínea (chamados de tripomastigotas metabólicos ou sanguíneos) dando início ao ciclo de desenvolvimento do *T. cruzi* na luz intestinal dos triatomíneos. Na porção anterior do intestino médio (ou estômago) os tripomastigotas sanguícolas passam a epimastigota e esferomastigotas poucas horas após a ingestão do parasito. Os epimastigotas se multiplicam por divisão binária longitudinal e passam para a porção posterior do intestino do triatomíneo, microambiente pobre em nutrientes, e sofrem nova metamorfose se diferenciando em tripomastigotas metacíclicos. Estes tripomastigotas são infectantes e são liberados nas fezes juntamente com algumas formas epimastigotas que não são infectivas. As formas epimastigotas são lisadas pelo soro normal do hospedeiro vertebrado.

No hospedeiro vertebrado o parasito pode penetrar pelas mucosas ou por soluções de continuidade da pele. No ponto de entrada na pele ocorre uma reação inflamatória transitória, de natureza eritematosa, desenvolvendo um nódulo denominado de chagoma. Quando o parasito penetra na mucosa ocular ocorre um edema bupalpebral unilateral, fato assinalado por Chagas já em 1909. Estudos mais aprofundados sobre o assunto foram publicados pelo pesquisador argentino Romana (1935) e por este motivo a lesão recebeu o nome de “sinal de Romana”.

O *T. cruzi* pode parasitar praticamente todo tipo de célula e a modulação desta invasão celular é fundamentalmente dependente da resposta do hospedeiro (Vianna, 1911; Gonçalves da Costa e cols., 1984; Lenzi e cols., 1996; Gonçalves da Costa e cols., 2002). Na célula do hospedeiro, o parasito encontra-se em um vacúolo parasitóforo. Sob acidificação, o parasito secreta a proteína lítica, TcTox, que juntamente com a atividade trans-sialidase, leva à ruptura da membrana do vacúolo parasitóforo e a liberação do tripomastigota para o citoplasma. Uma vez livre no citoplasma, os tripomastigotas metacíclicos diminuem de tamanho e se diferenciam em amastigotas. Os amastigotas se multiplicam intensamente dentro da célula e então se diferenciam novamente em tripomastigotas, que rompem a membrana plasmática. Após a ruptura da membrana, os tripomastigotas estão livres para infectar células vizinhas ou disseminar para outros órgãos, ou infectar o inseto vetor, via corrente sanguínea (Andrews e cols., 1990; Garcia e Azambuja, 1996; De Souza, 2002a; Lima e cols., 2010) (Figura 1).



TDR/Wellcome Trust

Figura 1 - Ciclo Evolutivo do *Trypanosoma cruzi*.

Na doença de Chagas aguda, que é benigna na maioria dos casos, as lesões cardíacas são resultantes da invasão das células do miocárdio pelo parasito e do processo inflamatório decorrente da ruptura das células parasitadas que expõe um grande número de antígenos. Durante a fase aguda pode se observar casos cuja sintomatologia é bastante discreta, o que algumas vezes pode levar o paciente a confundí-la com uma gripe, até formas mais graves onde se observa uma parasitemia elevada, dilatação progressiva do coração, linfadenopatia sistêmica e esplenomegalia. Formas mais graves podem atingir o sistema nervoso central e causar uma meningoencefalite e a morte do paciente.

O *T. cruzi* pode ser transmitido também por transfusão sanguínea, em áreas onde a doença de Chagas é ou não endêmica, nas Américas do Sul e Central, tendo sido constatada inclusive nos Estados Unidos e no Canadá (Bern e cols., 2008). Outro mecanismo de transmissão do *T. cruzi* é a congênita, demonstrada inicialmente por Chagas (1911), a qual está associada a nascimentos prematuros, abortamentos e placentites, relatada em muitas áreas da América do Sul (Azogue e cols., 1985; Coura, 2007). A transmissão por via oral também é possível, pequenos surtos epidêmicos já foram registrados, após refeições coletivas, em que houve contaminação de alimentos, como cana de açúcar e açaí (Coura e cols., 2002). A amamentação é também uma via de transmissão oral, conforme descrito nos trabalhos de Mazza e colaboradores (1936) e nos de Medina-Lopes (1988). Entretanto, não se desaconselha a amamentação por parte das mães chagásicas, uma vez que a ocorrência do parasita é considerada rara (WHO, 1991). O transplante de órgãos e os acidentes laboratoriais são vias de transmissão menos frequentes (Tanowitz e cols., 1992).

Em 9 de junho de 2006, no 15^o Encontro Anual da Comissão Intergovernamental do Cone Sul de iniciativa contra a doença de Chagas, foi formalmente declarado que o Brasil encontra-se livre da transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*. Além do Brasil, a transmissão vetorial foi eficientemente eliminada no Uruguai (1997), Chile (1999), amplas áreas na Argentina, Bolívia e Paraguai, e parte da América Central. A prevalência global da doença foi reduzida da estimativa de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2002a; Coura e cols., 2002) a aproximadamente 9 milhões atualmente (Schofield e cols., 2006).

1.1.2 Taxonomia e Aspectos morfológicos

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que, segundo Levine e colaboradores, (1980), pertence à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatida e Gênero *Trypanosoma*, Seção Stercoraria (Hoare, 1972; Souza, 2000), Subgênero *Schizotrypanum*, Espécie *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Chagas, 1909.

A Ordem Kinetoplastida é subdividida em duas sub-ordens, Bodonina e Trypanosomatina (Vickerman, 1990), caracterizadas pela presença de uma estrutura celular típica chamada cinetoplasto. Cada uma destas subordens agrupa somente uma única família de organismos, Bodonidae e Trypanosomatidae. Juntas, estas famílias de protozoários flagelados compreendem 15 gêneros, nove em Trypanosomatidae e seis em Bodonidae (Hughes e Piontkivska, 2003). O cinetoplasto, com estrutura geralmente única, presente em todos os indivíduos desta ordem, contém um agregado de DNA mitocondrial (k-DNA) que representa cerca de 30% do DNA total dos protozoários da ordem Kinetoplastida (Vickerman, 1990; Stuart e Feagin, 1992).

Em linhas gerais, quanto à organização estrutural, os Kinetoplastida se caracterizam pela presença de um corpo celular, sustentado por um citoesqueleto, formado por microtúbulos subpeliculares intimamente associados à membrana plasmática (De Souza, 1999). Esses protozoários podem apresentar um ou dois flagelos locomotores, ligados ou não à membrana plasmática, neste caso formando a chamada membrana ondulante, e uma mitocôndria única, que em algumas espécies, percorre toda a extensão da célula (Vickerman, 1976; Schmidt e Roberts, 1989).

A família Trypanosomatidae é de grande importância para a medicina, além de acarretar problemas na área econômica, sendo composta por protozoários uniflagelados, parasitos de invertebrados, vertebrados e de plantas, que podem ter seus ciclos de vida estabelecidos em um único hospedeiro (parasitos monoxênicos), ou em mais de um hospedeiro (parasitas heteroxênicos). Como exemplos de gêneros monoxênicos, principalmente encontrados em insetos e geralmente não patogênicos para humanos, temos: *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas* e *Wallaceina*. Contudo, entre os gêneros heteroxênicos destacam-se alguns que são patogênicos para mamíferos, como: *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Endotrypanum*. O gênero *Phytomonas*, por outro lado, apresenta espécies patogênicas para vegetais (Hughes e Piontkivska, 2003).

Os tripanossomatídeos podem apresentar várias formas evolutivas, definidas pela presença ou ausência de flagelo extracelular visível à microscopia de luz, ou de membrana ondulante, pela posição do cinetoplasto e base do flagelo em relação ao núcleo, entre outras características (Hoare e Wallace, 1966). O *T. cruzi* apresenta três formas evolutivas (Figura 2), identificadas morfológicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo: 1 - tripomastigota, que é o estágio infectante, com cinetoplasto na parte posterior, terminal ou subterminal, e flagelo emergindo de uma depressão chamada bolsa flagelar próxima ao cinetoplasto; 2 - epimastigota, que é a forma de multiplicação do parasito no inseto vetor, com cinetoplasto e bolsa flagelar anterior ou junto ao núcleo; 3 - amastigota, que é a forma de multiplicação intracelular, arredondada, com flagelo inconspícuo (Brener, 1979).

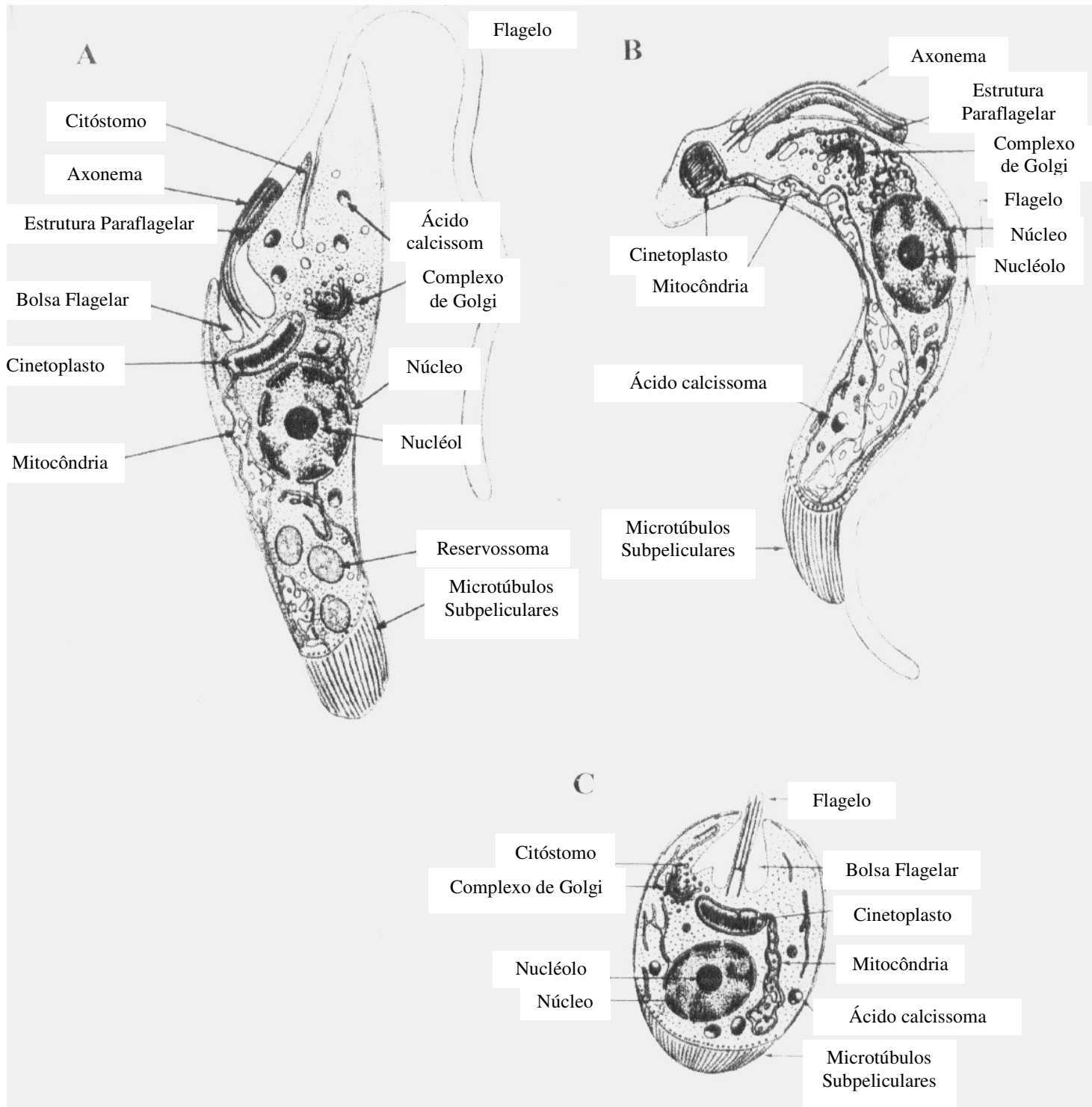


Figura 2 - Esquema dos aspectos morfológicos gerais das formas evolutivas de *Trypanosoma cruzi*. Epimastigota (A), tripomastigota (B) e amastigota (C) (De Souza, 1999).

Entre as organelas bastante específicas de tripanossomatídeos estão os glicossomas e os acidocalcissomas, envolvidos em vias metabólicas. Os glicossomas são responsáveis por concentrar e compartimentalizar as enzimas da via glicolítica, aumentando a eficiência do processo (De Souza, 1999). Como os glicossomas encontrados em tripanossomatídeos contêm enzimas típicas de peroxissomos, eles são considerados um tipo especial de peroxissomo. Os peroxissomos de células de mamíferos contêm mais de 50 diferentes enzimas envolvidas em várias vias metabólicas como metabolismo de peróxidos, β -oxidação de ácido graxos, síntese de fosfolipídios entre outras. Existem também evidências de que vias metabólicas adicionais, como fixação de dióxido de carbono (Opperdoes e Cotton 1982), vias de recuperação de purinas e biosíntese *de novo* de pirimidinas, alongamento de ácidos graxos, biosíntese de isoprenóides e esteróides (Opperdoes, 1987), ocorram nos glicossomas de tripanossomatídeos, embora elas ocorram no citosol de outras células. Os glicossomas não possuem um genoma, as suas proteínas são codificadas por genes nucleares, traduzidos em ribossomos livres e importadas pós-traducionalmente para dentro da organela (De Souza, 2009).

Os acidocalcissomas são organelas ácidas, que estão envolvidas em funções como (i) estoque de cálcio, magnésio, sódio, potássio, zinco, ferro e compostos de fósforo, especialmente pirofosfato inorgânico e polifosfato, como determinado por análises bioquímicas e microanálises de raio X; (ii) homeostase do pH e (iii) osmorregulação, atuando em estreita associação com o vacúolo contrátil. Apresentam enzimas como H^+ -ATPase, Ca^{2+} - H^+ -ATPase e pirofosfatases (V - H^+ -PPase) (Benchimol e cols., 1998; Rodrigues e cols., 1999; Docampo e cols., 2005). Apesar da presença de vacúolo contrátil ser muito comum em protozoários, existem poucos relatos dessas estruturas em tripanossomatídeos. Mais recentemente, a aquaporina, uma proteína envolvida no transporte de água, foi identificada em formas epimastigotas de *T. cruzi*, estando localizada em ambos acidocalcissomos e vacúolo contrátil (Montalvetti e cols., 2004). Essas estruturas parecem estar envolvidas no processo de osmoregulação. Foi demonstrado que a fusão do acidocalcissomos com o vacúolo contrátil ocorre via um processo mediado pela adenosina monofosfato cíclica (Rohloff e Docampo, 2008).

Os tripanossomatídeos são células altamente polarizadas, e sua atividade endocítica é restrita à bolsa flagelar e à região do citóstoma (De Souza e cols., 2009). O conteúdo das vesículas endocíticas é entregue a estruturas incomuns chamadas reservossomos, que são organelas da via endocítica, localizadas na região posterior do parasito, específicas da forma

epimastigota. Essa organela tem sido considerada o destino final de macromoléculas capturadas do meio extracelular assim como o local onde ocorre o maior acúmulo de proteases do parasito, sendo muito rica em cisteína-proteinases. Os revossomos provavelmente têm função lisossomal, já que os lisossomos clássicos nunca foram identificados em *T. cruzi*. Apesar disso, a atividade arilsulfatase, que é característica de lisossomos, foi detectada em pequenas vesículas distribuídas por todo o corpo celular das formas epimastigotas e tripomastigotas. A função digestiva desses compartimentos não foi descoberta (De Souza, 2002b; Adade e cols., 2007; De Souza, 2009).

1.2 A doença de Chagas

O estudo dos protozoários hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* é importante, pois estes causam doenças graves em extensas áreas do mundo, das quais a tripanossomíase africana, que acomete humanos (doença do sono) e animais (Nagana), e a tripanossomíase americana (doença de Chagas) são as mais importantes (Hoare, 1972). Os parasitos vivem no sangue e nos tecidos, causando lesões graves que podem ser letais, tanto na forma aguda como na forma crônica da doença (Torres, 1941).

Estudos mostram que a distribuição geográfica da infecção chagásica, seus reservatórios e vetores, fazem parte de um ecossistema exclusivamente americano, sendo encontrado em extensas áreas do Continente, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile, onde 90 milhões de pessoas nesta região estão expostas à infecção (Coura e Dias, 2009). Segundo a Organização Mundial de Saúde, esta doença parasitária é a principal nesta região e a terceira no mundo, após a malária e a esquistossomose (WHO, 2002b). Na América Latina constitui a quarta doença mais importante, precedida por doenças respiratórias, diarreia e SIDA (Schofield, 1994). Atualmente, estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas no mundo, principalmente na América Latina onde a doença de Chagas é endêmica. Mais de 25 milhões de pessoas correm o risco de infecção. Em 2008, cerca de 10.000 pessoas morreram tendo como causa a doença de Chagas (WHO, 2010).

Embora a doença de Chagas seja caracterizada, até o momento, como uma endemia exclusiva do continente americano, existem países (considerados não endêmicos) que trocam significativamente a população com a América Latina, principalmente sob a forma de migração.

Esses movimentos populacionais começaram a criar novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e políticos. Além da migração de pessoas, vetores triatomíneos não infectados foram encontrados nas regiões costeiras da África, Oriente médio, sudeste da Ásia e regiões do Pacífico ocidental, tendo se espalhado através do comércio marítimo da América Latina desde o início do século XVI (Schofield e cols., 2009).

Hoje se estima que exista mais de 300.000 indivíduos infectados nos EUA, mais de 5.500 no Canadá, mais de 80.000 na Europa e no Pacífico ocidental, mais de 3.000 no Japão e mais de 1.500 na Austrália (Schmunis e Yadon, 2009). A Figura 3 mostra a distribuição da infecção por *T. cruzi* no continente americano, enfatizando a transmissão da doença para áreas não endêmicas.

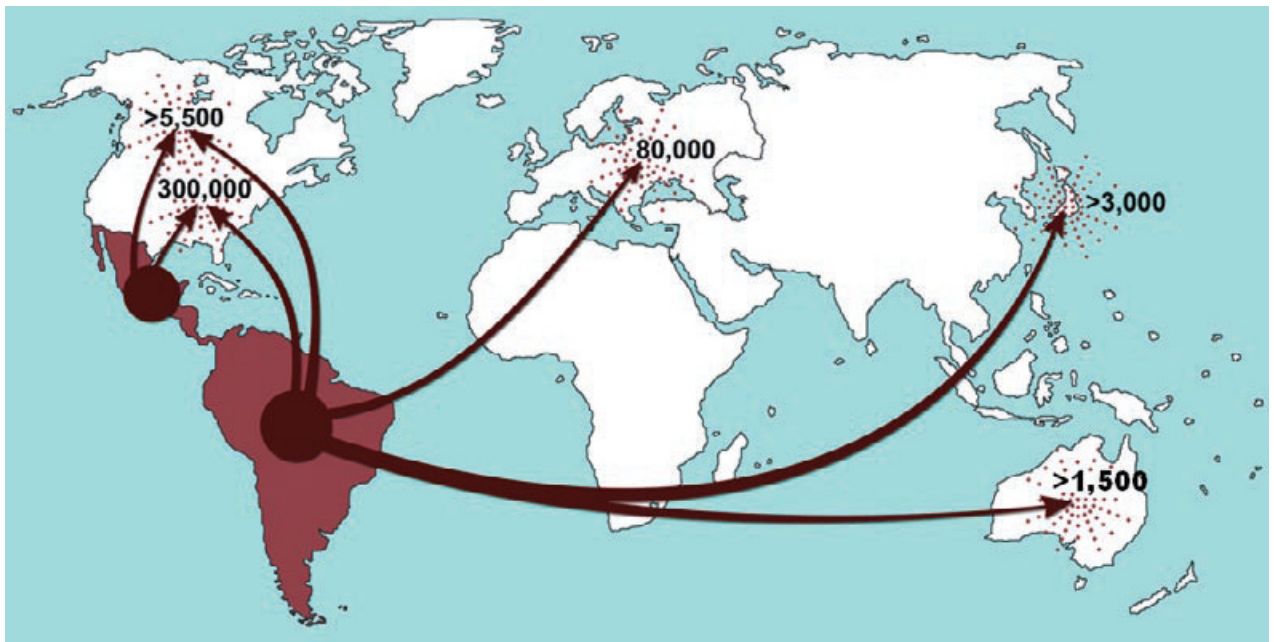


Figura 3 - Distribuição e migração da doença de Chagas. A doença era considerada uma doença exclusivamente americana acometendo toda a América Latina e América Central. Hoje, graças principalmente a migração, essa doença vem se espalhando pelo mundo (Coura e Viñas, 2010).

Entretanto, a quimioterapia desta doença ainda não é satisfatória, sendo baseada apenas em nitrofuranos e nitroimidazóis, que agem através da indução do dano oxidativo do parasito, podendo produzir sérios efeitos tóxicos no hospedeiro e sendo pouco eficaz em seus estágios avançados (Cançado e Brener, 1979; Wilkinson e cols., 2009). Como não existem perspectivas

em relação a vacinas e medicamentos satisfatórios, a busca para novas terapias é prioridade. Entretanto, o desenvolvimento de novas drogas está relacionado com alto custo financeiro e pouca atratividade comercial. Como consequência, a doença de Chagas integra o grupo das chamadas doenças tropicais negligenciadas (Wilkinson e cols., 2009). Reconhecida pela WHO como uma das principais doenças negligenciadas do mundo, a doença de Chagas vem acometendo a humanidade desde a antiguidade e continua sendo um problema relevante na América Latina (Hotez e cols., 2007). Em 2007, estudos mostraram que menos de 0,5% das pesquisas mundiais acerca das doenças negligenciadas tiveram como objetivo a doença de Chagas (Moran, 2009; Williams, 2009).

A descoberta da doença de Chagas e de seu agente causador foi feita por Carlos Chagas, em 1909, na cidade de Lassance, estado de Minas Gerais. Carlos Chagas isolou o parasito do triatomíneo *Panstrongylus megistus*, denominando-o *T. cruzi*, em homenagem a Oswaldo Cruz. Posteriormente Carlos Chagas encontrou o *T. cruzi* no sangue de um gato e também em uma menina doente chamada Berenice (Chagas 1909). Seguiram-se as descobertas do *T. cruzi* em um tatu, *Dasybus novencinctus* (Chagas, 1912) e em macacos, pelo mesmo autor (Chagas, 1924). Uma revisão do ciclo evolutivo do parasito também foi realizada (Chagas, 1913).

A transmissão e a disseminação da doença foram facilitadas pelas migrações dentro da América do Sul e da América Latina para o norte (Kirchhoff e cols., 1987). Este parasito já foi registrado desde o paralelo 45 graus sul até 40 graus norte, em e cols., hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados.

A tripanossomíase americana, considerada originalmente uma enzootia, afetava inicialmente mamíferos silvestres nas regiões do norte do Chile ou sul do Peru sendo transmitida por triatomíneos do mesmo habitat. O homem, penetrando neste ambiente natural, estabelecendo-se com suas habitações e abrigos de animais domésticos, determinou uma adaptação progressiva do *T. cruzi* a estes ecótopos artificiais, infectando os animais domésticos suscetíveis e o próprio homem, determinando a adaptação de algumas espécies de triatomíneos ao peri-domicílio e ao interior dos domicílios, estabelecendo assim o ciclo biológico nos novos habitats, disseminando a doença pela América do Sul (Dias e Coura, 1997). Outros flagelados idênticos ou semelhantes ao *T. cruzi* foram descobertos em mais de 100 espécies e subespécies de mamíferos e em numerosos triatomíneos.

Segundo Brener (1997), no homem, a infecção produz a doença de Chagas aguda após um período de incubação de 8 a 10 dias na transmissão vetorial. A doença de Chagas aguda pode ser aparente ou inaparente. Na aparente a evolução é rápida e com alta parasitemia. Os aspectos clínicos mais importantes são: febre, astenia, cefaléia, anorexia, mal-estar geral, sudorese, dores musculares, às vezes com vômitos e diarreia, sendo possível a linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, edema generalizado ou de face e/ou membros inferiores, exantema e meningo-encefalite (raros); são freqüentes na forma aguda os sintomas de cardiopatia aguda, com miocardite e pericardite. A duração da fase aguda pode variar de alguns dias a cerca de dois meses e, se o paciente não for a óbito neste período, a parasitemia e o quadro febril tendem a desaparecer, ocorrendo a transição para a forma crônica (Cançado, 2005). Se houver terapia apropriada, ocorre normalmente evolução para a cura. Na forma aguda inaparente o paciente é oligossintomático e a doença é subclínica, podendo até passar despercebida. A forma aguda pode evoluir para a forma crônica indeterminada, o que ocorre na maioria dos casos agudos não tratados, sem sintomas ou manifestações clínicas, cardíacas, digestivas ou nervosas; ou ainda com exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos do coração e/ou do tubo digestivo normais, forma evidenciada por sorologia ou métodos parasitológicos indiretos, como xenodiagnóstico, sendo a forma mais freqüente em áreas endêmicas e entre doadores de sangue infectados. A forma crônica indeterminada, mesmo assintomática, quando feita uma análise histopatológica, apresenta alterações inflamatórias variáveis no miocárdio e no sistema nervoso vegetativo intracardíaco, possivelmente progressivas e responsáveis pelo agravamento da doença, passando a formas crônicas determinadas benignas ou malignas e morte.

A forma aguda pode também evoluir para a forma subaguda com alterações patológicas graves, principalmente miocardite intensa e mau prognóstico. A forma crônica determinada, evolução da forma aguda ou da forma crônica indeterminada, pode apresentar manifestações digestivas, principalmente devido a megaesôfago e/ou megacólon. A forma crônica determinada pode apresentar também predominância de cardiopatia crônica chagásica, progressiva, acometendo 10 a 40% dos chagásicos crônicos em áreas endêmicas (Dias e Coura, 1997). Na fase crônica da doença, observa-se uma baixa parasitemia e um quadro muitas vezes assintomático podendo durar anos ou até décadas (Cançado, 2005; Coura e Borges-Pereira, 2010).

Em pacientes com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), há uma reativação da infecção com *T. cruzi*. A defesa imunológica contra o *T. cruzi* é mediada principalmente por

linfócitos T, dos quais a subpopulação CD4 é depletada nos pacientes com SIDA. As lesões observadas na associação da doença de Chagas com a SIDA são comparáveis às dos pacientes sem SIDA, com doença de Chagas, adquirida seja através do vetor, transfusões de sangue, ou acidentes de laboratório. A meningoencefalite é uma rara complicação em pacientes chagásicos, descrita por Carlos Chagas em crianças, em geral com uma imunodeficiência adquirida por subnutrição. A incidência de meningoencefalite voltou a ter um significado importante nos casos da associação da doença de Chagas com a infecção pelo HIV. A reativação da doença de Chagas pode ocorrer também em pacientes transplantados; com leucemia linfocítica ou imunodeficiência congênita, casos onde há imunossupressão (Rocha e cols., 1994). Após a fase aguda da doença de Chagas na qual há uma “cura clínica” através de quimioterapia ou em casos assintomáticos, a relação parasito/hospedeiro é desequilibrada somente quando um tratamento com drogas imunossupressivas é introduzido. Tem sido demonstrado que drogas imunossupressivas podem modular tanto a imunidade mediada por células quanto a produção de anticorpos, afetando, portanto, a imunidade do hospedeiro (Calabrese, 1999).

Em 2007, Coura publicou o artigo “Doença de Chagas: o que é sabido e o que é preciso”, e listou 10 tópicos necessários para o futuro do controle da doença: 1 - Esclarecer a patogênese e o padrão evolutivo da doença de Chagas; 2 - Desenvolver uma droga efetiva para as fases agudas e crônicas; 3 - Implantar um teste específico e rápido para as infecções por *T. cruzi* tipo I, II, Z3 e ZI/Z3; 4 - Padronizar técnicas para diagnóstico sorológico e controle da avaliação da cura; 5 - Comparar a mortalidade induzida pelos quatro tipos de *T. cruzi*; 6 - Estudar a metaciclogênese das diferentes cepas de *T. cruzi*; 7 - Analisar o risco de triatomíneos selvagens se adaptarem a domicílios de humanos; 8 - Avaliar a mortalidade da doença de Chagas na região Amazônica; 9 - Estabelecer um programa de doença de Chagas, de controle e sobrevivência nessa mesma região; e 10 - Priorizar os programas de controle da doença na América Latina e México.

Em 2009, durante o encontro satélite do XXXVI Encontro Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, um comite de especialistas reconheceu e unificou a nomenclatura das cepas de *T. cruzi*. A partir dessa data, os isolados e cepas de *T. cruzi* deveriam ser classificadas dentro de seis diferentes unidades discretas de tipagem ou “discrete typing units” (DTU’s), denominadas: *T. cruzi* I-VI. (Zingales e cols., 2009).

1.3 Genoma do *T. cruzi*

Como ocorre nos eucariotos, o *T. cruzi* possui dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares bem definidos: o núcleo e a mitocôndria. Nos tripanossomatídeos, a mitocôndria apresenta características peculiares, albergando uma rede complexa de moléculas circulares de DNA denominada de cinetoplasto ou kDNA (DNA mitocondrial) (Borst e cols., 1982).

Uma característica interessante do *T. cruzi* é o fato do tamanho do genoma variar extensivamente entre cepas, e clones da mesma cepa (Henriksson e cols., 1996).

A análise da cinética de renaturação de DNA de *T. cruzi* mostrou que aproximadamente 9–14% do DNA total do parasito é composto por seqüências altamente repetitivas (Requena e cols., 1996).

O kDNA é composto por dois tipos de moléculas circulares que diferem em tamanho e função denominadas de minicírculo e maxicírculo (Shapiro e Englund, 1995). Os minicírculos possuem cerca de 1.400 pb e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por células. Apresentam quatro regiões de 120 a 160 pb de seqüência bastante conservada entre si e as regiões variáveis têm cerca de 280 a 320 pb (Degrave e cols., 1988; Sturm e cols., 1989), estas seqüências presentes nos minicírculos não codificam peptídeos. As seqüências variáveis são transcritas gerando pequenos RNAs denominados RNAs guia (gRNAs), moléculas que estão envolvidas no processo de editoração dos mRNA das enzimas mitocôndriais. Neste processo, a maioria dos transcritos dos genes provenientes dos maxicírculos só pode ser traduzida em proteínas após a adição ou deleção de resíduos de uridina (Hajduk e cols., 1997; Stuart e cols., 1997).

O sequenciamento completo do genoma de *T. cruzi*, juntamente com o de outros tripanossomatídeos foi concluído em 2005, porém ainda não foi possível realizar a montagem completa devido ao grande número de seqüências repetitivas (El-Sayed e cols., 2005a e 2005b). O clone escolhido para o sequenciamento foi o CL Brener, em função de sua caracterização experimental estar bem estabelecida; ter sido isolado de *Triatoma infestans*, um vetor domiciliado; por ser infectiva para camundongos; por ter um miotropismo evidente, verificando lesões inflamatórias no miocárdio e no músculo esquelético e liso das paredes internas com o acometimento dos plexos miontericos e lesões neuronais; por mostrar uma fase aguda claramente definida em humanos infectados; e finalmente, por ser susceptível às drogas usadas no

tratamento clínico da doença de Chagas. Este clone parece ser geneticamente estável, no que diz respeito ao comportamento de uma série de caracteres fenotípicos e genotípicos (isoenzimas, esquizodema, RAPD (amplificação randômica de DNA polimórfico) e impressão digital de DNA) (Zingales e cols., 1997).

De acordo com os dados do sequenciamento, *T. cruzi* é um organismo diplóide cujo genoma compreende cerca de 60 Mb com aproximadamente 12.000 genes (El-Sayed e cols., 2005a). Também foi demonstrado que pelo menos 50% do genoma do parasito é constituído de seqüências repetitivas consistindo principalmente de famílias gênicas de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas. A maior das famílias gênicas codifica proteínas de superfície como membros da superfamília das trans-sialidases, mucinas, proteínas associadas à mucina (MASP) e a glicoproteína de superfície gp 63. Todas estas proteínas são *T. cruzi*-específicas e representam 18% do total de genes codificantes de proteína no genoma do parasito. Inúmeras classes de moléculas sinalizadoras estão ausentes em tripanossomatídeos, incluindo receptores de serpentina, proteínas heterotriméricas G, domínios de interação SH2 e SH3 e fatores de regulação transcricional. Ainda dentro deste contexto, foram identificadas 167 proteína quinases distintas (El-Sayed e cols., 2005a).

1.4 Transcrição e Expressão Gênica em *T. cruzi*

A transcrição de genes que codificam proteínas em tripanossomatídeos é policistrônica, ou seja, os genes são transcritos em única unidade contendo cópias do mesmo gene cuja função e padrão de expressão são distintos. Os tripanossomatídeos têm atraído a atenção dos biólogos moleculares por possuírem mecanismos únicos de expressão gênica, como a transcrição policistrônica, *trans-splicing*, e o envolvimento da RNA polimerase I na síntese de mRNA e na edição de RNA (Vanhamme e Pays, 1995; Clayton, 2002; Das e cols, 2008). No *trans-splicing*, os mRNA individuais são gerados por um mecanismo onde duas moléculas de RNA separadas são reunidas para formar um transcrito maduro. Assim, o pré-mRNA é unido em sua extremidade 5' a um pequeno RNA denominado mini-exon. Em paralelo a esse processo, ocorre a poliadenilação na extremidade 3'.

O *T. cruzi* possui diferentes hospedeiros durante o seu ciclo. Para conseguir sobreviver em diferentes ambientes, o parasito necessita alterar precisamente a expressão de seus genes

codificantes para diferentes proteínas, através da modulação do seu genoma. As alterações na bioquímica e morfologia do parasito de um estágio do ciclo de vida para outro são resultado de mudanças programadas na expressão gênica como resposta às mudanças no meio externo do parasito (Saxena e cols., 2003).

Em 2003, Minning e colaboradores, utilizando a técnica de microarranjo de DNA caracterizaram alguns genes expressos especificamente durante a diferenciação de tripomastigotas para amastigotas. Das 4.400 sequências estudadas observaram 14 genes previamente identificados e 25 novos genes associados especificamente a forma amastigota. Muitos desses genes estão envolvidos na produção e *turnover* de proteínas, incluindo seis genes das etapas da síntese de proteínas, sete do endereçamento de proteínas, doze relacionados ao metabolismo, três do transporte, crescimento, divisão celular, um da síntese de DNA, um de RNA estrutural, além de oito genes identificados sem processo biológico estabelecido e dois genes não significantes na análise de sequências traduzidas do BLAST.

Outras abordagens relacionadas com a expressão diferencial de genes em *T. cruzi* têm sido feitas estudando níveis do mRNA através de técnicas moleculares. Entretanto, o controle da expressão gênica utilizando eventos pós-transcricionais em *T. cruzi* resulta em uma fraca correlação entre o níveis de mRNA e as respectivas proteínas codificadas, como também tem sido descrito para outros tipos celulares (Humphery-Smith e cols., 1997; Gygi e cols., 1999; Finzi e cols., 2004). Consequentemente, ferramentas que utilizem técnicas proteômicas tornaram-se fundamentais para estudos de padrões globais de expressão gênica (Hancock e cols., 1999; Tyers e Mann, 2003), uma vez que os mapas proteômicos obtidos representam as proteínas expressas na situação fisiológica em questão, suplantando as limitações encontradas nas técnicas de microarranjos, principalmente nos tripanossomatídeos onde a regulação ocorre após a transcrição.

Poucos fatores de transcrição têm sido identificados em tripanossomatídeos (Gunzl e cols., 2007; Hernandez-Rivas e cols., 2007). Enquanto alguns mostram clara identidade na sequência com seus ortólogos em levedura e vertebrados, outros apresentam um baixo grau de similaridade. Em relação à transcrição da RNA polimerase II, fatores de transcrição que participam da síntese do *spliced leader* RNA (SL RNA) foram identificados em *T. brucei*, como o TRF4 e o SNAPc (Schimanski e cols., 2005; Das e cols., 2005).

De fato, em tripanossomatídeos, somente um promotor foi descrito, da RNA pol II, apesar de tentativas repetidas em muitos laboratórios (Campbell e cols., 2003). Outros estudos têm implicado o processamento de mRNA, a repressão da tradução, o recrutamento de polissomos e a adaptação de códon, na regulação da expressão gênica nos kinetoplastídeos, os quais constituem processos que seriam previstos para explicar o papel da regulação da abundância de mRNA na determinação dos níveis de expressão de proteínas (McNicoll e cols., 2005; Jager e cols., 2007; Nardelli e cols., 2007; Horn, 2008). Além disso, estudos prévios de microarranjo em kinetoplastídeos têm revelado um número relativamente modesto de genes cujos transcritos são significativamente regulados (Duncan, 2004). Existem, entretanto, evidências de que os níveis de transcritos nesses parasitos são controlados pelo decaimento do mRNA, envolvendo 3'-UTRs e proteínas de ligação a RNA (Di Noia e cols., 2000; McNicoll e cols., 2005; Noe e cols., 2008).

Em 2010, Rodrigues e colaboradores, mostraram em *T. cruzi* que a meia-vida do mRNA do gen da proteína de choque térmico (HSP) 70 aumenta após o choque térmico, e sua estabilização é dependente da síntese de proteína. Através da técnica de decaimento de RNA e de transfecção, mostraram que ambas as regiões 3'-UTRs e 5'-UTRs (regiões não traduzidas) precisam estar presentes para aumentar a estabilidade do mRNA da HSP70 a 37°C, e parecem atuar cooperativamente para estabilizar o mRNA desse gen durante o choque térmico.

Pouco é sabido sobre a estrutura da cromatina e regulação epigenética em tripanossomatídeos (Belli, 2000; Horn, 2001; Masina e cols., 2007). Esses organismos possuem várias cópias de genes codificando histonas H1, H2A, H2B, H3 e H4 (Ivens e cols., 2005). As histonas em tripanossomatídeos são, entretanto, extremamente diferentes daquelas encontradas em outros organismos. Apesar disso, assim como em outros organismos, os nucleossomos constituem a unidade estrutural básica da cromatina nos tripanossomatídeos (Hecker e cols., 1994; Espinoza e cols., 1996), e a microscopia eletrônica mostra arranjos regulares de nucleossomos nesse grupo de parasitos. Interessantemente, os cromossomos não condensam durante a mitose como ocorre comumente em eucariotos superiores (Hecker e Gander, 1985; Martínez-Calvillo e cols., 2010)

Até o presente momento, o conhecimento sobre as sequências de DNA e proteínas que participam na iniciação da transcrição em tripanossomatídeos é limitado. Um melhor entendimento da forma como a expressão gênica é regulada nesses parasitos ajudaria a

compreender processos importantes como diferenciação, virulência e variação antigênica. Também ajudaria na descoberta de novos alvos chave no controle das infecções causadas por esses organismos (Vanhamme, 2008). Além disso, o estudo da transcrição e da regulação epigenética em eucariotos primitivos, como os tripanossomatídeos, ajudaria a compreender a evolução da maquinaria de transcrição e do código das histonas (Figueiredo e cols., 2009). Diversas evidências indicam que a transcrição de genes codificando proteínas nesses organismos, inicia *upstream* das características unidades poliestrônicas. Da mesma forma, recentes estudos funcionais indicam que existem mais fatores de transcrição gerais em tripanossomatídeos do que originalmente estimado, logo a transcrição nesses organismos não seria tão atípica como inicialmente pensado. A identificação de modificações e variantes das histonas nas origens de transcrição poliestrônica revelou que a estrutura da cromatina desempenha um papel importante na iniciação da transcrição em tripanossomatídeos, diferente de outros organismos. De forma similar, a terminação da transcrição é provavelmente influenciada por regulação epigenética mediada pela cromatina. Em um futuro próximo, estudos amplos sobre o genoma poderão fornecer mais dados interessantes que nos ajude a entender os mecanismos complexos de transcrição desse grupo especial de eucariotos (Talbert e Henikoff, 2009; Martínez-Calvillo e cols., 2010).

1.5 Os vetores da doença de Chagas

Os triatomíneos são insetos medindo de 1 a 4 cm de comprimento. Eles podem ser facilmente distinguidos de outros hemípteros por serem hematófagos e possuírem uma probóscida retilínea com apenas três segmentos. O *Triatoma infestans*, o *T. brasiliensis*, o *T. dimidiata*, o *Panstrongylus megistus* e o *Rhodnius prolixus*, são as espécies mais importantes na transmissão da doença (Jurberg e Galvão, 2006).

Os triatomíneos são classificados como uma subfamília de Reduviidae (Hemiptera, Heteroptera), definidos pelo seu hábito hematófago e adaptações morfológicas associadas com o encontro do hospedeiro e a alimentação com sangue (Coura e Dias, 2009). Como subfamília de Reduviidae, os triatomíneos são comumente classificados em cinco tribos e 15 gêneros (Lent e Wigodzinsky, 1979), embora vários outros arranjos tenham sido propostos (Carcavallo e cols., 2000; Galvão e cols., 2003). A maior parte dessas classificações tem sido baseada em

características morfológicas, embora comparações de caracteres citogenéticos e sequências de DNA genômicos tenham algumas vezes contestado essa abordagem. Existe muita dificuldade em chegar a uma classificação estável desse grupo.

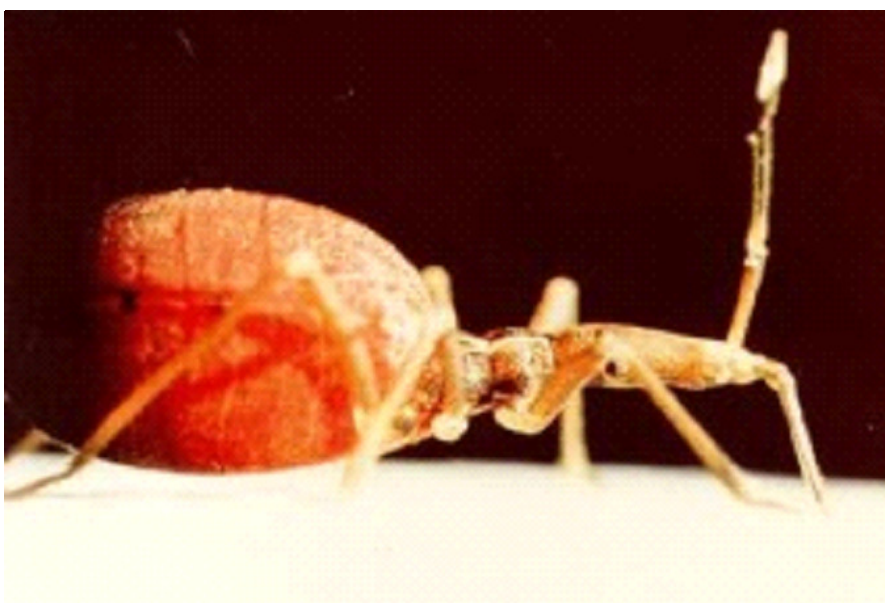
Mais de 130 espécies estão descritas como vetores em potencial. Todas são provavelmente capazes de transmitir o *T. cruzi*, embora relativamente poucas tenham significância epidemiológica como vetores do *T. cruzi* para humanos. Esses de grande importância são populações que têm se adaptado a viver em contato próximo com humanos, por exemplo, pela colonização de habitações rurais, embora estejam atualmente submetidas a uma série de intervenções de controle em larga escala, o que espera-se mudar radicalmente a distribuição e a importância relativa dessas espécies (Dias e cols., 2002; Schofield e cols., 2006; Schofield e Galvão, 2009).

No Brasil, foram descritas 52 espécies de triatomíneos, mas cinco com particular importância epidemiológica por serem domésticas: *T. infestans*, *P. megistus*, *T. brasiliensis*, *T. pseudomaculata* e *T. sordida*. As outras 47 espécies são silvestres e mantidas no ciclo natural, alimentando-se somente em mamíferos silvestres. O *T. infestans*, que é a única espécie estritamente doméstica, foi eliminada no Brasil, Chile e Uruguai, e sua erradicação ou controle em outros países da América do Sul está em progresso (Lent e Wigodinsky, 1979; WHO, 2002a; Coura, 2008).

Estes insetos hematófagos chegam a ingerir em sangue de 6 a 12 vezes o seu peso original (Figura 4), e em uma única alimentação normalmente ingerem cerca de 10 mM de heme ligado a hemoglobina. Esta grande quantidade de sangue é continuamente digerida através de uma grande variedade de proteinases liberando aminoácidos, peptídeos e heme.

A

www.selvas.org/newsAN0705.htm

B

www.fiocruz.br/ccs/glossario/chagas.htm

Figura 4 - Triatomíneos antes (A) e depois (B) do repasto sanguíneo.

1.6 Heme - estrutura e papel celular

O heme é uma metaloporfirina formada pela coordenação de um átomo de ferro à protoporfirina IX (Figura 5). Seu núcleo porfirínico possui pontes meteno, que unem os quatro anéis pirrólicos, formando um tetrapirrol de estrutura rígida e planar. Estas pontes meteno são denominadas α , β , δ e γ (Moore, 1980).

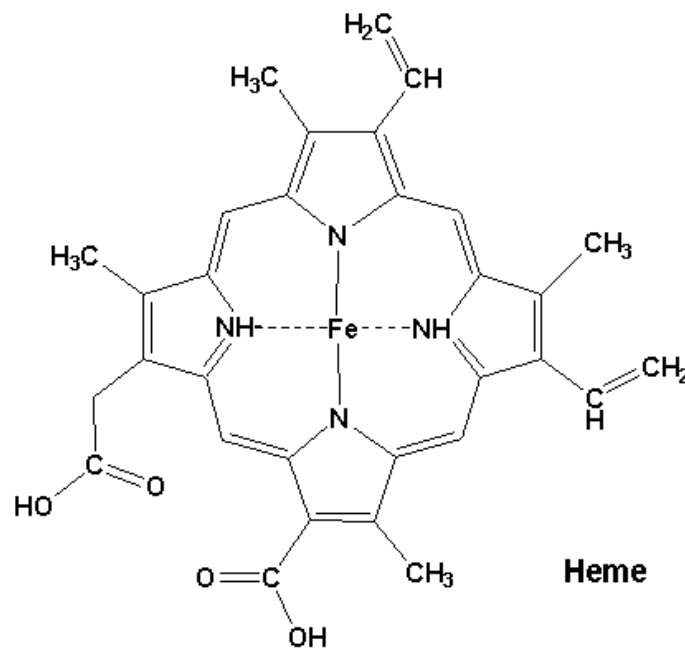


Figura 5 - Estrutura química do Heme (Fe-protoporfirina IX).

As conjugações entre os anéis pirrólicos são responsáveis pela cor característica e planaridade das protoporfirinas e derivados. A coordenação de metais divalentes como ferro, zinco e cobre aos átomos de nitrogênio determina a participação das protoporfirinas em processos metabólicos, que envolvem reações de oxi-redução, através da variação do estado redox destes átomos (Moore, 1980). O heme possui um átomo de ferro em seu núcleo. O átomo de ferro pode estar em seu estado oxidado Fe^{+3} (ferri-PP IX) ou estar em seu estado reduzido Fe^{+2} (ferro-PP IX).

Em hemeproteínas, o heme se encontra geralmente associado a cadeias polipeptídicas através da interação do átomo de ferro com resíduos de histidina ou metionina, como um ou dois ligantes axiais. Apenas duas das seis ligações coordenadas possíveis do átomo de ferro podem ser utilizadas em interações com ligantes, uma vez que, quatro coordenações estão comprometidas com a ligação do átomo de ferro com o heme.

O heme catalisa uma boa parte dos processos de oxidação nos sistemas biológicos, sendo muito importante nas funções celulares e na homeostase dos organismos. É o grupamento prostético de diversas proteínas envolvidas no transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), na respiração celular (citocromo c, citocromo c oxidase, e citocromo redutase), na detoxificação de drogas (enzima P450) e em defesas anti-oxidantes (catalases e peroxidases) (Mense e Zhang, 2006). Esta molécula também está envolvida no metabolismo de esteróides e com proteínas que participam da transdução de sinal, além de ser parte integral da cianocobalamina (vitamina B12), que está envolvida na hematopoese e outras funções celulares. Ainda atua como grupo prostético de nitroforinas (liberação de NO na saliva de insetos hematófagos), citocromo b5 (doador de elétrons), citocromo b558 (subunidade catalítica da NADPH oxidase), indoleamina 2,3-dioxigenase e triptofano 2,3 dioxigenase (metabolismo oxidativo de triptofano), cistationa b-sintase (condensação da L-serina e L-homocisteína em cistationina, e neuronal PAS2 (fator de transcrição de mamífero regulado por CO implicado na regulação do ritmo circadiano) (Gozzelino e cols., 2010).

Essas observações sugerem que o heme e as hemeproteínas estão envolvidas em funções básicas como sensibilidade a oxigênio, respiração celular e metabolismo, crescimento, renovação e diferenciação celular, todos necessários para sobrevivência de organismos. A hemina, a forma oxidada da Fe-Protoporfirina IX, é um promotor essencial do crescimento de progenitores hematopoéticos e potente indutor da transcrição do gene para globina (Tsiftoglou e cols., 2006).

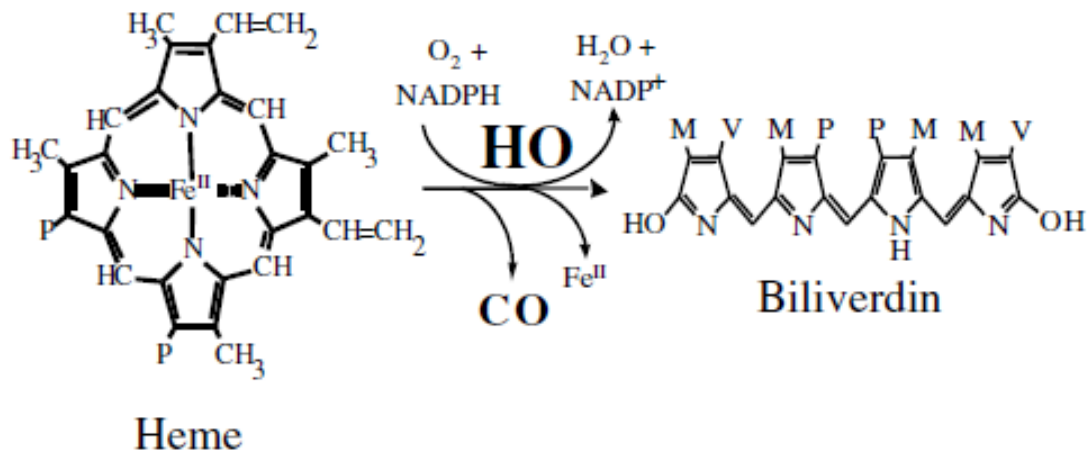
Estudos bioquímicos mostraram a ausência da via completa da biossíntese de heme em *T. cruzi* (Salzman e cols., 1982; Lombardo e cols., 2003), e isso foi corroborado com o recente sequenciamento do genoma de *T. cruzi*, onde oito enzimas da via clássica de biossíntese de heme, a partir da glicina, estão ausentes nesse organismo (El-Sayed e cols., 2005a). Portanto, a ausência de sua biossíntese torna o heme uma molécula essencial para esse parasito.

Diversas hemeproteínas auxiliam na síntese de moléculas reguladoras, como o óxido nítrico (NO sintase), hormônios esteróides (hidroxilases) e não esteróides. A guanilato ciclase,

também uma hemeproteína, participa da síntese de guanosina monofosfato cíclica (GMPC), importante mensageiro secundário dos sistemas biológicos (Fayadat e cols., 1999; Spiro, 2008). Além disso, a classe de hemeproteínas envolvidas com sinalização celular inclui ainda histidina quinases, fosfodiesterases, proteína quinase do fator eIF2 α (fator de iniciação da síntese proteica de eucarioto sensível a heme), e até fatores de transcrição com domínio básico de ligação com DNA responsivos à heme. O heme também está envolvido em sinalização de quinases e fatores de transcrição como fatores indutores de hipóxia (HIFs), Bach1, e outros como proteína antisense de HIV (HAPs) (Tsiftoglou e cols., 2006). Outras hemeproteínas são reguladas por heme como a δ -aminolevulinato sintase 1 (ALAS1), enzima limitante na síntese de heme, a proteína reguladora de ferro (IRP2), a ligação de heme induz oxidação, ubiquitinação e degradação, a DGCR8 (DiGeorge região crítica 8), proteína ligadora de RNA envolvida no processamento de microRNA, a ligação de heme é requerida para a função, e canal Slo1 BK, envolvida no transporte transmembrana de potássio, inibida por heme (Gozzelino e cols., 2010).

1.7 Heme Oxigenase

Um mecanismo intracelular importante de controle da homeostase do heme é sua degradação enzimática pela Heme Oxigenase microssomal (HO). A via de degradação de heme já é bem caracterizada em mamíferos. A HO catalisa a degradação do heme, numa reação dependente de oxigênio, em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro (Fe⁺²) (Figura 6) (Tenhunen e cols., 1969; Gozzelino e cols., 2010).



Retirado de Mancuso, 2004.

Figura 6 - Via de degradação do heme em mamíferos. Os substituintes são metil (M), vinil (V), e ácido propiônico (P).

Este foi o primeiro mecanismo fisiológico de degradação de heme caracterizado *in vivo*. A expressão dos genes *HMOX* na maioria dos organismos vivos sugere que essa reação enzimática apareceu cedo durante a evolução (Li e Stocker, 2009). Em 1968, Schmid e colaboradores descobriram atividades HO em microsomas do fígado, baço, rim e medula de ratos, e hoje é largamente aceito que a HO microsomal exerce um papel chave no catabolismo fisiológico do heme nos mais variados organismos (Kikuchi e cols., 2005). A reação da HO ocorre na presença de NADP/NADPH como poder redutor. A transferência de elétrons do NADPH para a enzima é mediada pela citocromo P-450 (Ortiz de Montellano, 2000).

A HO também é encontrada em plantas e bactérias. Em plantas, a biliverdina formada é utilizada na biossíntese de fitobilinas como ficobilinas e fitocromobilinas (Muramoto e cols., 2002). Fitocromobilinas são precursores dos cromóforos dos fitocromos de plantas superiores. A HO de plantas catalisa uma reação semelhante à reação em mamíferos, exceto pelo fato do agente redutor ser a ferredoxina reduzida (algas vermelhas e cianobactérias possuem uma HO solúvel, que converte o heme em biliverdina IX α) (Dammeyer e Frankenberg-Dinkel, 2008).

Para suprir a falta de ferro no meio extracelular, a bactéria patogênica *Corynebacterium diphtheriae* se utiliza da enzima Hmu O, que possui atividade heme oxigenásica, para degradar o heme captado do meio extracelular. Através deste mecanismo o patógeno obtém ferro do heme do hospedeiro. A Hmu O não está associada a membranas e possui massa molecular menor do que a HO de humanos (24 kDa) (Yoshida e Migita, 2000).

Genes homólogos a HO da bactéria gram negativa *Neisseriae meningitidis*, a nmHO, foram identificados em mais de seis espécies de gênero *Neisseriae*, apoiando a hipótese de que algumas bactérias adquirem ferro através da degradação de heme (Zhu e cols., 2000; Mocny e cols., 2007).

Em mamíferos, biliverdina IX α é convertida em bilirubina IX α pela ação da enzima biliverdina redutase (Tenhunen e cols., 1970(a)). Fisiologicamente, a biliverdina não é detectada em mamíferos, visto que é rapidamente convertida em bilirubina. A bilirubina é removida da circulação pelos hepatócitos, onde é conjugada a duas moléculas de ácido glucurônico, glicose ou xilose para excreção (Tenhunen e cols., 1969; Stocker e cols., 1990).

Outros animais como aves, répteis, anfíbios, alguns peixes e insetos apresentam a biliverdina como produto final da degradação de heme, diferente dos mamíferos, nos quais o produto final desta via é a bilirubina (Urich, 1990).

Na degradação enzimática do heme, as HOs de mamíferos, plantas e a maioria das HOs descritas em bactérias geram apenas o isômero α de biliverdina IX. Estas enzimas possuem uma alta especificidade quanto a quebra da ponte meteno α do anel porfirínico do heme (Ortiz de Montellano, 2000).

Apesar de a maioria dos organismos possuir o isômero alfa de biliverdina, já foram encontrados *in vivo* outros isômeros de biliverdina, como biliverdina IX γ no tegumento, hemolinfa e em ovos de insetos (McDonagh 2001), e a dicisteinil-BV IX γ de *Rhodnius prolixus* (Paiva-Silva e cols., 2006); biliverdina IX β encontrada durante o desenvolvimento fetal de mamíferos (Yamaguchi e Nakajima, 1995), biliverdina IX δ encontrada primeiramente no ovário de *Turbo cornatus*, um molusco marinho (Benedickt e cols., 1988), e a biliverdina IX α modificada de *Aedes aegypti*, a biglutamil-biliverdina IX α (Pereira e cols., 2007).

Nos últimos anos, foram descritas duas enzimas que produzem isômeros de biliverdina distintos do isômero α *in vitro*: a HO recombinante da bactéria *Pseudomonas aeruginosa*, a pa-

HO e a HO recombinante de *D. melanogaster*, a DmHO (Ratliff e cols., 2001; Caignan e cols., 2002; Friedman e cols., 2004; Zhang e cols., 2004).

A *pa*-HO produz os isômeros β e δ de biliverdina IX. A cristalização da enzima permitiu ver que no seu sítio ativo, o posicionamento do heme é distinto do posicionamento nas HO de mamíferos e outras bactérias, direcionando a quebra do anel porfirínico para as pontes meteno β e δ (Ratliff e cols., 2001; Caignan e cols., 2002; Friedman e cols., 2004).

Já a DmHO, recentemente expressa em *E. coli*, produz outros dois isômeros, além do isômero α de biliverdina (75%), os isômeros β e δ (25%) (Zhang e cols., 2004). Entretanto, as razões pelas quais esse mecanismo ocorre ainda não foram esclarecidas.

É sabido que a expressão de HO exerce um papel citoprotetor numa variedade de tipos celulares. Os efeitos benéficos dessa indução parecem ser devido tanto à produção aumentada de biliverdina e bilirrubina, que são potentes antioxidantes, como à diminuição da concentração de heme livre, um potente pró-oxidante. Tem sido mostrado que o estresse oxidativo causa uma maior injúria celular endotelial em pacientes com deficiência em HO-1. Mecanismos relacionados a HO parecem exercer papéis importantes em diversos aspectos de diferentes doenças (Balla e cols., 2005; Soares e Bach, 2009).

O interesse na HO tem sido ampliado, de sua função metabólica à função protetora da enzima e seus produtos do catabolismo de heme em uma variedade de condições associadas ao estresse oxidativo (Perrella, 2007; Gozzelino e cols., 2010).

1.7.1 Isoformas de Heme Oxigenases

Três isoformas de HO já foram caracterizadas em diversos mamíferos, denominadas HO 1, 2 e 3 (HO-1, HO-2 e HO-3, respectivamente). Estas isoformas são produto de três genes distintos (Galbraith, 1999).

A HO-1 possui 32 kDa e é muito expressa em células ricas em retículo endoplasmático como as células do fígado, pulmão e principalmente as do baço. Nestes órgãos, a degradação de heme está envolvida com a destruição dos eritrócitos senescentes (Tenhunen e cols., 1970a). A expressão desta isoforma é induzida em situações de estresse, como na presença de metais pesados, radiação UV, variações nos níveis de O_2 , acidose, excesso de H_2O_2 e heme (Maines, 1997; Galbraith, 1999; Christou e cols., 2005). Inicialmente, esta isoforma foi denominada Hsp32

e devido à sua indução por hipotermia foi considerada uma proteína da família de proteínas de choque térmico (Ryter e Tyrrell, 2000).

A atividade de HO-1 no fígado e em outros órgãos é marcadamente aumentada pela administração de hemina ou hemoglobina em animais (Tenhunen e cols., 1970b; Shibahara e cols., 1978; Shibahara e cols., 1979). A indução da HO-1 é devido ao término da repressão do gene HO-1 pelo heme através da ligação ao repressor traducional, Bach1 (Ogawa e cols., 2001).

A enzima HO-2 possui 36 kDa, é expressa constitutivamente e foi encontrada primeiramente nos testículos e em algumas regiões do cérebro, e está presente também no endotélio vascular e no tecido muscular liso adjacente aos vasos. A atividade desta enzima parece estar relacionada com a produção de CO, principalmente no cérebro, atuando como neurotransmissor (Maines, 1997).

A HO-2 tem 20 aminoácidos extras na porção N-terminal comparado com a HO-1. A similaridade de aminoácidos entre estas duas isoformas é de 43%, mas existem vários trechos de seqüências extremamente conservadas em termos de estrutura secundária (Yoshida e Migita, 2000). HO-1 e HO-2 catalisam a mesma reação, mas diferem na estrutura primária, peso molecular e termoestabilidade (Ryter e Tyrrell, 2000).

Um terceiro tipo de Heme Oxigenase (HO-3) foi descrito no cérebro de ratos. A HO-3 é uma proteína de 33 kDa codificada por um transcrito de 24 kb e expressa constitutivamente em fígado, baço, rim e cérebro de ratos. A HO-3 possui 90% de homologia de seqüência com a HO-2, mas apresenta baixa atividade catalítica de heme (McCoubrey Jr e cols., 1997). Entretanto, não foi encontrado gene de HO-3 funcional em ratos; o gene da HO-3 parece derivado de transcritos processados do gene de HO-2 (Hayashi e cols., 2004). HO-2 e HO-3 possuem dois sítios adicionais de ligação de heme, identificados como domínios regulatórios de heme (HRD-heme regulatory domain) (Galbraith, 1999; Ryter e Tyrrell, 2000). A regulação da expressão do gene da HO-3 e sua síntese ainda é pouco entendida, e seu possível papel na fisiologia e patologia ainda precisa ser esclarecido.

HO-1, HO-2 e Hmu O possuem a estrutura dos sítios ativos bastante similar e têm mecanismos semelhantes de degradação de heme. O mecanismo de quebra de heme, obtido nos estudos da HO-1, pode ser aplicado às duas outras enzimas: HO-2 e Hmu O (Yoshida e Migita, 2000).

1.7.2 Regulação do gene Heme Oxigenase-1 (*HO-1*)

Em cultura de células humanas, a expressão de HO-1 pode ser reprimida por hipóxia ou pelo tratamento com interferon- γ ou deferoxamina; interessante, a repressão da expressão de HO-1 parece ser específica para células humanas porque os mesmos repressores podem induzir a expressão dessa isoforma em cultura de células de roedores (Shibahara, 2003). Por outro lado, a HO-2, a forma constitutiva, é responsiva a fatores de crescimento, opiáceos, glicocorticóides adrenais, e óxido nítrico (NO) (Maines, 1992; Maines, 1997). Apesar das duas isoformas de HO catalisarem a mesma reação, estas possuem diferentes papéis na proteção tecidual contra injúrias. Baseado em diversas linhas de evidência, a hipótese mais convincente sugere que a indução de HO-1 é uma das primeiras respostas celulares a danos teciduais e é responsável pela rápida transformação do prooxidante heme em CO e bilirrubina (BR), duas moléculas com atividades antiinflamatória e antioxidante. E de outra forma, a HO-2, constitutivamente expressa, é primariamente envolvida na manutenção da homeostase de heme e na prevenção de dano mediado por NO (Maines e Panahian, 2001).

Recentemente, Shibahara e colaboradores focaram sua atenção na repressão da expressão de HO-1 como uma estratégia de defesa desenvolvida em humanos (Shibahara e cols., 2003). Essa idéia reforçou a descoberta concomitante de Bach-1/Bach-2 como repressores da transcrição do gene da HO-1 (Oyake e cols., 1996). Bach-1 é um fator de transcrição amplamente expresso em tecidos de camundongos e humanos, incluindo cérebro, e camundongos deficientes em Bach-1 têm superexpressão do gene da HO-1 em muitos tecidos, incluindo cérebro (Sun e cols., 2002). Além disso, Bach-1 é induzido em cultura de células humanas por hipóxia, interferon- γ , e deferoxamina, os quais são repressores da expressão de HO-1 (Oyake e cols, 1996; Shibahara, 2003).

A análise por deleção do promotor *HO-1* de camundongo revelou dois elementos ativadores (*enhancers*) E1 e E2, localizados a -4 kb e -9 kb do quadro de leitura aberto de *HO-1*, semelhantes aos elementos envolvidos na ativação da transcrição de *HO-1* por heme. Cada uma das duas regiões *enhancers* contém múltiplos elementos de resposta ao estresse que se assemelham as seqüências de reconhecimento para a oncoproteína v-Maf (MARE, elemento de reconhecimento de Maf), e NF-E2, um fator de transcrição específico de eritrócito.

Existem três pequenas proteínas que compõe a família Maf: MafF, MafG e MafK, que estão envolvidas em vários fatores fisiológicos, incluindo o desenvolvimento, a diferenciação, a hematopoese e a resposta ao estresse. Heterodímeros de Nrf2 (um membro da família p45 NF-E2) e proteínas MafK têm sido implicados na ativação do gene de *HO-1* de camundongo por heme, Zn e *tert*-butilhidroquinona.

As proteínas MafK também formam heterodímeros com fatores de transcrição da família Bach (Bach1 e Bach2) mas, ao contrário dos heterodímeros formados com Nrf2, os heterodímeros formados com Bach1 (e apenas com Bach1) funcionam como repressores de *HO-1* (Oyake e cols., 1996; Igarashi e cols., 1998; Muto e cols., 1998). De considerável interesse é que a transcrição de *HO-1* é regulada negativamente pela ligação de heme a Bach1 *in vitro* (Ogawa e cols., 2001). Isto ocorre porque a ligação de heme a proteína Bach impede sua associação a MafK, evitando que o complexo Bach/MafK se ligue a MARE, prevenindo assim a transcrição (Figura 7).

A predição de que Bach1 agiria como um repressor *in vivo* tem sido confirmada para o gene *HO-1* de camundongo (Sun e cols., 2002). A expressão basal de *HO-1* promovida pelos *enhancers* E1 e E2 foi reprimida pela super expressão de Bach1 e a adição de heme aboliu esta repressão. Recentes estudos usando imunoprecipitação de cromossomos (ChIP) têm claramente identificado o heme como um fator regulatório no centro da Maf regulatória envolvendo uma troca dinâmica na ocupação dos sítios de MARE por proteínas Bach e Nrf2 ligadas a Maf (Sun e cols., 2004).

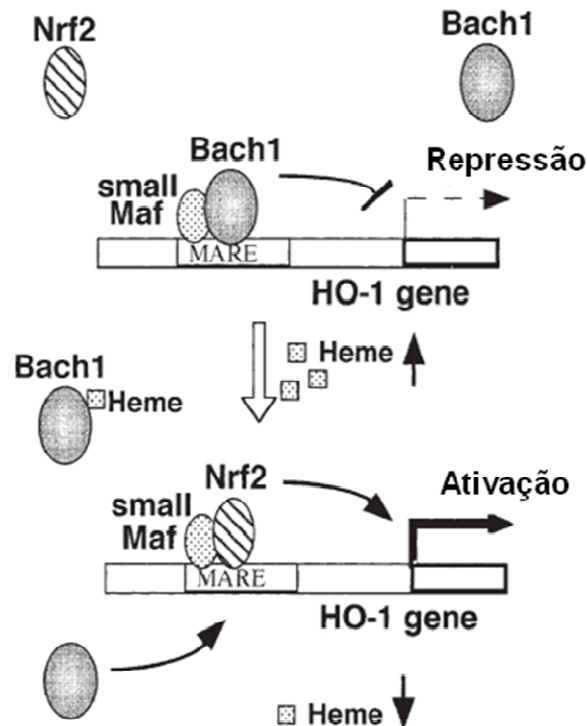


Figura 7 - Regulação do gene Heme Oxigenase (Shibahara, 2003).

Portanto, Bach-1 tem um importante papel no metabolismo de heme, funcionando como um sensor, controlando a expressão da HO-1 através de uma regulação por *feedback*, reprimindo ou ativando a sua transcrição, dependendo da disponibilidade de heme. A repressão da expressão da HO-1 pode ser útil em muitas situações porque diminui a necessidade de energia para a degradação de heme e previne o acúmulo local de CO, ferro e biliverdina; além disso, a repressão da HO-1 pode diminuir o suplemento de ferro para células cancerosas ou patógenos, como bactérias e protozoários, os quais requerem ferro como essencial cofator para proliferação celular (Shibahara, 2003; Zenke-Kawasaki e cols., 2007).

A atividade HO também é regulada pela biliverdina redutase (BVR), que reduz BV, produto inibitório da atividade oxigenase, em bilirrubina (Ewing e Maines, 1995). A BVR era considerada uma proteína não-induzível, mas recentemente foi mostrado que a redutase pode ser induzida pós-transcricionalmente por LPS e bromobenzeno (Ewing, 1993; Maines e cols., 2001).

1.7.3 HO - Mecanismo de catálise

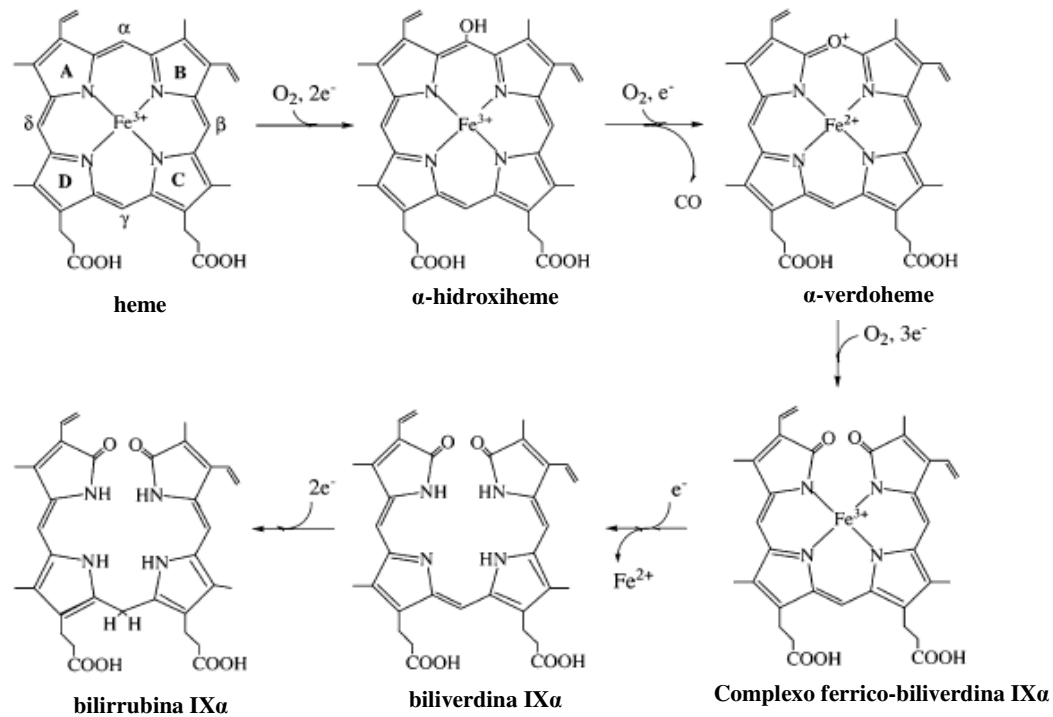
A HO quebra o anel porfirínico da molécula de heme, gerando uma molécula de biliverdina IX α , uma molécula de monóxido de carbono (CO) e um átomo de ferro livre (Tenhunen e cols., 1969).

A HO é uma proteína que liga heme de forma 1:1, formando um complexo (Yoshida e Kikuchi, 1978; Yoshida e Kikuchi, 1979). A reação de degradação do heme catalizada pelo sistema HO é essencialmente muito similar à decomposição de heme pela chamada oxidação acoplada da mioglobina ou hemoglobina com ácido ascórbico (Yoshida e Kikuchi, 1975; Kikuchi e cols., 2005).

A reação de oxidação do heme ocorre basicamente em três etapas. O heme é primeiramente oxidado em α -meso-hidroxiheme, consumindo uma molécula de oxigênio e utilizando-se do poder redutor gerado pelo sistema NADPH-citocromo-P450-redutase. Nesta reação, o oxigênio molecular se liga ao átomo de ferro da molécula de heme, formando um peróxido altamente reativo que irá atacar uma das pontes meteno do anel porfirínico (Figura 8). O direcionamento deste ataque, ou seja, qual ponte meteno será oxidada, é determinado pelo posicionamento da molécula de heme no sítio ativo da enzima. No caso das HOs clássicas, o ataque do peróxido formado é direcionado para a ponte meteno α (carbono meso α). Desta forma, a molécula de heme serve tanto como substrato, quanto como grupo prostético para a HO (Ortiz de Montellano, 2000; Yoshida e Migita, 2000).

O α -meso-hidroxiheme, em seu estado desprotonado, adquire caráter parcial de radical livre através da transferência do elétron do oxigênio para o átomo de ferro. Esta espécie reage com outra molécula de oxigênio para formar verdoheme e CO. Esta etapa da reação não requer doadores de elétrons (Figura 8).

O verdoheme é, então, convertido em biliverdina e um átomo de ferro é liberado. Esta última etapa consome mais uma molécula de oxigênio e requer o poder redutor gerado pelo sistema NADPH-citocromo-P450-redutase (Ortiz de Montellano, 2000).



Retirado de Kikuchi e cols., 2005.

Figura 8 - Sequência de reações catalisadas pelas Heme Oxigenases. A reação do heme a biliverdina IX α é catalisada pela HO, e biliverdina IX α a bilirrubina IX α catalisada pela biliverdina redutase. A, B, C e D representam os anéis pirrólicos do heme, e α , β , γ e δ , representam os meso-carbonos do heme.

Como já dito acima, é a posição do heme dentro do sítio ativo da enzima, que determina qual ponte meteno deve ser quebrada, ou seja, determina a formação de α , β , δ ou γ -meso-hidroxi-heme, como primeiro intermediário da reação. A formação da espécie α -meso-hidroxi-heme é o processo que determina a formação do isômero α de biliverdina. No sítio catalítico da enzima de mamíferos, apenas o carbono α -meso está acessível para a formação do hidroperóxido de ferro. A proteína obstrui estericamente o acesso aos carbonos β , γ e δ (Ortiz de Montellano, 2000).

Os propionatos da molécula de heme são muito importantes para o correto posicionamento do carbono α -meso para hidroxilação. O sítio catalítico da HO possui resíduos polares que interagem com os propionatos do heme, posicionando-o para quebra exclusiva na ponte meteno α . No caso da HO humana, estes resíduos correspondem: a lisina (Lys)-16 e a tirosina (Tyr)-137 (Schüller e cols., 1999).

Já a enzima encontrada em *Pseudomonas aeruginosa*, a *pa*-HO não possui estes resíduos polares, que são substituídos pelos resíduos asparagina (Asn)-19 e fenilalanina (Phe)-117. A ausência das interações estabilizadoras entre os resíduos polares da enzima e os propionatos da molécula de heme levam a um rearranjo do posicionamento desta molécula. Este novo posicionamento leva à quebra das pontes meteno δ e β , produzindo biliverdina IX δ (70%) e biliverdina IX β (30%), respectivamente (Ratliff e cols., 2001; Caignan e cols., 2002).

Outra enzima distinta das HOs clássicas foi caracterizada recentemente em *D. melanogaster*, a DmHO. Esta foi a primeira descrição de uma HO em insetos. Expressa em *E. coli*, a enzima produz outros dois isômeros além do isômero α de biliverdina (75%), os isômeros β e δ (25%). O resíduo Phe-37 da HO-1 de mamíferos, que corresponde a Phe-50 na DmHO, possui um papel importante na interação com a posição α -meso da molécula de heme e é bastante conservado na maioria das HOs descritas, estando presente nesta enzima. A maioria dos aminoácidos, de alguma forma, importantes nas HOs de mamíferos são também encontrados na DmHO, com exceção da Asp-140, por exemplo, envolvido no mecanismo de ativação do oxigênio molecular. O fato da DmHO produzir também isômeros β e δ , sugere que a estrutura do sítio de ligação do heme desta enzima deva apresentar diferenças quando comparado ao sítio da HO de mamíferos (Zhang e cols., 2004).

Apesar das semelhanças, a DmHO é diferente das outras HOs. O complexo de ligação da DmHO com a molécula de heme não envolve o resíduo de histidina como o ligante proximal e o átomo de ferro não está envolvido na formação do complexo. Além disso, a liberação do átomo de ferro da molécula de biliverdina ao final da reação ocorre de forma mais lenta que nas outras HOs. É interessante ressaltar a capacidade da DmHO degradar heme em biliverdina apesar de não haver ligação do átomo de ferro da molécula de heme com a enzima (Zhang e cols., 2004). O mesmo parece acontecer com a HmuO, quando substitui-se a His-20 por uma Ala. A falta da histidina proximal para a ligação do heme através do ferro da molécula não interfere em sua quebra (Wilks e Moenne-Loccoz, 2000).

1.7.4 HO em insetos hematófagos e parasitos - Vias alternativas de degradação de heme

Quase todos os casos descritos de quebra do anel de heme pela Heme Oxigenase produz a Biliverdina IX α (BV IX α). Uma das exceções é o *Rhodnius prolixus*, um dos insetos vetores de

T. cruzi, que cliva o anel porfirínico na posição γ -meso. A biliverdina de *Rhodnius* (RpBV) é uma BV IX γ conjugada a dois resíduos de cisteína (adicionados aos grupos vinilas), gerando a dicisteinil-BV IX γ (Paiva-Silva e cols., 2006).

Foi proposto que o catabolismo de heme em *R. prolixus* (Figura 9) envolve três passos distintos: (1) modificação do heme por duas adições consecutivas de dipeptídeos cisteinilglicina ou glutatona, no último caso, seguida da remoção dos resíduos glutâmicos; (2) clivagem oxidativa do anel porfirínico de dicisteinilglicina-heme para dicisteinilglicina-BV IX γ ; e (3) hidrólise do peptídeo cisteína-glicina por uma peptidase, liberando o produto final RpBV, uma dicisteinil-BV IX γ . A determinação desta estrutura sugere que o sítio ativo da HO de *Rhodnius* apresenta uma conformação diferente no seu sítio ativo capaz de acomodar as modificações sofridas pela molécula de heme (Paiva-Silva e cols., 2006).

Em 2007, Pereira e colaboradores descreveram a via de degradação do heme no mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor na transmissão da dengue, e mostraram que em contraste com o *R. prolixus*, envolve a clivagem oxidativa do heme sem modificações prévias, no carbono α -meso. Entretanto, diferente de todos os outros organismos previamente descritos, a biliverdina produzida nessa reação é modificada posteriormente pela conjugação de dois resíduos de glutamina, levando a formação de uma biglutamil-biliverdina IX α excretável.

Nos insetos hematófagos, *R. prolixus* e *A. aegypti*, a biliverdina não está associada a proteínas. Nesses insetos, os produtos finais da degradação de heme são biliverdinas conjugadas a aminoácidos específicos, cisteína e glutamina respectivamente (Paiva-Silva e cols., 2006; Pereira e cols., 2007). A adição de aminoácidos à estrutura da biliverdina torna essa molécula um composto mais solúvel, mais fácil de ser excretado. Esses estudos sugerem que a degradação de heme em insetos hematófagos pode ter características únicas relacionadas à necessidade de uma eficiente remoção de grandes quantidades de biliverdina, produzida após a digestão de sangue. De fato, mamíferos excretam bilirrubina através de sua conjugação com resíduos de ácido glicurônico. Falhas nesse processo causam icterícia e desordens neurológicas na síndrome Crigler-Najar (McDonagh, 2001). De acordo com isso, essas modificações nos pigmentos da bile podem representar um caso evolutivo convergente num esforço comum de evitar distúrbios na membrana e citotoxicidade por esses produtos hidrofóbicos da degradação de heme (Graça-Souza e cols., 2006).

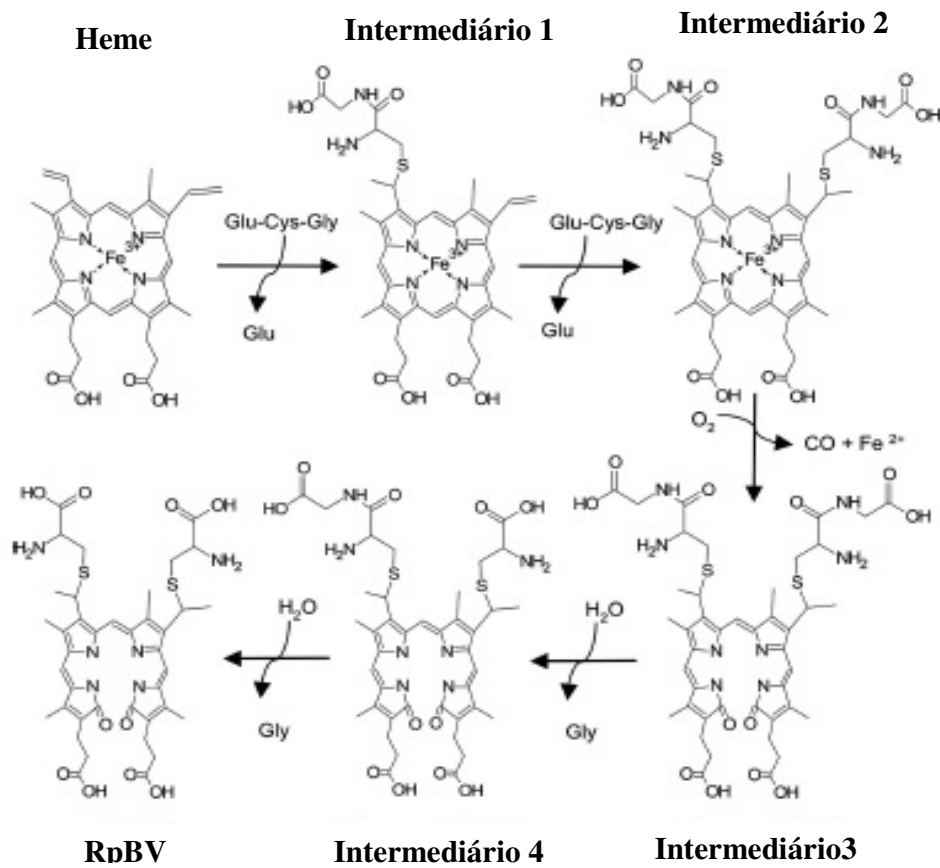


Figura 9 - Via proposta para a degradação de heme em *R. prolixus* (Paiva-Silva e cols., 2006).

É razoável especular que a degradação de heme em insetos tem um papel antioxidante, não só pela remoção do heme livre pró-oxidante mas também devido às propriedades antioxidantes da biliverdina (Graça-Souza e cols., 2006). Contudo, a degradação de heme é supostamente protetora somente quando acoplada à eficiente remoção de ferro pela ferritina, de maneira a evitar a produção de espécies reativas de oxigênio pela reação de fenton (Ryter e Tyrrell, 2000).

O sistema de degradação enzimática do heme em parasitas protozoários é desconhecida. Foi mostrado recentemente uma HO de *Plasmodium falciparum*, protozoário do filo Apicomplexa, a PfHO. Esse estudo mostra que o mecanismo de clivagem de heme é conservado no parasito da malária humana, *P. falciparum*, e que a clivagem de heme resulta na produção de bilirrubina IX α (BR IX α). A PfHO é uma enzima com dupla atividade: HO e BVR. Além disso, a

localização plastidial da enzima sugere a ferredoxina reduzida (Fd) como doador de elétrons (Okada, 2009).

A enzima recombinante PfHO foi purificada usando sistema de expressão em *E. coli*, e a reação catalizada por essa enzima caracterizada com Fd. Os resultados mostraram que essa enzima realmente depende de uma Fd reduzida, além da presença de um quelante de ferro para sua atividade máxima. Essa dependência de um quelante de ferro foi visto primeiramente para a HO de *Arabidopsis thaliana* e acredita-se que o quelante seja requerido para a liberação do ferro do complexo ferrico-BV (Muramoto e cols., 2002). Em ambos os casos, a deferoxamina é o quelante mais eficiente (Rhie e Beale, 1995; Muramoto e cols., 2002).

Em adição, a PfHO pode catalisar a formação de BR IX α a partir de heme e obtém um perfil de espectro de absorção similar ao obtido com a HO e BVR de cianobactéria. Isso sugere que apesar da seqüência de aminoácidos da PfHO não ser muito similar às seqüências de HO e BVR, a conversão metabólica de heme a BR IX α é conservada (Okada, 2009). O mecanismo proposto da reação de clivagem do heme pela HO/BVR está mostrado na Figura 10.

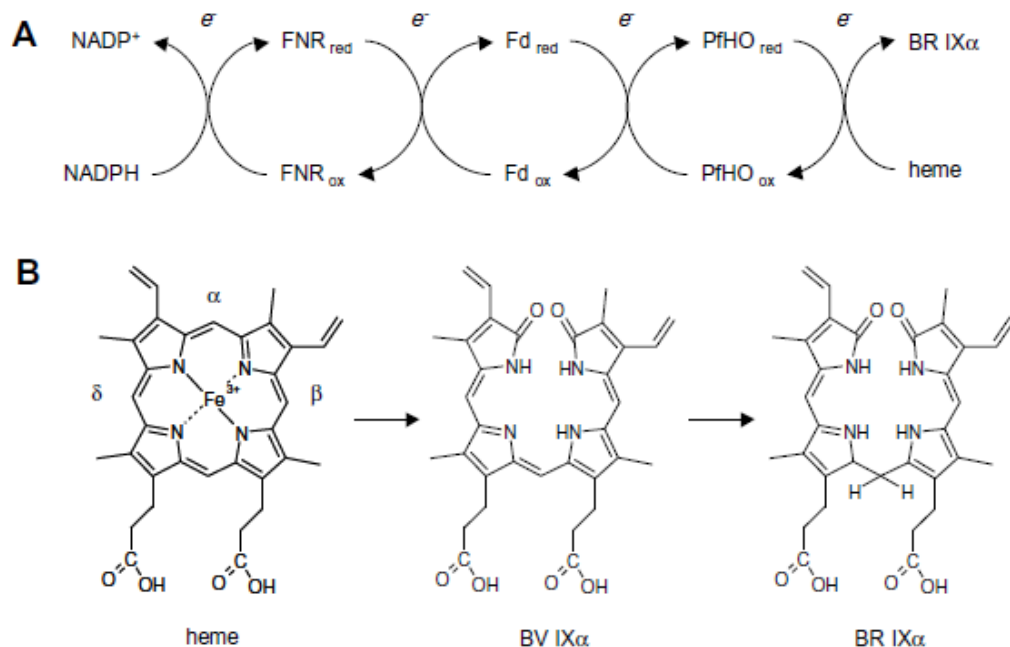


Figura 10 - Mecanismo proposto da síntese de bilirrubina IX α a partir de heme mediado pela PfHO (Okada, 2009).

Apesar de não ter sido encontrada nenhuma típica seqüência de HO no genoma de *Trypanosoma cruzi* (El-Sayed e cols., 2005a), resultados iniciais do nosso laboratório demonstram a presença de biliverdina, principal metabólito de heme, neste protozoário, através de espectrofotometria e cromatografia líquida de alta performance (HPLC). O mecanismo de detoxificação de heme ainda é completamente desconhecido em tripanossomatídeos, mas a existência da molécula de biliverdina em *T. cruzi* nos faz crer na existência de uma atividade funcional de Heme Oxigenase. Demonstrar a existência desta proteína tão própria do parasito, é de grande importância, visto seu grande potencial para tornar-se um alvo quimioterápico.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

O presente trabalho utilizou um coquetel de inibidores de proteases composto por: AEBSF, aprotinina, leupeptina, bestatina, pepstatina A e E-64, assim como ácido etilenodiamino tetracético (EDTA), ácido etilenoglicol tetracético (EGTA), Triton X-100, Hepes, SDS, Tris, glicina, acrilamida, agarose, TEMED, dimetilsulfóxido (DMSO), coomassie Blue G-250, bicarbonato de amônio, iodacetamida, ácido fórmico, anticorpo secundário anti-camundongo acoplado a partículas de ouro coloidal 5 nm e 10 nm e anticorpo policlonal anti-tubulina (SIGMA-ALDRICH, MO, EUA). Utilizou-se também hemina (Heme-Cl), SnPPIX, CoPPIX, Biliverdina (PORPHYRIN PRODUCTS, Logan, UT), BHI (DIFCO, Sparks, MD, EUA) e SFB (CULTLAB, São Paulo, Brasil). Padrão de peso molecular pré-corado SeeBlue® (250, 98, 64, 50, 36, 30, 16, 6 e 4 kDa), Kit Taq polimerase, corante SYBR® *safe DNA gel stain* e dNTP mix (INVITROGEN CORPORATION, Califórnia, EUA), leite desnatado (Nestlé, São Paulo, Brasil), Ditiontreitol (DTT), anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho, *hyperfilm* e Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amershan Biosciences, Sunnyvale, CA, EUA), anticorpo monoclonal contra a HO-1 (Stressgen Biotechnologies, Victoria BC, Canada), etanol e metanol (MERCK, NJ, EUA). Sulfato de amônio, água (grau cromatográfico) e acetonitrilo (J.T.Backer, NJ, EUA), ácido fosfórico (Tedia Company Inc, Fairfield, EUA) e tripsina (Promega, MA, EUA). Proteína A/G plus agarose (SANTA CRUZ, CA, EUA). Kit Big Dye Terminator v3.1 (AB Applied Biosystems, EUA). Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

2.2 Parasitos

A cepa Dm28c (CT-IOC-010) foi obtida da coleção de tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz e criopreservada em nitrogênio líquido (-196°C). Subculturas de epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas a 28°C (câmara de incubação B.O.D – Modelo 347 CD, São paulo, Brasil) durante sete dias em meio BHI suplementado com hemina 30 µM e 10% de SFB. As culturas foram colocadas em garrafas de 50 mL (25 cm²), com uma densidade de 2 - 3 x 10⁷

organismos/mL em 5 mL de meio, sendo a manipulação das células feita em câmara de fluxo laminar (modelo FLV, série 301, Trox do Brasil, Ltda). Posteriormente, o crescimento foi monitorado pela contagem em câmara de Neubauer em microscópio invertido com contraste de fase (modelo CK2, Olympus, Japão) para utilização nos experimentos.

2.3 Preparação dos parasitos para os ensaios de proliferação

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (5×10^5 parasitas), obtidos no 7º dia de crescimento, em meio BHI suplementado com hemina 30 μM e 10% SFB, foram centrifugados por 3 minutos a 2350 x g, a temperatura ambiente (centrífuga universal refrigerada, modelo HERMLE Z 323 K, Alemanha) e lavados duas vezes em BHI sem adição de hemina, e transferidas para BHI contendo 10% de SFB.

2.4 Efeito do SnPPIX na proliferação do parasito

Os parasitos foram mantidos em cultura por 7 dias na presença de diferentes concentrações de SnPPIX (0, 3 μM , 30 μM , 100 μM e 1 mM, inibidor da HO-1), e seu crescimento monitorado pela contagem em câmara de Neubauer. Para testar o efeito do SnPPIX na presença de heme, os parasitos foram mantidos por 12 dias em cultura na presença ou na ausência de heme 30 μM bem como na presença ou na ausência de SnPPIX (30 ou 100 μM). Nos grupos SnPPIX + heme, houve pré-tratamento com SnPPIX por 20 minutos antes da adição de heme.

2.5 Efeito da biliverdina na proliferação do parasito

Os parasitos foram mantidos em cultura por 5 dias na presença ou na ausência de heme 30 μM bem como na presença ou na ausência de diferentes concentrações de biliverdina (0,30 μM , 100 μM e 300 μM). Para testar o efeito da biliverdina após pré-tratamento com SnPPIX, os parasitos foram mantidos em cultura por 5 dias na presença ou na ausência de heme 30 μM bem como na presença ou na ausência de biliverdina (100 μM) e SnPPIX (100 μM , inibidor da HO-1).

Nos grupos tratados com SnPPIX, houve pré-tratamento por 20 minutos antes da adição de heme e/ou BV.

2.6 Efeito do CoPPIX na proliferação do parasito

Os parasitos foram cultivados por 5 dias na presença ou na ausência de heme 30 μ M bem como na presença ou na ausência de CoPPIX 30 μ M (indutor da HO-1).

2.7 Preparo das amostras para *Immunoblotting*

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidos no 7º dia de crescimento, em meio BHI suplementado com hemina 30 μ M e 10% SFB, foram centrifugados (2350 x g por 3 minutos, temperatura ambiente) e lavados duas vezes em BHI sem adição de hemina, transferidos para BHI contendo 10% de SFB, e tratados por 5 dias na presença de diferentes concentrações de hemina (0,30 μ M, 100 μ M e 300 μ M), CoPPIX (30 μ M), SnPPIX (100 μ M) ou biliverdina (100 μ M). Após o período de incubação, estes parasitos foram, então, centrifugados, lavados duas vezes em tampão fosfato de potássio 100 mM NaCl 150 mM pH 7,4 (PBS), e o sedimento foi ressuspensão em tampão de lise (Hepes 50 mM, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 1%, EDTA 10 mM; pH 6,4) na presença de coquetel de inibidores de proteases (AEBSF 1,04 mM, aprotinina 800 nM, leupeptina 20 μ M, bestatina 40 μ M, pepstatina A 15 μ M e E-64 14 μ M). Para o experimento de imunoprecipitação os parasitos foram ressuspensos em tampão de lise específico (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, contendo NaCl 150 mM, EDTA 5 mM e NaF 10 mM), na presença de coquetel de inibidores de proteases, e incubados por 30 minutos a 4°C para lise completa. Depois de lisados os parasitos foram então centrifugados por 10 minutos a 9400 x g à 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante (extrato acelular, parte solúvel) recolhido para dosagem de proteína.

2.8 Dosagem de proteína

As dosagens de proteína foram realizadas segundo o protocolo descrito por Lowry e colaboradores (1951), utilizando albumina sérica bovina 0,1% como padrão.

2.9 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida em Condições Desnaturantes (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS foram realizadas como descrito por Laemmli (1970), utilizando cuba Mini Protean Tetra Cell (Biorad, EUA) e fonte Gibco BRL Electrophoresis Power Supply (modelo 250EX, Life & Technology, EUA). Além disso, foram utilizados géis contendo 12% de acrilamida e padrão de massa molecular pré-corados SeeBlue[®] miosina (250 kDa), soroalbumina bovina (BSA) (98 kDa), Glutamina desidrogenase (64 kDa), álcool desidrogenase (50 kDa), anidrase carbônica (36 kDa), mioglobina (30 kDa), lisozima (16 kDa), aprotinina (6 kDa) e cadeia β de insulina (4 kDa).

2.10 Immunoblotting

Após a realização de eletroforese SDS-PAGE 12%, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. A eletrotransferência foi realizada em cuba Mini Trans-blot Cell (Biorad, EUA), em tampão Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, contendo metanol 20% a 100 V por 120 minutos a 4°C (Towbin e colaboradores, 1979). A transferência foi monitorada corando-se a membrana, por 5 minutos, com uma solução 0,1% (p/v) de vermelho de Ponceau, ácido tricloroacético (TCA) 1,5% (p/v) e ácido sulfossalicílico 1,5% (p/v). Posteriormente, a membrana foi descorada por lavagem com água para visualização das bandas e obtenção do perfil proteico. Em seguida, a membrana foi totalmente descorada com Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contendo 0,15 M de NaCl (TBS) e bloqueada com tampão TTL (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, contendo 5 % (p/v) de leite desnatado e 0,1% (v/v) de tween 20) por 1 hora à temperatura ambiente. Após 1 hora, o tampão de bloqueio foi desprezado e a membrana incubada com anticorpo monoclonal contra HO-1 numa diluição de 1:1000 em TTL por aproximadamente 18 horas a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes, em intervalos de 5 minutos, com 20 mL de TT (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%). Seguiu-se uma incubação com o anticorpo secundário anti-camundongo, numa diluição de 1:10.000 conjugado com peroxidase, por 1 hora. A membrana foi então lavada 5 vezes, em intervalos de 5 minutos, com 20 mL de TT e 3 vezes com TBS. Por fim o complexo antígeno-anticorpo foi revelado através do método de intensificação de quimioluminescência pelo luminol (ECL). O método ECL consiste basicamente na oxidação do luminol, reação catalisada pela peroxidase em

presença de peróxido de hidrogênio. Intensificadores químicos sustentam a emissão de luz do luminol, que imprime as bandas correspondentes as proteínas em filmes autorradiográficos. O *Hyperfilm* (Amersham Biosciences) foi exposto por 5 minutos, revelado e fixado adequadamente em câmara escura. Para o *immunoblotting* com as amostras provenientes da imunoprecipitação, o procedimento foi feito como descrito acima, com alteração apenas da diluição do anticorpo primário (1:250).

2.11 *Stripping*

Como controle de carregamento de proteínas, as membranas após revelação para *immunoblotting* contra HO-1, foram incubadas em banho maria (modelo 796, De Leo & Cia Ltda., Brasil) a aproximadamente 57°C por 30 minutos para remoção dos anticorpos (primário e secundário) previamente utilizados. Após esse período, as membranas eram lavadas três vezes com TBS e seguia-se então o protocolo de *immunoblotting* para a proteína tubulina (controle constitutivo) a partir do bloqueio como descrito anteriormente. Foi utilizado o anticorpo policlonal anti-tubulina na diluição de 1:1000, e o anticorpo secundário anti-coelho a 1:10.000.

2.12 Imunoprecipitação

Após a lise, o sobrenadante foi incubado com anticorpo monoclonal contra HO-1 numa diluição de 1:200 por 2 h a 4°C, sob agitação. Em seguida, foi adicionado proteína A/G agarose (20 µL/500 µL de amostra) por aproximadamente 18 horas a 4°C. Após esse período, as amostras foram centrifugadas (590 x g por 5 minutos, a 4°C), lavadas duas vezes em PBS, e feita a eluição do sedimento (resina) com a adição de tampão de amostra (Laemmli, 1970) e fervura por 3 minutos. Seguia-se então uma centrifugação (9400 x g por 5 minutos, temperatura ambiente) para recolhimento do sobrenadante (eluído). Após a primeira centrifugação, o sobrenadante (não-ligado) foi recolhido para posterior análise.

2.13 Imunocitoquímica

Formas epimastigotas de *T. cruzi*, obtidos no 7º dia de crescimento, em meio BHI suplementado com hemina 30 µM e 10% SFB, foram centrifugados (5000 rpm por 3 minutos) e lavados duas vezes em BHI sem adição de hemina, transferidos para BHI contendo 10 % de SFB, e tratados por cinco dias na presença ou na ausência de hemina (300 µM). Após o período de incubação, estes parasitos foram, então, centrifugados, lavados duas vezes em PBS, e os parasitos (10^7 células/mL) fixados com 0,1% glutaraldeído e 4% paraformaldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M (pH 7,2) a 25°C por 1 h. Em seguida, as células foram desidratadas em série com soluções de concentração crescente de metanol e emblocadas em resina Lowicryl. Os cortes ultrafinos foram incubados com anticorpo monoclonal contra HO-1 (diluição 1:10) e posteriormente com anticorpo secundário contra camundongo acoplado a partículas de ouro coloidal 10 nm (diluição 1:10). Por fim, as grades foram contrastadas com acetato de uranila e citrato de chumbo, e examinadas no microscópio eletrônico de transmissão Jeol JEM1011 (Tóquio, Japão). Para os experimentos de colocalização, além do anticorpo anti-HO-1, foi utilizado também o anticorpo primário policlonal anti-hexoquinase, como marcador glicosomal na concentração de 1:10 e anticorpo secundário contra cabra acoplado a partículas de ouro coloidal 5 nm (diluição 1:10).

2.14 Fixação e coloração por Coomassie coloidal (G-250)

Após a realização de eletroforese SDS-PAGE 12%, o gel foi fixado em solução aquosa contendo 30% de etanol e 2% (v/v) de ácido fosfórico e mantido sob agitação moderada durante três sessões de 10 min, onde no intervalo de cada uma, a solução em contato com o gel era removida e outra recém preparada adicionada. Este mesmo procedimento foi repetido em outras três sessões de agitação moderada durante 10 min com solução contendo 2% (v/v) de ácido fosfórico em água. O gel foi então transferido para uma solução aquosa de etanol a 18%, ácido fosfórico a 2% (v/v) e sulfato de amônio a 15% (m/v). Após 20min de incubação, adicionou-se o volume necessário de Coomassie Blue G-250 a 2% (m/v) em água, para atingirmos uma concentração final de C. Blue de 0,02% (m/v). Deixou-se agitando por 72 h.

2.15 Digestão *in gel*

Após a coloração do gel, a digestão foi realizada de acordo com Shevchenko e colaboradores (2006), com modificações. Pedacos do gel contendo as bandas de proteínas foram extraídos do mesmo, transferidos para tubos de 0,5 mL e cortadas em pequenos pedacos. Duzentos microlitros de uma solução de bicarbonato de amônio 25 mM pH 8,0 e acetonitrila, numa proporção 1:1 (v/v), foi adicionado a cada tubo para lavagem, sob agitação, por 15 min repetidas vezes até que os pedacos de gel fossem totalmente descolorados. A solução de lavagem foi então retirada e o gel desidratado pela adição de acetonitrilo por 5 min. O solvente foi removido, e as amostras proteicas completamente secas em concentrador à vácuo (Speed Vac, modelo SC 110, Savant Instruments, EUA). A redução das proteínas foi feita pela adição de DTT 10 mM por 30 min à temperatura ambiente. Em seguida a solução foi descartada e os pedacos de gel submetidos a iodacetamida 50 mM a fim de modificar cisteínas para carbamidometilcisteínas. Após a remoção da iodacetamida, as amostras foram submetidas a dois ciclos de lavagem (bicarbonato de amônio 100 mM pH 8,0) e desidratação (acetonitrilo por 5 min), e após o último passo de desidratação, procedeu-se à remoção da solução e secagem em *speed vac*.

Cada amostra foi rehidratada com aproximadamente 10 µL de solução de tripsina gelada (20 ng/µL em bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,0) e deixada em banho de gelo por 10 min. Após a rehidratação, e conseqüentemente, inchaço do gel, o excesso de tripsina foi removido e adicionou-se 20 µL de bicarbonato de amônio 50 mM pH 8,0 às amostras seguido de uma incubação de 16 h a 37°C. Após a digestão, os 20 µL presentes em cada reação foram transferidos para um novo tubo de 0,5 mL. A extração dos peptídeos foi feita com a adição de 30 µL da solução 1:1 ácido fórmico 10% (v/v) em água e acetonitrila com forte agitação por 30 min. Após esse período a reação foi transferida para tubos novos e o procedimento de extração repetido mais uma vez. Ao final, as amostras (peptídeos), contendo 80 µL cada, foram concentradas em *speed vac* até atingir aproximadamente 10 µL e armazenadas a -20°C até a análise espectrométrica.

2.16 Espectrometria de Massa LC-ESI-ION TRAP

Os extratos peptídicos da digestão trípica foram aplicados em coluna C18 Picofrit ProteoPep™ II 15 cm x 75 µm (300 Å, partícula de 5 µm - New Objective, EUA). A introdução das amostras e a distribuição na fase móvel, a 250 nL/min, foi realizada pelo cromatógrafo *MS Pump Surveyor* (Thermo Finnigan, EUA) equipado com um “loop” de injeção de 20 µL (Rheodyne, EUA). A fase móvel A foi ácido fórmico 0,1% (v/v) em água e a fase móvel B, ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila. O gradiente empregado para a separação peptídica foi 5% de B por 5 minutos, 40% de B em 35 minutos, 60% de B em 45 minutos e finalmente, 80% de B em 48 minutos. Os peptídeos eluídos da coluna foram diretamente introduzidos em um espectrômetro LCQ Deca XP^{Plus} ion trap (Thermo Finnigan, EUA) (alocado no laboratório de Toxinologia - IOC - FIOCRUZ) para análise. À fonte eletrospray foi aplicada uma voltagem de 2,0 kV, enquanto o capilar de entrada foi ajustado para 35 V e 180°C. Os espectros dos peptídeos eluídos foram adquiridos de maneira dado-dependente, primeiramente pela aquisição de um espectro MS completo de m/z de 400 a 2.000, seguido por um modo *ZoomScan* entre m/z de 400 a 2.000 dos íons mais intensos do espectro MS total prévio. Os scans MS/MS foram adquiridos usando um q_z de ativação de 0,25, tempo de ativação de 30 milissegundos e energia de colisão normalizada em 35%. O controle de ganho automático do equipamento foi em torno dos valores alvo de 1 x 10⁸, 4 x 10⁷ e 1 x 10⁸ para os *scans* de MS, Zoom e MS/MS, respectivamente.

2.17 Espectrometria de Massa LC-ESI-Linear trap/Orbitrap

Os extratos peptídicos da digestão trípica foram aplicados em coluna C18 Picofrit ProteoPep™ II 15 cm x 75µm (300 Å, partícula de 5 µm - New Objective, EUA). A introdução das amostras e a distribuição na fase móvel, a 250 nL/min, foi realizada em cromatógrafo *ACCELA* (Thermo Finnigan, EUA) equipado com um *loop* de injeção de 20 µL (Rheodyne, EUA). A fase móvel A foi ácido fórmico 0,1% (v/v) em água e a fase móvel B, ácido fórmico 0,1% (v/v) em acetonitrila. O gradiente empregado para a separação peptídica foi 5% de B por 5 minutos, 40% B em 35 minutos, 60% B em 45 minutos e, finalmente, 80% B em 48 minutos. Os peptídeos eluídos da coluna foram diretamente introduzidos em um espectrômetro LTQ-Orbitrap XL (Thermo Finnigan, EUA), alocao no laboratório do Prof. Francisco de Assis Machado Reis

– Instituto de Química – UNICAMP, para análise. À fonte *nanoelectrospray* foi aplicada uma voltagem de 2,5 kV enquanto o capilar de entrada foi ajustado para 34 V e 220°C. Os espectros dos peptídeos eluídos foram adquiridos de maneira dado-dependente primeiramente pela aquisição de um espectro MS completo de m/z 400 a 1.800 no analisador *Orbitrap* com resolução de 60.000. Para cada espectro MS, os dez íons mais intensos foram então submetidos à fragmentação (MS/MS) no analisador *Linear Trap*. Os espectros MS/MS foram adquiridos usando um q_z de ativação de 0,25, tempo de ativação de 30 milisegundos e energia de colisão normalizada em 35%.

2.18 Busca em banco de dados (LC-ESI-ION TRAP)

Os espectros MS/MS foram extraídos, desconvoluídos e sua forma monoisotópica determinada pelo programa BioWorks versão 3.3. Todas as amostras MS/MS foram analisadas usando o Sequest (ThermoFinnigan, San Jose, CA; version 27, rev. 12). O Sequest foi ajustado para busca no banco Kineto-19-06-2006 (76961 entradas), assumindo a digestão pela enzima tripsina. As buscas foram conduzidas com a tolerância para massa dos íons-fragmento de 0,5 Da e para os íons precursores de 1,4 Da. Cisteínas (Cys) modificadas por iodoacetamida foram especificadas como uma modificação fixa. Oxidação de metionina (Met), oxidação de triptofano (Trp) para formilcinurenina de triptofano e cisteína com aduto de acrilamida foram especificadas como modificações variáveis.

2.19 Busca em banco de dados (LC-ESI-Linear trap/Orbitrap)

Os espectros MS/MS foram extraídos de arquivos do tipo *raw*, padrão para instrumentos da Thermo, utilizando o RawExtract1_9_8 (McDonald *e cols.*, 2004) e a busca feita contra o banco de dados Kineto-19-06-2006 (76961 entradas mais proteínas contaminantes comuns); todas as sequências foram adquiridas no formato FASTA. Os níveis de confiança e a taxa de falso-positivos foram calculados usando um banco *decoy* (“despiste”) que contém sequências reversas do banco original adicionadas ao referido banco. As sequências mais apropriadas deste banco combinado foram selecionadas pela ferramenta de busca ProLuCID (Xu *e cols.*, 2006). Oxidação de metionina e carbamidometilação de cisteína foram consideradas modificações

variável e fixa, respectivamente. O espaço de busca incluiu todos os peptídeos candidatos que caíram dentro da janela de tolerância de 50 ppm, independente de seus estados trípticos; nenhuma clivagem enzimática foi imposta.

2.20 Identificação de proteínas (LC-ESI-ION TRAP)

O programa Scaffold (versão 01-07-00, Proteome Software Inc., EUA) foi utilizado para validar as identificações dos peptídeos e proteínas geradas pelos espectros MS/MS. As identificações dos peptídeos pelo Sequest foram aceitas quando satisfizeram os seguintes parâmetros: *scores* deltaCn maiores que 0,1 e *scores* XCorr maiores que 1,8, 2,5 e 3,5 para peptídeos simples, dupla e triplamente carregados. No caso da identificação das proteínas, foram aceitas aquelas proteínas que contivessem pelo menos dois peptídeos identificados. Proteínas que continham peptídeos similares e que não puderam ser diferenciadas somente baseado na análise MS/MS foram agrupadas para satisfazer os princípios de parsimônia.

2.21 Identificação de proteínas (LC-ESI-Linear trap/Orbitrap)

A validação da identificação dos peptídeos/espectros foi feita utilizando o Search Engine Processor (SE-Processor), um programa não-comercial desenvolvido para avaliar a confiabilidade das identificações. Resumidamente, o SE-Processor primeiramente excluiu identificações em que a massa teórica divergisse mais de 12 ppm da massa experimental. Em seguida, as identificações foram agrupadas por carga (+1, +2 e ≥ 3) e então pelo estado tríptico (total, semi- ou não), resultando em nove subgrupos distintos. Para cada resultado, seu *cross-correlation score* gerado pelo ProLuCID assim como seu valor de *DeltaCN* (para identificações do tipo *target* e *decoy*) foram utilizados para gerar uma função discriminante Bayesiana. Pontos periféricos das duas distribuições, apresentando uma distância de Mahalanobis maior do que 4, foram descartados. Depois, as identificações foram classificadas em ordem não-decrescente de acordo com o *score* discriminante e um ponto de corte foi estabelecido para aceitar uma taxa de falso positivo de 1%, baseado no número de peptídeos *decoy*. Esse procedimento foi realizado independentemente em cada subconjunto de dados, resultando em uma taxa de falso-positivo independente de estado tríptico ou carga. Além disso, exigiu-se uma sequência de tamanho

mínimo de sete resíduos de aminoácidos e cada proteína da lista foi confirmada por pelo menos dois peptídeos identificados.

2.22 Extração e quantificação de DNA

A extração foi realizada através do método fenol-clorofórmio (Medina-Acosta & Cross, 1993). Essa técnica purifica os ácidos nucleicos de proteínas, separando enzimas contaminantes. Foram utilizadas aproximadamente 1×10^8 células. O extrato obtido foi solubilizado em TE (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, EDTA 1 mM) contendo 20 µg/ml de RNase A e incubado a 37°C por aproximadamente 30 min. Este foi armazenado a -20°C para posterior quantificação por dosagem espectrofotométrica (razão 260/280 nm) (Thermo Scientific NanoDrop™, EUA).

2.23 Reação de polimerização em cadeia (PCR)

Os oligonucleotídeos específicos para uma heme oxigenase em *Trypanosoma cruzi* foram desenvolvidos, através do programa Primer3, utilizando-se como base as sequências de proteínas hipotéticas de *Theileria annulata* (TA06150) e de *Plasmodium falciparum* (PF10_0116). Alinhando estas duas proteínas, elas mostram homologia na região do domínio conservado HOX. Foram utilizados dois pares de oligonucleotídeos. As condições finais normais para as amplificações por PCR (termociclador, modelo Veriti 96 well, AB applied biosystems, EUA) incluíram de 30 a 128 ng de DNA genômico, 1 U de Taq DNA polimerase, tampão de reação 1X, MgCl₂ 1,5 mM, 0,2 mM de cada dNTP e 0,3 µM de cada oligonucleotídeo, para um volume final de reação de 25 µL. Para o 1º par utilizado foram feitas 3 reações alternativas, cada uma com a seguinte alteração: 0,8 U de Taq DNA polimerase, MgCl₂ 1 mM ou 0,2 µM de cada oligonucleotídeo. As condições de ciclagem utilizadas foram: desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 segundos, anelamento a 55°C por 30 segundos, extensão a 72°C por 1 minuto e uma extensão final a 72°C por 5 minutos. Para o segundo par foi feita a seguinte alteração na reação: 0,8 U de Taq DNA polimerase e 0,2 µM de cada oligonucleotídeo.

Quadro 1 - Sequência dos oligonucleotídeos senso e anti-senso para a HO-1 utilizados na técnica de PCR, temperatura de anelamento de cada oligonucleotídeo e número de ciclos.

Oligonucleotídeo	Sequência	Nº de ciclos	Temperatura de anelamento (°C)
Senso HO-1	5' TCG TTT TGC TCG TTG TTC TG 3'	35	55
Anti-senso HO-1 1	5' AGC GTA GAA GCA TGG AAG GA 3'	35	55
Senso HO-1	5' TCG TTT TGC TCG TTG TTC TG 3'	35	54
Anti-senso HO-1 2	5' GAA TGA GAG AGG GTG CGT GT 3'	35	54

2.24 Análise dos Produtos da PCR

Para avaliar os produtos amplificados, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1,7%, dissolvida pelo calor em tampão TBE (Tris-borato 45 mM, EDTA 1 mM). O corante SYBR® *safe DNA gel stain* foi adicionado ao gel de agarose numa concentração final de 1 X. No preparo das amostras, foi adicionado 2 µL de tampão de amostra (glicerol 30%, azul de bromofenol 0,25% e xileno cianol 0,25%) a cada 10 µL de cada reação de PCR. A eletroforese foi realizada em cuba horizontal (Life Technologies, EUA) a 80 V, por aproximadamente 1 hora e 30 minutos. O gel foi visualizado em transiluminador (modelo Gibco BRL UV, TFX-ZOM, Life & Technology, EUA), sob luz UV, e a imagem armazenada por sistema de captura de imagem automatizado (Alphaimager Mini Analysis System, modelo AT126D, Alpha Innotech Corp, EUA).

2.25 Purificação dos produtos da PCR

Após a amplificação, procedeu-se a purificação dos produtos obtidos, para posterior sequenciamento, utilizando a banda de DNA extraída do gel ou a partir diretamente da amostra obtida como produto da PCR. Para purificação a partir do produto da PCR diretamente, utilizamos 10 µL de cada reação com o produto desejado formando uma única amostra. À amostra foi adicionado NaCl e isopropanol para as concentrações finais de 0,2 M e 75%, respectivamente, por 15 minutos à temperatura ambiente. Após esse período então, a amostra foi

centrifugada a 16900 x g por 20 minutos e o sobrenadante descartado. Em seguida, o sedimento foi seco e suspenso em 10 µL de água deionizada. Para purificação, utilizando a banda de DNA extraída do gel, foi utilizado o Illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit, seguindo protocolo descrito pelo fabricante. Após ambos procedimentos de purificação para sequenciamento, as amostras foram quantificadas por dosagem espectrofotométrica (razão 260/280 nm).

2.26 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado com o auxílio do kit Big Dye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) em um sequenciador ABI 3730 (Applied Biosystems) seguindo as instruções dos fabricantes. Para cada amostra foram realizadas duas reações de sequenciamento independentes, a primeira com o iniciador senso e a segunda com o iniciador antisenso. A concentração dos iniciadores utilizados foi de 3,2 pmol e a reação de sequenciamento foi realizada com o seguinte ciclo: 96°C por 25 segundos (desnaturação inicial); seguido de 25 ciclos: 96°C por 10 segundos (desnaturação), 50°C graus por 5 segundos (ligação dos iniciadores) e 60°C por 4 minutos (extensão). Em seguida, os produtos de extensão foram purificados pelo método de precipitação por etanol (Applied Biosystems) com o objetivo de retirar os nucleotídeos e iniciadores não incorporados. Após a purificação os produtos foram eletroinjetados com 1,5 KV por 15 segundos e eletroeluídos por 2 horas a 8,5 KV no sequenciador. A análise das sequências foi realizada com o auxílio do programa Chromas 2.22.

2.27 Análise estatística

Análises descritivas (média, desvio padrão) das variáveis foram realizadas. Foi utilizado o One way Anova para avaliar a variância entre os grupos e o teste de Tukey para análise de significância, considerando significativo as diferenças com no mínimo $p < 0,05$. Para realização do teste foi utilizado o programa “Graph Pad Prism”, Versão 3.0 (Graph Pad Software, Inc.).

3 RESULTADOS

Resultados do nosso laboratório demonstram a presença de biliverdina, principal metabólito de heme, em *Trypanosoma cruzi* através de Espectrofotometria e HPLC. A partir destes resultados investigamos a possível existência de uma atividade Heme Oxigenase em *T. cruzi*.

Uma vez que resultados do nosso grupo mostraram o aumento da proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* de maneira dose-resposta em relação à adição de heme, mesmo em altas concentrações (Lara e cols., 2007), avaliamos o efeito do SnPPIX, inibidor da HO-1, na cultura de epimastigotas. A Figura 11 mostra um efeito inibidor dose e tempo-dependente desta porfirina sobre a proliferação do parasito, efeito contrário ao observado quando o heme é adicionado à cultura.

Vimos também que o SnPPIX inibe a proliferação celular tanto na ausência (Figura 11) quanto na presença de heme (Figura 12). Uma vez que o SnPPIX diminuiu a proliferação celular, adicionamos então ao meio biliverdina, produto da degradação do heme pela HO, e observamos que esta, juntamente com o heme, foi capaz de reverter parcialmente a inibição provocada pelo SnPPIX. O resultado pode ser visto na Figura 13.

A partir desse resultado foi então realizada uma curva de proliferação na presença de diferentes concentrações de biliverdina, na ausência de heme. Na Figura 14 podemos observar que a biliverdina sozinha não tem o efeito proliferativo do heme, não sendo capaz de aumentar a proliferação do parasito. Foi realizada então uma curva onde adicionamos biliverdina na presença de heme, e observamos um aumento da proliferação desse tratamento em relação ao tratamento somente com heme, mostrando um efeito sinérgico na proliferação do parasito (Figura 15).

Testamos também o efeito do CoPPIX, indutor da HO-1, na proliferação celular. Este não alterou a proliferação do parasito, como pode ser visto na Figura 16. Como esses resultados são de caráter fisiológico, faz-se necessário a utilização de anticorpo específico, para analisar diretamente a presença da proteína HO-1 e sua expressão.

Posteriormente, investigamos a presença da enzima HO-1 em *T. cruzi* através da técnica de *immunoblotting*, utilizando anticorpo monoclonal anti-HO-1. Para isso, formas epimastigotas foram incubadas por cinco dias na presença ou ausência de diferentes concentrações de heme. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente em material e métodos.

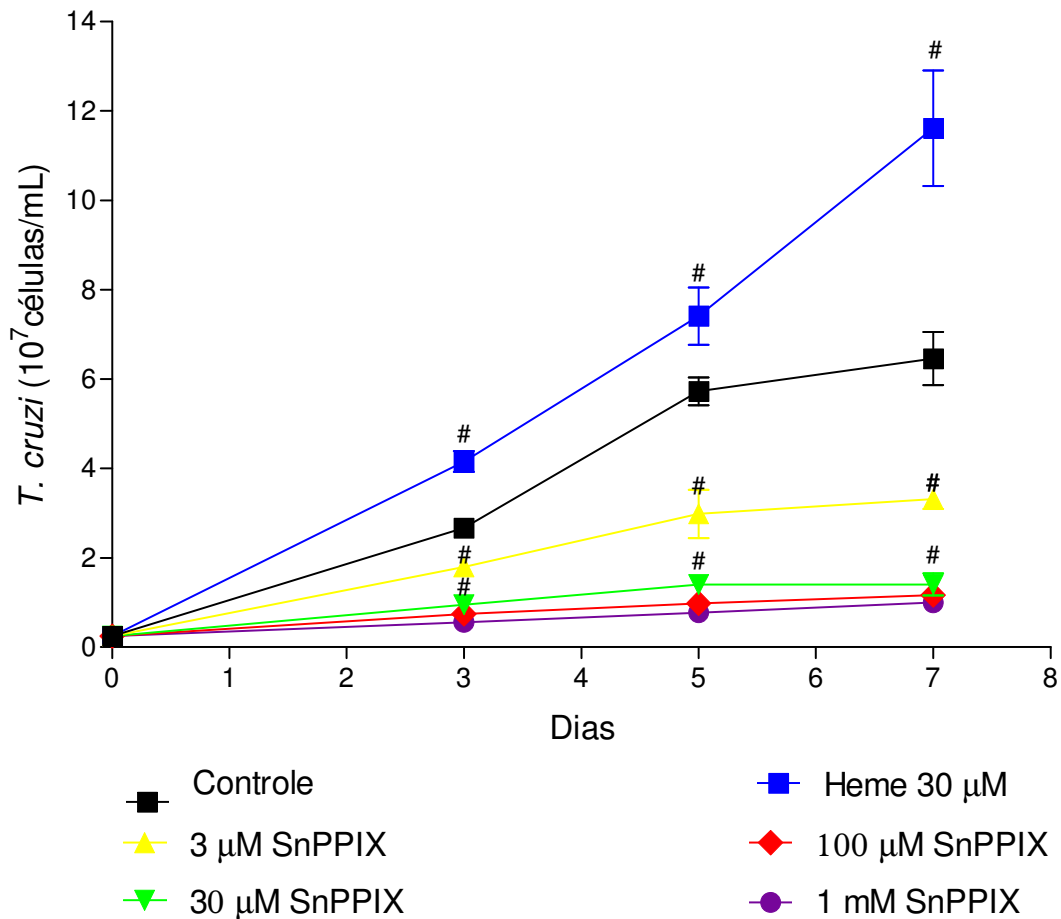


Figura 11 - Efeito do SnPPIX na cinética de proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($0,25 \times 10^7/\text{mL}$) obtidos no 7º dia de crescimento, em meio BHI suplementado com 10% SFB foram incubados na presença de diferentes concentrações de SnPPIX por sete dias. O tratamento dos parasitos com heme 30 μ M representa um controle positivo de proliferação. O número de parasitos foi quantificado com auxílio de câmara de Neubauer. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, # $p < 0,01$ em relação ao grupo controle pelo teste de One-way ANOVA-Tukey. Figura representativa de três experimentos independentes.

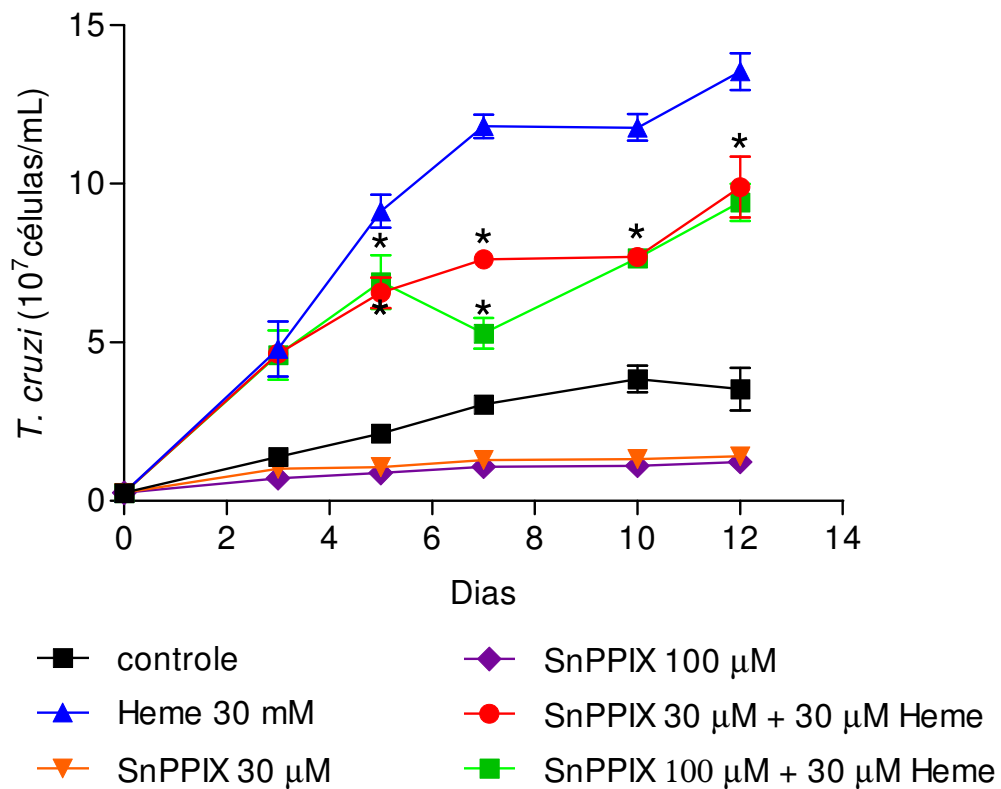


Figura 12 - Efeito do SnPPIX, na presença de heme, na proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi*. Os parasitos ($0,25 \times 10^7$ /mL) foram mantidos por 12 dias em cultura na presença ou na ausência de heme $30 \mu\text{M}$ bem como na presença ou na ausência de SnPPIX 30 ou $100 \mu\text{M}$ (inibidor da HO-1). Nos grupos SnPPIX + heme, houve pré-tratamento com SnPPIX por 20 minutos antes da adição de heme. O tratamento dos parasitos com heme $30 \mu\text{M}$ representa um controle positivo de proliferação. O número de parasitos foi quantificado com auxílio de câmara de Neubauer. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, $*p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com heme $30 \mu\text{M}$ pelo teste de One-way ANOVA-Tukey. Figura representativa de três experimentos independentes.

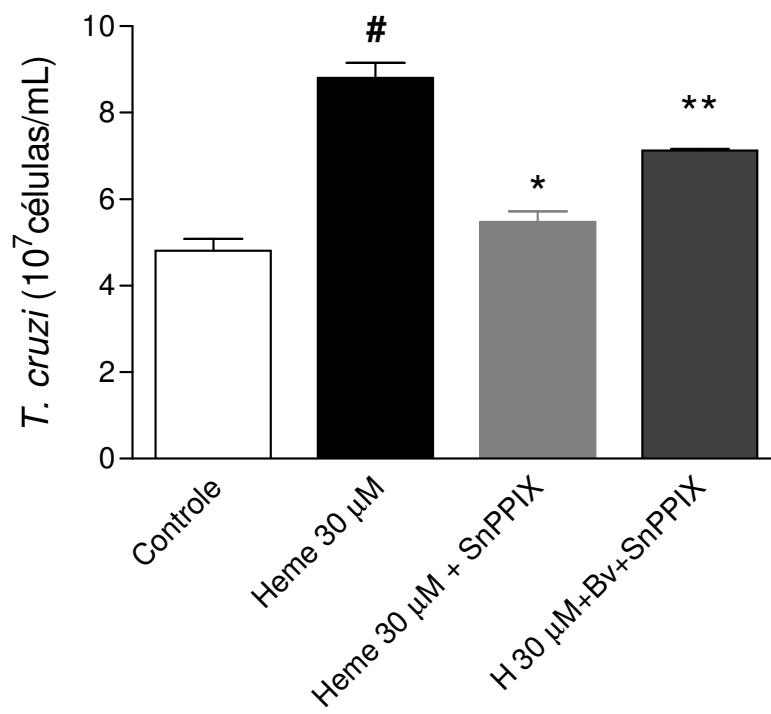


Figura 13 - Efeito da biliverdina após pré-tratamento com SnPPIX na proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi*. Os parasitos ($0,25 \times 10^7/\text{mL}$) foram mantidos por cinco dias em cultura na presença ou na ausência de heme (H) $30 \mu\text{M}$ bem como na presença ou na ausência de biliverdina (BV) $100 \mu\text{M}$ e SnPPIX $100 \mu\text{M}$ (inibidor da HO-1). Nos grupos tratados com SnPPIX, houve pré-tratamento com esta porfirina por 20 minutos antes da adição de heme e/ou BV. O tratamento dos parasitos com heme $30 \mu\text{M}$ representa um controle positivo de proliferação. O número de parasitos foi determinado no 5º dia com auxílio de câmara de Neubauer. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, # $p < 0,001$ em relação ao grupo controle, * $p < 0,001$ em relação ao grupo tratado com heme $30 \mu\text{M}$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo heme $30 \mu\text{M}$ + SnPPIX $100 \mu\text{M}$ pelo teste de One-way ANOVA-Tukey. Figura representativa de dois experimentos independentes.

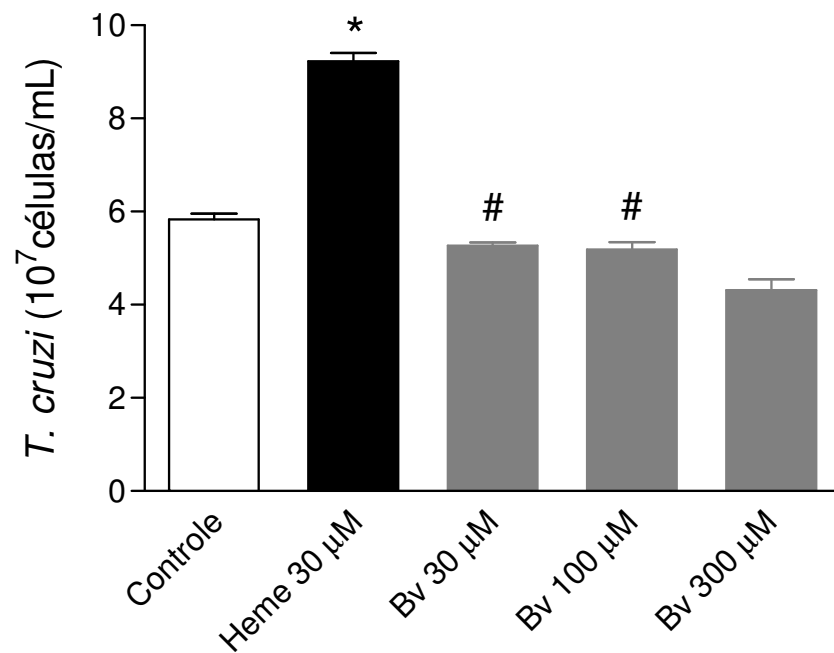


Figura 14 - Efeito da biliverdina na proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi*. Os parasitos ($0,25 \times 10^7/\text{mL}$) foram mantidos por cinco dias em cultura na presença ou na ausência de heme $30 \mu\text{M}$ bem como na presença ou na ausência de diferentes concentrações de biliverdina. O tratamento dos parasitos com heme $30 \mu\text{M}$ representa um controle positivo de proliferação. O número de parasitos foi determinado no 5º dia com auxílio de câmara de Neubauer. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p > 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste de One-way ANOVA-Tukey. Figura representativa de dois experimentos independentes.

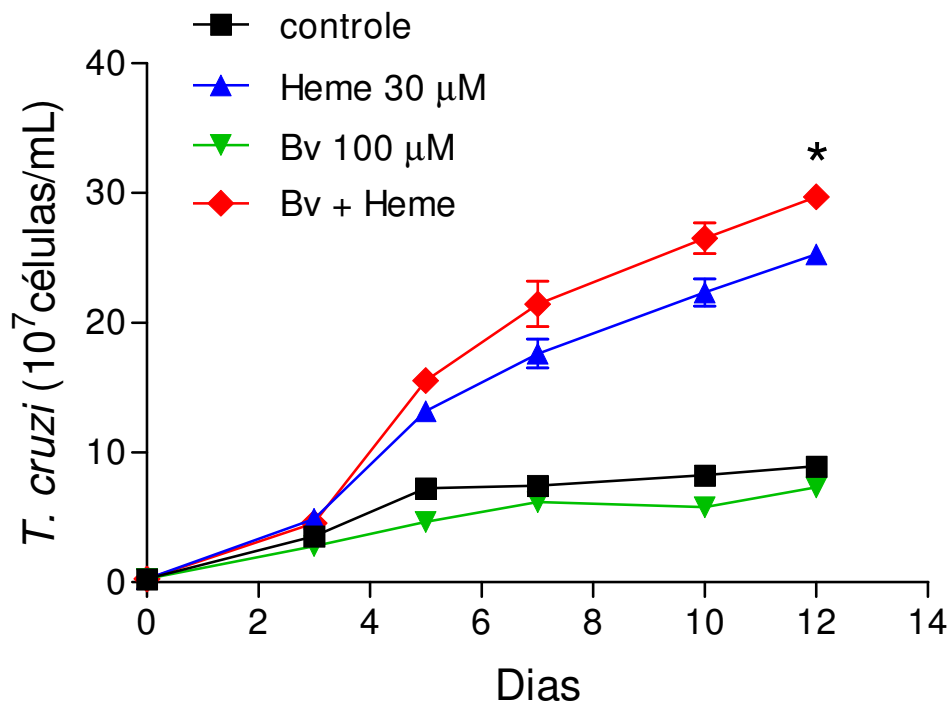


Figura 15 - Efeito sinérgico de biliverdina e heme na proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi*. Os parasitos ($0,25 \times 10^7/\text{mL}$) foram mantidos por 12 dias em cultura na presença ou na ausência de biliverdina (BV) $100 \mu\text{M}$ e/ou na presença ou na ausência de heme $30 \mu\text{M}$. O tratamento dos parasitos com heme $30 \mu\text{M}$ representa um controle positivo de proliferação. O número de parasitos foi quantificado com auxílio de câmara de Neubauer. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo heme $30 \mu\text{M}$ pelo teste de One-way ANOVA-Tukey. Figura representativa de três experimentos independentes.

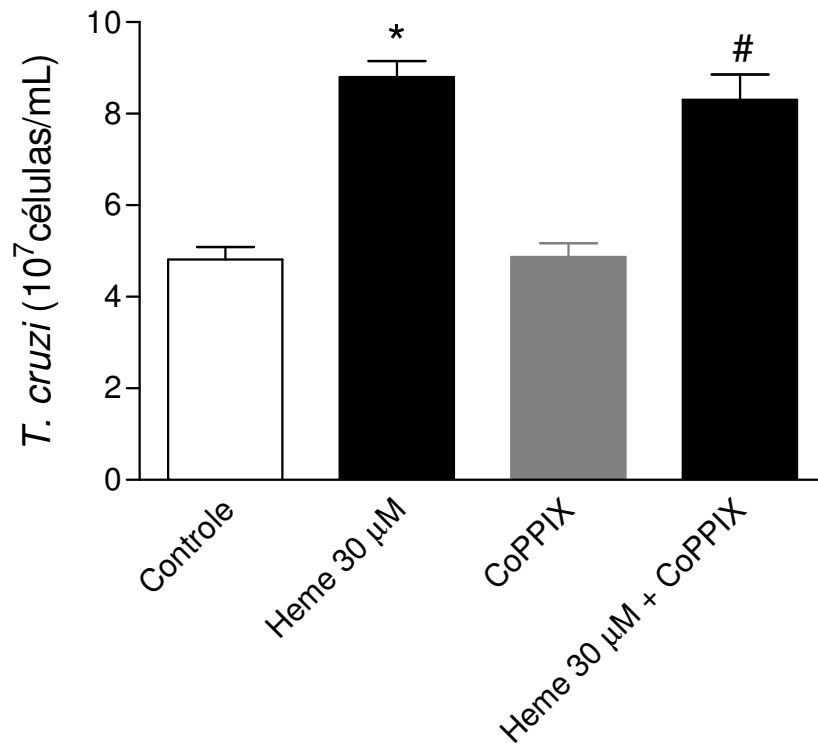


Figura 16 - Efeito do CoPPIX na proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi*. Os parasitos ($0,25 \times 10^7/\text{mL}$) foram mantidos por cinco dias em cultura na presença ou na ausência de heme $30 \mu\text{M}$ e/ou na presença ou na ausência de CoPPIX (indutor da HO-1). O tratamento dos parasitos com heme $30 \mu\text{M}$ representa um controle positivo de proliferação. O número de parasitos foi determinado no 5º dia com auxílio de câmara de Neubauer. Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p > 0,05$ em relação ao grupo tratado com heme $30 \mu\text{M}$ pelo teste de One-way ANOVA-Tukey. Figura representativa de dois experimentos independentes.

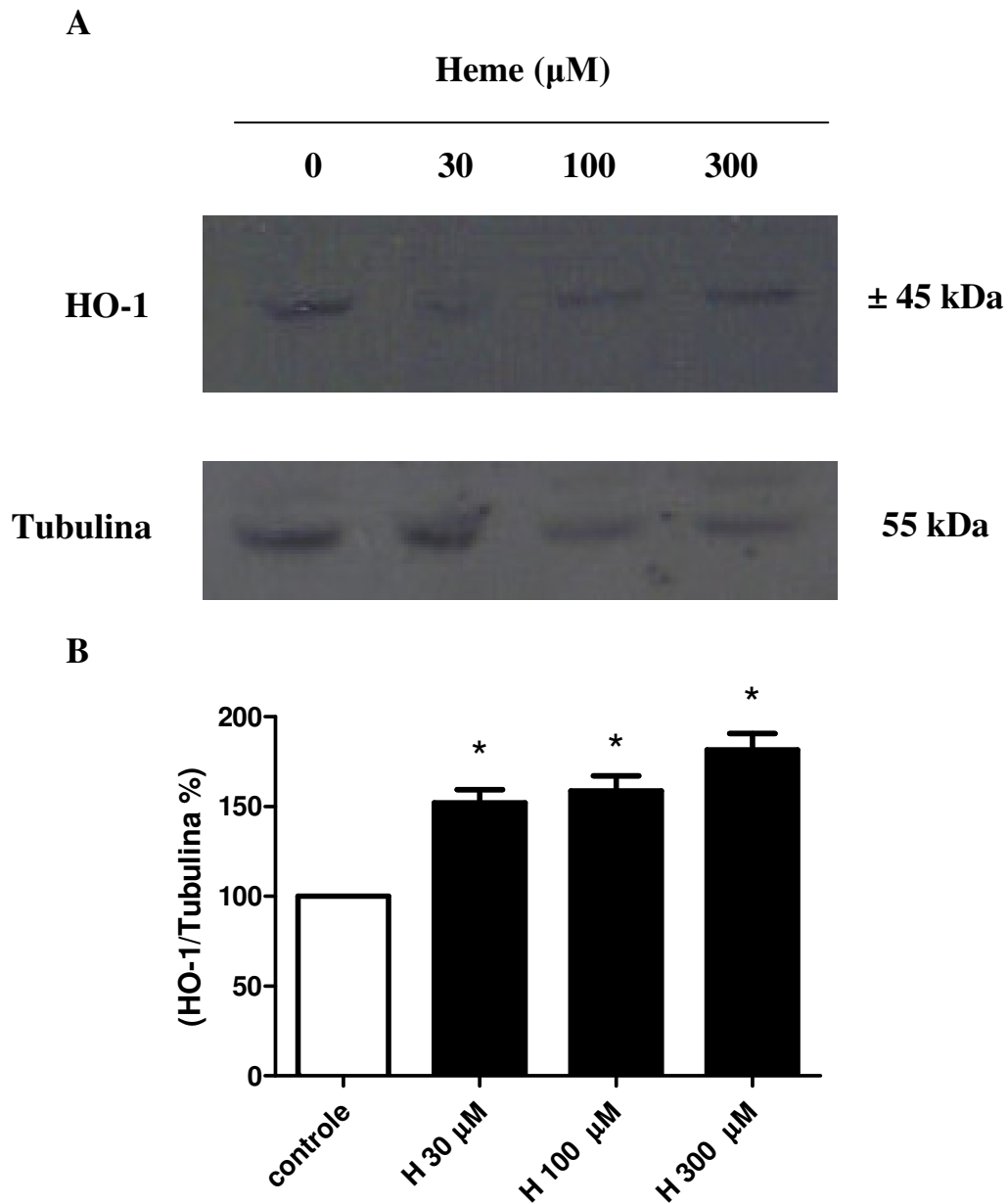


Figura 17 - Análise dos níveis de expressão da HO-1 em formas epimastigotas de *T. cruzi* após tratamento com heme. As células ($2,5 \times 10^7$) foram mantidas em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de diferentes concentrações de heme (0, 30 μM , 100 μM e 300 μM) por cinco dias. Os parasitos foram lisados no 5º dia, as proteínas foram separadas em eletroforese SDS-PAGE (12%) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, incubada com o anticorpo monoclonal anti-HO-1 ou anti-tubulina (proteína constitutiva controle) e revelada com o kit ECL. (A) Figura representativa de três experimentos independentes (B). Os dados estão expressos em média \pm erro padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste de One-way ANOVA-Tukey.

Com base na Figura 17 podemos observar que o anticorpo, apesar de ser anti-mouse, teve afinidade por uma proteína de *T. cruzi*, de massa aproximada de 45 kDa. Curiosamente a proteína reconhecida pelo anticorpo apresenta massa molecular diferente da HO clássica, de 32 kDa, fato interessante indicando que pode se tratar de uma HO específica do parasito, com características próprias. Observamos também um aumento dos níveis de expressão da HO-1 em resposta ao heme, o que é mais uma evidência de que se trata realmente de uma HO, que é responsiva a heme, seu principal substrato. Além disso, verificamos a possibilidade de modulação da expressão da enzima na presença de CoPPIX, SnPPIX ou biliverdina. O SnPPIX não age diretamente na expressão da enzima pois é um inibidor de sua atividade. Sendo assim, existe um acúmulo da molécula de heme na sua presença, o que poderia levar ao aumento da expressão da enzima, uma vez que a molécula de heme também é um indutor de HO-1. Já a BV, por ser metabólito do heme, poderia também alterar a expressão da enzima, talvez inibindo a sua expressão pela presença do produto da reação. Na Figura 18, podemos observar que apenas o CoPPIX foi capaz de modular os níveis de expressão da HO-1, aumentando cerca de 50% a sua expressão em relação ao controle.

Dando continuidade à investigação da presença da enzima HO-1 em *T. cruzi*, realizamos a técnica de imunocitoquímica, utilizando anticorpo monoclonal anti-HO-1. Os parasitos foram tratados da mesma forma como anteriormente descrito no *immunoblotting*, e o material preparado como descrito em material e métodos. Podemos observar nessa análise ultraestrutural, que o anticorpo HO-1 foi localizado em epimastigotas na presença ou na ausência de heme, apresentando marcação principalmente no citoplasma do parasito, apesar de aparecer também em membranas e no interior de vesículas. Podemos notar também o aumento da marcação do anticorpo nos parasitos previamente tratados com heme, indicando uma maior expressão da enzima nessa condição (Figura 19).

Esse conjunto de resultados sugere a presença de uma proteína do tipo Heme Oxigenase em *T. cruzi*, embora esta proteína não esteja anotada em seu genoma recentemente publicado (El-Sayed e cols., 2005a), uma vez que o anticorpo reage especificamente com uma proteína de *T. cruzi*, aumentando sua expressão no tratamento com heme.

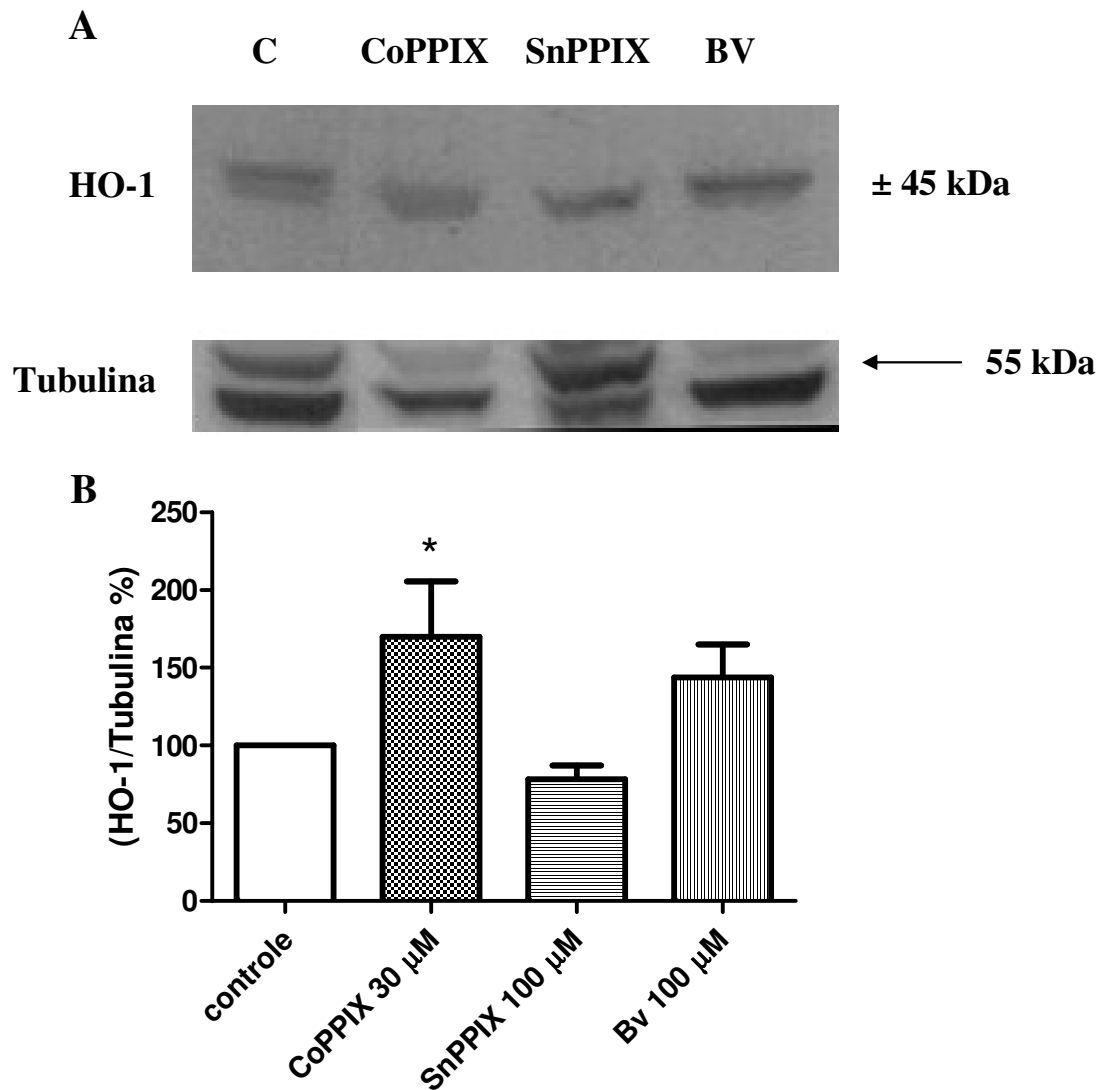
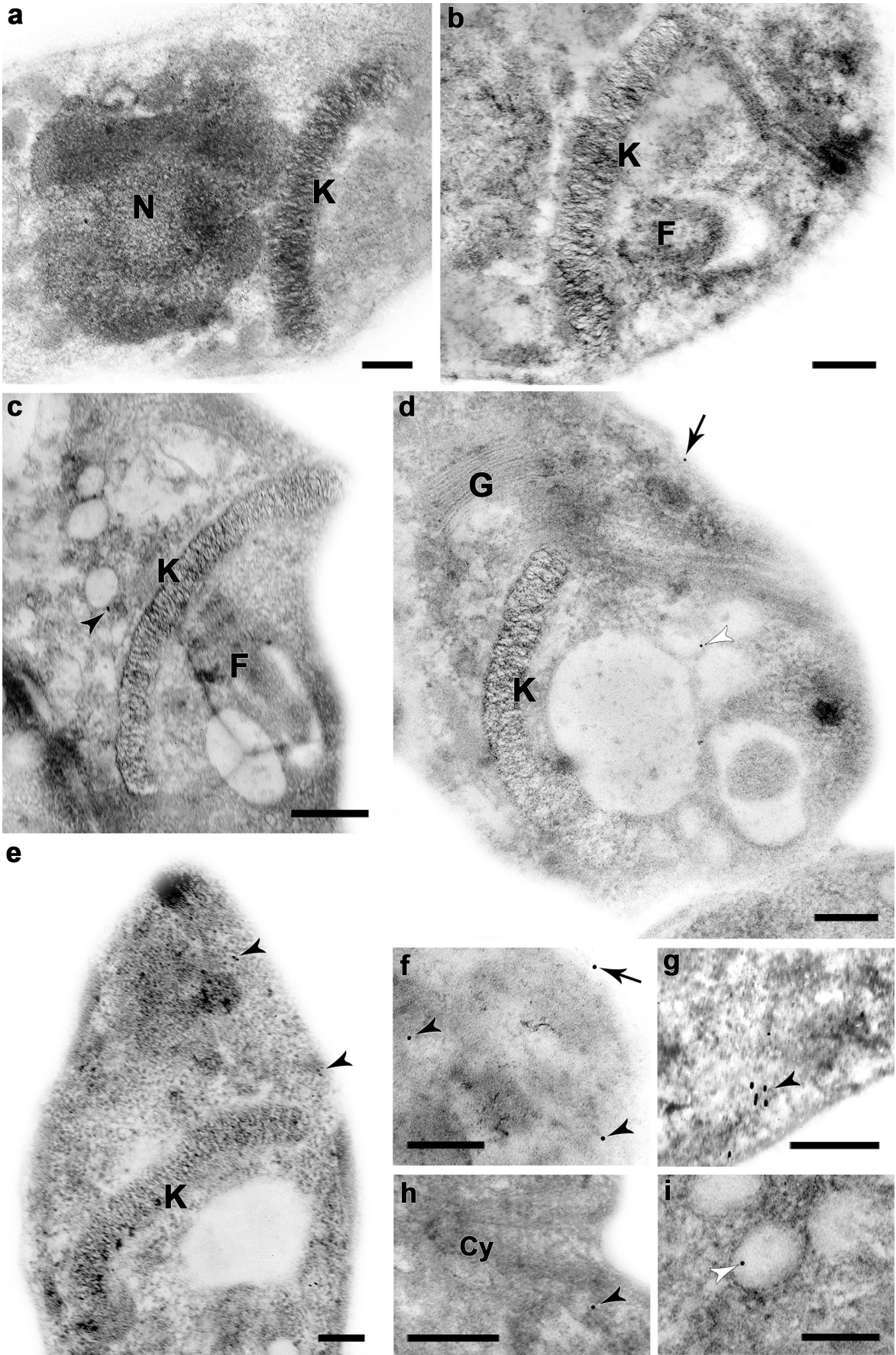


Figura 18 - Análise dos níveis de expressão da HO-1 em formas epimastigotas de *T. cruzi* após diferentes tratamentos. As células ($2,5 \times 10^7$) foram mantidas em BHI suplementado com 10% de SFB na ausência e/ou na presença de CoPPIX (30 µM), SnPPIX (100 µM) ou biliverdina (BV) 100 µM. Os parasitos foram lisados no 5º dia, as proteínas foram separadas em eletroforese SDS-PAGE (12%) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, incubada com o anticorpo monoclonal anti-HO-1 ou anti-tubulina (controle constitutivo) e revelada com o kit ECL. (A) Figura representativa de três experimentos independentes. (B) Os dados estão expressos em média ± erro padrão, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste de One-way ANOVA-Tukey.

Figura 19 - Imunocitoquímica ultra-estrutural de HO-1 em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Após incubação por cinco dias na presença ou na ausência de heme 300 μ M, os parasitos foram fixados, desidratados e emblocados em resina Lowicryl. Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti-HO-1 e em seguida com anticorpo secundário acoplado a partículas de ouro coloidal. Por fim, as grades foram contrastadas e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão. (a) Controle secundário (amostra tratada somente com o anticorpo secundário) não apresentando partícula de ouro. (b,c) Parasitos controle (sem heme) não apresentando imunomarcção para HO-1 (b) ou com raras partículas citosólicas (c). (d-i) epimastigotas tratados com heme mostrando aumento da marcação no citosol (cabeças de setas pretas), membrana plasmática (seta pretas) ou no interior de vesículas citosólicas (cabeças de seta brancas). N - núcleo; K - kinetoplasto; F - flagelo; G - complexo de golgi; Cy - citosol. Barras = 200 nm.



Como a HO não consta no genoma de *T. cruzi*, o reconhecimento do anticorpo somente não é suficiente para dizermos que se trata realmente de uma HO. Então, partimos para uma abordagem mais molecular, a fim de identificar a proteína com atividade Heme Oxigenase em *T. cruzi*, utilizando como ferramenta a biologia molecular. O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio para amplificação por PCR do gene da HO-1 utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir do genoma de *T. cruzi*. Para isso nos baseamos em proteínas hipotéticas dos parasitos *Theileria annulata* e *Plasmodium falciparum*, que continham o domínio conservado da HO. A identidade desta proteína em *Plasmodium falciparum* foi confirmada por Okada, 2009. A Figura 20 mostra um esquema do desenho, onde o ponto de interrogação significa que não foi possível achar aquela região do gene, e como as três regiões (linhas coloridas) identificadas contra as sequências brutas de *T. cruzi* foram encontradas montadas em pontos diferentes do genoma, não sabemos se realmente formam um gene. Esperava-se como produto da amplificação um fragmento de cerca de 720 pares de base. A Figura 21 mostra como produto da amplificação por PCR em gel de agarose 1,7%, bandas correspondentes a 369, 492 e 738 pb. Como podemos observar, a banda de 369 pb aparece de forma predominante. Apesar de ser um produto de tamanho diferente do esperado, por ser a banda predominante, foi a primeira a ser sequenciada. As amostras que obtiveram somente essa banda como produto da amplificação foram reunidas e essa amostra única purificada como descrito em material e métodos. O resultado do sequenciamento identificou essa proteína como uma trans-sialidase, proteína bastante abundante em *T. cruzi*. A superfamília das trans-sialidasas, que são proteínas de superfície, é codificada por aproximadamente 700 genes, representando de 1 a 2% do genoma do parasito (El-Sayed e cols., 2005a). Em seguida, a banda de 738 pb, que é bem próxima ao tamanho esperado, também foi purificada e sequenciada, desta vez a partir do gel. Porém, o sequenciamento desse produto a partir da purificação da banda do gel gerou um cromatograma de baixa resolução, e impediu a identificação das sequências geradas, pela baixa confiabilidade da identificação dos nucleotídeos. Para tentar obter uma amplificação mais específica, utilizamos um segundo par de oligonucleotídeos, que geraria como produto da amplificação um fragmento menor, com cerca de 640 pares de base. Após padronização da reação de PCR, testando diferentes condições (como temperatura de anelamento, concentração de primer, taq e MgCl₂), encontramos a condição ideal obtendo como produto da reação uma única banda, correspondente a um fragmento de aproximadamente 520 pb, tamanho um pouco abaixo

do esperado (Figura 22). Essa única banda foi então sequenciada a partir do produto como descrito em material e métodos. A Figura 23 mostra o resultado dos alinhamentos (em ordem decrescente de similaridade) da sequência obtida no sequenciamento frente às sequências depositadas no *GenBank*, apresentando similaridade principalmente com proteínas hipotéticas em *T. cruzi*, e em mamíferos com proteínas conhecidas como CCD39 (proteína 39 contendo domínio *coiled-coil*), todas com funções desconhecidas.

Dando seguimento à tentativa de identificação da HO-1 de *T. cruzi*, utilizamos a técnica de espectrometria de massa a partir de eletroforese unidimensional do extrato proteico de *T. cruzi*. A Figura 24 mostra o gel SDS-PAGE 12%, utilizado para a extração de proteínas das bandas a serem utilizadas na espectrometria de massa. As amostras observadas no gel foram preparadas como para o *immunoblotting*, com a forma epimastigota do parasito incubada por cinco dias, desta vez na presença ou ausência de heme 30 μ M. Após a coloração do gel por coomassie blue coloidal, foi selecionada a região do gel que teria as proteínas extraídas para digestão com tripsina. Foram selecionados cinco pares de bandas (referentes aos tratamentos com e sem heme) de 1 mm cada, abrangendo uma faixa de massa molecular de 40 a 50 kDa aproximadamente. Os extratos peptídicos da digestão trípica foram analisados no espectrômetro de massas (nanoLC-ESI-ION TRAP). A análise das proteínas de massa aproximada de 45 kDa extraídas da eletroforese 1D revelou no espectrômetro de massa 23 proteínas (Quadro 2), algumas já conhecidas de *T. cruzi* e algumas proteínas hipotéticas. O quadro 2 mostra então a lista dessas 23 proteínas identificadas, juntamente com o número total de espectros MS/MS associados à cada proteína identificada e o número de peptídeos únicos.

Tem sido sugerido que o número total de espectros é relacionado com à abundância da proteína, portanto um método promissor para quantificação. Esse método é conhecido como *spectral counting*, o qual compara o número de espectros MS/MS associado a cada proteína (Pang e cols., 2002; Gao e cols., 2003). Liu e colaboradores, em 2004, mostraram uma excelente correlação entre o *spectral counting* e a quantidade de proteína, utilizando uma mistura de proteínas solúveis de levedura.

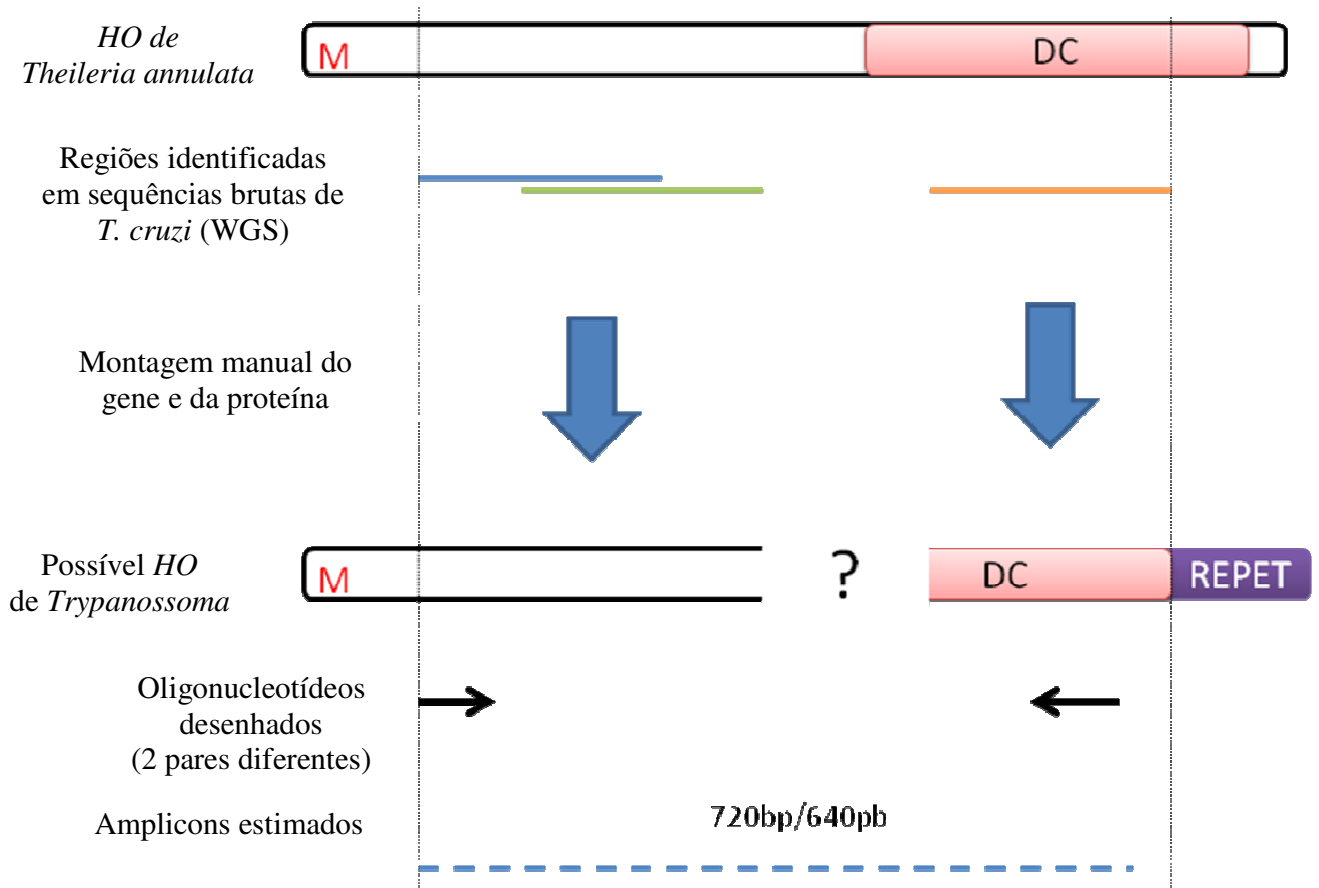


Figura 20 - Esquema do desenho de oligonucleotídeos para o possível gene da HO de *T. cruzi* - Os oligonucleotídeos específicos para *Trypanosoma cruzi* foram desenvolvidos, através do programa Primer3, utilizando-se como base a sequência de uma proteína hipotética de *Theileria annulata* (TA06150). M - metionina; REPET - região repetitiva antes de um *stop codon*; DC - domínio conservado. As três regiões identificadas no blast contra o WGS (usando a sequência de *Theileria annulata*) estão em cores diferentes, pois foram encontradas montadas em pontos diferentes do genoma.

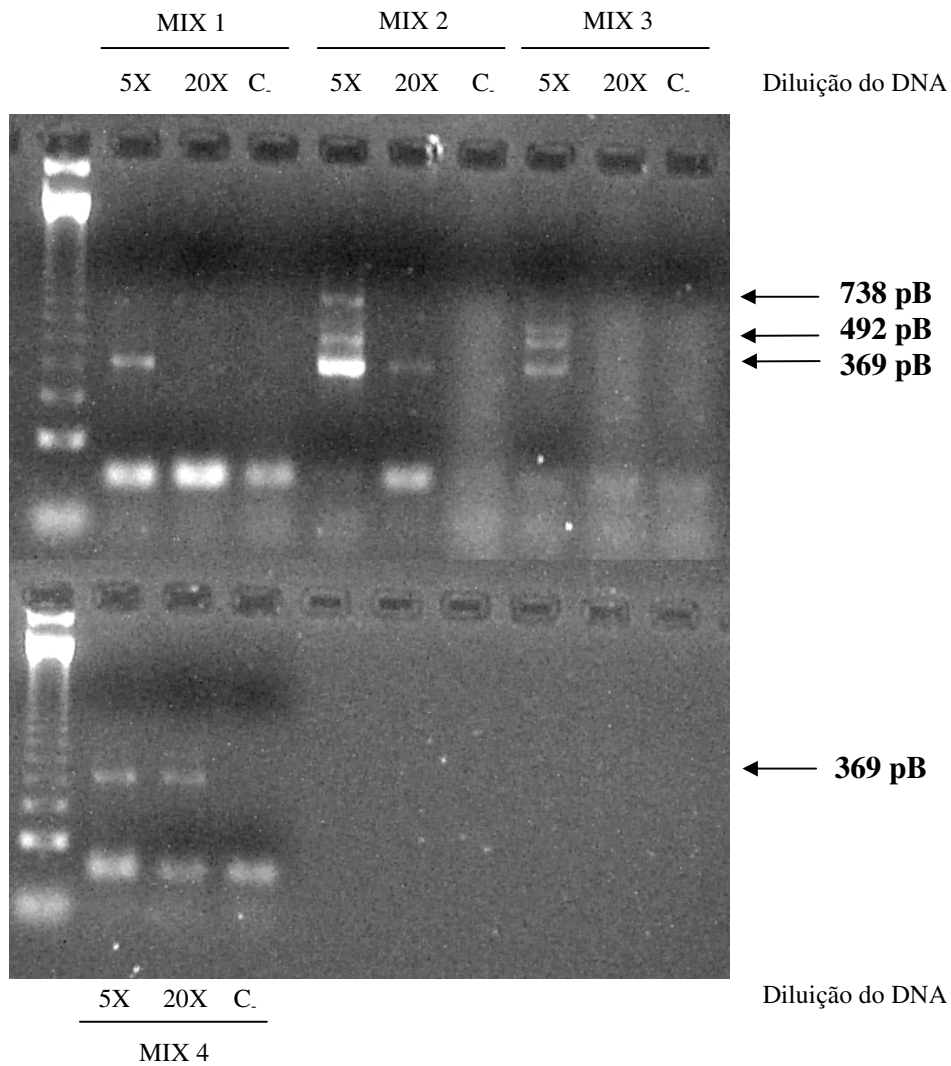


Figura 21 - Análise dos produtos de PCR com o primeiro par de oligonucleotídeos para o gene da HO-1. O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e os *primers* desenhados a partir de proteínas hipotéticas dos parasitos *Theileria annulata* e *Plasmodium falciparum*. A temperatura de anelamento foi de 55°C. As condições normais do MIX foram: Taq 1 U, tampão 1X, DNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, *primers* 0,3 μM e de 32 a 128 ng de DNA genômico. MIX 1 - normal; MIX 2 - Taq 0,8 U; MIX3 - MgCl₂ 1 mM; MIX 4 - *primers* 0,2 μM. Controle negativo (sem DNA).

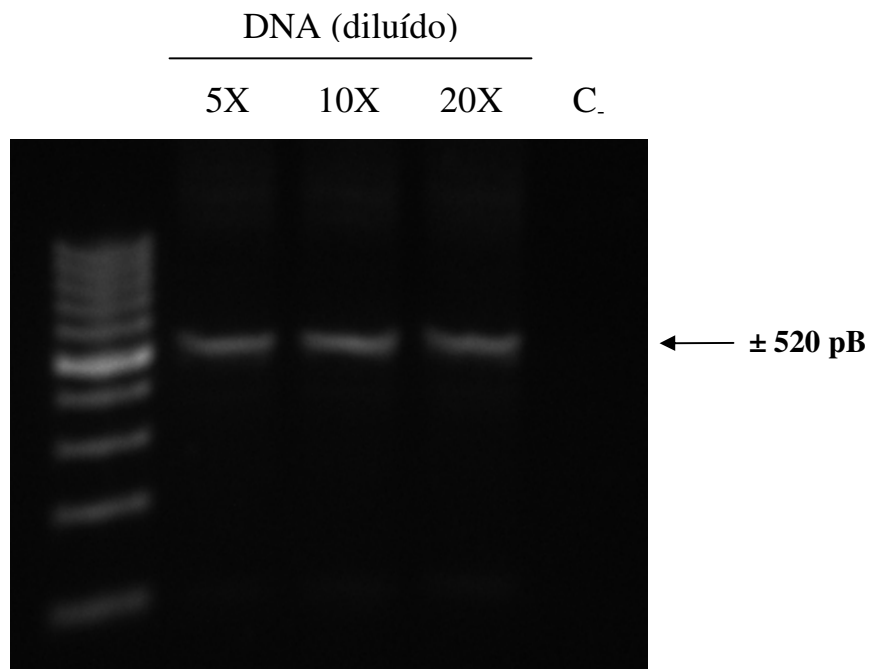


Figura 22 - Análise dos produtos de PCR com o segundo par de oligonucleotídeos para o gene da HO-1. O DNA genômico foi extraído pelo método fenol-clorofórmio e os *primers* desenhados a partir de proteínas hipotéticas dos parasitos *Theileria annulata* e *Plasmodium falciparum*. A temperatura de anelamento foi de 54°C. As condições do MIX foram: Taq 0,8 U, tampão 1X, DNTP 0,2 mM, MgCl₂ 1,5 mM, primers 0,2 µM e de 30 a 123 ng de DNA genômico. Controle negativo (sem DNA).

A

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
XP_809838.1	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener] >qb EAN8	169	196	67%	3e-42	100%	G
XP_805164.1	hypothetical protein [Trypanosoma cruzi strain CL Brener] >qb EAN8	169	194	67%	8e-42	92%	G
XP_001685007.1	hypothetical protein [Leishmania major strain Friedlin] >emb CAJ082(115	115	56%	2e-24	59%	G
CBH13909.1	hypothetical protein, conserved, (fragment) [Trypanosoma brucei qa	113	113	54%	1e-23	64%	
XP_001567035.1	hypothetical protein [Leishmania braziliensis MHOM/BR/75/M2904] >e	113	113	57%	1e-23	56%	G
XP_847643.1	hypothetical protein [Trypanosoma brucei TREU927] >qb AAX70009.	113	113	54%	1e-23	64%	G
CBH10727.1	hypothetical protein, conserved [Trypanosoma brucei gambiense DAI	111	111	54%	4e-23	63%	
AAX80109.1	hypothetical protein Tb04.30K5.520 [Trypanosoma brucei]	111	111	54%	4e-23	63%	
XP_844563.1	hypothetical protein [Trypanosoma brucei TREU927] >qb AAX69517.	111	111	54%	4e-23	63%	G
XP_001467284.1	hypothetical protein [Leishmania infantum JPCMS] >emb CAM70339.:	110	110	56%	5e-23	56%	G
XP_545213.2	PREDICTED: similar to CG17387-PA [Canis familiaris]	72.4	72.4	58%	2e-11	37%	UGM
XP_002912499.1	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 39-like [Ailuropoda	71.2	71.2	58%	4e-11	37%	GM
XP_001916106.1	PREDICTED: similar to hCG16256 [Equus caballus]	69.7	69.7	58%	1e-10	36%	UGM
XP_002814379.1	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 39-like [Pongo abe	68.9	68.9	58%	2e-10	36%	GM
BAG65133.1	unnamed protein product [Homo sapiens]	68.9	68.9	58%	2e-10	36%	G
NP_852091.1	coiled-coil domain-containing protein 39 [Homo sapiens] >sp Q9UFE-	68.9	68.9	58%	2e-10	36%	UGM
NP_001101137.1	coiled-coil domain-containing protein 39 [Rattus norvegicus] >qb ED	68.9	68.9	59%	2e-10	35%	UG
EAW78374.1	hCG16256, isoform CRA_a [Homo sapiens]	68.9	68.9	58%	2e-10	36%	
EDM01225.1	coiled-coil domain containing 39 (predicted), isoform CRA_b [Rattus	68.9	68.9	59%	2e-10	35%	G
EDL35031.1	coiled-coil domain containing 39, isoform CRA_c [Mus musculus]	68.6	68.6	54%	3e-10	37%	G
BAC26777.1	unnamed protein product [Mus musculus]	68.6	68.6	54%	3e-10	37%	G
NP_080498.1	coiled-coil domain-containing protein 39 [Mus musculus] >sp Q9D5Y	68.6	68.6	54%	3e-10	37%	UGM
XP_002716382.1	PREDICTED: coiled-coil domain containing 39 [Oryctolagus cuniculus];	67.4	67.4	54%	6e-10	36%	UGM
XP_614198.3	PREDICTED: coiled-coil domain containing 39-like [Bos taurus] >ref >	67.4	67.4	58%	6e-10	35%	UGM
XP_003132600.1	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 39-like [Sus scrofa	66.6	66.6	54%	1e-09	36%	UGM
XP_002758127.1	PREDICTED: coiled-coil domain-containing protein 39-like [Callithrix j;	66.6	66.6	58%	1e-09	34%	GM
XP_002127751.1	PREDICTED: similar to coiled-coil domain containing 39 [Ciona intesti	65.9	65.9	57%	2e-09	34%	UGM
XP_781717.2	PREDICTED: hypothetical protein [Strongylocentrotus purpuratus] >r	65.5	65.5	52%	2e-09	39%	UGM
XP_002505722.1	predicted protein [Micromonas sp. RCC299] >qb AC066980.1 predic	63.9	63.9	50%	7e-09	35%	UGM
XP_001368408.1	PREDICTED: similar to hCG16256, [Monodelphis domestica]	63.2	63.2	53%	1e-08	36%	UGM
XP_003060037.1	predicted protein [Micromonas pusilla CCMP1545] >qb EEH55989.1 i	60.8	60.8	50%	6e-08	37%	G

B

Sequences producing significant alignments:							
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident	Links
Q9UFE4.3	RecName: Full=Coiled-coil domain-containing protein 39	68.9	68.9	58%	1e-11	36%	G
Q9D5Y1.1	RecName: Full=Coiled-coil domain-containing protein 39	68.6	68.6	54%	1e-11	37%	G
Q0VCP3.1	RecName: Full=Olfactomedin-like protein 3; Flags: Precursor	33.1	33.1	21%	0.68	50%	G
Q9NRN5.1	RecName: Full=Olfactomedin-like protein 3; AltName: Full=HNOEL-iso	33.1	33.1	21%	0.68	50%	G
Q9VJE5.1	RecName: Full=Restin homolog; AltName: Full=Cytoplasmic linker prot	32.7	32.7	49%	0.89	24%	G
B0BNI5.2	RecName: Full=Olfactomedin-like protein 3; Flags: Precursor	32.0	32.0	21%	1.5	47%	G
Q8BK62.2	RecName: Full=Olfactomedin-like protein 3; Flags: Precursor	32.0	32.0	21%	1.5	47%	G
Q8CJ40.1	RecName: Full=Rootletin; AltName: Full=Ciliary rootlet coiled-coil pro	32.0	32.0	94%	1.5	23%	G
Q3UJL6.2	RecName: Full=Pleckstrin homology domain-containing family A memb	31.6	31.6	36%	2.0	28%	G
Q15075.2	RecName: Full=Early endosome antigen 1; AltName: Full=Endosome-	31.2	31.2	40%	2.6	23%	G
Q292S8.2	RecName: Full=Kinesin-like protein costa; AltName: Full=Kinesin-like	31.2	31.2	75%	2.6	26%	
Q4QRL3.2	RecName: Full=Coiled-coil domain-containing protein 88B; AltName: f	31.2	31.2	31%	2.6	36%	G
A6NC98.1	RecName: Full=Coiled-coil domain-containing protein 88B; AltName: f	30.8	30.8	28%	3.4	38%	G
Q25C36.1	RecName: Full=Olfactomedin-like protein 3; AltName: Full=Olfactome	30.8	30.8	19%	3.4	53%	G
Q9NSC5.2	RecName: Full=Homer protein homolog 3; Short=Homer-3	30.8	30.8	27%	3.4	39%	G
Q9BV73.2	RecName: Full=Centrosome-associated protein CEP250; AltName: Fu	30.8	30.8	42%	3.4	27%	G
Q32L59.1	RecName: Full=Transmembrane and coiled-coil domain-containing pro	30.4	30.4	28%	4.4	33%	G
Q6IQ23.2	RecName: Full=Pleckstrin homology domain-containing family A memb	30.0	30.0	36%	5.8	26%	G
Q72HM1.1	RecName: Full=2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	30.0	30.0	33%	5.8	32%	G
Q304B9.1	RecName: Full=Neutral ceramidase; Short=N-CDase; Short=NCDase;	30.0	30.0	51%	5.8	31%	G
Q47RS4.1	RecName: Full=2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	30.0	30.0	40%	5.8	28%	G
P21249.2	RecName: Full=Major antigen; AltName: Full=Myosin-like antigen	30.0	30.0	44%	5.8	22%	
Q8N393.2	RecName: Full=Zinc finger protein 786	30.0	30.0	19%	5.8	46%	G
C1DJEB.1	RecName: Full=UPF0502 protein Avin_04790	30.0	30.0	44%	5.8	33%	G
Q3V0C1.2	RecName: Full=Zinc finger matrin-type protein 1	29.6	29.6	14%	7.5	45%	G
Q3TMW1.2	RecName: Full=Coiled-coil domain-containing protein 102A	29.6	29.6	51%	7.5	29%	G
Q96A19.2	RecName: Full=Coiled-coil domain-containing protein 102A	29.6	29.6	51%	7.5	29%	G
Q66HR5.1	RecName: Full=Calcium-binding and coiled-coil domain-containing pro	29.6	29.6	54%	7.5	24%	G
A0JNH6.1	RecName: Full=Coiled-coil domain-containing protein 102A	29.6	29.6	51%	7.5	29%	G

Figura 23 - Blastx: Análise da similaridade da sequência obtida no sequenciamento frente às sequências depositadas no GenBank do programa Blastx. (A) *database nr* e (B) *database swissprot*.

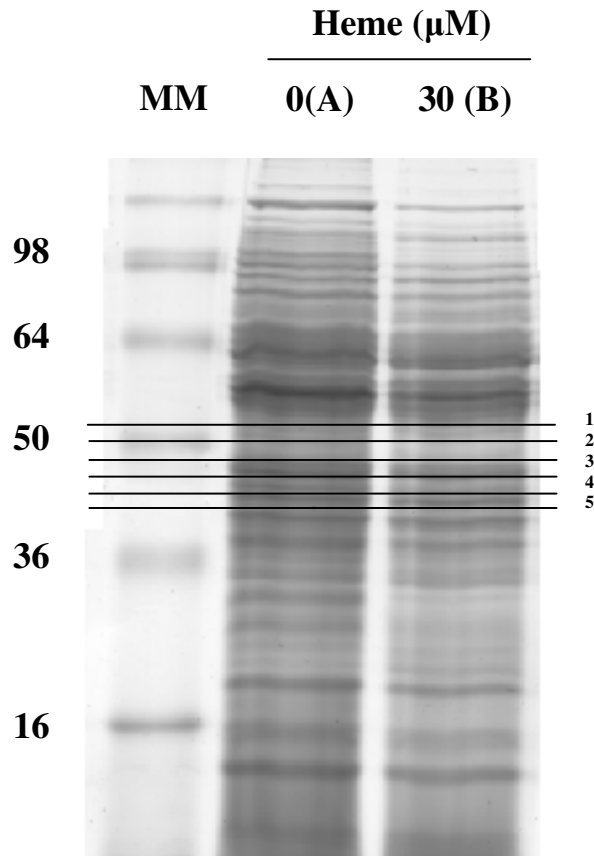


Figura 24 - Eletroforese unidimensional do extrato proteico total de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2,5 \times 10^7$) foram mantidas em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme $30 \mu\text{M}$ por cinco dias. Os parasitos foram lisados no 5º dia, as proteínas separadas em eletroforese SDS-PAGE 12%, e o gel corado por comassie coloidal. Foram extraídas do gel as proteínas referentes às cinco bandas de 1 mm de cada tratamento (controle - A; Heme $30 \mu\text{M}$ - B) para preparação dos extratos peptídicos por digestão trípica e posterior análise no espectrômetro de massas (nanoLC-ESI-ION TRAP).

Desta forma, podemos especular que ao se obter mais espectros de uma mesma proteína em determinado tratamento, controle (sem heme) ou heme 30 μM , significa dizer que esta se encontra mais abundante, mais expressa nesse tratamento. Baseado nisso então podemos especular que as proteínas alanina aminotransferase, piruvato quinase, cistationa gama liase, prostaglandina F2 α sintase, álcool desidrogenase, frutose-bifosfato aldolase, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), nucleosídeo fosforilase, transaldolase e a proteína hipotética (n^o de acesso 71661567) encontram-se mais expressas nas células tratadas com heme. Enquanto que a aspartato aminotransferase mitocondrial teve maior expressão no grupo controle. Apesar do reconhecimento do anticorpo monoclonal anti-HO-1 visto na Figura 17, não encontramos nenhuma sequência equivalente a HO.

A fim de refinar a análise proteômica, utilizamos a técnica de imunoprecipitação, com objetivo de concentrar a proteína alvo. Para isso formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme 300 μM por cinco dias. Os parasitos foram lisados e a imunoprecipitação realizada seguida de *immunoblotting*, utilizando anticorpo monoclonal anti-HO-1. Na Figura 25, podemos observar um aumento significativo do imunocomplexo nas células tratadas com heme 300 μM , cerca de duas vezes em relação ao controle. Além da banda específica, de 45 kDa, aparecem também duas bandas, provavelmente equivalentes às cadeias leve e pesada do anticorpo. Para identificar as proteínas imunoprecipitadas, realizamos uma nova espectrometria de massa. A Figura 26 mostra o gel SDS-PAGE 12%, utilizado para a extração das bandas utilizadas na espectrometria de massa. As amostras observadas no gel foram preparadas como as amostras para imunoprecipitação. Após a coloração do gel por coomassie blue coloidal, foram selecionadas as regiões que seriam extraídas do gel para digestão com tripsina. A análise dos peptídeos gerados levou a identificação de 72 classes de proteínas, que foram listadas em três tabelas: proteínas encontradas somente em A (controle) (Tabela 1), proteínas encontradas somente em B (heme 300 μM) (Tabela 2), e proteínas encontradas em ambos tratamentos (Tabela 3). Apenas duas classes de proteínas foram identificadas somente no grupo controle, ATPase subunidade β e Glicose 6-fosfato isomerase. Já o grupo tratado com 300 μM de heme, apresentou 35 classes de proteínas, expressas somente nessa condição. E a Tabela 3 mostra as 35 classes proteínas identificadas em ambas condições, juntamente com o número total de espectros MS/MS associados à cada identificação e o número de peptídeos únicos.

Quadro 2 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas por nanoLC-ESI-ION TRAP, com o número total de espectros MS/MS associados à cada proteína identificada e o número de peptídeos únicos entre parênteses.

Proteína	Nº de acesso (gi)	MM Teórica (kDa)	Banda 1		Banda 2		Banda 3		Banda 4		Banda 5	
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
<i>Heat shock protein 70 (HSP70)</i>	71661434	73	8(7)	10(8)		7(6)			1(1)	1(1)	1(1)	2(2)
HSP70, precursor mitocondrial	71407515	71	18(11)	5(4)	2(1)	7(5)		3(2)				
Carnitina/colina acetiltransferase	71652512	67								7(5)		
Proteína de ligação a poli-A	71659778	61									4(3)	
Alanina aminotransferase	71660443	55							1(1)	5(4)		
Piruvato quinase (PK)	4033434	55							1(1)	3(2)		1(1)
Proteína dissulfeto isomerase	71658893	54								2(2)		
Aspartato aminotransferase, mitocondrial	71412236	46					6(3)	1(1)				
Tirosina aminotransferase	1168606	46	7(5)	5(4)	2(2)	3(3)			1(1)		1(1)	

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo SEQUEST. Foram consideradas válidas identificações de peptídeos com $\Delta CN > 0,1$ e $XCorr > 1,8$; 2,5 ou 3,5 para $z = +1$; +2 ou +3, respectivamente. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 1,4 Da e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met e Trp assim como alquilação de Cys por acrilamida). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa Scaffold versão 1.7.

Quadro 2 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas por nanoLC-ESI-ION TRAP, com o número total de espectros MS/MS associados à cada proteína identificada e o número de peptídeos únicos entre parênteses (continuação).

Proteína	Nº de acesso (gi)	MM Teórica (kDa)	Banda 1		Banda 2		Banda 3		Banda 4		Banda 5	
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Cistationa gama liase	71662043	44							3(2)	9(8)	8(6)	10(7)
Proteína hipotética	71661567	43									2(2)	8(8)
Prostaglandina F2 α sintase	71659766	42	9(5)	1(1)	16(9)	20(13)	6(5)	17(9)	10(6)	17(8)	3(3)	7(5)
Álcool desidrogenase	71664570	42			3(3)	10(8)	1(1)	2(2)				
Proteína hipotética	71660170	42					1(1)	2(2)				
Frutose-bisfosfato aldolase, glicossomal	71414543	41					2(2)	4(3)	4(3)	15(8)	1(1)	4(3)
GAPDH glicossomal	120679	39				1(1)	9(6)	15(11)	2(1)	4(2)		
Aspartato carbamoiltransferase	71649785	36									2(2)	

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo SEQUEST. Foram consideradas válidas identificações de peptídeos com Δ CN > 0,1 e XCorr > 1,8; 2,5 ou 3,5 para $z = +1$; +2 ou +3, respectivamente. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 1,4 Da e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met e Trp assim como alquilação de Cys por acrilamida). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa Scaffold versão 1.7.

Quadro 2 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas por nanoLC-ESI-ION TRAP, com o número total de espectros MS/MS associados à cada proteína identificada e o número de peptídeos únicos entre parênteses (continuação).

Proteína	Nº de acesso (gi)	MM Teórica (kDa)	Banda 1		Banda 2		Banda 3		Banda 4		Banda 5	
			A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Desidrogenase 2-hidroxiácida específica para D-isômero	71420052	39						2(2)		4(4)	12(10)	9(6)
Ciclofilina 40 kDa	33867789	38						4(3)	2(2)			
Nucleosídeo fosforilase	71652657	37						2(1)	9(5)	15(9)	3(3)	5(5)
Oxidoreductase	71420395	37							2(2)	2(2)		
Transaldolase	71400573	36						1(1)	6(5)	18(9)		
Malato desidrogenase citosólica	71405868	36									8(3)	6(5)

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo SEQUEST. Foram consideradas válidas identificações de peptídeos com $\Delta CN > 0,1$ e $XCORR > 1,8$; 2,5 ou 3,5 para $z = +1$; +2 ou +3, respectivamente. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 1,4 Da e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met e Trp assim como alquilação de Cys por acrilamida). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa Scaffold versão 1.7.

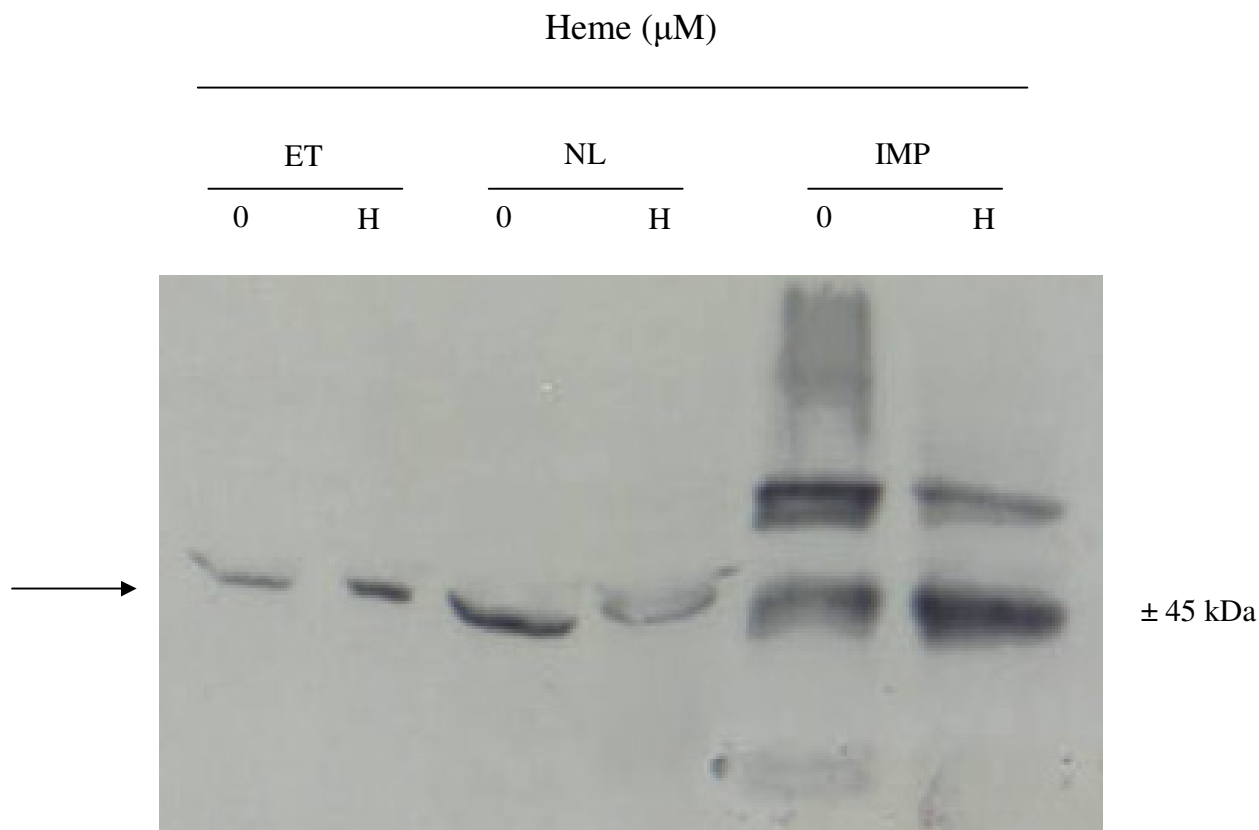


Figura 25 - Imunoprecipitação e análise da expressão da HO-1 em epimastigotas tratados com heme. Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2,5 \times 10^7$) foram mantidas em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme $300 \mu\text{M}$ por cinco dias. Os parasitos foram lisados no 5º dia e a imunoprecipitação realizada com anticorpo monoclonal anti-HO-1 e proteína A/G agarose. Após a eluição, as proteínas foram separadas em eletroforese SDS-PAGE (12%) e transferidas para uma membrana de nitrocelulose, incubada com o anticorpo monoclonal anti-HO-1 e revelada por ECL. Esta figura é representativa de três experimentos independentes. ET - extrato total; NL - não-ligado; IMP - imunoprecipitado.

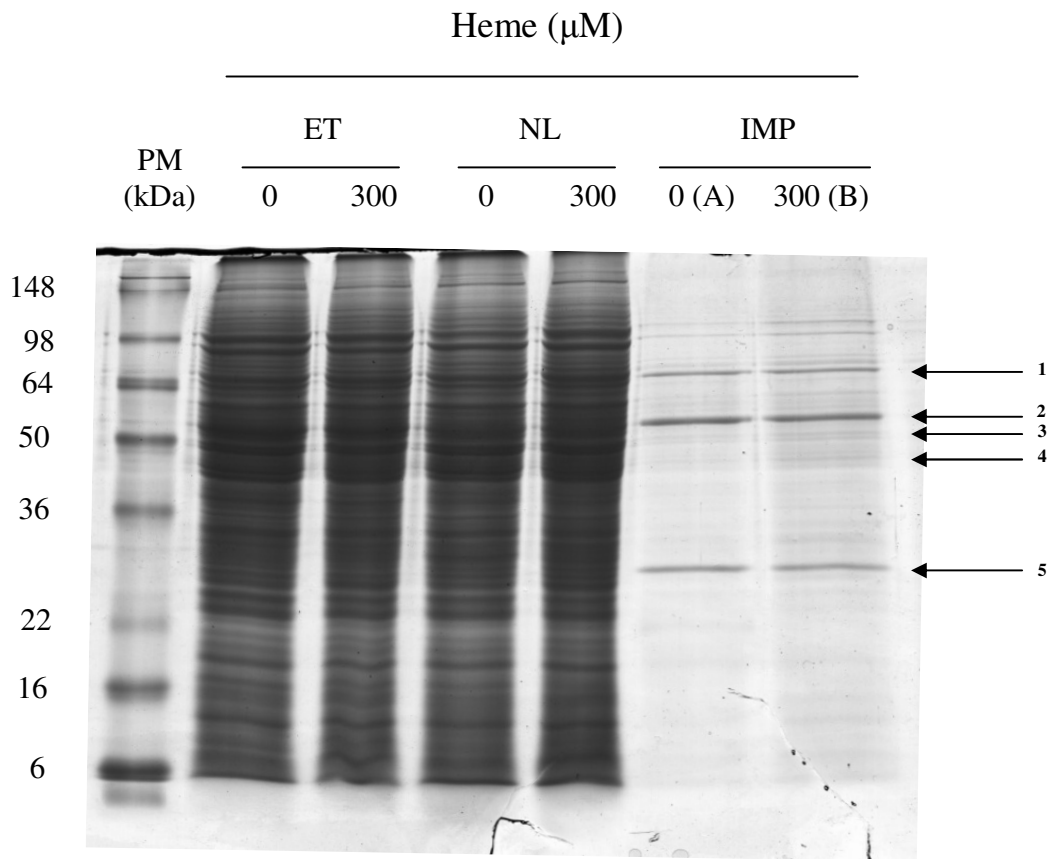


Figura 26 - Eletroforese unidimensional do imunoprecipitado de *T. cruzi* com anticorpo anti-HO-1. Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2,5 \times 10^7$) foram mantidas em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme 300 μM por cinco dias. Os parasitos foram lisados no 5^o dia, feita a imunoprecipitação com anticorpo anti-HO-1 e as proteínas separadas em eletroforese SDS-PAGE 12%. A partir da coloração por comassie blue coloidal, foram extraídas do gel cinco bandas de cada tratamento (controle - A; Heme 300 μM - B) para preparação dos extratos peptídicos e posterior análise no espectrômetro de massas (LC-ESI-Linear trap/Orbitrap). ET - extrato total; NL - não-ligado; IMP - imunoprecipitado.

Tabela 1 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas apenas na condição A (sem heme) por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap.

Proteína (Classe)	Nº de acesso (gi)*	MM Teórica (kDa)
ATPase subunidade β	70883049	56
Glicose 6-fosfato isomerase	60548034	35

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo ProLuCID. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 50 ppm e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa SE-Processor. *gi de uma proteína representativa da classe.

Tabela 2 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas apenas na condição B (heme 300 μ M) por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap.

Proteína (Classe)	Nº de acesso (gi)*	MM Teórica (kDa)
<i>Heat shock protein 85</i> (HSP85)	70867473	81
Urocanato hidratase	71419309	75
Proteína hipotética	70881954	72
RNA helicase dependente de ATP	71650107	69
Flavoproteína succinato desidrogenase	70873803	67
Transcetolase	70870034	58
Peptidase processadora mitocondrial	71655600	54
6-fosfo-1-frutoquinase	70887446	54
Tripanotiona redutase	71405339	54
Citrato sintase	71660323	53
Peptidase M20/M25/M40	71649847	51
Lipoamida Desidrogenase	194368485	49
Glutamina sintetase	70865738	48
Fator de alongamento 1- gamma	70870856	47
Fator de iniciação eucariótico 4a	71666845	46
Proteína hipotética	70874225	46
Fosfoglicerato quinase	71654898	44

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo ProLuCID. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 50 ppm e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa SE-Processor. *gi de uma proteína representativa da classe.

Tabela 2 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas apenas na condição B (heme 300 μ M) por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap (continuação).

Proteína (Classe)	Nº de acesso (gi)*	MM Teórica (kDa)
2-amino-3-cetobutirato coenzima A ligase	71650629	44
Acetilornitina deacetilase-like	71417045	43
Aminoacilase	70876041	43
Proteína hipotética	70884702	43
Glutamamil carboxipeptidase	71410072	43
Desidrogenase 2-hidroxiácida específica para D-isômero	71420052	39
Prolina racemase	71419827	38
Proteína hipotética	70868053	37
Proteína hipotética	70880016	32
Proteína precursora p22	70878183	26
Proteína ribossomal 60S L13a	71657094	26
Proteassoma subunidade α -2	71420498	25
Proteína ribossomal 40S S3	71748612	24
Proteína flagelar ligadora de cálcio	70869034	24
Autoantígeno I/6	71655864	23
Complexo HslVU, subunidade proteolítica	74025044	23
Triparedoxina peroxidase	71413207	22
Fator de alongamento 2	71421496	17

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo ProLuCID. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 50 ppm e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa SE-Processor. *gi de uma proteína representativa da classe.

Utilizando o *spectral counting* como método de quantificação, podemos dizer que apenas quatro das 35 proteínas (tabela 3) não se encontram mais expressas nas células tratadas com heme, que são: piruvato fosfato diquinase, isocitrato desidrogenase, aspartato aminotransferase e a proteína hipotética (nº de acesso 70887191). Portanto, podemos dizer que a maioria das proteínas encontram-se mais expressas na presença de heme, indicando uma grande modificação do perfil proteico (ilustrado no diagrama de Venn, Figura 27), e expressão dessas, nos parasitos tratados com heme. Foi identificada também, utilizando o banco *Swissprot*, a proteína IGKC de camundongo, correspondente à cadeia kappa, um tipo de cadeia leve de imunoglobulinas, corroborando o resultado obtido na imunoprecipitação, onde aparecem bandas adicionais à banda desejada, derivadas provavelmente do anticorpo primário, utilizado na preparação da amostra.

A Tabela 4 apresenta a lista de proteínas em comum às duas análises proteômicas. Das 23 proteínas encontradas na Tabela 1, 12 voltam a aparecer na segunda espectrometria de massa, dessa vez a partir de imunoprecipitação.

Como muitas proteínas identificadas nas duas espectrometrias de massa são de localização glicossomal, e encontramos na imunocitoquímica alguma marcação do anticorpo anti-HO-1 no interior de vesículas, realizamos uma nova imunocitoquímica, utilizando anticorpo primário policlonal anti-hexoquinase como marcador glicossomal, além do anticorpo monoclonal anti-HO-1, continuando a investigação da localização ultraestrutural da proteína de estudo no parasito. Como mostra a Figura 28, podemos observar que ocorre colocalização glicossomal, ou seja, há marcação do anticorpo anti-HO-1 no glicossomo, sugerindo que a proteína de estudo pode ter localização glicossomal.

Tabela 3 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas em ambas as condições por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap com o número total de espectros MS/MS associados à cada identificação e o número de peptídeos únicos entre parênteses.

Proteína (Classe)	Nº de acesso (gi)*	MM Teórica (kDa)	A	B
Piruvato fosfato diquinase	71666490	101	12(3)	12(5)
<i>Heat shock protein 70</i> (HSP70)	71661432	71	12(5)	48(15)
HSP70, precursor mitocondrial	71407515	71	140(28)	202(34)
ATP sintase subunidade α	71904594	64	4(3)	12(5)
Proteína de ligação a poli-A	71659778	61	4(2)	7(2)
Chaperonina HSP60, mitocondrial	3023478	59	6(2)	20(6)
Alanina aminotransferase	71667866	55	6(3)	8(3)
Hexoquinase	71655813	52	9(4)	18(6)
β tubulina	71656281	50	10(6)	34(12)
α tubulina	18568136	50	3(2)	4(2)
Fator de alongamento 1- α	66476124	49	10(3)	46(7)
Tiol-transferase Tc52	37781033	48	8(4)	17(6)

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo ProLuCID. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 50 ppm e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa SE-Processor. *gi de uma proteína representativa da classe.

Tabela 3 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas em ambas as condições por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap com o número total de espectros MS/MS associados à cada identificação e o número de peptídeos únicos entre parênteses (continuação).

Proteína (Classe)	Nº de acesso (gi)*	MM Teórica (kDa)	A	B
S-adenosilhomocisteína hidrolase	71654820	48	8(4)	19(9)
Isocitrato desidrogenase	71659757	47	3(2)	3(2)
Tirosina minotransferase	1168606	46	5(3)	17(7)
Aspartato aminotransferase, mitocondrial	71412236	46	9(4)	7(3)
Enolase	71665461	46	19(6)	44(11)
Succinil-CoA ligase cadeia β	71663174	45	3(2)	11(5)
Glutamato desidrogenase	71663732	45	49(13)	73(17)
Cistationina β -sintase	71668089	44	8(4)	14(5)
Proteína ligadora de GTP	71661506	44	2(2)	4(2)
Cistationa gama liase	71662043	44	2(2)	8(3)
Proteína Hipotética	70883016	43	8(3)	9(4)
Proteína Hipotética	70887191	42	6(2)	3(2)
Álcool desidrogenase	71664570	42	6(2)	10(4)
Proteína de interação Hsc70	71663660	42	5(2)	6(3)

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo ProLuCID. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 50 ppm e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa SE-Processor. *gi de uma proteína representativa da classe.

Tabela 3 - Lista de proteínas da 1D PAGE identificadas em ambas as condições por LC-ESI-Linear trap/Orbitrap com o número total de espectros MS/MS associados à cada identificação e o número de peptídeos únicos entre parênteses (continuação).

Proteína (Classe)	Nº de acesso (gi)*	MM Teórica (kDa)	A	B
Prostaglandina F2 α sintase	71659766	42	26(9)	51(13)
Frutose-bifosfato aldolase, glicossomal	71414543	41	8(5)	22(6)
Arginina kinase	71407949	40	7(4)	14(6)
GAPDH glicossomal	26393926	39	6(2)	12(3)
Proteína Hipotética	70881732	37	8(4)	16(7)
14-3-3 protein	71654806	30	3(2)	6(2)
Proteína Gim5A	71659858	27	6(3)	18(3)
Triosefosfato isomerase	1730005	27	3(2)	11(4)
Proteína ativadora de proteassoma PA26	71411031	25	4(2)	7(4)

Os espectros MS/MS gerados foram submetidos à procura em banco de dados (cinetoplastídeos - gerado localmente) utilizando o algoritmo ProLuCID. Os parâmetros de procura foram: digestão por tripsina; erro tolerado para massa de íon precursor de 50 ppm e para íon-fragmento de 0,5 Da; modificação fixa (carbamidometilação de Cys); modificações variáveis (oxidação de Met). Foram aceitas apenas identificações de proteínas com pelo menos dois peptídeos associados e todos os dados foram validados pelo programa SE-Processor. *gi de uma proteína representativa da classe.

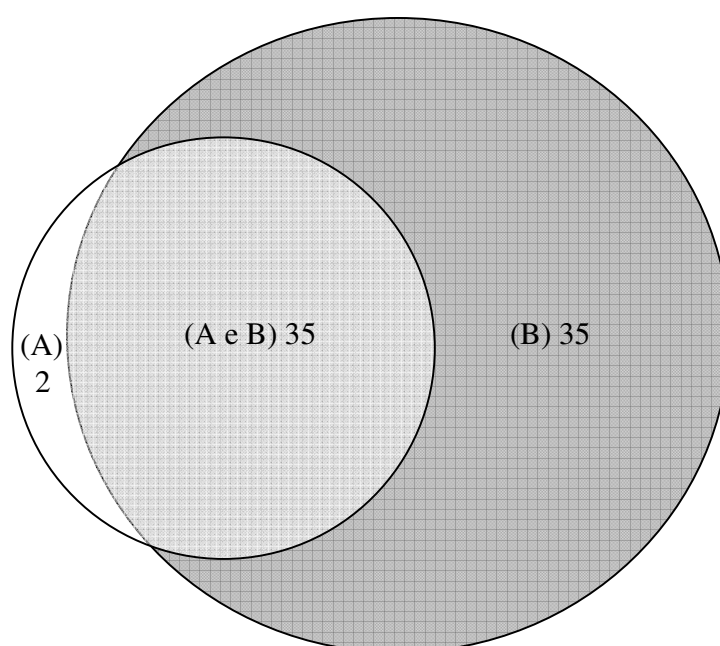


Figura 27 - Diagrama de Venn indicando o número de classes de proteínas encontradas em cada estado por 1D PAGE LC-ESI-Linear trap/Orbitrap.

Tabela 4 - Lista de proteínas identificadas em ambas as espectrometrias de massa (LC-ESI-ION TRAP e LC-ESI-Linear trap/Orbitrap).

Proteína (Classe)	Nº de acesso (gi)*	MM Teórica (kDa)
Heat shock protein 70 (HSP70)	71661432	71
HSP70, precursor mitocondrial	71407515	71
Proteína de ligação a poli-A	71659778	61
Alanina aminotransferase	71667866	55
Aspartato aminotransferase, mitocondrial	71412236	46
Tirosina aminotransferase	1168606	46
Cistationa gama liase	71662043	44
Prostaglandina F2 α sintase	71659766	42
Álcool desidrogenase	71664570	42
Frutose-bifosfato aldolase, glicossomal	71414543	41
GAPDH glicossomal	26393926	39
Desidrogenase 2-hidroxiácida específica para D-isômero	71420052	39

*gi de uma proteína representativa da classe.

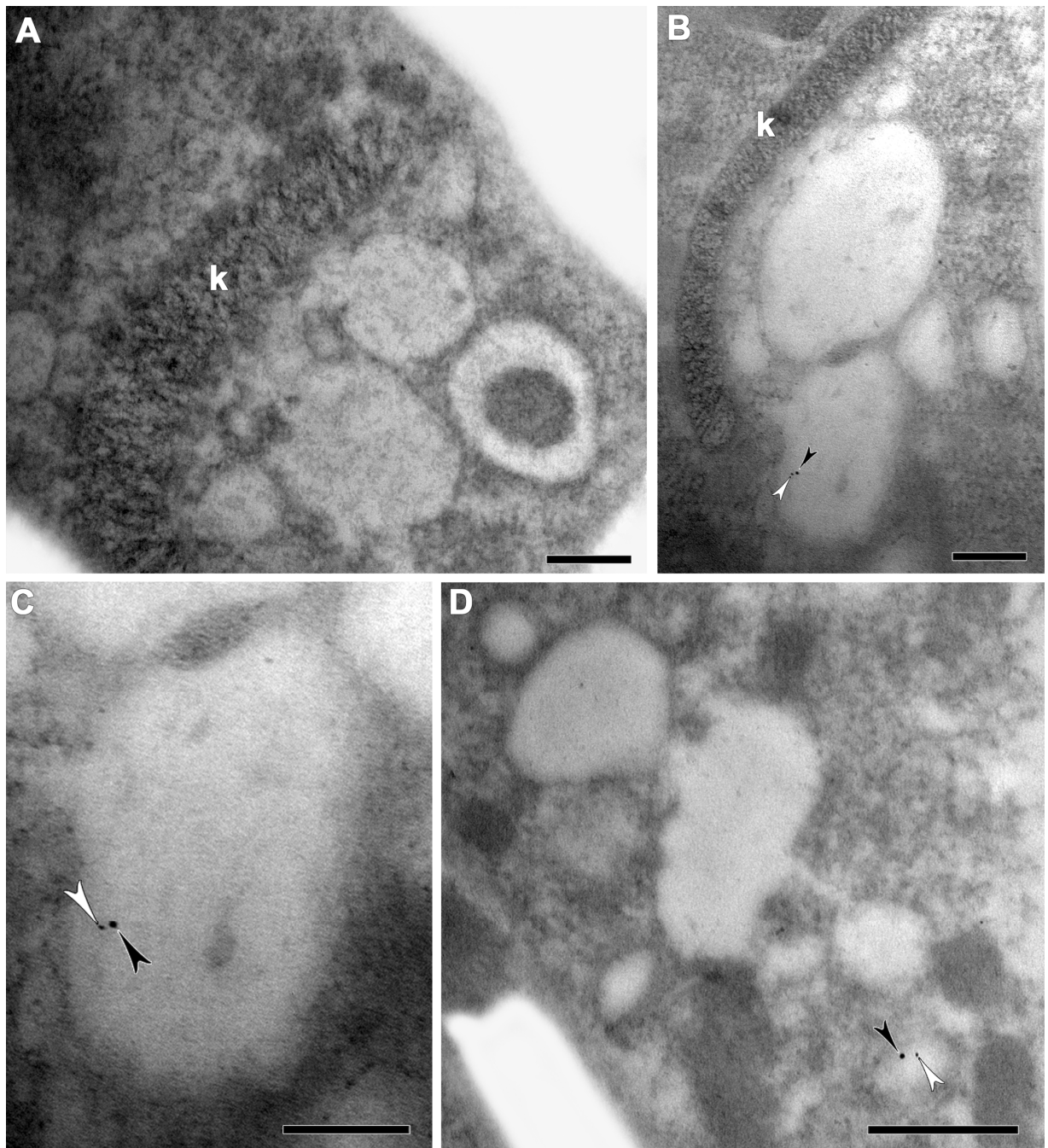


Figura 28 - Imunocitoquímica ultra-estrutural em formas epimastigotas de *T. cruzi* com hexoquinase como marcador glicossomal. Após incubação por cinco dias na presença ou na ausência de heme 300 μ M, os parasitos foram fixados, desidratados e emblocados em resina Lowicryl. Os cortes foram incubados com anticorpo monoclonal anti-HO-1 e anticorpo policlonal anti-hexoquinase e em seguida com anticorpos secundário acoplados a partículas de ouro coloidal de 10 nm e 5 nm, respectivamente. Por fim, as grades foram contrastadas e examinadas em microscópio eletrônico de transmissão. (a) Controle secundário (amostra tratada somente com o anticorpo secundário) não apresentando partícula de ouro. (b-d) Parasitos controle apresentando colocalização, com dupla marcação glicossomal, HO-1 (cabeças de seta pretas) e hexoquinase (cabeças de seta brancas). K - kinetoplasto. Barras = 200 nm.

4 DISCUSSÃO

Estudos bioquímicos mostraram a ausência da via completa da biossíntese de heme em *T. cruzi*, o que foi corroborado com o sequenciamento do genoma de *T. cruzi*. Uma vez que o heme não é sintetizado pelo *T. cruzi*, torna-se uma molécula essencial para o parasito. O parasito capta a molécula de heme do intestino de seu hospedeiro invertebrado, o inseto triatomíneo, que é hematófago e se alimenta de grandes quantidades de sangue. No interior do intestino do barbeiro, esse sangue é digerido, levando a liberação de hemoglobina e sua degradação em moléculas de heme (que podem ser então ser internalizadas pelo parasito), e peptídeos livres ou ainda ligados à molécula de heme. Resultados do nosso grupo mostram que a molécula de heme é internalizada rapidamente pelas formas epimastigotas de *T. cruzi*, sendo incorporada aos reservossomas, e que esta promove uma indução na proliferação do parasito de forma dose-dependente (Lara e cols., 2007). Esse trabalho teve o objetivo então, de identificar uma proteína HO-1 funcional em *T. cruzi*, visto a importância dessa enzima como um mecanismo intracelular no controle de sua homeostase.

A fim de investigar o possível envolvimento de uma atividade Heme Oxigenase na proliferação do parasito, testamos o efeito do CoPPIX, o indutor de sua síntese proteica (Gong e cols., 2008) e do SnPPIX, seu inibidor enzimático. A CoPPIX não provocou nenhum efeito sobre a proliferação do parasito (Figura 16). Ao contrário disso, observamos a inibição dose-resposta provocada pelo SnPPIX sobre a proliferação celular mesmo na ausência de heme porque apesar de não ter a adição de heme à cultura, o meio de cultura utilizado, o BHI, tem em sua composição hemeproteínas (Figura 11). Essas hemeproteínas podem ser internalizadas e posteriormente podem liberar a molécula de heme, servindo como fonte de ferro para o parasito. A diminuição observada na presença de SnPPIX (Figuras 11 e 12) poderia indicar que um, ou mais de um produto da degradação de heme seria importante para o evento de crescimento. De acordo com resultados desta tese, um dos produtos da degradação da molécula de heme, a biliverdina, quando adicionado à cultura não interfere na proliferação das formas epimastigotas (Figura 14). Além disso, dados do nosso laboratório mostram que a adição de ferro, ou um quelante de ferro como a deferroxamina, também não interfere na proliferação. O monóxido de carbono, outro produto da degradação da molécula de heme, não teve seu efeito testado sobre a proliferação do parasito. Resultados do nosso grupo mostram que o efeito inibitório da proliferação celular mediada por

SnPPIX na presença de heme se dá pela competição das porfirinas pela entrada na célula, competindo pelo mesmo transportador (**“A role for porphyrins heme-analogues: inhibit the heme uptake in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes by ABC transporters competition and decrease its proliferation”**, manuscrito em preparação).

Quando adicionado à cultura o produto da degradação do heme, biliverdina, na presença de SnPPIX e heme, foi visto uma reversão parcial da inibição da proliferação causada pelo SnPPIX (Figura 13), embora crescentes concentrações de biliverdina adicionadas ao meio de cultura não tenha alterado a proliferação celular (Figura 14). Isto somado ao aumento da proliferação no tratamento BV + heme em relação ao tratamento com heme (Figura 15), nos faz especular que *in vivo* o parasito só entra em contato com a biliverdina depois de já ter estado na presença de heme, ocorrendo então uma sinalização celular que não é completa quando tratamos o parasito somente com BV, sem adição prévia de heme. A necessidade da presença da molécula de heme para que ocorra o aumento do crescimento de formas epimastigotas quando adicionado BV sugere que o heme tenha um papel sinalizador nas células de *Trypanosoma cruzi*.

De fato, resultados anteriores do nosso laboratório mostram o heme como um sinalizador celular para este parasito. O heme leva a um aumento dose-resposta na proliferação celular do *T. cruzi*, através da ativação da via CaMKII (Souza e cols., 2009) que por sua vez está envolvida com as espécies reativas de oxigênio formadas pelos parasitos na presença de heme (**“Heme-induced reactive oxygen species formation stimulates proliferation of *Trypanosoma cruzi* and is associated with the CaMKII signalling pathway”** – submetido a PLoS ONE). Nossos dados estão de acordo com Masuya e colaboradores que em 1999, mostraram também sinalização do heme via CaMKII, onde o heme leva à ativação de um proto-oncogene em células humanas.

Observamos por *immunoblotting* um aumento dos níveis de expressão da provável HO-1 em resposta ao heme (Figura 17). O reconhecimento de uma proteína de *T. cruzi* pelo anticorpo anti-HO-1 juntamente com a identificação da molécula de biliverdina nas células tratadas com heme (dados não mostrados do doutorando Maurício Cupello) nos leva a crer na presença de uma enzima responsável pela degradação da molécula de heme semelhante a HO-1, apesar dessa proteína não estar anotada no genoma deste parasito recentemente publicado (El-Sayed *et al.*, 2005a).

A observação do aumento dos níveis de expressão da proteína reconhecida pelo anticorpo em resposta ao heme sugere a presença de uma atividade Heme Oxigenase com regulação

parecida aos outros organismos nesse parasito. Quando investigado o efeito de CoPPIX sobre a modulação da expressão da enzima por *immunoblotting*, observamos um aumento significativo dos níveis de expressão da provável HO-1 em relação ao controle (Figura 18). Portanto, parece que o CoPPIX também é capaz de induzir a expressão da HO-1 em *T. cruzi*. A transcrição em tripanossomatídeos é policistrônica, longas unidades policistrônicas são transcritas, o que explica provavelmente a razão de poucos promotores terem sido identificados até hoje (Martínez-Calvillo e cols, 2010). A expressão diferencial de genes em tripanossomatídeos ocorre principalmente pós-transcricionalmente, através de um processamento primário do transcrito (*trans-splicing* e poliadenilação).

A indução de HSP tem sido um modelo eficiente para o estudo de mecanismos de expressão gênica e regulação em eucariotos. Em *T. cruzi*, a expressão gênica da HSP70 também tem sido investigada, mostrando que a síntese de HSP70 aumenta de 4 a 5 vezes após o choque térmico a 37 °C, enquanto os níveis de mRNA aumentam apenas 2 vezes, sugerindo um mecanismo de controle traducional (Requena e cols., 1992). Recentemente, em 2010, Rodrigues e colaboradores, mostraram os mecanismos regulatórios pós-transcricionais da indução do gene da HSP70, através do aumento da meia-vida do mRNA, e a participação de ambas regiões 3'-UTRs e 5'-UTRs na estabilização do mRNA durante o choque térmico em *T. cruzi*. Portanto, o aumento da expressão da proteína reconhecida pelo anticorpo anti-HO-1 também pode estar ocorrendo através de regulação a nível pós-transcricional.

Um fato relevante é a massa molecular (45kDa) da proteína reconhecida pelo anticorpo (Figura 17), enquanto que a HO-1 clássica de mamíferos possui massa molecular de 32 kDa. A HO da bactéria patogênica *Corynebacterium diphtheriae*, a enzima Hmu O que possui atividade heme oxigenásica, também tem massa molecular diferente da HO de humanos: 24 kDa (Yoshida e Migita, 2000). Essa diferença na massa molecular é um outro indício de que se trata de uma HO-1 de estrutura diferente da enzima de mamífero, própria do parasito.

A imunocitoquímica, utilizando anticorpo anti-HO1, corrobora o resultado obtido no *immunoblotting*, com um aumento da marcação nos parasitos tratados com heme, sugerindo uma maior expressão desta enzima na presença de heme (Figura 19). E também observamos que a proteína de estudo apresenta marcação além do citosol, em membranas e no interior de vesículas, podendo ter mais de uma localização. Dados da literatura mostram algumas enzimas que se encontram presentes em mais de um compartimento em tripanossomatídeos. Enzimas envolvidas

na defesa contra espécies reativas de oxigênio (EROs) têm sido encontradas em ambos citosol e glicossomos (Dey e Datta, 1994; Wilkinson e cols., 2002). Por exemplo, uma peroxidase localizada em glicossomos de *T. cruzi* que, via glutationa e triparedoxina, recebe seus elétrons a partir da tripanotona. Além disso, há indícios da presença de tripanotona redutase não só no citosol mas também em glicossomos de *T. cruzi* e *T. brucei* (Wilkinson e cols., 2002; Hannaert e cols., 2003).

Esse conjunto de resultados sugere a existência da HO-1 em *T. cruzi*, e em 2007, Ciccarelli e colaboradores, mostraram um *immunoblotting* em *T. cruzi*, utilizando anticorpo policlonal anti-HO-1. Entretanto, como esta enzima não está anotada no genoma do parasito (El-Sayed e cols., 2005a), para provar que se trata realmente de uma HO-1, apesar de fortes evidências, como a identificação de biliverdina, principal metabólito de heme, é preciso realizar uma abordagem molecular.

Utilizamos então a biologia molecular como ferramenta, e a técnica de PCR para amplificação do gene da HO-1 utilizando oligonucleotídeos desenhados a partir do genoma de *T. cruzi*, baseado em proteínas hipotéticas dos parasitos *Theileria annulata* e *Plasmodium falciparum*. Observamos como produto da amplificação bandas correspondentes a 369, 492 e 738 pb (Figura 21). A banda de 369, produto predominante, foi a primeira a ser purificada para sequenciamento. Como resultado do sequenciamento identificou-se uma trans-sialidase, proteína bastante abundante em *T. cruzi*. Em 2005, com a publicação do genoma do *T. cruzi*, foi demonstrado que pelo menos 50% do genoma do parasito é constituído de seqüências repetitivas consistindo principalmente de famílias gênicas de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas (El-Sayed e cols., 2005). Os membros das superfamílias das trans-sialidasas, mucinas, proteínas associadas à mucina (MASP) e a glicoproteína de superfície gp 63 estão envolvidos nos processos de adesão e invasão das células do hospedeiro mamífero, virulência e evasão do sistema imune do hospedeiro (Frasch, 1994).

O produto de amplificação esperado através da análise do desenho dos oligonucleotídeos a partir do genoma do *T. cruzi*, é um fragmento de cerca de 720 pb. Obtivemos como produto do PCR também o fragmento de 738 pb (Figura 21), de tamanho bem próximo ao esperado, porém o sequenciamento deste fragmento a partir da purificação da banda extraída do gel de agarose gerou seqüências de baixa confiabilidade, pela dificuldade da determinação dos nucleotídeos devido à baixa resolução do cromatograma. O processo de purificação pode não ter sido muito

eficaz devido à presença ainda de resíduos de agarose na amostra. Foi utilizado então um novo par de oligonucleotídeos, já desenhados, de uma região mais interna da sequência desejada, para tentar diminuir o aparecimento de bandas inespecíficas e facilitar a purificação do produto em questão. Conseguimos obter uma única banda como produto da reação, de 520 pb (Figura 22), que foi purificada e sequenciada, porém a sequência obtida não parece ser exatamente a região para qual os oligonucleotídeos foram desenhados (alinhamento < 100%), e também não gerou alinhamentos com nenhuma proteína de função conhecida, somente proteínas hipotéticas de *T. cruzi* e proteínas CCD39 de mamíferos (Figura 23).

O sequenciamento completo do genoma de *T. cruzi*, e de outros tripanossomatídeos foi concluído em 2005, porém até agora, o genoma de *T. cruzi* não foi totalmente montado, devido a um conteúdo gênico altamente repetitivo e a heterozigiosidade das cepas disponíveis. Muitas proteínas preditas têm funções putativas ou desconhecidas que impedem a identificação correta dessas proteínas e conseqüentemente a elucidação do metabolismo do parasito (Berriman e cols., 2005; El-Sayed e cols., 2005a e 2005b, Capriles e cols., 2010). Além disso, dentro da região selecionada para o desenho dos oligonucleotídeos há um trecho onde a sequência de DNA não consta como um gene e está entre duas regiões de repetição, sem qualquer notação. Com isso, não foi identificada a sequência toda a ser amplificada, mas encontramos o que achávamos ser o início e o final da sequência que alinhava com a proteína com domínio HO de *Theileria annulata*. Portanto, apesar do desenho dos oligonucleotídeos a partir de análise dos dados brutos do genoma de *T. cruzi* ter sido uma tentativa de isolar o gene da HO, era possível que esses oligonucleotídeos não levassem à sequência desejada já que não se sabe se trata-se de um gene verdadeiro, devido a dificuldade de se trabalhar com o genoma complexo e não totalmente montado de *T. cruzi*.

Dando seguimento à identificação da HO-1, ou uma proteína com atividade HO em *T. cruzi*, utilizamos também a técnica de espectrometria de massa a partir de eletroforese unidimensional como tentativa de identificação da HO-1 de *T. cruzi*. A espectrometria de massa, atualmente, tem sido a ferramenta mais utilizada na identificação de proteínas, devido a sua sensibilidade e alta precisão (Görg e cols., 2004). Esta técnica permite determinar a massa molecular de uma biomolécula, como carboidratos, lipídeos e no caso em questão, proteínas.

A utilização da análise proteômica nos possibilita o estudo do nível de expressão gênica em condições específicas, nos dá informações sobre a estrutura primária dessas biomoléculas, e também a identificação de proteínas que sofrem modificações pós-traducionais comumente

encontradas no *T. cruzi*, e que não são detectadas por análise do genoma. Esse pode ser um fator importante para a identificação da HO-1 de *T. cruzi*, já que esta não consta no genoma do parasito.

A partir da análise da espectrometria de massa, foi possível a identificação de 23 proteínas (Quadro 2), obtidas a partir das bandas de massa aproximada de 45 kDa extraídas do gel SDS-PAGE 12% (Figura 24), e seguindo o critério de seleção de proteínas que obtiveram pelo menos dois peptídeos associados. Utilizando como estratégia o *spectral counting*, podemos especular que 13 dessas proteínas encontradas estão mais expressas quando o parasito é tratado com heme. O *spectral counting* é uma estratégia viável para análise quantitativa relativa, onde o número de espectros associados aos peptídeos de uma proteína é utilizado como medida alternativa da abundância da proteína (Choi e cols., 2008; Lundgren e cols., 2010). Apesar de conceitualmente simples, estudos recentes têm demonstrado que o *spectral counting* pode ser tão sensível quanto a intensidade dos picos dos íons (em termos de faixa de detecção) mas ainda mantendo a linearidade da medida (Liu e cols., 2004; Blondeau e cols., 2004; McAfee e cols., 2006; Old e cols., 2005; Ishihama e cols., 2005; Colinge e cols., 2005; Zybailov e cols., 2006; Lu e cols., 2007; Fu e cols., 2008). Uma limitação é que a resposta ao aumento da abundância da proteína é saturável e também que quando a contagem de espectros é baixa, a sensibilidade à mudanças na quantidade de proteína diminui.

Dentre as proteínas encontradas mais expressas na presença de heme, estão a prostaglandina F2 α sintase, a transaldolase, a HSP70 e duas proteínas da via glicolítica, piruvato quinase e frutose-bifosfato aldolase (Quadro 2).

A prostaglandina F2 α sintase é chamada de *old yellow enzyme* em *T. cruzi* (TcOYE). Ela pertence à família das oxidoredutases flavina-dependente (Kubata e cols., 2002). A TcOYE é uma NADPH oxidoredutase que contém flavina mononucleotídeo (FMN) como grupo prostético que catalisa a síntese de prostaglandina F2 α . Esta enzima pode reduzir também agentes tripanocidas (nifurtimox e outros) ou hidróperóxido (Williams e cols., 2002). Foi sugerido que esta enzima seria responsável pela maior parte da atividade antioxidante em *T. cruzi* (Kubata e cols., 2002). A transaldolase é uma enzima integrante da via das pentoses. Evidências bioquímicas têm sugerido que a via das pentoses exerce função essencial de proteção do parasito contra o estresse oxidativo, já que é a principal fonte de NADPH na célula. O NADPH funciona como cofator da enzima tripanotiona redutase para a manutenção do estado reduzido da

trypantion, importante defesa do parasito contra espécies reativas de oxigênio, em seu estado reduzido (Igoillo-Esteve e cols., 2007).

É interessante observar o aumento de enzimas envolvidas na defesa antioxidante com o tratamento com heme já que este apresenta conhecido efeito pró-oxidante (Ryter e Tyrrell, 2000). Resultados do nosso grupo mostram que o heme está envolvido no balanço redox do *T. cruzi*, levando à formação de espécies reativas de oxigênio no parasito tratado com heme (“**Heme-induced reactive oxygen species formation stimulates proliferation of *Trypanosoma cruzi* and is associated with the CaMKII signalling pathway**” - submetido a PLoS ONE).

A imunoprecipitação com o anticorpo anti-HO-1 mostrou mais uma vez que o anticorpo reconhece uma proteína de *T. cruzi*, e podemos observar também no *immunoblotting* do imunoprecipitado que o imunocomplexo aumentou significativamente nas células tratadas com heme (Figura 25), sugerindo novamente uma maior expressão desta enzima na presença de heme. Como a imunoprecipitação foi realizada para parcial purificação do extrato de proteínas do parasito, e concentração da proteína alvo, realizamos uma nova espectrometria de massa, para identificar as proteínas imunoprecipitadas. A análise proteômica dos cinco pares de bandas selecionadas desta imunoprecipitação levou à identificação de 72 classes de proteínas (Tabelas 1, 2 e 3), destacando 35 que encontram-se expressas tanto na condição controle, quanto nas células tratadas com heme 300 μ M (Tabela 3). Utilizando o *spectral counting* como método de quantificação, podemos dizer que cerca de metade das 35 proteínas listadas tem grande aumento de sua expressão na presença de heme, como por exemplo, HSPs, hexoquinase, fator de alongamento 1- α , tiol-transferase Tc52, S-adenosilhomocisteína hidrolase, tirosina aminotransferase, enolase, succinil-CoA ligase, glutamato desidrogenase, prostaglandina F2 α sintase, frutose-bifosfato aldolase e arginina quinase. Analisando as 72 proteínas, podemos dizer que a maioria encontra-se mais expressa na presença de heme, e que há uma significativa alteração do perfil protéico quando os parasitos são tratados com heme (Figura 27).

Verificando as proteínas encontradas nas duas espectrometrias de massa, notamos que 12 das 23 encontradas primeiramente, se repetem na segunda análise proteômica, como a prostaglandina F2 α sintase e a frutose-bifosfato aldolase, que são ricas em espectros e têm suas expressões significativamente aumentadas em ambas as análises, além de terem massa molecular na faixa da proteína de interesse (Tabela 4). No entanto, não foi possível identificar a proteína HO-1 funcional. Desta forma futuros experimentos são necessários e deverão ser desenvolvidos,

incluindo a eletroforese 2D para refinamento da análise proteômica e identificação da proteína alvo. Além disso, é interessante destacar que dados na literatura a partir de análises proteômicas de *T. cruzi*, mostram que de 30 a 36% das proteínas identificadas nesses estudos são de genes designados como hipotéticos, que validam estes como genes genuínos de *T. cruzi* (Lima e cols., 2010).

Como muitas proteínas identificadas em ambas as espectrometrias de massa são de vias metabólicas que ocorrem dentro dos glicossomas, como transaldolase e transcetolase (via das pentoses), nucleosídeo fosforilase (recuperação de purinas), frutose-bifosfato aldolase, glicose-6-fosfato isomerase, enolase, triose fosfato isomerase, hexoquinase (via glicolítica), entre outras, fizemos uma nova análise imunocitoquímica com marcação glicossomal, e vimos que ocorre colocalização com o anticorpo anti-HO-1, sugerindo que a proteína de estudo também possa ter localização glicossomal (Figura 28).

A glicólise não é o único processo metabólico que ocorre nos glicossomas. Enzimas envolvidas no metabolismo de peróxidos também podem ser encontradas nessas organelas, embora a catalase, enzima característica de peroxissomos, não tenha sido detectada em *T. brucei* e *Leishmania*. Mas encontra-se presente em glicossomos de *Phytomonas* e *Crithidia*. Outras vias metabólicas ou enzimas compartilhadas com os peroxissomos são a β -oxidação de ácidos graxos, via das pentoses, a primeira parte da biossíntese de lipídios éter e a HMG-CoA redutase para a síntese de isoprenóides. Único nos glicossomos é, entretanto, a presença de enzimas envolvidas no salvamento de purinas, biossíntese de pirimidinas e gliconeogênese (Oppendoes, 1987; Oppendoes, 1988; Michels e cols., 2000; Hannaert e cols., 2003).

Vias metabólicas que são comuns a diversos organismos são compostas principalmente por reações enzimáticas que são catalizadas por proteínas conservadas. Enzimas que realizam reações químicas semelhantes geralmente compartilham estruturas similares, entretanto enzimas análogas têm pouca ou nenhuma similaridade estrutural, mas compartilham a mesma atividade catalítica, e parecem não ser evolutivamente relacionadas (Fitch, 1970). A análise de sequências *in silico* e comparações de estruturas primárias e secundárias por si só não podem provar que duas sequências não são relacionadas a partir de um ponto de vista evolutivo. Uma origem comum pode ser sugerida a partir da conservação da estrutura da proteína, mesmo quando a evidência da homologia pela sequência de aminoácidos tenha sido descartada por divergência. A possibilidade de uma origem comum pode ser considerada altamente improvável

pela confirmação adicional de que duas proteínas têm diferentes estruturas tridimensionais (3D) (Galperin e cols., 1998). Além disso, essas diferenças na estrutura 3D são um fator importante na seleção de uma proteína como potencial alvo terapêutico (Capriles e cols., 2010).

A busca de alvos para o desenvolvimento de novas drogas para o tratamento de parasitoses é atualmente baseada na identificação de enzimas específicas de vias metabólicas do parasito. Entretanto, dados sobre frequência e distribuição de enzimas análogas sugerem que estas podem representar uma fonte inexplorada de alvos, já que enzimas análogas compartilham a mesma atividade mas possuem estruturas terciárias diferentes, um fator interessante para o desenvolvimento de drogas (Capriles e cols., 2010).

O sistema de degradação enzimática do heme em parasitas protozoários é desconhecida. A primeira demonstração foi a HO de *Plasmodium falciparum*, protozoário do filo Apicomplexa, a PfHO. Esse estudo mostra que o mecanismo de clivagem de heme é conservado no parasito da malária humana, *P. falciparum*, e que a clivagem de heme resulta na produção de bilirrubina IX α (BR IX α). Um fato interessante é que a PfHO é uma enzima com dupla atividade: HO e BVR (Okada, 2009).

O ano de 2009 marcou o centenário da descoberta da doença de Chagas, descoberta por Carlos Chagas em 1909. A doença é um grave problema na América Latina, e apesar disso a quimioterapia existente para a doença ainda não é satisfatória, sendo pouco eficaz em seus estágios avançados (fase crônica), além de ser extremamente tóxica para o hospedeiro. Novas e efetivas drogas no combate às doenças tropicais, como a doença de Chagas, poderiam reduzir drasticamente o grau de morbidade dessas doenças em regiões em desenvolvimento como o Brasil e o restante da América Latina.

Esses resultados são pioneiros na indicação da presença de uma possível Heme Oxigenase em *T. cruzi*. A demonstração dessa proteína em *T. cruzi* seria de grande importância, já que parece ser tão característica do parasito e diferente da enzima clássica de mamíferos, o que é de extrema importância para o estudo de alvos quimioterápicos para o tratamento da doença, pela possibilidade de ação seletiva da droga sobre o patógeno.

5 CONCLUSÕES

- O SnPPIX, inibidor da HO-1, inibiu parcialmente a proliferação do parasito, na ausência ou na presença de heme, diferentemente do heme, que aumenta a proliferação celular de forma dose dependente, como mostram resultados anteriores do grupo.
- A biliverdina, produto da degradação do heme pela HO, quando adicionado ao meio de cultura na presença de heme, foi capaz de reverter parcialmente a inibição da proliferação mediada por SnPPIX. Observou-se também que a biliverdina só aumenta a proliferação celular na presença de heme.
- O CoPPIX, indutor da HO-1, por sua vez, não interferiu na proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi*.
- Verificamos um aumento dos níveis de expressão da provável HO-1 de *T. cruzi* em resposta a adição de heme, através das técnicas de *immunoblotting*, imunocitoquímica e imunoprecipitação.
- A provável HO-1 de *T. cruzi* possui uma massa molecular de aproximadamente 45 kDa, diferente da HO-1 de mamíferos.
- Verificamos a expressão da provável HO-1 na presença de CoPPIX, SnPPIX e biliverdina, e somente o CoPPIX foi capaz de modular os níveis de expressão da HO-1.
- Observamos na análise ultraestrutural que o anticorpo anti-HO-1 está localizado principalmente no citoplasma do parasito, mas também apresentou marcação glicossomal, sugerindo que a provável HO-1 de *T. cruzi* pode ter mais de uma localização.
- Os resultados de espectrometria de massa mostraram uma grande alteração do perfil protéico na presença de heme, mas futuros experimentos são necessários, como eletroforese bidimensional, para a identificação da proteína alvo.

REFERÊNCIAS

Adade CM, de Castro SL, Soares MJ. Ultrastructural localization of *Trypanosoma cruzi* lysosomes by aryl sulphatase cytochemistry. *Micron* 2007; 38: 252-256.

[Andrews NW](#), [Abrams CK](#), [Slatin SL](#), [Griffiths G](#). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. *Cell* 1990; 61: 1277-1287.

Azogue E, La Fuente C, Darras CH. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1985; 79: 176-180.

[Balla J](#), [Vercellotti GM](#), [Jeney V](#), [Yachie A](#), [Varga Z](#), [Eaton JW](#), [Balla G](#). Heme, heme oxygenase and ferritin in vascular endothelial cell injury. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49: 1030-1043.

Belli SI. Chromatin remodelling during the life cycle of trypanosomatids. *Int J Parasitol* 2000; 30: 679-687.

Benchimol M, De Souza W, Vanderheyden N, Zhong L, Lu H-G, Moreno S, Docampo R. Functional expression of a vacuolar-type H⁺-ATPase in the plasma membrane and intracellular vacuoles of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J* 1998; 332: 695-702.

Benedickt E; Gossauer A, Kost HP, Miki W, Yamaguchi K. Biliverdin IX delta and neobiliverdin IX delta, isolated from the ovaries of the marine snail, *Turbo cornutus*. *Eur J Biochem* 1988; 175: 643-648.

[Bern C](#), [Montgomery SP](#), [Katz L](#), [Caglioti S](#), [Stramer SL](#). Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis* 2008; 21: 476-482.

[Berriman M](#), [Ghedin E](#), [Hertz-Fowler C](#), [Blandin G](#), [Renauld H](#), [Bartholomeu DC](#). The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. *Science* 2005; 309: 416-422.

Blondeau F, Ritter B, Allaire PD, Wasiak S, Girard M, Hussain N, et al. Tandem MS analysis of brain clathrin-coated vesicles reveals their critical involvement in synaptic vesicle recycling. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 3833-3838.

Borst P, Van der Ploeg M, Van Hoek JFM, Tas J, James J. On the content and ploidy of trypanosomes. *Mol Biochem parasitol* 1982; 6:13-623.

Brener Z. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. In Brener Z and Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 450.

Brener Z. Morfologia e ciclo evolutivo do *T. cruzi*. In: JCP Dias, JR Coura (Orgs.). *Clínica*

e Terapêutica da Doença de Chagas. ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1997.

Caignan GA, Deshmukh R, Wilks A, Huang H, Moenne-Loccoz P et al. Oxidation of heme to β - and δ -biliverdin by *Pseudomonas aeruginosa* heme oxygenase as a consequence of an unusual seating of heme. *J Am Chem Soc* 2002; 124: 14879-14892.

Calabrese KS. Immunosuppressive drugs as a tool to explore immunopathology in Experimental Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 273-276.

Campbell DA, Thomas S, Sturm NR. Transcription in kinetoplastid protozoa: why be normal? *Microbes Infect*, 2003; 5: 1231-1240.

Cançado JR, Brener Z. Terapêutica. In Brener Z and Andrade Z (eds). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Guanabara Koogan, 1979. p. 362-424.

Cançado JR. Tratamento Específico da Doença de Chagas nas Fases Aguda e Crônica. In: Coura JR (ed.) *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias*, Volume I, p. 667-676, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2005.

[Capriles PV](#), [Guimarães AC](#), [Otto TD](#), [Miranda AB](#), [Dardenne LE](#), [Degraive WM](#). Structural modelling and comparative analysis of homologous, analogous and specific proteins from *Trypanosoma cruzi* versus *Homo sapiens*: putative drug targets for chagas' disease treatment. [BMC Genomics](#) 2010; 11: 610-620.

Carcavallo RU, Jurberg J, Lent H, Noireau F, Galvão C. Phylogeny of the Triatominae (Hemiptera Reduviidae). Proposals for taxonomic arrangements. *Entomol Vectores* 2000; 7: 1-99.

Chagas C. Nova tripanomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1909; 1: 159-218.

Chagas C. Moléstia de Carlos Chagas ou tireoidite parasitária. Nova doença humana transmitida pelo "barbeiro" (*Conorhinus megistus*). Segunda conferência na Academia Nacional de Medicina. Tipogr. Leuzinger (Rio de Janeiro) 1911, 28p.

Chagas C. Sobre um trypanosome do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculatus*. Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. *Brazil Médico* 1912; 26: 305-306.

Chagas C. Revisão do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. *Brazil Médico* 1913; 27: 225.

Chagas C. Sobre a verificação do *Trypanosoma cruzi* em macacos do Pará (*Chrysothrix sciureus*). *Scien Med* 1924; 2: 75-76.

Choi H, Fermin D, Nesvizhskii AI. Significance Analysis of Spectral Count Data in Label-free Shotgun Proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2008; 7: 2373-2385.

Christou H, Bailey N, Kluger MS, Mitsialis SA, Kourembanas S. Extracellular acidosis induces heme oxygenase-1 expression in vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H2647-2652.

Ciccarelli A, Araujo L, Batlle A, Lombardo E. [Effect of haemin on growth, protein content and the antioxidant defence system in *Trypanosoma cruzi*](#). *Parasitology* 2007; 134: 959-965.

Clayton C E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO journal* 2002; 21: 1881-1888.

Colinge J, Chiappe D, Lagache S, Moniatte M, Bougueleret L. Differential proteomics via probabilistic peptide identification scores. *Anal Chem* 2005; 77: 596-606.

Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends Parasitol.* 2002; 18: 171-176.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007; 102: 113-122.

Coura JR. Doença de Chagas. In: JR Coura (ed), *Síntese das doenças infecciosas e parasitárias*. Editora Guanabara Koogan 2008. Rio de Janeiro, p. 12-18.

[Coura JR, Dias JC](#). Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. [Mem Inst Oswaldo Cruz](#) 2009; 104: 31-40.

Coura JR, Borges-Pereira J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Tropica* 2010; 115: 5-13.

Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. *Nature*. 2010; 465: S6-S7.

[Dammeyer T, Frankenberg-Dinkel N](#). Function and distribution of bilin biosynthesis enzymes in photosynthetic organisms. [Photochem Photobiol Sci](#). 2008; 7: 1121-1130.

Das A, Zhang Q, Palenchar JB, Chatterjee B, Cross GAM, Bellofatto V. Trypanosomal TBP functions with the multisubunit transcription factor tSNAP to direct spliced-leader RNA gene expression. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 7314-7322.

Das A, Banday M, Bellofatto V. RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 429-434.

De Souza W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1999; 94: 17-36.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des* 2002a; 8: 269-285.

De Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res* 2002b; 88:

1013-1025.

De Souza W, Sant'Anna C, Cunha-e-Silva NL. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. *Prog Histochem Cytochem* 2009; 44: 67-124.

De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2009; 104: 89-100.

Degrave W, Fragoso SP, Britto C, Van heuverswyn H, Kidane GZ, Cardoso MA, Mueller RU, Simpson L, Morel CM. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1988; 27: 63-70.

Dey R, Datta SC. Leishmanial glycosomes contain superoxide dismutase. *Biochem J* 1994; 301: 317-319.

Di Noia JM, D'Orso I, Sanchez DO, Frasch AC. AU-rich elements in the 3'-untranslated region of a new mucin-type gene family of *Trypanosoma cruzi* confers mRNA instability and modulates translation efficiency. *J Biol Chem* 2000; 275: 10218-10227.

Dias JCP, Coura JR. Epidemiologia – Vetores e reservatórios do *T. cruzi*. In Dias JCP and Coura JR (Orgs). *Clínica e Terapêutica da doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997.

Dias JCP, Silveira AC, Schofield CJ. The impact of Chagas disease control in Latin America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2002; 97: 603-612.

Docampo R, De Souza W, Miranda K, Roheloff P, Moreno S. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Rev Microbiol* 2005; 3: 251-261.

Duncan R: DNA microarray analysis of protozoan parasite gene expression: outcomes correlate with mechanisms of regulation. *Trends Parasitol* 2004; 20: 211-215.

El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 2005a; 309: 409-415.

El-Sayed NM, Myler PJ, Blandin G, Berriman M, Crabtree J, Aggarwal G, et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. *Science* 2005b; 309: 404-409.

Espinoza I, Toro GC, Hellman U, Galanti N. Histone H1 and core histones in *Leishmania* and *Crithidia*: comparison with *Trypanosoma*. *Exp Cell Res* 1996; 224: 1-7.

Ewing JF, Weber CM, Maines MD. Biliverdin reductase is heat resistant and coexpressed with constitutive and heat shock forms of heme oxygenase in brain. *J Neurochem* 1993; 61: 1015-1023.

Ewing JF, Maines MD. Immunohistochemical localization of biliverdin reductase in rat

- brain: age related expression of protein and transcript. *Brain Res* 1995; 672: 29-41.
- Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc J. Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. *J Biol Chem* 1999; 274: 10522-10538.
- Figueiredo LM, Cross GAM, Janzen CJ. Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. *Nat Rev Microbiol* 2009; 7: 504–513.
- Finzi JK, Chiavegatto CW, Corat KF, Lopez JA, Cabrera OG, Mielniczki-Pereira AA, et al. [Trypanosoma cruzi response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide](#). *Mol Biochem Parasitol* 2004; 133: 37-43.
- Fitch WM: Distinguishing homologous from analogous proteins. *Syst Zool* 1970; 19: 99-113.
- Frasch ACC. Trans-sialidase, SAPA amino acid repeats and the relationship between *Trypanosoma cruzi* and mammalian host. *Parasitol* 1994; 108: S37-S44.
- Friedman J, Lad L, Li H, Wilks A, Poulos TL. Structural basis for novel δ -regioselective heme oxygenation in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem*. 2004; 43: 5239-5245.
- Fu X, Gharib SA, Green PS, Aitken ML, Frazer DA, Park DR. Spectral index for assessment of differential protein expression in shotgun proteomics. *J Proteome Res* 2008; 7: 845-854.
- Galbraith R. Heme oxygenase: who needs it? *Proc Soc Exp Biol Med* 1999; 222: 299-305.
- Galperin MY, Walker DR, Koonin EV. Analogous enzymes: Independent inventions in enzyme evolution. *Genome Res* 1998; 8: 779-790.
- Galvão C, Carcavallo RU, Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and, taxonomic notes. *Zootaxa* 2003; 202: 1–36.
- Gao J, Opiteck GJ, Friedrichs MS, Dongre AR, Hefta SA. Changes in the Protein Expression of Yeast as a Function of Carbon Source. *J Proteome Res* 2003; 2: 643-649.
- Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* 1996; 8: 240-244.
- Gonçalves da Costa SC, Lagrange PH, Hurtrel B, Kerr I, Alencar A. Role of lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. *Histopathological Studies. Ann Immunol (Inst. Pasteur)* 1984; 135 C: 317-332.
- Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS, Valle TZ, Lagrange PH. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. *Histol*

Histopathol 2002; 17: 837-844.

Gong Q, Yin H, Fang M, Xiang Y, Yuan C, Zheng GY. Heme oxygenase-1 upregulation significantly inhibits TNF- α and Hmgb1 releasing and attenuates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. [Int Immunopharmacol](#) 2008; 8: 792-798.

Görg A, Weiss W, Dunn MJ. [Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics](#). *Proteomics* 2004; 4: 3665-3685.

Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of Cell Protection by Heme Oxygenase -1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010; 50: 323-54.

Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GRC, Paes MC, Sorgine MHF, et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. [Insect Biochem Mol Biol](#) 2006; 36: 322-35.

Gunzl A, Vanhamme L, Myler PJ. Transcription in trypanosomes: a different means to the end. In: *Trypanosomes: After the Genome*, Barry JD, McCulloch R, Mottram JC, Acosta-Serrano A., Eds, 2007; pp. 177-208, Horizon Bioscience, Wyonham, UK.

Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1720-1730.

Hajduk SL, Adler B, Madison-Antenucci S, McManusm, Sabatini R. Insertional and deletional RNA editing in trypanosome mitochondria. *Nucleic Acids Symp Ser* 1997; 36: 15-18.

Hancock W, Apffel A, Chakel J, Hahnenberger K, Choudhary G, Traina JA, et al. Integrated genomic/proteomic analysis. *Anal Chem* 1999; 71: 742A-748A.

Hannaert V, Bringaud F, Opperdoes FR, Michels PA. Evolution of energy metabolism and its compartmentation in Kinetoplastida. *Kinetoplastid Biol Dis.* 2003; 2: 11-41.

Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T et al. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. *Gene* 2004; 336:241-250.

Hecker H, Gander ES. The compaction pattern of the chromatin of trypanosomes. *Biol Cell* 1985; 53: 199-208.

Hecker H, Betschart B, Bender K, Burri M, Schlimme W. The chromatin of trypanosomes. *Int J Parasitol* 1994; 24: 809-819.

Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1996; 12: 108-14.

Hernandez-Rivas R, Florencio-Martinez LE, Martinez-Salazar M, Martinez-Calvillo S.

“Gene expression and transcriptional machinery in trypanosomatid and apicomplexa parasites,” in *Advances in the Immunobiology of Parasitic Diseases*, Terrazas LI, Ed., pp. 313–337, Research Signpost, Kerala, India, 2007.

Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. *Nature* 1966; 212: 1385-1386.

Hoare CA. *The Trypanosomes of Mammals. A zoological monograph.* Oxford, Edinburgh: Backwell Scientific Publications., 1972.

Horn D. Nuclear gene transcription and chromatin in *Trypanosoma brucei*. *Int J Parasitol* 2001; 31: 1157-1165.

Horn D. Codon usage suggests that translational selection has a major impact on protein expression in trypanosomatids. *BMC genomics* 2008; 9(1): 2-13.

Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE, Sachs JD, Saviolli L. Control of Neglected Tropical Diseases. *N Engl J Med* 2007; 357: 1018-1027.

Hughes AL, Piontkivska H. Phylogeny of Trypanosomatidae and Bodonidae (Kinetoplastida) Based on 18S rRNA: Evidence for Paraphyly of Trypanosoma and Six Other Genera. *Mol Biol Evol* 2003; 20: 644-652.

Humphery-Smith I, Cordwell SJ, Blackstock WP. Proteome research: complementarity and limitations with respect to the RNA and DNA worlds. *Electrophoresis* 1997; 18: 1217-1242.

Igarashi K, Hoshino H, Muto A, Suwabe N, Nishikawa S et al. Multivalent DNA binding complex generated by small Maf and Bach1 as a possible biochemical basis for β -globin locus control region complex. *J Biol Chem* 1998; 273: 11783-11790.

Igoillo-Esteve M, Maugeri D, Stern AL, Beluardi P, Cazzulo J. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*: a potential target for the chemotherapy of Chagas disease. *An Acad Bras Cienc* 2007; 79: 649-663.

Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M. Exponentially modified protein abundance index for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1265-1272.

Ivens AC, Peacock CS, Worthey EA et al. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. *Science* 2005; 309: 436-442.

Jager AV, De Gaudenzi JG, Cassola A, D'Orso I, Frasch AC. mRNA maturation by two-step trans-splicing/polyadenylation processing in trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104: 2035-2042.

Juberg J, Galvão C. Biology, ecology, and systematics of Triatominae (Heteroptera, Reduviidae), vectors of Chagas disease, and implications for human health. In:

RABITSCH, W. (Ed.): Hug the bug – For love of true bugs. Festschrift zum 70. Geburtstag von Ernst Heiss, 2006. *Denisia* 19, 1095-1115.

Kikuchi G, Toshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and Heme degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 338: 558-567.

Kirchhoff LV, Gam AA, Gilliam FC. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in central american immigrants. *Am J Med* 1987; 82: 915-920.

Kubata BK, Kabututu Z, Nozaki T, Munday CJ, Fukuzumi S, Ohkubo K, et al. A key role for old yellow enzyme in the metabolism of drugs by *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med* 2002;196: 1241-51.

Laemmli, UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 21-37.

Lara FA, Sant'Anna C, Laranja GAT, Lemos D, Coelho MG, Salles IS et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; 355: 16-22.

Lent A, Wigodzinsky P. Revision of the triatomine (Hemiptera: Reduviidae) and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bull Am Mus Nat Hist* 1979, art. 3, New York, 520 pp.

Lenzi HL, Oliveira DN, Lima MT, Gattass CR. *Trypanosoma cruzi*: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. *Exp Parasitol* 1996; 84: 16-27.

Levine ND, Crliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honingberg BM, et al. A newly revised classification of the Protozoa. *J Protozool* 1980; 27: 37-58.

Li C, Stocker R. Heme oxygenase and iron: from bacteria to humans. *Redox Rep.* 2009; 14: 95-101.

Lima FM., Oliveira P, Mortana RA, Silveira JF, Bahia D. The challenge of Chagas' disease: Has the human pathogen, *Trypanosoma cruzi*, learned how to modulate signaling events to subvert host cells? *New Biotechnol* 2010; 27: 837-843.

Liu H, Sadygov RG, Yates JR. A Model for Random Sampling and Estimation of Relative Protein Abundance in Shotgun Proteomics. *Anal Chem* 2004; 76: 4193-4201.

Lombardo ME, Araújo LS, Batlle A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem Cell Biol* 2003; 35: 1263-1271.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-275.

Lu P, Vogel C, Wang R, Yao X, Marcotte EM. Absolute protein expression profiling

estimates the relative contributions of transcriptional and translational regulation. *Nat Biotechnol* 2007; 25: 117-124.

[Lundgren DH](#), [Hwang SI](#), [Wu L](#), [Han DK](#). Role of spectral counting in quantitative proteomics. *Expert Rev Proteomics* 2010; 7: 39-53.

Maines MD. Heme Oxygenase in Clinical Applications and Functions. Boca Raton. FL: CRC Press, 1992.

Maines MD. The heme oxygenase system a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1997; 37: 517-554.

Maines MD, Panahian N. The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions? *Adv Exp Med Biol* 2001; 502: 249-272.

Maines MD, Ewing JF, Huang TJ, Panahian N. Nuclear localization of biliverdin reductase in the rat kidney: response to nephrotoxins that induce heme oxygenase-1. *J Pharmacol Exp Ther* 2001; 296: 1091-1097.

Mancuso C. Heme Oxygenase and Its Products in the Nervous System. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6: 878-887.

Martínez-Calvillo S, Vizuet-de-Rueda JC, Florencio-Martínez LE, Manning-Cela RG, Figueroa-Angulo EE. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. *J Biomed Biotechnol*. 2010; 2010:525241.

Masina S, Zangger H, Rivier D, Fasel N. Histone H1 regulates chromatin condensation in *Leishmania* parasites. *Exp Parasitol* 2007; 116: 83-87.

Masuya Y, Kameshita I, Fujisawa H, Kohno H, Hioki K, Tokunaga R, Taketan S. MAP Kinase-Independent Induction of Proto-oncogene *c-fos* mRNA by Hemin in Human Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 289-295.

Mazza S, Montama A, Benitez C, Janzi EZ. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al nino por leche de la madre com enfermedad de Chagas. *MEPRA, Misión de Estudios e Patologia Regional Argentina* 1936; 28: 41-46.

Mc Donagh AF. Turning green to gold. *Nat Struct Biol* 2001; 8: 198-200.

McAfee KJ, Duncan DT, Assink M, Link AJ. Analyzing proteomes and protein function using graphical comparative analysis of tandem mass spectrometry results. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: 1497-1513.

McCoubrey Jr. WK, Huang TJ, Maines MD. Isolation and characterization of a cDNA from the rat brain that encodes hemoprotein heme oxygenase-3. *Eur J Biochem* 1997; 247: 725-732.

McDonald WH, [Tabb DL](#), [Sadygov RG](#), [MacCoss MJ](#), [Venable J](#), [Graumann J](#), et al. MS1,

MS2, and SQT-three unified, compact, and easily parsed file formats for the storage of shotgun proteomic spectra and identifications. *Rapid Commun. Mass Spectrom* 2004; 18: 2162-2168.

McNicoll F, Muller M, Cloutier S, Boilard N, Rochette A, Dube M, Papadopoulou B. Distinct 3'-untranslated region elements regulate stage-specific mRNA accumulation and translation in *Leishmania*. *J Biol Chem* 2005; 280: 35238-35246.

Medina Lopes MD. Transmissão do *T. cruzi* em um caso, durante aleitamento, em área não endêmica. *Rev Soc Bras Med Trop* 1988; 21: 151-153.

Medina-Acosta E, Cross GA. Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple mini-prep procedure. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 59: 327-329.

Mense MS, Zhang L. Heme: a versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to MAP kinases. *Cell Res* 2006; 16: 681-692.

Michels PAM, Hannaert V, Bringaud F. Metabolic aspects of glycosomes in Trypanosomatidae – new data and views. *Parasitol Today* 2000; 16: 482-489.

Minning TA, Bua J, Garcia GA, McGraw RA, Tarleton RL. Microarray profiling of gene expression during trypomastigote to amastigote transition in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 2003; 131: 55-64.

Mocny JC, Olson JS, Connell TD. Passively Released Heme from Hemoglobin and Myoglobin Is a Potential Source of Nutrient Iron for *Bordetella bronchiseptica*. [Infect Immun](#) 2007; 75: 4857-4866.

Montalvetti A, Rohloff P, Docampo R. A functional aquaporin co-localizes with the vacuolar proton pyrophosphatase to acidocalcisomes and the contractile vacuole complex of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 2004; 279: 3867-3882.

Moore MR. International review of drugs in acute porphyria. *Int J Biochem* 1980; 12: 1089-1097.

Moran, M. Neglected disease research and development: how much are we really spending? *Plos Med*. 2009; 6: 137-146.

Muramoto T, Tsurui N, Terry MJ, Yokota A, Kohchi T. Expression and biochemical properties of a ferredoxin-dependent heme oxygenase required for phytochrome chromophore synthesis. *Plant Physiol* 2002; 130: 1958-1966.

Muto A, Hoshino H, Madisen L, Yanai N, Obinata M, Karasuyama H, Hayash, N, Nakauchi H, Yamamoto M, Groudine M and Igarashi K 1998 Identification of Bach2 as a B-cell-specific partner for small Maf proteins that negatively regulate the immunoglobulin heavy chain gene 3' enhancer. *EMBO J* 1998; 17: 5734-5743.

Nardelli SC, Avila AR, Freund A, Motta MC, Manhaes L, de Jesus TC, Schenkman S, Fragoso SP, Krieger MA, Goldenberg S et al. Small-subunit rRNA processome proteins are translationally regulated during differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Eukaryot Cell* 2007; 6: 337-345.

Noe G, De Gaudenzi JG, Frasch AC. Functionally related transcripts have common RNA motifs for specific RNA-binding proteins in trypanosomes. *BMC Mol Biol* 2008; 9: 107-126.

Ogawa K, Sun J, Taketani S, Nakajima O, Nishitani C, et al. Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *EMBO J* 2001; 20: 2835-2843.

Okada K. The novel heme oxygenase-like protein from *Plasmodium falciparum* converts heme to bilirubin IXa in the apicoplast. *FEBS Lett* 2009; 583: 313-319

Old WM, Meyer-Arendt K, Aveline-Wolf L, Pierce KG, Mendoza A, Sevinsky JR, et al. Comparison of label-free methods for quantifying human proteins by shotgun proteomics. *Mol Cell Proteomics* 2005; 4: 1487-1502.

Opperdoes FR, Cotton D. Involvement of the glycosome of *Trypanosoma brucei* in carbon dioxide fixation. *FEBS Lett* 1982; 143: 60-64.

Opperdoes FR. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu Rev Microbiol* 1987; 41:127-151.

Opperdoes FR. Glycosomes may provide clues to the import of peroxisomal proteins. *Trends Biochem Sci* 1988; 13: 255-260.

Ortiz de Montellano PR. The mechanism of heme oxygenase. *Curr Opin Chem Biol* 2000; 4: 221-227.

Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, et al. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with Mafk and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol Cell Biol* 1996; 16: 6083-6095.

Paiva-Silva GO, Cruz-Oliveira C, Nakayasu ES, Maya-Monteiro CM, Dunkov BC et al. A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 8030-8035.

Pang JX, Ginanni N, Dongre AR, Hefta AS, Opiteck GJ. Biomarker discovery in urine by proteomics. *J Proteome Res* 2002; 1: 161-169.

Pereira LOR, Oliveira PL, Almeida IC, Paiva-Silva GO. Biglutaminyl-Biliverdin IX Alpha as a Heme Degradation Product in the Dengue Fever Insect-Vector *Aedes aegypti*.

Biochemistry 2007; 46: 6822-6829.

Perrela MA. Heme oxygenase-1: a multifaceted triple-threat molecule. [Am J Respir Cell Mol Biol](#) 2007; 36: 137.

Ratliff M, Zhu W, Deshmukh R, Wilks A, Stojiljkovic I. Homologues of neisserial heme oxygenase in gram-negative bacteria: degradation of heme by the product of the *piga* gene of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 2001; 183: 6394-6403.

Requena JM, Jimenez-Ruiz A, Soto M, Assiego R, Santarén JF, Lopez MC, Patarroyo ME, Alonso C. Regulation of hsp70 expression in *Trypanosoma cruzi* by temperature and growth phase. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 53: 201-211.

Requena JM, Lopez MC, Alonso C. Genomic repetitive DNA elements of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1996; 12: 279-83.

Rey L. Tripanossomíase por *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas): O Parasito. In: Rey L. *Parasitologia*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 151-159.

Rhie GE, Beale SI. Phycobilin biosynthesis: reductant requirements and product identification for heme oxygenase from *Cyanidium caldarium*. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 320: 182-194.

Rocha A, Meneses ACO, Silva AM, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MKN, *et al.* Pathology of patients with Chaga's disease and acquired immunodeficiency syndrome. *Am J Trop Med Hyg* 1994; 50: 261-268.

Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. Characterization of a vacuolar pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 7712-7723.

Rodrigues DC, Silva R, Rondinelli E, Ürményi TP. *Trypanosoma cruzi*: Modulation of HSP70 mRNA stability by untranslated regions during heat shock. *Exp Parasitol* 2010; 126: 245-253.

Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol* 2008; 118: 17-24.

Romaña C. Acerca de um sintoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas, la conjutivitis esquizotripanosómica unilateral (hipótesis sobre a puerta de entrada conjutival de la enfermedad). *MEPRA* 1935; 22: 16.

Ryter SW, Tyrrel RM. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensivity: haem oxygenase has both pro and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 2000; 28: 289-309.

Salzman TA, Stella AM, Xifra W, Batlle AM, DoCampo R, Stoppani AO. Porphyrin biosynthesis in parasite hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma*

cruzi. Comp Biochem Physiol B 1982; 72: 663-667.

Saxena A, Worthey EA, Yan S, Leland A, Stuart KD, Myler PJ. Evaluation of differential gene expression in *Leishmania major* Friedlin procyclics and metacyclics using DNA microarray analysis. Mol Biochem Parasitol 2003; 129: 103-14.

Schimanski B, Nguyen TN, Gunzl A. Characterization of a multisubunit transcription factor complex essential for spliced-leader RNA gene transcription in *Trypanosoma brucei*. Mol Cell Biol 2005; 25: 7303-7313.

Schmidt GD, Roberts LS. Kinetoplastida: Trypanosomes and their skin. In: Foundations of Parasitology. 4 ed. Times Mirror/ Mosby College Publishing, 1989. p. 55-80.

Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Tropica 2009; 15: 14-21.

Schofield CJ. Triatominae – Biology and Control. Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88: 606.

Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol 2006; 21: 583-588.

Schofield CJ, Grijalva MJ, Diotaiuti L. Distribución de los vectores de la Enfermedad de Chagas en países “no endémicos”: La posibilidad de transmisión vectorial fuera de América Latina. Enf Emerg 2009; 11: 20-27.

Schofield CJ, Galvão C. [Classification, evolution, and species groups within the Triatominae](#). Acta Trop 2009; 110: 88-100.

Schuller DJ, Wilks A, Ortiz de Montellano PR, Poulos TL. Crystal structure of human oxygenase-1. Nat Struct Biol 1999; 6: 860-867.

Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. Ann Rev Microbiol 1995; 49: 117-143.

Shibahara S, Yoshida T, Kikuchi G. Induction of heme oxygenase by hemin in cultured pig alveolar macrophages. Arch Biochem Biophys 1978; 188: 243-250.

Shibahara S, Yoshida T, Kikuchi G. Mechanism of increase of heme oxygenase activity induced by hemin in cultured pig alveolar macrophages. Arch Biochem Biophys 1979; 197: 607-617.

Shibahara S. The heme oxygenase dilemma in cellular homeostasis: new insights for the feedback regulation of heme catabolism. Tohoku J Exp Med 2003; 200: 167-186.

Shibahara S, Nakayama M, Kitamuro T, Udono-Fujimori R, Takahashi K. Repression of heme oxygenase-1 expression as a defense strategy in humans. Exp Biol Med (Maywood) 2003; 228: 472-473.

- Soares MP, Bach FH. Heme oxygenase-1: from biology to therapeutic potential. *Trends Mol Med* 2009; 15: 50-58.
- Souza CF, Carneiro AB, Silveira AB, Laranja GAT, Silva-Neto MAC, Gonçalves da Costa SC, Paes MC. Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. [Biochem Biophys Res Commun](#) 2009; 390: 541-6.
- Souza WF. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In Brener Z, Andrade Z, Barral-Netto (eds). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan 2000. p. 88-126.
- Spiro T. A twist on heme signaling. [ACS Chem Biol](#). 2008; 3: 673-5.
- [Stocker R](#), [McDonagh AF](#), [Glazer AN](#), [Ames BN](#). Antioxidant activities of bile pigments: biliverdin and bilirubin. [Methods Enzymol](#) 1990; 186: 301-309.
- Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. *Int Rev Cytol* 1992; 141: 65-88.
- Stuart K, Allen TE, Kable ML, Lawson S. Kinetoplastid RNA editing: complexes and catalysis. *Curr Opin Chem Biol* 1997; 1: 340-346.
- Sturm NR, Degrave W, Morel C, Simpson L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircles DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. *Mol Bioch Parasitol* 1989; 33: 205-214.
- Sun J, Hoshino H, Takaku K, Nakajima O, Muto A et al. Bach1 regulates enhancer availability of heme oxygenase-1 gene. *EMBO J* 2002; 21: 5216-5224.
- Sun J, Brand M, Zenke Y, Tashiro S, Groudine M, K Igarashi. Heme regulates the dynamic exchange of Bach1 and NF-E2-related factors in the Maf transcription factor network. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 1461-1466.
- Talbert PB, Henikoff S. Chromatin-based transcriptional punctuation. *Genes Dev* 2009; 23: 1037-1041.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas disease. *Clin Microbiol Rev* 1992; 5: 400-419.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *J Biol Chem* 1969; 244: 6388-6394.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic catabolism of hemoglobin: stimulation of microsomal heme oxygenase by hemin. *J Lab Clin Med* 1970b; 75: 410-421.
- Tenhunen R, Ross ME, Marver HS, Schmid R. Reduced nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate dependent biliverdin reductase: partial purification and characterization.

Biochemistry 1970a; 9: 298-303.

Torres CM. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz 1941; 36: 391-404.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedures and some applications. Proc Nat Acad Sci 1979; 76: 4350-4354.

Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. Pharmacol Ther 2006; 111: 327-345.

Tyers M, Mann M. From genomics to proteomics. Nature 2003; 422: 193-197.

Urich K. Comparative animal biochemistry. Springer-Verlag New York 1990; pp 716-759.

Vanhamme L, Pays E. Control of gene expression in Trypanosomes. Microbiol Rev 1995; 59: 223-240.

Vanhamme L. Trypanosome RNA polymerases and Transcription factors: sensible trypanocidal drug targets? Drug Targets 2008; 9: 979-996.

Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas. Mem Inst Oswaldo Cruz 1911; 3: 276-294.

Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA (ed). Biology of the Kinetoplastida. 1 ed. London: Academic Press; 1976. p. 1-30.

Vickerman K. Phylum Zoomastigina - Class Kinetoplastida. In: Handbook of Protoctista. Boston: James and Bartlett Publishers; 1990. p. 215-238.

WHO. Control of Chagas disease. Report a WHO expert committee, Genova. WHO Tech Rep Ser 1991; 811: 1-95.

WHO - World Health Organization. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. Technical Report Series 2002a; n°. 905, Geneva, 96 pp.

WHO. Chagas' disease. In: Weekly Epidemiological Record, World Health Organization. Geneva, 2002b; 2: 10-12.

World Health Organization (2010). Fact sheet N° 340. June 2010 from Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/print.html> Acessado em: (acesso em 07 jul 2010).

- Wilkinson SR, Meyer DJ, Taylor MC, Bromley EV, Miles MA, Kelly JM. The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin. J Biol Chem 2002; 277: 17062-

17071.

Wilkinson SR, Kelly JM. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 29 (11): 31-55.

Wilks A, Moenne-Loccoz P. Identification of the Proximal Ligand His-20 in Heme Oxygenase (Hmu O) from *Corynebacterium diphtheriae*. *J Biol Chem* 2000; 275; 11686-11692.

Williams N. Flagging up a neglected killer. *Curr Biol* 2009; 19: 628-629.

Williams RE, Bruce NC. 'New uses for an Old Enzyme'-the Old Yellow Enzyme family of flavoenzymes. *Microbiology* 2002; 148:1607-1614.

Xu,T, et al. ProLuCID, a fast and sensitive tandem mass spectra-based protein identification program. *Mol Cell Proteomics* 2006; 5: S174-174.

Yamaguchi T, Nakajima H. Changes in the composition of bilirubin XI isomers during human prenatal development. *Eur J Biochem* 1995; 233: 467-472.

Yoshida T, Kikuchi G. Sequence of heme decomposition by the coupled oxidation of myoglobin with ascorbic acid. *Tohoku J Exp Med* 1975; 115: 67-74.

Yoshida T, Kikuchi G. Purification and properties of heme oxygenase from pig spleen microsomes. *J Biol Chem* 1978; 253: 4224-4229.

Yoshida T, Kikuchi G. Purification and properties of hemeoxygenase from rat liver microsomes. *J Biol Chem* 1979; 254: 4487-4491.

Yoshida T, Migita CT. Mechanism of heme degradation by heme oxygenase. *J Inorg Biochem* 2000; 82: 33-41.

Zenke-Kawasaki Y, Dohi Y, Katoh Y, Ikura T, Ikura M, et al. Heme induces ubiquitination and degradation of the transcription factor Bach1. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 6962-6971.

Zhang X, Sato M, Sasahara M, Migita CT, Yoshida T. Unique features of recombinant heme oxygenase of *Drosophila melanogaster* compared with those of other heme oxygenases studied. *Eur J Biochem* 2004; 271: 1713-1724.

Zhu W, Wilks A, Stojiljkovic I. Degradation of heme in gram-negative bacteria: the product of the *hemO* gene of Neisseriae is a heme oxygenase. *J Bacteriol* 2000; 182: 6783-6790.

Zingales B, Pereira ME, Almeida KA, Umezawa ES, Nehme NS, Oliveira RP, et al. Biological parameters and molecular markers of clone CL Brener - the reference organism of the *Trypanosoma cruzi* genome project. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 1997; 92: 811-4.

[Zingales B](#), [Andrade SG](#), [Briones MR](#), [Campbell DA](#), [Chiari E](#), [Fernandes O](#), et al. A new

consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999; 104(7):1051-4.

Zybailov B, Mosley AI, Sardi ME, Coleman MK, Florens L, Washburn MP. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. J Proteome Res 2006; 5: 2339-2347.