



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

Natália Pereira de Almeida Nogueira

A Influência do metabolismo redox na transmissão da doença de Chagas

Rio de Janeiro

2012

Natália Pereira de Almeida Nogueira

A Influência do metabolismo redox na transmissão da doença de Chagas

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

Rio de Janeiro

2012

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

N788 Nogueira, Natália Pereira de Almeida.

A influência do metabolismo redox na transmissão da doença de Chagas / Natália Pereira de Almeida – 2012.
132 f.

Orientadora: Marcia Cristina Paes

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

1. *Trypanosoma cruzi* – Teses. 2. Doença de Chagas - Parasitologia. 3. Oxidantes. 4. Insetos vetores. 5. Oxirredução. I. Paes, Marcia Cristina. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 616.937

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

Assinatura

Data

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Interação de Tripanosomatídeos e Vetores no Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro sob orientação da Prof^a Marcia Cristina Paes na vigência de auxílios concedidos pela FAPERJ (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro).

Natália Pereira de Almeida Nogueira

A influência do metabolismo redox na transmissão da doença de Chagas

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 30 de março de 2012.

Orientadora:

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

Banca Examinadora:

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

Prof. Dr. Antônio Galina Filho
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Prof. Dr. Fernando Ariel Genta
Instituto Oswaldo Cruz - FIOCRUZ

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

Prof.^a Dra. Kátia Calp Gondim
Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ

Rio de Janeiro

2012

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar a clareza para enxergar os problemas, a sabedoria para tentar resolvê-los da melhor maneira possível e a compreensão para aceitar aquilo que não posso mudar.

Ao meu pai Jorge e às minhas avós queridas, Antônia e Belmira, por terem me criado, pelo amor e por estarem sempre rezando e torcendo por mim. Vocês são muito importantes.

À minha mãe, por estar sempre olhando por mim

À **Marcia**, minha eterna gratidão pelo apoio, incentivo, generosidade, confiança, pelos ensinamentos, pela luta, por acreditar em mim mesmo quando eu mesma não consigo ou não posso, por ter me dado oportunidades profissionais e liberdade para fazer tudo o que eu imaginei e sugeri dentro e fora do laboratório. Muito obrigada!!!

A **professora Marsen**, pelo apoio, compreensão, ensinamentos, disponibilidade, pela amizade e torcida e pela revisão atenciosa desta tese.

Ao professor Sergio Dalmau (Pardal) pelos ensinamentos sobre citometria de fluxo, pelas conversas nem tão científicas, pelos experimentos na hora do almoço. Apesar da partida precipitada a convivência deixou muitas marcas...saudades.

Às professoras do LIA-BPPN, Kátia, Marsen, Graça, por contribuírem cada uma de alguma forma para a minha formação.

Ao corpo técnico do LIA-BPPN, Beto, Gustavo, Shirley, João Roberto e Paulinho, pela paciência, pelos conselhos e por estarem sempre dispostos a ajudar.

A TODOS OS ALUNOS DO LAB 2 PELA CONVIVÊNCIA AMIGA, CARINHOSA E DE ACIMA DE TUDO, RESPEITO MÚTUO.

Às professoras Georgia Atella e Ana Rossini que generosamente abriram seus laboratórios para que eu pudesse usar animais, equipamentos e seus conhecimentos.

Aos companheiros do grupo CRUZI: Cíntia, Maurício, Pedro, Luiza, Jéssica e Francis não apenas pelas discussões científicas, mas também pelo incentivo, companheirismo, torcida e convivência sempre animada, respeitosa e fraterna dentro e fora do laboratório. Com certeza eu não teria conseguido sem a ajuda de cada um de vocês!

Às amigas Patricia, Amanda, Mônica, , e Paulinha, pelas conversas (quase nunca científicas), pelos momentos de descontração tão importantes para não nos deixar enlouquecer. Amigas queridas!!

Às amigas e colegas de bancada, Fabiana e Daniele pelos almoços sempre divertidos, pelas conversas, desabafos e por fazerem do ambiente de trabalho um lugar também amistoso. Adoro vocês.

À Cíntia, pela amizade, pelas discussões, sinceridade, incentivo, por estarmos juntas todo esse tempo dentro e fora do laboratório, por ser minha irmã de coração.

Ao Gustavo pela companhia na caminhada.

Aos amigos Elisa, Marcio, Therezinha, Adilson e Barbara pelo carinho, apoio e torcida.

À Elisa por me ajudar a ver a vida com mais clareza e menos peso.

Aos meus amigos, **TODOS ELES**, por estarem presentes nos melhores quatro anos da minha vida, pela convivência e que apesar da distância imposta pela vida, por continuarem sendo os melhores amigos! Vocês são muito especiais para mim! Obrigada por tudo! Aos membros da banca, que contribuirão imensamente para este trabalho. A todos que, de alguma forma, ajudaram na realização desta tese.

“TUDO O QUE HOJE PRECISO REALMENTE SABER, APRENDI NO JARDIM DE INFÂNCIA...

Tudo o que hoje preciso realmente saber, sobre como viver, o que fazer e como ser, eu aprendi no jardim de infância. A sabedoria não se encontrava no topo de um curso de pós-graduação, mas no montinho de areia da escola de todo dia.

Estas são as coisas que aprendi:

1. Compartilhe tudo;
2. Jogue dentro das regras;
3. Não bata nos outros;
4. Coloque as coisas de volta onde pegou;
5. Arrume sua bagunça;
6. Não pegue as coisas dos outros;
7. Peça desculpas quando machucar alguém; mas peça mesmo !!!
8. Lave as mãos antes de comer e agradeça a Deus antes de deitar;
9. Dê descarga; (esse é importante)
10. Biscoitos quentinhos e leite fazem bem para você;
11. Respeite o limite dos outros;
12. Leve uma vida equilibrada: aprenda um pouco, pense um pouco... desenhe... pinte... cante... dance... brinque... trabalhe um pouco todos os dias;
13. Tire uma soneca a tarde; (isso é muito bom)
14. Quando sair, cuidado com os carros;
15. Dê a mão e fique junto;
16. Repare nas maravilhas da vida;
17. O peixinho dourado, o hamster, o camundongo branco e até mesmo a sementinha no copinho plástico, todos morrem... nós também.

(...) Pense como o mundo seria melhor se todos nós, no mundo todo, tivéssemos biscoitos e leite todos os dias por volta das três da tarde e pudéssemos nos deitar com um cobertorzinho para uma soneca. Ou se todos os governos tivessem como regra básica, devolver as coisas ao lugar em que elas se encontravam e arrumassem a bagunça ao sair. Ao sair para o mundo é sempre melhor darmos as mãos e ficarmos juntos. É necessário abrir os olhos e perceber que as coisas boas estão dentro de nós, onde os sentimentos não precisam de motivos nem os desejos de razão.

"O importante é aproveitar o momento e aprender sua duração, pois a vida está nos olhos de quem souber ver"...

Pedro Bial

RESUMO

NOGUEIRA, Natália Pereira de Almeida. **A influência do metabolismo redox na transmissão da doença de Chagas.** 2012. 126 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2012.

As formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* proliferam e se diferenciam no interior de diferentes compartimentos do trato digestivo dos triatomíneos. Esses ambientes antagônicos, no que diz respeito à concentração de nutrientes, pH e *status* redox, constituem um desafio para o protozoário por conterem moléculas e fatores capazes de deflagrar diferentes sinalizações e respostas no parasito. Por isso, testamos a influência de produtos abundantes do metabolismo do vetor e de *status* redox distintos, frente aos processos de proliferação e diferenciação *in vivo* e *in vitro*. Como exemplo temos o heme e a hemozoína, subprodutos da digestão da hemoglobina, e o urato, rico na urina dos insetos. O heme é uma importante molécula em todos os seres vivos. Nosso grupo mostrou seu papel na proliferação *in vitro* de *T. cruzi* e que esse sinal é governado pela enzima redox-sensível CaMKII (Lara *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009). Esse efeito parece depender de uma sinalização redox, onde o heme e não seus análogos induz a formação de EROs, modulando a atividade da CaMKII (Nogueira *et al.*, 2011). Apesar de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) em formas epimastigotas, o heme não alterou a ultraestrutura desses parasitos mostrando uma adaptação a ambientes oxidantes. Além disso, a adição de FCCP inibiu a formação de EROs mitocondrial, diminuindo a proliferação dos parasitos. Em contrapartida, a AA aumentou drasticamente a produção de EROs mitocondrial levando à morte dos epimastigotas. Estes resultados confirmam a hipótese de regulação redox do crescimento de epimastigotas. A formação de β -hematina (hemozoína) constitui uma elegante estratégia para minimizar o efeito tóxico do heme nos insetos hematófagos. Contudo, a β -hematina não influenciou a proliferação ou a metaciclógênese *in vitro*. Já o urato, e outros antioxidantes clássicos como o GSH e o NAC prejudicaram a proliferação *in vitro* de epimastigotas. Estes efeitos foram parcialmente revertidos quando os antioxidantes foram incubados juntamente com o heme. Durante a metaciclógênese *in vitro*, o NAC e o urato induziram um aumento significativo das formas tripomastigotas e levaram a diminuição da porcentagem de formas epimastigotas. Em contrapartida, o heme e a β -hematina apresentaram o efeito oposto, diminuindo a porcentagem de formas tripomastigotas e aumentando a de epimastigotas. No intuito de confirmar a influência do *status* redox na biologia do parasito *in vivo*, nós quantificamos a carga parasitária nas porções anterior e posterior e no reto do triatomíneo alimentado na presença ou na ausência de NAC e urato por qPCR. O tratamento com os antioxidantes aumentou a carga parasitária em todas as partes do intestino analisadas. Posteriormente, para diferenciar as formas evolutivas responsáveis pelo incremento da carga parasitária, foram realizadas contagens diferenciais nas mesmas porções do intestino do inseto vetor. Cinco dias após a infecção foi observado aumento significativo de formas tripomastigotas e diminuição de formas epimastigotas *in vivo*. Em conjunto, estes dados sugerem que, assim como a concentração de nutrientes e o pH, o *status* redox também pode influenciar a biologia do *T. cruzi* no interior do inseto vetor. Neste cenário, moléculas oxidantes agiriam a favor da proliferação, e em contraste, antioxidantes parecem favorecer a metaciclógênese.

Palavras-chave: *Status* redox. Metaciclógênese. *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi epimastigotes proliferate and differentiate inside different compartments of the triatomines gut. These environments are antagonistic in terms of nutrient content, pH and redox status. All these factors represent a challenge to the protozoan due to the presence of molecules and factors which are able to induce different signals to the parasite. Thus, we tested the influence of abundant metabolism products of the vector, with distinct redox status, in the proliferation and metacyclogenesis *in vitro* and *in vivo*. These molecules are heme and hemozoin, both byproducts of hemoglobin digestion, and urate, present in the urine of insects. Heme is a ubiquitous molecule present in all living organisms. Our group studied its role in *T. cruzi* growth *in vitro*, showing that this signal is governed by the redox-sensitive enzyme CaMKII (Lara *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009). Indeed, it seems to rely on a redox signaling pathway in which heme, but not its analogs, induces ROS formation, thus modulating CaMKII activity (Nogueira *et al.*, 2011). Although it induces ROS in epimastigotes, the heme molecule had no deleterious effect upon the parasites ultrastructure, suggesting an adaptation to oxidative environments. In addition, FCCP inhibited mitochondrial ROS formation, then decreasing the parasite proliferation. On the other hand, AA drastically increased mitochondrial ROS production leading to cell death. These results corroborate the hypothesis of redox regulation of epimastigotes proliferation. Hemozoin (β -hematin) formation is an elegant strategy to minimize the toxic effect of heme in hematophagous insects. However, β -hematin had no influence upon the proliferation or metacyclogenesis *in vitro*. Also, urate, GSH and NAC impaired epimastigote proliferation. These effects were partially reversed when the antioxidants were incubated along with heme. During metacyclogenesis *in vitro*, NAC and urate induced a significant increment of trypomastigotes and decreased the percentage of epimastigotes. Heme and β -hematin presented the opposite effect diminishing the percentage of trypomastigotes and increasing the percentage of epimastigotes. To confirm the influence of the redox status in the parasite biology *in vivo*, we quantified the parasite loads in the anterior and posterior midguts and in the rectum of the triatomine vector fed with or without NAC and urate by qPCR. The treatment with the antioxidants increased the parasite loads in all midgut sections analyzed. Afterwards, in order to distinguish the evolutive forms responsible for the increment of parasite loads, we performed differential counting of the midgut sections. Five days post infection we observed an increment of trypomastigotes and a decrease of epimastigote forms *in vivo*. Taken together, these data suggests that, as well as nutrient content and pH, the redox status may also influence *T. cruzi* biology in the vector. In this scenario, oxidants act to turn on proliferation and in contrast, antioxidants seem to switch the cycle towards metacyclogenesis.

Keywords: Redox status. Metacyclogenesis. *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 1 | Diagrama das principais estruturas e organelas encontradas nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 19 |
| Figura 2 | Ciclo de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 22 |
| Figura 3 | Micrografia eletrônica de transmissão e varredura dos estágios de desenvolvimento de <i>T. cruzi</i> | 23 |
| Figura 4 | Distribuição geográfica da doença de Chagas no Brasil e países latinos americanos..... | 26 |
| Figura 5 | Estágio de desenvolvimento de <i>R. prolixus</i> | 30 |
| Figura 6 | Estrutura química do Heme (Fe-protoporfirina IX)..... | 33 |
| Figura 7 | Estrutura do cristal de hemozoína..... | 35 |
| Figura 8 | Estrutura química do urato (ácido úrico)..... | 36 |
| Figura 9 | Efeito de diferentes análogos de heme na proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 54 |
| Figura 10 | Efeito de diferentes análogos de heme na formação de EROs em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 55 |
| Figura 11 | A e B- Efeito do peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) exógeno na produção de EROs e na proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 57 |
| Figura 12 | Produção de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) endógeno induzida por heme..... | 58 |
| Figura 13 | Análise por citometria de fluxo da produção de EROs induzida por heme..... | 59 |
| Figura 14 | Microscopia confocal a laser do efeito da AA e do FCCP sobre a produção de superóxido mitocondrial induzida por heme..... | 61 |
| Figura 15 | A e B- Análise por citometria de fluxo do efeito do FCCP e da AA sobre a produção de superóxido mitocondrial induzida por heme.... | 62 |
| Figura 16 | Efeito de inibidores da CTE na proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 63 |
| Figura 17 | Efeito do heme sobre a ultraestrutura de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 65 |

| | | |
|-----------|---|----|
| Figura 18 | Efeito da β -hematina na proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 67 |
| Figura 19 | Efeito de diferentes concentrações de urato na proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 68 |
| Figura 20 | Efeito de concentrações crescentes de glutathiona reduzida (GSH) na proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 68 |
| Figura 21 | Efeito de concentrações crescentes de N-acetilcisteína (NAC) na proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> | 69 |
| Figura 22 | A a C - Número total de parasitos no sobrenadante ao longo da metaciclogênese <i>in vitro</i> frente a moléculas de diferentes status redox..... | 71 |
| Figura 23 | A a C - Percentual de tripomastigotas e epimastigotas: a influência de moléculas de diferentes status redox ao longo da metaciclogênese <i>in vitro</i> | 72 |
| Figura 24 | A a C - Análise por PCR em tempo real das formas epimastigotas e tripomastigotas: a influência de moléculas de status redox distintos <i>in vivo</i> | 74 |
| Figura 25 | A a C - Análise por PCR em tempo real das formas epimastigotas e tripomastigotas: a influência de moléculas de status redox distintos <i>in vivo</i> | 75 |
| Figura 26 | A a F - Concentração de epimastigotas e tripomastigotas: a influência de moléculas de diferentes status redox <i>in vivo</i> | 77 |
| Figura 27 | A a F - Concentração de epimastigotas e tripomastigotas: a influência de antioxidantes <i>in vivo</i> | 78 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--|---|
| AA | Antimicina A |
| AMPc | Adenosine monophosphate ciclic |
| ATP | <i>Adenosine triphosphate</i> |
| BHI | <i>Brain heart infusion</i> |
| Ca ²⁺ -H ⁺ -ATPase | <i>Calcium-proton ATPase</i> |
| CaCl ₂ | Cloreto de cálcio |
| CaMKII | Proteína quinase dependente de Ca ²⁺ /CaM II |
| CMH ₂ DCFDA | 5-(e-6)- clorometil-2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester |
| CTE | Cadeia transportadora de elétrons |
| Cu,Zn-SOD | Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco |
| DEPC | dietilpirocarbonato |
| DHE | Diidroetidina |
| DMSO | Dimetilssulfóxido |
| DNA | <i>Deoxyribonucleic acid</i> |
| DTU | <i>Discret typing unit</i> |
| ERO | Espécie reativa de oxigênio |
| FCCP | Fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona |
| Fe-MPIX | Fe-mesoporfirina IX |
| Fe-SOD | Superóxido dismutase dependente de ferro |
| GPx | Glutaciona peroxidase |
| GR | Glutaciona redutase |
| GSH | Glutaciona reduzida |
| Gsp | Glutacionilespermidina |
| GSSG | Glutaciona oxidada |
| H ⁺ -ATPase tipo P | Próton ATPase do tipo P |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de hidrogênio |
| Hb | Hemoglobina |
| HOCl | Ácido hipoclorídico |
| Hz | Hemozoína |
| kDNA | <i>Kinetoplastid DNA</i> |
| LC-MS/MS | <i>Liquid chromatography-mass spectrometry/ mass spectrometry</i> |

| | |
|------------------------------|---|
| MET | Microscopia eletrônica de transmissão |
| Mn-SOD | Superóxido dismutase dependente de magnésio |
| MPIX | mesoporfirina IX |
| NAC | N-acetil cisteína |
| NADH | Nicotinamida dinucleotídeo reduzida |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida |
| NADH-fumarato redutase | Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida fumarato |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida |
| NADPH-oxidase | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida oxidase |
| NANA | Ácido N-acetil-neuramínico |
| O ₂ | Oxigênio molecular |
| O ₂ ^{•-} | Ânion superóxido |
| •OH | Radical hidroxil |
| PCR | <i>Polimerase chain reaction</i> |
| pH | Potencial de hidrogênio |
| pK | Constante de ionização |
| PKG | Proteína quinase dependente de guanosina monofosfato cíclica |
| PPIX | protoporfirina IX |
| qPCR | <i>Quantitative polimerase chain reaction</i> |
| SFB | Soro fetal bovino |
| SH | Grupamento sulfidril |
| SIDA | Síndrome da imunodeficiência adquirida |
| Sn-PPIX | Sn-protoporfirina IX |
| SOD | Superóxido dismutase |
| T(SH) ₂ | Tripanotiona reduzida |
| TAO | Oxidase alternativa do tripanosoma |
| TAU | <i>Triatomine artificial urine</i> |
| TAU 3AAG | <i>Triatomine artificial urine supplemented with 3AAG</i> |
| TcMPx | Triparedoxina peroxidase mitocondrial de <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| TcXNPx | Triparedoxina peroxidase citosólica de <i>Trypanosoma cruzi</i> |
| Trx(SH) ₂ | Tioredoxina reduzida |
| TrxR | Tioredoxina redutase |
| Trxs | Tiorredoxinas |

| | |
|-------------------------|---|
| TrxS ₂ | Tioredoxina oxidada |
| TryR | Tripanotiona redutase |
| V-H ⁺ -Ppase | Pirofosfatase próton dependente do tipo V |
| XO | Xantina oxidorreductase |
| ZI | Zimodema I |
| ZII | Zimodema II |
| ZIII | Zimodema III |
| Zn-PPIX | Zn-protoporfirina IX |

SUMÁRIO

| | | |
|---------|--|----|
| | INTRODUÇÃO | 16 |
| 1 | REVISÃO DA LITERATURA | 18 |
| 1.1 | <i>Trypanosoma cruzi</i> | 18 |
| 1.1.1 | <u>Aspectos morfológicos e organização taxonômica</u> | 18 |
| 1.1.2 | <u>O genoma do <i>T. cruzi</i>: transcrição e expressão gênica</u> | 20 |
| 1.1.3 | <u>Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i></u> | 22 |
| 1.1.3.1 | A metaciclogênese..... | 24 |
| 1.2 | A doença de Chagas e sua distribuição geográfica | 26 |
| 1.3 | Triatomíneos: os vetores da doença de Chagas | 29 |
| 1.4 | Interações Parasito-Vetor | 31 |
| 1.4.1 | <u>O heme</u> | 33 |
| 1.4.2 | <u>A hemozoína</u> | 35 |
| 1.4.3 | <u>O urato</u> | 36 |
| 1.5 | O metabolismo Redox | 37 |
| 1.5.1 | <u>Diferenças entre estresse oxidativo e desbalanço redox</u> | 40 |
| 1.5.2 | <u>O metabolismo redox do <i>T. cruzi</i></u> | 41 |
| 2 | MATERIAL E MÉTODOS | 46 |
| 2.1 | Reagentes | 46 |
| 2.2 | Parasitas | 46 |
| 2.3 | Identificação de espécies reativas de oxigênio | 46 |
| 2.3.1 | <u>Produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂)</u> | 47 |
| 2.3.2 | <u>Citometria de fluxo</u> | 47 |
| 2.3.3 | <u>Microscopia de fluorescência confocal</u> | 48 |
| 2.4 | Microscopia eletrônica de transmissão | 48 |
| 2.5 | Proliferação <i>in vitro</i> | 48 |
| 2.6 | Metaciclogênese <i>in vitro</i> | 49 |
| 2.7 | Determinação de formas evolutivas de <i>T. cruzi</i> | 49 |
| 2.8 | Insetos | 50 |
| 2.9 | Infecção de <i>R. prolixus</i> com <i>T. cruzi</i> | 50 |
| 2.10 | Extração de RNA total | 50 |
| 2.11 | Síntese da 1ª fita de cDNA | 51 |
| 2.12 | Desenho dos oligonucleotídeos | 51 |
| 2.13 | Normalização da carga parasitária | 51 |
| 2.14 | PCR em tempo real (qPCR) | 52 |

| | | |
|------|--|----|
| 2.15 | Análise estatística..... | 52 |
| 3 | RESULTADOS..... | 53 |
| 3.1 | Efeito do heme e seus análogos sobre a proliferação e a formação de EROs de <i>T. cruzi</i>..... | 53 |
| 3.2 | Efeito do H₂O₂ exógeno e na produção de EROs intracelulares e na proliferação de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>..... | 53 |
| 3.3 | A produção de EROs endógenos induzidos por heme em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>..... | 56 |
| 3.4 | A produção de superóxido mitocondrial induzida por heme em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>..... | 60 |
| 3.5 | O heme e a ultraestrutura celular do <i>T. cruzi</i>..... | 64 |
| 3.6 | O papel de moléculas de <i>status</i> redox antagônicos frente à proliferação <i>in vitro</i> de formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i>..... | 64 |
| 3.7 | O papel de moléculas de <i>status</i> redox antagônicos na metaciclo gênese <i>in vitro</i> do <i>T. cruzi</i>..... | 69 |
| 3.8 | O papel de moléculas de <i>status</i> redox antagônicos na interação <i>in vivo</i> entre o <i>R. prolixus</i> e o <i>T. cruzi</i>..... | 73 |
| 4 | DISCUSSÃO..... | 79 |
| 5 | CONCLUSÃO..... | 88 |
| | REFERÊNCIAS..... | 90 |

APÊNDICE A - Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS.

APÊNDICE B - The role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é causada pelo protozoário unicelular *Trypanosoma cruzi*, e 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 dez 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).

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 insetos triatomíneos. Na porção anterior do intestino médio (ou estômago) os tripomastigotas sanguícolas passam a formas epimastigotas 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 transformação, a metaciclogênese, se diferenciando em tripomastigotas metacíclicos que são liberadas nas fezes. Estas formas tripomastigotas não proliferam e são altamente infectantes.

A doença de Chagas, mesmo hoje, após mais de 100 anos de sua descoberta, não apresenta uma quimioterapia satisfatória. Não existem vacinas e o benznidazol, medicamento disponível atualmente é tóxico e pouco eficaz durante a fase crônica da doença. O fato de a fase aguda ser em muitos casos assintomática, dificulta o tratamento. É importante então o desenvolvimento de novos medicamentos, que sejam mais específicos para o parasita e, portanto menos tóxicos para o hospedeiro.

Evidências da literatura indicam que a íntima interação parasito-vetor é essencial para o sucesso da propagação da doença de Chagas (Garcia *et al.*, 2007). Nesse sentido, o entendimento sobre as moléculas e fatores provenientes, tanto do inseto vetor quanto do parasito, capazes de modular os processos de diferenciação e proliferação do *T. cruzi* se tornam importantes alvos contra o protozoário.

Esta tese tem por objetivo estudar a interação parasito-vetor entre o *Trypanosoma cruzi* e o *Rhodnius prolixus*. Para cumprir esse objetivo o estudo está centrado no estado redox de *T. cruzi* *in vivo* e *in vitro* quando na presença de moléculas

abundantes no inseto. Pretende-se mostrar a geração de EROs e seu possível papel na infecção do vetor e na transmissão da doença de Chagas. Como objetivos específicos (i) estudou-se a formação de EROs mitocondrial induzido por heme em formas epimastigotas de *T. cruzi*; (ii) avaliou-se o efeito da molécula de heme sobre a morfologia das organelas de epimastigotas de *T. cruzi*; (iii) quantificou-se os processos de proliferação e metaciclogênese de *T. cruzi in vitro* frente a moléculas abundantes no vetor triatomíneo; (iv) quantificou-se os processos de proliferação e metaciclogênese de *T. cruzi in vivo* na presença de diferentes moléculas de *status redox* antagônicos.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 *Trypanosoma cruzi*

1.1.1 Aspectos morfológicos e organização taxionômica

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que, taxonomicamente 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 subordens, 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, 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 caracterizam-se 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 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. É 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).

Entre as organelas 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). Os acidocalcissomas são organelas ácidas, que concentram cálcio, magnésio, zinco, fosfato inorgânico e grânulos de polifosfato. Essas também são responsáveis pela homeostase de pH e pela osmorregulação, atuando em associação com um vacúolo contrátil. Nos acidocalcissomas estão presentes enzimas como H⁺-ATPase tipo P, Ca²⁺-H⁺-ATPase e pirofosfatases (V-H⁺-PPase) (Lu *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2005; Docampo, 2005; De Souza, 2009; Moreno e Docampo, 2009).

Os reservossomos são organelas de via endocítica consideradas o último destino das macromoléculas obtidas do meio extracelular, bem como o maior sítio de acúmulo de proteases e de grandes quantidades de colesterol. Esta organela apresenta funções associadas aos lisossomos, já que essas organelas acídicas nunca foram identificadas em *T. cruzi* (De Souza, 2002; De Souza, 2009; Pereira *et al.*, 2011). Na Figura 1 estão listadas as principais estruturas e organelas encontradas no *T. cruzi* (De Souza, 2008).

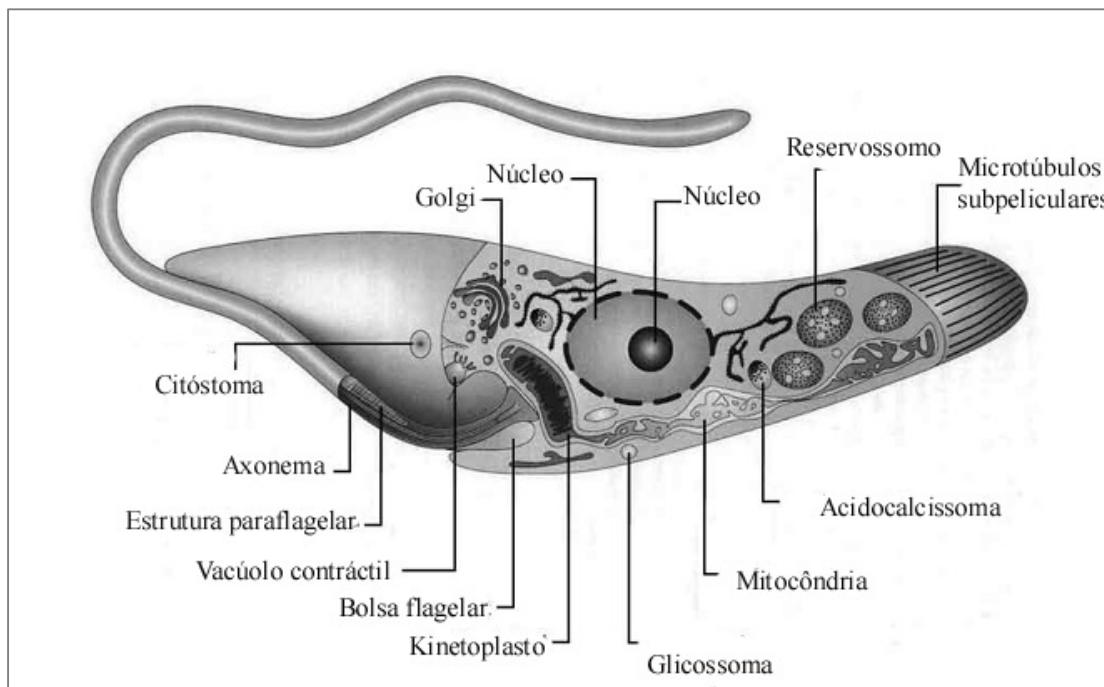


Figura 1 – Diagrama das principais estruturas e organelas encontradas nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Modificado de De Souza, 2008.

1.1.2 O genoma do *T. cruzi*: transcrição e expressão gênica

O *T. cruzi* possui diferentes hospedeiros durante o seu ciclo evolutivo. 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 *et al.*, 2003).

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 DNA circulares denominada de cinetoplasto ou kDNA (DNA mitocondrial) (Borst *et al.*, 1982).

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

O sequenciamento completo do genoma de *T. cruzi*, juntamente com o de outros tripanossomatídeos foi concluído em 2005, porém ainda não foi possível realizar sua montagem completa devido ao grande número de sequências repetitivas. De acordo com os dados do sequenciamento, o *T. cruzi* é um organismo diplóide cujo genoma compreende cerca de 60 Mb com aproximadamente 12.000 genes (El-Sayed *et al.*, 2005). Também foi demonstrado que pelo menos 50% do genoma do parasito é constituído de sequências repetitivas, principalmente de famílias gênicas de proteínas de superfície, retrotransposons e repetições subteloméricas. A transcrição de DNA satélite foi identificada em vários organismos sugerindo que a transcrição deste tipo de sequência é um fenômeno geral apesar de sua função desconhecida. No caso específico do *T. cruzi*, a sequência satélite de 195 pb é a sequência de DNA repetitivo mais abundante no parasito, sendo responsável por ~10% do genoma do parasito. Além disso, esta sequência de 195 pb é intensivamente transcrita não havendo regulação ao longo do ciclo de vida e entre as formas evolutivas do *T. cruzi* (Martins *et al.*, 2008). Em consequência destas características, a sequência de 195 pb tem sido utilizada como base para a construção de oligonucleotídeos iniciadores com a finalidade de diagnóstico parasitológico do *T. cruzi* em sangue humano, amostras de tecidos e nas fezes de vetores (Gonzales *et al.*, 1984).

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 (Vanhame e Pays, 1995; Clayton, 2002; Das *et al.*, 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'.

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 *et al.*, 1997; Gygi *et al.*, 1999; Finzi *et al.*, 2004).

1.1.3 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* compreende um complexo grupo de populações de parasitas circulando entre humanos, vetores, reservatórios selvagens e animais domésticos (Garcia *et al.*, 2007). Este parasito é o agente etiológico da doença de Chagas ou tripanossomíase Americana (Chagas, 1909), sendo transmitido, através de vetores triatomíneos, insetos hematófagos conhecidos popularmente como barbeiros, durante sua alimentação no hospedeiro vertebrado. O seu ciclo biológico é do tipo heteroxênico, passando por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (mamíferos) e extracelular no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) (Elias *et al.*, 2001).

Cada estágio é caracterizado por morfologia celular distinta (Brenner, 1973; Tyler e Engman, 2001; Elias *et al.*, 2001) e o desenvolvimento é concomitante com mudanças no metabolismo (Adroher *et al.*, 1988, 1990; Bringaud *et al.*, 2006) e na expressão gênica (Krieger *et al.*, 1999; El-Sayed *et al.*, 2005; Atwood *et al.*, 2005). Seu ciclo de vida alterna-se entre estágios replicativos (incluindo as formas epimastigotas no intestino do inseto vetor, também observadas na fase logarítmica de crescimento em culturas axênicas, além dos amastigotas encontrados em células de mamíferos) e uma fase não replicativa, porém infectante (incluindo os tripomastigotas metacíclicos encontrados nas fezes e na urina do inseto vetor e na fase estacionária de culturas axênicas de parasitas e os tripomastigotas sanguícolas nos mamíferos, além da fase líquida de tripomastigotas de cultura) (Hoare e Wallace, 1966; Tyler e Engman, 2001, Garcia *et al.*, 2007).

Durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo suga o sangue de um vertebrado infectado ingerindo o *T. cruzi* na forma tripomastigota da corrente sanguínea, dando início ao ciclo de desenvolvimento do parasito na luz intestinal dos triatomíneos (Figura 2). Na porção anterior do intestino médio os tripomastigotas sanguícolas passam a forma epimastigota poucas horas após sua ingestão. Parte dos epimastigotas se multiplica por divisão binária longitudinal e, na ampola retal do triatomíneo, sofre nova diferenciação (metaciclogênese) passando a tripomastigotas metacíclicos. Estes

tripomastigotas metacíclicos são liberados nas fezes, atingindo a corrente sanguínea de um novo hospedeiro vertebrado, que ao se coçar após a picada do triatomíneo permite que o parasito penetre pelas mucosas onde encontra principalmente macrófagos. Após intensa multiplicação na célula hospedeira, sob a forma de amastigotas, estes se diferenciam novamente em tripomastigotas, caindo na circulação do vertebrado e completando o ciclo (Brener, 1979; Tyler e Engman, 2001).

No ponto de lesão da picada ocorre uma reação inflamatória transitória, de natureza eritematosa, desenvolvendo um nódulo denominado de chagoma. Quando o parasito penetra na mucosa ocular ocorre um edema bipalpebral unilateral que recebeu o nome de “sinal de Romaña” devido aos estudos aprofundados publicados pelo pesquisador Romaña em 1935. 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; Lenzi *et al.*, 1996; Gonçalves da Costa *et al.*, 2002; Villalta *et al.*, 2009; Ferreira *et al.*, 2011; Silva-Neto *et al.*, 2012).

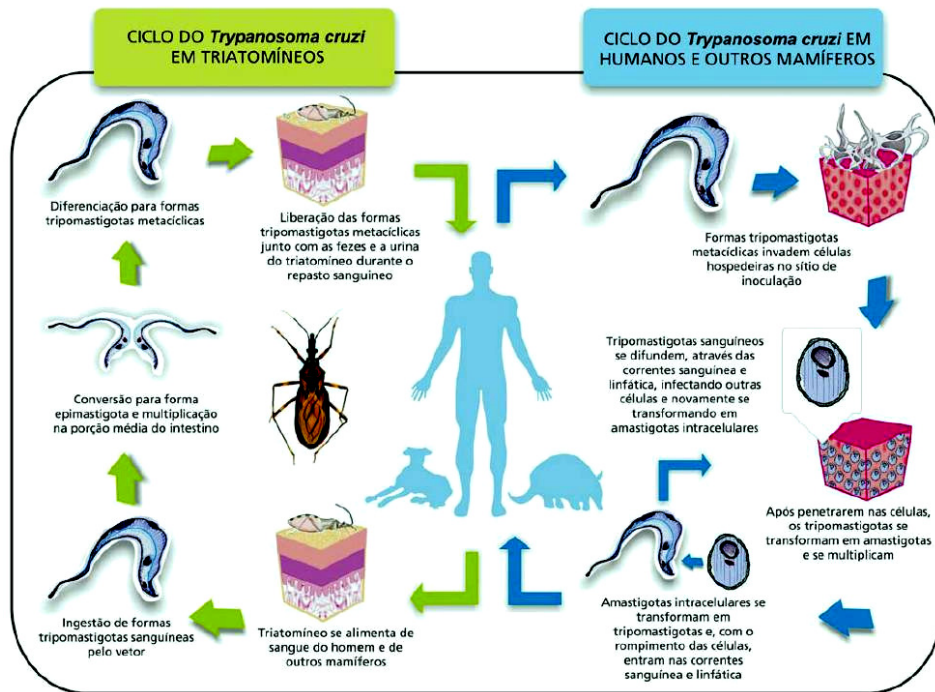


Figura 2 – Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi*. Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz

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 3) identificadas morfologicamente pela posição do cinetoplasto com relação ao núcleo da célula e à emergência do flagelo: 1 - amastigota, que é a forma de multiplicação intracelular, arredondada, com flagelo inconspícuo; 2 - epimastigota, que é a forma de multiplicação do parasito no inseto vetor, com cinetoplasto e bolsa flagelar anterior ou junto do núcleo; 3 - 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 (Brenner, 1979; De Souza, 2002).

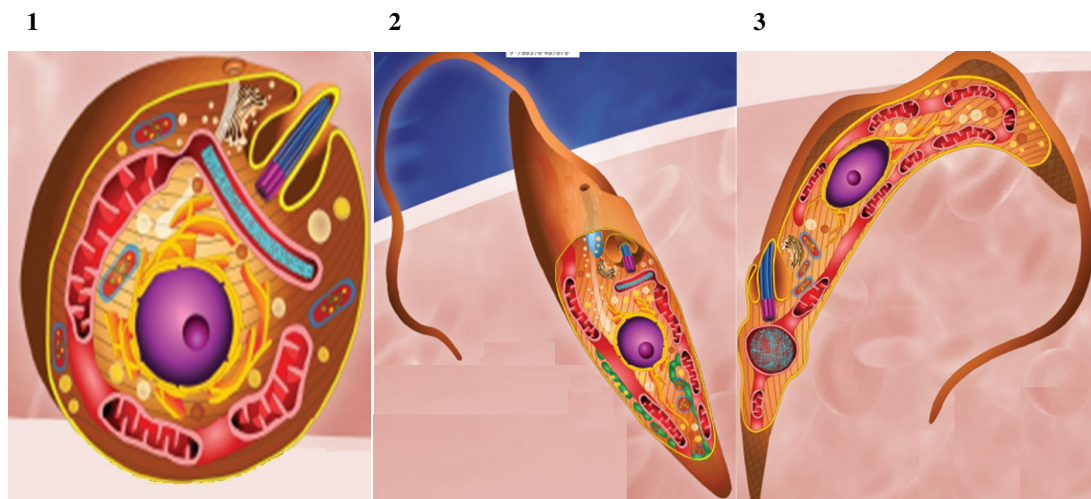


Figura 3 – Ilustração dos estágios de desenvolvimento de *T. cruzi* em corte longitudinal mostrando as principais estruturas celulares: 1- amastigota intracelular; 2- epimastigota; 3- tripomastigota (modificado de Atlas didático ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* – Teixeira *et al.*, 2011).

1.1.3.1 A metaciclogênese

A metaciclogênese, transformação dos epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos, que ocorre no intestino médio do inseto vetor, é indispensável no ciclo de vida do *T. cruzi*. Ela é requerida na formação de parasitos infectantes ao hospedeiro

mamífero. A maior parte das modificações fenotípicas ocorre durante a metaciclogênese, incluindo a falta de proliferação, o desenvolvimento da infectividade, o aumento da resistência ao soro humano e modificações da organização nuclear e da morfologia celular (Krieger *et al.*, 1999; Elias *et al.*, 2001; Tyler e Engman, 2001; Parodi-Talice *et al.*, 2007). Durante a diferenciação, o núcleo se enlaga e passa por mudanças ultraestruturais substanciais. Em análises de microscopias eletrônicas de transmissão o núcleo metacíclico aparece fragmentado e a cromatina densa está dispersa, ao invés de estar restrita à periferia nuclear como ocorre nos epimastigotas (Elias *et al.*, 2001). Nesse caso a reorganização nuclear pode estar associada à repressão transcricional característica das formas não proliferativas do parasito. Por muitos anos as bases moleculares dessas alterações morfogenéticas permaneceram desconhecidas. Este desconhecimento adveio, principalmente, em consequência de relatos conflitantes a cerca das condições que podem iniciar ou influenciar a diferenciação (Sullivan, 1982; Contreras *et al.*, 1988), de diferenças importantes entre as cepas de *T. cruzi* (Krassner *et al.*, 1990) e da falta de marcadores estágio-específico bem caracterizados.

Vários autores identificaram genes positivamente regulados expressos na metaciclogênese (Avila *et al.*, 2001; Dallagiovanna *et al.*, 2001; Fragoso *et al.*, 2003; Yamada-Ogatta *et al.*, 2004). Porém, o padrão de expressão estágio-específico, as funções biológicas, além da localização subcelular dos produtos gênicos ainda não foram totalmente identificadas. Até o presente momento, o exemplo mais promissor de marcador estágio-específico é a MET-III. Esta proteína nuclear parece ser regulada positivamente em tripomastigotas metacíclicos (Yamada-Ogatta *et al.*, 2004). Em 2007, Gluenz e colaboradores demonstraram que, apesar de não ser essencial para a diferenciação do parasito, a MET-III é uma marcadora específica de tripomastigotas metacíclicos não sendo expressa em tripomastigotas sanguíneos. Além disso, após a invasão de células de mamíferos, sua expressão diminui rapidamente.

A publicação do proteoma do *T. cruzi* possibilitou um maior esclarecimento sobre esse processo de diferenciação. Com o uso de LC-MS/MS, os autores demonstraram que a metaciclogênese resultava numa maior expressão de proteínas envolvidas nas defesas antioxidantes e diminuição da produção de proteínas ribossomais (Atwood *et al.*, 2005). Mais recentemente, utilizando técnicas de eletroforese 2D e espectrometria de massas MALDI-TOF foram identificadas cerca de 50% de proteínas diferentemente expressas entre epimastigotas e tripomastigotas. Mais ainda, enzimas envolvidas na manutenção do *status* redox (p. ex. tiol transferase e

cistationa gama liase) apresentaram aumento da regulação, sugerindo uma modulação do estresse nutricional na manutenção do *status* redox do parasito, provavelmente pela ativação e/ou inativação de vias metabólicas (Parodi-Talice *et al.*, 2007).

1.2 A doença de Chagas e sua distribuição geográfica

A descoberta da doença de Chagas e do 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*, denominado-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, *Dasypus novencinctus* (Chagas, 1912) e em macacos, pelo mesmo autor (Chagas, 1924). Um fato único na história da medicina: Chagas conseguiu estabelecer a etiologia e o ciclo parasitário, identificar os insetos vetores, os reservatórios domésticos e silvestres, além de descrever a doença e seu diagnóstico, evidenciando todos os aspectos básicos da sua patologia e epidemiologia.

O estudo dos protozoários hemoflagelados do gênero *Trypanosoma* é relevante uma vez que estes causam doenças graves em extensas áreas do mundo. Dentre as mais importantes encontramos a tripanossomíase africana, que acomete humanos (doença do sono) e animais (Nagana), e a tripanossomíase americana (doença de Chagas) (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.

A distribuição geográfica da doença de Chagas, incluindo seus reservatórios e vetores se estende desde o sudeste dos Estados Unidos ao Sul da Argentina e Chile. Portanto, ela cobre todas as Américas, onde 90 milhões de pessoas nesta região estão expostas à infecção. É estimado que 15 milhões de pessoas apresentem infecção pelo *T. cruzi* ou ainda carreguem a doença. A Figura 4 mostra a distribuição da infecção por *T. cruzi* nas Américas, enfatizando zonas endêmicas e antrozoönóticas no Brasil (Coura e Dias 2009).

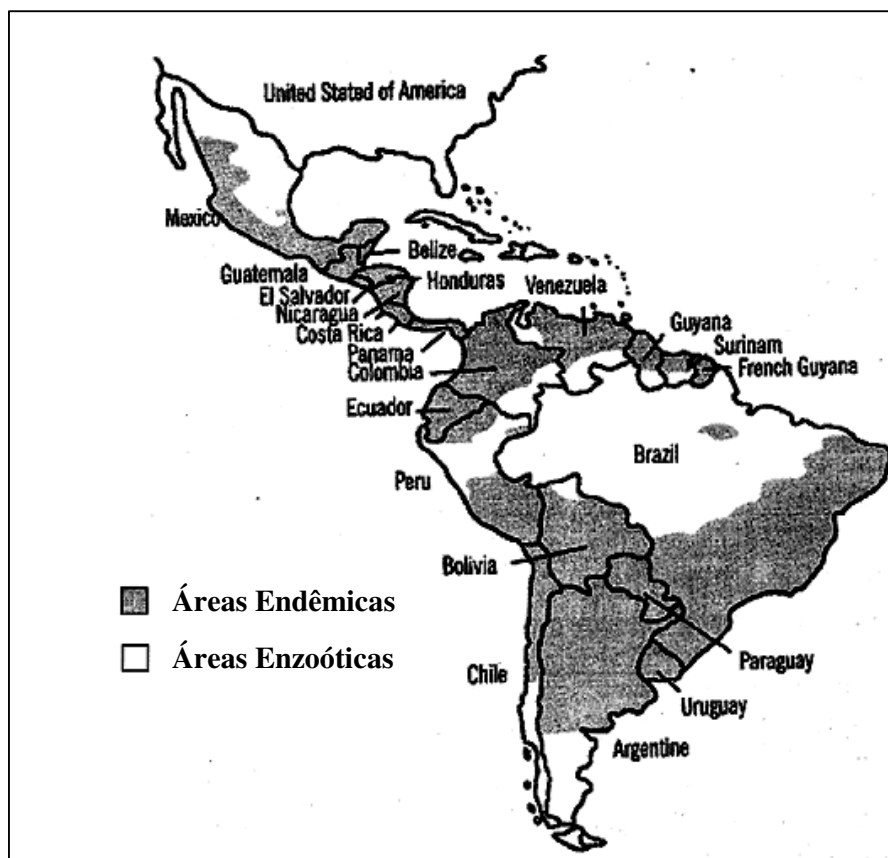


Figura 4 – Distribuição geográfica da doença de Chagas no Brasil e países latino americanos. Modificado de Coura e Dias, 2009.

Segundo a Organização Mundial de Saúde, a doença de Chagas é a principal doença parasitária na América do Sul e a terceira no mundo, após a malária e a esquistossomose. Na América Latina constitui a quarta doença infecciosa mais importante, após as doenças respiratórias, diarreia e SIDA (WHO, 2002). Entretanto, a quimioterapia desta doença ainda é bastante controversa e insatisfatória, já que as duas únicas drogas disponíveis, o nifurtimox e o benznidazol são tóxicas, possivelmente carcinogênicas, além de apresentarem baixa eficiência contra a fase crônica da doença (Ferreira *et al.*, 1988; Gorla, 1989; Wilkinson e Kelly, 2009).

A tripanossomíase americana, considerada originariamente 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 nichos artificiais,

infectando os animais domésticos suscetíveis e o próprio homem, determinando a interação 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).

A transmissão e a disseminação da doença foram facilitadas pelas migrações dentro da América do Sul e da América Latina para o norte (Kirchhoff *et al.*, 1987). Segundo Schmunis e Yadon (2009), a migração dos países endêmicos para a América do Norte, Europa e Oceania tem contribuído para a elevação da doença de Chagas a um problema de saúde global. Em 2006, 3,8% dos 80.522 imigrantes dos 17 países endêmicos para a Austrália estavam infectados com o *T. cruzi*. No Canadá, também em 2006, 3,5% dos 156.960 imigrantes oriundos de países da América Latina estavam infectados com o parasito. Em 15 países da Europa no ano de 2005, 2,9% dos 483.074 imigrantes legais que partiram da América Latina estavam possivelmente infectados. Este parasito já foi registrado desde o paralelo 45 graus sul até 40 graus norte, em hospedeiros vertebrados e/ou invertebrados. Nos EUA, foi estimado que 1,9% dos aproximadamente 13 milhões de imigrantes latino americanos em 2000, e 2% dos 17 milhões em 2007 estavam potencialmente infectados com o *T. cruzi*. Destes, 49.157 em 2000 e 65.133 em 2007 podem já ter desenvolvido sintomas e sinais da fase crônica da doença de Chagas (Schmunis e Yadon, 2009).

A infecção por *T. cruzi* tem ganhado notoriedade devido a sua associação com estados imunossupressivos tais como a infecção por HIV (Vaidian *et al.*, 2004) e pelo perigo de ser transmitido por transfusão sanguínea e transplante de órgãos, em áreas onde a doença de Chagas é ou não endêmica (De Paula *et al.*, 2008).

O transplante de órgãos e os acidentes laboratoriais são vias de transmissão menos frequentes (Brener, 1984; Tanowitz *et al.*, 1992). Com relação à transmissão por acidente laboratorial, a tripanosomíase americana é uma das mais importantes sob o ponto de vista de contaminação laboratorial. Os modos de infecção em laboratório são variáveis, podendo o indivíduo se infectar durante a manipulação de cultura, fezes de triatomíneo ou sangue contaminado com *T. cruzi*.

Apesar de constituir uma doença parasitária importante nas Américas, em 9 de junho de 2006, durante o 15º 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, especificamente pelo *T. infestans*, foi eficientemente eliminada no

Uruguai (1997), Chile (1999), em amplas áreas na Argentina, na Bolívia, Paraguai, e em parte da América Central. A prevalência global da doença foi reduzida da estimativa de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas (WHO, 2002; Coura *et al.*, 2002) a aproximadamente nove milhões atualmente (Schofield *et al.*, 2006).

Outro mecanismo de transmissão do *T. cruzi* é a congênita (Bittencourt, 1963), a qual está associada a nascimentos prematuros, abortamentos e placentites, relatada em muitas áreas da América do Sul (Azogue *et al.*, 1985). A aquisição do *T. cruzi* pela via oral tem sido recentemente foco de atenção. No Brasil, após o controle da transmissão através do *Triatoma infestans* e pela transfusão de sangue, a forma mais frequente e importante de transmissão é através da via oral (Coura, 2006; Yoshida, 2009). Vários casos da doença de Chagas aguda através de alimentos contaminados ocorreram em diferentes regiões do país nos últimos quatro anos. Os casos mais prevalentes são na região amazônica, onde predominam triatomíneos de outras espécies além do *T. infestans* (Coura, 2006). Na Amazônia brasileira mais de 50% dos casos registrados de doença de Chagas aguda entre 1968 e 2000 foram atribuídos à microepidemias transmitidas oralmente (Coura *et al.*, 2002).

Coura, em 2007, listou os dez tópicos necessários para o futuro da doença de Chagas, sendo eles: (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 diferentes cepas de *T. cruzi*; (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.

1.3 Triatomíneos: os vetores da doença de Chagas

A ordem Hemiptera compreende uma série de espécies de insetos hematófagos e também os fitófagos (Lehane, 1991). Os vetores da doença de Chagas pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, na qual todas as 155 espécies são hematófagas obrigatórias. A classificação atual da subfamília Triatominae

reconhece 140 espécies, agrupadas em seis tribos e 18 gêneros (Schofield e Galvão, 2009). Destas, duas tribos, Rhodniini e Triatomini apresentam a maior importância epidemiológica como vetores de tripanossomas. Apesar do entendimento geral de que todas as espécies de Triatominae são capazes de transmitir o *T. cruzi*, investigações recentes apontam a necessidade de uma associação mais específica entre espécies particulares de Triatominae e genótipos definidos dos parasitos (Vallejo *et al.*, 2009).

Os triatomíneos, popularmente conhecidos como “barbeiros” são insetos grandes, medindo de 1 a 4 cm de comprimento podendo ser facilmente distinguidos de outros hemípteros por possuírem uma probóscida retilínea com apenas três segmentos. Da fase de ovo até a fase adulta, o *Rhodnius prolixus* realiza mudas, passando por cinco estágios de ninfa (Neves, 2000). Cada muda depende de uma alimentação com sangue. Além da muda, as fêmeas também precisam ingerir sangue para a postura dos ovos (Garcia e Azambuja, 1979; 1991). Assim como outros insetos da família Reduviidae, o *R. prolixus* possui hábitos alimentares noturnos, passando por grandes períodos de jejum (Lehane, 1991).

Uma fêmea adulta de *Triatoma infestans* produz pequenos agregados de ovos subsequentes a cada alimentação com sangue. Ao longo de sua vida, de seis meses a um ano, ela pode produzir de 100 a 300 ovos (Lehane, 1991). Os ovos eclodem em 10 a 30 dias e há cinco estágios de ninfa (Figura 5). A maioria dos percevejos triatomíneos se alimenta à noite e possuem uma picada quase sem dor. Os insetos adultos são capazes de realizar vôos prolongados o que provavelmente é um importante meio de dispersão local. O *Triatoma infestans*, o *Triatoma brasiliensis*, o *Triatoma dimidiata*, o *Panstrongylus megistus* e o *Rhodnius prolixus*, são as espécies mais importantes na transmissão da doença (Juberg e Galvão, 2006). Ao sul do equador a espécie mais eficiente como vetor da tripanosomíase é o *Triatoma infestans*, enquanto ao norte esse papel cabe ao *R. prolixus*.



Figura 5 – Estágios de desenvolvimento do *R. prolixus*. Da esquerda para direita: ovo, ninfas de 1º, 2º, 3º, 4º, e 5º estágio e adulto. (foto de Hatisaburo Masuda – Laboratório de Bioquímica de Insetos –IBqM –UFRJ).

1.4 Interações Parasito-Vetor

Desde a sua descoberta há um século (Chagas, 1909), evidências da literatura indicam que a íntima interação parasito-vetor é essencial para o sucesso da propagação da doença de Chagas (Garcia *et al.*, 2007). Nesse sentido, vários autores investigaram as associações entre o *T. cruzi* e o triatomíneo, relacionando diversos fatores e moléculas ao estabelecimento da infecção no inseto. É improvável que o *T. cruzi* e seus vetores triatomíneos tenham coevoluído no intuito de facilitar a transmissão do parasito, porém este evento proporcionou uma elegante estratégia, baseada tanto no inseto vetor quanto no parasito, agindo no sentido do desenvolvimento e/ou controle do protozoário no interior do hospedeiro invertebrado mantendo um equilíbrio.

A interação *T. cruzi*-triatomíneo parece ser ainda mais complexa do que se imaginava. Parece haver uma maior susceptibilidade de interação entre insetos e cepas de *T. cruzi* da mesma área geográfica (Perlowagora-Szumlewics *et al.*, 1990). Essas observações são corroboradas levando-se em consideração a inabilidade de algumas cepas de *T. cruzi* em se desenvolver em certas espécies de triatomíneos (Garcia *et al.*, 1984; Gonzalez e Garcia, 1992).

Este fato pode ser explicado pelo fato do *Trypanosoma cruzi* não constituir uma única entidade, mas sim, corresponder a dois subgrupos genéticos altamente divergentes (Briones *et al.*, 1999). O polimorfismo genético do *T. cruzi* foi originalmente

demonstrado utilizando eletroforese de isoenzimas, levando à classificação de três grupos principais: o zimodema 1 (Z1) que aparecia espalhado por *habitats* silvestres; o zimodema 2 (Z2) que parecia estar mais associado à infecções humanas na região do cone sudeste; e o zimodema 3 (Z3) que parecia estar restrito à região amazônica (Devera *et al.*, 2003). Análises posteriores utilizando diversos marcadores e ferramentas de biologia molecular confirmaram esse agrupamento, indicando, porém, duas linhagens principais agora denominadas *T. cruzi* I (=Z1) e *T. cruzi* II (=Z2) incluindo o Z3 dentro do *T. cruzi* II (Briones *et al.*, 1999; Vallejo *et al.*, 2009). Em 2009, durante o encontro satélite do XXXVI Encontro Anual de Pesquisa Básica em Doença de Chagas, um comitê 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 classificados dentro de seis diferentes unidades discretas de tipagem ou “*discrete typing units*” (DTU’s), denominadas: *T. cruzi* I-VI (Tibayrenc, 1998; Zingales *et al.*, 2009; Zingales *et al.*, 2012).

No ambiente do trato digestivo do inseto, deve-se levar em consideração a participação de bactérias simbiotes da flora intestinal dos triatomíneos no desenvolvimento do *T. cruzi*. A bactéria intestinal *Serratia marcescens*, isolada de *R. prolixus* afeta fortemente o desenvolvimento inicial do *T. cruzi* (Azambuja *et al.*, 2004). Com relação aos efeitos da infecção de *T. cruzi* sobre o inseto vetor, este parasito é classificado como subpatogênico, porém, o parasita parece afetar de alguma forma a homeostase do trato intestinal do triatomíneo, uma vez que, em insetos infectados, há maior desenvolvimento de bactérias e fungos (Eichler e Schaub, 1998). Em condições ótimas, não há alteração do desenvolvimento e nem da taxa de mortalidade de ninfas infectadas quando comparadas a não infectadas, ocorrendo apenas uma maior sensibilidade em resistir ao jejum, já que inseto e parasito competem pelos mesmos nutrientes (Schaub, 1989; Schaub, 2006; Vallejo *et al.*, 2009).

Após o repasto sanguíneo a membrana perimicrovilar (barreira fisiológica e física para as enzimas envolvidas tanto na digestão quanto na absorção dos nutrientes do sangue) funciona como um sítio de adesão para os epimastigotas (Billingsley e Downe, 1985; Ferreira *et al.*, 1988). Esse processo é um fator básico para o estabelecimento do parasita no vetor (Garcia *et al.*, 1989; Garcia e Azambuja, 2004). Alves e colaboradores, em 2007, demonstraram que proteínas hidrofóbicas de epimastigotas e resíduos de carboidratos provenientes do vetor *R. prolixus*, principalmente o ácido N-acetil-

neuramínico (NANA) e a D-manose, constituem fatores importantes nessa interação parasito-vetor, provavelmente devido a natureza química dessas proteínas.

O intestino anterior dos triatomíneos é o primeiro ambiente encontrado pelo *T. cruzi* ao ser ingerido juntamente com o sangue. Os parasitos entram em contato com componentes e moléculas da saliva (Barros *et al.*, 2009; Silva-Neto *et al.*, 2012), dos intestinos anterior e médio, além de produtos da digestão. Nesse sentido, vários autores examinaram a influência de enzimas digestivas, fatores hemolíticos, lectinas e peptídeos derivados da globina, todos virtualmente capazes de modular os processos de diferenciação e proliferação do *T. cruzi* (Garcia, 1987; Garcia e Azambuja, 1991; Kollien e Schaub, 2000; Azambuja *et al.*, 2005). Contudo, apesar dos esforços na elucidação dessa complexa interação parasito-vetor, algumas moléculas abundantes presentes no vetor, tais como: (i) o heme, também um subproduto da digestão da hemoglobina, (ii) a hemozoína, um agregado de heme abundante nas fezes dos triatomíneos (Oliveira *et al.*, 2000b; Oliveira *et al.*, 2007) e (iii) o urato, presente em altas concentrações na urina desses insetos (Wigglesworth, 1931) permaneceram menos estudadas.

1.4.1 O heme

A maioria dos animais hematófagos ingere grandes quantidades de sangue em uma única alimentação. Os triatomíneos chegam a ingerir a cada repasto de três a dez vezes seu peso corporal em sangue (Friend *et al.*, 1965). Nessa situação há a liberação de altas concentrações de hemoglobina (Hb), a proteína mais abundante no sangue de mamíferos (constituindo cerca de 60% do conteúdo proteico do sangue humano). Por esta razão, a degradação da Hb no trato digestivo desses insetos leva a liberação de grandes concentrações de heme.

O heme (Figura 6) 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 desintoxicação de drogas (enzima P450) e em defesas antioxidantes (catalase) (Ponka, 1999). Esta molécula também está envolvida no metabolismo da biossíntese de esteróides e com proteínas que participam da transdução de sinal, além de ser parte integrante da cianocobalamina (vitamina B12), que está

envolvida na hematopoese e outras funções celulares. 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 (Furuyama *et al.*, 2007).

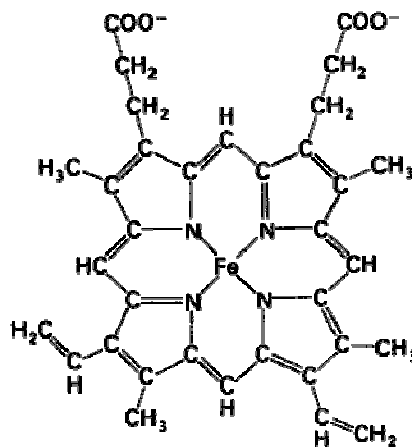


Figura 6 – Estrutura química do heme (Fe-protoporfirina IX)

Além disso, Arévalo e colaboradores, em 1985, demonstraram que a adição de heme ao meio de cultura aumenta a proliferação de formas epimastigotas. Mais tarde, estudos bioquímicos demonstraram a ausência da via completa da biossíntese de heme em *T. cruzi* (Lombardo *et al.*, 2003), sendo este dado corroborado com o sequenciamento do genoma do *T. cruzi*, onde oito enzimas da via clássica de biossíntese de heme, a partir da glicina, estão ausentes nesse organismo (El-Sayed *et al.*, 2005). Posteriormente, nosso grupo mostrou que a forma epimastigota, quando mantida em cultura, aumenta sua proliferação de maneira dose resposta à suplementação de heme (Lara *et al.*, 2007). Recentemente, aprofundamos ainda mais esse tema demonstrando pela primeira vez, o envolvimento da Cálcio Calmodulina quinase II (CaMKII) na via de sinalização induzida por heme mediando a proliferação deste parasito (Lara *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009). Portanto, a ausência de sua biossíntese torna o heme uma molécula essencial para esse parasito.

Apesar da importância descrita acima, o heme livre é uma molécula potencialmente tóxica devido a sua habilidade de gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) (Gutteridge e Smith, 1988), promovendo a formação de radicais livres, levando

à oxidação de lipídeos (Ryter e Tyrrell, 2000; Deterding *et al.*, 2004), proteínas e DNA (Aft e Mueller, 1984). Sendo também um ânion lipofílico, é capaz de alterar a permeabilidade e a seletividade de membranas biológicas (Schmitt *et al.*, 1993).

1.4.2 A hemozoína

Enquanto está ligado à hemoglobina, o heme está em sua forma solúvel. Porém, o heme livre apresenta baixa solubilidade em meio aquoso, portanto, é bastante comum que o heme se insolubilize, acarretando a formação de agregados de heme (Slater *et al.*, 1991; Oliveira *et al.*, 1999). Os agregados de heme resultam na redução da formação de radicais livres uma vez que os hidroperóxidos orgânicos têm acesso apenas à superfície dos agregados (Oliveira *et al.*, 2002). Ao longo dos anos, os agregados de heme encontrados nos animais hematófagos foram descritos com o nome genérico de hematina, sugerindo serem apenas depósitos não específicos de heme (Wigglesworth, 1943). Foi no parasita *Plasmodium* que primeiramente caracterizou-se um tipo particular de agregado de heme chamado de “pigmento malárico” ou hemozoína (Hz) (Pagola *et al.*, 2000) (Figura 7). Esses parasitas durante a fase eritrocítica se protegem da grande concentração de heme através do sequestro e conversão do heme em hemozoína. Em 1991, Slater e colaboradores determinaram que as moléculas de heme interagiam entre si através de ligações ferro-carboxilato. Mais tarde, a estrutura da hemozoína foi resolvida por difração de raio-X mostrando que moléculas únicas de heme estavam ligadas através de ligações ferro-carboxilato recíprocas produzindo dímeros de heme. Estes dímeros, por sua vez, interagem entre si por pontes de hidrogênio entre as cadeias de propionato do anel porfirínico (Pagola *et al.*, 2000). Por anos acreditou-se que a hemozoína era exclusiva dos parasitas maláricos, contudo estudos mostraram a sua formação em outros organismos hematófagos como no helminto *Shistosoma mansoni* e em *Rodnius prolixus*, um dos vetores da doença de Chagas (Oliveira *et al.*, 1999; Oliveira *et al.*, 2000a; Oliveira *et al.*, 2000b; Oliveira *et al.*, 2007). Essas observações indicam que a agregação de heme é uma estratégia recorrente na natureza representando uma eficiente via de desintoxicação do heme nesses organismos hematófagos (Graça-Souza *et al.*, 2006).

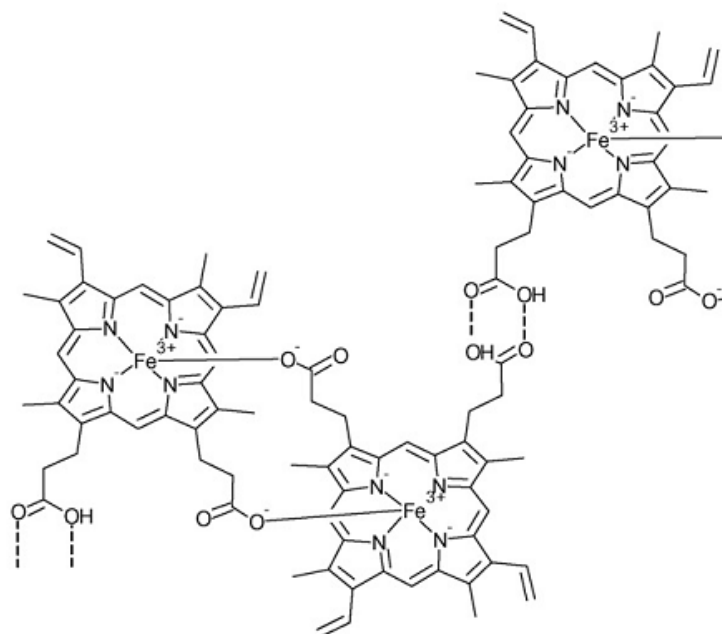


Figura 7 – Estrutura do cristal de hemozoína. Modificado de Egan, 2008.

1.4.3 O urato

O ácido úrico (Figura 8) é o produto final do metabolismo de purinas em humanos, que ao contrário de outros mamíferos não apresentam a enzima uricase (Watanabe *et al.*, 2002). O urato também pode ser produzido através da degradação da xantina ou hipoxantina pela ação da enzima xantina oxidoreductase (Feigelson *et al.*, 1957). Devido à sua baixa solubilidade (Kippen *et al.*, 1974), o ácido úrico pode se cristalizar nas articulações deflagrando uma forte resposta inflamatória conhecida como gota (Cronstein e Terkeltaub, 2006). Mais recentemente, o urato, assim como a hemozoína, tem sido relacionado à patogênese da malária, levando à liberação de mediadores inflamatórios (Orengo *et al.*, 2008; Orengo *et al.*, 2009). Por outro lado, acredita-se que o urato seja um dos antioxidantes mais importantes no plasma humano, agindo tanto como formador de complexos inativos com metais de transição, como interceptador de radical hidroxil, hidroperóxidos lipídicos e ácido hipoclorídico (Maples e Mason, 1988).

O ácido úrico constitui o principal produto final do metabolismo de nitrogênio também nos insetos. Nesses organismos o urato é sintetizado no corpo gorduroso

(Cochran, 1975), secretado para a hemolinfa e posteriormente absorvido pelos túbulos de Malpighi para a formação da urina dos insetos (Wigglesworth, 1931; O'Donnel e Maddrell, 1983). Em mutantes de *Drosophila melanogaster* incapazes de sintetizar ácido úrico, foi demonstrada uma maior sensibilidade ao estresse oxidativo, indicando um papel antioxidante do urato também nos insetos (Hilliker *et al.*, 1992).

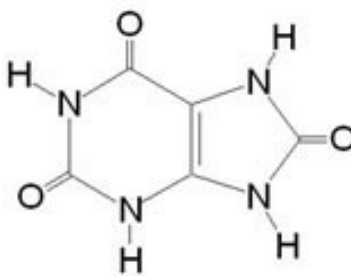


Figura 8 – Estrutura química do urato
(ácido úrico)

Graça-Souza e colaboradores (1997) observaram grandes quantidades de urato na hemolinfa de *Rhodnius prolixus*, representando o antioxidante de baixo peso molecular mais importante nesses organismos. Mais tarde, o mesmo grupo demonstrou que, de fato, o heme liberado durante a digestão do sangue modulava a produção de ácido úrico através da ativação da proteína quinase C (Graça-Souza *et al.*, 1999). A manutenção de uma alta titulação de urato nos fluidos extracelulares (cerca de 5 mM) protege o *Rhodnius* contra o dano oxidativo causado pela ingestão de grandes quantidades de heme.

1.5 O metabolismo Redox

Após o surgimento dos primeiros organismos capazes de produzir oxigênio (algas verdes e cianobactérias), a atmosfera terrestre tornou-se oxidante apresentando hoje 21% de O₂ em seu ambiente. Exceto para organismos anaeróbios, o oxigênio é necessário em todos os animais e plantas para a produção eficiente de energia, sendo essencial à manutenção da vida destes seres. Porém, justamente devido ao seu alto potencial eletroquímico de redução, tão eficiente para oxidar combustíveis e gerar

energia, o oxigênio é também uma molécula altamente perigosa para a célula pelos danos causados a biomoléculas como proteínas, lipídeos e DNA.

A mitocôndria é o compartimento celular dos mamíferos com a maior atividade redox, onde ocorre mais de 90% da transferência de elétrons para o O_2 comoceptor final. A maior parte da transferência de elétrons se dá através de um circuito, denominado cadeia transportadora de elétrons (CTE) que utiliza a energia potencial da oxidação de vários substratos metabólicos (p. ex. ácidos graxos e piruvato) para a geração de ATP. A membrana interna da mitocôndria de mamíferos apresenta cinco complexos multiproteicos com funções específicas na fosforilação oxidativa. O complexo I (NADH-quinona oxidoreductase), o complexo III (coenzima Q: citocromo redutase) e o complexo IV (citocromo oxidase) são bombas de prótons com capacidade redox. Já o complexo II (succinato desidrogenase) transfere elétrons do succinato para a cadeia e o complexo V (ATP sintase), é uma bomba de prótons reversível que utiliza o gradiente eletroquímico de prótons para a síntese de ATP (Mitchell, 1979; Dröge, 2002; Go e Jones, 2008; Kowaltowski *et al.*, 2009).

A CTE reduz continuamente o O_2 consumido à água (redução de quatro elétrons), porém uma pequena quantidade de ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) é também gerada como resultado da redução de apenas um elétron do oxigênio. O $O_2^{\cdot-}$ é bastante reativo, sendo transformado em uma espécie menos reativa, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) através da ação das enzimas manganês superóxido dismutase (Mn-SOD) na matriz mitocondrial, e cobre-zinco superóxido dismutase (Cu,Zn-SOD) no espaço intermembranas e no citosol (Weisiger *et al.*, 1973a; Weisiger *et al.*, 1973b; Okado-Matsumoto *et al.*, 2001).

Desta forma, a cadeia transportadora de elétrons (CTE) constitui a mais importante fonte de espécies reativas de oxigênio (EROs) na maioria dos tecidos. O maior sítio de redução univalente do oxigênio molecular em superóxido é um componente da CTE presente na membrana interna da mitocôndria, a ubiquinona parcialmente reduzida (Krieger-Brauer *et al.*, 1997; Dröge, 2002). Praticamente todas as células e tecidos convertem continuamente uma pequena proporção de oxigênio em superóxido por esse mecanismo. Além desse mecanismo, isoformas da enzima NADPH-oxidase, também geram grandes quantidades de ânion superóxido (Dinauer *et al.*, 1997). A enzima xantina oxidoreductase (XO), apesar de formar ácido úrico (um potente antioxidante), também resulta na produção de superóxido (Ames *et al.*, 1981). O oxigênio molecular pode ainda ser parcialmente reduzido a radical hidroxil ($\cdot OH$), um

oxidante forte e inespecífico capaz de modificar proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos (Chance *et al.*, 1979; Turrens, 2003). Apesar de não ser um radical, o H_2O_2 é muito importante devido a sua capacidade de penetrar membranas biológicas e como intermediário na formação de radicais mais reativos, incluindo o ácido hipocloroso (HOCl) através da ação da enzima mieloperoxidase (presente nos fagossomos dos neutrófilos) (Winterbourn *et al.*, 2000), além de participar da formação do radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) (Halliwell, 1999; Dröge, 2002). As espécies reativas como o ânion superóxido e o peróxido de hidrogênio por muito tempo foram conhecidas apenas como subprodutos da respiração aeróbica e por gerarem efeitos danosos a biomoléculas como DNA, proteínas e lipídios (Tappel, 1955; Aft e Mueller 1983, 1984). Contudo, um crescente corpo de evidências vem demonstrando que as EROs estão envolvidas na manutenção da homeostase redox em várias vias de sinalização celulares, sugerindo o envolvimento dessas espécies num complexo conjunto de processos celulares (Dröge, 2002; Turrens, 2003).

Um radical livre pode ser definido como qualquer espécie que apresente um ou mais elétrons desemparelhados, por exemplo, as espécies reativas de oxigênio (EROs), a maioria dos metais de transição (ferro, zinco, manganês ou cobre) e a molécula de oxigênio propriamente dita que apresenta dois elétrons desemparelhados (Halliwell e Gutteridge, 1984). Em contrapartida, antioxidantes foram definidos como substâncias capazes de, em concentrações relativamente baixas, competirem com outros substratos oxidáveis e, diminuir significativamente ou inibir a oxidação desses substratos (Halliwell, 1999). Esta definição inclui compostos não enzimáticos como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), urato e glutatona (GSH) (Dröge, 2002), bem como enzimas: (1) Cu,Zn-SOD e Mn-SOD, (2) catalase, que catalisa a dismutação do H_2O_2 em oxigênio e água (Chance *et al.*, 1979) e (3) glutatona peroxidase (GPx), uma peroxidase responsável pela redução do H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos utilizando a glutatona reduzida (GSH) como doador de hidrogênio (Ursini *et al.*, 1995). A glutatona oxidada (GSSG) formada pela GPx pode ser reduzida pela ação da enzima glutatona redutase (GR), uma enzima redutora de dissulfido que requer NADPH como doador de elétrons para manter o equilíbrio dos níveis de GSH. As tioredoxinas (Trxs) são proteínas monoméricas com um par redox de cisteínas ativas que ciclam entre TrxS_2 (forma oxidada) a Trx(SH)_2 (forma reduzida). Conseqüentemente, o par TRx/TrxR funciona como um importante sistema redutor

intracelular, que pode trabalhar em conjunto ou substituir as funções do sistema GR/GSH em células de mamíferos (Sztajer *et al.*, 2001).

1.5.1 Diferenças entre estresse oxidativo e desbalanço redox

Há mais de duas décadas o estresse oxidativo foi definido como um aumento do estímulo pró-oxidante seguido da diminuição das defesas antioxidantes (Sies, 1985). A visão clássica de que as espécies reativas e outros oxidantes apenas reagem indiscriminadamente destruindo componentes biológicos sofreu uma mudança de paradigma na qual, o papel das EROs na regulação de funções fisiológicas, particularmente na transdução de sinais também passa a ser considerada (Suzuki e Ford, 1999). O acúmulo de evidências sobre vias de sinalização moduladas por EROs e mecanismos redox e o advento de novos marcadores de estresse oxidativo levou à necessidade de uma definição mais abrangente.

O termo “estresse oxidativo” descreve vários processos deletérios e irreversíveis provenientes de um desbalanço entre a formação excessiva de espécies reativas e a ineficiência das defesas antioxidantes dando origem a situações patológicas. Por outro lado, os termos “controle redox” ou “sinalização redox” descrevem processos transientes e reversíveis nos quais há uma perturbação do balanço redox ou pelo aumento da concentração de EROs, ou ainda pela diminuição da atividade de um ou mais sistemas antioxidantes. Nessa situação, a mudança do status redox GSH/GSSG sinaliza a indução de respostas protetoras contra o dano oxidativo, e promove o retorno ao *status* redox original (Dröge, 2002; Frein, 2005; Jones, 2006).

Evidências acumuladas nos últimos anos confirmam as EROs e espécies reativas de nitrogênio (ERNs) como participantes em sinalizações redox (Jones, 2008). Essas espécies estão presentes nas células em concentrações muito baixas, porém, suficientes para estimular a proliferação celular (Burdon, 1995). Outras evidências mostram que células tumorais podem aumentar sua produção de H₂O₂ (Szatrowski e Nathan, 1991) e a associação de uma família de NADPH oxidases (Nox) com a proliferação celular (Suh *et al.*, 1999; Lambeth, 2004; Brown e Griendling, 2009). Tais descobertas corroboram a importante função das vias de sinalização redox no controle do crescimento celular. De fato, as enzimas catalase e peroxidase podem afetar a sinalização redox, confirmando o H₂O₂ como uma espécie quantitativamente importante na sinalização redox (Go e Jones, 2005; Hansen *et al.*, 2007).

Nesse sentido, os antioxidantes de baixo peso molecular têm uma grande importância no controle da homeostase redox. Essas moléculas agem não somente como cosubstratos em reações de desintoxicação, como GSH e ascorbato (Dickinson e Forman, 2002), mas também como removedores de radicais, convertendo espécies reativas em compostos menos reativos.

A glutathiona é um tripeptídeo (γ -Glu-Cys-Gly) composto de resíduos de ácido glutâmico, glicina e cisteína. É o antioxidante baseado em tiol intracelular mais abundante, sendo encontrado em concentrações milimolares em todas as células aeróbicas. A sulfidril (-SH) da cisteína é a responsável pelo poder redutor da glutathiona, sendo este aminoácido também um conhecido antioxidante fisiológico (Dröge, 2002). A GSSG é novamente reduzida pela flavoenzima dependente de NADPH, a GR. Sua capacidade de oxidação e redução é requerida para a manutenção do potencial redox em meios biológicos. Além disso, a relação GSH/GSSG constitui uma importante ferramenta de quantificação do status redox da célula, uma vez que, praticamente todos os sistemas biológicos apresentam cisteínas sensíveis ao *status redox*, funcionando na sinalização celular (Meister, 1988; Jones, 2006; Jones, 2008).

1.5.2 O metabolismo redox do *T. cruzi*

Devido a seu ciclo de vida complexo, alternando entre o inseto vetor e seus hospedeiros vertebrados, o *T. cruzi* passa pelos mais variados ambientes, enfrentando diferenças bruscas de temperatura, pH, além de um gradiente de nutrientes e variações do *status redox*. Concomitantemente, e em resposta às mudanças ambientais, esses parasitos também sofrem transformações morfológicas e bioquímicas drásticas. Tais variações levam à transdução de sinais que deflagram os processos de proliferação e diferenciação. Portanto, a percepção de espécies reativas de oxigênio é um mecanismo importante para a adaptação e interação dos tripanosomatídeos com seu ambiente (Steenkamp, 2002).

Em sua fase intracelular, o *T. cruzi* está exposto a espécies reativas de oxigênio provenientes de diferentes mecanismos, incluindo as espécies geradas por seu próprio metabolismo aeróbico e pela resposta imune do hospedeiro vertebrado (Docampo, 1990; Piacenza *et al.*, 2009). Os protozoários parasitas apresentam diferenças importantes no que em relação ao metabolismo redox não apenas quando comparados com seus hospedeiros, mas também entre si (Turrens, 2004; Irigoín *et al.*, 2008).

No que diz respeito ao metabolismo intermediário, o *T. cruzi* prefere consumir glicose a outras fontes de carbono (aminoácidos), mesmo quando ambas estão disponíveis (Cannata e Cazzulo, 1984; Bringaud *et al.*, 2006). A cadeia transportadora de elétrons dos kinetoplastida apresenta diferenças importantes se comparada com a CTE dos mamíferos. Por muitos anos a presença e a funcionalidade de um complexo I nos tripanossomatídeos tem sido alvo de controvérsia (Turrens, 2004). A arquitetura completa do complexo I do *T. cruzi* foi resolvida mostrando que, apesar de todas as subunidades responsáveis pela transferência de elétrons estarem presentes, quatro subunidades membranares envolvidas na extrusão de prótons estão ausentes (Oppenheimer e Michels, 2008). Além disso, dados recentes utilizando diferentes cepas demonstraram que o complexo I do *T. cruzi* é de fato não funcional na oxidação de NADH, não estando envolvida na transdução de energia nesses parasitos (Carranza *et al.*, 2009). A ausência dessas subunidades pode explicar a não inibição do transporte de elétrons pela rotenona nesses parasitos (Affranchino *et al.* 1985).

Provavelmente devido a não funcionalidade do complexo I, a maioria dos tripanossomatídeos utilizem o succinato como principal produto final do metabolismo de glicose. Nesses organismos, o succinato pode ser produzido pela enzima fumarato redutase NADH-dependente (FRD) presente tanto no glicossoma quanto na mitocôndria dos parasitos (Boveris *et al.* 1986; Besteiro *et al.*, 2002; Coustou *et al.*, 2005; Coustou *et al.*, 2006). Estas peculiaridades em conjunto fazem da mitocôndria e de suas vias de obtenção de energia alvos em potencial para pesquisas de drogas tripanocidas. Apesar disso, do ponto de vista do potencial de membrana mitocondrial e da captação de cálcio, a mitocôndria do *T. cruzi* apresenta o comportamento bastante similar ao das células de mamíferos (Vercesi *et al.* 1991; Irigoín *et al.* 2008).

Protozoários parasitas apresentam diferenças importantes também em termos de defesas antioxidantes, não apenas quando comparados com o hospedeiro mamífero, bem como quando se compara os diferentes gêneros de parasitos. Por exemplo, tripanosomatídeos do gênero *Leishmania* e *Trypanosoma*, bem como *Plasmodium* apresentam, em seu citoplasma, uma isoforma SOD dependente de ferro (Fe-SOD), normalmente encontrada apenas em bactérias e ausente em outras células eucarióticas e outra isoforma dependente de ferro (Fe-SOD) na mitocôndria e no glicossoma (Wilkinson *et al.*, 2006; Getachew e Gedamu, 2007). Estudos recentes demonstraram que a superexpressão da isoforma A da SOD de *T. cruzi* (TcSODA) forneceu resistência

às formas epimastigotas de *T. cruzi* à morte celular programada induzida por soro (Piacenza *et al.*, 2007).

A capacidade do *T. cruzi* em evadir a resposta oxidativa do hospedeiro é diretamente relacionada ao sucesso do processo de invasão e ao estabelecimento da doença (Piñeyro *et al.*, 2008; Piacenza *et al.*, 2009).

Na década de 80, Boveris e colaboradores (1980) observaram que o *T. cruzi*, diferentemente de seus hospedeiros vertebrados, não apresentava as enzimas catalase, nem os sistemas antioxidantes GSH/GR e tioredoxina/thioredoxina redutase para a manutenção da homeostase redox. Estas observações, e o fato das drogas disponíveis para a quimioterapia terem como mecanismo de ação a geração de EROs, os levaram a concluir que o sistema antioxidante destes organismos era deficiente. Ao contrário, pesquisas posteriores demonstraram que o sistema antioxidante destes protozoários era bastante específico apresentando uma gama de substratos e localizações intracelulares únicas (Wilkinson *et al.*, 2003).

No *T. cruzi*, o metabolismo redox é baseado em um dithiol específico conhecido como tripanotiona (T(SH)₂) além de sua redutase correspondente a flavo enzima tripanotiona redutase (TryR) (Fairlamb *et al.* 1985; Wilkinson *et al.*, 2000; Flohé *et al.*, 2003; Irigoín *et al.*, 2008). A T(SH)₂ consiste de duas moléculas de glutatona conjugadas a uma poliamida (espermidina) (Fairlamb e Cerami, 1992; Krauth-Siegel *et al.*, 2003). Os tripanosomatídeos transformam boa parte de sua glutatona em tripanotiona, que em pH fisiológico, seus grupos SH são mais reativos que a glutatona devido a valores de pK menores (Moutiez *et al.*, 1994). Portanto, a tripanotiona parece particularmente apropriada para a redução de hidroperóxidos (Flohé *et al.*, 2003). Um estudo utilizando *T. brucei* como modelo, demonstrou que a diminuição da expressão da enzima tripanotiona redutase (TR) diminui a infectividade do parasito e que a diminuição em menos de 10% desta atividade enzimática é capaz de parar o crescimento celular (Krieger *et al.*, 2000). Apesar do papel da tripanotiona na proliferação ter sido demonstrada apenas em *T. brucei*, as proteínas envolvidas também estão presentes em *T. cruzi* (El-Sayed *et al.*, 2005), sugerindo uma via em comum. O sistema T(SH)₂ /TR protege o parasito contra estresse oxidativo e fornece equivalentes redutores para a síntese de DNA (Dormeyer *et al.*, 2001; Muller *et al.*, 2003). Porém, o papel da T(SH)₂ na desintoxicação de drogas em *T. cruzi* é pouco claro.

Diferentes peroxidases foram identificadas em *T. cruzi*, uma peroxidase citosólica, a triparedoxina peroxidase citosólica (TcCPx) e outra localizada na

mitocôndria (TcMPx). Estas enzimas são responsáveis pela desintoxicação de H_2O_2 e hidroperóxidos orgânicos de cadeia curta (Wilkinson *et al.*, 2000). Estudos recentes demonstram uma importante intercorrelação entre as enzimas citosólica e mitocondrial (Peloso *et al.*, 2011). Estes parasitos apresentam também duas peroxidases dependentes de glutatona envolvidas na desintoxicação de ácidos graxos e hidroperóxidos de fosfolípídeos, mas não de H_2O_2 (Wilkinson *et al.*, 2002b). Ao contrário em *T. brucei* foram identificadas duas peroxidases (uma peroxiredoxina e um membro das peroxidases não selênio dependente, mas dependente de glutatona) capazes de desintoxicação H_2O_2 (Wilkinson *et al.*, 2003). Além disso, posteriormente foi descrita uma enzima heme-peroxidase ascorbato-dependente que parece ser especificamente dependente de glutatona como fonte de equivalentes redutores, localizada no retículo endoplasmático e com limitada habilidade para metabolizar hidroperóxidos de ácidos graxos de cadeia longa e fosfolípídeos, resultados de peroxidação lipídica (Wilkinson *et al.*, 2002a).

Recentemente, foi demonstrado que a superexpressão da TcCPx levou à resistência ao peroxinitrito tanto endógeno como exógeno (Piacenza *et al.*, 2008). Além disso, esses parasitos também se tornaram mais infectantes quando comparados ao controle. Um efeito similar foi observado em *L. donovani* que superexpressavam cTCPx: os parasitos se tornaram mais resistentes a oxidantes e mais virulentos contra macrófagos quando comparados com as células controle (Iyer *et al.*, 2008).

Além da tripanotona e do GSH, o *T. cruzi* também apresenta outros tiois de baixo peso molecular incluindo o glutationilpermidina (Gsp) e o ovotiol A [N1-metil-4-mercaptotimidina]. Essas moléculas assim como o GSH são mantidas na sua forma reduzida pela ação direta da tripanotona (Ariyanayagam e Fairlamb, 2001). A concentração desses tiois varia de acordo com o estágio de vida, e da fase de crescimento. Apesar das atividades *in vitro* descritas tanto para o Gsp quanto para o ovotiol A, as funções *in vivo* dessas moléculas ainda não são conhecidas (Tetaud e Fairlamb, 1998; Zoete *et al.*, 2000; Melchers *et al.*, 2007). Esses tiois de baixo peso molecular, bem como a própria T(SH)₂, podem participar diretamente da defesa antioxidante através da remoção de radicais livres (Irigoín *et al.*, 2008).

Assim como leveduras (Davies *et al.*, 1995), bactérias (Demple e Halbrook, 1983) e células de mamíferos (Wiese *et al.*, 1995), o *T. cruzi* é capaz de se adaptar de maneira transiente ao estresse oxidativo. Essa adaptação pode ser observada quando os parasitos são pré-tratados com concentrações não-tóxicas de H_2O_2 e então submetidos a

concentrações maiores (sub-letais). Além disso, a incubação de formas epimastigotas com diferentes concentrações de H_2O_2 induziram o aumento da expressão da enzima triparedoxina peroxidase citosólica (Finzi *et al.*, 2004). Dados recentemente publicados pelo nosso grupo também estão em conformidade com a teoria de sinalização e controle redox, onde o heme (estímulo oxidante) induz a formação de EROs que modulam a atividade da enzima redox-sensível CaMKII a deflagrar a proliferação dos epimastigotas (Nogueira *et al.*, 2011).

Em 2009 comemoramos o centenário da descoberta da doença de Chagas e até o presente momento, não existem vacinas ou quimioterapia para o tratamento da fase crônica da doença. Portanto, o estudo de novos aspectos da biologia deste parasito, bem como da sua relação com o inseto vetor, se tornam importantes no combate desta enfermidade. A forma epimastigota de *T. cruzi* está exposta a EROs provenientes de diferentes mecanismos, incluindo o menos estudado microambiente do trato digestivo do vetor triatomíneo rico em heme. Além disso, há uma escassez de evidências na literatura relacionando moléculas abundantes no vetor como heme, hemozoína e urato com a proliferação e diferenciação *in vivo* do *T. cruzi*. Por isso, o entendimento do papel *in vivo* destas moléculas sobre o metabolismo redox do parasito, além de sua importância no seu ciclo de vida e na modulação das interações parasito-vetor se faz essencial para o aprofundamento acerca dos mecanismos e fatores necessários e suficientes para a transmissão da doença de Chagas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Reagentes

O presente trabalho utilizou urato (ácido úrico), dimetilsulfóxido (DMSO), horseradish peroxidase (HRP), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), fluorocarbonil-cianeto fenilhidrazona (FCCP), antimicina A (AA), glutationa reduzida (GSH) e N-acetilcisteína (NAC) (SIGMA FINE CHEMICALS, St. Louis, MO, USA). Utilizou-se também hemina (Heme-Cl) e porfirinas (protoporfirina IX, mesoporfirina IX, Femesoporfirina IX, Sn-protoporfirina IX, Zn-protoporfirina IX) (PORPHYRIN PRODUCTS, Logan, UT), Brain heart infusion (BHI) (DIFCO, Sparks, MD, USA), soro fetal bovino (SFB) (CULTLAB, São Paulo, Brasil) e PANÓTICO RÁPIDO LB (LABORCLIN). A sonda diidroetinida (DHE), o reagente Amplex Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine), 5-(e-6)-clorometil-2',7' diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester (CM-H₂DCFDA) e o reagente Trizol[®] foram obtidos na INVITROGEN CORPORATION, Califórnia, USA. Utilizou-se o High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems California, USA). Também foram usados o QuantiFast SYBR Green PCR Kit e o RNeasy mini kit (Qiagen). A β-hematina (hemozoína) utilizada foi gentilmente cedida pelo Dr Marcus Oliveira, IBqM-UFRJ. 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. Culturas de epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas a 28°C durante sete dias em meio BHI suplementado com heme 30 μM e 10% (v/v) de SFB. As culturas foram colocadas em garrafas de 25 cm², com uma densidade de 7-8 x 10⁷ células/mL em 5 mL de meio. Posteriormente, o crescimento foi monitorado pela contagem em câmara de Neubauer para utilização nos experimentos.

2.3 Identificação de espécies reativas de oxigênio

Para a identificação de espécies reativas de oxigênio foram utilizadas as sondas fluorescentes diidroetidina (DHE), Amplex red e CMH₂DCFDA. A DHE é uma sonda

seletiva para a detecção de superóxido (Zhao e cols., 2003; Zhao e cols., 2005) capaz de reagir com EROs levando a formação do produto fluorescente vermelho (λ_{em} 580 nm).

Para a detecção de peróxido de hidrogênio utilizamos o reagente Amplex red, que na presença de peroxidase reage com o H_2O_2 com uma estequiometria de 1:1, gerando o produto fluorescente resorufina (Zhou e cols., 1997). O CMH₂DCFDA é uma sonda permeável à célula, indicadora de espécies reativas de oxigênio e se baseia em fluoresceínas reduzidas, não fluorescentes, que adquirem fluorescência após a remoção dos grupos acetato por esterases intracelulares. O DCFH₂ é então oxidado por EROs bem como por outros radicais oxidantes ($\bullet NO$ e $CO_3^{\bullet -}$), gerando o produto fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF) (Royall e cols., 1993; Wrona e cols., 2005).

2.3.1 Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para a quantificação da liberação de H_2O_2 , formas epimastigotas de *T. cruzi* (1×10^7 parasitas/mL) obtidos no 7º dia de crescimento, em meio BHI suplementado com 10% (v/v) SFB e 30 μM heme foram centrifugados a 3500 rpm por 5 min, lavados com PBS (100 mM tampão fosfato de sódio, 150 mM NaCl, pH 7,4) e incubados em PBS contendo 1,25 μM de Amplex Red e 1 U/mL *horseradish peroxidase* e concentrações crescentes de heme por 30 min. Posteriormente os parasitos foram separados por centrifugação a 3500 rpm por 5 min e então os sobrenadantes foram analisados em um espectrofluorímetro Cary Eclipse, utilizando o comprimento de onda de excitação de 530 nm e 590 nm como comprimento de onda de emissão. Os dados foram calibrados através de uma curva padrão preparada na hora de cada experimento com concentrações crescentes (5 a 160 pmoles H_2O_2) de H_2O_2 .

2.3.2 Citometria de fluxo

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (1×10^7 parasitas/mL) obtidas no 7º dia de crescimento, em meio BHI suplementado com 10% (v/v) SFB e 30 μM heme, foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 min, lavadas com PBS pH 7,4, expostas a 5 μM DHE, e desafiadas com concentrações crescentes de heme por 30 min a 28°C. Para avaliação da formação de EROs mitocondrial, as formas epimastigotas foram expostas a 5 μM DHE e desafiadas com 30 μM heme, 1 μM FCCP ou 2 $\mu g/ mL$ AA por 30 min a 28°C. Alternativamente, os parasitos foram incubados com 2 μM CM-H₂DCFDA por 30 min,

recebendo nos 15 min finais, 30 μ M heme ou 30 μ M das porfirinas (protoporfirina IX, mesoporfirina IX, Fe-mesoporfirina IX, Sn-protoporfirina IX ou Zn-protoporfirina IX). A produção de EROs foi analisada utilizando um citômetro de fluxo FACScalibur (BD Biosciences) e os dados de fluorescência foram igualmente processados pelo programa WinMDI 2.8.

2.3.3 Microscopia de fluorescência confocal

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (1×10^7 parasitas/mL) obtidas no 7º dia de crescimento, em meio BHI suplementado com 10% (v/v) SFB e 30 μ M heme foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 min, lavadas com PBS, expostas a 5 μ M DHE, e desafiadas com 30 μ M heme, 1 μ M FCCP ou 2 μ g/ mL AA por 30 min a 28°C. Posteriormente a produção de superóxido mitocondrial foi analisada utilizando um microscópio confocal de varredura a laser LSM 510 META (Zeiss).

2.4 **Microscopia eletrônica de transmissão**

Formas epimastigotas de *T. cruzi* (5×10^7 células) foram obtidas no 7º dia de crescimento, em meio BHI suplementado com 10% (v/v) SFB e 30 μ M heme foram centrifugadas a 3500 rpm por 5 min e incubadas com 100 μ M heme por diferente períodos de tempo a 28°C. Para a microscopia eletrônica de transmissão os parasitos foram lavados três vezes em PBS e fixados com 2,5% (v/v) glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio pH 7,2 a temperatura ambiente por 40 minutos e pós fixados com uma solução 1% (p/v) OsO₄, 0,8% (p/v) ferricianeto de potássio e 2,5 mM CaCl₂ no mesmo tampão por 20 minutos. Os parasitos foram desidratados em uma série ascendente de acetona (30% a 100%) e então embebidos em resina Poly/Bed. Após a secagem da resina os cortes ultrafinos de 1 μ m foram corados com 0,5% acetato de uranila e 3% chumbo e examinados em um microscópio Zeiss EM10C.

2.5 **Proliferação *in vitro***

Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2,5 \times 10^5$ parasitas/mL), no 7º dia de crescimento em meio BHI, suplementado com 10% (v/v) SFB e 30 μ M heme, foram transferidas para BHI contendo 10% (v/v) SFB e: (a) 30 μ M β -hematina (hemozoína) na

ausência de 30 μ M heme; (b) 0,2 mM ou 1 mM urato na ausência ou na presença de 30 μ M heme; (c) diferentes concentrações de GSH; e (d) diferentes concentrações de NAC. Também foram testados os efeitos: (e) de 1 μ M FCCP; (f) de 2 μ g/ mL antimicina A e de (g) 20 μ M H₂O₂. Avaliamos o efeito dos análogos de heme: (h) protoporfirina IX (PPIX); (i) mesoporfirina IX (MPIX); (j) Fe-mesoporfirina IX (Fe-MPIX); (k) Sn-protoporfirina IX (Sn-PPIX); ou (l) Zn-protoporfirina IX (Zn-PPIX), na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os parasitas foram cultivados por até 12 dias e o crescimento monitorado pela contagem destes em câmara de Neubauer.

2.6 Metaciclologênese *in vitro*

Para a indução da metaciclologênese *in vitro* foi utilizado o procedimento descrito por Contreras e colaboradores (1988). Primeiramente, formas epimastigotas de *T. cruzi* (5×10^7 parasitas/mL), no 7º dia de crescimento em meio BHI, suplementado com 10% (v/v) SFB e 30 μ M heme, foram coletadas por centrifugação a 5000 rpm por 5 minutos e suspensas a uma concentração de 5×10^8 parasitas/mL em meio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM tampão fosfato de sódio, pH 6,0) na ausência ou na presença de 30 μ M heme, 30 μ M hemozoína, 1 mM urato, 30 μ M. Após 2 h a 37°C, os parasitas foram diluídos 100 vezes em meio TAU3AAG (meio TAU suplementado com 50 mM ácido glutâmico, 10 mM L-prolina, 2 mM ácido aspártico e 10 mM glicose) e desafiados a diferentes tratamentos, acondicionados em garrafas de cultura e mantidos a 28°C até a hora da quantificação do experimento.

2.7 Determinação de formas evolutivas de *T. cruzi*

Nos experimentos *in vitro*, as diferentes formas evolutivas de *T. cruzi* (epimastigota, forma intermediária ou tripomastigota) foram diferenciadas pela coloração dos parasitos com corante PANÓTICO RÁPIDO LB segundo as instruções do fabricante. Posteriormente foi analisada a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo do parasito por microscopia de luz. Em epimastigotas, o cinetoplasto é localizado na posição anterior ao núcleo e apresenta forma discóide, já em tripomastigotas metacíclicos, o cinetoplasto fica localizado de maneira posterior ao núcleo sendo mais disperso e esférico. Nos experimentos *in vivo*, as formas evolutivas de *T. cruzi* foram diferenciadas de acordo com o tamanho celular e mobilidade.

2.8 Insetos

Para os experimentos *in vivo*, foram utilizados ninfas de 5º estágio de *Rhodnius prolixus* mantidas a 28°C e 80% de umidade, alimentadas com sangue de coelho a cada 30 dias na colônia da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Alternativamente para os experimentos, os insetos foram alimentados com sangue humano descomplementarizado utilizando alimentadores artificiais (Garcia *et al.*, 1975). Os insetos foram dissecados cinco ou onze dias após a alimentação e acondicionados em PBS para contagem diferencial ou em reagente Trizol[®] para extração de RNA total.

2.9 Infecção de *R. prolixus* com *T. cruzi*

Ninfas de 5º estágio foram alimentadas em alimentador artificial com sangue humano descomplementarizado, contendo 5×10^7 epimastigotas/mL, e (i) 30 µM NAC ou (ii) 1 mM urato e mantidas a 28°C. Após cinco ou 11 dias, diferentes porções do trato digestivo (anterior, posterior e reto) foram removidas e homogeneizadas em PBS pH 7,4 para posterior quantificação do número de parasitos em câmara de Neubauer e das formas evolutivas de acordo com a motilidade dos parasitos ou para quantificação molecular por PCR em tempo real.

2.10 Extração de RNA total

Os intestinos de cinco ninfas de 5º estágio foram dissecados em salina (150 mM NaCl) gelada e homogeneizados em 600 µL de Trizol[®] (Invitrogen Corporation, Califórnia USA). As amostras foram centrifugadas por 15 minutos a 12000 rpm, o sobrenadante foi retirado e passado para um novo tubo, incubados a temperatura ambiente por 5 minutos e 100 µL de clorofórmio foram acrescentados ao sobrenadante. Após mais 3 minutos em temperatura ambiente, as amostras foram novamente centrifugadas por 15 minutos a 12000 rpm, a fase aquosa (superior) foi retirada, 300 µL de isopropanol foram acrescentados à mesma e as amostras foram incubadas por mais 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os tubos foram centrifugados por 15 minutos a 12000 rpm e o sobrenadante foi então descartado. Aos precipitados obtidos, foram acrescentados entre 10-20 µL de água previamente tratada com 0,01% (v/v)

dietilpirocarbonato (DEPC). Posteriormente foi utilizado o *kit* de limpeza do RNA RNeasy mini kit (Qiagen) de acordo com as instruções do fabricante para remoção de contaminantes de DNA e proteínas.

2.11 Síntese da 1ª fita de cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA, foram utilizados 4 µg RNA (10 µL), acrescentando 2 µL de RT random primers 10X, 2 µL do tampão da enzima 10X, 0,8 µL de dNTP 100 mM, 1 µL da enzima RT, 1 µL de inibidor de RNase e 3,2 µL de água foi adicionada a cada tubo. As amostras foram incubadas a 25°C por 10 minutos, 37°C por 2 horas, e 70°C por 15 minutos conforme sugerido pelo fabricante do kit (High Capacity cDNA reverse transcription kit, Applied Biosystems). No final da reação as amostras foram guardadas no freezer (- 20°C).

2.12 Desenho dos oligonucleotídeos

Para a amplificação da carga parasitária específica para *T. cruzi* foi utilizado o par de oligonucleotídeos TCZ de 188 pb (senso: 5' cga gct ctt gcc cac acg ggt gct 3' e anti-senso: 5'cct cca agc agc gga tag ttc agg 3') baseado na sequência satélite de 195 pb contido no DNA do parasito. Este DNA representa cerca de 5% a 10% do genoma total do protozoário e é constituído de sequências repetitivas de 195 pb distribuídas em regiões não sintéticas com os genomas dos parasitos *Trypanosoma brucei* e *Leishmania major* (Martins *et al.*, 2008). O outro par de oligonucleotídeos selecionado foi o RpMIP (senso: 5'-ccagtggg-gacaatatgt-3' e anti-senso: 5'-ggtacaaaca-aattctacg-3'). A proteína RpMIP é um membro da família de “major intrinsic protein” com função de aquaporinas presente nos túbulos de Malpighi do inseto vetor *R. prolixus* (Echevarría *et al.*, 2001). Para o desenho dos oligonucleotídeos iniciadores foi utilizado o programa Primer 3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) (Rozen e Skaletsky, 2000).

2.13 Normalização da carga parasitária

Para normalizar a quantidade de tecido analisado em cada reação de PCR foi escolhido o gene RpMIP para corrigir as variações intra-amostra, recuperação de RNA.

A normalização com um padrão externo foi possível uma vez que as amplificações do gene quantificador de *T. cruzi* (TCZ) e do inseto vetor *R. prolixus* (RpMIP) ocorreram com eficiências semelhantes.

2.14 PCR em tempo real (qPCR)

As condições finais normais para as amplificações por PCR em tempo real (aparato, modelo Rotor-Gene Q, Quiagen, EUA) consistiram de cDNA diluído 40 vezes, 250 nM de cada par de oligonucleotídeos (TCZ ou RpMIP) e o QuantiFast SYBR Green PCR Kit (Qiagen), para um volume final de reação de 15 μ L. O protocolo de amplificação consistiu de uma fase de desnaturação a 94°C por 5 s, e 40 ciclos de amplificação a 95°C por 3 s, 65°C por 1 s. A emissão de fluorescência foi medida ao final de cada etapa de alongamento. Uma curva de *melting* foi realizada com medições contínuas da fluorescência entre 60°C e 95°C. Controles negativos de cada par de oligonucleotídeos consistiram da reação sem a adição de cDNA. Os valores obtidos foram utilizados para construção de gráficos utilizando o programa Prism 3.0.

2.15 Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste não paramétrico One-way ANOVA, sendo utilizado como teste posterior o teste de Tukey (Prism 3 Graphpad).

3 RESULTADOS

3.1 Efeito do heme e seus análogos sobre a proliferação e a formação de EROs de *T. cruzi*.

Dados anteriores do nosso grupo demonstraram que o heme, e não a hemoglobina e seus peptídeos derivados era capaz de estimular a proliferação de formas epimastigotas *in vitro* de maneira dose-dependente (Lara *et al.*, 2007). Portanto, para investigar o determinante estrutural da molécula de heme capaz de deflagrar a proliferação destes parasitos, desafiamos as células com várias porfirinas análogas ao heme. Foram avaliadas porfirinas que não apresentam um átomo de ferro central, como a protoporfirina IX (Figura 9A) e a mesoporfirina IX (Figura 9B); também foi testada a Fe-mesoporfirina IX (Figura 9C), que apresenta estrutura bastante similar a do heme, porém os dois grupos vinis estão substituídos por dois grupos etis, assim como ocorre na mesoporfirina IX. Outras porfirinas como Sn-protoporfirina IX (Figura 9D) e a Zn-protoporfirina IX (Figura 9E) também foram avaliadas. Foi possível observar de uma maneira geral que, de todos os análogos testados, apenas o heme foi capaz de aumentar a proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Ao contrário, o tratamento com mesoporfirina IX (MPIX), protoporfirina IX (PPIX), Fe-mesoporfirina IX (Fe-MPIX) e Zn-PPIX por 10 ou 12 dias diminuiu significativamente a proliferação destes parasitos ainda que em concentrações baixas como 3 μ M (Figura 9).

Para avaliar se as porfirinas análogas ao heme também seriam capazes de induzir a formação de espécies reativas nos parasitos, utilizamos a sonda fluorescente CMH₂-DCFDA. As formas epimastigotas foram incubadas por 30 minutos na presença de 30 μ M de heme, 30 μ M PPIX, 30 μ M MPIX ou 30 μ M Fe-MPIX e posteriormente avaliadas por citometria de fluxo (Figura 10). Apesar da semelhança estrutural com o heme, o desafio das formas epimastigotas com outras porfirinas não foi capaz de induzir a formação de EROs.

3.2 Efeito do H₂O₂ exógeno e na produção de EROs intracelulares e na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Uma vez que as porfirinas acima não induziram a geração de EROs e consequente crescimento dos parasitos, utilizamos uma molécula oxidante clássica (H₂O₂) a fim de testar o poder oxidante e sua modulação na proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi in vitro*.

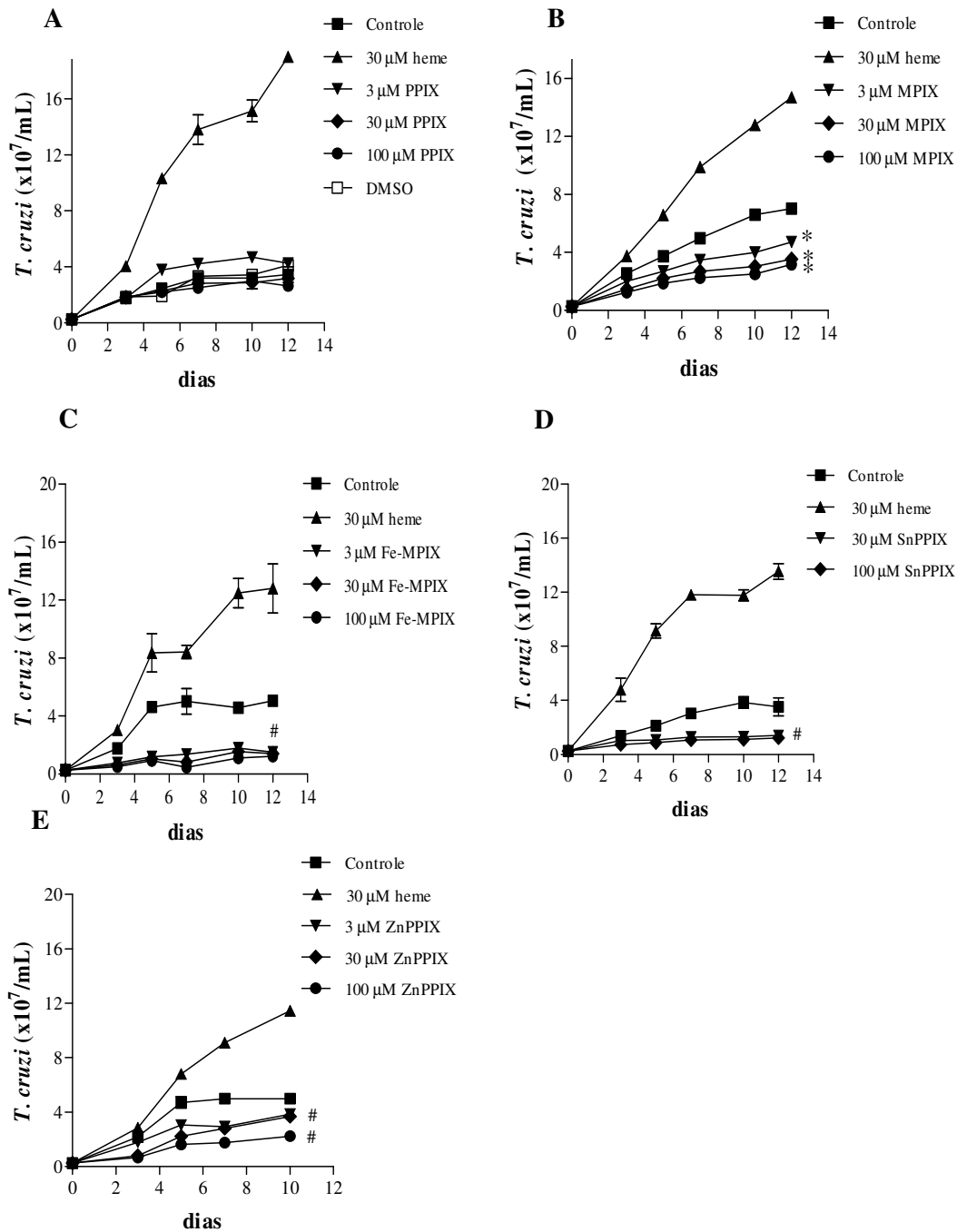


Figura 9 – Efeito de diferentes análogos de heme na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μ M heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em meio BHI suplementado com 10% SFB sem a adição de heme e expostas a diferentes concentrações de (A) Protoporfirina IX (PPIX), (B) Mesoporfirina IX (MPIX), (C) Fe-mesoporfirina IX (Fe-MPIX), (D) Sn-protoporfirina IX (SnPPIX) ou (E) Zn-protoporfirina IX (ZnPPIX), na ausência ou na presença de 30 μ M heme por 10 ou 12 dias. Os gráficos são representativos de três experimentos

independentes realizados em duplicatas. Os dados representam média \pm desvio padrão. Análise estatística dos 10^o ou 12^o dias de tratamento, * $p < 0,001$ e # $p < 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

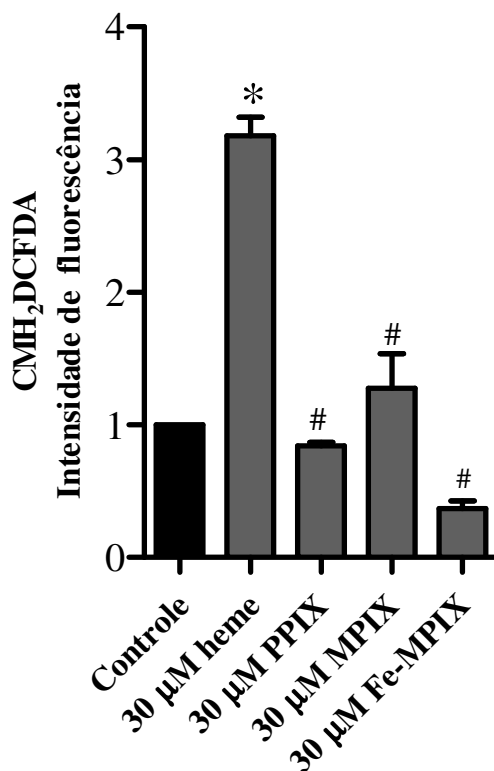


Figura 10 – Efeito de diferentes análogos de heme na formação de EROs em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μM heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em PBS e expostas a 2 μM de CMH₂DCFDA por 30 min, e 30 μM heme, 30 μM PPIX, 30 μM MPIX ou 30 μM Fe-MPIX nos 15 minutos finais de incubação. A formação de EROs foi monitorada por citometria de fluxo. O gráfico representa os valores de fluorescência relativa, calculados através da razão entre a mediana do grupo experimental e a mediana do grupo controle (sem adição de heme). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 2) * $p < 0,001$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,001$ em relação ao grupo incubado com heme, pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

De fato, observamos que a adição de 20 μM H_2O_2 exógeno foi capaz de aumentar tanto a produção de EROs (Figura 11A) quanto à proliferação de formas epimastigotas *in vitro* (Figura 11B).

3.3 A produção de EROs endógenos induzidos por heme em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Investigamos se o heme era capaz de induzir a produção de peróxido de hidrogênio endógeno. Para tal, adaptamos os parasitas a ausência de heme onde os mesmos foram mantidos apenas em BHI e 10% FSB por duas passagens. Posteriormente, as células foram lavadas em meio BHI suplementado com 10% SFB sem a adição de heme. Na Figura 12 observa-se um aumento significativo da produção de peróxido de hidrogênio após a adição de concentrações crescentes de heme recém-preparado na hora de cada experimento.

Utilizamos a sonda fluorescente diidroetidina (DHE) para a identificação de outra forma de EROs além do peróxido já identificado acima. Para isso, formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram expostas ao DHE e monitoradas por microscopia de fluorescência confocal e citometria de fluxo. Em todos estes experimentos foram realizados controles de autofluorescência, onde os parasitos eram incubados em meio de reação na ausência de DHE para excluir qualquer fluorescência inespecífica.

Como descrito anteriormente, os parasitos foram adaptados ao meio sem adição de heme apenas na presença de BHI e 10% FSB por duas passagens. A seguir, as formas epimastigotas de *T. cruzi* foram lavadas em meio BHI suplementado com 10% SFB sem a adição de heme. Posteriormente, os parasitos foram incubados com concentrações crescentes de heme por 30 min. Na Figura 13 é possível observar que o heme também foi capaz de aumentar o sinal fluorescente do DHE de maneira concentração dependente em formas epimastigotas de *T. cruzi*, demonstrando a formação de EROs intracelulares induzidos pela molécula de heme.

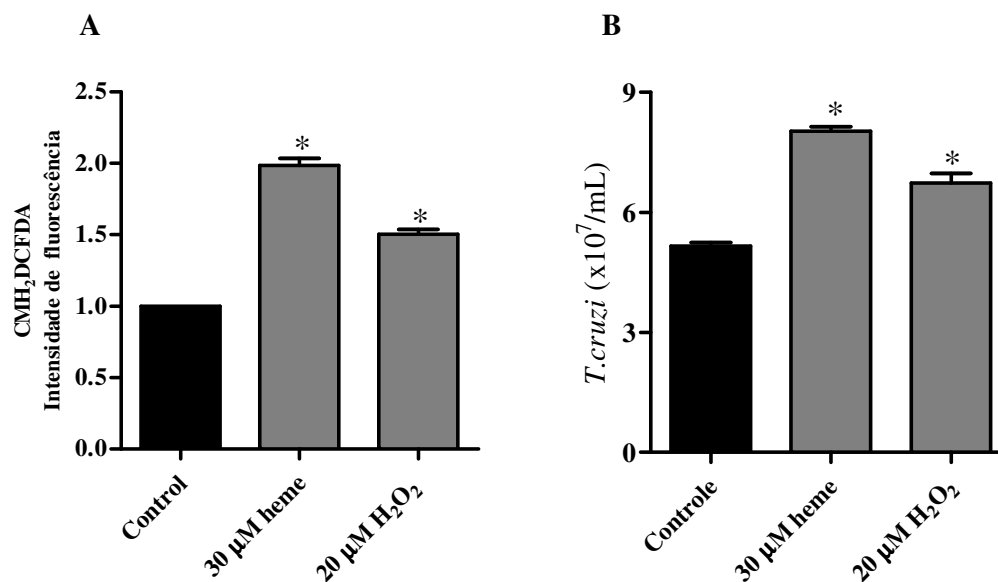


Figura 11 – Efeito do peróxido de hidrogênio (H₂O₂) exógeno na produção de EROs e na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB sem a adição de heme. (A) Estas células foram então lavadas e incubadas em PBS e expostas a 2 μM de CMH₂DCFDA, 30 μM heme ou 20 μM H₂O₂ por 30 min. A formação de EROs foi monitorada por citometria de fluxo. O gráfico representa os valores de fluorescência relativa, calculados através da razão entre a mediana do grupo experimental e a mediana do grupo controle (sem adição de heme). Os dados estão expressos como média ± desvio padrão (n= 3). * p< 0,05 em relação ao grupo controle e pelo teste One-way ANOVA (Tukey). Alternativamente, (B) os parasitos foram lavados e incubados em meio BHI fresco na ausência ou na presença de 30 μM heme ou 20 μM H₂O₂ por 5 dias. O número de parasitos foi quantificado com auxílio de câmara de Neubauer. Os dados representam média ± desvio padrão (n=4), * p<0,05 em relação ao grupo controle pelo One-way ANOVA (Tukey).

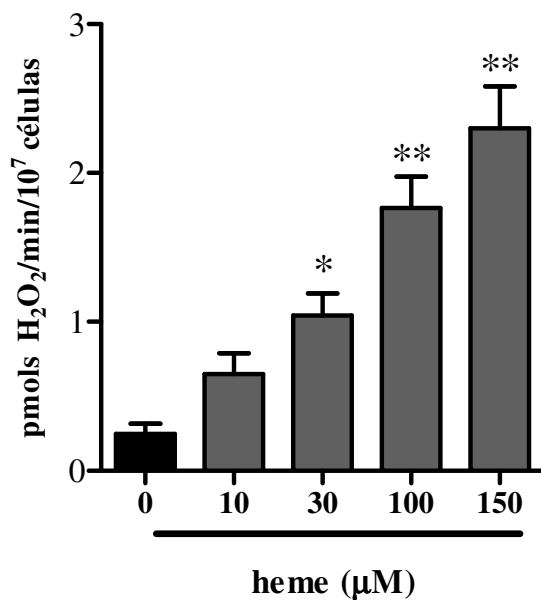


Figura 12 – Produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) endógeno induzida por heme. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB sem a adição de heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em PBS e expostas a 1,25 μM Amplex red, 1U/ mL *horseradish peroxidase* e concentrações crescentes de heme por 30 min. A produção de H_2O_2 foi medida em um espectrofluorímetro nos comprimentos de onda de excitação 563 nm e de emissão 587 nm. Os dados estão expressos como média \pm erro padrão ($n = 2$) de experimentos independentes realizados em duplicata, * $p < 0,05$ e ** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

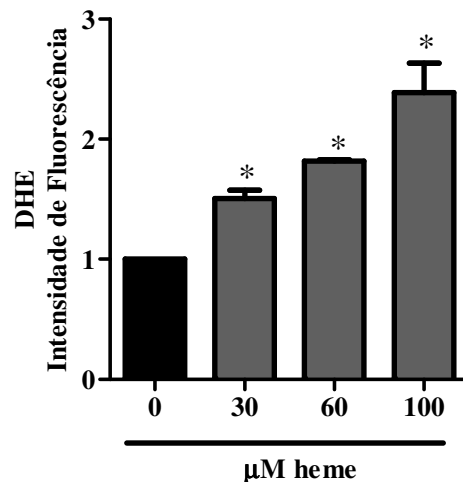


Figura 13 – Análise por citometria de fluxo da produção de EROs induzida por heme. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 µM heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em PBS e expostas a 5 µM de DHE red por 30 minutos. Posteriormente as células foram incubadas na ausência ou na presença de 30, 60 e 100 µM heme. A formação de EROs foi monitorada por citometria de fluxo. O gráfico mostra os valores de fluorescência relativa, calculados através da razão entre a mediana do grupo experimental e a mediana do grupo controle (sem adição de heme). Os dados estão expressos como média ± erro padrão (n= 3) de experimentos independentes realizados em triplicata, * p< 0,001 em relação ao grupo controle pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

3.4 A produção de superóxido mitocondrial induzida por heme em formas epimastigotas de *T. cruzi*.

Através de microscopia confocal a laser (Figura 14) podemos observar que a fluorescência vermelha do DHE e a fluorescência verde o Mitotracker green se colocalizam majoritariamente no cinetoplasto, mitocôndria única dos tripanossomatídeos (Figuras 14B, 14C e 14E). Além disso, a adição do desacoplador FCCP abole a produção de superóxido (Figura 14F) quando comparado ao parasito tratado com heme (Figuras 14B), e que alternativamente, na presença de antimicina A a produção de superóxido aumenta grandemente na ausência (Figura 14C) e mais ainda na presença de heme (Figura 14E), demonstrando um efeito cumulativo entre essas duas moléculas. Na Figura 15 analisamos quantitativamente, por citometria de fluxo, o protocolo utilizado na Figura 14 e foi possível confirmar na Figura 15A que a adição de FCCP previne a formação de EROs induzida por heme. Mais ainda, as EROs mitocondriais parecerem ser cruciais para a proliferação de epimastigotas já que o FCCP também diminuiu a proliferação dos parasitos na ausência ou presença de heme quando comparado com o grupo controle (Figura 16).

Na Figura 15B pode-se observar que a adição de antimicina A, por si só, já é capaz de promover a liberação de grandes quantidades de superóxido pelo complexo III da CTE. Esse efeito já era esperado, sendo extensivamente relatado na literatura (Boveris e Cadenas, 1975; Kwong e Sohal, 1998; Muller *et al.*, 2004).

Contudo, o aumento exacerbado da produção de superóxido, de cerca de quatro vezes mais que o controle, denota um efeito cumulativo entre heme e AA, com posterior drástica diminuição da proliferação de epimastigotas *in vitro* (Figura 16).

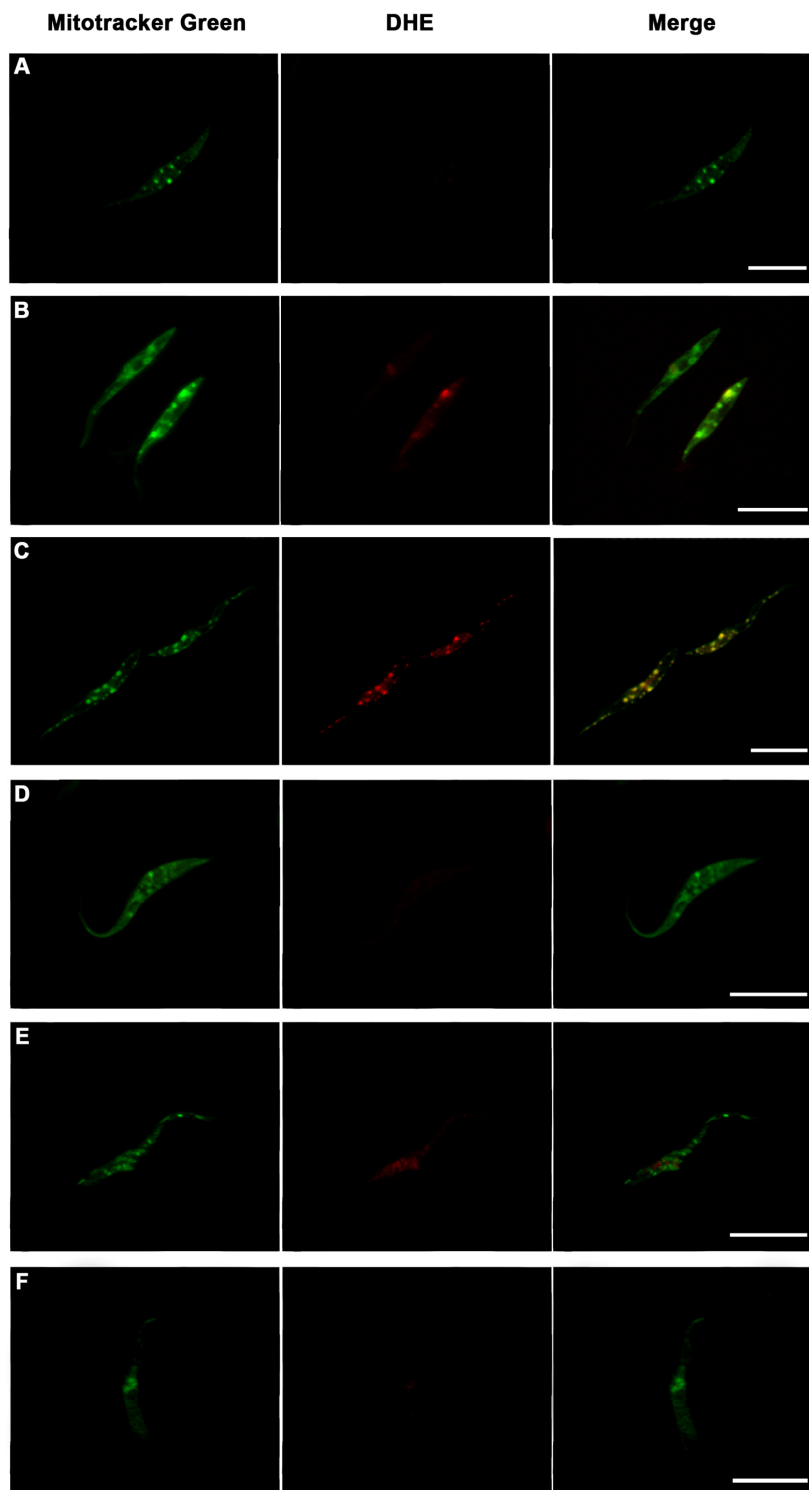


Figura 14 – Microscopia confocal a laser do efeito da AA e do FCCP sobre produção de superóxido mitocondrial induzida por heme. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB sem a adição de heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em PBS e expostas a 20 nM Mitotracker green e 5 μ M DHE e em seguida as células foram desafiadas na ausência (A), ou na presença de (B) 30 μ M heme, (C) 2 μ g/mL AA, (D) 1 μ M FCCP, (E) AA + heme ou (F) FCCP + heme por 30 minutos. A formação de EROs foi monitorada por microscopia confocal a laser. As imagens são representativas de três experimentos independentes. Barra = 20 μ m.

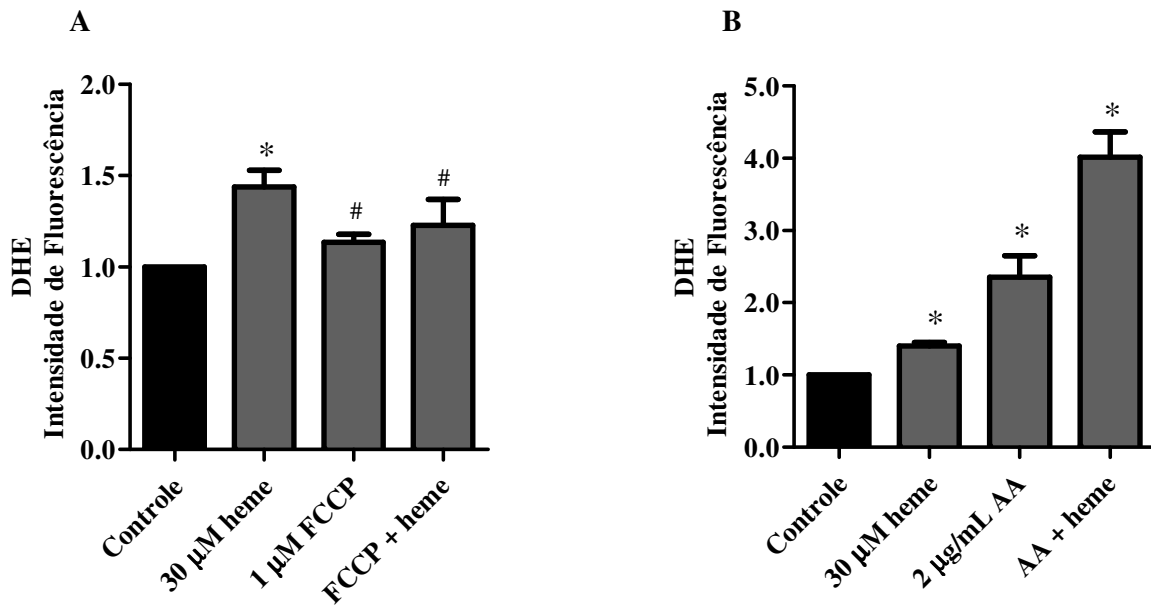


Figura 15 - Análise por citometria de fluxo do efeito do FCCP e da AA sobre a produção de superóxido mitocondrial induzida por heme. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μ M heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em PBS e expostas a 5 μ M de DHE por 30 min. Posteriormente as células foram incubadas na ausência ou na presença de 30 μ M heme, 1 μ M FCCP (**A**) ou 2 μ g/mL AA (**B**). A formação de $O_2^{\cdot -}$ foi monitorada por citometria de fluxo. As barras representam os valores de fluorescência relativa, calculados através da razão entre a mediana do grupo experimental e a mediana do grupo controle (sem adição de heme). Os dados estão expressos como média \pm desvio padrão (n= 5) * p< 0,05 e # p> 0,05 em relação ao grupo controle pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

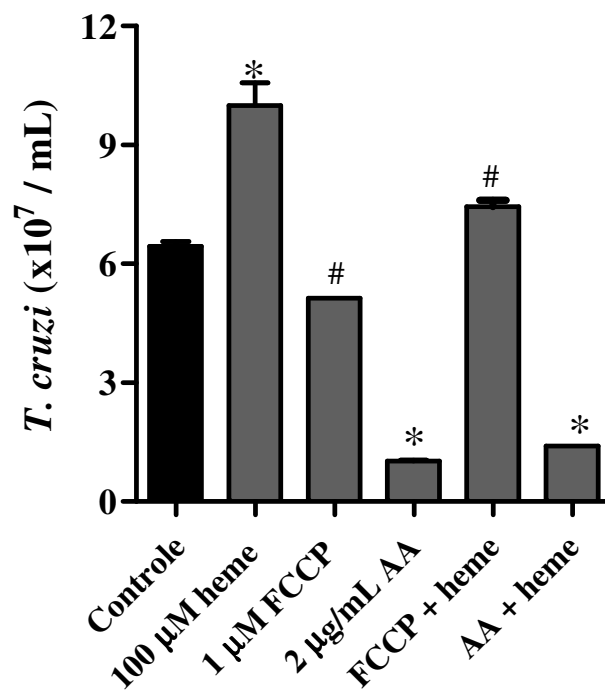


Figura 16- Efeito de inibidores da CTE na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μM heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em meio BHI fresco suplementado com 10% SFB na ausência ou na presença de 100 μM heme, 1 μM FCCP ou 2 μg/mL antimicina A por 5 dias. O número de parasitos foi quantificado com auxílio de câmara de Neubauer. Os dados representam média ± desvio padrão (n=4), * p<0,001 e # p> 0,05 em relação ao grupo controle pelo One-way ANOVA (Tukey).

3.5 O heme e a ultraestrutura celular do *T. cruzi*.

Devido as suas características anfífilas, o heme também é capaz de se associar às membranas lipídicas levando a permeabilização e ruptura celular, marcadamente um mecanismo redox-independente (Schmitt *et al.*, 1993).

Por essa razão, na Figura 17 analisamos o efeito de uma alta concentração de heme (100 μ M) na ultraestrutura de epimastigotas. Utilizando microscopia eletrônica de transmissão (MET), não foi observada nenhuma alteração na morfologia das membranas e organelas do parasito. Também não foi notada perda da organização mitocondrial como o seu inchaço ou o aparecimento de estruturas membranares concêntricas dentro da organela, características marcantes de estresse oxidativo.

3.6 O papel de moléculas de *status* redox antagônicos frente a proliferação *in vitro* de formas epimastigotas do *T. cruzi*.

Além do heme, outras moléculas e fatores podem influenciar a biologia do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado. Neste sentido, nos questionamos qual seria o efeito de moléculas abundantes no inseto vetor de caráter redox antagônico, como o heme, a β -hematina e o urato, além de outros antioxidantes importantes como o GSH e o NAC frente à proliferação e diferenciação *in vitro* do *T. cruzi*.

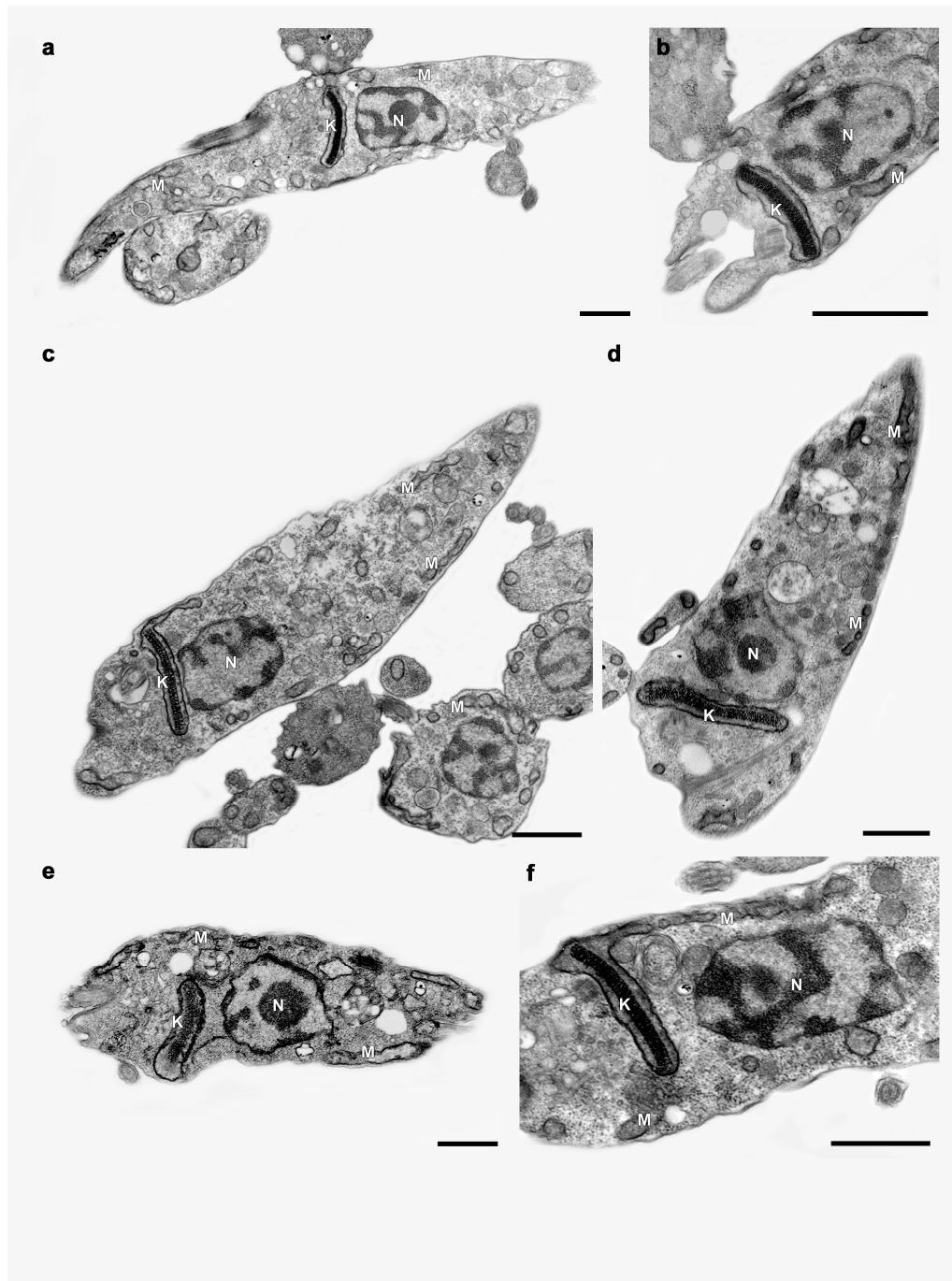


Figura 17 – Efeito do heme sobre a ultraestrutura de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μM heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em meio BHI + 10% SFB foram incubados na ausência (a) e (b) ou na presença de 100 μM de heme por: (c) 15 minutos; (d) 30 minutos; (e) e (f) 60 minutos. A barra representa 1 μm . Os parasitos foram então processados para microscopia eletrônica de transmissão como detalhado em Material e Métodos. As formas epimastigotas controle apresentam morfologia normal com mitocôndria (M), núcleo (N) e cinetoplasto (K) típicos. A figura é representativa de três experimentos independentes.

Testamos o efeito da hemozoína (β -hematina) na proliferação de formas epimastigotas *in vitro*. Na Figura 18, ao compararmos a proliferação promovida por β -hematina ao efeito do heme, ambas na concentração 30 μ M, em formas epimastigotas de *T. cruzi*, não foi observado o mesmo aumento da proliferação. Neste caso, o crescimento induzido pela hemozoína foi estatisticamente semelhante ao controle sem heme.

Dados da literatura sugerem que o urato é um antioxidante importante em insetos (Graça-Souza *et al.*, 1997). Analisamos então, o efeito do urato na proliferação *in vitro* de epimastigotas (Figura 19). Após dez dias de cultura observamos que o urato, em duas concentrações distintas (0,2 mM e 1 mM), diminui a multiplicação de epimastigotas quando comparado com o efeito proliferativo do heme. Por outro lado, esse efeito pode ser parcialmente revertido na presença de 30 μ M heme, sugerindo que haja competição entre estas moléculas fisiológicas de *status* redox antagônicos.

Testamos então, o efeito do GSH na proliferação de epimastigotas. Na Figura 20, observamos ao longo de 12 dias, o efeito de duas concentrações (30 μ M e 1 mM) de GSH na ausência ou na presença de heme, e foi possível observar uma diminuição da proliferação de epimastigotas quando comparado com os parasitos incubados com heme. Além disso, esse efeito pode ser parcialmente revertido na presença de 30 μ M heme, corroborando a ideia de competição entre estas moléculas fisiológicas de *status* redox antagônicos.

Avaliamos então, o efeito de concentrações crescentes do N-acetilcisteína (NAC) frente à proliferação de formas epimastigotas (Figura 21). Após 12 dias de cultura observamos que o NAC em duas concentrações distintas (30 μ M e 1 mM), diminui a multiplicação de epimastigotas quando comparado ao grupo incubado com heme. Mais uma vez, esse efeito pode ser parcialmente revertido na presença de 30 μ M heme.

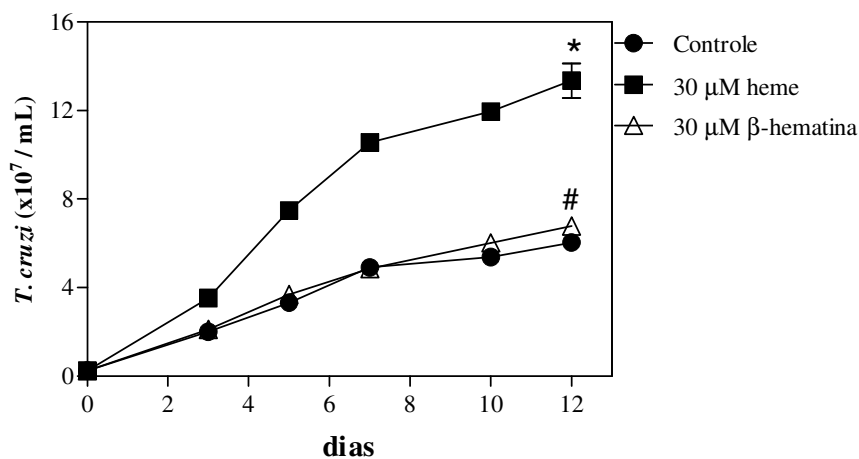


Figura 18 – Efeito da β-hematina na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μM heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em meio BHI + 10% SFB na ausência ou na presença de 30 μM heme ou 30 μM β-hematina por 12 dias. O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os dados representam média ± desvio padrão. Análise estatística do 12º dia de tratamento, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com heme pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

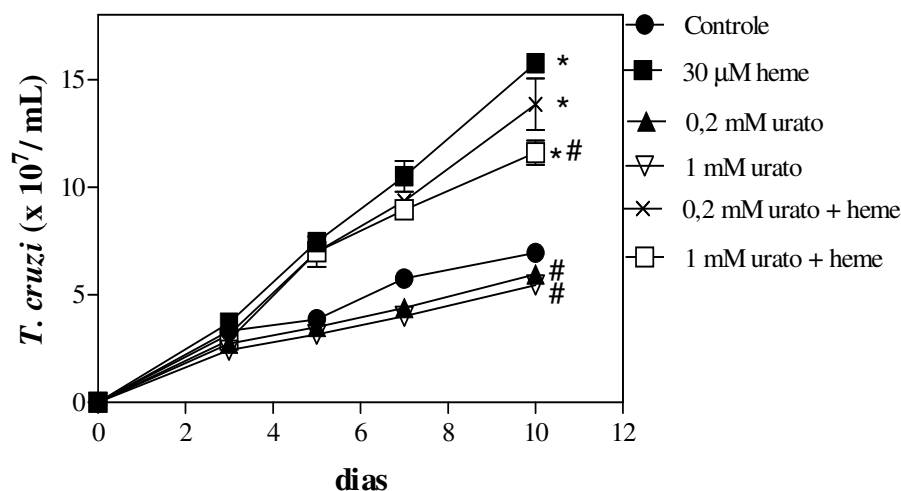


Figura 19 – Efeito de diferentes concentrações de urato na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μM heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em meio BHI + 10% SFB na presença de 0,2 mM ou 1 mM urato, na ausência ou na presença de 30 μM heme por 10 dias. O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os dados representam média ± desvio padrão. Análise estatística do 10º dia de tratamento, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com heme pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

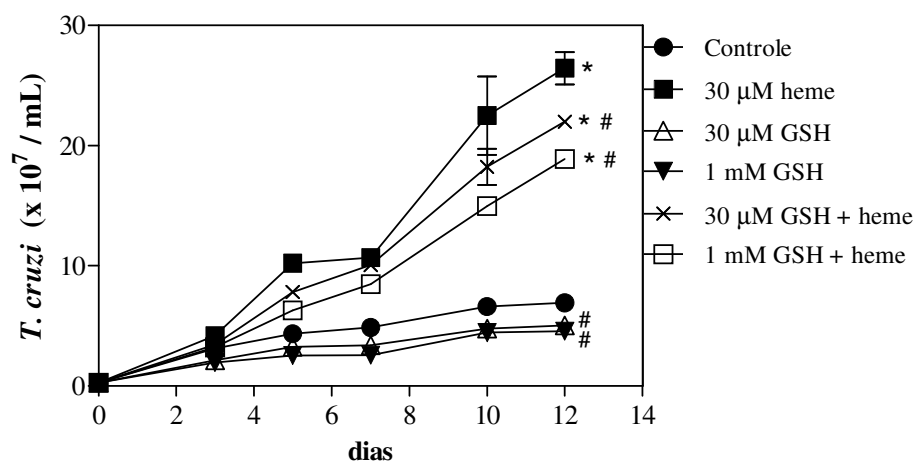


Figura 20 – Efeito de concentrações crescentes de glutatona reduzida (GSH) na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μM heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em meio BHI + 10% SFB na presença de 30 μM ou 1 mM glutatona reduzida (GSH), na ausência ou na presença de 30 μM heme por 12 dias. O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os dados representam média ± desvio padrão. Análise estatística do 12º dia de tratamento, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com heme pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

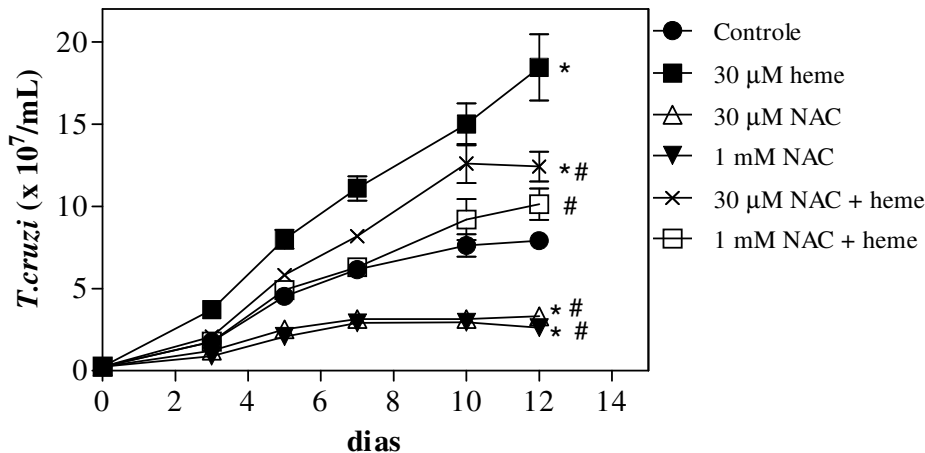


Figura 21 – Efeito de concentrações crescentes de N-acetilcisteína (NAC) na proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μ M heme. Estas células foram então lavadas e incubadas em meio BHI + 10% SFB na presença de 30 μ M ou 1 mM de N-acetilcisteína (NAC), na ausência ou na presença de 30 μ M heme por 12 dias. O gráfico é representativo de três experimentos independentes realizados em duplicatas. Os dados representam média \pm desvio padrão. Análise estatística do 12º dia de tratamento, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle e # $p < 0,05$ em relação ao grupo tratado com heme pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

3.7 O papel de moléculas de *status redox* antagonísticos na metaciclógênese *in vitro* do *T. cruzi*.

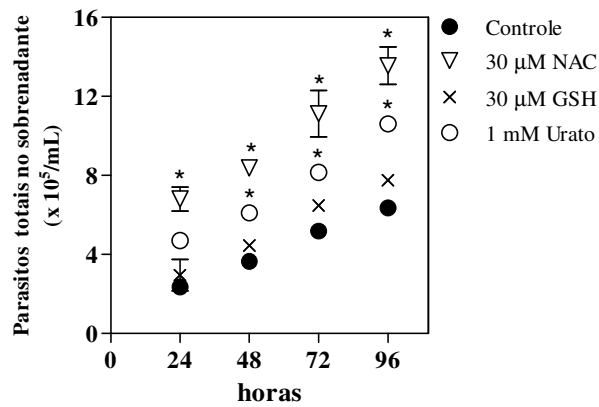
O processo de metaciclógênese é um bom modelo para o estudo da diferenciação do *T. cruzi*, uma vez que este processo pode, em condições apropriadas, ser mimetizado *in vitro*, tornando possível a obtenção de um grande número de parasitos em cada estágio da diferenciação (Bonaldo *et al.*, 1988). O heme, o urato e a β -hematina são moléculas fisiologicamente abundantes no barbeiro, contudo, apresentam *status redox* antagonísticos e localizações distintas. Ao contrário do heme, o urato (Figura 19) diminuiu drasticamente a proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* enquanto a β -hematina (Figura 18) não influenciou a proliferação dos parasitos. Durante a metaciclógênese *in vivo*, os parasitos se aderem às membranas perimicrovilares das células intestinais do intestino médio do inseto. Após a adesão à cutícula retal, as formas epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos e soltam para a luz do reto do triatomíneo (Kollien e Schaub, 2000). Este evento pode ser mimetizado

in vitro utilizando garrafas de cultura onde a adesão ocorre (Contreras *et al.*, 1988). Para melhor entender o papel de moléculas envolvidas nos processos fisiológicos do vetor na diferenciação do *T. cruzi* (Figura 22), testamos o efeito de (i) 30 μ M heme, (ii) 30 μ M β -hematina, (iii) 1 mM urato, além de importantes antioxidantes como (iv) 30 μ M GSH ou (v) 30 μ M NAC na metacicloênese *in vitro*. Analisamos o número total de parasitos no sobrenadante de cultura em 24, 48, 72 e 96 horas.

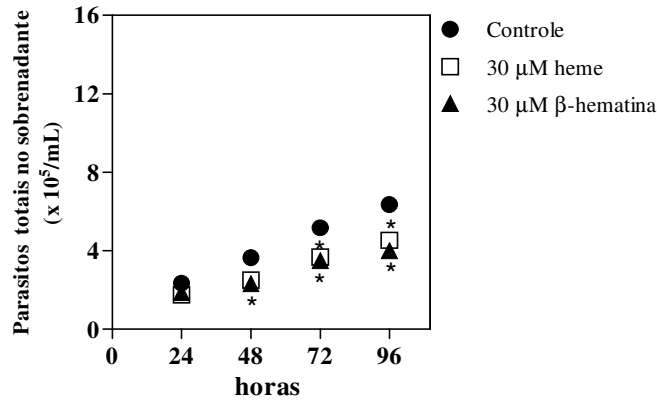
Na Figura 22A podemos observar uma maior densidade de parasitos totais/mL quando a metacicloênese foi estimulada na presença de 1 mM urato ou 30 μ M NAC em todos os tempos testados. Também foi possível notar (Figura 22B) que a presença de 30 μ M heme ou 30 μ M β -hematina em um meio artificial (TAU3AAG), propício para a diferenciação, levou à diminuição da concentração de parasitos totais/mL em todos os tempos analisados. Na Figura 22C construímos um gráfico ilustrativo da 96^o hora após a indução da metacicloênese. Os antioxidantes NAC, GSH e urato produziram um aumento de 113,4%, 22% e 66,9%, respectivamente, de parasitos/mL no sobrenadante. Em contrapartida, o heme e a β -hematina levaram a uma diminuição de 28,75% e 37% na porcentagem de células totais no sobrenadante da metacicloênese.

Através da coloração pelo reagente de Panótico podemos notar na Figura 23A que já após 24 h em meio TAU3AAG, os parasitos incubados com de 1 mM urato, 30 μ M GSH ou 30 μ M NAC apresentaram aumento na porcentagem de tripomastigotas. Mais ainda, estes mesmos tratamentos diminuíram a porcentagem de formas epimastigotas (Figura 23B) quando comparados com o grupo controle. Além disso, a indução da metacicloênese na presença 30 μ M heme ou 30 μ M β -hematina mostrou uma marcada redução inicial do percentual tripomastigotas (Figura 23A) e um enriquecimento na porcentagem de epimastigotas quando comparado com o controle não tratado (Figura 23B).

A



B



C

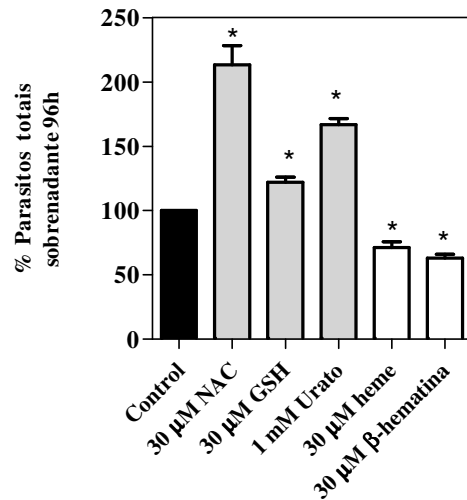


Figura 22 – Número total de parasitos no sobrenadante ao longo da metaciclo-gênese *in vitro* frente a moléculas de diferentes status redox. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μM heme. Estas células foram então lavadas em meio TAU e incubadas em meio propício para metaciclo-gênese (Material e Métodos) e tratados com: (A) 30 μM NAC, 30 μM GSH ou 1 mM urato ou (B) 30 μM heme, 30 μM β-hematina. Os sobrenadantes de cultura foram coletados após de 24 a 96 horas e o número total de parasitos determinado por quantificação em câmara de Neubauer. (C) Porcentagem de parasitos totais no sobrenadante após 96 h de tratamento. Os dados representam média ± erro padrão de três experimentos independentes. Análise estatística, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

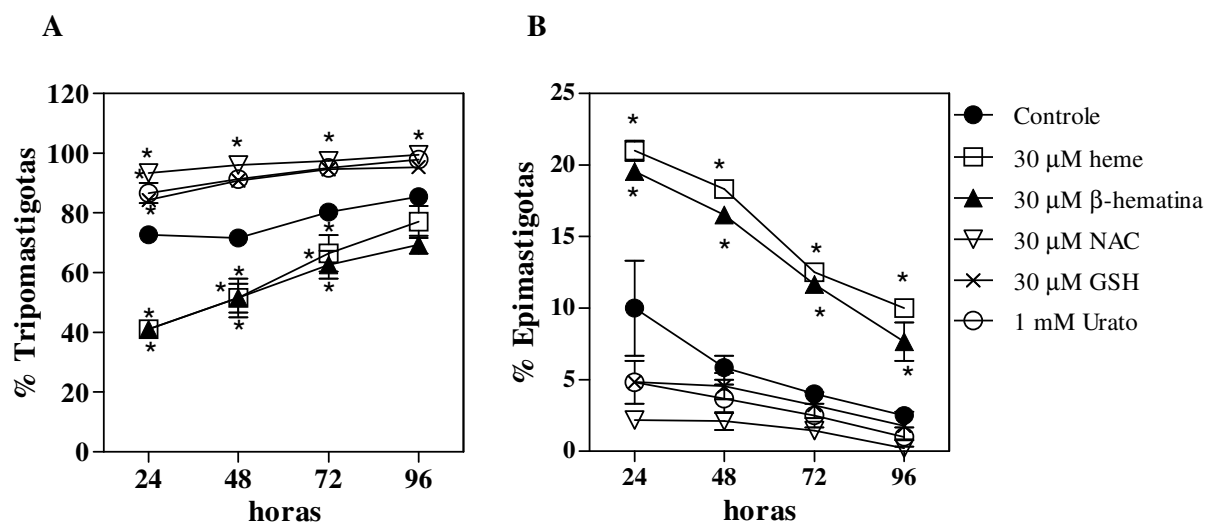


Figura 23 – Percentual de tripomastigotas e epimastigotas: a influência de moléculas de diferentes status redox ao longo da metaciclologênese *in vitro*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas por sete dias em meio BHI suplementado com 10% SFB e 30 μ M heme. Estas células foram então lavadas em meio TAU e incubadas em meio propício para metaciclologênese (Material e Métodos) e tratados com: 30 μ M heme, 30 μ M β -hematina, 30 μ M NAC, 30 μ M GSH ou 1 mM urato. Os sobrenadantes de cultura foram coletados em 24, 48, 72 e 96 horas e as formas evolutivas de *T. cruzi* determinado por microscopia de luz de acordo com a posição do cinetoplasto (Material e Métodos). **(A)** Os dados representam média \pm erro padrão do percentual de tripomastigotas de cinco experimentos independentes. **(B)** Os dados representam média \pm erro padrão do percentual de epimastigotas de três experimentos independentes. Análise estatística, * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

3.8 O papel de moléculas de *status* redox antagônicos na interação *in vivo* entre o *R. prolixus* e o *T. cruzi*.

Com o objetivo de quantificar a presença de *T. cruzi* em diferentes porções do trato digestivo do seu hospedeiro invertebrado, o barbeiro, foi desenhado um par de oligonucleotídeos iniciadores senso e anti-senso denominado (TCZ) capaz de amplificar uma sequência de 188 pb baseada em sequências repetitivas de 195 pb (Martins *et al.*, 2008). O outro par de oligonucleotídeos selecionado foi o RpMIP. A proteína RpMIP é um membro da família de “major intrinsic protein” com função de aquaporinas presente nos túbulos de Malpighi do inseto vetor *R. prolixus* (Echevarría *et al.*, 2001).

A Figura 24 mostra o PCR em tempo real realizado com cDNAs obtidos a partir das diferentes porções do trato digestivo do *R. prolixus* após cinco dias da infecção com *T. cruzi*. Podemos observar que a TCZ é expressa nas três porções testadas do inseto. Avaliamos se os efeitos antiproliferativo e pró-diferenciação dos antioxidantes NAC e urato *in vitro* também poderiam ser estudados *in vivo*. Observamos na Figura 24 que na presença dos antioxidantes houve aumento da expressão da TCZ nas três porções estudadas. A porção posterior (Figura 24B) e o reto (Figura 24C) apresentaram aumento significativo da expressão de TCZ, sendo este cerca de seis vezes maior que nos insetos infectados e alimentados apenas com sangue. A porção anterior (Figura 24A) também apresentou aumento da expressão relativa da TCZ nos tratamentos com NAC ou urato, porém este não foi estatisticamente significativo.

Utilizando a mesma abordagem metodológica, avaliamos também a expressão da TCZ onze dias após a infecção dos insetos e novamente nota-se aumento da expressão da TCZ nas três porções do intestino do inseto estudadas (Figura 25). A porção anterior do intestino dos insetos infectados (Figura 25A) na presença de 1 mM urato apresentou cerca de três vezes mais expressão de TCZ que os insetos infectados apenas com sangue. Da mesma maneira, na Figura 25B, observamos que a expressão da TCZ também foi significativa na porção posterior dos animais infectados com 1 mM urato. O reto (Figura 25) também apresentou aumento da expressão relativa da TCZ nos tratamentos com NAC ou urato, porém, estes não foram estatisticamente significativos.

Uma vez que a TCZ é expressa em todas as formas evolutivas do *T. cruzi* (Martins *et al.*, 2008), realizou-se contagens diferenciais para elucidar e distinguir as formas (epimastigotas ou tripomastigotas) responsáveis pelo aumento da expressão da TCZ nas porções do trato digestivo do inseto.

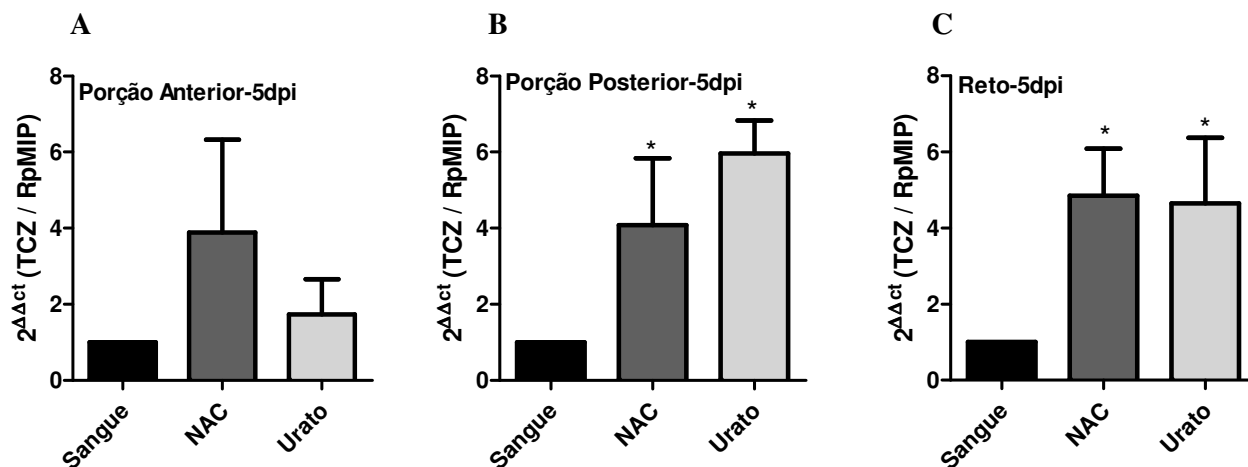


Figura 24 - Análise por PCR em tempo real das formas epimastigotas e tripomastigotas: a influência de moléculas de status redox distintos *in vivo*. Ninfas de *R. prolixus* no 5^o estágio foram alimentadas com 5×10^7 epimastigotas/mL em sangue humano descomplementarizado, sangue suplementado com 1 mM NAC ou sangue suplementado com 1 mM urato. Cinco dias após a infecção, o RNA total das porções do intestino (A) Porção Anterior, (B) Porção Posterior ou (C) Reto foi extraído em TRIzol® (invitrogen) posteriormente, foi sintetizada uma primeira fita de cDNA. O PCR em tempo real foi feito usando o par de oligonucleotídeos iniciadores da TCZ e o da RpmIP. A expressão da TCZ foi calculada usando a RpmIP como normalizador, conforme descrito no Material e Métodos. Os dados representam média \pm erro padrão de sete experimentos independentes. Análise estatística, * $p < 0,05$ em relação ao grupo alimentado com sangue (controle) pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

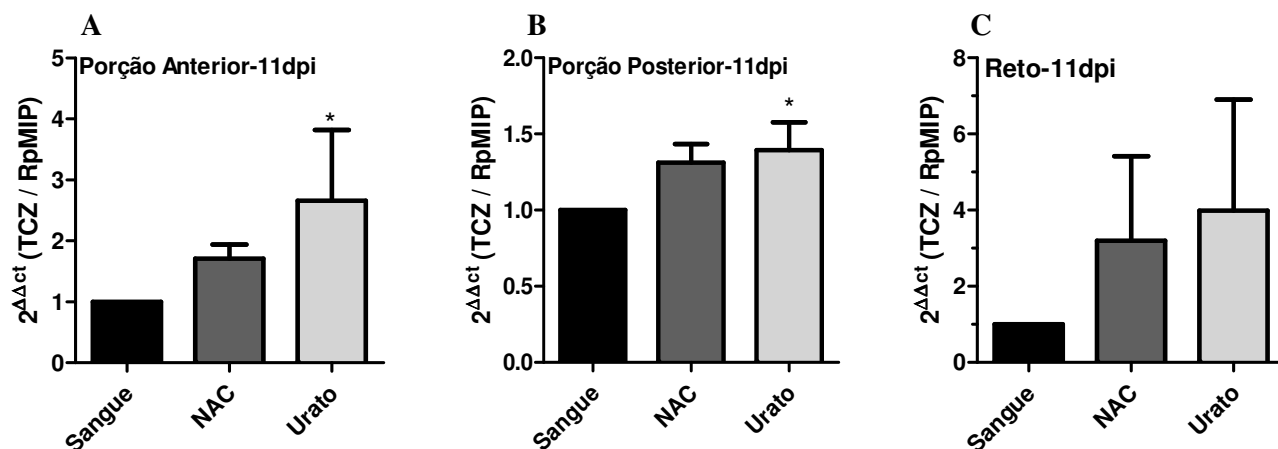


Figura 25 - Análise por PCR em tempo real das formas epimastigotas e tripomastigotas: a influência de moléculas de status redox distintos *in vivo*. Ninfas de *R. prolixus* no 5^o estágio foram alimentadas com 5×10^7 epimastigotas/mL em sangue humano descomplementarizado, sangue suplementado com 1 mM NAC ou sangue suplementado com 1 mM urato. Onze dias após a infecção, o RNA total das porções do intestino: (A) Porção anterior, (B) Porção posterior ou (C) Reto, foi extraído em TRIzol® (invitrogen) e utilizado, posteriormente, para a síntese da primeira fita de cDNA. O PCR em tempo real foi feito usando o par de oligonucleotídeos iniciadores da TCZ e o da RpmIP. A expressão da TCZ foi calculada usando a RpmIP como normalizador, conforme descrito no Material e Métodos. Os dados representam média \pm erro padrão de sete experimentos independentes. Análise estatística, * $p < 0,05$ em relação ao grupo alimentado com sangue (controle) pelo teste One-way ANOVA (Tukey).

Foi possível notar que, após cinco dias de infecção, nos insetos alimentados com antioxidantes, a concentração de formas tripomastigotas foi maior que a de epimastigotas em todos os tratamentos e compartimentos do intestino (Figura 26 A, B e C). Observamos também, um aumento significativo da concentração de formas tripomastigotas na porção anterior (78,1%) e no reto (82,4%) de insetos alimentados com 1 mM NAC (Figuras 26D e 26F). Nas Figuras 26E e 26F nota-se o tratamento com 1 mM urato enriqueceu o número de formas tripomastigotas na porção posterior (78,8%) e no reto (82,8%) dos insetos. Notavelmente, a alimentação dos insetos com 1 mM NAC acarretou na diminuição das formas epimastigotas na porção posterior (22,5%) do intestino do vetor (Figura 26B).

Ao analisar as porções do intestino do vetor onze dias após a infecção com *T. cruzi* (Figura 27) não foi possível observar nenhuma diferença estatística da concentração de formas epimastigotas ou tripomastigotas tratados com os antioxidantes quando comparados com insetos infectados exclusivamente com sangue sugerindo que 11 dias após a alimentação já houve uma adaptação dos parasitos a condição biológica a que foram submetidos.

O conjunto de resultados da Figura 18 a Figura 27 indica que, ao contrário da proliferação, a metaciclologênese parece ser favorecida em ambientes redutores.

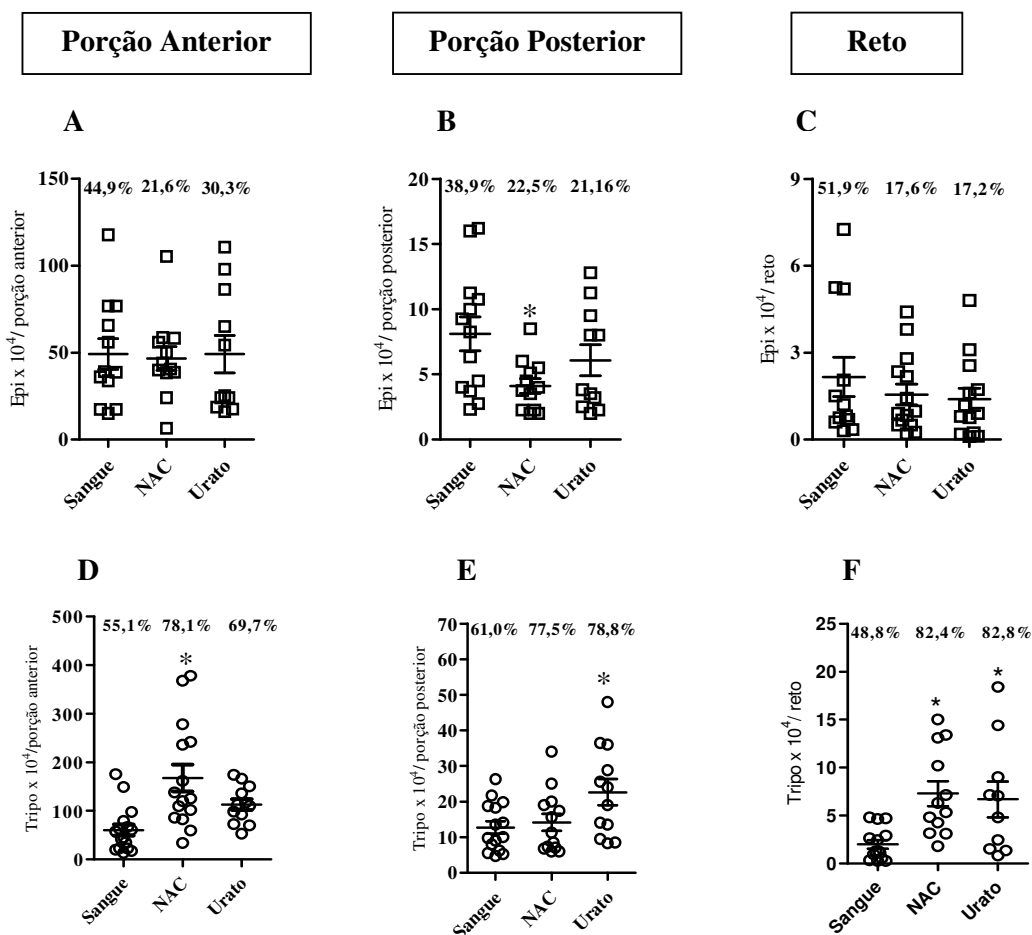


Figura 26 - Concentração de epimastigotas e tripomastigotas: a influência de moléculas de diferentes status redox *in vivo*. Ninfas de *R. prolixus* no 5^o estágio foram alimentadas com 5×10^7 epimastigotas/mL em sangue humano descomplementarizado, sangue suplementado com 1 mM NAC ou sangue suplementado com 1 mM urato. Cinco dias após a infecção, o intestino de seis insetos foi dissecado e homogeneizado em PBS. A porcentagem de epimastigotas (quadrados) e tripomastigotas (círculos) em cada porção do intestino foi determinada utilizando uma câmara de Neubauer, sendo (A e D) Porção Anterior, (B e E) Porção Posterior e (C e F) Reto. Os dados representam média \pm erro padrão do percentual de epimastigotas de três experimentos independentes realizados em sextuplicatas. Análise estatística, * $p < 0,05$ em relação ao grupo alimentado com sangue (controle) pelo teste One-way ANOVA (Tukey). Os insertos representam os percentuais de parasitos totais em relação a cada grupo experimental e porção do intestino do inseto vetor.

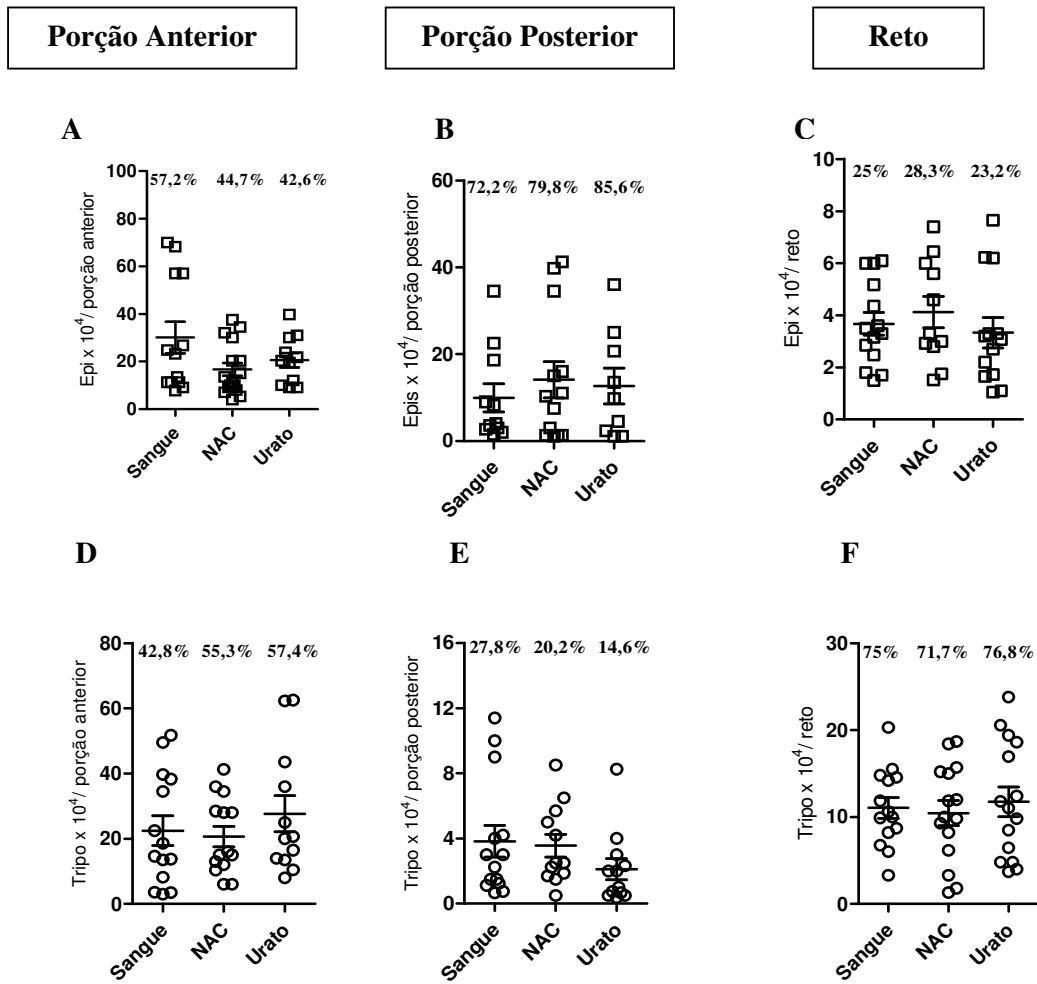


Figura 27 - Concentração de epimastigotas e tripomastigotas: a influência de antioxidantes *in vivo*. Ninfas de *R. prolixus* no 5º estágio foram alimentadas com 5×10^7 epimastigotas/mL em sangue humano descomplementarizado, sangue suplementado com 1 mM NAC ou sangue suplementado com 1 mM urato. Onze dias após a infecção, o intestino de seis insetos foi dissecado e homogeneizado em PBS. A porcentagem de epimastigotas (quadrados) e tripomastigotas (círculos) em cada porção do intestino foi determinado utilizando uma câmara de Neubauer, sendo (A e D) Porção Anterior, (B e E) Porção Posterior, e (C e F) Reto. Os dados representam média \pm erro padrão do percentual de epimastigotas de três experimentos independentes realizados em sextuplicatas. Análise estatística, $*p < 0,05$ em relação ao grupo alimentado com sangue (controle) pelo teste One-way ANOVA (Tukey). Os inserts representam os percentuais de parasitos totais em relação a cada grupo experimental e porção do intestino do inseto vetor.

4 Discussão

O heme é uma molécula ubíqua que apresenta um grande número de papéis fisiológicos, tais como respiração celular, desintoxicação de drogas e transporte de gases e a proliferação *in vitro* do *T. cruzi* (Furuyama *et al.*, 2007; Lara *et al.*, 2007). Ao testarmos análogos da molécula de heme para identificar o determinante químico responsável pela proliferação das formas epimastigotas, observamos que nenhuma das porfirinas testadas foi capaz de induzir o crescimento *in vitro* (Figura 9) ou a formação de EROs (Figura 10) nos parasitos. Portanto, tanto o átomo de ferro, quanto as substituições do anel porfirínico são importantes para deflagrar a sinalização via CaMK II, e a proliferação *in vitro* das formas epimastigotas de *T. cruzi* (Nogueira *et al.*, 2011).

A formação de EROs na mitocôndria é um processo fisiológico e ocorre de maneira contínua através da redução parcial do oxigênio com a geração do ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e posterior formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Kowaltowski *et al.*, 2009).

As formas sanguíneas do protozoário *Trypanosoma brucei*, ao contrário do *T. cruzi*, dependem apenas de uma oxidase alternativa para a respiração celular (Clarkson *et al.*, 1989). A oxidase alternativa do tripanosoma (TAO) é uma oxidase terminal independente de citocromo da cadeia transportadora de elétrons. A TAO é uma proteína com dois átomos de ferro que transfere elétrons do ubiquinol para o oxigênio, reduzindo-o à água (Chaudhuri *et al.*, 2006). Através de análises de bioinformática, Opperdoes e Michels (2008) demonstraram que o complexo I do *T. brucei* apresenta apenas 19 subunidades das 46 presentes no hospedeiro vertebrado envolvidas na translocação de prótons através da membrana. Esta hipótese também pode ser estendida ao *T. cruzi*, uma vez que, todas as subunidades e peptídeos codificados na mitocôndria e no núcleo também podem ser detectados no genoma deste parasito (Opperdoes e Michels 2008).

O H_2O_2 tem sido reconhecido ao longo dos anos como um importante componente de cascatas de sinalização, agindo como mensageiro intracelular ao mediar várias funções celulares incluindo proliferação, diferenciação, apoptose e senescência (Rhee *et al.*, 2005). Em formas epimastigotas de *T. cruzi*, o heme é capaz de induzir a formação de H_2O_2 exógeno (Figura 11A), e endógeno de maneira dose dependente (Figura 12); bem como a proliferação dos protozoários *in vitro* (Figura 11B). Finzi e colaboradores (2004) demonstraram que concentrações subletais de H_2O_2 podiam induzir a

proliferação de epimastigotas. Estes dados estão em conformidade com resultados do nosso laboratório que vem mostrando que o heme leva ao aumento da proliferação desses parasitos conforme a sua adição por induzir a formação de EROs e a ativação da enzima CaMKII (Lara *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2011; Paes *et al.*, 2011).

Dados da literatura demonstram que o aumento sistemático da taxa respiratória utilizando desacopladores é uma estratégia efetiva na prevenção do dano oxidativo, mesmo em baixas concentrações (Kowaltowski *et al.*, 2009). A queda do potencial mitocondrial pode ser alcançada tanto pelo desacoplamento da fosforilação oxidativa da produção de ATP, com o uso de agentes como o FCCP, que penetra a membrana interna da mitocôndria e a torna permeável a prótons (Boveris e Chance, 1973), quanto pelo uso de inibidores dos complexos da cadeia respiratória. A antimicina A é um potente inibidor que se liga ao sítio Q_i da enzima citocromo c oxidase, inibindo a oxidação do ubiquinol, aumentando a liberação de superóxido pelo complexo III (Drose e Brandt, 2008). Testamos, portanto, o papel de inibidores clássicos da CTE, como o FCCP e a antimicina A na produção de EROS e na proliferação das formas epimastigotas.

Na Figura 13 foi notado o mesmo efeito dose resposta com a adição de heme, desta vez, utilizando a sonda DHE sensível à superóxido. Interessantemente, os experimentos de microscopia confocal mostraram que a marcação desta sonda se dava majoritariamente no cinetoplasto (Figura 14B). O envolvimento da mitocôndria na formação de EROs induzida por heme em formas epimastigotas foi confirmado utilizando-se inibidores clássicos da CTE. A exposição concomitante das células ao FCCP e ao heme reduziu aos níveis do controle a fluorescência vermelha do DHE (Figuras 14F e 15A), já a coincubação do heme com a AA aumentou drasticamente a produção de superóxido nas formas epimastigotas (Figuras 14E e 15B). É relevante ressaltar que, um efeito tardio desses inibidores da cadeia transportadora de elétrons pode ser avaliado no ensaio de proliferação de formas epimastigotas *in vitro* (Figura 16). A ausência de EROs promovida pela adição de FCCP aboliu a proliferação das formas epimastigotas induzida pelo heme, confirmando a importância dessas espécies reativas na sinalização de proliferação desses parasitos. Em contrapartida, a produção excessiva de grandes quantidades de $O_2^{\cdot-}$ promovida pela antimicina A (Figura 15B) parece ter induzido um quadro conhecido como estresse oxidativo, caracterizado por dano e morte celular, pois a Figura 16 mostrou que o tratamento com antimicina A diminuiu drasticamente a concentração de parasitos.

Esse conjunto de resultados está em conformidade com a hipótese de regulação redox do crescimento de epimastigotas (Lara *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2011), já que, a diminuição da produção de superóxido mitocondrial pela adição de FCCP modula a proliferação de epimastigotas. Por outro lado, o estresse oxidativo promovido pela produção massiva de EROs na presença de antimicina A resulta em dano e morte celular.

Uma vez que a mitocôndria abriga heme-proteínas muito importantes como, por exemplo, a enzima citocromo c oxidase (Carr e Winge, 2003), os resultados das Figuras 14, 15 e 16 sugerem a mitocôndria como um alvo em potencial da molécula de heme obtido no meio ambiente das formas epimastigotas do *T. cruzi*.

Comparando a formação de EROs, a atividade da ECT entre outros aspectos da bioenergética de formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, Gonçalves e colaboradores (2011) observaram que as formas tripomastigotas sanguíneas dependem mais da glicólise do que da fosforilação oxidativa para sua demanda energética, além de serem mais resistentes aos desafios redox. Estas observações levaram os autores a sugerir a ocorrência do remodelamento mitocondrial durante o ciclo de vida do *T. cruzi* como uma adaptação do parasita aos diferentes ambientes dos diferentes hospedeiros.

De fato, o *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida bastante complexo envolvendo diferentes estágios morfológicos e funcionais, portanto, a adaptação a modificações ambientais e a condições físico-químicas diversas representam um importante mecanismo de sobrevivência. Além disso, a coevolução dos parasitos e insetos promoveu o estabelecimento de uma estratégia sofisticada que facilita o desenvolvimento do protozoário e seu estabelecimento do vetor invertebrado.

A molécula de heme é um bom exemplo desta íntima relação parasito-vetor, uma vez que ela é capaz de promover a proliferação das formas epimastigotas (Lara *et al.*, 2007; Souza *et al.*, 2009; Paes *et al.*, 2011) e, apesar de sua ação pró-oxidante potencialmente deletéria para as células (Ryter e Tyrrell, 2000), as formas epimastigotas de *T. cruzi* parecem estar bastante adaptadas a este ambiente não sofrendo alterações morfológicas ou de ultraestrutura frente a uma alta concentração de heme (Figura 16).

Os antioxidantes de baixa massa molecular são conhecidos por sua importância na proteção contra o dano oxidativo. Acredita-se que o urato seja um dos antioxidantes mais importantes no plasma humano, agindo tanto como formador de complexos inativos com metais de transição, como interceptador de radical hidroxil,

hidroperóxidos lipídicos e ácido hipocloroso (Maples e Mason, 1988). Wigglesworth, em 1931, demonstrou a presença de ácido úrico nos túbulos de Malpighi e na urina de insetos hematófagos. Além disso, Graça-Souza e colaboradores (1997) observaram que a hemolinfa de *Rhodnius* apresenta aproximadamente dez vezes mais urato que o plasma humano. Mais ainda, a administração direta de ácido úrico no intestino de mosquitos infectados diminuiu a nitrificação de proteínas do sangue da alimentação, além de aumentar a infecção por *Plasmodium berghei* nesses insetos (Peterson *et al.*, 2007).

O GSH e a N-acetil cisteína agem não somente como cosubstratos em reações de desintoxicação, mas também como removedores de radicais livres, convertendo espécies reativas em compostos menos reativos (Dickinson e Forman, 2002). O GSH é o antioxidante baseado em tiol intracelular mais abundante, sendo encontrado em concentrações milimolares em todas as células aeróbicas. Além disso, o GSH parece ser um importante antioxidante também em insetos. Paes e Oliveira (1999) descreveram uma atividade GPx em todos os tecidos de fêmeas de *R. prolixus*, mais especialmente na hemolinfa desses animais. Nesse caso, a atividade GPx extracelular constitui uma adaptação à hematofagia. Porém, o efeito de uma grande quantidade de glutatona em animais infectados com *T. cruzi* ainda não foi estudado. O aminoácido cisteína é o responsável pelo poder redutor da glutatona e também um conhecido antioxidante fisiológico (Dröge, 2002). Ao analisarmos o efeito destas moléculas redutoras sobre as formas epimastigotas, observamos uma resposta padrão de diminuição da proliferação dos parasitos quando comparados com o grupo tratado com heme (Figuras 19, 20 e 21). Estes dados corroboram a hipótese de modulação entre moléculas fisiológicas de *status* redox antagônicos, indicando o papel inibitório de moléculas redutoras frente à proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* e confirmando a necessidade do sinal oxidante, fisiologicamente fornecido pelo heme, para deflagrar o crescimento desses parasitos.

A associação simbiótica entre os vetores triatomíneos, especificamente *T. infestans* e o *R. prolixus* e o actinomiceto não cordiforme é bem caracterizada (Baines, 1956) e necessária para o desenvolvimento normal do inseto (Azambuja *et al.*, 2005). Porém, a bactéria hemolítica isolada do estômago de *R. prolixus*, *Serratia marcescens* apresenta efeito tripanocida nos estágios iniciais de desenvolvimento do *T. cruzi* (Azambuja *et al.*, 2004).

Vários estudos sugeriram que peptídeos imunogênicos induzíveis poderiam limitar o desenvolvimento do *T. cruzi* no inseto vetor (Jaynes *et al.*, 1988; Lowenberger,

2001; Vizioli *et al.*, 2001), porém a maioria desses trabalhos analisou a interação parasito-vetor em situações experimentais onde os parasitos entravam em contato direto com fatores provenientes da hemolinfa. Em contrapartida, o *T. cruzi* fica restrito ao trato digestivo do inseto, sendo liberado nas fezes durante o repasto sanguíneo, não havendo contato direto entre o parasito e fatores da hemolinfa (Lopes *et al.*, 2003). A presença de inibidores do sistema complemento na saliva e no intestino de triatomíneos pode beneficiar o desenvolvimento do parasita, já que, as formas epimastigotas são susceptíveis à lise por fatores do complemento (Garcia *et al.*, 1984; Barros *et al.*, 2009).

Estas observações constituem adaptações evolucionárias do parasito a fim de evitar o contato direto com componentes letais da resposta imune do vetor, bem como de aumentar as chances de contato com moléculas moduladoras do seu ciclo de proliferação e diferenciação. Há muito se conhece alguns fatores envolvidos na diferenciação de *T. cruzi* como: a osmolaridade, o pH, estresse metabólico e AMPc presente na urina do vetor (Gonzalez *et al.*, 1998; Kollien e Schaub, 1997; Kollien e Schaub, 2000). Adicionalmente, após a alimentação há aumento do número de formas tripomastigotas no trato urinário de *Triatoma infestans*, o que sustenta a hipótese de que o fluxo urinário, rico em urato (Wigglesworth, 1931), um potente antioxidante, participa da transformação de formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas (Schaub e Lösch 1988; Kollien e Schaub, 1997; Kollien e Schaub, 2000). Porém, os mecanismos envolvidos nessa sinalização permanecem desconhecidos. Recentemente, a fosforilação do fator de transcrição Tc-eIF2a se mostrou crítica para a diferenciação do parasito, uma vez que, formas epimastigotas mutantes super-expressando esta proteína não eram capazes de realizar a metaciclogênese (Tornelli *et al.*, 2011). Contudo, o estado redox parece contribuir na diferenciação de alguns tipos celulares tais como células epiteliais humanas de cólon (Caco-2) e células epiteliais humanas renais HEK-293 (Nkabyo *et al.*, 2002; Nalvarte *et al.*, 2004).

As interações entre o *T. cruzi* e o inseto vetor começam com a chegada do sangue infectado ao intestino do triatomíneo. Posteriormente, ao entrar no trato digestivo durante o repasto sanguíneo, os parasitos encontram os componentes e produtos da digestão do sangue presentes nos intestinos anterior e posterior do inseto. Virtualmente, todas essas moléculas, como por exemplo, peptídeos derivados da globina (Fraïnderaich *et al.*, 1993), fatores hemolíticos (Azambuja *et al.*, 2005), componentes enzimáticos presentes no intestino do inseto vetor (Garcia *et al.*, 2010), ácidos graxos livres, mais especificamente o ácido oleico (Wainszelbaum *et al.*, 2003), a microbiota

intestinal do inseto (Valejo *et al.*, 2009) e o heme (Souza *et al.*, 2009) são capazes de modular a proliferação e a diferenciação do *T. cruzi*. Porém, até o presente momento, devido à complexidade dos mecanismos envolvidos nessa interação, *T. cruzi*-triatomíneo ainda não foi elucidado(a) a(s) molécula(s) e/ ou fator(es) necessários e suficientes para deflagrar os processos de proliferação e diferenciação do *T. cruzi*.

As interações bioquímicas entre o *T. cruzi* e os vetores triatomíneos têm sido investigadas desde 1909 (Chagas, 1909). Notadamente, um estudo compreensivo descrevendo o papel fisiológico de moléculas abundantes e de status redox contrastantes na interação *T. cruzi*-vetor foi pouco explorado.

Portanto, moléculas fisiológicas do vetor poderiam representar um fator de estresse por estarem em altas concentrações e em compartimentos contrastantes. De fato, na Figura 22 observamos um aumento na densidade de parasitos totais/mL quando a metacicloênese foi estimulada na presença de urato ou NAC em todos os tempos testados. Em contrapartida, a diferenciação na presença de heme ou β -hematina prejudicou este processo, levando à diminuição da concentração de parasitos totais/mL ao longo da metacicloênese. Ao avaliarmos o processo de diferenciação mais profundamente para distinguir as formas epimastigotas das tripomastigotas metacíclicas, o efeito pró-metacicloênese *in vitro* dos antioxidantes fica ainda mais marcado. Já nas primeiras 24 h de estresse nutricional em meio TAU3AAG notou-se grande aumento da porcentagem de tripomastigotas nos grupos incubadas com NAC, GSH ou urato, aumento este que se manteve pelas 96 h analisadas (Figura 23). Em contrapartida, estas moléculas levaram ao decréscimo da porcentagem das formas epimastigotas evidenciando ainda mais o seu papel no favorecimento da metacicloênese. Estes dados podem ser corroborados ao analisarmos o efeito da molécula de heme, que por apresentar um caráter oxidante, resultou numa menor porcentagem de formas tripomastigotas e num incremento da porcentagem de formas epimastigotas. A β -hematina também levou a um efeito semelhante ao heme.

Estudos com o protozoário *Plasmodium* demonstraram o envolvimento do ácido xanturênico, um subproduto da oxidação do triptofano com propriedades redutoras (Murakami *et al.*, 2001; López-Burillo *et al.*, 2003), produzido pelo mosquito vetor, com a exflagelação desses parasitos. O ácido xanturênico leva à gametogênese, fenômeno de diferenciação essencial para a transmissão da malária (Billker *et al.*, 1998). Este processo foi recentemente aprofundado mostrando a participação de uma proteína quinase dependente de GMP cíclico (PKG) (McRobert *et al.*, 2008). Esse

conjunto de dados sugere que a diferenciação dos protozoários causadores da malária acontece em ambientes redutores. Apesar destas fortes evidências, os autores não relacionaram o fato de o ácido xanturênico ser uma molécula redutora à sua importância frente à diferenciação dos parasitos maláricos. Nossos dados são inéditos ao relacionar o status redox à modulação da biologia do *T. cruzi*.

A reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada no diagnóstico, no monitoramento, e na progressão da terapia de várias doenças infecciosas (Ehrlich e Greenberg, 1994). No caso do *T. cruzi*, esta estratégia tem sido aplicada desde 1989 para a análise de amostras clínicas infectadas com o parasito (Moser *et al.*, 1989). Mais recentemente, a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) se tornou uma das técnicas mais utilizadas para medir a expressão gênica. Ferramentas de diagnóstico mais precisas, bem como marcadores parasitológicos mais específicos são prioridades na clínica de doenças infecciosas (Schijman *et al.*, 2011). Neste sentido, o uso da PCR em tempo real se torna uma potente e rápida ferramenta no diagnóstico e quantificação do *T. cruzi* em amostras biológicas. Utilizando oligonucleotídeos iniciadores baseados na sequência repetitiva TCZ avaliamos por PCR em tempo real a presença do *T. cruzi* nas porções do intestino do inseto vetor infectado e tratado com os antioxidantes NAC e urato cinco dias após a infecção. Corroborando os dados encontrados nos experimentos *in vitro*, as infecções *in vivo* na presença de NAC e urato também resultaram no aumento da expressão de TCZ e consequente, aumento da infecção dos insetos por *T. cruzi* nas três porções do intestino avaliadas. Mais ainda, esse aumento da expressão da TCZ se deu pelo aumento das formas tripomastigotas, evidenciando o favorecimento da metaciclo genese *in vivo* pelo ambiente redutor promovido pela presença dos antioxidantes NAC e urato. Ao avaliarmos a expressão da TCZ por PCR em tempo real onze dias após a infecção, apenas o urato apresentou aumento significativo da expressão da TCZ nas porções anterior e posterior. Este resultado, em comparação ao obtido com as alimentações cinco dias após a infecção, pode ser interpretado como uma adaptação tanto dos parasitos como dos triatomíneos às modificações provocadas pelo ambiente redutor promovido pelos antioxidantes durante a alimentação dos insetos.

Em conjunto, estas observações sugerem que, ao contrário da proliferação, que necessita de um ambiente oxidante para ocorrer, a diferenciação se dá em ambientes redutores. Neste cenário, moléculas oxidantes agiriam a favor da proliferação, e em contraste, antioxidantes parecem favorecer a metaciclo genese.

Na ausência de vacinas, o controle da doença de Chagas tem dependido grandemente de medidas que visem à erradicação do inseto vetor. Vários esforços de grande escala baseados na pulverização de inseticidas tem sido utilizados com sucesso até hoje com a eliminação de novos casos da doença no Brasil (Moncayo e Ortiz-Yanine, 2006). Contudo, alguns fatores tem levantado preocupações acerca da re-emergência da doença de Chagas no Cone Sul, tais como: eficiência reduzida dos piretroides em ambientes peridomésticos, levando à eliminação incompleta do *Triatoma infestans* em alguns países (Cecere *et al.*, 2004). Com isso, novas estratégias como a paratransgênese têm se tornado uma alternativa no combate a esta enfermidade.

Nesta abordagem, a flora bacteriana nativa do vetor triatomíneo é isolada e geneticamente transformada *in vitro* para produzir moléculas que interfiram na transmissão do patógeno. Os simbioses geneticamente modificados são então reintroduzidos no inseto vetor onde a expressão dessas moléculas reduzindo a competência vetorial (Hurwitz *et al.*, 2011). Recentemente, esta estratégia tem sido testada também para o *T. cruzi* com cepas de *Rhodococcus rhodnii* produzindo vários peptídeos anti-microbianos que combinados aumentam a eficiência de morte do parasito (Fieck *et al.*, 2010). Contudo, a produção e a liberação de insetos paratransgênicos para aplicações em saúde pública devem ser tratadas com muito cuidado no que diz respeito às políticas ambientais e segurança humana (Beard *et al.*, 2002).

Todavia, o papel do status redox no controle da microbiota e na interação inseto triatomíneo-*T. cruzi* até o presente momento ainda não havia sido avaliada. No contexto fisiológico, tanto para o *T. cruzi* quanto para o vetor triatomíneo, o urato representa uma importante molécula moduladora da metaciclogênese e conseqüentemente da transmissão dos parasitos para seus hospedeiros vertebrados. Observações realizadas em nosso laboratório relatam que tripomastigotas metacíclicos em cultura, na presença de urato, sobrevivem por 19 dias a mais que os parasitos controle, confirmando os benefícios do ambiente redutor para esta forma evolutiva do *T. cruzi*.

A descoberta de novas drogas representa alto risco e gastos, além disso, o desenvolvimento de agentes desenhados especificamente contra doenças de tripanosomas não é considerado comercialmente atraente. Até recentemente, o interesse das grandes indústrias farmacêuticas tem sido mínimo, com a maioria das pesquisas e desenvolvimento ocorrendo dentro das universidades. Como uma conseqüência disto, estas infecções têm sido chamadas de “doenças mais negligenciadas” (Wilkinson e Kelly, 2009). As drogas em uso atualmente para a quimioterapia da doença de Chagas

parecem induzir estresse oxidativo aumentando diretamente os níveis de EROs (p. ex. nifurtimox e benznidazol) (Wilkinson e Kelly, 2009) ou indiretamente, afetando os componentes que medeiam a desintoxicação de espécies reativas (p. ex. difluoromethylornithina, pentamidina e arsênicos trivalentes) (Krauth-Seigel e Coombs, 1999; Muller *et al.*, 2001). Além disso, novos candidatos de drogas como o análogo de putescina diaminobutanone exercem sua atividade tripanocida ao causar disfunção mitocondrial resultando em geração de EROs exacerbada (Menezes *et al.*, 2006; Menna-Barreto *et al.*, 2009). Deste modo, torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos que visem o entendimento das vias envolvidas na formação e desintoxicação de EROs, assim como sua importância no ciclo de vida destes parasitos, fornecendo novos rumos para a aplicação de abordagens terapêuticas mais eficientes.

5 CONCLUSÕES

- Em oposição a molécula de heme, o tratamento das formas epimastigotas com seus análogos diminui significativamente a proliferação dos parasitos. Ainda de maneira controversa, o desafio das formas epimastigotas de *T. cruzi* com as porfirinas análogas ao heme não foi capaz de induzir a formação de EROs.
- Assim como ocorre em resposta ao heme, a adição exógena do oxidante H₂O₂ induziu a proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi*. Além disso, concentrações crescentes de heme são capazes de induzir aumento significativo na produção de H₂O₂ endógeno nos parasitos.
- O heme é capaz de aumentar a produção de superóxido mitocondrial majoritariamente no cinetoplasto, mitocôndria única dos tripanossomatídeos, como observado pela co-localização entre o sinal fluorescente do DHE e o Mitotracker green por microscopia confocal.
- O desacoplamento da CTE aboliu a produção de superóxido na presença e na ausência de heme, ocasionando a diminuição da proliferação das formas epimastigotas. Já a inibição do complexo III da CTE em conjunto com o heme, aumentou exacerbadamente a produção de superóxido mitocondrial, levando morte dos parasitos *in vitro*.
- Após a exposição de formas epimastigotas a uma alta concentração de heme não foi observada nenhuma alteração na morfologia das membranas e organelas do parasito, ou perda da organização mitocondrial, demonstrando a adaptação do *T. cruzi* a ambientes oxidantes.
- Os antioxidantes urato, GSH e NAC levaram a diminuição das formas epimastigotas quando comparado com o efeito proliferativo do heme.
- Durante a metacicloênese, os antioxidantes urato, GSH e NAC estimularam enormemente a diferenciação *in vitro* dos parasitos.
- A β -hematina não influenciou a proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi in vitro*. A indução da metacicloênese na presença heme ou hemozina levaram a

diminuição da concentração de parasitos no sobrenadante, do percentual de tripomastigotas e um enriquecimento na porcentagem de epimastigotas.

- A quantificação *in vivo* cinco e onze dias após a infecção dos vetores com NAC ou urato revelou aumento da carga parasitária nas três porções do intestino do inseto estudadas. As formas tripomastigotas foram as envolvidas neste aumento, corroborando a hipótese do favorecimento da metaciclogênese *in vivo* por moléculas redutoras.

REFERÊNCIAS

- Adroher FJ, Osuna A, Lupianez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. Arch Biochem Biophys. 1988; 267: 252–261.
- Adroher FJ, Osuna A, Lupianez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. Mol Cell Biochem. 1990; 94: 71–82.
- Aft RL, Mueller GC. Hemin-mediated DNA strand scission. J Biol Chem. 1983; 258: 12069–12072.
- Aft RL, Mueller GC. Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. J Biol Chem. 1984; 259: 301–305.
- Alves CR, Albuquerque-Cunha JM, Mello CB, Garcia ES, Nogueira NF, Bourguignon SC, de Souza W, Azambuja P, Gonzalez MS. *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. Expl Parasitol. 2007; 116: 44–52.
- Ames BN, Cathcart R, Schwiers E, Hochstein P. Uric acid provides an antioxidant defense in humans against oxidant- and radical-caused aging and cancer: a hypothesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1981; 78: 6858–6862.
- Arévalo J, Panebra A, Santa Cruz C. Relevance of hemin for *in vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi*. J Protozool. 1985; 32(3): 553–555.
- Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 2001; 115: 189–198.
- Atwood JAIII, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, Opperdoes FR, Orlando R, Tarleton RL. The *Trypanosoma cruzi* proteome. Science. 2005; 309(5733): 473–476.
- Avila AR, Yamada-Ogatta SF, da Silva Monteiro V, Krieger MA, Nakamura CV de Souza W, Goldenberg S. Cloning and characterization of the metacyclogenin gene, which is specifically expressed during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mol Biochem Parasitol. 2001; 117: 169–177.
- Azambuja P, Feder D, Garcia ES. Isolation of *Serratia marcescens* in the midgut of *Rhodnius prolixus*: impact on the establishment of the parasite, *Trypanosoma cruzi*, in the vector. Exp Parasitol. 2004; 107: 89–96.
- Azambuja P, Ratcliffe NA, Garcia ES. Towards an understanding of the interactions of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* within the reduviid insect host *Rhodnius prolixus*. An Acad Bras Cienc. 2005; 77: 397–404.

- 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.
- Baines S. The role of the symbiotic bacteria in the nutrition of *Rhodnius prolixus*. *J Exp Biol.* 1956; 33: 533–541.
- Barros VC, Assumpção JG, Cadete AM, Santos VC, Cavalcante RR, Araújo RN, Pereira MH, Gontijo NF. The role of salivary and intestinal complement system inhibitors in the midgut protection of triatomines and mosquitoes. *PLoS One.* 2009; 4(6): e6047.
- Beard CB, Cordon-Rosales C, Durvasula RV. Bacterial symbionts of the triatominae and their potential use in control of Chagas disease transmission. *Annu Rev Entomol.* 2002; 47: 123–41.
- Besteiro S, Biran M, Biteau N, Coustou V, Baltz T, Canioni P, Bringaud F. Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme NADH-dependent fumarate reductase. *J Biol Chem.* 2002; 277: 38001–38012.
- Billingsley PF, Downe AER. Cellular localisation of aminopeptidase in the midgut cells associated with blood feeding in adult female *Rhodnius prolixus* Stal (Hemiptera: Reduviidae) during blood digestion. *Cell Tissue Res.* 1985; 241: 421–428.
- Billker O, Lindo V, Panico M, Etienne AE, Paxton T, Dell A, Rogers M, Sinden RE, Morris HR. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito. *Nature.* 1998; 392: 289–292.
- Bittencourt AL. Placenta chagásica e transmissão da doença de Chagas. *Rev Inst Med Trop. São Paulo* 1963; 5: 62–67.
- Bonaldo MC, Souto-Padron T, De Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol.* 1988; 106: 1349–1358.
- Borst P, Van der Ploeg M, Van Hoek JFM, Tas J, James J. On the DNA content and ploidy of trypanosomes. *Mol Biochem Parasitol.* 1982; 6:13–23.
- Boveris A, Cadenas E. Mitochondrial production of superoxide anions and its relationship to the antimycin insensitive respiration. *FEBS Lett.* 1975; 54: 311–314.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide: general properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J.* 1973; 134: 707–716.
- Boveris A, Hertig CM, Turrens JF. Fumarate reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1986; 19(2): 163–169.
- Boveris A, Sies H, Martino EE, Docampo R, Turrens JF, Stoppani AO. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J.* 1980; 188(3): 643–648.

- 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. Laboratory acquired Chagas disease: an endemic disease among parasitologists? In: Morel C (ed). *Genes and antigens of parasites: a laboratory manual* 2 ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p. 3–9.
- Brener, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973; 27: 347–382.
- Bringaud F, Rivière L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: Adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol.* 2006; 149: 1–9.
- Briones MR, Souto RP, Stolf BS, Zingales B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. *Mol Biochem Parasitol.* 1999; 104(2): 219–232.
- Brown DI, Griendling KK. Nox proteins in signal transduction. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 1239–1253.
- Burdon RH. Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med.* 1995; 18: 775–794.
- Cannata JJ, Cazzulo JJ. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol.* 1984; 79: 297–308.
- Carr HS, Winge DR. Assembly of Cytochrome c Oxidase within the Mitochondrion. *Acc. Chem. Res.* 2003; 36: 309–316.
- Carranza J C, Kowaltowski AJ, Mendonça MAG, Oliveira TC, Gadelha FR, Zingales B. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes *J Bioenerg Biomembr.* 2009; 41: 299–308.
- Cecere MC, Vazquez-Prokopec GM, Gurtler RE, Kitron U. Spatio-temporal analysis of reinfestation by *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae) following insecticide spraying in a rural community in northwestern Argentina. *Am J Trop Med Hyg.* 2004; 71: 803-810.
- 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. Sobre a verificação do *Trypanosoma cruzi* em macacos do Pará (*Chrysothrix sciureus*). *Scien Med.* 1924; 2: 75–76.

- 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.
- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev.* 1979; 59: 527–605.
- Chaudhuri M, Ott RD, Hill GC. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 2006; 22: 484-491.
- Clarkson AB Jr, Bienen EJ, Pollakis G, Grady RW. Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *J Biol Chem.* 1989; 264: 17770-17776.
- Clayton C E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. *EMBO journal* 2002; 21: 1881–1888.
- Cochran DG. In; *Insect Biochemistry and Function* (Candy DJ, Kilby BA eds) 1975; pp 177–281.
- Contreras VT, Araujo-Jorge TC, Bonaldo MC, Thomaz N, Barbosa HS, Meirelles Mde N, Goldenberg S. Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988; 83: 123.
- Coura JR, Dias JCP. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease - 100 years after its discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 31–40.
- 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. Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas' disease. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006; 39: 113–117.
- Coustou V, Besteiro S, Rivière L, Biran M, Biteau N, Franconi JM, Boshart M, Baltz T, Bringaud F. A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 2005; 280: 16559–16570.
- Coustou V, Biran M, Besteiro S, Rivière L, Baltz T, Franconi JM, Bringaud F.J. Fumarate is an essential intermediary metabolite produced by the procyclic *Trypanosoma brucei*. *J Biol Chem.* 2006; 281: 26832–26846.
- Cronstein BN, Terkeltaub R. The inflammatory process of gout and its treatment. *Arthritis Res Ther.* 2006; (Suppl 1): S3.

- Cupello MP, Souza CF, Buchensky C, Soares JBRC, Laranja GAT, Coelho MGP, Cricco JA, Paes MC. The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. *Acta Trop* 2011; 120: 211–218.
- Dallagiovanna B, Plazanet-Menut C, Ogatta SF, Avila AR, Krieger MA, Goldenberg S. *Trypanosoma cruzi*: a gene family encoding chitin-binding-like proteins is posttranscriptionally regulated during metacyclogenesis. *Exp Parasitol*. 2001; 99: 7–16.
- Das A, Banday M, Bellofatto V. RNA polymerase transcription machinery in trypanosomes. *Eukaryot Cell* 2008; 7: 429–434.
- Davies JMS, Lowry CV, Davies KJA Transient adaptation to oxidative stress in yeast. *Arch Biochem Biophys*. 1995; 317: 1–6.
- De Paula EV, Goncales NS, Xueref S, Addas-Carvalho M, Gilli SC, Angerami RN, Goncales FL Jr. Prevalence of transfusion-transmitted Chagas Disease among multitransfused patients in Brazil. *BMC Infect Dis*. 2008; 8: 1-5.
- 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. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. *Curr Pharm Des*. 2008; 14: 822–838.
- De Souza W. Basic Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des*. 2002; 8: 269–285.
- De Souza W. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2009; 104: 89–100.
- Demple B, Halbrook J. Inducible repair of oxidative DNA damage in *Escherichia coli*. *Nature*. 1983; 304: 466–468.
- Deterding LJ, Ramirez DC, Dubin JR, Mason RP, Tomer KB. Identification of free radicals on hemoglobin from its self-peroxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidinyl radical. *J Biol Chem*. 2004; 279: 11600-11607.
- Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003; 98: 1–12.
- 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.
- Dickinson DA, Forman HJ. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Ann NY Acad Sci*. 2002; 973: 488–504.

- Dinauer MC, Deck MB, Unanue ER. Mice lacking reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase activity show increased susceptibility to early infection with *Listeria monocytogenes*. *J Immunol*. 1997; 158: 5581–5583.
- Docampo R, De Souza W, Miranda K, Roheloff P, Moreno S. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. *Nature Rev Microbiol*. 2005; 3: 251–261.
- Docampo R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem Biol Interac*. 1990; 73: 1–27.
- Dormeyer M, Reckenfelderbaumer N, Ludemann H, Krauth-Siegel RL. Trypanothione-dependent synthesis of deoxyribonucleotides by *Trypanosoma brucei* ribonucleotide reductase. *J Biol Chem*. 2001; 276: 10602–10606.
- Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev*. 2002; 82: 47–95.
- Dröse S, Brandt U. The mechanism of mitochondrial superoxide production by the cytochrome bc1 complex. *J. Biol.Chem*. 2008; 283: 21649–21654.
- Echevarría M, Ramírez-Lorca R, Hernández CS, Gutiérrez A, Méndez-Ferrer S, González E e cols. Identification of a new water channel (Rp-MIP) in the Malpighian tubules of the insect *Rhodnius prolixus*. *Pflugers Arch* 2001; 442: 27–34.
- Ehrlich G e Greenberg S. PCR-Based Diagnostics for Infectious Disease. Boston: Blackwell Scientific Publications. 1994; 698 p.
- Eichler S, Schaub GA. The effects of aposymbiosis and of an infection with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) on the tracheal system of the reduviid bugs *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans*. *J Insect Physiol*. 1998; 44: 131–140.
- Elias MC, Marques-Porto R, Freymuller E, Schenkman S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organization. *Mol Biochem Parasitol*. 2001; 11: 79–90.
- El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, Tran AN e cols. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science*. 2005; 309: 409–415.
- Fairlamb AH, Blackburn P, Ulrich P, Chait BT, Cerami A. Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. *Science*. 1985; 227: 1485–1487.
- Fairlamb AH, Cerami A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Ann Rev Microbiol*. 1992; 46: 695–729.
- Feigelson P, Davidson JD, Robins RK. Pyrazolopyrimidines as inhibitors and substrates of xanthine oxidase. *J Biol Chem*. 1957; 226: 993–1000.

- Ferreira AVM, Segatto M, Menezes Z, Macedo AM, Gelape C, Andrade LO, Nagajyothi F, Scherer P E, Teixeira MM, Tanowitz HB. Evidence for *Trypanosoma cruzi* in adipose tissue in human chronic Chagas disease. *Microbes Infect.* 2011; 12–13.
- Ferreira RC, Schwarz U, Ferreira LC. Activation of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microsomal enzymes. *Mutat Res.* 1988; 204: 577–583.
- Fieck A, Hurwitz I, Kang AS, Durvasula R. *Trypanosoma cruzi*: synergistic cytotoxicity of multiple amphipathic anti-microbial peptides to *T. cruzi* and potential bacterial hosts. *Exp Parasitol.* 2010; 125: 342–347.
- Finzi JK, Chiavegatto CWM, Corat KF, Lopez JA, Cabrera OG, Mielniczki-Pereira AA, Colli W, Alves MJM, Gadelha FR. *Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide. *Mol Biochem Parasitol.* 2004; 133: 37–43.
- Flohé L, Hecht HJ, Steinert P. Glutathione and trypanothione in parasitic hydroperoxide metabolism. *Free Radic Biol Med.* 2003; 27: 966–984.
- Fragoso SP, Plazenet-Menut C, Carreira MA, Motta MC, Dalla-giovana B, Krieger MA, Goldenberg S. Cloning and characterization of a gene encoding a putative protein associated with U3 small nucleolar ribonucleoprotein in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 2003; 126: 113–117.
- Fraidenraich D, Peña C, Isola EL, Lammel EM, Coso O, Añel AD, Pongor S, Baralle F, Torres HN, Flawia MM. Stimulation of *Trypanosoma cruzi* adenylyl cyclase by an alpha D-globin fragment from *Triatoma* hindgut: effect on differentiation of epimastigote to trypomastigote forms. *Proc Natl Acad Sci.* 1993; 90: 10140–1044.
- Frein D, Schildknecht S, Bachschmid M, Ullrich V. Redox regulation: A new challenge for pharmacology. *Bioch Pharmacol.* 2005; 70: 811–823.
- Friend WG. The gorging response in *Rhodnius prolixus*. *Stal Can J Zool.* 1965; 43: 125–132.
- Furuyama K, Kaneko K, Vargas VD. Heme as a magnificent molecule with multiple missions: Heme determines its own fate and governs cellular homeostasis. *Exp Med.* 2007; 213: 1–16.
- Garcia ES e Azambuja P. Fisiologia de triatomíneos: desenvolvimento, reprodução e interação com *Trypanosoma cruzi* – In: *Trypanosoma cruzi* e doença de chagas, 1979. pp 41–47. Brener, Z e Andrade Z. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.
- Garcia ES, Azambuja P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. *Parasitol Today* 1991; 7: 240–244.
- Garcia ES, Azambuja, P. Lignoids in insects: chemical probes for the study of ecdysis, excretion and *Trypanosoma cruzi* interactions. *Toxicon.* 2004; 15: 431–440.

- Garcia ES, Genta FA, Azambuja P, Schaub GA. Interactions between intestinal compounds of triatomines and *Trypanosoma cruzi* Trends Parasitol. 2010; 26: 499–505.
- Garcia ES, Gonzalez MS, Azambuja P, Rembold H. Chagas' disease and its insect vector. Effects of azadirachtin A on the interaction of a triatomine host (*Rhodnius prolixus*) and its parasite (*Trypanosoma cruzi*). Z Naturforsch. 1989; 44: 317–322.
- Garcia ES, Macarini JD, Garcia MLM, Ubatuba FB. Feeding of *Rhodnius prolixus* in the laboratory. An Acad Bras Cienc. 1975; 47: 539–545.
- Garcia ES, Ratcliffe NA, Whitten MM, Gonzalez MS, Azambuja P. Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. J Insect Physiol. 2007; 53: 11–21.
- Garcia ES, Vieira E, Gomes JEPL, Gonçalves AM. Molecular biology of the interaction *Trypanosoma cruzi*/invertebrate host. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1984; 79: 33–37.
- Garcia ES. The digestion of Triatominae. In: Brenner, R.R., Stoka, A. (Eds.) Chagas' Disease Vector II. Anatomic and Physiological Aspects. CRC Press, Florida, 1987 pp.47–59.
- Getachew F, Gedamu L. *Leishmania donovani* iron superoxide dismutase A is targeted to the mitochondria by its N-terminal positively charged amino acids. Mol Biochem Parasitol. 2007; 154: 62–69.
- Gluenz V, Taylor MC, Kelly JM. The *Trypanosoma cruzi* metacyclic-specific protein Met-III associates with the nucleolus and contains independent amino and carboxyl terminal targeting elements. Inter J Parasitol. 2007; 37: 617–625.
- Go YM, Jones DP. Intracellular proatherogenic events and cell adhesion modulated by extracellular thiol/disulfide redox state. Circulat. 2005; 111: 2973–2980.
- Go YM, Jones DP. Redox compartmentalization in eukaryotic cells. Bioch Bioph Acta. 2008; 780: 1273–1290.
- 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.
- Gonçalves RLS, Menna-Barreto RFS, Polycarpo CR, Gadelha FR, Castro SL, Oliveira MF. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr. 2011; 43: 651–661.
- Gonzalez A, Prediger E, Huecas ME, Nogueira N, Lizardi PM. Minichromosomal repetitive DNA in *Trypanosoma cruzi*: its use in a high-sensitivity parasite detection assay. Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 3356–3360.

- Gonzalez MS e cols. Influence of Triatominae hormonal regulation on the development of *Trypanosoma cruzi*, in Atlas of Chagas' Disease Vectors in the Americas (Vol. 2) 1998; pp 665–707, Editora FIOCRUZ.
- Gonzalez MS, Garcia ES. Effect of azadirachtin on the development of *Trypanosoma cruzi* in different species of triatomine insect vectors: long-term and comparative studies. *J Invert Pathol.* 1992; 60: 201–205.
- Gorla NB, Ledesma OS, Barbieri GP, Larripa IB. Thirteen fold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutat Res.* 1989; 224: 263–267.
- Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GRC, Paes MC, Sorgine MHF, Oliveira MF, Oliveira PL. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insec Bioch Mol Biol.* 2006; 36: 322–335.
- Graça-Souza AV, Petretski JH, Demasi M, Bechara EJH, Oliveira PL. Urate protects a blood-sucking insect against hemin-induced oxidative stress. *Free Rad Biol Med.* 1997; 22: 209–214.
- Graça-Souza AV, Silva-Neto MAC, Oliveira PL. Urate Synthesis in the Blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. Stimulation by hemin is mediated by protein kinase C. *J Biol Chem.* 1999; 274: 9673–9676.
- Gygi SP, Rochon Y, Franza BR, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 1720–1730.
- Halliwell B, Gutteridge JMC. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem J.* 1984; 219: 1–14.
- Halliwell B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). *Free Radic Res.* 1999; 31: 261–272.
- Hansen JM, Moriarty-Craige S, Jones DP. Nuclear and cytoplasmic peroxiredoxin-1 differentially regulates NF-kappaB activities. *Free Radic Biol Med.* 2007; 43: 282–288.
- Henriksson J, Aslund L, Pettersson U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* 1996; 12: 108–114.
- Hilliker AJ, Duyf B, Evans D, Phillips JP. Urate-null rosy mutants of *Drosophila melanogaster* are hypersensitive to oxygen stress. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; 89(10): 4343–4347.
- 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.

- 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.
- Hurwitz I, Fieck A, Read A, Hillesland H, Klein N, Kang A, Durvasula R. Paratransgenic control of vector borne diseases. *Int J Biol Sci.* 2011; 7: 1334-1344.
- Irigoín F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohé L, Radi R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism a oxidant detoxification *Free Radic Biol Med.* 2008; 45: 733–742.
- Iyer JP, Kaprakkaden A, Choudhary, ML, Shaha C. Crucial role of cytosolic tryparedoxin peroxidase in *Leishmania donovani* survival, drug response and virulence. *Mol Microbiol.* 2008; 68: 372–391.
- Jaynes JM, Burton CA, Barr SB, Jeffers GW, Julian GR, White KL, Enright FM, Klei TR, Laine RA. *In vitro* cytotoxic effect of novel lytic peptides on *Plasmodium falciparum* and *Trypanosoma cruzi*. *FASEB J.* 1988; 2: 2878–2883.
- Jones DP. Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2008; 295:C849–C868.
- Jones DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal.* 2006; (9-10): 1865-1879.
- 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. *Denisia* 2006; 19: 1095–1115.
- Kippen I, Klinenberg JR, Weinberger A, Wilcox WR. Factors affecting urate solubility *in vitro*. *Ann Rheum Dis.* 1974; 33: 313–317.
- Kirchhoff LV, Gam AA, Gilliam FC. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in central american immigrants. *Am J Med.* 1987; 82: 915–920.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Parasitol Today.* 2000; 16: 381–387.
- Kollien AH, Schaub GA. *Trypanosoma cruzi* in the rectum of the bug *Triatoma infestans*: effects of blood ingestion of the vector and artificial diuresis. *Parasitol Res.* 1997; 83: 781–788.
- Kowaltowski AJ, Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med.* 2009; 47: 333–343.

- Krassner SM, Granger B, Phermsangngnam P, Le T, Linden V. Further studies on substrates inducing metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. J Protozool. 1990; 37: 128–132.
- Krauth-Siegel RL, Meiering SK, Schmidt H. The parasite-specific trypanothione metabolism of trypanosoma and leishmania. J Biol Chem. 2003; 384: 539–549.
- Krieger MA, Avila AR, Ogatta SF, Plazanet-Menut C, Goldenberg S. Differential gene expression during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999; 94: 165–168.
- Krieger S, Schwarz W, Ariyanayagam MR, Fairlamb AH, Krauth-Siegel RL, Clayton C. Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. Mol Microbiol. 2000; 35: 542–552.
- Krieger-Brauer H, Medda PK, Kather H. Insulin-induced activation of NADPH-dependent H₂O₂ generation in human adipocyte plasma membranes is mediated by Gai2. J Biol Chem. 1997; 272: 10135–10143.
- Kwong LK, Sohal RS. Substrate and site specificity of hydrogen peroxide generation in mouse mitochondria. Arch Biochem Biophys. 1998; 350: 118–126.
- Lambeth JD. NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. Nat Rev Immunol. 2004; 4: 181–189.
- Lara FA, Sant'Anna C, Lemos D, Laranja GAT, Coelho MGP, Reis Salles I, Michel A, Oliveira PL, Cunha-e-Silva N, Salmon D, Paes MC. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 355: 16–22.
- Lehane MJ. Biology of blood-sucking insects. Harper Collin Academic. 1991; 77–85.
- 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, e cols. A newly revised classification of the Protozoa. J Protozool. 1980; 27: 37–58.
- Lombardo ME, Araújo LS, Batlle A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Int J Biochem Cell Biol. 2003; 35: 1263–1271.
- Lopez L, Morales G, Ursic R, Wolff M, Lowenberger C. Isolation and characterization of a novel insect defensin from *Rhodnius prolixus*, a vector of Chagas disease. Insec Bioch Mol Biol. 2003; 33: 439–447.
- López-Burillo S, Tan DX, Mayo JC, Sainz RM, Manchester LC, Reiter RJ. Melatonin, xanthurenic acid, resveratrol, EGCG, vitamin C and alpha-lipoic acid

differentially reduce oxidative DNA damage induced by Fenton reagents: a study of their individual and synergistic actions. *J Pineal Res.* 2003; 34: 269–277.

- Lowenberger CA. Form, function, and phylogenetic relationships of mosquito Immune peptides. In: Beck G, Sugumaran M, Cooper R (Eds.), *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune System*. Kluwer Academic, Dordrecht, 2001; pp. 113–129.
- Lu HG, Zhong L, De Souza W, Benchimol M, Moreno SJN, Docampo R. Ca^{2+} content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Cell Biol.* 1998; 18: 2309–2323.
- Maples KR, Mason RP. Free radical metabolite of uric acid. *J Biol Chem.* 1988; 263: 1709–1712.
- Martins C, Baptista CS, Iennea S, Cerqueira GC, Bartholomeu DC, Zingales B. Genomic organization and transcription analysis of the 195-bp satellite DNA in *Trypanosoma cruzi* *Mol Bioch Parasitol* 2008; 160: 60–64.
- McRobert L, Taylor CJ, Deng W, Fivelman QL, Cummings RM, Polley SD, Billker O, Baker DA. Gametogenesis in malaria parasites is mediated by the cGMP-dependent protein kinase. *PLoS Biol.* 2008; 6: e139.
- Meister A. Glutathione metabolism and its selective modification. *J Biol Chem.* 1988; 263: 17205–17208.
- Melchers J, Dirdjaja N, Ruppert T, Krauth-Siegel RL. Glutathionylation of trypanosomal thiol redox proteins. *J Biol Chem.* 2007; 282: 8678–8694.
- Menezes D, Valentim C, Oliveira MF, Vannier-Santos MA (2006) Putrescine analogue cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 98: 99–105.
- Menna-Barreto RF, Goncalves RL, Costa EM, Silva RS, Pinto AV, Oliveira MF, de Castro SL. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2009; 47: 644–653.
- Mitchell P. Keilin's respiratory chain concept and its chemiosmotic consequences *Science.* 1979; 206: 1481–159.
- Moncayo A e Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol.* 2006; 100: 663-677.
- Moreno SN, Docampo R. The role of acidocalcisomes in parasitic protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2009; 56: 208–213.
- Moser DR, Kirchhoff LV, Donelson JE. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 1989; 27: 1477–1482.

- Moutiez M, Meziane-Cherif D, Aumercier M, Sergheraert C, Tartar A. Compared reactivities of trypanothione and glutathione in conjugation reactions. *Chem Pharm Bull.* 1994; 42: 2641–2644.
- Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondrial membrane. *J Biol Chem.* 2004; 279: 49064–49073.
- Muller S, Liebau E, Walter RD, Krauth-Siegel RL. Thiol-based redox metabolism of protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 2003; 19: 320–328.
- Murakami K, Ito M, Yoshino M. Xanthurenic acid inhibits metalion-induced lipid peroxidation and protects NADP-isocitrate dehydrogenase from oxidative inactivation. *J Nutr Sci Vitamino (Tokyo)* 2001; 47: 306–310.
- Nalvarte I, Damdimopoulos AE, Nystom C, Nordman T, Miranda-Vizuete A, Olsson JM, Eriksson L, Bjornstedt M, Arner ES, Spyrou G. Overexpression of enzymatically active human cytosolic and mitochondrial thioredoxin reductase in HEK-293 cells. Effect on cell growth and differentiation. *J Biol Chem.* 2004; 279: 54510–54517.
- Neves, D. P. – Filo Arthropoda . In: *Parasitologia humana*. 10ª edição, São Paulo, Ed. Atheneu; 2000.
- Nkabyo YS, Ziegler TR, Gu LH, Watson WH, Jones DP. Glutathione and thioredoxin redox during differentiation in human colon epithelial (Caco-2) cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2002; 283: G1352– G1359.
- Nogueira NP, de Souza CF, Saraiva FM, Sultano PE, Dalmau SR, Bruno RE, Gonçalves Rde L, Laranja GA, Leal LH, Coelho MG, Masuda CA, Oliveira MF, Paes MC. Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. *PLoS One.* 2011; 6(10): e25935.
- O'Donnell MJ, Maddrell SHJ. Paracellular and transcellular routes for water and solute movements across insect epithelia. *Exp Biol.* 1983; 106: 231–253.
- Okado-Matsumoto A, Fridovich I. Subcellular distribution of superoxide dismutases (SOD) in rat liver: Cu,Zn-SOD in mitochondria. *J Biol Chem.* 2001; 276: 38388–38393.
- Oliveira MF, d'Avila JCP, Torres CR, Oliveira PL, Tempone AJ, Rumjanek FD, Silva JR, Dansa-Petretski M, Oliveira MA, de Souza W, Braga CMS, Ferreira ST. Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol Biochem Parasitol.* 2000a; 111: 217–221.
- Oliveira MF, Gandara AC, Braga CM, Silva JR, Mury FB, Dansa-Petretski M, Menezes D, Vannier-Santos MA, Oliveira PL. Heme crystallization in the midgut of triatomine insects. *Comp Biochem Physiol.* 2007; C146: 168–174.
- Oliveira MF, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Souza W, Braga CMS, Masuda H, Oliveira PL. Haemozoin formation in the midgut of the blood sucking insect *Rhodnius prolixus*. *FEBS Lett.* 2000b; 477: 95–98.

- Oliveira MF, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Souza W, Lins U, Braga CMS, Masuda H, Oliveira PL. Haem detoxification by an insect. *Nature*. 1999; 400: 517–518.
- Oliveira MF, Timm BL, Machado EA, Miranda K, Attias M, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Oliveira MA de Souza W, Pinhal NM, Sousa JJ, Vugman NV, Oliveira PL. On the pro-oxidant effects of haemozoin. *FEBS Lett*. 2002; 512: 139–144.
- Opperdoes FR, Michels PA. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends Parasitol*. 2008; 24: 310–317.
- Orengo JM, Leliwa-Sytek A, Evans JE, Evans B, van de Hoef D, Nyako M, Day K, Rodriguez A. Uric acid is a mediator of the *Plasmodium falciparum* induced inflammatory response. 2009; 4(4): e5194.
- Orengo JM, Evans JE, Bettio E, Leliwa-Sytek A, Day K, Rodriguez A. *Plasmodium*-induced inflammation by uric acid. *PLoS Pathog*. 2008; 4:e1000013.
- Paes MC, Cosentino-Gomes D, de Souza CF, Nogueira NP, Meyer-Fernandes JR. The role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol Res*. 2011; 2011: 174614.
- Paes MC, Oliveira PL. Extracellular glutathione peroxidase from the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Arch Insec Biochem Physiol*. 1999; 41: 171–177.
- Pagola S, Stephens PW, Bohle DS, Kosar AD, Madsen SK. The structure of malaria pigment beta-haematin. *Nature*. 2000; 404: 307–310.
- Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, Correa A, Dallagiovanna B, Cayota A, Krieger M, Goldenberg S, Robello C. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *J Mass Spectrom*. 2007; 42: 1422–1432.
- Peloso EF, Vitor SC, Ribeiro LHG, Piñeyro MD, Robello C, Gadelha FR. Role of *Trypanosoma cruzi* peroxiredoxins in mitochondrial bioenergetics. *J Bioenerg Biomembr*. 2011; 43: 419–424.
- Pereira MG, Nakayasu ES, Sant'Anna C, De Cicco NN, Atella GC, de Souza W, Almeida IC, Cunha-e-Silva N. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. *PLoS One*. 2011; 6:e22359.
- Perlowagora-Szumlewicz A, Muller CA, Moreira CJ. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 4- the reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Rev Saude Publica*. 1990; 24: 165–177.
- Peterson TM, Gow AJ, Luckhart S. Nitric oxide metabolites induced in *Anopheles stephensi* control malaria parasite infection. *Free Radic Biol Med*. 2007; 42: 132–142.

- Piacenza L, Peluffo G, Alvarez M N, Kelly JM, Wilkinson SR, Radi R. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem J*. 2008; 410: 359–368.
- Piacenza L, Alvarez MN, Peluffo G, Radi R. Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. *Curr Opin Microbiol*. 2009; 12: 415–421.
- Piñeyro MD, Parodi-Talice A, Arcari T, Robello C. Peroxiredoxins from *Trypanosoma cruzi*: virulence factors and drug targets for treatment of Chagas disease? *Gene*. 2008; 31; 408: 45–50.
- Ponka P. Cell Biology of Heme. *Am J Med Sc*. 1999; 318: 241–256.
- Rhee SG, Yang KS, Kang SW, Woo HA, Chang TS. Controlled elimination of intracellular H₂O₂ regulation of peroxiredoxin, catalase, and glutathione peroxidase via post-translational modification. *Antioxid Red Sig* 2005; 7: 5–6.
- 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.
- Romaña C. Acerca de un 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.
- Rozen S, Skaletsky HJ. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S. (eds) *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Humana Press, Totowa, NJ 2000; 365-386.
- Ryter SW, Tyrrell RM The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med*. 2000; 28: 289–309.
- 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: 103–114.
- Schaub GA, Lösch P. *Trypanosoma cruzi*: Origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. *Exp Parasitol*. 1988; 65: 174–186.
- Schaub GA. Does *Trypanosoma cruzi* stress its vectors? *Parasitol Today*. 1989; 5: 185–188.
- Schaub GA. Parasitogenic alterations of vector behaviour. *Intern J Med Microbiol*. 2006; 296: 37–40.
- Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, Cura C, Auter F, Veron V, Qvarnstrom Y, *et al*. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5: e931.

- Schmidt GD, Roberts LS. Kinetoplastida: Trypanosomes and their skin. In: Foundations of Parasitology. 4 ed. Times Mirror/ Mosby College Publishing, 1989. p. 55–80.
- Schmitt TH, Frezzatti WA, Schreier S. Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. Arch Biochem Biophys. 1993; 307: 96–103.
- Schmunis GA, Yadon ZE. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. Acta Trop. 2009; 115: 14-21.
- Schofield CJ, Galvão C. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Trop. 2009; 110: 88–100.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. Trends Parasitol. 2006; 22: 583–588.
- Shapiro TA, Englund PT. The structure and replication of kinetoplast DNA. Ann Rev Microbiol 1995; 49: 117–143.
- Sies H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. In: Oxidative Stress, edited by Sies H. London, Academic Press: London. 1985, pp. 1–8.
- Silva-Neto MA, Carneiro AB, Silva-Cardoso L, Atella GC. Lysophosphatidylcholine: A Novel Modulator of *Trypanosoma cruzi* Transmission. J Parasitol Res. 2012; 2012: 625838.
- Slater AF, Swiggard WJ, Orton BR, Flitter WD, Goldberg DE, Cerami A, Henderson GB. An iron–carboxylate bond links the heme units of malaria pigment. Proc Natl Acad Sci. 1991; 88: 325–329.
- 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: 541–546.
- 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.
- Steenkamp DJ. Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids. Antioxid Redox Signal. 2002; 4:105–121.
- Stiebler R, Timm BL, Oliveira PL, Hearne GR, Egan TJ, e cols. On the physico-chemical and physiological requirements of hemozoin formation promoted by perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus* midgut. Insect Biochem Mol Biol 2010; 40: 284–292.
- Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. Int Rev Cytol. 1992; 141: 65-88.

- Suh YA, Arnold RS, Lassegue B, Shi J, Xu X, Sorescu D, Chung AB, Griendling KK, Lambeth JD. Cell transformation by the superoxide-generating oxidase Mox1. *Nature*. 1999; 401: 79–82.
- Sullivan JJ. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: a simplified procedure. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982; 76: 300-303.
- Suzuki YJ, Ford GD. Redox regulation of signal transduction in cardiac and smooth muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1999; 31: 345–353.
- Sztatowski TP, Nathan CF. Production of large amounts of hydrogen peroxide by human tumor cells. *Cancer Res*. 1991; 51: 794–798.
- Sztajer H, Gamain B, Aumann KD, Slomiannyi C, Becker K, Brigelius-Flohe R, Flohé L. The putative glutathione peroxidase gene of *Plasmodium falciparum* codes for a thioredoxin peroxidase. *J Biol Chem*. 2001; 276: 7397–7403.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas disease. *Clin Microbiol Rev*. 1992; 5: 400–419.
- Tappel AL. Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. *J Biol Chem* 1955; 217: 721–733.
- Tetaud E, Fairlamb AH. Cloning, expression and reconstitution of the trypanothione-dependent peroxidase system of *Crithidia fasciculata*. *Mol Biochem Parasitol*. 1998; 96: 111–123.
- Tibayrenc M 1998. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *Int J Parasitol* 28: 85–104.
- Tonelli RR, Augusto LS, Castilho BA, Schenkman S. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2a is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms 2011; 6 (11): e27904.
- Turrens JF. Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J. Physiol*. 2003; 552: 335–344.
- Turrens JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. *Mol Asp Med*. 2004; 25: 211–220.
- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revised. *Int J Parasitol*. 2001; 31: 472–481.
- Ursini F, Maiorino M, Brigelius-Flohé R, Aumann KD, Roveri A, Schomburg D, Flohé L. Diversity of glutathione peroxidases. *Methods Enzymol*. 1995; 252: 38–53.
- Vaidian AK, Weiss LM, Tanowitz HB. Chagas' disease and AIDS. *Kinetoplastid Biol Dis* 2004; 3: 2–6.

- Vallejo GA, Guhl F, Schaub GA. Triatominae–*Trypanosoma cruzi*/*T. rangeli*: Vector–parasite interactions. *Acta Trop*. 2009; 110: 137–147.
- Vanhame L, Pays E. Control of gene expression in Trypanosomes. *Microbiol Rev* 1995; 59: 223–240.
- Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1911; 3: 276–294.
- Vickerman K. Phylum Zoomastigina - Class Kinetoplastida. In: *Handbook of Protozoa*. Boston: James and Bartlett Publishers; 1990. p. 215-238.
- 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.
- Vieira M, Rohloff P, Luo S, Cunha-E-Silva NL, De Souza W, Docampo R. Role for a P-type H⁺-ATPase in the acidification of the endocytic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 2005; 392: 467–474.
- Villalta F, Scharfstein J, Ashton AW, Tyler KM, Guan F, Mukherjee S, Lima MF, Alvarez S, Weiss LM, Huang H, Machado FS, Tanowitz HB. Perspectives on the *Trypanosoma cruzi*–host cell receptor interactions. *Parasitol Res*. 2009; 104: 1251–1260.
- Vizioli J, Richman AM, Uttenweiler-Joseph S, Blass C, Bulet P. The defensin peptide of the malaria vector mosquito *Anopheles gambiae*: antimicrobial activities and expression in adult mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol*. 2001; 31: 241–248.
- Wainszelbaum MJ, Belaunzarán ML, Lammel EM, Florin-Christensen M, Florin-Christensen J, Isola ELD. Free fatty acids induce cell differentiation to infective forms in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 2003; 375: 705–712.
- Watanabe S, Kang DH, Feng L. Uric acid, hominoid evolution, and the pathogenesis of salt-sensitivity. *Hypert*. 2002; 40: 355–360.
- Weisiger RA, Fridovich I. Mitochondrial superoxide simutase: site of synthesis and intra mitochondrial localization. *J Biol Chem*. 1973a; 248: 4793–4796.
- Weisiger RA, Fridovich I. Superoxide dismutase: organelle specificity. *J Biol Chem*. 1973b; 248: 3582–3592.
- WHO (2010). Fact sheet N° 340. June 2010 from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/print.html> (acesso em Março 2012).
- WHO. Chagas’ disease. In: *Weekly Epidemiological Record*, World Health Organization. Geneva, 2002; 2: 10–12.

- Wiese AG, Pacifici RE, Davies KJ. Transient adaptation to oxidative stress in mammalian cells. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 318: 231–240.
- Wigglesworth VB. The fate of haemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. *Proc R Soc. London* 1943; 131: 313–339.
- Wigglesworth VB. The physiology of excretion in a blood-sucking insect. *Rhodnius prolixus*. III. The mechanism of uric acid excretion. *J Exp Biol.* 1931; 8: 443–451.
- Wilkinson SR, Horn D, Prathalingam SR, Kelly JM. RNA interference identifies two hydroperoxide metabolizing enzymes that are essential to the bloodstream form of the african trypanosome. *J Biol Chem.* 2003; 278: 31640–31646.
- Wilkinson SR, Kelly JM. Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med.* 2009; 29(11): e31.
- Wilkinson SR, Meyer DJ, Kelly JM. Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity. *Biochem J.* 2000; 352: 755–761.
- Wilkinson SR, Obado SO, Mauricio EL, Kelly JM. *Trypanosoma cruzi* expresses a plant-like ascorbate-dependent hemoperoxidase localized to the endoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002a; 99: 13453–13458.
- Wilkinson SR, Prathalingam SR, Taylor MC, Ahmed A, Horn D, Kelly JM. Functional characterisation of the iron superoxide dismutase gene repertoire in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic Biol Med.* 2006; 40: 198–209.
- Wilkinson SR, Taylor MC, Touitha S, Mauricio IL, Meyer D, Kelly J. TcGPXII, a glutathione-dependent *Trypanosoma cruzi* peroxidase with substrate specificity restricted to fatty acid and phospholipid hydroperoxides, is localized to the endoplasmic reticulum. *Biochem J.* 2002b; 364: 787–974.
- Winterbourn CC, Vissers MC, Kettle AJ. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol.* 2000; 7: 53–58.
- Wrona M, Patel KB, Wardman P Reactivity of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein and dihydrorhodamine 123 and their oxidized forms towards carbonate, nitrogen dioxide, and hydroxyl radicals. *Free Radic. Biol. Med.* 2005; 38: 262–270.
- Yamada-Ogatta SF, Motta MC, Toma HK, Monteiro-Goes V, Avila AR, Muniz BD, Nakamura C, Fragoso SP, Goldenberg S, Krieger MA. *Trypanosoma cruzi*: cloning and characterization of two genes whose expression is up-regulated in metacyclic trypomastigotes. *Acta Trop.* 2004; 90: 171–179.
- Yoshida N. Molecular mechanisms of *Trypanosoma cruzi* infection by oral route. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 101–107.
- Zhao H, Joseph J, Fales HM, Sokoloski EA, Levine RL, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Detection and characterization of the product of hydroethidine and

intracellular superoxide by HPLC and limitations of fluorescence. *Proc Natl Acad Sci.* 2005; 102: 5727–5732.

- Zhao H, Kalivendi S, Zhang H, Joseph J, Nithipatikom K, Vasquez-Vivar J, Kalyanaraman B. Superoxide reacts with hydroethidine but forms a fluorescent product that is distinctly different from ethidium: potential implications in intracellular fluorescence detection of superoxide. *Free Radic Biol Med.* 2003; 34: 1359–1368.
- Zhou M, Diwu Z, Panchuk-Voloshina N, Haugland RP. A stable nonfluorescent derivative of resorufin for the fluorometric determination of trace hydrogen peroxide: applications in detecting the activity of phagocyte NADPH oxidase and other oxidases. *Anal Biochem.* 1997; 253: 162–168.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG; Second Satellite Meeting. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009; 104: 1051–1054.
- Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications *Infect Genet Evol.* 2012; 12: 240–253.
- Zoete V, Bailly F, Vezin H, Teissier E, Duriez P, Fruchart JC, Catteau JP, Bernier JL. 4-Mercaptoimidazoles derived from the naturally occurring antioxidant ovothiols 1. Antioxidant properties. *Free Radic Res.* 2000; 32: 515–524.

Review Article

The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*

Marcia Cristina Paes,^{1,2} Daniela Cosentino-Gomes,^{3,4} Cíntia Fernandes de Souza,^{1,2}
Natália Pereira de Almeida Nogueira,¹ and José Roberto Meyer-Fernandes^{3,4}

¹Laboratório de Interação de Tripanossomatídeos e Vetores, Departamento de Bioquímica, IBRAG, UERJ, 20521-160 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

²Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia-Entomologia Molecular (INCT-EM), 21941-521 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

³Laboratório de Bioquímica Celular, Instituto de Bioquímica Médica, Centro de Ciências da Saúde, UFRJ, 21941-521 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

⁴Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem, 21941-521 Rio de Janeiro, RJ, Brazil

Correspondence should be addressed to Marcia Cristina Paes, mcpaes@uerj.br

Received 8 June 2011; Accepted 15 August 2011

Academic Editor: Xin-zhuan Su

Copyright © 2011 Marcia Cristina Paes et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Trypanosoma cruzi, the protozoan responsible for Chagas disease, has a complex life cycle comprehending two distinct hosts and a series of morphological and functional transformations. Hemoglobin degradation inside the insect vector releases high amounts of heme, and this molecule is known to exert a number of physiological functions. Moreover, the absence of its complete biosynthetic pathway in *T. cruzi* indicates heme as an essential molecule for this trypanosomatid survival. Within the hosts, *T. cruzi* has to cope with sudden environmental changes especially in the redox status and heme is able to increase the basal production of reactive oxygen species (ROS) which can be also produced as byproducts of the parasite aerobic metabolism. In this regard, ROS sensing is likely to be an important mechanism for the adaptation and interaction of these organisms with their hosts. In this paper we discuss the main features of heme and ROS susceptibility in *T. cruzi* biology.

1. *Trypanosoma cruzi* and Its Biological Cycle

Trypanosoma cruzi comprises a complex group of parasite populations circulating among humans, vectors, reservoirs, and wild and domestic animals [1]. This parasite is the causative agent of Chagas disease or American trypanosomiasis [2] and is transmitted through triatomine vectors, which are blood-sucking insects, when they feed on the vertebrate host.

After an insect feeds on the blood of an infected vertebrate, the development cycle of the parasite begins in the intestinal tract of triatomines. In the anterior midgut, most blood trypomastigotes transform into epimastigotes a few hours after ingestion. Some epimastigotes multiply by longitudinal binary fission, and in the insect rectum, a new differentiation occurs (metacyclogenesis process) in which epimastigotes are transformed into metacyclic trypomastigotes.

These metacyclic trypomastigotes (highly infectious) are shed in feces and reach the bloodstream of a new vertebrate host after this host scratches an insect bite. The organisms penetrate the mucosa where there are many macrophages; after intense multiplication in the host cell in the form of amastigotes, they transform into trypomastigotes again, returning to the vertebrate circulation and completing the cycle [3]. These series of morphological and biochemical transformations in the life cycle may occur in response to external stimuli [4]. Recently, reactive oxygen species (ROS) and heme have been hypothesized to be important signaling molecules. In this way, protozoan parasites, which are specifically located in places where these molecules are constantly released, must evolve special mechanisms to take advantage of them. This paper will focus on the principal features of heme in *T. cruzi* biology and how different forms of these parasites are susceptible to ROS.

2. Vectors of *Trypanosoma cruzi*

2.1. Biting Patterns and Importance of the Heme Molecule.

Both the *Rhodnius prolixus* and *Triatoma infestans* species are very important in disease transmission. Differentiation into each of the five larval stages and the adult stage of these organisms is determined by their food. These blood-sucking insects ingest 6 to 12 times their original weight in blood. Usually, approximately 10 mM of heme bound to hemoglobin is obtained in a single ingestion [5].

Heme is a ubiquitous molecule usually associated with polypeptide chains through interactions between the iron atom and histidine or methionine residues. Heme catalyzes many oxidation processes in biological systems and is very important in cellular functions, as it is involved in oxygen transport (hemoglobin and myoglobin), in cellular respiration (cytochromes), in antioxidant defenses (peroxidases), in drug detoxification enzyme (P450), and cell signalling regulation (nitric oxide synthase) [6, 7]. Therefore, heme and hemeproteins are involved in basic functions such as oxygen sensitivity, cellular respiration, metabolism, growth, renewal, and cell differentiation, which are all essential for the survival of organisms. Moreover, heme is a toxic molecule due to its ability to generate reactive oxygen species and its amphiphilic features, to associate with lipid membranes, leading to altered membrane permeabilization and cell disruption [8–11].

2.2. Heme Uptake by *T. cruzi* Epimastigotes. The literature reports that there are some organisms that depend on essential hemeproteins but lack a heme biosynthetic pathway in part or in total; trypanosomatids are included in this group [12, 13]. In fact, biochemical and genomic studies have demonstrated the absence of key enzymes of heme biosynthesis in *T. cruzi* [14, 15]. In this regard, it is plausible that these parasites take up heme from the midgut of their vector.

In fact, during the development of *T. cruzi* epimastigotes in the digestive tract of insects, parasites utilize exogenous growth factors. Using ultrastructural studies, it has been noted that these factors are taken up by endocytosis via the flagellar pocket and the cytostome [16]. The cytostome, present in the anterior region of the cell near the flagellar pocket, is the preferred site of entry of bovine albumin and transferrin, and are reservosomes, the mature form of endosomes [17].

Interestingly, internalization of heme and hemoglobin proceeds through different routes and/or mechanisms. It has been shown through fluorescence microscopy using fluorescent heme analogues that entry is not modified by lowering the temperature, by preincubation with unlabeled hemoglobin or by reduction of ATP production. On the other hand, the transport of heme is compromised by the addition of cyclosporine, an inhibitor of ATP Binding Cassette- (ABC-) type transporters. This is the first evidence that heme uptake involves the activity of a P-glycoprotein (Pgp) homologue, an ABC transporter [18]. It has also been inferred that other insect trypanosomatids including

Crithidia deanei, *Crithidia oncopelti*, and *Blastocrithidia culicis* obtain haem from their bacterial endosymbionts [19].

2.3. The Intracellular Trafficking of Heme in *T. cruzi* Epimastigotes. Although fluorescent analogue of heme is internalized faster than hemoglobin in *T. cruzi*, suggesting the existence of two different pathways used to target molecules, the intracellular traffic of heme is the same as other various molecules, including several proteins [18, 20]. Heme internalization starts at the cytostome, involving vesicles that travel along the cell body (early endosomes), and ends at the reservosomes, which have been described as a site for protein and lipid accumulation [18].

2.4. Heme as a Signaling Molecule in *T. cruzi* Proliferation. Malaquias and Oliveira [21] showed that, when exposed to mitogenic factors present in fetal serum, *T. cruzi* cells are stimulated by phosphoinositide-specific phospholipase C (PI-PLC), leading to the accumulation of phosphatidylinositol 3-phosphate (IP3) and diacylglycerol (DAG) and increasing their proliferation. Recent studies have shown the importance of second messengers in differentiation of trypanosomatids, including *T. brucei*-induced cAMP (adenosine 3'-5' cyclic monophosphate) [22]. Several serine/threonine kinases, including a cyclin-dependent kinases [23] and a cAMP-dependent protein kinase (PKA) [24], phosphatidylinositol 3-kinase [25], a calcium-dependent protein kinase (PKC) [26], and a kinase dependent on calcium/calmodulin [27], have been identified in *T. cruzi* epimastigotes through biochemical studies, and in some cases, through molecular studies as well, such as PKA [28, 29]. The identification of these kinases groups has been corroborated by Parsons et al. [30]. Also in *T. cruzi*, before the differentiation of epimastigotes into metacyclic trypomastigotes, cAMP levels increase three- to fourfold inducing the differentiation of *T. cruzi* epimastigotes to metacyclic trypomastigotes [31].

It has been shown that heme, but not hemoglobin or its peptides, stimulates *T. cruzi* proliferation *in vitro* in a dose-dependent manner. Different strains were tested (Y and Dm28c), and both increased in the same manner. Further, a wide heme concentration range was employed, and even at higher concentrations, cells proliferated following the heme addition [18]. The authors hypothesized that heme could drive *T. cruzi* proliferation through a kinase cascade.

Heme-induced growth of epimastigotes is not affected by inhibitors of cGMP-dependent protein kinase (PKG), PKC, PKA, PI3K, or cyclin-dependent kinase. Moreover addition of KN 93 and Myr-AIP (inhibitors of calmodulin kinase) to a culture of these cells reduces the expected growth, indicating the involvement of calmodulin kinase in heme-mediated cell signaling [32]. Furthermore, the authors showed that heme-induced *T. cruzi* growth is associated with CaMKII [31], demonstrating a signaling role for the heme molecule in the biological cycle of *Trypanosoma cruzi*. Recently, heme was shown to modulate a (Na⁺ + K⁺) ATPase, via heme receptor-mediated stimulation of the PI-PLC/PKC signaling pathway in *Leishmania amazonensis* [33]. On the other hand, in *Trypanosoma brucei brucei* this biomolecule may

be involved in nutritional control; it was able to inhibit activity of ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolases (E-NTPDases), an enzyme that is involved in the generation of free adenosine outside of the cell, together with ecto-5'-nucleotidase [34].

2.5. Redox Metabolism of *T. cruzi*. As a protozoan parasite of vertebrate and invertebrate hosts, *T. cruzi* is susceptible to a number of oxidative killing mechanisms, including reactive oxygen species (ROS). ROS can be produced during the degradation of hemoglobin in the midgut of insect vector as a consequence of the release of high amounts of heme or as a byproduct of *T. cruzi* aerobic metabolism [5, 35]. During respiration, molecular oxygen can undergo partial reduction, giving rise to relatively stable species, by accepting one, two, or three electrons, with the formation of superoxide anions $O_2^{\bullet-}$, hydrogen peroxide (H_2O_2), and hydroxyl radicals ($\bullet OH$), respectively [36]. High rates of $O_2^{\bullet-}$ can also be produced by the NADPH oxidase complex, which becomes active immediately after phagocytosis by macrophages. Superoxide radicals can also generate the formation of H_2O_2 by spontaneous or SOD-catalyzed dismutation [37].

The mitochondria are the main source of ROS generation in most eukaryotic cells. Mitochondrial ROS are recognized as the key element in cell signaling processes and in a variety of degenerative mechanisms [38]. The Trypanosomatidae family is characterized by a single long mitochondrion with a dilated region known as the kinetoplast, in which mitochondrial DNA (kDNA) is observed [39]. Despite these peculiar characteristics, mitochondria of trypanosomatids are able to generate and sustain a membrane potential comparable to mammalian mitochondria [40].

Like other trypanosomatids, *T. cruzi* has an intricate antioxidant defense system that varies with their life stages and is distinct from its mammal host and insect vector in its complexity. In contrast to their hosts, trypanosomatids lack GSH/glutathione reductase (GR) and thioredoxin/thioredoxin reductase systems. Their redox metabolism depends on a particular dithiol called trypanothione and its corresponding reductase, trypanothione reductase (TryR). Moreover, *T. cruzi* lacks catalase and glutathione peroxidase (GPx), two major eukaryotic enzymes employed in the detoxification of peroxides. In spite of the absence of these two enzymes, *T. cruzi* possesses two peroxiredoxins, an ascorbate-dependent hemoperoxidase, several distinct peroxidases, of which at least two share sequence homology with GPx, and four iron-containing superoxide dismutases (SOD). For a complete review of redox metabolism in *T. cruzi*, see [41]. A controlled balance between extracellular ROS production and the ability of the cell to deal with these oxidants may predict the success of certain life stages in colonization and survival within the host.

3. Differential Susceptibility of *T. cruzi* Life Stages to ROS

T. cruzi responds differently to oxidative stress depending on its life stage. Analysis of 10 strains from *T. cruzi* demonstrated

a significant increase in trypanothione synthetase (TryS) and in cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase isoforms, during differentiation from the noninfective epimastigote to the infective metacyclic trypomastigote form. Moreover, these elevations in antioxidant enzymes were shown to be more pronounced in the virulent strains than in attenuated ones [42]. At the same time, ascorbate peroxidase and TryR remained unchanged during the different life stages of the parasite [42].

These differences in sensitivity correlated with the genetic diversity between the lineages *T. cruzi*. A comparative study between two different strains of *T. cruzi*, the Tulahuén strain (*T. cruzi* VI [43], previously classified as *T. cruzi* I) and the Y strain (*T. cruzi* II), showed significant differences in the resistance to H_2O_2 treatment. Epimastigote forms of Tulahuén strain were shown to be more resistant to H_2O_2 than Y strain, presenting higher activity of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), an enzyme implicated in the supply of NADPH, due to proper function of the trypanothione-dependent system and an increase in the cytosolic tryparedoxin peroxidase (TcCPx) content [35, 44]. Interestingly, Tulahuén strain was shown to be more susceptible to benzimidazole, a well known prooxidant trypanocidal drug, than Y strain [45, 46]. In agreement with these findings, the *T. cruzi* I strains Col1.7G2 and Silvio X-10 cl1 displayed more resistance to H_2O_2 treatment than the *T. cruzi* II strains JG and Esmeraldo cl3. Nevertheless, in contrast to the phenotypes observed with the Y and Tulahuén strains, these differences could not be attributed to differences in the redox potential of the strains analyzed [47]. In this case, the differential sensitivity to oxidative stress was suggested to be due to changes in the activity of MSH2, a central component of the DNA mutation and mismatch repair (MMR) machinery [47]. The MMR has a key function in recognizing and repairing base mismatches and frame shift mismatches that escape DNA polymerase proofreading during DNA replication [48].

With respect to life stage, *T. cruzi* epimastigotes seem to be more susceptible to the generation of H_2O_2 resulting from xanthine oxidase activity in the serum of chagasic patients lacking a complement system. The treatment of epimastigotes with this serum resulted in an inhibition of cell growth *in vitro*, a decrease in SOD activity, and an increase in membrane lipid peroxidation. Interestingly, the same results were not observed when parasites were treated with serum from healthy individuals [49]. Why epimastigotes have higher susceptibility to human serum than infective forms is unclear, but the exposure of epimastigotes to fresh human serum over a short period of time led to a decrease in cell respiration, loss of mitochondrial membrane potential, increased $O_2^{\bullet-}$ production, and release of cytochrome *c*, a process characteristic of programmed cell death [50]. Moreover, it seems that the mitochondrion has a fundamental role in epimastigote-dependent complement activation; an accumulation of high amounts of Ca^{2+} inside the mitochondrial matrix was observed, causing partial dissipation of the inner membrane potential and $O_2^{\bullet-}$ production [51]. In addition to causing an endogenous increase of $O_2^{\bullet-}$ during contact of epimastigotes with human serum,

this noninfective stage also triggers $O_2^{\cdot-}$ formation by macrophages, with high, almost lethal, toxicity to the cell because of the formation of peroxynitrite [52–54]. On the other hand, infective trypomastigotes may be less exposed to peroxynitrite, as these forms may not stimulate the respiratory burst efficiently [54]. Nevertheless, internalization of *T. cruzi* trypomastigotes by macrophages may activate NADPH oxidase, which is involved in $O_2^{\cdot-}$ production and peroxynitrite formation. These forms also showed a higher sensitivity to peroxynitrite than to H_2O_2 [37]. Conversely, Tanaka et al. [55] demonstrated that H_2O_2 is the main oxygen metabolite responsible for killing *T. cruzi* inside macrophages, and *T. cruzi* trypomastigotes were shown to be more resistant to killing by H_2O_2 than were the epimastigotes. The LD_{50} at which epimastigotes were killed was 6.0 nmol/min/ml of H_2O_2 , while the LD_{50} for trypomastigotes was 8.7 nmol/min/ml of H_2O_2 *in vitro* [55]. Exposure of metacyclic trypomastigotes to 70 μM H_2O_2 for 6 h caused an increase of 46-fold in G6PDH specific activity, while G6PDH activity from epimastigote forms presented a time-dependent decrease at the same conditions [56]. It seems that trypomastigotes are more resistant to killing by activated primary macrophages or by increased oxygen radicals than epimastigotes [55]. Nevertheless, overexpression of epimastigote TcCPX increased parasite virulence and resistance to macrophage killing [57]. In trypomastigotes, the increased expression of antioxidant enzymes may also be involved in the persistence of these forms in the serum [41, 58, 59] or inside macrophages during phagocytosis. In agreement with this thought, trypomastigotes with TcCPX overexpressed, caused an increase in parasitemia and tissue inflammation during mouse infections [37]. More severe infections were also observed within metastatic forms of *Leishmania*; this was suggested to be due to the functional activity of peroxiredoxin [60]. Therefore *T. cruzi* antioxidant defense could be considered an important virulence factor [37, 57].

Although *T. cruzi* epimastigotes are shown to be more sensitive to ROS, these cells can tolerate various levels of oxidants. Pretreatment of *T. cruzi* epimastigotes with low H_2O_2 concentrations (15–20 μM) allowed an increase in cell proliferation of parasites, accompanied by a transient adaptation response to higher H_2O_2 concentrations [35]. Moreover, transient oxidative stress can also induce *T. cruzi* epimastigotes growth by heme stimulation via a mechanism mediated by a CaM Kinase II-like pathway [61]. This adaptation mechanism could be related to increasing expression levels of arginine kinase, an enzyme involved in the interconversion between phosphoarginine, a molecule with high energetic potential like creatine, and ATP. The process was suggested to be independent of redox content, indicating the participation of an unknown stress response mechanism [62].

4. Redox Metabolism and Drug Resistance

The drugs currently used against Chagas disease are nifurtimox and benznidazole, two nitro chemotherapeutic agents described to have trypanocidal effects and an ability to

generate ROS. ROS generation may occur through the reduction of the nitro group by the action of nitro anion radical or hydronitroxide radical which then may react with molecular oxygen generating $O_2^{\cdot-}$. [63, 64]. Susceptibility of *T. cruzi* to nifurtimox and benznidazole has been described as correlated with the levels of free and conjugated glutathione [63, 65]. Treatment of *T. cruzi* cultures with nifurtimox or benznidazole resulted in a loss of reduced thiol compounds (GSH, trypanothione and glutathionyl spermidine), which was suggested to be probably due to the conjugation of these compounds with reduced metabolites of the nitro drugs rather than an oxidation effect on thiol consumption [65, 66]. Besides, it was also observed that redox-cycling activity of nifurtimox was only acquired at high concentrations doses (>400 μM), two orders of magnitude higher than that required for antiproliferative activity [66]. Moreover, nifurtimox has been reported to act as an inhibitor of *T. cruzi* trypanothione reductase, an enzyme responsible for the maintenance of reduced state of the intracellular thiols [67, 68]. The total amount of free or conjugated glutathione may vary greatly either between different strains of *T. cruzi* or between the different life stages of a unique strain, with the following differentiation sequence: epimastigote > trypomastigote > amastigote [64]. These differences in thiol contents could explain the diversity in resistance of *T. cruzi* stages to treatment with these drugs and in its sensibility to ROS. The resistance of *T. cruzi* to trypanocidal drugs can also be associated with higher expression of enzymatic antioxidants. *In vitro*-induced *T. cruzi* resistant to benznidazole presented an increase in the expression of the cytosolic and mitochondrial tryparedoxin peroxidase isoforms and in FeSOD isoforms, compared with the correspondent sensitive lineage. [69–71]. Interestingly, these observations were not involved in naturally resistant strains [69–71]. In *T. brucei*, null mutants for SODB1 (cytosolic, glycosomal) exhibited 3-fold increased susceptibility to nifurtimox than wild-type cells [72]. It seems that nifurtimox and benznidazole divert thiol compounds from their ability to act as free radical scavengers. Therefore the protection against the toxic effects of ROS might rely on enzymatic antioxidant activities. Antioxidant defenses and drug susceptibility of most studied *T. cruzi* strains are summarized in Table 1.

With respect to the search for alternative drugs for Chagas disease, the activity of natural compounds such as naphthoquinones, natural products of several families of higher plants, has been extensively investigated [73]. Like nifurtimox and benznidazole, the cytotoxicity of naphthoquinones has been implicated in redox cycling and ROS generation [74]. Recently, three derivative compounds of C-allyl lawsone (2-hydroxy-3-allyl-1,4-naphthoquinone) were shown to be effective against intracellular amastigotes, decreasing the percentage of infection in murine macrophages, with low toxicity to host cells. Indeed, it seems that this compound is involved in mitochondrial damage, accompanied by an increase in H_2O_2 generation. Epimastigotes were shown to be more resistant than trypomastigotes to treatment with these compounds, despite having a more sensitive mitochondrion and higher accumulation of H_2O_2 within the cells [75]. Another type of naphthoquinone, an

TABLE 1: Antioxidant defenses and drug susceptibility of *T. cruzi* strains.

| Strain | DTU* | Redox state | Drug susceptibility | Reference |
|------------|------|---|---------------------------------|--------------|
| Y | II | Low concentrations of antioxidant enzymes; lower activity of G6PDH | Resistant | [42, 44] |
| Tulahuen | VI | High concentrations of antioxidant enzymes; higher activity of G6PDH; lower Thiol contents | Susceptible | [42, 44, 65] |
| Colombiana | I | High concentrations of antioxidant enzymes; no alteration of TcCPX and TcMPX and FeSOD isoforms | Resistant (natural) | [42, 69–71] |
| Cl Brener | VI | No alteration of TcCPX and TcMPX and FeSOD isoforms | Susceptible (<i>in vitro</i>) | [69–71] |

* Discrete typing units (DTUs), according to Zingales et al., 2009 [43].

α -lapachone derivative, was shown to have a trypanocidal effect. This compound was tested against two strains of *T. cruzi*, the Y strain (*T. cruzi* II) and the Colombian strain (*T. cruzi* I), which presented higher resistance to the treatment than Y. In line with these findings, the Y strain is partially resistant and the Colombian strain is highly resistant to the chemotherapeutic agents currently in use. In contrast with the other naphthoquinones, this α -lapachone derivative does not have the capacity to generate free radicals, instead, it might function in the inhibition of proteinases [76]. Although sensibility to ROS may be related to the different *T. cruzi* groups, *in vitro* analysis of prooxidant drugs susceptibility between *T. cruzi* I and *T. cruzi* II strains showed no significant differences [45, 46]. However, correlation between the susceptibility to benznidazole in distinct genetic groups of *T. cruzi* has been described [77]. The subject is still controversial, and in this case, geographic distribution and phylogenetic distances of parasites must be considered [45].

5. Conclusions

T. cruzi epimastigotes present divergent behavior after exposure to oxidative stress. It seems that these cells can deal with external addition of H₂O₂, on the other hand, the generation of ROS from mammalian sites like serum and the immune system represents a challenge to these cells. For example, membrane-bound phosphatases from *T. cruzi* are more resistant to the addition of sublethal doses of hydrogen peroxide than *Trypanosoma rangeli* phosphatase [78]. Interestingly, the concentrations of trypanothione vary between 1.52–2.1 mM in epimastigotes, 0.5 mM in trypomastigotes, and 0.12 mM in amastigotes [41]. At the same time, there is an increase in the expression of antioxidant enzymes during the differentiation of *T. cruzi* from a noninfective form to the infective form, trypomastigotes [41, 58]. In contrast, stress-induced oxidant resistance in *Leishmania chagasi* is not accompanied by an increase in ROS scavengers, but instead is suggested to be associated with heat shock proteins like HSP70 [79, 80]. The mechanism by which *T. cruzi* escape from the oxidative burst of mammalian macrophages is still unknown; nevertheless, exposure of phosphatidylserine on the surface of trypomastigotes surface induces a deactivating

effect on macrophages. This profile is also seen in apoptotic cells as a means to avoid anti-inflammatory responses [67].

There is a growing interest in understanding how ROS could be involved in the signaling process that permits parasites to colonize such different microenvironments. In this way, especially for *T. cruzi*, the extreme heterogeneity of this population and its susceptibility to oxygen metabolites must be carefully noted. These observations, in addition to their epidemiological significance, could permit the development of more effective drugs for the treatment of Chagas disease.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

- [1] E. S. Garcia, N. A. Ratcliffe, M. M. Whitten, M. S. Gonzalez, and P. Azambuja, "Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions," *Journal of Insect Physiology*, vol. 53, no. 1, pp. 11–21, 2007.
- [2] C. Chagas, "Nova tripanomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem," *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 1, pp. 159–218, 1909.
- [3] A. Rassi, A. Rassi, and J. A. Marin-Neto, "Chagas disease," *The Lancet*, vol. 375, no. 9723, pp. 1388–1402, 2010.
- [4] D. J. Steenkamp, "Trypanosomal antioxidants and emerging aspects of redox regulation in the trypanosomatids," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 4, no. 1, pp. 105–121, 2002.
- [5] A. V. Graça-Souza, C. Maya-Monteiro, G. O. Paiva-Silva et al., "Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 36, no. 4, pp. 322–335, 2006.
- [6] P. Ponka, "Cell biology of heme," *The American Journal of the Medical Sciences*, vol. 318, no. 4, pp. 241–256, 1999.
- [7] Y. Zhu and R. B. Silverman, "Revisiting heme mechanisms. A perspective on the mechanisms of nitric oxide synthase (NOS), heme oxygenase (HO), and cytochrome P450s (CYP450s)," *Biochemistry*, vol. 47, no. 8, pp. 2231–2243, 2008.

- [8] S. W. Ryter and R. M. Tyrrell, "The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 28, no. 2, pp. 289–309, 2000.
- [9] L. J. Deterding, D. C. Ramirez, J. R. Dubin, R. P. Mason, and K. B. Tomer, "Identification of free radicals on hemoglobin from its self-peroxidation using mass spectrometry and immunospin trapping: observation of a histidinyl radical," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 12, pp. 11600–11607, 2004.
- [10] R. N. Hasan and A. I. Schafer, "Hemin upregulates Egr-1 expression in vascular smooth muscle cells via reactive oxygen species ERK-1/2-Elk-1 and NF- κ B," *Circulation Research*, vol. 102, no. 1, pp. 42–50, 2008.
- [11] T. H. Schmitt, W. A. Frezzatti, and S. Schreier, "Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 307, no. 1, pp. 96–103, 1993.
- [12] J. Campos-Salinas, M. Cabello-Donayre, R. García-Hernández et al., "A new ATP-binding cassette protein is involved in intracellular haem trafficking in *Leishmania*," *Molecular Microbiology*, vol. 79, no. 6, pp. 1430–1444, 2011.
- [13] K. E. J. Tripodi, S. M. Menendez Bravo, and J. A. Cricco, "Role of heme and heme-proteins trypanosomatid essential metabolic pathways," *Enzyme Research*, vol. 2011, Article ID 873230, 12 pages, 2011.
- [14] M. E. Lombardo, L. S. Araujo, and A. Batlle, "5-Amino-levulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 35, no. 8, pp. 1263–1271, 2003.
- [15] N. M. El-Sayed, P. J. Myler, D. C. Bartholomeu et al., "The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease," *Science*, vol. 309, no. 5733, pp. 409–435, 2005.
- [16] W. De Souza, T. U. De Carvalho, M. Benchimol, and E. Chiari, "*Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake," *Experimental Parasitology*, vol. 45, no. 1, pp. 101–115, 1978.
- [17] I. Porto-Carreiro, M. Attias, K. Miranda, W. De Souza, and N. Cunha-E-Silva, "*Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes," *European Journal of Cell Biology*, vol. 79, no. 11, pp. 858–869, 2000.
- [18] F. A. Lara, C. Sant'Anna, D. Lemos et al., "Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 355, no. 1, pp. 16–22, 2007.
- [19] L. Kořený, J. Lukeš, and M. Oborník, "Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all?" *International Journal for Parasitology*, vol. 40, no. 2, pp. 149–156, 2010.
- [20] W. De Souza, "Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*," *Current Pharmaceutical Design*, vol. 8, no. 4, pp. 269–285, 2002.
- [21] A. T. Malaquias and M. M. Oliveira, "Phospholipid signalling pathways in *Trypanosoma cruzi* growth control," *Acta Tropica*, vol. 73, no. 2, pp. 93–108, 1999.
- [22] M. Parsons and L. Ruben, "Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids," *Parasitology Today*, vol. 16, no. 2, pp. 56–62, 2000.
- [23] E. B. Gómez, M. I. Santori, S. Laría et al., "Characterization of the *Trypanosoma cruzi* Cdc2p-related protein kinase 1 and identification of three novel associating cyclins," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 113, no. 1, pp. 97–108, 2001.
- [24] C. M. Ochatt, R. M. Ulloa, H. N. Torres, and M. T. Tellez-Inon, "Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 57, no. 1, pp. 73–81, 1993.
- [25] A. C. Schoijet, K. Miranda, W. Girard-Dias et al., "A *Trypanosoma cruzi* phosphatidylinositol 3-kinase (TcVps34) is involved in osmoregulation and receptor-mediated endocytosis," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 283, no. 46, pp. 31541–31550, 2008.
- [26] M. L. Gómez, C. M. Ochatt, M. G. Kazanietz, H. N. Torres, and M. T. Tellez-Inón, "Biochemical and immunological studies of protein kinase C from *Trypanosoma cruzi*," *International Journal for Parasitology*, vol. 29, no. 7, pp. 981–989, 1999.
- [27] S. B. Ogueta, G. C. Macintosh, and M. T. Tellez-Inón, "Stage-specific substrate phosphorylation by a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in *Trypanosoma cruzi*," *Journal of Eukaryotic Microbiology*, vol. 45, no. 4, pp. 392–396, 1998.
- [28] H. Huang, C. Werner, L. M. Weiss, M. Wittner, and G. A. Orr, "Molecular cloning and expression of the catalytic subunit of protein kinase A from *Trypanosoma cruzi*," *International Journal for Parasitology*, vol. 32, no. 9, pp. 1107–1115, 2002.
- [29] H. Huang, L. M. Weiss, F. Nagajyothi et al., "Molecular cloning and characterization of the protein kinase A regulatory subunit of *Trypanosoma cruzi*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 149, no. 2, pp. 242–245, 2006.
- [30] M. Parsons, E. A. Worthey, P. N. Ward, and J. C. Mottram, "Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*," *BMC Genomics*, vol. 6, article 127, 2005.
- [31] C. Naula and T. Seebeck, "Cyclic AMP signaling in trypanosomatids," *Parasitology Today*, vol. 16, no. 1, pp. 35–38, 2000.
- [32] C. F. Souza, A. B. Carneiro, A. B. Silveira et al., "Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 390, no. 3, pp. 541–546, 2009.
- [33] E. E. Almeida-Amaral, V. C. Cardoso, F. G. Francioli, and J. R. Meyer-Fernandes, "*Leishmania amazonensis*: heme stimulates (Na⁺+K⁺)ATPase activity via phosphatidylinositol-specific phospholipase C/protein kinase C-like (PI-PLC/PKC) signaling pathways," *Experimental Parasitology*, vol. 124, no. 4, pp. 436–441, 2010.
- [34] M. S. Leite, R. Thomaz, J. H. M. Oliveira, P. L. Oliveira, and J. R. Meyer-Fernandes, "*Trypanosoma brucei brucei*: effects of ferrous iron and heme on ecto-nucleoside triphosphate diphosphohydrolase activity," *Experimental Parasitology*, vol. 121, no. 2, pp. 137–143, 2009.
- [35] J. K. Finzi, C. W. M. Chiavegatto, K. F. Corat et al., "*Trypanosoma cruzi* response to the oxidative stress generated by hydrogen peroxide," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 133, no. 1, pp. 37–43, 2004.
- [36] J. F. Turrens, "Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa," *Molecular Aspects of Medicine*, vol. 25, no. 1-2, pp. 211–220, 2004.
- [37] M. N. Alvarez, G. Peluffo, L. Piacenza, and R. Radi, "Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 286, no. 8, pp. 6627–6640, 2011.
- [38] A. J. Kowaltowski, N. C. de Souza-Pinto, R. F. Castilho, and A. E. Vercesi, "Mitochondria and reactive oxygen species," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 4, pp. 333–343, 2009.

- [39] W. de Souza, M. Attias, and J. C. F. Rodrigues, "Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida)," *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 41, no. 10, pp. 2069–2080, 2009.
- [40] A. E. Vercesi, C. F. Bernardes, M. E. Hoffmann, F. R. Gadelha, and R. Docampo, "Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ," *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, no. 22, pp. 14431–14434, 1991.
- [41] F. Irigoín, L. Cibils, M. A. Comini, S. R. Wilkinson, L. Flohé, and R. Radi, "Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: trypanothione metabolism and oxidant detoxification," *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 45, no. 6, pp. 733–742, 2008.
- [42] L. Piacenza, M. P. Zago, G. Peluffo, M. N. Alvarez, M. A. Basombrio, and R. Radi, "Enzymes of the antioxidant network as novel determiners of *Trypanosoma cruzi* virulence," *International Journal for Parasitology*, vol. 39, no. 13, pp. 1455–1464, 2009.
- [43] B. Zingales, S. G. Andrade, M. R. S. Briones et al., "A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI," *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, vol. 104, no. 7, pp. 1051–1054, 2009.
- [44] A. A. Mielniczki-Pereira, C. M. Chiavegatto, J. A. López, W. Colli, M. J. M. Alves, and F. R. Gadelha, "*Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluconate dehydrogenases activities," *Acta Tropica*, vol. 101, no. 1, pp. 54–60, 2007.
- [45] D. Villarreal, C. Barnabé, D. Sereno, and M. Tibayrenc, "Lack of correlation between in vitro susceptibility to Benznidazole and phylogenetic diversity of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease," *Experimental Parasitology*, vol. 108, no. 1–2, pp. 24–31, 2004.
- [46] K. P. Luna, I. P. Hernández, C. M. Rueda, M. M. Zorro, S. L. Croft, and P. Escobar, "In vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains from Santander, Colombia, to hexadecylphosphocholine (miltefosine), nifurtimox and benznidazole," *Biomedica*, vol. 29, no. 3, pp. 448–455, 2009.
- [47] P. C. Campos, V. G. Silva, C. Furtado et al., "*Trypanosoma cruzi* MSH2: functional analyses on different parasite strains provide evidences for a role on the oxidative stress response," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 176, no. 1, pp. 8–16, 2010.
- [48] C. R. Machado, L. Augusto-Pinto, R. McCulloch, and S. M. R. Teixeira, "DNA metabolism and genetic diversity in *Trypanosomes*," *Mutation Research*, vol. 612, no. 1, pp. 40–57, 2006.
- [49] S. M. Hernandez, R. A. Kolliker-Frers, M. S. Sanchez et al., "Antiproliferative effect of sera from chagasic patients on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Involvement of xanthine oxidase," *Acta Tropica*, vol. 109, no. 3, pp. 219–225, 2009.
- [50] L. Piacenza, F. Irigoín, M. N. Alvarez et al., "Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression," *Biochemical Journal*, vol. 403, no. 2, pp. 323–334, 2007.
- [51] F. Irigoín, N. M. Inada, M. P. Fernandes et al., "Mitochondrial calcium overload triggers complement-dependent superoxide-mediated programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*," *Biochemical Journal*, vol. 418, no. 3, pp. 595–604, 2009.
- [52] S. R. Wilkinson, D. J. Meyer, and J. M. Kelly, "Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity," *Biochemical Journal*, vol. 352, no. 3, pp. 755–761, 2000.
- [53] M. Bergeron and M. Olivier, "*Trypanosoma cruzi*-mediated IFN- γ -inducible nitric oxide output in macrophages is regulated by iNOS mRNA stability," *The Journal of Immunology*, vol. 177, no. 9, pp. 6271–6280, 2006.
- [54] M. N. Alvarez, L. Piacenza, F. Irigoín, G. Peluffo, and R. Radi, "Macrophage-derived peroxynitrite diffusion and toxicity to *Trypanosoma cruzi*," *Archives of Biochemistry and Biophysics*, vol. 432, no. 2, pp. 222–232, 2004.
- [55] Y. Tanaka, H. Tanowitz, and B. R. Bloom, "Growth of *Trypanosoma cruzi* in a cloned macrophage cell line and in a variant defective in oxygen metabolism," *Infection and Immunity*, vol. 41, no. 3, pp. 1322–1331, 1983.
- [56] M. Igoillo-Esteve and J. J. Cazzulo, "The glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*: its role in the defense of the parasite against oxidative stress," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 149, no. 2, pp. 170–181, 2006.
- [57] L. Piacenza, G. Peluffo, M. N. Alvarez, J. M. Kelly, S. R. Wilkinson, and R. Radi, "Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite," *Biochemical Journal*, vol. 410, no. 2, pp. 359–368, 2008.
- [58] A. Parodi-Talice, V. Monteiro-Goes, N. Arrambide et al., "Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis," *Journal of Mass Spectrometry*, vol. 42, no. 11, pp. 1422–1432, 2007.
- [59] L. Piacenza, M. N. Alvarez, G. Peluffo, and R. Radi, "Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 12, no. 4, pp. 415–421, 2009.
- [60] N. Acestor, S. Masina, A. Ives, J. Walker, N. G. Saravia, and N. Fasel, "Resistance to oxidative stress is associated with metastasis in mucocutaneous leishmaniasis," *Journal of Infectious Diseases*, vol. 194, no. 8, pp. 1160–1167, 2006.
- [61] M. P. Cupello, C. F. de Souza, C. Buchensky et al., "The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters," *Acta Tropica*. In press.
- [62] M. R. Miranda, G. E. Canepa, L. A. Bouvier, and C. A. Pereira, "*Trypanosoma cruzi*: oxidative stress induces arginine kinase expression," *Experimental Parasitology*, vol. 114, no. 4, pp. 341–344, 2006.
- [63] Y. Repetto, E. Opazo, J. D. Maya, M. Agosin, and A. Morello, "Glutathione and trypanothione in several strains of *Trypanosoma cruzi*: effect of drugs," *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 115, no. 2, pp. 281–285, 1996.
- [64] J. D. Maya, Y. Repetto, M. Agosin et al., "Effects of Nifurtimox and benznidazole upon glutathione and trypanothione content in epimastigote, trypomastigote and amastigote forms of *Trypanosoma cruzi*," *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 86, no. 1, pp. 101–106, 1997.
- [65] C. Moncada, Y. Repetto, J. Aldunate, M. E. Letelier, and A. Morello, "Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs," *Comparative Biochemistry and Physiology*, vol. 94, no. 1, pp. 87–91, 1989.
- [66] M. Boiani, L. Piacenza, P. Hernández et al., "Mode of action of Nifurtimox and N-oxide-containing heterocycles against *Trypanosoma cruzi*: is oxidative stress involved?" *Biochemical Pharmacology*, vol. 79, no. 12, pp. 1736–1745, 2010.
- [67] M. C. Jockers-Scherubl, R. H. Schirmer, and R. L. Krauth-Siegel, "Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*.

- Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds,” *European Journal of Biochemistry*, vol. 180, no. 2, pp. 267–272, 1989.
- [68] G. B. Henderson, P. Ulrich, A. H. Fairlamb et al., “‘Subversive’ substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 85, no. 15, pp. 5374–5378, 1988.
- [69] F. B. Nogueira, J. C. Ruiz, C. Robello, A. J. Romanha, and S. M. F. Murta, “Molecular characterization of cytosolic and mitochondrial trypanothione peroxidase in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole,” *Parasitology Research*, vol. 104, no. 4, pp. 835–844, 2009.
- [70] H. M. Andrade, S. M. F. Murta, A. Chapeaurouge, J. Perales, P. Nirdé, and A. J. Romanha, “Proteomic analysis of *Trypanosoma cruzi* resistance to benznidazole,” *Journal of Proteome Research*, vol. 7, no. 6, pp. 2357–2367, 2008.
- [71] S. M. F. Murta, F. B. Nogueira, P. F. dos Santos et al., “Differential gene expression in *Trypanosoma cruzi* populations susceptible and resistant to benznidazole,” *Acta Tropica*, vol. 107, no. 1, pp. 59–65, 2008.
- [72] S. R. Prathalingham, S. R. Wilkinson, D. Horn, and J. M. Kelly, “Deletion of the *Trypanosoma brucei* superoxide dismutase gene *sodB1* increases sensitivity to nifurtimox and benznidazole,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 51, no. 2, pp. 755–758, 2007.
- [73] A. V. Pinto and S. L. De Castro, “The trypanocidal activity of naphthoquinones: a review,” *Molecules*, vol. 14, no. 11, pp. 4570–4590, 2009.
- [74] M. Dubin, S. H. Fernandez-Villamil, A. O. Stoppani et al., “Cytotoxicity of beta-lapachone, an naphthoquinone with possible therapeutic use,” *Medicina*, vol. 61, no. 3, pp. 343–350, 2001.
- [75] R. F. S. Menna-Barreto, R. L. S. Goncalves, E. M. Costa et al., “The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 5, pp. 644–653, 2009.
- [76] S. C. Bourguignon, H. C. Castro, D. O. Santos et al., “*Trypanosoma cruzi*: in vitro activity of Epoxy- α -Lap, a derivative of α -lapachone, on trypomastigote and amastigote forms,” *Experimental Parasitology*, vol. 122, no. 2, pp. 91–96, 2009.
- [77] M. J. De Ornelas Toledo, M. T. Bahia, C. M. Carneiro et al., “Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes,” *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, no. 1, pp. 223–230, 2003.
- [78] D. Cosentino-Gomes, T. Russo-Abrahão, A. L. Fonseca-de-Souza, C. R. Ferreira, A. Galina, and J. R. Meyer-Fernandes, “Modulation of *Trypanosoma rangeli* ecto-phosphatase activity by hydrogen peroxide,” *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 47, no. 2, pp. 152–158, 2009.
- [79] M. A. Miller, S. E. McGowan, K. R. Gantt et al., “Inducible resistance to oxidant stress in the protozoan *Leishmania chagasi*,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, no. 43, pp. 33883–33889, 2000.
- [80] J. H. Zarley, B. E. Britigan, and M. E. Wilson, “Hydrogen peroxide-mediated toxicity for *Leishmania donovani chagasi* promastigotes: role of hydroxyl radical and protection by heat shock,” *The Journal of Clinical Investigation*, vol. 88, no. 5, pp. 1511–1521, 1991.

Heme-Induced ROS in *Trypanosoma Cruzi* Activates CaMKII-Like That Triggers Epimastigote Proliferation. One Helpful Effect of ROS

Natália Pereira de Almeida Nogueira³, Cintia Fernandes de Souza¹, Francis Monique de Souza Saraiva¹, Pedro Elias Sultano¹, Sergio Ranto Dalmau¹, Roberta Eitler Bruno¹, Renata de Lima Sales Gonçalves⁴, Gustavo Augusto Travassos Laranja¹, Luís Henrique Monteiro Leal², Marsen Garcia Pinto Coelho¹, Claudio A. Masuda⁵, Marcus F. Oliveira^{4,6}, Marcia Cristina Paes^{1,7*}

1 Laboratório de Interação Tripanossomatídeos e Vetores, Departamento de Bioquímica, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes (IBRAG), Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil, **2** Laboratório de Microscopia e Processamento de Imagens, Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Rio de Janeiro, Brasil, **3** Laboratório de Artrópodos Hematófagos, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, **4** Laboratório de Bioquímica Redox - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, **5** Laboratório de Biologia Molecular de Leveduras, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, **6** Laboratório de Inflamação e Metabolismo, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil, **7** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia - Entomologia Molecular (INCT-EM), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brasil

Abstract

Heme is a ubiquitous molecule that has a number of physiological roles. The toxic effects of this molecule have been demonstrated in various models, based on both its pro-oxidant nature and through a detergent mechanism. It is estimated that about 10 mM of heme is released during blood digestion in the blood-sucking bug's midgut. The parasite *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, proliferates in the midgut of the insect vector; however, heme metabolism in trypanosomatids remains to be elucidated. Here we provide a mechanistic explanation for the proliferative effects of heme on trypanosomatids. Heme, but not other porphyrins, induced *T. cruzi* proliferation, and this phenomenon was accompanied by a marked increase in reactive oxygen species (ROS) formation in epimastigotes when monitored by ROS-sensitive fluorescent probes. Heme-induced ROS production was time- and concentration-dependent. In addition, lipid peroxidation and the formation of 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) adducts with parasite proteins were increased in epimastigotes in the presence of heme. Conversely, the antioxidants urate and GSH reversed the heme-induced ROS. Urate also decreased parasite proliferation. Among several protein kinase inhibitors tested only specific inhibitors of CaMKII, KN93 and Myr-AIP, were able to abolish heme-induced ROS formation in epimastigotes leading to parasite growth impairment. Taken together, these data provide new insight into *T. cruzi*-insect vector interactions: heme, a molecule from the blood digestion, triggers epimastigote proliferation through a redox-sensitive signalling mechanism.

Citation: Nogueira NPdA, Souza CFd, Saraiva FMdS, Sultano PE, Dalmau SR, et al. (2011) Heme-Induced ROS in *Trypanosoma Cruzi* Activates CaMKII-Like That Triggers Epimastigote Proliferation. One Helpful Effect of ROS. PLoS ONE 6(10): e25935. doi:10.1371/journal.pone.0025935

Editor: Laurent Rénia, Agency for Science, Technology and Research - Singapore Immunology Network, Singapore

Received: February 3, 2011; **Accepted:** September 14, 2011; **Published:** October 11, 2011

Copyright: © 2011 Nogueira et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and PIBIC/UERJ. MFO is a research scholar from CNPq and is a recipient of the FAPERJ Jovens Cientistas do Nosso Estado scholarship. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: mcpaes@uerj.br

Introduction

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease [1], during its life cycle, develops and differentiates within the midgut lumen of triatomine insects. The transmission of parasites to vertebrate hosts occurs through the insect's faeces when the triatomine vectors feed on blood, which usually comprises an intake of approximately 6 to 12 times its own body weight. The amount of blood ingested is equivalent to about 10 mM of heme, which is present in different forms inside the triatomine digestive tract [2]. The absence of a complete heme biosynthetic pathway in both *T. cruzi* and *Leishmania* support the hypothesis that heme is essential for the survival of these parasites [3–5]. Thus, it seems

plausible that trypanosomatids should acquire extracellular heme from their invertebrate hosts. In this regard, our group has previously demonstrated that heme stimulated *T. cruzi* epimastigote proliferation in a dose-dependent manner [6].

Ferriprotoporphyrin-IX (heme) constitutes a key molecule in many biological reactions, including respiration, detoxification and oxygen transport [7], processes that are essentially mediated by heme proteins such as cytochromes, catalase, myoglobin and hemoglobin. However, "free" heme exerts a number of toxic effects, causing not only molecular damage to lipids, DNA and proteins [8–10], but also decomposing organic hydroperoxides into highly reactive alkoxyl and peroxy radicals that are included in the pool of reactive oxygen species (ROS) [11–12]. In addition,

due to its amphiphilic features, heme can associate with lipid membranes, leading to altered membrane permeabilisation and cell disruption markedly a redox independent mechanism [13].

It is known that cells are capable of generating endogenously and constitutively ROS which are utilized in the induction and maintenance of signal transduction pathways involved in cell growth and differentiation [14]. However, a high level of pro-oxidant species overcomes the cells pro-oxidant/antioxidant balance disturbing the redox signalling and control [15–18]. An aberration in endogenous ROS production, known as oxidative stress, has been involved in the process of aging [16] and in the pathogenesis of several diseases such as cancer [19], diabetes [20] and atherosclerosis [21]. Conversely, the regulated increase in free radicals leads to a temporary imbalance that represents the physiological basis for redox regulation [22]. Several cytokines [23], growth factors [24] and hormones [25] trigger ROS production. In response to these triggers, ROS act as secondary messengers in the intracellular signal transduction pathway in normal physiological events [14,26,27].

A multifunctional serine/threonine protein kinase that responds to changes in the redox state of cells is the Ca^{2+} calmodulin kinase II (CaMKII) [28,29]. CaMKII is known to mediate the downstream effects of Ca^{2+} /CaM [30]. CaMK II holoenzyme contains three main regions: an N-terminal catalytic region responsible for catalyzing the phosphotransferase reaction, a regulatory region that contains Ca^{2+} /CaM binding sites and an auto inhibitory domain (AID). In the absence of bound Ca^{2+} /CaM, the CaMKII is maintained in an inactive state because of an interaction of the AID with the catalytic domain of its own subunit [30]. The Ca^{2+} /CaM complex binding induces the phosphorylation of the CaMKII in Thr²⁸⁶ and enhancing its kinase activity [30].

We have recently shown that heme-induced *T. cruzi* growth is associated with calcium-calmodulin-dependent kinase II (CaMKII) activity [31]. Based on previous evidence showing that heme can exert potent pro-oxidant actions [8,11] and that CaMKII activity can be stimulated by oxidation [28,29], here we hypothesized whether heme would drive *T. cruzi* proliferation through a redox dependent CaM Kinase II-like cascade and in fact, the data presented herein indicate that heme induces a transient oxidative stress condition that stimulates *T. cruzi* growth via a mechanism mediated by a CaM Kinase II-like pathway.

Materials and Methods

Chemicals

Rabbit anti- α/β tubulin polyclonal antibody was purchased from Sigma-Adrich Fine Chemicals (St. Louis, MO, USA). Hemin and other porphyrins were from Frontier Scientific (Logan, UT, USA). 5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate acetyl ester (CMH₂-DCFDA) and Dihydroethidium (DHE) were purchased from Invitrogen Corporation (Carlsbad, California, USA). Mouse monoclonal anti-4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE) antibody was from Abcam Inc. (Cambridge, UK). Anti-mouse secondary antibody was from GE Healthcare (Uppsala, Sweden). The inhibitors used in the work were from Calbiochem (La Jolla, CA, USA). All other reagents used were of analytical purity.

Parasites

Trypanosoma cruzi Dm28c (CT-IOC-010) strain was provided by the Trypanosomatid Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Brazil. Parasites were grown at 28 °C for 7 days in brain–heart infusion medium (BHI) and supplemented with 30 μM hemin (heme-Cl) and 10% foetal calf serum (FCS). Parasite growth

was monitored by cell counting in a Neubauer chamber. Unless otherwise indicated, the parasites were adapted for two passages in BHI supplemented with 10% FCS without heme supplementation prior to the experiments.

Effects of porphyrins on *T. cruzi* proliferation

Epimastigotes stocks were maintained in BHI supplemented with 10% FCS and 30 μM heme. For the experiments, Cells were harvested from culture the flasks, washed twice in BHI and suspended in fresh BHI, 10% FCS without the addition of heme. Next, 2.5×10^6 parasites/mL were grown at 28 °C for 10 or 12 days in BHI medium supplemented with 10% FCS in the absence or presence of different concentrations of porphyrins. Parasite proliferation was monitored by cell counting in a Neubauer chamber.

Effect of urate on *T. cruzi* proliferation

Epimastigotes were maintained in BHI supplemented with 10% FCS and 30 μM heme for 7 days. Next, 2.5×10^6 parasites/mL were grown at 28 °C for 10 days in BHI medium supplemented with 10% FCS in the absence or presence of 30 μM heme and 1 mM urate. Parasite growth was monitored by cell counting in a Neubauer chamber.

Effects of H₂O₂ and CaMKII inhibition on *T. cruzi* proliferation

Epimastigotes were maintained in BHI supplemented with 10% FCS and 30 μM heme for 7 days. Next, 2.5×10^6 parasites/mL were grown at 28 °C in BHI medium supplemented with 10% FCS in the absence (control) or in the presence of 20 μM H₂O₂, 30 μM heme, 30 μM Myr-AIP, 30 μM Myr-AIP plus 20 μM H₂O₂ and 30 μM Myr-AIP plus 30 μM heme. Parasite proliferation was monitored by cell counting in a Neubauer chamber after 5 days of culture

Fluorescence microscopy

Parasites were collected by centrifugation at 1500 *g* for 5 min (Hermle-z323k, rotor: 220.72V04) and washed in PBS (100 mM phosphate buffer and 150 mM NaCl, pH 7.4). The cells (1×10^7) were re-suspended in PBS and incubated with 2 μM CM-H₂DCFDA and different concentrations of heme at 28 °C for 30 min. Aliquots of cells were mounted on slides and coverslips and were observed by differential interference contrast (DIC) and fluorescence using an Axioplan 2 Zeiss fluorescence microscope (Zeiss, Göttingen, Germany). All obtained images were processed equivalently with Adobe PhotoShop software (Adobe, Seattle, USA).

Flow cytometry - Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were loaded in PBS (100 mM phosphate buffer and 150 mM NaCl, pH 7.4) with 2 μM CM-H₂DCFDA or 5 μM DHE for 30 min and 20 μM H₂O₂, 30 μM heme or other porphyrins for 15 min unless otherwise stated. ROS production was analysed by flow cytometry using a FACS Calibur apparatus with a 488 nm ion-argon laser (BD Biosciences, Mississauga, Canada). Controls with classical antioxidants were carried out by pre-incubating parasites with 1 mM urate for 15 min or 5 mM GSH for 2 h prior to heme exposure. To analyse the effect of CaMKII inhibition, parasites were pre-incubated with 2 μM KN-93 or 30 μM Myr-AIP for 1 h.

Hydrogen peroxide production

For the H₂O₂ release measurements, adapted epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were loaded in PBS (100 mM phosphate buffer and 150 mM NaCl, pH 7.4) containing 1.25 μM of Amplex Red

reagent and 1 U/mL horseradish peroxidase and 30 μM heme for 30 min. Afterwards, parasites were separated by centrifugation at 2000 g for 5 min and then the supernatants were analysed in a Cary Eclipse fluorescence spectrophotometer using an excitation wavelength of 530 nm and an emission wavelength of 590 nm. Data were calibrated by adding increasing concentrations of a freshly prepared H_2O_2 solution.

Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS)

Adapted epimastigotes were collected by centrifugation at 1500 g for 5 min and washed twice in PBS (100 mM phosphate buffer and 150 mM NaCl, pH 7.4). The pellet was re-suspended in the reaction solution (PBS containing 200 μM desferoxamin and 2 mM CaCl_2) and incubated in the absence or presence of different concentrations of heme and 300 μM H_2O_2 at 37 $^\circ\text{C}$ for 30 min. The cells were then lysed by freezing and thawing, and the cell-free extracts of *T. cruzi* were incubated at 95 $^\circ\text{C}$ for 30 min with 2% trichloroacetic acid (TCA) and 0.134% thiobarbituric acid (TBA). Next, the tubes were cooled, and 500 μL of n-butanol was added. Thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) were separated by centrifugation at 9300 g for 5 min, the supernatants were collected and the absorbance was measured at 532 nm.

Western blotting

Adapted epimastigotes (4×10^8 cells/mL) were incubated in BHI supplemented with 10% FCS in the absence (control) or in the presence of 30 μM heme at 28 $^\circ\text{C}$ for 30 minutes. Parasites were collected by centrifugation at 1500 g for 5 min, washed with PBS and the pellet was re-suspended in lysis buffer (50 mM HEPES, 1 mM MgCl_2 , 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10 mM EDTA; pH 6.4) containing protease inhibitor cocktail Sigma-Adrich Fine Chemicals (1.04 mM AEBSF, 800 nM aprotinin, 20 μM

leupeptin, 40 μM bestatin, 15 μM pepstatin A and 14 μM E-64). After parasite lysis, the samples were centrifuged at 9300 g , 4 $^\circ\text{C}$ for 10 min, the pellet was discarded and the supernatants were used for protein quantification according to Lowry *et al.* [32]. Whole protein extracts of *T. cruzi* (about 80 μg) were subjected to electrophoresis in a 15% SDS-polyacrylamide gel under reducing conditions. Proteins were transferred to a nitrocellulose membrane at 4 $^\circ\text{C}$ for 2 h. Membranes were blocked with Tris-buffered saline (25 mM Tris, 192 mM glycine, pH 8.3, 20% methanol) solution containing 0.1% Tween 20 (TBS-T) and 5% bovine serum albumin (BSA). The membranes were then incubated overnight with anti-4-HNE antibody (1:1000), or anti- α/β tubulin (1:1000) diluted in blocking solution, washed in TBS-T, and finally incubated for 1 h with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse antibody or horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit antibody (1:10,000). The bands were revealed by chemiluminescence using the ECL substrate. Blots were exposed to ECL Hyperfilm (Amersham) and quantification was performed by densitometric analysis of the exposed films (Adobe Photoshop 5 programme) using anti- α/β tubulin as a load control.

Effects of kinase inhibitors on *T. cruzi*

In the experiments employing protein kinase inhibitors, the drugs were initially used at the following final concentrations, corresponding to five-fold the K_i values for mammalian cells: LY294002 (phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor, 8.0 μM); roscovitine (inhibitor of cyclin-dependent kinases; 3.5 μM); H-89 (inhibitor of cyclic AMP-dependent protein kinase, 0.24 μM); H-9 (inhibitor of cyclic GMP-dependent protein kinase 5 μM); bisindolylmaleimide I (inhibitor of protein kinase C, 0.05 μM); KN-93 (inhibitor of CaM kinase II, 2 μM); Myr-AIP (inhibitor of CaM kinase II, 30 μM).

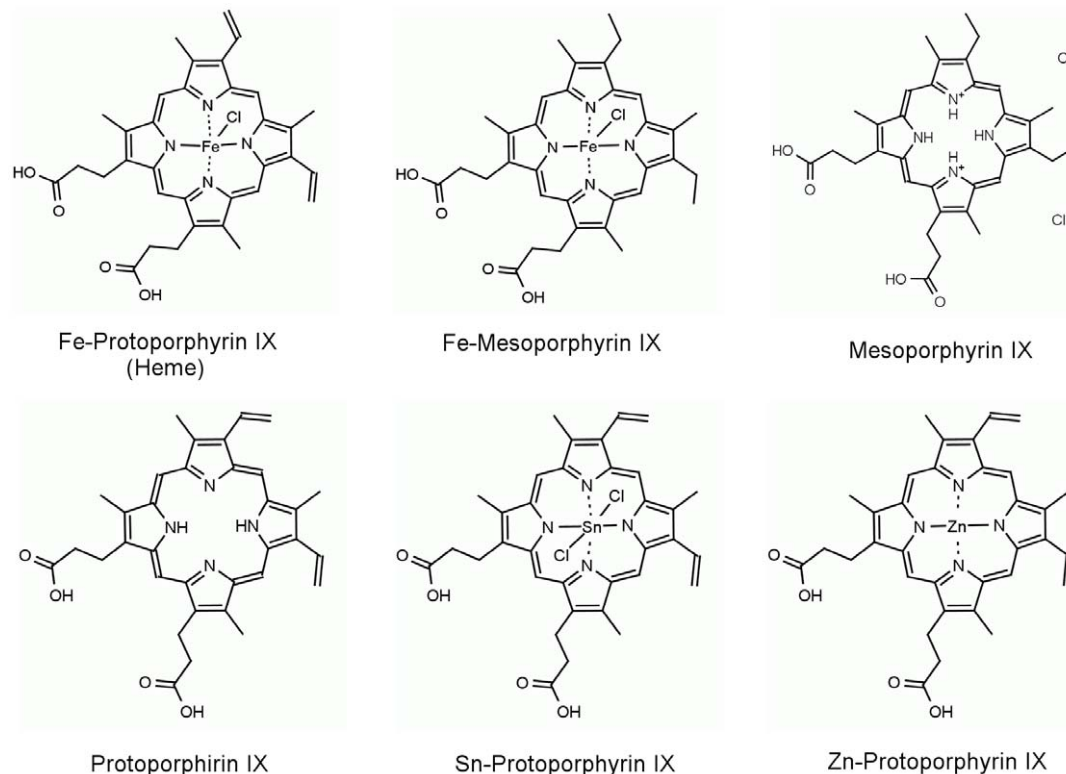


Figure 1. Molecular structure of the different porphyrins utilised in this study.

doi:10.1371/journal.pone.0025935.g001

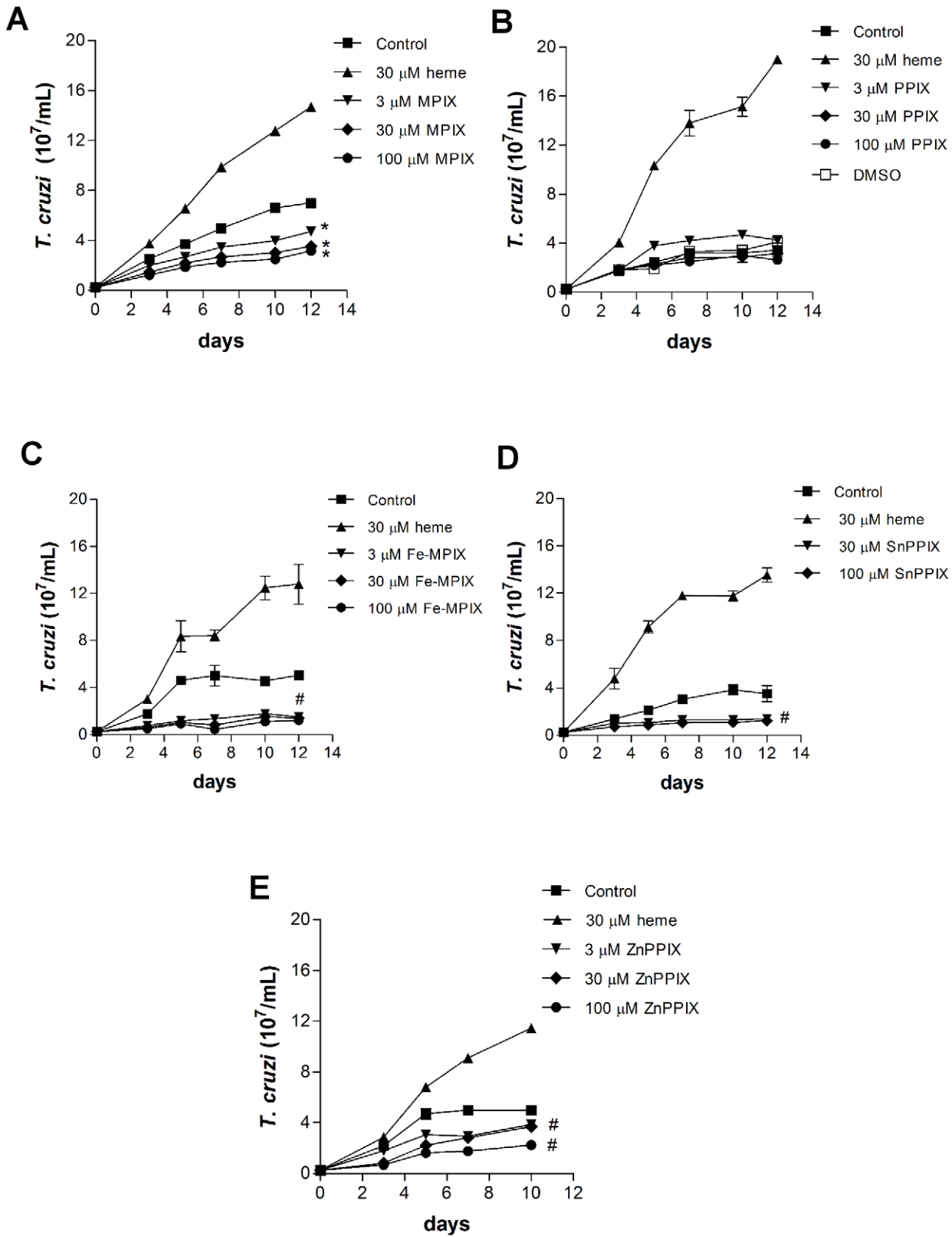


Figure 2. Porphyrins and *T. cruzi* proliferation. Epimastigotes (2.5×10^6 cells/mL) were incubated in BHI medium supplemented with 10% FCS in the absence (control) or in the presence of the porphyrins (A) mesoporphyrin IX (MPIX), (B) protoporphyrin IX (PPIX), (C) Fe-mesoporphyrin IX (Fe-MPIX), (D) Sn-protoporphyrin IX (SnPPIX), (E) Zn-protoporphyrin IX (ZnPPIX), for ten or twelve days. All data are presented as the mean \pm standard deviation ($n=3$), * $p < 0.001$ or # $p < 0.05$ as compared to the control group by Tukey's test. doi:10.1371/journal.pone.0025935.g002

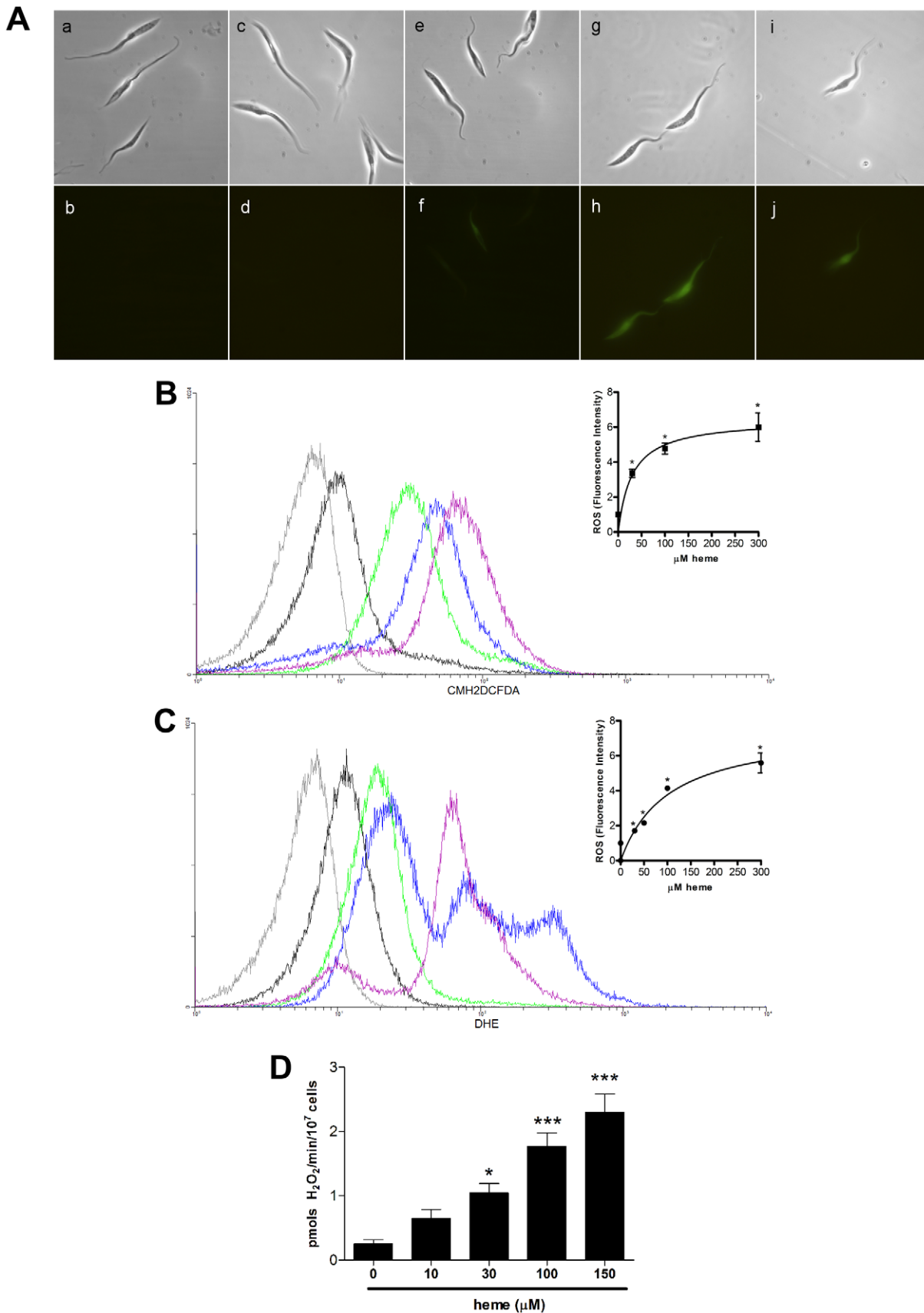


Figure 3. Effect of heme on ROS formation in *T. cruzi* epimastigotes. (A) Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were incubated with $2 \mu\text{M}$ CMH₂DCFDA and different concentrations of heme. Images a, c, e, g and i show differential interference contrast, whereas b, d, f, h and j show fluorescence images. The CMH₂DCFDA ($2 \mu\text{M}$) signal indicated in green was acquired with λ_{Em} 517–527 nm: (a and b) autofluorescence, (c and d) no

heme, (e and f) 30 μM heme, (g and h) 100 μM heme and (i and j) 300 μM heme. **(B)** Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were incubated in PBS with 2 μM CMH₂DCFDA and 30 μM heme for 30 min. The ROS formation was analysed by flow cytometry. The histograms correspond to: autofluorescence (gray), 2 μM CMH₂DCFDA (control-black), 30 μM heme (green), 100 μM heme (blue) and 300 μM heme (purple). The histograms are representative of five independent experiments. The inset graph represents the fluorescence intensity values obtained by the ratio of the experimental group median to the control group median (without heme). Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=5$), * $p<0.001$ as compared to the control group by Tukey's test. **(C)** Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were incubated in PBS with 5 μM DHE and heme for 30 min, and ROS formation was measured by flow cytometry. The histograms show autofluorescence (gray), 5 μM DHE (control-black), 30 μM heme (green), 100 μM heme (blue) and 300 μM heme (purple). The histograms are representative of two independent experiments. The inset graph represents the fluorescence intensity values obtained by the ratio of the experimental group median to the control group median (without heme). Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=2$), * $p<0.001$ as compared to the control group by Tukey's test. **(D)** Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were incubated in PBS with 1.25 μM Amplex red, 1 U/mL HRP and 30 μM heme for 30 min, and H₂O₂ production was measured in the supernatant by fluorescence spectrophotometry. Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$), * $p<0.01$, ** $p<0.05$ and *** $p<0.001$ as compared to the control group by Tukey's test.

doi:10.1371/journal.pone.0025935.g003

Statistical analyses

Statistical analysis were conducted with GraphPad Prism 3 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Data are presented as the mean \pm standard deviation (SD), and all experiments were repeated at least three times. Data were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA), and differences between groups were assessed with Tukey's post-test. The level of significance was set at $p<0.05$.

Results

T. cruzi proliferation is induced specifically by heme but not by other porphyrins

Previous data from our group have shown that heme, but not hemoglobin or its peptides, stimulates *T. cruzi* proliferation *in vitro* in a dose-dependent manner [6]. Thus, to investigate the structural determinant of the heme molecule that causes *T. cruzi* proliferation, cells were treated with several heme analogues (Figure 1). We tested porphyrins that lack the central iron atom: protoporphyrin IX (PPIX) and mesoporphyrin IX (MPIX). We also used Femesoporphyrin IX (Fe-MPIX), which has a structure similar to heme but lacks the two vinyl groups, which are replaced by two ethyl groups, as well as MPIX. Others porphyrins such as SnPPIX and ZnPPIX were also used. Figure 2 shows that among all of the porphyrins tested, only heme was able to induce a potent

proliferative effect on *T. cruzi*. In fact, treatment with MPIX, Fe-MPIX and ZnPPIX for 10 or 12 days significantly impaired *T. cruzi* proliferation even at low concentrations (3 μM). We also added free iron to cell cultures and the proliferation was not increased (data not show). Thus, these results show that the ferriprotoporphyrin (heme) molecule, and not other porphyrins, is required to potentiate *T. cruzi* growth. Interestingly, the vinyl groups are also important for heme-induced *T. cruzi* growth, indicating that the central iron is not solely responsible for the observed effects.

Heme, but not other porphyrins, induces reactive species (ROS) formation in *T. cruzi*

It has been known that heme is able to promote peroxides and others reactive species formation [11] but in the case of *T. cruzi*, heme induces proliferation as well. Thus, to gain insight on the mechanism by which heme promotes *T. cruzi* proliferation, we next investigated ROS formation in heme-exposed *T. cruzi* by measuring the fluorescence intensities of two distinct ROS-sensitive probes: CMH₂-DCFDA and dihydroethidium (DHE). Figure 3A shows that heme caused a dose-dependent increase of ROS formation in *T. cruzi*, as assessed by the CMH₂-DCFDA fluorescence signal using an epifluorescence microscope. Heme treatment did not affect parasite viability or structure because they appeared to be well preserved and to possess the expected, normal shape (Figure 3A, DIC images). We then evaluated ROS

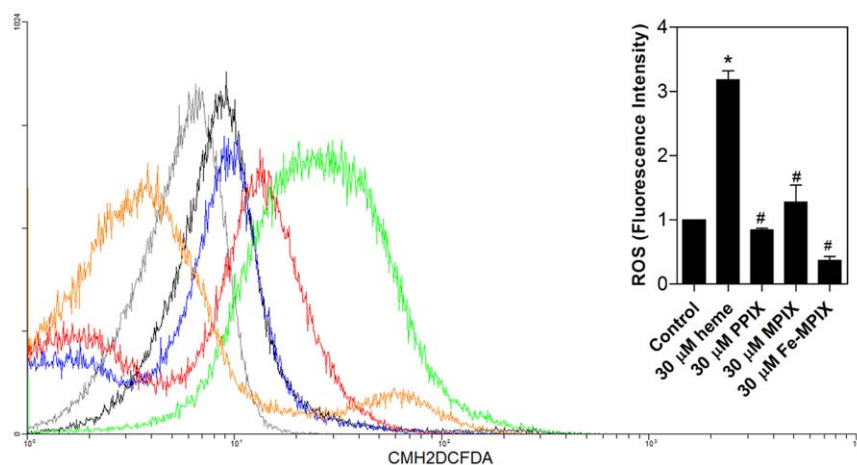


Figure 4. Porphyrins and ROS formation *T. cruzi*. Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were incubated in PBS with 2 μM CMH₂DCFDA for 30 min with the addition of 30 μM heme, 30 μM PPIX, 30 μM MPIX or 30 μM Fe-MPIX for the final 15 min. The production of ROS was analysed by flow cytometry. The histograms show autofluorescence (gray), 2 μM CMH₂DCFDA (control-black), 30 μM heme (green), 30 μM PPIX (blue), 30 μM MPIX (red) and 30 μM Fe-MPIX (orange). The histograms are representative of four independent experiments. The inset graph represents the fluorescence intensity values obtained by the ratio of experimental group median to the control group median (without heme). Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=2$), * $p<0.001$ as compared to the control group and # $p<0.001$ relative to the heme group by Tukey's test.

doi:10.1371/journal.pone.0025935.g004

formation in parasites treated with several heme concentrations by measuring the CMH₂-DCFDA fluorescence signal using flow cytometry (Figure 3B). There was a clear dose-dependent increase in CMH₂-DCFDA fluorescence in the parasites treated with increased heme concentrations (Figure 3B). Heme-induced ROS production was further investigated with another ROS-sensitive probe, DHE. Figure 3C show that, similarly to the data obtained for CMH₂-DCFDA, heme caused a dose-dependent increase in DHE fluorescence intensity. Additionally, we employed Amplex red reagent in combination with horseradish peroxidase (HRP), to detect H₂O₂ released from heme treated epimastigotes. As shown in figure 3D H₂O₂ levels increased in a dose-response manner to the addition of heme. To check if the heme analogues are also able to promote the ROS formation in parasites, we measured the CMH₂-DCFDA fluorescent signal using flow cytometry (Figure 4). Despite of the structural similarities with heme, the challenge of epimastigotes with 30 μM PPIX, 30 μM MPIX or 30 μM Fe-MPIX was unable to induce ROS, confirming that heme, is in fact, required to trigger ROS formation in *T. cruzi*.

Heme induces lipid peroxidation in *T. cruzi*

Lipid peroxidation is one of the hallmarks of the pro-oxidant effects of heme [8]. Lipid peroxides are usually decomposed into reactive aldehydes such as malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxy-2-nonenal (4-HNE), which are also reactive oxygen species [33]. Figure 5 shows that both end-products of lipid peroxidation were observed in cellular extracts of *Trypanosoma cruzi*, and their levels were increased in the presence of heme. In fact, heme induced a significant, dose-dependent increase in MDA formation (Figure 5A). Due to its electrophilic properties, the aldehyde 4-HNE forms adducts with cellular proteins [26,33–35]. In Figure 5B, we can observe a great increment in 4-HNE-protein adduct formation after heme exposure. The α/β tubulin antibody

was used to normalize the protein load. The protein oxidation seems to target specific proteins, named as bands 1–3, which increased 4-HNE label in about 3 to 4 fold when compared to the control group (without heme) (Figure 5C).

Antioxidants prevent heme-induced ROS and impair *T. cruzi* proliferation

ROS normally occur in living tissues at relatively low steady-state levels because of the large number of antioxidants mechanisms involved in cellular protection. Here, the antioxidants urate (Figure 6A) and GSH (Figure 6B), which are potent ROS scavengers, were able to reverse all fluorescence signals. Assuming that ROS is in fact important for the proliferation of these cells and since antioxidants remove these species from the cell milieu we can suppose that the growth of the parasites does not increase in the presence of antioxidants. So, in order to prove this hypothesis we tested the effect of urate upon the parasite growth. Figure 7 shows that 1 mM urate significantly decreased parasite proliferation, even in the presence of heme, indicating that ROS levels greatly influence the parasite growth homeostasis.

Heme-induced ROS formation in *T. cruzi* is kinetically regulated

An increased magnitude and longer duration of the ROS concentration demonstrates that the process is not able to protect the cells against ROS. However, a temporary increase of the ROS concentration indicates the presence of a regulatory process that helps the cells or tissues to achieve low, steady-state ROS levels [14]. Next, we investigated the dynamics by which heme induces ROS formation in *T. cruzi*. Figure 8 shows that heme induced a transient increase in ROS formation, as assessed by the fluorescence signal of CMH₂-DCFDA, and maximum levels of fluorescence were observed after incubation with heme for 30 min. This result shows that in heme-

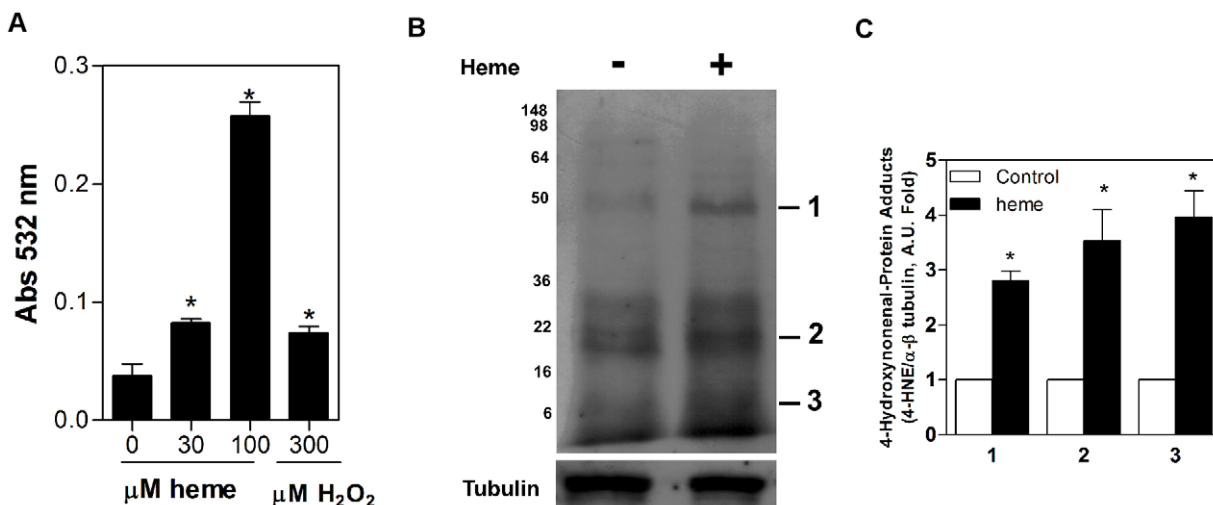


Figure 5. Heme triggers lipid peroxidation in *T. cruzi*. (A) Epimastigotes (1×10^9 cells/mL) were challenged with 30 μM, 100 μM heme or 300 μM H₂O₂ (as a positive control) at 37 °C for 30 min. Next, the cells were lysed, and the cell-free extracts were incubated at 95 °C for 30 min in acidic TBA. Lipid peroxides were extracted in *n*-butanol and separated by centrifugation. The supernatant was used to determine the absorbance at 532 nm. Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$), * $p<0.05$ as compared to the control group (no heme) by Tukey's test. (B) Epimastigotes (4×10^8 cells/mL) were incubated in BHI supplemented with 10%FCS, in the absence (control without heme) or in the presence of 30 μM heme for, 30 min. Parasites were lysed, and 80 μg of whole protein were electrophoresed in a 15% PAGE gel, transferred onto a nitrocellulose membrane, and incubated with monoclonal anti-4-HNE (1:1000). The bands were visualised using the ECL kit. This result is representative of three independent experiments. (C) Quantification of the level of 4-HNE adducts was determined by densitometry of three independent experiments using α/β tubulin as a load control. Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$), * $p<0.001$ as compared to the control group (without heme) by Tukey's test. The bands were analyzed using Adobe Photoshop 5.0. doi:10.1371/journal.pone.0025935.g005

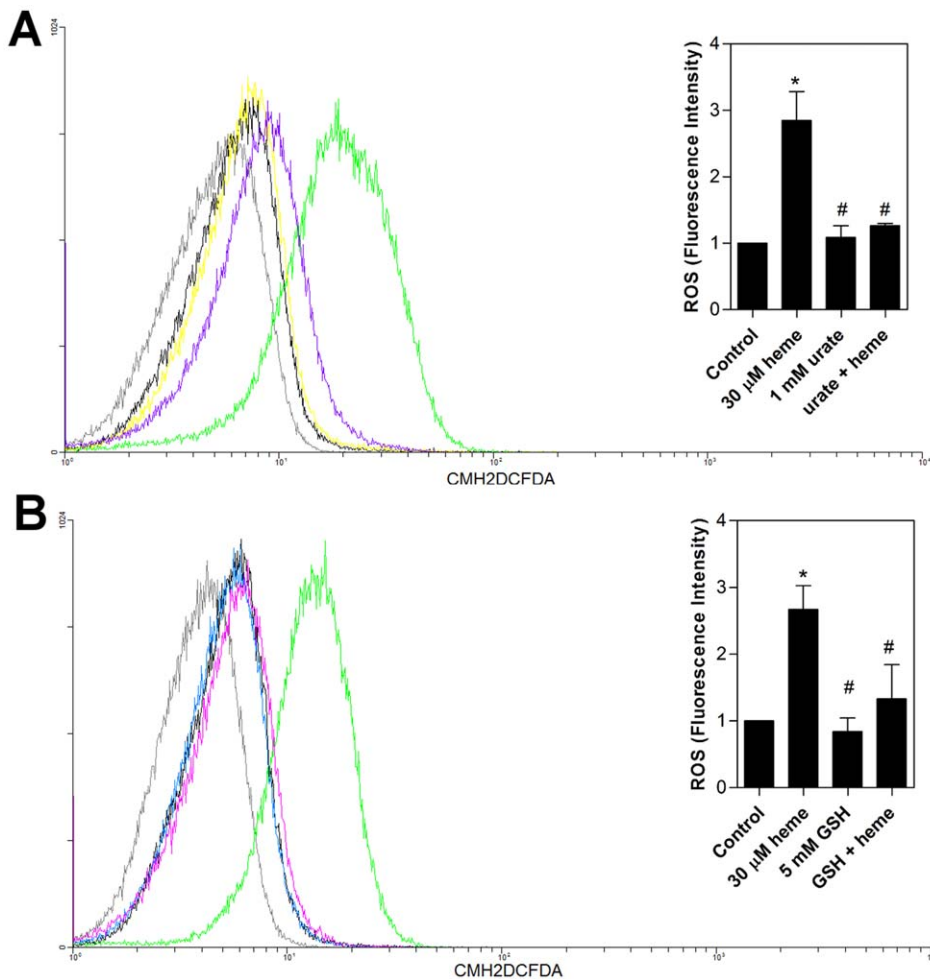


Figure 6. Classical antioxidants are able to prevent ROS induced by heme in *T. cruzi* epimastigotes. (A) Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were pre-incubated in PBS containing 2 μ M CMH₂DCFDA for 30 min and treated with 1 mM urate and 30 μ M heme for 15 min. ROS formation was analysed by flow cytometry. The histograms show autofluorescence (gray), 2 μ M CMH₂DCFDA (control-black), 30 μ M heme (green), 1 mM urate (yellow) and heme+urate (purple). The histograms are representative of four independent experiments. The inset graph shows the fluorescence intensity values obtained by the ratio of the experimental group median to the control group median (without heme). (B) Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were pre-incubated in PBS containing 5 mM GSH for 2 h and incubated with 2 μ M CMH₂DCFDA for 30 min with the addition of 30 μ M heme for the final 15 min. The production of ROS was analysed by flow cytometry. The histograms are representative of 4 experiments. The histograms show autofluorescence (gray), 2 μ M CMH₂DCFDA (control-black), 30 μ M heme (green), 5 mM GSH (blue) and heme+GSH (pink). The inset graph shows the fluorescence intensity values obtained by the ratio of experimental group median to the control group median (without heme). Data are expressed as the mean \pm standard deviation (n=4), * $p < 0.001$ as compared to the control group and # $p < 0.001$ relative to the heme group by Tukey's test. doi:10.1371/journal.pone.0025935.g006

induced ROS formation in *T. cruzi*, there is an important antioxidant mechanism that can efficiently reverse the redox imbalance in a short period. This result suggests the presence of a regulatory event since ROS formation is dependent exclusively on the heme molecule and can be regulated intracellularly very quickly. Changes in the redox balance can indicate the involvement of redox signalling.

Induction of *T. cruzi* proliferation by heme is mediated by ROS formation and requires CaMKII redox signalling

In an attempt to elucidate the mechanisms by which heme regulates redox-dependent *T. cruzi* proliferation, we tested the effect of specific inhibitors of several specific enzymes involved in signalling cascades (Table 1). Table 1 shows that heme-induced ROS formation in *T. cruzi* was not affected by protein kinase A (PKA), protein kinase C (PKC), protein kinase G (PKG), cyclin-dependent kinases, or phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K) specific inhibitors. We also tested the CaMKII inhibitors KN-93, a

molecule that acts by competitively binding to the calmodulin binding domain of the enzyme and Myr-AIP, a myristoylated form of the specific autocamtide-2-related inhibitory peptide (Figures 9A and 9B). These specific inhibitors of CaMKII, KN-93 and Myr-AIP, were able to block heme-induced ROS formation, strongly implicating the involvement of this enzyme in the redox mechanisms required by heme to promote *T. cruzi* proliferation.

Next, we determined whether similar to heme, exogenous H₂O₂ and pharmacological blockade of CaMKII would exert an inhibitory effect on epimastigotes ROS formation and parasite proliferation. As shown in figure 10A, the specific inhibitor of CaMKII blocked ROS production in epimastigotes. Furthermore, figure 10B shows that the treatment of parasites with Myr-AIP disturbed the H₂O₂-induced parasite growth.

In fact, this result is in agreement with previous evidence from our group showing that *T. cruzi* epimastigote proliferation is completely blocked following inhibition of CaMKII activity by

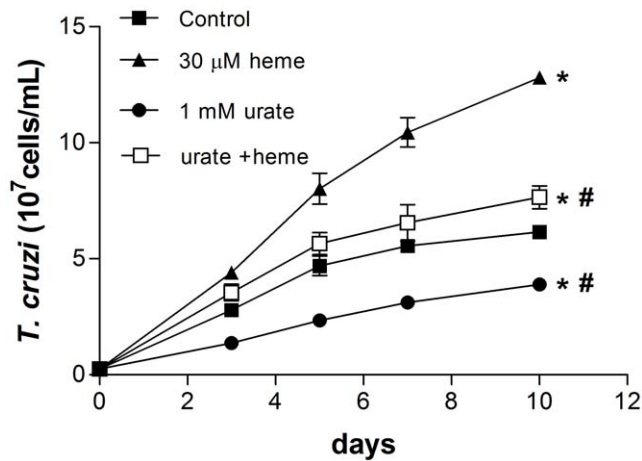


Figure 7. Urate and *T. cruzi* proliferation. Epimastigotes (2.5×10^6 cells/mL) were incubated in BHI medium supplemented with 10% FCS in the absence (control) or in the presence of 30 μ M heme and 1 mM urate for ten days. The growth curve is representative of three independent experiments. All data are presented as the mean \pm standard deviation ($n=3$), * $p<0.05$ compared to the control group or # $p<0.05$ as compared to the heme group by Tukey's test. doi:10.1371/journal.pone.0025935.g007

Myr-AIP and that subsequent heme-induced proliferation does not occur [31].

Discussion

Altogether, the data presented herein indicate the importance of the heme molecule, an abundant and important molecule in *Trypanosoma cruzi* biology, and the value of elucidating the defence and regulatory mechanisms developed by this parasite in response to heme. The drugs currently available for the treatment of Chagas disease (benznidazole, nifurtimox) seem to act by inducing oxidative stress [36,37]. In this regard, the identification of systems

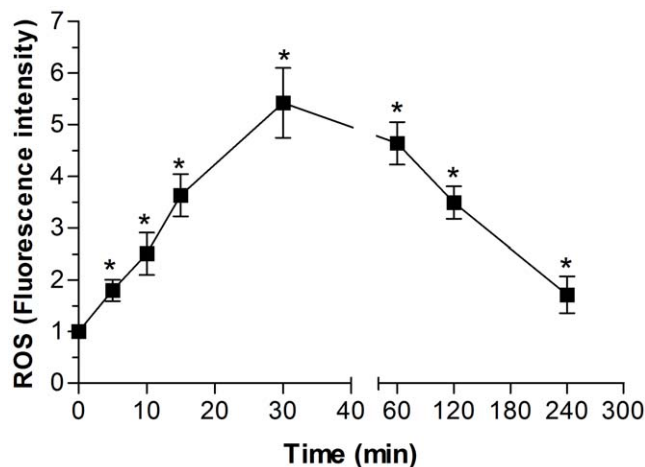


Figure 8. Heme generates ROS in *T. cruzi* in a transient manner. Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were treated in PBS with 30 μ M heme for different periods of time (5, 10, 15, 30, 60, 120 and 240 min) and loaded with 2 μ M CMH₂DCFDA in PBS for 30 min. ROS formation was analysed by flow cytometry. Fluorescence intensity values were obtained by the ratio of the heme group median to the control group median. Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=5$), * $p<0.05$ as compared to the control group by Tukey's test. doi:10.1371/journal.pone.0025935.g008

Table 1. The effect of kinase inhibitors on ROS production stimulated by heme in *T. cruzi*.

| Inhibitor | Target | ROS (Fluorescence intensity) | |
|-------------------------|-------------------------|------------------------------|-------------------|
| | | No heme | Heme |
| Control | --- | 1 | 3.240 \pm 0.435 |
| H-89 0.24 μ M | PKA | 1.061 \pm 0.085 | 2.596 \pm 0.505 |
| Roscovitine 3.5 μ M | cyclin dependent kinase | 1.194 \pm 0.226 | 2.643 \pm 0.533 |
| BIS 0.05 μ M | PKC | 1.021 \pm 0.017 | 2.297 \pm 0.624 |
| Ly 294002 8 μ M | PI3-K | 1.468 \pm 0.198* | 3.305 \pm 0.120 |
| H9 5 μ M | PKG | 1.063 \pm 0.016 | 2.375 \pm 0.404 |

Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were pre-incubated in PBS with the PK inhibitors ($5 \times K_i$) for 1 h and loaded in PBS with 2 μ M CMH₂DCFDA for 30 min and with 30 μ M heme for the final 15 min. ROS formation was measured by flow cytometry. **Fluorescence** intensity values were obtained by the ratio of the experimental group median (with heme) to the control group median (without heme). Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$), * $p<0.01$ as compared to the control group (no heme) by Tukey's test. doi:10.1371/journal.pone.0025935.t001

involved in the formation and detoxification of ROS as well as its role in the life cycle of the parasite, provide a valuable target for the development of an effective chemotherapy. The data presented herein demonstrate that heme is able to induce ROS in a dose-dependent manner in *T. cruzi* epimastigotes favouring the increase of the parasite proliferation by the antioxidant urate, corroborate the idea that redox signalling in fact governs *T. cruzi* biology. Although the heme molecule serves as a component of many essential enzymatic activities, as an amphiphilic compound, it may promote deleterious cellular processes such as lipid peroxidation and oxidative membrane damage [8,11,33]. Consistent evidence indicates that heme-induced lipid peroxidation is exerted mainly via the decomposition of organic hydroperoxides – instead of H₂O₂ – into alkoxyl and peroxy radicals [38,39]. The measurement of TBARS revealed that heme induced lipid peroxidation after 30 min of incubation in a dose-dependent manner, corroborating our results demonstrating a peak of ROS formation after 30 min. In the present study, immunoblotting against 4-HNE adducts indicated an increase of 4-HNE-modified proteins in parasites exposed to heme as compared to unexposed parasites. These results suggest that *T. cruzi* might benefit from the induction of aldehydes with biological activities necessary for the modulation of its cellular signalling. In fact, recent reports indicate that 4-HNE is a potent cell signalling molecule [26,34]. The present findings corroborate the data in the literature demonstrating that 4-HNE is involved in the proliferation and differentiation of several cell types *in vitro* [35].

Current perspectives favour evidence for the existence of a redox-based network of regulatory mechanisms that are intimately linked to cellular function. Unlike oxidative stress, which is characterised by an increase of ROS and radical-induced damage, redox regulation, or “redox signalling,” describes a reversible phase of physiological regulatory reactions that occur over shorter time periods. In such processes, the oxidative reactions are returned to the resting state through the activation of reductive pathways [15,17,22,40,41]. PI3K, MAPK and CaMKs have been related to redox signalling. ROS-induced kinases activation appears to occur, at least in part, through the inactivation of phosphatases, which can occur via the oxidation of these proteins [42–46]. These observations lead us to suggest that heme could be

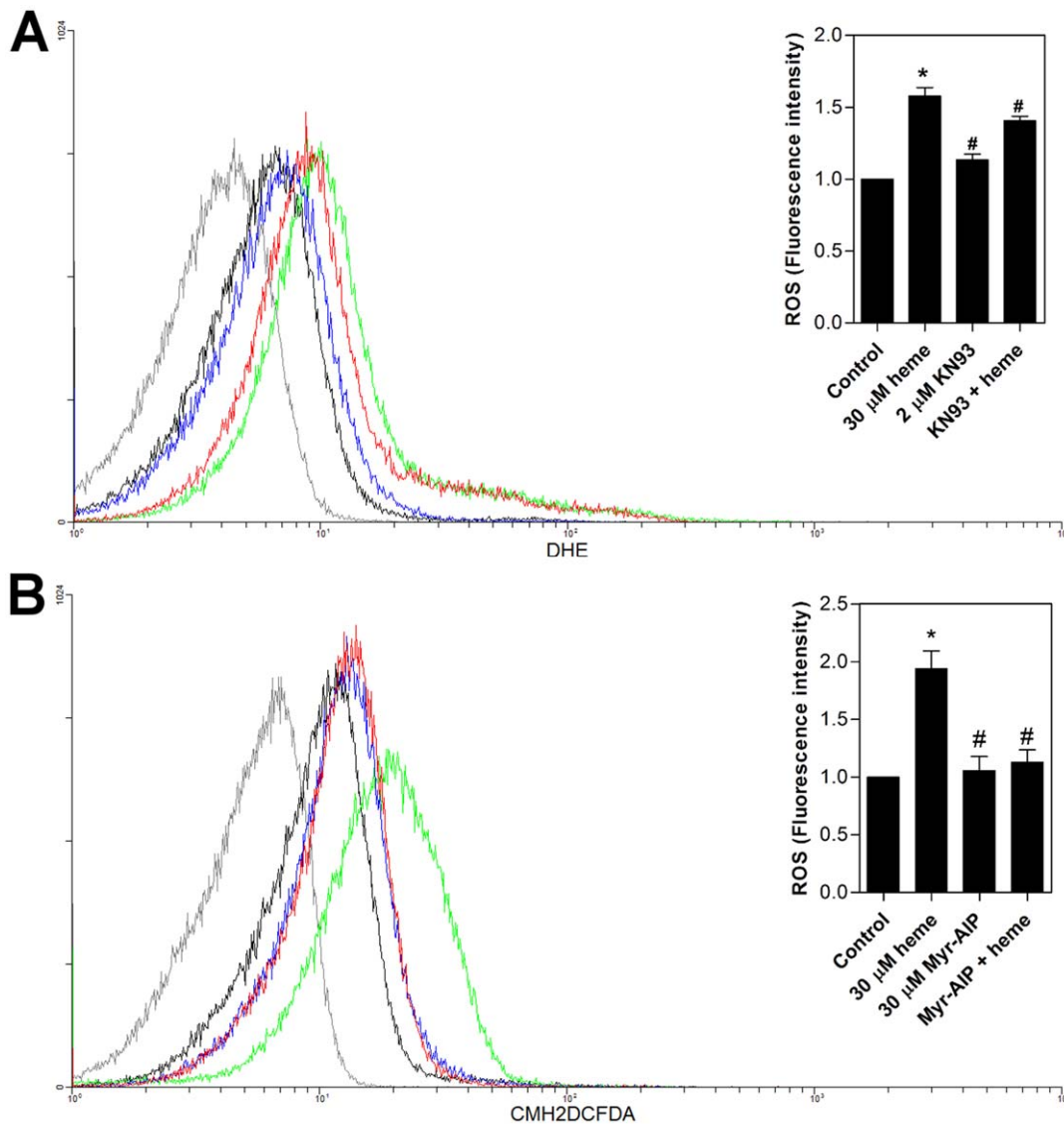


Figure 9. The CaMKII inhibitor is able to prevent ROS formation in *T. cruzi* epimastigotes. (A) Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were pre-incubated in PBS with 2 μ M KN-93 for 1 h and then incubated in PBS with 5 μ M DHE and 30 μ M heme for 30 min. The production of ROS was analysed by flow cytometry. The histograms show autofluorescence (gray), 5 μ M DHE (control-black), 30 μ M heme (green), 2 μ M KN-93 (blue) and KN-93+heme (red). The histograms are representative of two independent experiments. The inset graph represents the fluorescence intensity values obtained by the ratio of experimental group median to the control group median (without heme). Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=2$), * $p<0.05$ as compared to the control group and # $p<0.05$ relative to the heme group by Tukey's test. (B) Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were pre-incubated in PBS with 30 μ M Myr-AIP for 1 h and then loaded with 2 μ M CMH₂DCFDA for 30 min with the addition of 30 μ M heme for the final 15 min. ROS formation was analysed by flow cytometry. The histograms show autofluorescence (gray), CMH₂DCFDA (control- black), 30 μ M heme (green), 30 μ M Myr-AIP (blue) and Myr-AIP+heme (red). The histograms are representative of three independent experiments. The inset graph represents the fluorescence intensity values obtained by the ratio of the experimental group median to the control group median (without heme). Data are expressed as the mean \pm standard deviation ($n=3$), * $p<0.001$ as compared to the control group (without heme) and # $p<0.001$ compared to the heme group by Tukey's test.

doi:10.1371/journal.pone.0025935.g009

involved in ROS formation in *T. cruzi* epimastigotes by modulating an intracellular signalling pathway that is redox-sensitive.

Among all of the pathways tested, inhibition of the PI3K increased ROS formation by approximately 47% independently of the presence of heme. Goldshmit *et al.* [47] suggested that the PI3K pathway regulates the toxic levels of ROS induced by oxidative stress in neurons. Recent studies have shown that CaMKs can function as sensors of the redox status of different cellular types. Oxidative stress induced by H₂O₂ activates CaMKII and CaMKIV in T Jurkat lymphocytes independently

of calcium influx in these cells [29,40], thus stimulating the antiapoptotic pathway through I κ B and Akt [29]. These events are probably due to the oxidation and inactivation of intracellular phosphatases.

Recently, Cosentino-Gomes *et al* have shown that hydrogen peroxide inhibits ecto-phosphatase in *Trypanosoma rangeli* [48]. According to these observations, any cellular process that involves ROS production could potentially activate CaMKs, even in the absence of a calcium influx. Through pharmacological and molecular inhibition, it has been demonstrated that CaMKII participates in ERK phosphorylation induced by H₂O₂ in human

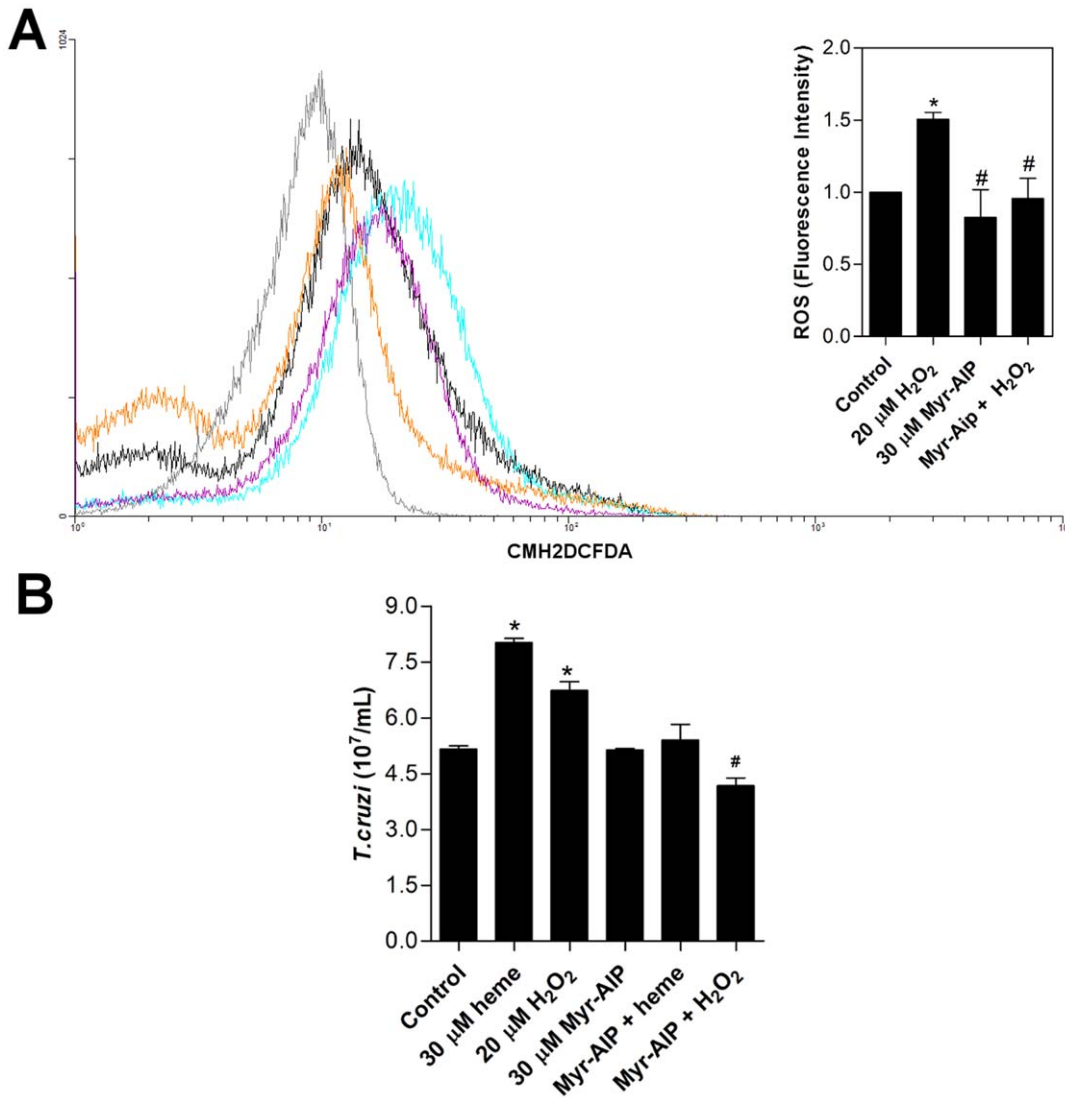


Figure 10. The CaMKII inhibitor is able to prevent ROS formation in *T. cruzi* epimastigotes. (A) Epimastigotes (1×10^7 cells/mL) were pre-incubated in PBS with 30 μ M Myr-AIP for 1 h and then incubated in PBS with 2 μ M CMH₂DCFDA and 20 μ M H₂O₂ for 30 min. The production of ROS was analysed by flow cytometry. The histograms show autofluorescence (gray), 2 μ M CMH₂DCFDA (control-black), 20 μ M H₂O₂ (blue), 30 μ M Myr-AIP (orange) and Myr-AIP+H₂O₂ (purple). The histograms are representative of two independent experiments. The inset graph represents the fluorescence intensity values obtained by the ratio of experimental group median to the control group median (without heme). Data are expressed as the mean \pm standard deviation (n=2), * $p < 0.05$ as compared to the control group and # $p < 0.05$ relative to the H₂O₂ group by Tukey's test. (B) Epimastigotes (2.5×10^6 cells/mL) were incubated in BHI medium supplemented with 10% FCS in the absence (control) or in the presence of 30 μ M heme, 20 μ M H₂O₂, 30 μ M Myr-AIP, or 30 μ M Myr-AIP plus heme or H₂O₂. After five days parasites were quantified using a Neubauer chamber. All data are presented as the mean \pm standard deviation (n=2), * $p < 0.05$ as compared to the control group and # $p < 0.05$ relative to the H₂O₂ group by Tukey's test.

doi:10.1371/journal.pone.0025935.g010

breast cancer cells [49]. This pathway could be one of the pathways responsible for allowing cancer cells to survive treatments that induce oxidative stress, such as chemotherapy or ionising radiation [49]. In addition, Bouallegue *et al.*, demonstrated that CaMKII act as a critical upstream component triggering the H₂O₂-induced phosphorylation of IGF-1R, ERK and PKB in vascular smooth muscle cells [50]. In this case, the ROS induced upregulation of CaMKII could contribute to the abnormal cell proliferation related to the pathogenesis of vascular disease [50,51].

We have searched the *Trypanosoma cruzi* genome for CaMKII homologs and identified two ORFs that encode putative CaMKII in the database representing two alleles of the same gene: one

allele sequenced from strain CL Brenner, non-Esmeraldo-like haplotype (XP_815126) and another allele sequenced from strain CL Brenner, Esmeraldo-like haplotype (XP_816286) (Figure S1). These two alleles are extremely similar among themselves (7 different residues in a total of 545) and both present approximately 37% identity and 55% similarity to the kinase domain (residues 23–271) of the human CaMKII alpha subunit [52]. These sequences had been previously identified as members of the CaMK family by Parsons and coworkers [53]. We have used in this and previous work [31] reagents considered to be specific for the identification of CaMKII protein activation (phospho-specific CaMKII antibody) and activity (the substrate camtide-2 and the inhibitor Myr-AIP). All three reagents were developed

based on the aminoacid sequence neighbouring the autophosphorylation T²⁸⁶ residue from CaMKII subunits. In Figure S2 we show that this region is conserved in the *T. cruzi* sequences identified giving support to the use of these reagents to study the function of CaMKII in *T. cruzi* [52]. The results of these studies support the hypothesis that a CaMKII-like enzyme is involved in the redox imbalance, thus modulating the adaptation to the redox status in different cell types such as *Trypanosoma cruzi*. In this present work we demonstrate that, despite the presence of large amounts of heme within the insect midgut, which is assumed to cause redox imbalance to the insect [2,54], *T. cruzi* epimastigotes require heme for proliferation in a mechanism that involves parasite CaM kinase II-like activation. Additionally, this is another indication for the beneficial effect of ROS if it is tightly controlled.

Furthermore, these two *T. cruzi* sequences presents a conserved calmodulin binding region (residues 290–300 of the human CaMKII alpha subunit – Figure S1) and an autoinhibitory domain containing a threonine residue in a position similar to the T286 residue of the human CaMKII alpha subunit (marked in green in Figure S1). The autophosphorylation of the T286 residue is directly involved in the regulation of a calcium/calmodulin independent activity that is observed after the first activation of this enzyme by calcium/calmodulin binding [49]. This characteristic distinguishes CaMKII from other members of the calcium/calmodulin dependent protein kinase family [49]. Another feature of CaMKII enzyme that differ them from other members of the CaM-dependent protein kinase family is the formation of a dodecamer complex. This association occurs via its C-terminal region [49] and although the similarity is not as good as in other functional domains, we can observe in the alignment (Figure S1) [52] an overall conservation of the characteristics in this region as well. Therefore, the conservation of these features (kinase domain, calcium/calmodulin binding region, autophosphorylation site and C-terminal association domain) on these two *T. cruzi* sequences makes a strong argument for their election as putative CaMKII enzymes.

The biochemical interplay between *T. cruzi* and the triatomine vectors has been investigated since 1909 [1]. Notwithstanding, a comprehensive study describing the physiological role of heme in *T. cruzi*-vector interaction has been lacking. Several important issues must be considered in this context: *i*) the total heme levels in the vector midgut reach millimolar concentrations; of note, heme crystallisation into hemozoin (Hz) is a very efficient heme detoxification process that takes place in the midgut of different triatomine species [55,56]. Interestingly, recent evidence has demonstrated that Hz represents by far the dominant iron-containing compound found in the triatomine midgut, comprising at least 97% of whole iron species [57]. Therefore, despite the very low “free” heme levels in the *R. prolixus* midgut [57], it is conceivable that small amounts of heme would be physiologically relevant to allow progression of the *T. cruzi* life cycle in this compartment. *ii*) at micromolar concentrations, heme exerts a potent pro-oxidant effect, *iii*) the drugs currently available for the treatment of Chagas disease (nifurtimox and benznidazole) seem to act via the alteration of redox metabolism [36,37], and novel drug candidates, such as the naphthofuranquinones and the putrescine analogue diaminobutanone, exert their trypanocidal activity by causing a mitochondrial dysfunction that results in increased ROS generation [58,59]. Thus, the identification of

mechanisms involved in ROS formation and detoxification as well as their role in the *T. cruzi* life cycle would provide valuable data for the development of novel, effective therapeutic approaches.

The heme molecule represents a key molecule in the interface between the vector and the parasite and this interaction determine the transmission of Chagas disease. In this study we demonstrate that ROS (H₂O₂) or heme-induced ROS activated CaMKII, triggering the proliferation of the epimastigote forms. Also, the antioxidants, such as urate and GSH, inhibited heme-induced ROS and parasite proliferation. In addition, Myr-AIP, the specific CaMKII inhibitor extinguished heme-induced ROS in epimastigotes, decreasing parasite growth. The data presented herein indicate that heme induces a transient oxidative stress condition that stimulates *T. cruzi* proliferation via a mechanism mediated by a CaM Kinase II-like pathway.

Supporting Information

Figure S1 Multiple sequence alignment of human CaMKII isoforms and two putative isoforms of CaMKII from *T. cruzi*. Asterisk “*” means that the residues are identical in all sequences in the alignment. “:” means that conserved substitutions have been observed, while “.” means that semi-conserved substitutions are observed. Residues marked in red are the 7 different aminoacids observed between the two *T. cruzi* isoforms. Residues marked in green are homologous to the T²⁸⁶ from the human CaMKII alpha isoform which is phosphorylated during the process of autophosphorylation/ autoactivation induced by calcium/calmodulin binding. The alignment was made using CLUSTALW program version 2.0.12 (52). (DOC)

Figure S2 Sequence alignment of Myr-AIP with human and *T. cruzi* isoforms of CaMKII. Alignment of the aminoacid sequences of MyrAIP (A), the peptide epitope used to generate the phospho-CaMKII antibody (B) and Camtide2 (C) with the homologous region of human and *T. cruzi* CamKII isoforms. XP_816286 sequence was omitted from the figure since it is identical to the sequence of XP_815126. Residue highlighted in yellow indicates the T286A mutation introduced in Myr-AIP sequence to inhibit the phosphorylation of this peptide. Asterisk “*” means that the residues are identical in all sequences in the alignment. “:” means that conserved substitutions have been observed, while “.” means that semi-conserved substitutions are observed. (DOC)

Acknowledgments

We greatly appreciate the gift of kinase inhibitors from Dr. Mário Alberto Cardoso Silva-Neto (IBqM-UFRJ). We would like to thank Professor Luís Henrique Monteiro Leal, *in memoriam*, with our best memories and admiration.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MCP NPAN SRD MFO. Performed the experiments: NPAN CFS FMSS PES RLSG SRD REB GATL CAM. Analyzed the data: MCP NPAN SRD GATL LHML MGPC CAM MFO. Contributed reagents/materials/analysis tools: MCP LHML MGPC MFO. Wrote the paper: MCP NPAN MFO.

References

1. Chagas C (1909) 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 1: 159–218.
2. Graça-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GRC, Paes MC, et al. (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. Insec Bioch Mol Biol 36: 322–335.

3. Lombardo ME, Araujo LS, Batlle A (2003) 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Inter J of Biochem & Cell Biol* 35: 1263–1271.
4. El-Sayed NM, Myler PJ, Bartholomeu DC, Nilsson D, Aggarwal G, et al. (2005) The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. *Science* 309: 409–415.
5. Sah JF, Ito H, Kolli BK, Peterson DA, Sassa S, et al. (2002) Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events uroporphyrin and for photodynamic therapy. *J Biol Chem* 277: 14902–14909.
6. Lara FA, Sant'Anna C, Lemos D, Laranja GAT, Coelho MGP, et al. (2007) Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem Biophys Res Commun* 355: 16–20.
7. Ponka P (1999) Cell biology of heme. *Am J Med Sci* 318: 241–256.
8. Tappel AL (1955) Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. *J Biol Chem* 217: 721–733.
9. Aft RL, Mueller GC (1983) Hemin-mediated DNA strand scission. *J Biol Chem* 258: 12069–12072.
10. Aft RL, Mueller GC (1984) Hemin-mediated oxidative degradation of proteins. *J Biol Chem* 259: 301–305.
11. Rytter SW, Tyrrell RM (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. *Free Radic Biol Med* 28: 289–309.
12. Deterding LJ, Ramirez DC, Dubin JR, Mason RP, Tomer KB (2004) Identification of free radicals on hemoglobin from its self-peroxidation using mass spectrometry and immuno-spin trapping: observation of a histidyl radical. *J Biol Chem* 279: 11600–11607.
13. Schmitt TH, Frezzatti WA, Schreier S (1993) Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch of Biochem Biophys* 307: 96–103.
14. Dröge W (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82: 47–95.
15. Jones D (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: 1865–1879.
16. Halliwell B, Gutteridge JMC (2007) *Free Radicals in Biology and Medicine*, fourth edition, Clarendon Press, Oxford.
17. Jones D (2008) Radical-free biology of oxidative stress. *Am J Physiol Cell Physiol* 295: C849–868.
18. Nordberg J, Arnér ESJ (2001) Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. *Free Radic Biol Med* 31: 1287–1312.
19. Dreher D, Junod AF (1996) Role of oxygen free radicals in cancer development. *Eur J Cancer* 32A: 30–38.
20. Houstis N, Rosen ED, Lander ES (2006) Reactive oxygen species have a causal role in multiple forms of insulin resistance. *Nature* 440: 944–948.
21. Singal PK, Khaper N, Farahmand F, Bello-Klein A (2000) Oxidative stress in congestive heart failure. *Curr Cardiol Rep* 2: 206–211.
22. Frein D, Schildknecht S, Bachschmid M, Ullrich V (2005) Redox regulation: A new challenge for pharmacology. *Biochem Pharmacol* 70: 811–823.
23. Bonizzi G, Piette J, Merville MP, Bours V (2000) Cell type-specific role for reactive oxygen species in nuclear factor κ B activation by interleukin-1. *Biochem Pharmacol* 59: 7–11.
24. Zhang Y, Griendling KK, Dikalova A, Owens GK, Taylor WR (2005) Vascular hypertrophy in angiotensin II-induced hypertension is mediated by vascular smooth muscle cell-derived H_2O_2 . *Hypertension* 46: 732–737.
25. Bae YS, Kang SW, Seo MS, Baines IC, Tekle E, et al. (1997) Epidermal growth factor (EGF)-induced generation of hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 272: 217–221.
26. Rudolph TK, Freeman BA (2009) Transduction of redox signaling by electrophile-protein reactions. *Sci Signal* 2: re7.
27. Trachootham D, Lu W, Ogasawara MA, Nilsa RD, Huang P (2008) Redox regulation of cell survival. *Antioxid Redox Signal* 10: 1343–1374.
28. Howe CJ, LaHair MM, Maxwell JA, Lee JT, Robinson PJ, et al. (2002) Participation of the calcium/calmodulin-dependent kinases in hydrogen peroxide-induced I κ B phosphorylation in human T lymphocytes. *J Biol Chem* 277: 30469–30476.
29. Franklin RA, Rodriguez-Mora OG, LaHair MM, McCubrey JA (2006) Activation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases as a consequence of oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8: 1807–1817.
30. Swilius MT, Waxham MN (2008) Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinases. *Cell Mol Life Sci* 65: 2637–2657.
31. Souza CF, Carneiro AB, Silveira AB, Laranja GAT, Silva-Neto MAC, et al. (2009) Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. *Biochem Biophys Res Commun* 390: 541–546.
32. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
33. Catalá A (2009) Lipid peroxidation of membrane phospholipids generates hydroxy-alkenals and oxidized phospholipids active in physiological and/or pathological conditions. *Chem Phys Lipids* 157: 1–11.
34. Petersen DR, Doorn JA (2004) Reactions of 4-hydroxynonenal with proteins and cellular targets. *Free Radic Biol Med* 37: 937–945.
35. Barrera G, Pizzimenti S, Dianzani U (2004) 4-hydroxynonenal and regulation of cell cycle: effects on the pRb/E2F pathway. *Free Radic Biol Med* 37: 597–606.
36. Docampo R, Mason RP, Mottley C, Muniz RP (1981) Generation of free radicals induced by nifurtimox in mammalian tissues. *J Biol Chem* 256: 10930–10933.
37. Wilkinson SR, Kelly JM (2009) Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Rev Mol Med* 11: e31.
38. Kalyanaram B, Mottley C, Mason RP (1983) A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxyl free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. *J Biol Chem* 258: 3855–3858.
39. Van der Zee J, Barr DP, Mason RP (1996) Spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-butyl hydroperoxide. *Free Rad Biol Med* 20: 199–206.
40. Gough NR (2009) Focus issue: the long and short of redox signaling. *Sci Signal* 2: eg12.
41. Flohé L (2010) Changing paradigms in thiology: from antioxidant defense toward redox regulation. *Methods Enzymol* 473: 1–39.
42. Howe CJ, LaHair MM, McCubrey JA, Franklin RA (2004) Redox regulation of the calcium/calmodulin-dependent protein kinases. *J Biol Chem* 279: 44573–44581.
43. Leslie NR, Benneth D, Lindsay YE, Stewart H, Gray A, et al. (2003) Redox regulation of PI 3-kinase signalling via inactivation of PTEN. *EMBO J* 22: 5501–5510.
44. Leslie NR (2006) The redox regulation of PI 3-kinase-dependent signaling. *Antioxid Redox Signal* 8: 1765–1774.
45. McCubrey JA, LaHair MM, Franklin RA (2006) Reactive oxygen species-induced activation of the MAP kinase signaling pathways. *Antioxid Redox Signal* 8: 1775–1789.
46. McCubrey JA, Franklin RA (2006) Reactive oxygen intermediates and signalling through kinase pathways. *Antioxid Redox Signal* 8: 1745–1749.
47. Goldshmit Y, Erlich S, Pinkas-Kramarski R (2001) Neuregulin rescues PC12-ErbB4 cells from cell death induced by H_2O_2 . Regulation of reactive oxygen species levels by phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem* 276: 46379–46385.
48. Cosentino-Gomes D, Russo-Abrahão T, Fonseca-de-Souza AL, Ferreira CR, Galina A, et al. (2009) Modulation of *Trypanosoma rangeli* ecto-phosphatase activity by hydrogen peroxide. *Free Radic Biol Med* 47: 152–158.
49. Rodriguez-Mora OG, LaHair MM, Evans MJ, Kovacs CJ, Allison RR, et al. (2006) Inhibition of the CaM-Kinases augments cell death in response to oxygen radicals and oxygen radical inducing cancer therapies in MCF-7 human breast cancer cells. *Cancer Biol Ther* 5: 1022–1030.
50. Bouallegue A, Pandey NR, Srivastava AK (2009) CaMKII knockdown attenuates H_2O_2 -induced phosphorylation of ERK1/2, PKB/Akt, and IGF-1R in vascular smooth muscle cells. *Free Radic Biol Med* 47: 858–866.
51. Dhalla NS, Temsah RW, Netticaden T (2000) Role of oxidative stress in cardiovascular disease. *J Hypertens* 18: 655–673.
52. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, et al. (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31: 3497–3500.
53. Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC (2005) Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics* 6: 127–146.
54. Paes MC, Oliveira MB, Oliveira PL (2001) Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Arch Insect Biochem Physiol* 48: 63–71.
55. Oliveira MF, Silva JR, Dansa-Petretski M, de Souza W, Braga CMS, et al. (2000) Haemozoin formation in the midgut of the blood sucking insect *Rhodnius prolixus*. *FEBS Lett* 477: 95–98.
56. Oliveira MF, Gandara ACP, Braga CMS, Silva JR, Mury FB, et al. (2007) Heme crystallization in the midgut of triatomine insects. *Comp Biochem Physiol C* 146: 168–174.
57. Stiebler R, Timm BL, Oliveira PL, Hearne GR, Egan TJ, et al. (2010) On the physico-chemical and physiological requirements of hemozoin formation promoted by perimicrovillar membranes in *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochem Mol Biol* 40: 284–292.
58. Menezes D, Valentim C, Oliveira MF, Vannier-Santos MA (2006) Putrescine analogue cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res* 98: 99–105.
59. Menna-Barreto RF, Goncalves RL, Costa EM, Silva RS, Pinto AV, et al. (2009) The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med* 47: 644–653.