

Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ
Instituto de Bioquímica Médica – IBqM

Vitor Lopes de Abreu Lima

**Ácido Xanturênico: um antioxidante de baixo peso molecular
no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti***

Rio de Janeiro, 2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Vitor Lopes de Abreu Lima

Ácido Xanturênico: um antioxidante de baixo peso molecular no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Biológica, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências (Química Biológica).

Orientador: Pedro Lagerblad de Oliveira
(Prof. Titular do IBqM)

Rio de Janeiro, 2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Lima, Vitor Lopes de Abreu
Ácido Xanturênico: um antioxidante de baixo peso molecular no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*/ Vitor Lopes de Abreu Lima
Rio de Janeiro, 2007

Tese (Doutorado em Química Biológica)
Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro
Instituto de Bioquímica Médica – IBqM
2007

Orientador: Pedro Lagerblad de Oliveira

- 1- *Aedes aegypti*
- 2- Ácido xanturênico
- 3- Antioxidante

I – Oliveira, Pedro Lagerblad

II – Universidade Federal do Rio de Janeiro – Instituto de Bioquímica Médica

III - Ácido Xanturênico: um antioxidante de baixo peso molecular no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*

FOLHA DE APROVAÇÃO

Vitor Lopes de Abreu Lima

Ácido Xanturênico: um antioxidante de baixo peso molecular no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*

Rio de Janeiro, 28 de setembro de 2007.

(Pedro Lagerblad de Oliveira, Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Universidade Federal do Rio de Janeiro).

(Hatsuburo Masuda, Professor Titular do Instituto de Bioquímica Médica – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Universidade Federal do Rio de Janeiro).

(Alexandre Afrânio Peixoto, Pesquisador do Instituto Oswaldo Cruz -RJ).

(Roger Frigério Castilho, Professor doutor da Universidade Estadual de Campinas)

(Ednildo de Alcantara Machado, Professor Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Universidade Federal do Rio de Janeiro)

(Robson de Queiroz Monteiro, Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica – Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Universidade Federal do Rio de Janeiro).

Lima, Vitor Lopes de Abreu. Ácido Xanturênico: um antioxidante de baixo peso molecular no intestino médio do mosquito *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro, 2007. Tese de Doutorado em Química Biológica – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Os insetos hematófagos ingerem grande quantidade de sangue a cada refeição, mosquito *Aedes aegypti* geralmente ingere de duas a três vezes seu próprio peso em sangue a cada vez que se alimenta. Quando o sangue é digerido, grandes quantidades de heme são liberadas no intestino. O heme liberado pela digestão da hemoglobina constitui um problema bioquímico devido a sua capacidade de catalizar a formação de espécies reativas de oxigênio. Para contornar este problema os intestinos dos insetos hematófagos são dotados de mecanismos bioquímicos que inibem a atividade pró-oxidante derivada da digestão do sangue. Com a descoberta de que o ácido xanturênico (XA), uma quinolina derivada de triptofano, está presente no intestino de mosquitos, decidimos estudar seu papel na bioquímica do heme e do ferro durante a digestão do sangue no mosquito *Aedes aegypti*.

Para isso: **1)** O XA foi identificado no intestino do *Aedes*, sua presença foi confirmada pelo tempo de eluição em cromatografia de fase reversa, espectrometria de absorção de luz (UV-VIS) e espectrometria de massa. **2)** Foi estabelecido um protocolo de quantificação do XA por cromatografia de fase reversa em HPLC e foi determinada a variação na sua quantidade no intestino médio do *Aedes* ao longo da digestão do sangue. Seu pico de concentração é em 24 horas após o repasto e alcança 15nmol por intestino (~7 mM). **3)** O RNAm para a enzima-chave de sua biossíntese foi identificado no epitélio intestinal por RT-PCR. **4)** Foi mostrado que o XA é capaz de se ligar ao ferro e ao heme, formando complexos com ambos e inibindo peroxidação de lipídeos causada por esses dois ligantes e a hemólise induzida por heme. A ligação do XA ao heme, bem como sua atividade antioxidante apresenta acentuada dependência de pH, aumentando quando o pH sobe de 7 para 8, indicando que a forma de protonação XA^{2-} é a forma ativa como quelante.

Em conjunto, os resultados indicam que o XA é um importante antioxidante no intestino do *Aedes*, onde está presente em abundância. Sua síntese é realizada no epitélio intestinal. Sua atividade se dá, pelo menos em parte, através da formação de compostos de coordenação com o heme e com o ferro tornando-os inativos na formação de espécies reativas de oxigênio.

Lima, Vitor Lopes de Abreu. Xanthurenic Acid: a low molecular weight antioxidant in the gut of the mosquito *Aedes aegypti*. Rio de Janeiro, 2007. Tese de Doutorado em Química Biológica – Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Hematophagous insects ingest large quantities of blood at each feeding. *Aedes aegypti* ingests three times its own weight in blood. When blood is digested large amounts of heme are liberated into the gut causing heme- and iron-catalyzed reactive oxygen species (ROS) formation. To overcome this challenge hematophagous insects have biochemical mechanisms that inhibit ROS formation. The identification of xanthurenic acid (XA) in mosquitoes raises the question of what are its physiological roles in the insect.

1) XA was identified in *Aedes* gut, its presence was confirmed by its elution time in HPLC chromatography; by its absorption spectrum in UV-VIS; by its molecular weight and fragmentation pattern determined by mass spectroscopy. **2)** XA content into gut was determined throughout blood digestion. Its peak value is 15 nmol/ gut, at 24 hours after meal. **3)** The key enzyme of XA synthesis was identified in gut epithelium cells by RT-PCR. **4)** It was shown that XA is capable to bind iron and heme, inhibiting lipid oxidation induced by these species and the heme-induced hemolysis. Both the binding and the antioxidant activity of XA are pH-dependent, increasing when pH raises from pH 7.0 to 8.0 (as well as the exflagellation activity), indicating that the active protonation form of this tetraprotic acid is XA^{2-} .

Taken together, these results indicate that XA is an important antioxidant mechanism inside mosquito gut, where it is found in large amounts, synthesized by epithelium. Its activity as an antioxidant involves, at least in part, the formation of coordination complexes with iron and heme.

Lista de abreviaturas:

- μM – Micromolar (10^{-6} mol/L)
- AeIMUC1 – *Aedes aegypti Intestinal Mucin 1*
- AMO - antranilato monooxigenase
- ARF – aril formidase
- ARH – aril hidrolase
- Glu – glutamato
- HDO – hidroxí-antranílico dioxigenase
- HeLP - “Heme Lipoprotein”
- HIV – Vírus da imunodeficiência adquirida
- IDO – indoleamina dioxigenase
- IL-5 – Interleucina-5
- KAT – quinurenina amidotransferase
- kDa – Kilo dalton (10^3 daltons)
- LPS – Lipopolissacarídeo bacteriano
- mM – Milimolar (10^{-3} mol/L)
- PBS – Salina Tampona com Fosfato (*Phosphate-buffered saline*)
- RHBP - “*Rhodnius Prolixus Heme-binding protein*”
- ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
- TBS – Salina tamponada com TRIS
- TDO – triptofano dioxigenase
- TRIS – Tris hidroxiaminometano

- UV – luz ultravioleta
- α KG - α -cetoglutarato

Agradecimentos

- Ao Pedro por me receber em seu laboratório, por toda ajuda recebida, e tudo que ele representa de positivo para o grupo.
- A todos colegas de estudo do lab: professores jovens e sênior; pós-docs, doutorandos, mestrandos, ICs, estudantes de escola técnicas e do CAP. Esta tese foi desenvolvida dentro da massa formada por cada um de vocês. Considero todos co-autores.
- A todo(a)s amigo(a)s e colegas de todo CCS pelas conversas, reagentes, softwares, cervejas, aulas, consultorias, dicas, apoios e partidas de sinuca e totó.
- A Ivan Fortes e a Tiago Sales, que participaram deste trabalho como alunos de iniciação científica.
- Ao Sr. João pelo apoio técnico, pelas conversas e pela simpatia.
- A Conceição e a Kátia pelo cuidado na colônia de mosquitos.
- A todos os colegas de laboratório que doaram suas taxas de bancada para gastos gerais do grupo.
- A todos que participaram de alguma forma da administração do lab., como o Zé Henrique, Renata Sales e o Marcos Sorgine
- Aos amigos do grupo do Orlando.
- Ao Ricardo Pilz pelas aulas de Tai-chi-chuan e, Shao-lin
- A Richard Valente pelos espectros de massa.
- A Robson Monteiro pela revisão do manuscrito.
- Aos membros da banca, que gentilmente aceitaram o convite para examinarem esta tese.
- A minha Mãe, Débora; minhas irmãs Rosa e Vera, meu irmão Bruno e ao meu pai Henrique (em memória).
- A Tina, por todo carinho e pelo convívio.
- E, principalmente, a própria Vida, que com seus desafios e seus mistérios nos convida sempre ao aprendizado, à superação e ao aprimoramento.

Lista de figuras:

Introdução

Figura 1.1- Artrópodes hematófagos ingerem grande quantidade de sangue a cada alimentação.	15
Figura 1.2.1 - Estrutura molecular da ferroprotoporfirina IX (heme)	16
Figura 1.3.1 - Esquema da redução monoelétrica do oxigênio diatômico	19
Figura 1.3.2 - Esquema geral da formação de radicais livres induzida por heme e ferro	20
Figura 1.3.3- Três das principais estratégias usadas por hematófagos para lidar com a grande quantidade de heme.	21
Figura 1.4- Ciclo de vida do <i>Plasmodium falciparum</i> .	23
Figura 1.5 - Aspecto geral da via das quinureninas.	27
Figura 1.5.2 - A primeira reação da via das quinureninas	28
Figura 1.6.- Estruturas obtidas por difração de raios X –	29
Figura 1.10 - A quinolobactina e o ácido xanturênico	43
Figura 1.12 - Quelatos do ácido xanturênico	45

Materiais e métodos

Figura 3.1 - Ciclo de vida do <i>Aedes aegypti</i>	48
Figura 3.2 - Dissecção do intestinos médio de <i>Aedes aegypti</i>	49

Resultados:

Figura 4.1.1 - Perfil de fracionamento do intestino médio do mosquito por cromatografia de fase reversa	61
Figura 4.1.2 - Espectros de massa do pico de 12 minutos fracionado de intestino de <i>Aedes</i> e de seus fragmentos	62
Figura 4.2.1 - Curva padrão da dosagem de XA por HPLC	63
Figura 4.2.2 - Curso temporal da variação da quantidade XA no intestino do mosquito	65
Figura 4.3.1 - Identificação do mRNA para a TDO no epitélio intestinal do <i>Aedes</i>	66
Figura 4.4.1 - Efeito de alguns inibidores via das quinureninas nos níveis de XA intestinal a 12 e a 24 horas	67
Figura 4.5 – Efeito protetor do XA na oxidação de lipídeos induzida por heme	68
Figura 4.6 – Variação da mobilidade eletroforética do heme causada pela adição de XA em dois diferentes pHs	69
Figura 4.7 – Efeito do XA na peroxidação lipídica induzida por íon ferroso e peróxido de hidrogênio.	70
Figura 4.8 – Formação do complexo XA:Fe ²⁺ .	72
Figura 4.9 – Titulação do XA.	73
Figura 4.10 – Atividade anti-hemolítica do XA na hemólise induzida por heme.	74

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 Hematofagia	14
1.2 O sangue como fonte de heme e ferro	15
1.2.1 Algumas propriedades químicas do heme.	16
1.3 O Estresse oxidativo.	18
1.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS)	18
1.3.2- Algumas estratégias bioquímicas usadas por artrópodes hematófagos	21
1.4 Ácido xanturênico (XA) como o fator de exflagelação	23
1.4.1 – XA no mosquito	25
1.5 Via das quinureninas - aspecto geral.	25
1.6 IDO e TDO	28
1.7 A TDO	30
1.8 A IDO	31
1.8.1 Radical superóxido como substrato da IDO	32
1.8.2 Depleção local de triptofano: IDO como um importante mecanismo efetor do γ -interferon.	32
1.8.3 – IDO – A enzima responsável pela prevenção da rejeição ao feto	33
1.8.4 – IDO e o sistema imune.	34
1.9 Resumo comparativo entre IDO e TDO	35
1.9.1 – Distribuição filogenética da IDO e da TDO	35
1.9.2 – Substratos	37
1.10 Atividades biológicas de alguns intermediários da via das quinureninas	39
1.10.1- Quinolobactina, um derivado metilado do ácido xanturênico usado como sideróforo por bactérias.	43
1.11 Atividade antioxidante <i>in vitro</i> de alguns intermediários da via das quinureninas	44
1.12 Ácido xanturênico: um quelante de metais	45
2 – OBJETIVOS	46
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	48
3.1 Mosquitos	48
3.2 Dissecção do intestino médio de <i>Aedes aegypti</i>	49
3.3 Dosagem do ácido xanturênico no intestino do <i>Aedes aegypti</i> por cromatografia de alta performance em coluna de fase reversa.	50
3.3.1 - Curvas padrão de ácido xanturênico	51
3.5 Ensaio de titulação potenciométrica do ácido xanturênico	52
3.6 Alimentação em comedouros artificiais	52

3.6.1 - Preparação do plasma.	53
3.6.2 - Administração das drogas com o sangue.	53
3.7 Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase do mRNA da triptofano dioxigenase do epitélio intestinal (RT-PCR)	54
3.7.1 - Extração de RNA total	54
3.7.2 - Síntese da primeira fita de cDNA	54
3.7.3 - Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) para reação em cadeia da polimerase (PCR)	55
3.7.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)	55
3.8 Ensaio de oxidação de fosfatidilcolina induzida por heme	
3.8.1 - Oxidação da fosfatidilcolina	56
3.8.2 - Preparo de lipossomas de fosfatidilcolina	56
3.8.3 - Preparo da solução de heme	56
3.8.4 - Curvas de consumo de O ₂ .	57
3.9 Ensaio de oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina induzida por íon ferroso	
3.9.1 - Oxidação da fosfatidilcolina	58
3.9.2 - Preparo de lipossomas de fosfatidilcolina	58
3.9.3 - Curvas de consumo de O ₂	58
3.10 Ensaio de deslocamento da mobilidade eletroforética do heme na presença de ácido xanturênico	
3.10.1 - Preparo do gel de agarose.	59
3.10.2 - Tampão de corrida	57
3.11 Ensaio de ligação do ácido xanturênico ao íon ferroso	57
3.12 Ensaio de hemólise induzida por heme	58
4 RESULTADOS	61
4.1 Identificação do ácido xanturênico (XA) no intestino do mosquito <i>Aedes aegypt</i>	61
4.2 Quantificação do XA ao longo da digestão por cromatografia de alta performance em coluna de fase reversa	63
4.3 Identificação da TDO no epitélio intestinal do <i>Aedes</i>.	65
4.4 Inibição da síntese de XA no intestino através da administração oral de inibidores	66
4.5 Oxidação de lipídeos pelo heme – efeito protetor do XA e dependência ao pH	67
4.6 Ligação do XA ao heme – efeito do pH	69
4.7 Efeito protetor do XA no sistema de oxidação de lipídeos induzido por íon ferroso e peróxido de hidrogênio	70
4.8 Ligação do XA ao íon ferroso	72
4.9 Titulação potenciométrica do XA.	73
4.10 Efeito anti-hemolítico do XA na hemólise induzida por heme.	74
5 DISCUSSÃO	75

5.1 XA, um metabólito presente em grandes concentrações no intestino do <i>Aedes aegypti</i>.	75
5.2 Atividades antioxidantes do XA e ligação ao ferro e ao heme – dependência ao pH.	76
5.3 Curva de titulação acido-base do XA e equação de protonação/desprotonação	77
5.4 Atividade anti-hemolítica do XA	79
5.4.1 - Compartimentos no intestino	80
5.5 Perspectivas: interação do XA e seus complexos com outras estruturas no intestino do <i>Aedes</i>	82
5.5.1 Matriz peritrófica e absorção de ferro	82
5.5.2 Digestão protéica	83
5.5.1 Microbiota Intestinal.	83
5.5 .1 Estado agregacional do XA	84
6 – CONCLUSÕES	
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
8 - ANEXO: Manuscrito submetido para publicação.	

1 INTRODUÇÃO

1.1. Hematofagia: como a dificuldade de acesso ao sangue implica no tamanho da ingesta em hematófagos

A hematofagia implica em alguns problemas. Um deles é que como o sangue é um tecido fluído e de importância vital, ele está muito bem protegido. Esta proteção se dá fisiologicamente por um sofisticado sistema, para evitar perdas por extravasamentos dos vasos, chamado de hemostase. Este sistema compreende a dor e mecanismos de coagulação, vasoconstrição que são utilizados para obturar, de forma rápida e eficiente, qualquer lugar onde apareça algum vazamento de sangue. Para romper estas linhas de defesa dos vertebrados, os hematófagos contam com um vasto repertório de recursos anti-hemostáticos, presentes na sua saliva. Analgésicos, vasodilatadores e anticoagulantes são encontrados na saliva de praticamente todos os hematófagos (RIBEIRO, J.M. 1995).

A defesa dos vertebrados também se dá a nível comportamental. Os hematófagos são tratados como inimigos por seus hospedeiros que são 5 ou 6 ordens de grandeza mais pesados que eles. De modo que o mosquito corre sério risco de vida a cada vez que vai se alimentar de sangue. Talvez por isso que muitos hematófagos, uma vez tendo driblado os sistemas de segurança de um hospedeiro vertebrado, tanto os hemostáticos quanto os comportamentais, aproveitem este momento para ingerir tanto sangue quanto for possível. Mosquitos costumam ingerir entre 3 e 5 vezes seu próprio peso a cada repasto sanguíneo, barbeiros ingerem em torno de 5 a 10 vezes seu peso em sangue a cada alimentação, carrapatos chegam a ingerir dezenas de vezes seu próprio peso, e mesmo morcegos vampiros apresentam comportamento similar ingerindo quantidades de sangue em torno de seu próprio peso a cada alimentação (**Figura 1.1**).

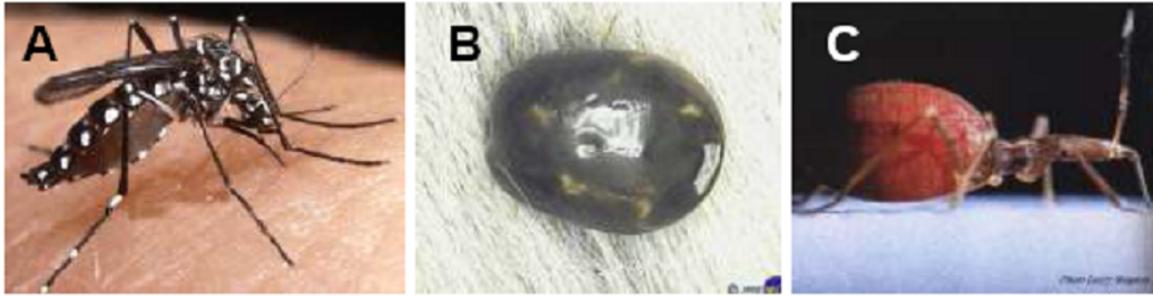


Figura 1.1- Artrópodes hematófagos ingerem grande quantidade de sangue a cada alimentação. Acima vemos três exemplos de hematófagos recém alimentados. Em A: uma fêmea de *Aedes aegypti* (Imagem extraída de: www.ipahb.com.br/saude.php); em B o carrapato bovino *Boophilus microplus* (Imagem extraída de: www.icb.usp.br); e em C o barbeiro *Rodnius prolixus*. (Imagem extraída de: www.u.arizona.edu)

Este tipo de comportamento é vantajoso porque minimiza o número de visitas ao hospedeiro vertebrado e os riscos dela decorrentes (LEHANE, 1991), mas implica em outros problemas adaptativos, como vamos ver abaixo.

1.2- O sangue como fonte de heme e ferro

O sangue é composto de duas proteínas amplamente majoritárias: albumina e hemoglobina que, juntas, correspondem a mais de 90% do seu total de proteínas. A albumina se apresenta solúvel no plasma e a hemoglobina compartimentalizada no interior das hemácias. A hemoglobina é uma hemoproteína que contém em torno de 5% de ferroprotoporfirina IX em sua composição (quatro grupos prostéticos de ~750 Da por tetrâmero de 60 kDa). A concentração de heme no sangue é portanto, em torno de 10 mM. No intestino dos hematófagos este valor pode ser ainda maior devido à acentuada diurese que ocorre logo após a alimentação (STOBBART R.H. 1977). Quando as hemácias são rompidas e a hemoglobina é digerida, grandes quantidades de heme são liberadas na luz intestinal dos hematófagos. No intestino do *Aedes* parte do heme é degradado formando

uma biliverdina biglutaminada (PEREIRA LO e cols. 2007) indicando que também há produção de íon ferroso.

1.2.1 – Algumas propriedades químicas do heme.

O heme é um tetrapirrol cíclico no qual as unidades pirrólicas estão unidas entre si por pontes meteno (=C--). A este cerne tetrapirrólico, representado em preto na **figura 1.2.1** estão ligados oito substituintes: quatro metilas (magenta), dois vinis (representados em azul) e dois propionatos (em verde). Ao anel terapirrólico com estes substituintes nesta disposição, dá-se o nome de protoporfirina IX. A disposição espacial dos quatro nitrogênios, com orbitais apontados para o centro da molécula, confere a esta estrutura a propriedade de formar compostos de coordenação (quelatos) de alta afinidade com metais. O quelato de protoporfirina IX com um cátion de ferro é chamado ferroprotoporfirina IX ou heme (**figura 1.2.1**).

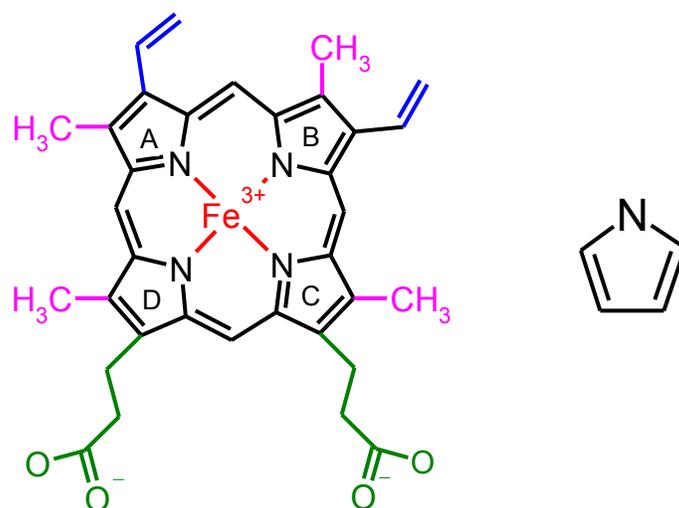


Figura 1.2.1 - À esquerda: estrutura molecular da ferroprotoporfirina IX (heme) À direita uma molécula de pirrol.

O heme, devido à sua capacidade de transitar entre dois estados redox (heme- Fe^{2+} e heme- Fe^{3+}), é capaz de atuar como catalisador de reações de oxi-redução. Esta propriedade é de grande utilidade na biologia celular, pois é o mecanismo básico de catálise de todas as hemoproteínas respiratórias, mas esta mesma propriedade torna-se um sério problema quando o heme se encontra fora do controlado ambiente dos sítios ativos enzimáticos. O heme livre, em concentrações micromolares, catalisa reações redox de forma descontrolada produzindo espécies reativas de oxigênio que causam o estresse oxidativo (GUTTERIDGE JM e SMITH A. 1988). Além disso, molécula de heme apresenta uma grande região apolar, mostrada na metade superior da **Figura 1.2.1**, que consiste nos pirróis A e B com substituintes vinílicos. O ferro confere um caráter polar catiônico ao centro da molécula de heme, este átomo de ferro possui dois orbitais alinhados entre si, dispostos perpendicularmente ao plano terapirrólico. Estes orbitais tem a capacidade de formar compostos de coordenação e conferem ao heme afinidade por diferentes gases como O_2 , CO_2 , CO e NO bem como por compostos de nitrogênio como azida (N_3^-) ou histidina. A outra metade do anel terapirrólico tem caráter aniônico, devido aos dois propionatos, negativamente carregados que estão presentes como substituintes.

O perfil químico do heme é o de uma molécula muito pouco solúvel em água. O procedimento de rotina no laboratório é usar uma solução de NaOH 0,1 M para solubilizá-lo na concentração de 5 mM. No ambiente fisiológico, o heme tem tendência a particionar-se para nichos apolares como lipoproteínas ou membranas lipídicas (ROSE MY e cols. 1985; LIGHT WR 3RD e OLSON JS 1990), onde ele vai encontrar-se em estreito contato com lipídeos, numa perigosa associação, uma vez que são um dos principais alvos de peroxidação por espécies reativas de oxigênio .

1.3 - O Estresse oxidativo.

Entende-se como estresse oxidativo quando ocorre uma produção de espécies oxidantes numa quantidade maior do que os sistemas de detoxificação são capazes de suportar. Este desbalanço causa oxidações não específicas que lesam os sistemas biológicos (JONES DP, 2006). Seu estudo tem inúmeros desdobramentos clínicos, pois situações de estresse oxidativo são muito presentes em uma série de patologias humanas de alta incidência como formação de placa de ateroma, sepse, doenças neurodegenerativas e no envelhecimento de um modo geral. Este fenômeno tem, entre os principais agentes causadores, as espécies reativas de oxigênio.

1.3.1 Espécies reativas de oxigênio (ROS)

O oxigênio é segundo elemento mais eletronegativo da tabela periódica, perdendo somente para o flúor. De fato, é desta força eletromotriz que deriva grande parte da capacidade de trabalho celular em todos organismos aeróbicos. Sua forma elementar mais abundante na natureza e nos sistemas biológicos é a molécula diatômica de O_2 . Sob esta forma o oxigênio é bem estável, apresentando uma reatividade muito menor do que o oxigênio monoatômico (oxigênio nascente) ou o ozônio (O_3). Em condições fisiológicas a molécula de O_2 apresenta reatividade virtualmente nula frente às biomoléculas.

O produto final da redução do O_2 são duas moléculas de água, extremamente estáveis do ponto de vista redox. Para que esta redução ocorra são necessários quatro elétrons. Neste processo podem ser formados intermediários como o superóxido ($O_2^{\bullet -}$), peróxido (H-O-O-H) e o radical hidroxil (HO^{\bullet}), correspondentes à entrada seqüencial de cada um destes elétrons (redução monoeletrônica, ver **figura 1.3.1**), nos quais os átomos de

oxigênio parcialmente reduzidos não têm a distribuição eletrônica metaestável da molécula de O_2 nem a distribuição eletrônica estável que o oxigênio possui na molécula de água. A distribuição eletrônica do oxigênio monoreduzido se assemelha à do flúor. Estas espécies, chamadas “espécies reativas de oxigênio” (ROS), apresentam alta reatividade frente a biomoléculas tem importante papel no estresse oxidativo.

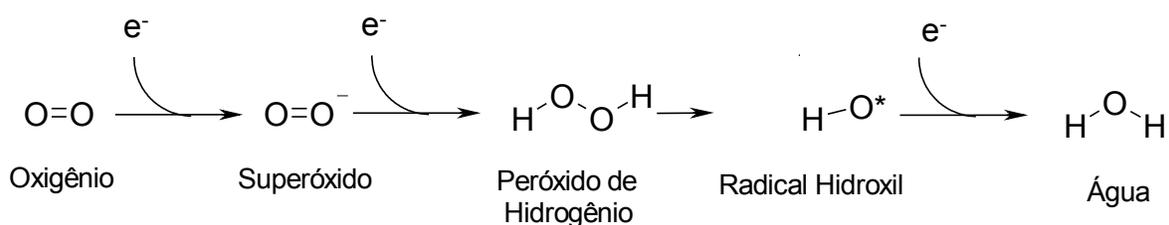


Figura 1.3.1- Esquema da redução monoelétrica do oxigênio diatômico. As espécies superóxido e hidroxil constituem umas das mais ativas ROS.

A compreensão da química das espécies reativas de oxigênio é muito dificultada pela própria reatividade destas moléculas. Neste cenário temos várias moléculas instáveis, e portanto, de difícil manipulação e dosagem. A acentuada reatividade destas espécies aumenta muito a gama de possibilidades de reações tornando os sistemas de oxidação por ROS muito complexos. Mas, apesar disso, algumas reações podem ser destacadas com o tendo um papel importante na peroxidação de lipídeos e proteínas.

A **Figura 1.3.2** esquematiza um modelo de como a peroxidação lipídica é entendida atualmente. Embora haja relatos de que o heme seja capaz de catalisar a formação de radical hidroxil (HO^\bullet), existem evidências consistentes de que a decomposição de peróxidos orgânicos em radicais peroxil (ROO^\bullet) e alcóxil (RO^\bullet) tem um papel preponderante na peroxidação de lipídeos (GRAÇA-SOUZA, A.V e cols. 2006).

Além disso o íon ferroso (Fe^{2+}) liberado pela eventual abertura do anel tetrapirrólico do heme é capaz de catalisar a formação do radical hidroxil (OH^\bullet). O radical hidroxil tem a capacidade de abstrair um elétron de uma molécula lipídica (RH) formando um radical alquil (R^\bullet), que forma posteriormente um radical peroxil (ROO^\bullet) pela incorporação de uma molécula de O_2 . Este radical peroxil pode, por sua vez, abstrair um átomo de hidrogênio de um lipídeo não-radicalar, gerando um radical lipídico (R^\bullet) e um peróxido lipídico (ROOH), que vai alimentar o ciclo de formação de mais radicais peroxil e alcoxil. É importante notar que os radicais peroxil, ao se reduzirem à custa da oxidação de moléculas-alvo regeneram os peróxidos que podem ser novamente oxidado pelo heme- Fe^{3+} retroalimentando e perpetuando este ciclo de oxidação.

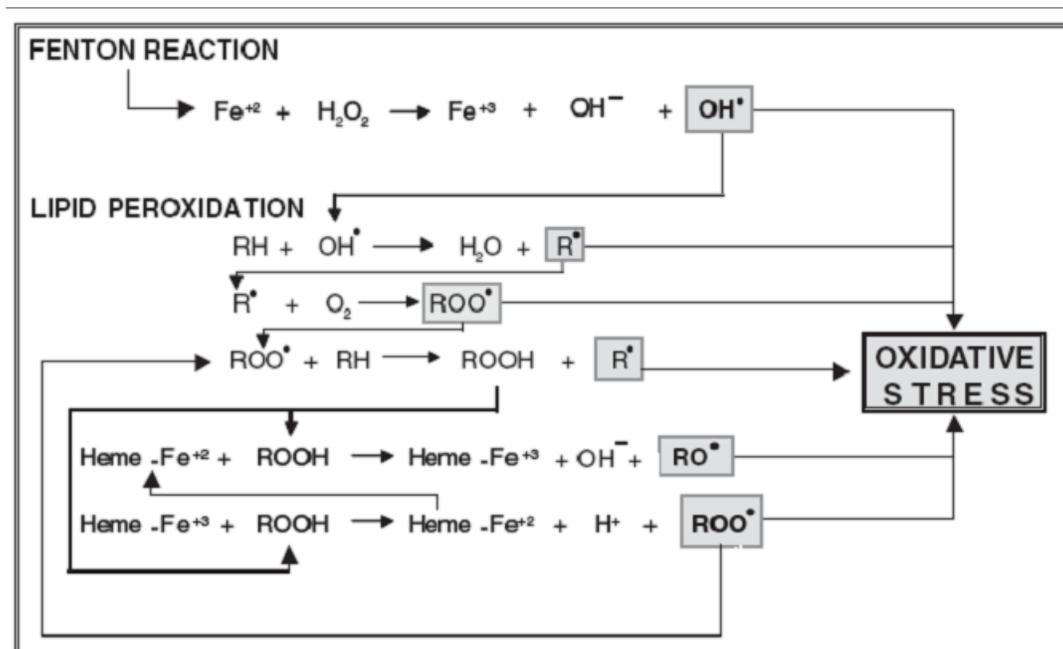


Figura 1.3.2 - Esquema geral da formação de radicais livres induzida por heme e ferro (extraído de GRAÇA-SOUZA, A.V e cols. 2006).

1.3.3- Algumas estratégias bioquímicas usadas por artrópodes hematófagos para lidar com o estresse oxidativo causado pela dieta rica em heme.

A idéia que mecanismos de geração de estresse oxidativo, como o descrito acima, são de relevância fisiológica para os hematófagos é reforçada pelos vários sistemas de detoxificação de heme presentes nos hematófagos . Estes sistemas funcionam de modo a reduzir ao máximo a quantidade de heme livre, seja pela formação de agregados insolúveis, pela formação de complexos inativos na manutenção da cascata de peroxidação, ou pela simples destruição do heme (**Figura 1.3.3**).

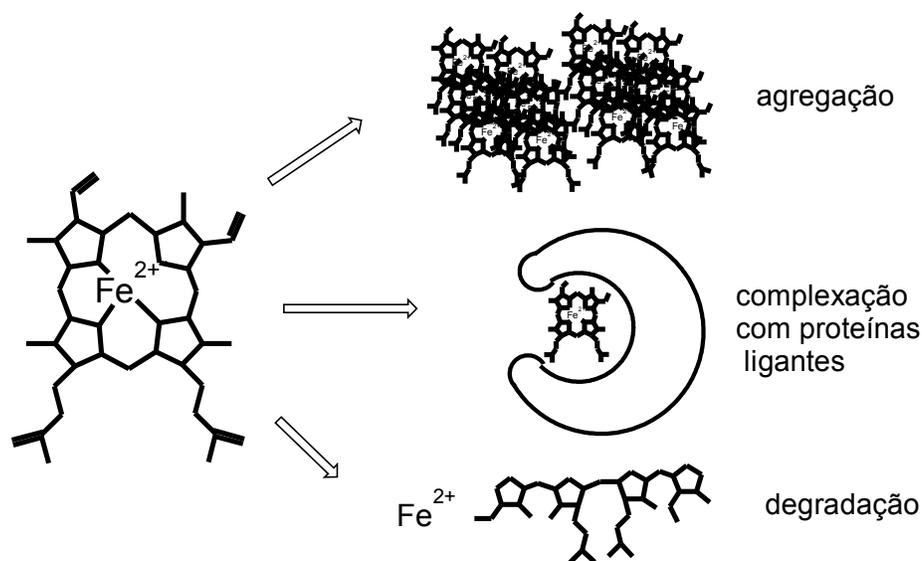


Figura 1.3.3- Três das principais estratégias usadas por hematófagos para lidar com a grande quantidade de heme proveniente do sangue consistem na sua agregação, na formação de complexos com apohemeproteínas e na sua degradação

Barbeiros da espécie *Rhodnius prolixus*, por exemplo, produzem em seu intestinos, durante a digestão do sangue, um agregado insolúvel de heme. A formação destes cristais, com baixa capacidade de formação de radicais livres, constitui no principal mecanismo de detoxificação do heme, uma vez que estes agregados são eliminados nas fezes carregando

em torno de 90% do heme ingerido. Foi mostrado que este agregado tem estrutura idêntica ao que o plasmódio produz durante sua fase de vida intra-eritrocítica, quando se alimenta basicamente de hemoglobina (OLIVEIRA, M.F e cols. 1999 e OLIVEIRA, M.F e cols. 2005).

O *Aedes aegypti* possui uma matriz peritrófica, adjacente ao epitélio intestinal cujas proteínas majoritárias são da classe das peritrofinas. Recentemente foi mostrado que uma delas, a AeiMuc I, apresenta múltiplos sítios de ligação para heme. Esta matriz recobre toda superfície interna do epitélio intestinal funcionando como uma barreira onde grande parte do heme ingerido se acumula em uma forma insolúvel aderido à esta estrutura macroscópica (DEVENPORT, M. e cols. 2006.; PÁSCOA, V. . e cols. 2002). Ao fim da digestão, a matriz se descola do epitélio e é liberada com as fezes carregando 90% do heme ingerido. No intestino deste mesmo inseto podem ser encontradas quantidades consideráveis de uma biliverdina biglutaminada, um tetrapirrol linear resultante da quebra do heme e com atividade antioxidante, sugerindo a presença de um sistema de degradação (PEREIRA LO e cols. 2007).

Rhodnius prolixus e o carrapato bovino *Boophilus microplus* possuem proteínas ligadoras de heme; A “*Rhodnius Prolixus Heme-binding protein*” RHBP (OLIVEIRA PL e cols 1995 e a “Heme Lipoprotein” HeLP (MAYA-MONTEIRO, C.M. e cols. 2000) respectivamente. Estas proteínas são capazes de formar, com o heme, complexos inativos do ponto de vista de produção radicalar. (DANSA-PETRETSKI M. e cols. 1995; MAYA-MONTEIRO CM 2004)

1.4- Ácido xanturênico (XA) como o fator de exflagelação do *Plasmodium*

Mosquitos são vetores de inúmeras doenças, das quais a malária talvez seja a de maior importância para saúde pública mundial. A malária é causada pelos protozoários do gênero *Plasmodium*. O plasmódio é ingerido pelo mosquito junto com o sangue do hospedeiro na forma de gametócitos. Como exemplo, o ciclo de vida do *Plasmodium falciparum* é mostrados na figura abaixo (**Figura 1.4**) (adaptada de :www.malariatest.com/cycle.html). Em destaque dentro da caixa azul vemos os primeiros eventos que acontecem logo após a ingestão do sangue pelo mosquito.

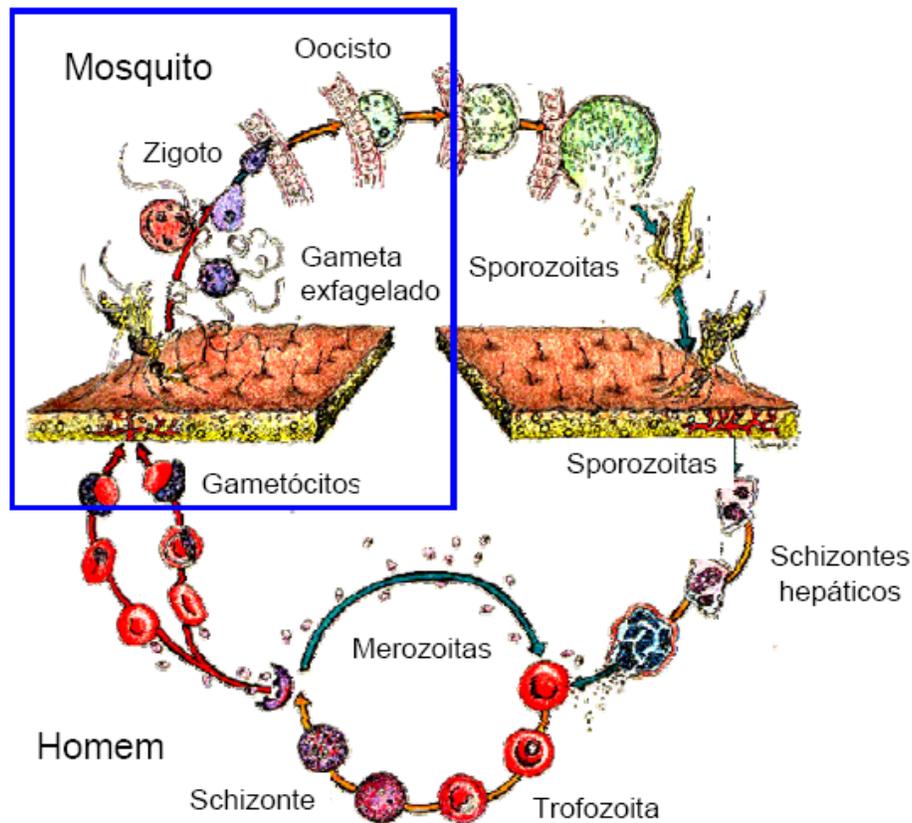


Figura 1.4- Ciclo de vida do *Plasmodium falciparum*. Em destaque na caixa azul vemos os primeiros eventos que ocorrem após a ingestão do sangue infectado pelo mosquito. Os gametócitos indiferenciados ingeridos se diferenciam em macrogametócito (gameta fêmea) e microgametócito (gameta macho, forma flagelada) que se fundem para formar o zigoto. O zigoto infecta o epitélio intestinal e desenvolve-se na forma de oocisto. (adaptado de :www.malariatest.com/cycle.html)

Os gametócitos são formas sexuais ainda indiferenciadas do protozoário que, ao chegarem na luz intestinal do mosquito sofrem acelerada diferenciação. Os gametócitos fêmea se diferenciam em macrogametócitos, e os gametócitos macho se diferenciam em microgametócitos. Cada gametócito macho produz oito microgametócitos, uma forma flagelada muito parecida com espermatozoides no seu aspecto ao microscópio ótico. Estes microgametócitos nadam até o macrogametócito e o fecundam na luz intestinal do mosquito durante a digestão, produzindo o zigoto. O zigoto invade o epitélio intestinal e se adere a membrana basal de onde se desenvolve em oocisto, dando prosseguimento ao seu ciclo. No processo de diferenciação dos gametócitos macho oito flagelos brotam da célula indiferenciada, daí o termo “exflagelação”, usado para descrevê-lo. Este processo ocorre em poucos minutos, pode ser acompanhado em uma lâmina de microscópio e já é conhecido a quase cem anos.

Para ensaios *in vitro* foi demonstrado que a exflagelação é disparada pela queda de temperatura, de 39°C para 20°C, similar a causada pela passagem do hospedeiro vertebrado para o inseto, com a concomitante alcalinização do pH sanguíneo de pH 7,3 para 8,0. Mas como o pH do bolo digestivo é em torno de 7,5 (BILKER, O. e cols. 2000) ainda faltava entender como a exflagelação seria disparada *in vivo*.

Nijhout, em 1979 (NIJHOUT MM, 1979), usando como modelo o *Pasmodium gallinaceum*, mostrou que um fator presente em extratos de cabeça e de intestino médio de *Aedes aegypti*, e nos excrementos de *Anopheles stephensi*, eram capazes de substituir o aumento de pH em ensaios de exflagelação *in vitro*. Este resultado foi reforçado em 1997 por Billker (BILLKER O, e cols. 1997) num trabalho usando extratos de cabeça de *Anopheles stephensi* para induzir exflagelação de *Plasmodium berghei* com resultados

similares: na presença dos extratos a exflagelação ocorria muito bem em pH 7,3, condição na qual não ocorre praticamente nenhuma diferenciação caso o extrato não esteja presente. Logo no ano seguinte o mesmo autor publica outro trabalho no qual um homogenato, agora obtidos de pupas de *Anopheles stephensi*, com atividade exflageladora, é fracionado e o fator de exflagelação é identificado como sendo o ácido xanturênico (GARCIA GE, e cols. 1998; BILLKER, O e cols. 1998), uma quinolina derivada do aminoácido triptofano sintetizada pela via das quinureninas.

1.4.1 – XA no mosquito

O ácido xanturênico foi identificado em extratos de cabeça, nas fezes e em glândulas salivares de mosquito. Nas glândulas salivares sua concentração diminui durante o repasto indicando que ele é secretado junto com a saliva e, provavelmente ingerido com o sangue. Esta é a explicação corrente na literatura para a presença desta molécula no intestino dos mosquitos (OKECH B e cols. 2006), até hoje a concentração de XA na glândula salivar é considerada maior que na cabeça e no intestino médio (OKECH B e cols. 2006).

O XA está presente em grandes quantidades nas larvas de *Aedes*. Sua concentração aumenta linearmente ao longo da vida larvar e decai bruscamente quando o inseto passa para a fase de pupa. Sua função nas larvas permanece um mistério. (LI J e LI G, 1997)

1.5-Via das quinureninas - aspecto geral.

Em seu aspecto geral, a via das quinureninas (**Figura 1.5**) apresenta um padrão ramificado peculiar, com dois ramos principais que podemos chamar de ramo (ou linha) das quinureninas e ramo dos antranilatos, representados horizontalmente no esquema. O ramo das quinureninas é formado pela N-formil-quinurenina, pela quinurenina e pela hidroxí-

quinurenina. Qualquer destas quinureninas pode sofrer hidrólise, liberando uma molécula de alanina, e produzindo seus correspondentes do ramo dos antranilatos: os ácidos N-formil-antranílico, antranílico e 3-hidroxi-antranílico. O ramo das quinureninas e o ramo dos antranilatos apresentam entre si uma relação de paralelismo e formam, juntos, o cerne da via das quinureninas.

Abaixo do ramo das quinureninas estão representados os componentes quinolínicos da via. Tanto a quinurenina como a hidroxi-quinurenina podem ser deaminadas em reações catalisadas por uma aminotransferase que usa α -cetoglutarato (α KG, na **Figura 1.5**) como acceptor do nitrogênio para formar glutamato (Glu).

Esta deaminação produz intermediários instáveis com grupamentos dioxo, (representados entre colchetes na **Figura 1.5**). Estes intermediários se ciclizam espontaneamente para formar os representantes quinolínicos da via: o ácido quinurênico e o ácido xanturênico (em destaque), que pode ser metilado em sua hidroxila ligada ao carbono 4 anel quinolínico para formar o sideróforo quinolobactina (MATTHIJS S, e cols. 2004).

Acima do ramo dos antranilatos temos o que podemos chamar ramo da nicotinamida que parte do ácido 3-hidroxi-antranílico. Este é oxidado por uma monooxigenase que abre seu anel aromático, formando um intermediário linear instável representado entre colchetes no diagrama. O intermediário se recicla espontaneamente, formando ácido quinolínico, que por sua vez é descarboxilado para produzir ácido nicotínico, um importante precursor na biossíntese dos carreadores de elétrons NAD e NADP.

Outro aspecto que chama a atenção quando olhamos esta via é a presença marcante das enzimas da classe das oxigenases. As oxidases são enzimas envolvidas com o

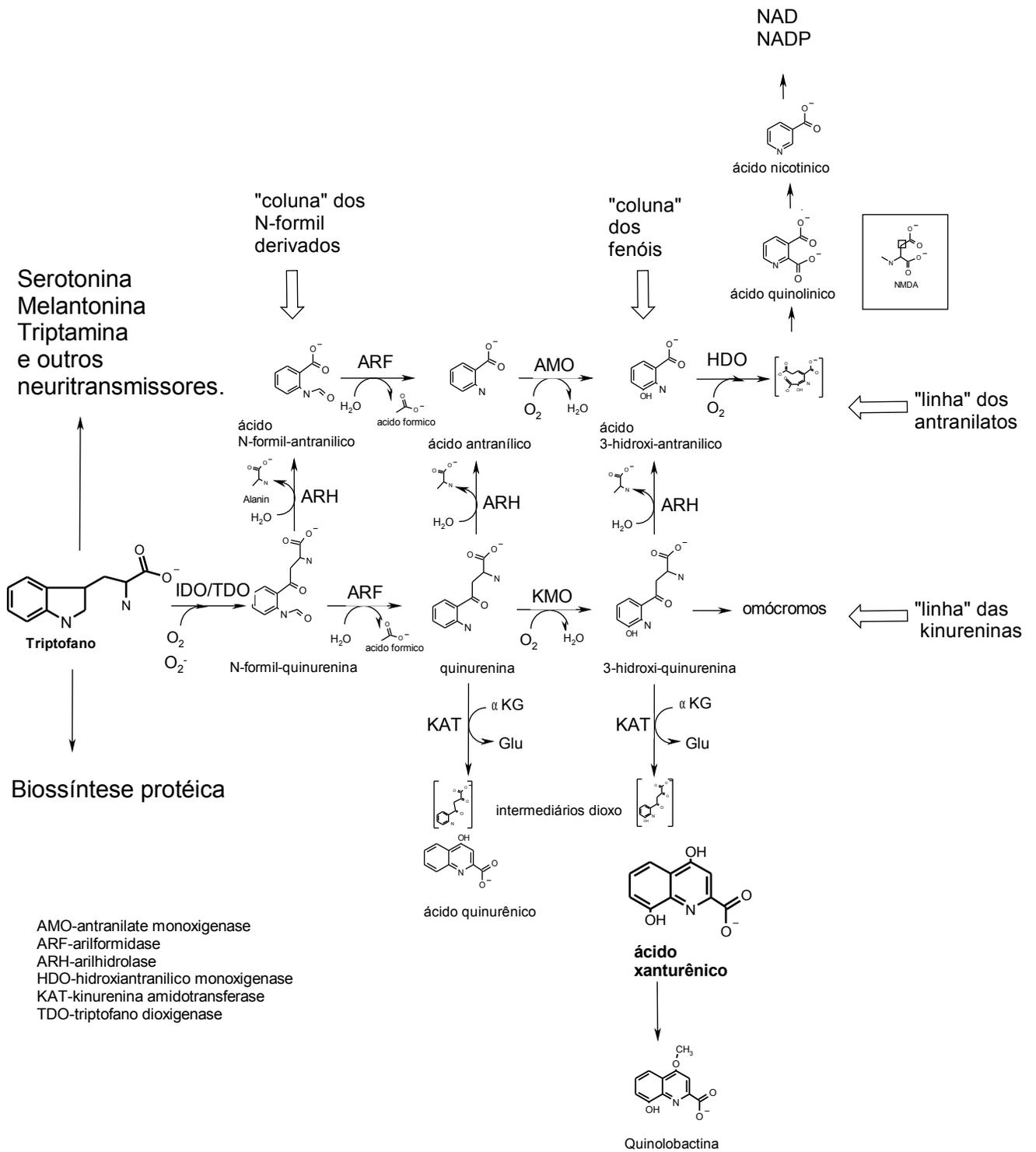


Figura 1.5 - Aspecto geral da via das quinureninas (adaptado de <http://www.genome.ad.jp/kegg/pathway/map/map00380.html>)

gerenciamento do potencial redutor da célula e com a respiração celular, agem muitas vezes usando NAD ou NADP como cofator. Já as oxigenases atuam incorporando átomos de oxigênio a um substrato de baixo peso molecular. As que incorporam ao produto de sua reação ambos os átomos do oxigênio diatômico são chamadas **dioxigenases**, enquanto que as incorporam apenas um átomo, são chamadas **monooxigenases** (HAYAISHI O, 2005). No diagrama mostrado temos as dioxigenases IDO/TDO e a HDO, e as monooxigenases KMO e AMO.

1.6 – Indoleamina dioxigenase (IDO) e triptofano dioxigenase (TDO)

O controle do fluxo metabólico na via das quinureninas é feito na primeira reação da via. A oxidação do triptofano para formar N-formilquinurenina.

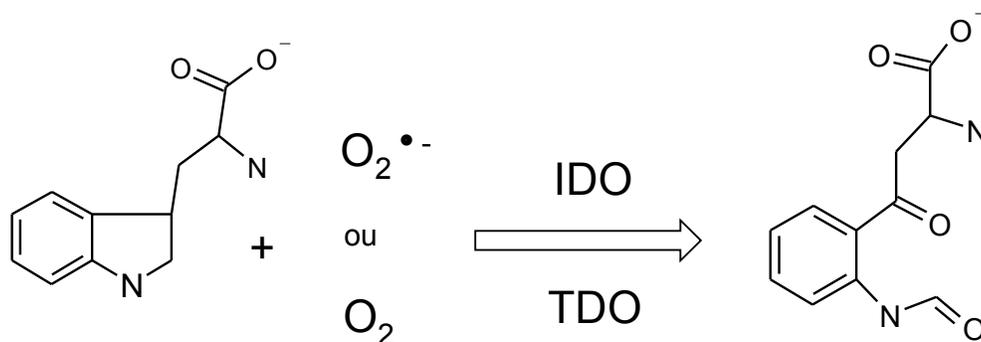


Figura 1.6- A primeira reação da via das quinureninas consiste na abertura da ligação entre os carbonos 2 e 3 do anel indólico do triptofano. Nesta reação de dioxigenação, um átomo de oxigênio é ligado a cada um destes carbonos produzindo N-formil-quinurenina.

A maioria dos estudos sobre esta reação foi realizado em modelos mamíferos como o rato, o camundongo, o coelho e humanos, devido a sua maior importância médica. Nestes organismos existem duas enzimas para catalisar esta reação: a indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) e a triptofano 2,3-dioxigenase (TDO). Ambas são heme proteínas com cadeias

polipeptídicas de tamanho muito parecido. Em ambas o grupamento prostético de heme está ligado de forma não-covalente com uma afinidade tal que uma fração da enzima está na forma de apoproteína e outra na forma de holoenzima. A determinação da estrutura por difração de raios X da IDO humana (SUGIMOTO, H. e cols. 2006) e de uma TDO da bactéria resistente à metais pesados *Ralstonia metallidurans* (ZHANG, Y. e cols. 2007) revelou que as duas proteínas, embora originárias de organismos tão afastados filogeneticamente, tem estruturas tridimensionais praticamente idênticas composta majoritariamente de α -hélices (ZHANG, Y. e cols. 2007). A diferença mais pronunciada está num domínio presente na IDO humana que não se encontra na TDO de *Ralstonia metallidurans*. A comparação das estruturas tridimensionais destas duas proteínas é mostrada na **figura 1.6**.

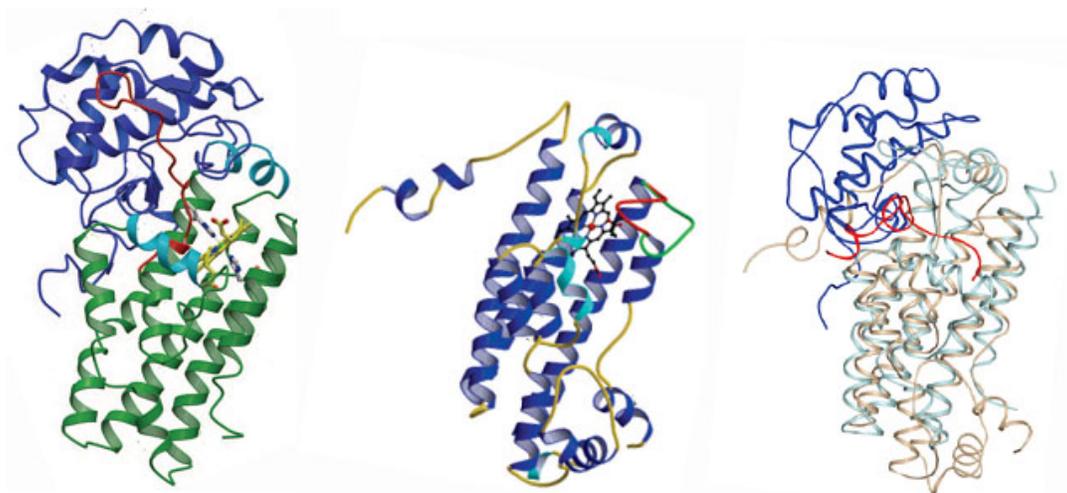


Figura 1.6.- Estruturas obtidas por difração de raios X de cristais de IDO humana (esq.) TDO de *Ralstonia metallidurans* (centro) e a sobreposição de ambas (direita). Adaptado de (SUGIMOTO, H. e cols. 2006; e de ZHANG, Y. e cols. 2007)

Isoformas de uma mesma enzima geralmente têm alta homologia de seqüência primária, mas IDO e TDO surpreendentemente apresentam uma homologia de seqüência primária de aminoácidos tão baixa que não é possível nem mesmo alinhar as seqüências de aminoácidos ou de nucleotídeos destas duas enzimas (mesmo se provenientes do mesmo organismo) usando o programa de alinhamento BLAST. Isso indica origens evolutivas diferentes para as duas enzimas. Intrigantemente, a IDO se assemelha em estrutura primária a uma outra hemoproteína: uma mioglobina de gastrópodes (SUZUKI T, e cols. 1996; SUZUKI T e TAKAGI T 1992).

1.7 A TDO

Em 1936 foi isolada pela primeira vez uma enzima que catalisa a conversão do triptofano em N-formil-quinurenina (KOTAKE Y e MASAYAMA T, 1936). A enzima se mostrou presente somente no fígado onde é estimulada pela presença de triptofano e de hidrocortisona, (TAYLOR MW e FENG GS. 1991). A enzima recombinante, expressa em *E. coli*, apresenta uma estrutura homotetramérica (α_4) (REN S e cols. 1996). Foi mostrado que esses indutores podem fazer sua atividade aumentar 10 vezes. Este veio a ser o primeiro sistema de enzima indutível descoberto em mamíferos (KNOX WE, e MEHLER AH 1951).

Além da regulação por glicocorticóides, foi proposto, num outro trabalho, que o próprio heme é capaz de regular a atividade da TDO hepática. Essa regulação se dá por dois mecanismos distintos: Pela interferência no equilíbrio apo-holoenzima ou estimulando sua expressão. Este trabalho (REN, S. e CORREIA, M.A. 2000), utilizando um modelo de depleção farmacológica do heme hepático, mostrou que os níveis da TDO hepática caem a

25-30% dos níveis normais quando o heme é farmacologicamente depletado. Seus dados indicam que na depleção aguda de heme a TDO se torna instável e é degradada, e que a transcrição e a expressão do gene da TDO também é dependente de heme.

1.8 AIDO

O fato de intermediários da via das quinureninas serem encontrados na urina de pacientes portadores de várias patologias (como artrite, tuberculose e leucemia, entre outras), nas quais a TDO não está aumentada sugeriu que havia uma outra enzima para iniciar o catabolismo do triptofano. Esta nova atividade foi descrita pela primeira vez em 1967, em intestino delgado de coelho (YAMAMOTO S e HAYAISHI O, 1967) mas devido à sua instabilidade durante a purificação, somente em 1978 foi desenvolvido um protocolo reprodutível para sua purificação (SHIMIZU T e cols.1978). Sua caracterização revelou uma glicoproteína monomérica com peso molecular estimado em 41 kDa por eletroforese em gel de poliacrilamida, com teor de açúcar em torno de 5%. A proteína purificada apresentou-se 80% saturada com heme. A sua atividade *in vitro* se mostrou dependente de azul de metileno e de ácido ascórbico como cofatores. Quanto à especificidade por substrato esta enzima é bem mais promíscua do que a TDO, aceitando D- e L-triptofano, D- e L-5-hidroxi-triptofano, triptamina e serotonina. Quanto à localização, a IDO apresenta-se ubiquamente distribuída pelos tecidos, mas é expressa em maiores quantidades no pulmão, no intestino delgado e na placenta, onde desempenha um papel fundamental na tolerância imune da mãe pelo feto (MUNN DH e cols 1998). Também é considerável em expressão em células dendríticas (TERNESS P e cols. 2006), macrófagos ativados e astrócitos (KISS C e cols. 2003).

1.8.1 – Radical superóxido como substrato daIDO

Quanto à forma do oxigênio utilizada pela IDO, uma série de evidências experimentais sustentam a hipótese de que esta enzima utiliza tanto O_2 como $O_2^{\bullet-}$ (radical superóxido) como substratos (HIRATA F e HAYAISHI O. 1971; HIRATA F e HAYAISHI O 1975; HIRATA F e cols. 1977).

A adição de superóxido dismutase (uma enzima que consome superóxido, depletando-o) ao meio reacional tem um efeito inibitório sobre a atividade da IDO. Já adição do sistema “xantina-xantina oxidase” (um sistema gerador de superóxido) ou superóxido de sódio tem um efeito estimulatório sobre a atividade da IDO. Este efeito estimulatório pode ser revertido pela adição de um “scavenger” de superóxido denominado “Tiron” (HIRATA, F. e HAYAISHI, O. 1975). Estes dados indicam que o superóxido ($O_2^{\bullet-}$), e não o oxigênio molecular (O_2), é preferido pela IDO, fato depois confirmado por uma série de estudos (KOBAYASHI K e cols. 1989; HIRATA F e cols. 1977; SONO M, 1989; TANIGUCHI T e cols. 1979; HAYAISHI O, 1976; OHNISHI T e cols. 1977). Esta atividade consumidora de superóxido da IDO não é observada somente em sistemas enzimáticos isolados mas também está presente em enterócitos em cultura sugerindo que o consumo de superóxido tem um papel fisiológico (TANIGUCHI T e cols 1977) sendo então proposto uma função antioxidante para esta enzima (SUN Y, 1989).

1.8.2 – Depleção local de triptofano: IDO como um importante mecanismo efetor do γ -interferon.

O γ -interferon é uma proteína produzida por linfócitos ativados e apresenta múltiplas funções como antiviral (SUH HS e cols. 2007), antiproliferativa, antiparasítica (GUPTA SL

e cols. 1994) e imunoregulatória (PUCCETTI P 2007). A descoberta de que o γ -interferon é um potente ativador da IDO e sua atividade depletora de triptofano permitiu a construção de um modelo de como é o mecanismo molecular das atividades biológicas do γ -interferon (HAYAISHI O 1985).

O triptofano é um aminoácido essencial em humanos e também é o menos abundante no plasma. A ativação da IDO produz uma depleção local de triptofano. Na ausência de triptofano não pode haver crescimento celular. Essa depleção tem um efeito ambíguo: por um lado patógenos não podem se desenvolver, ocasionando uma microbiostase em caso de infecção, mas por outro lado, as próprias células do sistema imune, que dependem de proliferação para sua atividade, como os linfócitos T, também se encontram inativadas na ausência deste aminoácido. Estes dados indicam que a IDO é um importante mecanismo efetor do γ -interferon, atuando, pelo menos em parte, através da depleção de triptofano (KUDO Y e cols. 2000)

1.8.3 – IDO – A enzima responsável pela prevenção da rejeição ao feto.

Munn e colaboradores mostraram em 1998 que a administração do inibidor da IDO em fêmeas de camundongos grávidas provocava a rejeição do concepto (MUNN e cols. 1998). O autor mostrou que a atividade depletora de triptofano de IDO suprime a atividade das células T, evitando a rejeição, fato confirmado posteriormente (KUDO Y e cols 2001).

A IDO está presente em grandes quantidades na placenta localizada mais especificamente nas microvilosidades em “brush border” somente no lado voltado para o feto (KUDO Y e BOYD CA. 2000). Esta enzima é detectada desde o sexto dia após a fecundação e ao longo de todo desenvolvimento (KUDO Y e cols 2004).

Outra evidência do papel da IDO na imunoregulação durante a gravidez pode ser encontrada na clínica médica. O terceiro trimestre da gravidez é normalmente caracterizado por uma ligeira inflamação sistêmica da mãe. Este quadro é acentuadamente agravado numa patologia muito freqüente denominada pré-eclampsia. Kudo e colaboradores.(KUDO Y e cols 2003), usando a relação entre as concentração plasmáticas de quinurenina e triptofano como indicador da atividade da IDO, e medindo os níveis de mRNA desta enzima na placenta conseguiram mostrar que o quadro inflamatório apresentado na pré-eclampsia está relacionado com um decréscimo na atividade da IDO.

1.8.4 – IDO e sistema imune.

Macrófagos estimulados por γ -interferon inibem o crescimento de parasitas intracelulares como toxoplasma e chlamydia e também o crescimento de bactérias como estreptococos. Para determinar o papel da IDO neste processo, MacKenzie e cols. utilizaram o inibidor da IDO 6-cloro DL-triptofano (CDLT). A adição deste inibidor foi capaz de reverter a atividade bacteriostática, mas não a protozoostática. Outros estudos mostraram que a adição de triptofano reverte o efeito do inibidor. Juntos, esses resultados indicam que a atividade da IDO é responsável pelo menos em parte pela microbiostase induzida por macrófagos (MACKENZIE CR, e cols. 1999).

Foi mostrado também que a atividade da IDO em macrófagos pode ser induzida pela presença do vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), podendo ser este o mecanismo pelo qual quinureninas são geradas no sistema nervoso central durante o complexo da demência induzida pela AIDS (GRANT RS e cols. 2000a,b). A presença da IDO nas células dendríticas (a principal célula apresentadora de antígenos e ativadora de linfócitos

T) sugere um papel desta enzima na tolerância por células T e na regulação da imunidade (von BUBNOFF D e cols. 2003).

Paradoxalmente, existe um trabalho mostrando que a IDO é essencial para a atividade das células “natural killer” (NK). Em 2004 foi mostrado que estas células também expressam IDO de uma maneira estimulada por γ -interferon. Neste trabalho, a atividade citotóxica das células NK frente às células K562 e HepG2 foi diminuída pela inibição da IDO (KAI S e cols. 2004)

Por outro, lado existem evidências de que células tumorais também se valem da depleção de triptofano pela IDO para escapar do sistema imune (UYTTENHOVE e cols. 2003). Este dado sugere que inibidores da IDO podem ser úteis como estratégias de tratamento em alguns casos de câncer.

1.9 – Resumo comparativo entre IDO e TDO

1.9.1 – Distribuição filogenética da IDO e da TDO

A **tabela 1.9.1** resume a distribuição da IDO e da TDO entre primatas, roedores, artrópodes, bactérias e archaeas. Nela estão os nomes científicos dos organismos que apresentam IDO e/ou TDO (nas suas respectivas colunas), o valor entre parênteses indica o percentual de identidade de aminoácidos com a IDO ou a TDO humanas. Abaixo do nome da espécie está o nome pelo qual a proteína é conhecida na dada espécie. A tabela resume uma série de buscas, feitas pelo autor, nos bancos de dados correspondentes aos grupos de organismos (primatas, roedores, artrópodes, bactérias e archaeas) disponíveis no site de

alinhamento de seqüências (BAST-<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?>

CMD=Web&PAGE_TYPE=BlastHome) do NCBI.

Tabela 1.6.1 -Distribuição da IDO e da TDO em alguns grupos de organismos

	IDO	TDO
Primatas	<i>Homo sapiens</i> Indoleamine 2,3-Dioxygenase (100%) <i>Pan troglodytes</i> hypothetical protein isoform 1 (99%) <i>Macaca mulatta</i> Indoleamine 2,3-Dioxygenase (93%),	<i>Homo sapiens</i> tryptophan 2,3-dioxygenase (100%) <i>Pan troglodytes</i> tryptophan 2,3-dioxygenase (99%)
Roedores	<i>Rattus norvegicus</i> Indoleamine 2,3-Dioxygenase (63%) <i>Mus musculus</i> Indoleamine 2,3-Dioxygenase (62%),	<i>Marmota monax</i> tryptophan 2,3-dioxygenase (92%) <i>Rattus norvegicus</i> tryptophan 2,3-dioxygenase (88%) <i>Mus musculus</i> tryptophan 2,3-dioxygenase (88%)
Artrópodes	Nenhuma proteína similar	<i>Drosophila ananassae</i> vermilion (57%), <i>Anopheles gambiae</i> tryptophan oxygenase (54%), <i>Aedes aegypti</i> tryptophan 2,3-dioxygenase (54%), <i>Tribolium castaneum</i> vermilion (57%), <i>Plodia interpunctella</i> tryptophan oxygenase (54%),
Bactérias	Nenhuma IDO encontrada	<i>Alteromonas macleodii</i> tryptophan oxygenase (41%) <i>Bdellovibrio bacteriovorus</i> tryptophan oxygenase (43%) <i>Psychroflexus torquis</i> tryptophan oxygenase (31%),
Archaea	Nenhuma IDO encontrada	Nenhuma TDO encontrada

Podemos notar que as IDO aparecem somente em primatas e roedores enquanto as TDO estão presentes em todos os grupos representados na **tabela 1.6.1**, exceto nas Archaea. Do ponto de vista evolutivo a TDO parece ser uma enzima mais antiga devido à sua presença em artrópodes e bactérias. A IDO parece ser uma aquisição mais recente, uma vez que só foi encontrada em mamíferos.

1.9.2 - Substratos

Quanto ao substrato aceptor de oxigênio a IDO é capaz de aceitar diferentes indoleaminas como D- e L-triptofano, D- e L-5-hidroxi-triptofano, triptamina e serotonina (TAYLOR MW e FENG GS. 1991; SHIMIZU T e cols.1978). Já a TDO é mais específica para triptofano. (TAYLOR MW e FENG GS. 1991; ZHANG, Y. e cols.2007). A **tabela 1.9 .1** resume as propriedades cinéticas da IDO e da TDO frente a diferentes substratos.

Tabela 1.9.2 - Comparação de parâmetros cinéticos da IDO e da TDO frente a diferentes substratos.

	IDO (coelho)		TDO (<i>Ralstonia metallidurans</i>)
	k_{cat} s^{-1}	Km (μM)	K_{cat}/K_m ($\mu M^{-1}/s^{-1}$)
L-triptofano	99	45	$3,06 \times 10^{-5}$
D-triptofano	71	400	inativa
5-hidroxi-L- triptofano	2,6	20	ND
5-hidroxi-D- triptofano	0,58	600	ND
triptamina	0,29	75	inativa
serotonina	0,17	10	ND
Ácido indol propionico	ND	ND	inativa
indol	ND	ND	inativa

Na **Tabela 1.9.2** temos os valores de k_{cat} e afinidade da IDO, obtida de intestino delgado de coelho, para diferentes substratos. E valores de processividade de uma TDO bacteriana mostrando sua exclusividade para L-triptofano. (adaptado de: TAYLOR MW e FENG GS. 1991; e de: ZHANG, Y. e cols. 2007). Os dados indicam que a TDO é exclusiva para triptofano enquanto a IDO, embora tenha preferência por triptofano, pode aceitar diferentes substratos especialmente 5-hidroxi triptofano e serotonina.

A **Tabela 1.9.3** resume e compara as características das duas enzimas. A distribuição da IDO é ubíqua em todos os tecidos, mas é mais expressa no pulmão, no intestino (quarto distal do intestino delgado de coelho) e na placenta (YAMAZAKI, F. e cols. 1985). Os indutores da IDO são interferons enquanto a TDO é regulada por glicocorticóides, pelo heme e próprio triptofano.

Tabela 1.9.3 Resumo comparativo da IDO e TDO.

	IDO	TDO
Localização	Todos tecidos principalmente pulmão, intestino e placenta	Fígado
Indutores	Interferon γ Interferon α	Dexametazona Hidrocortizona Triptofano heme
Tamanho em humanos (aminoácidos)	403	406
Substratos	O ₂ O ₂ ⁻ L-triptofano D-triptofano 5-hidroxi-L- triptofano 5-hidroxi-D- triptofano triptamina serotonina	O ₂ L-triptofano
Cofatores (<i>in vitro</i>)	Azul de metileno Ácido ascórbico	
Possíveis funções	Scavenger de O ₂ ⁻ Depleção de triptofano (citostase, microbiostase, imunossupressão) Produção de intermediários (sinalizadores, scavengers)	Controlar o nível plasmático de triptofano
Ação	local	sistêmica

O tamanho das cadeias polipeptídicas da duas enzimas humanas é muito parecido. 403 resíduos para a IDO e 406 aminoácidos para a TDO. A IDO aceita o oxigênio tanto na forma de radical superóxido como na forma de oxigênio molecular, e é capaz de metabolizar L- e D-triptofano; 5-hidroxi-L- triptofano e 5-hidroxi-D- triptofano e triptamina. A TDO utiliza somente triptofano. A IDO requer o sistema azul de metileno-ácido ascórbico para sua atividade *in vitro*. A IDO pode estar envolvida em uma diversidade de processos, como regulação do sistema imune a a bioquímica de radicais livres; a TDO parece estar implicada no controle do nível de triptofano plasmático. A ação da IDO é local enquanto a TDO tem ação sistêmica.

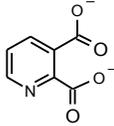
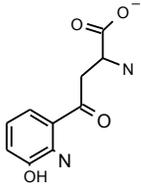
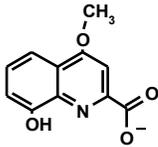
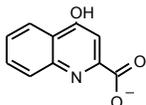
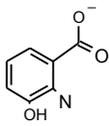
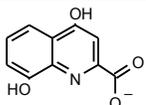
1.10 - Atividades biológicas de alguns intermediários da via das quinureninas.

Embora a via das quinureninas tenha sido vista por algum tempo como uma via de degradação do triptofano e seus intermediários como subprodutos desta degradação muitos trabalhos vem mostrando a necessidade de mudar este ponto de vista. O próprio fato desta via servir para a obtenção de nicotinamida já é suficiente para destacar sua importância. Uma breve revisão na literatura indica vários de seu componentes apresentam importantes atividades biológicas. Estas atividades estão resumidas na **Tabela 1.10**.

O ácido quinolínico é sintetizado por macrófagos em resposta a citocinas proinflamatórias e LPS (REINHARD JFJ e cols. 1998). Esta molécula é um análogo estrutural do neurotransmissor N-metil-D-aspartato (NMDA, mostrado no esquema da **Figura 1.5** dentro de uma caixa, acima à direita) e funciona como agonista em seus receptores. O acúmulo de ácido quinolínico, e sua atividade como agonista, é a explicação molecular vigente para a demência causada pelo HIV, um dos desdobramentos freqüentes da imunodeficiência adquirida (GUILLEMIN GJ e cols. 2005).

A 3-hidroxi-quinurenina é um precursor dos omócromos, os pigmentos dos insetos que conferem coloração a olhos e asas. *Aedes aegypti* mutantes deficientes na KMO apresentam olhos de coloração branca (HAN Q, e cols. 2003). Esta molécula também tem sido implicada como um fator pró-oxidante, uma vez que se decompõem em condições fisiológicas formando ROS, quando se acumula por algum motivo (HAN Q e LI J 2002).

Tabela 1.10- Resumo das atividades biológicas de integrantes de via das quinureninas

NOME	ESTRUTURA	PROCESSOS ENVOLVIDOS	REFERÊNCIA
ácido quinolínico		Sintetizado por macrófagos em resposta a citocinas pró-inflamatórias e LPS	REINHARD JFJ e cols. 1998
		análogo de NMDA (agonista)	GUILLEMIN GJ e cols. 2005
3-hidroxi-quinurenina		Precursor dos omócromos	HAN Q, e cols. 2003
		Precursor dos omócromos em <i>Aedes</i>	LI J e cols. 1999
		Oxida-se espontaneamente produzindo ROS	HAN Q e LI J 2002
		Regula muda de exoesqueleto em crustáceos	NAYA Y e cols. 1991
		Possível filtro de UV no olho e possível composto cataratogênico.	CHIARUGI A e cols. 1999
quinolobactina		Sideróforo bacteriano	MATTHIJS S, e cols. 2004 du DHARDEMARE AM e cols. 2004
Ácido quinurênico		Agonista receptores nicotínicos $\alpha 7$	HILMAS e cols. 2001
		Presente em retina de camundongos saudáveis, decai com o envelhecimento	REJDAK R e cols. 2004
		Antagonista de receptor de glutamato	KOCKI T e cols. 2003
		Sintetizado por astrócitos, antagonista de receptores de glicina.	KISS C e cols. 2003
Ácido 3-hidroxi antranílico		Tanização de casulo de insetos	MANTHEY MK e cols. 1992
xanthurenic acid 8- O -beta-D-glucoside		brunescens cataract	SHIRAO E e cols. 2001
		Presente em mutantes de cor de olho em <i>drosophila</i>	FERRÉ J e cols. 1985
3-hidroxi-quinurenina- O -beta-D-glucoside		Filtro de UV no olho, pode se ligar covalentemente às proteínas do cristalino causando catarata	HOOD BD e cols. 1999
Ácido xanthurênico		Regula muda de exoesqueleto em crustáceos	NAYA Y e cols. 1991

Um trabalho apontou a 3-hidroxi-quinurenina e o ácido xanturênico como fatores que regulam a muda de exoesqueletos em crustáceos. Injetando estas moléculas em caranguejos a muda é disparada.. Além disso, a 3-hidroxi-quinurenina está presente em olhos de vertebrados tanto na forma livre (CHIARUGI A e cols. 1999) na forma de um derivado glicosilado (HOOD BD e cols. 1999).

Postula-se que, devido à sua acentuada absorção de luz na faixa do UV esta molécula funcione como um filtro protetor no olho, e que um desequilíbrio em seu metabolismo seja a causa da catarata, situação na qual ela se derivatiza com as proteínas do cristalino, opacificando-o (HOOD BD e cols. 1999). Um derivado glicosídico do ácido xanturênico também se acumula no olho de vertebrados durante o processo de formação da catarata (SHIRAO E e cols. 2001) e nos olhos de *Drosophilas* mutantes incapazes de sintetizar omócromos (FERRÉ J e cols. 1985).

O ácido 3-hidroxi-antranílico está envolvido com a “tanização” das proteínas de casulas em insetos. A tanização (“tanning”) é um processo no qual as fibras protéicas que formam os casulos em que os insetos se recolhem para sofrer a metamorfose se tornam mais duras e impermeáveis. Neste processo o ácido 3-hidroxi-antranílico se derivatiza com as cadeias laterais destas proteínas, tornando-as mais apolares (MANTHEY MK e cols. 1992).

O ácido quinurênico também apresenta várias atividades frente a receptores neuronais. Esta molécula que é sintetizada por astrócitos (KISS C e cols. 2003) atua como agonista de receptores nicotínicos $\alpha 7$ (HILMAS e cols. 2001) e como antagonista dos receptores de glutamato (KOCKI T e cols. 2003) e de glicina (KISS C e cols. 2003). Além disso, ela também está presente na retina de camundongos saudáveis, onde sua

concentração decai com o envelhecimento dos animais, sendo este decaimento associado à patologias oculares (REJDAK R e cols. 2004).

1.10.1- Quinolobactina, um derivado metilado do ácido xanturênico usado como sideróforo por bactérias.

A quinolobactina merece atenção especial pois é a molécula com maior similaridade estrutural com o ácido xanturênico, diferindo deste apenas por uma metilação em uma de suas hidroxilas (**Figura 1.5.2**). Esta molécula foi descoberta em sistemas biológicos apenas a poucos anos, quando foi caracterizada como um sideróforo na bactéria *Pseudomonas fluorescens* (MOSSIALOS D, e cols. 2000) sintetizado à partir do ácido xanturênico (MATTHIJS S, e cols. 2004).

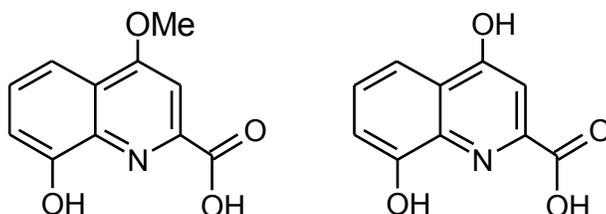


Figura 1.10 - A quinolobactina (esquerda), um derivado metilado do ácido xanturênico (direita), é usada como sideróforo pela bactéria *Pseudomonas fluorescens*

Para as bactérias de vida livre, e mesmo para patógenos, o ferro é um dos principais fatores limitantes para o crescimento, uma vez que, em solução o íon ferroso (Fe^{2+}) é logo oxidado a íon férrico Fe^{3+} e este, por sua vez, precipita-se na forma de hidróxido férrico $\text{Fe}(\text{OH})_3$ ou óxido férrico Fe_2O_3 . O pouco ferro solúvel disponível é alvo de grande disputa bioquímicas em ambientes como esse. A estratégia que alguns microorganismos desenvolveram foi a de sintetizar e secretar para o meio moléculas que formem compostos

de coordenação de alta afinidade pelo ferro. Estes compostos, além de manterem o ferro em solução e na forma reduzida (Fe^{2+}), garantem que este íon só poderá ser captado pelas células que possuem em sua superfície transportadores específicos. A quinolobactina, um análogo estrutural com estreita semelhança com o ácido xanturênico, é a molécula que desempenha o papel de sideróforo na bactéria *Pseudomonas fluorescens* (MATTHIJS S, e cols. 2004; du DHARDEMARE AM e cols. 2004).

1.11 - Atividade antioxidante *in vitro* de alguns intermediários da via das quiinureninas

Em 1990 (CHRISTEN S e cols 1990;) foi mostrado que os intermediários fenólicos desta via:, 3-hidróxi-quinurenina, ácido-3-hidroxi-antranílico e o ácido xanturênico, são capazes de atuar como “scavengers” de radicais peroxil em um sistema *in vitro*, na faixa de concentração micromolar, sendo tão eficientes como o ascorbato e o Trolox (um análogo solúvel da vitamina E) . Neste trabalho, os autores mostraram que a pneumonia aguda viral em camundongos resulta num aumento de 100 vezes na expressão da indoleamina 2,3-dioxigenase (IDO) pulmonar, a primeira enzima da via das quinureninas, considerada regulatória. Assim, foi proposto que esta via estaria funcionando para suprir de antioxidantes o epitélio pulmonar sujeito ao grande estresse oxidativo causado pela resposta imune à doença. Este trabalho nos levou a nos interessarmos por investigar se o ácido xanturênico não estaria desempenhando algum papel na proteção contra o estresse oxidativo no intestino do mosquito.

1.12 - Ácido xanturênico: um quelante de metais

O ácido xanturênico já é conhecido a algum tempo como um potente quelante de íon ferroso. De fato, este complexo é facilmente identificado devido à forte absorção de luz visível que lhe confere uma intensa coloração verde (**Figura 1.12**). A formação deste complexo é favorecida em pH ligeiramente alcalino (~7,5) e completamente revertida em pH ácido (MERCK INDEX).

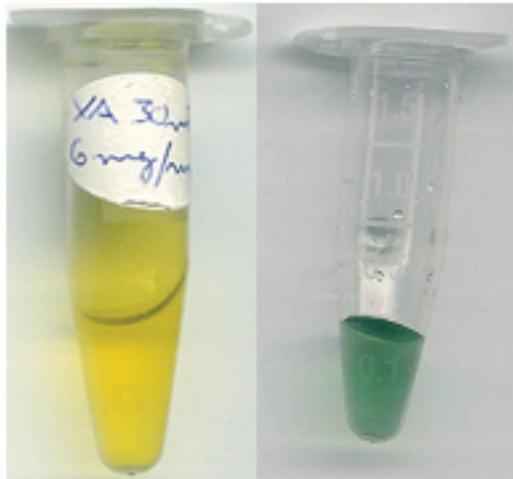


Figura 1.12 - Aspecto do ácido xanturênico com sua intensa coloração amarela (esquerda) e de seu complexo XA com íon ferroso, de coloração verde esmeralda (direita). Ambos em pH 7,5.

2 – OBJETIVOS

- Estabelecer um protocolo para determinação quantitativa do ácido xanturênico (XA) no mosquito *Aedes aegypti*.
- Determinar se a presença do XA neste inseto está, de alguma maneira, relacionada com a digestão do sangue.
- Estabelecer um protocolo para inibição da síntese do XA e avaliar seu efeito biológico.
- Determinar como o XA está relacionado com os potenciais geradores de ROS no intestino do mosquito durante a digestão do sangue, a saber: ferro e heme.
- Investigar se o XA atua como um antioxidante no intestino do *Aedes aegypti*. Em caso positivo, por qual mecanismo.
- Determinar o local de síntese do XA.
- Determinar a função biológica do XA no intestino do *Aedes aegypti*.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Mosquitos

Os mosquitos da espécie *Aedes aegypti*, cepa Red, foram cedidos pela doutora Denise Valle, do Instituto de Biologia do Exército. Tanto os adultos quanto as larvas foram mantidos em foto período de 12 horas de claro (lâmpadas fluorescentes) por 12 horas de escuro, com umidade relativa do ar mantida entre de 75% a 80%, e com temperatura em torno de 28°C.

Para manutenção da colônia (oviposição), uma gaiola, contendo cerca de 200 insetos era alimentada com sangue de coelho. Nesta gaiola era deixada uma pequeno recipiente com algodão hidrófilo embebido em solução de sacarose a 10%, onde os mosquitos podiam beber *ad libitum*. A água com açúcar era trocada de dois em dois dias.

Para a oviposição era colocado um pequeno copo plástico contendo água pela metade com um pedaço de papel de filtro fino semi-suberso nesta água. Ao fim da oviposição o papel de filtro era retirado, seco à temperatura ambiente, datado e armazenado em uma caixa plástica, dentro da colônia, para posterior eclosão.

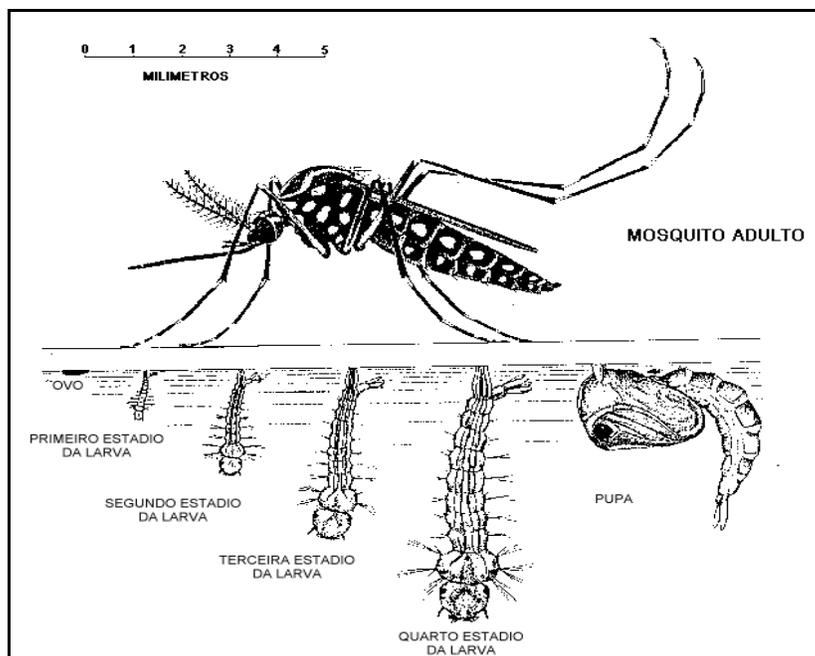


Figura 3.1 - O ciclo de vida do *Aedes aegypti* parte de um ovo e passa por quatro estádios larvares e um de pupa dentro da água antes da eclosão do inseto adulto.

Para eclosão, os ovos secos, ainda aderidos ao papel de filtro, eram previamente submetidos a vácuo moderado por 30 minutos, sob água filtrada. Após a aplicação do vácuo as larvas rapidamente eclodiam. Após eclosão as larvas eram transferidas para bandejas com água filtrada e alimentadas com ração de cachorro moída (Sendas). Ao longo de seu crescimento, as larvas eram divididas em um maior número de bandejas para que o excesso de densidade populacional por bandeja não atrapalhasse seu desenvolvimento. As pupas formadas (primeiras pupas aproximadamente seis dias após a eclosão) eram recolhidas das bandejas e colocadas em um pequeno copo com água, dentro de uma gaiola limpa, contendo sacarose a 10% (como a descrita acima) para a obtenção de novos adultos. A **Figura 3.1** ilustra o ciclo de vida do *Aedes aegypti*.

Os experimentos desta tese foram feitos com fêmeas de *Aedes aegypti* com idades entre 3 a 10 dias após a eclosão dos adultos.

3.2 - Dissecção do intestino médio de *Aedes aegypti*

Os mosquitos, manuseados com sugadores construídos à partir de pipetas plásticas de 10 mL, eram imobilizados por resfriamento em geladeira de onde foram transferidos para uma placa de petri mantida sobre um isopor com gelo moído. As dissecções foram feitas com auxílio de lupa estereoscópica (Leika modelo ZOOM 2000) e um par de micropiças (Dumont).

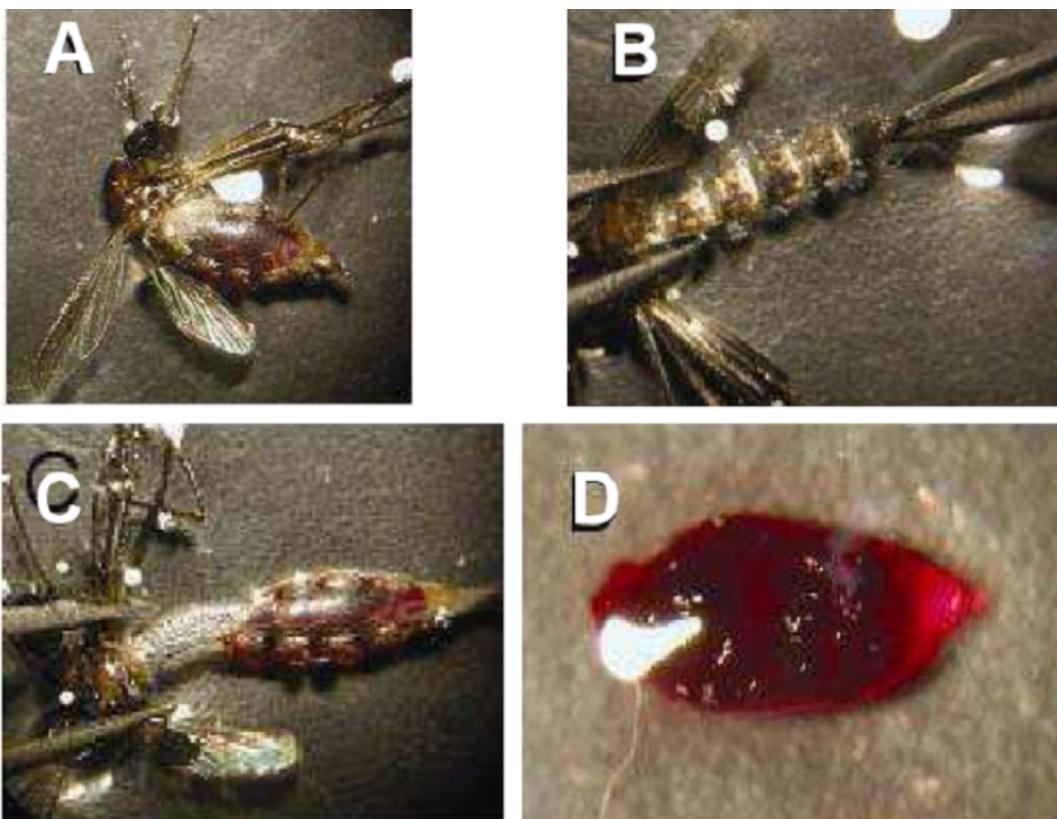


Figura 3.2 - Dissecção do intestinos médio de *Aedes aegypti*. Em **A**, um exemplar de *Aedes aegypti* tal como visto à lupa (10X), imerso na solução de etanol 50%. Em **B** vemos as pontas das duas pinças de dissecção segurando o tórax e a extremidade do abdome. **C** mostra como o tórax se solta do abdome permitindo o acesso a intestino médio e seu conteúdo **D**.

Sobre uma lâmina cavada era colocada uma gota de etanol:água (1:1) onde o mosquito adormecido era colocado (**Figura 3.2**, painel **A**). O mosquito era mantido imerso nesta gota de etanol de onde não conseguia fugir. O intestino médio era obtido segurando-se o tórax com uma das pinças e o terceiro segmento abdominal com a outra e puxando-as delicadamente em direções opostas. Ao se romper a junção entre o tórax e o abdome a pinça que estava prendendo o terceiro segmento do tórax era passada ao primeiro segmento e as duas partes eram então separadas (**Figura 3.2**, painéis **B** e **C**). Com esta manobra o intestino médio saía da cavidade torácica puxado pelo esôfago. Em seguida eram destacados os túbulos de malpighi e os ovários caso estivessem ainda aderidos à parte posterior do intestino médio. Cada intestino médio assim obtido, com o conteúdo ainda acondicionado no epitélio íntegro (**Figura 3.2**, painel **D**), era colocado em um microtubo de 1,5 mL contendo 150 µL salina tamponada com fosfato (PBS: NaCl 150 mM; PO_4^{3-} 50 ; pH 7.5 ajustado com NaOH) e armazenado em congelador, a -20°C para as análises posteriores.

3.3 - Dosagem do ácido xanturênico no intestino do *Aedes aegypti* por cromatografia de alta performance em coluna de fase reversa.

Cada intestino foi homogeneizado em 150 µL de PBS no próprio microtubo de ensaio (Eppendorf 1,5 mL) em que foi coletado com auxílio de um pequeno homogeneizador plástico. Este material foi diluído pela adição de 650 µL de tampão A (Acetonitrila 5%, ácido trifluoroacético 0,05%) perfazendo 800 µL. Após vigorosa agitação o tubo foi centrifugado por 10 minutos a 10.000 RPM em microcentrífuga refrigerada a 4°C. A partir do sobrenadante assim obtido, foram retirados 250 µL em uma microseringa Hamilton totalmente cheia. Esta seringa foi usada para encher o “loop” de 200 µL usado

em todas as corridas em HPLC desta tese (ou seja, cada corrida foi carregada com o correspondente a 0,25 intestino de mosquito). Durante todas as manipulações as amostras foram mantidas em isopor com gelo triturado (4°C).

As amostras foram fracionadas numa coluna de fase-reversa C-18 (Shimadzu CLC-ODS C18) em um aparelho de cromatografia de alta performance (Shimadzu LC-10AT Tokyo, Japan) equipado com um detector de “diode-array” (Shimadzu SPD-M10A). As cromatografias foram realizadas por 5 min. Em tampão A seguido de um gradiente linear de 15 min. de 20% de tampão B até 80% de tampão B Acetonitria 80%, ácido trifluoroacético 0,05%). O passo seguinte era tampão B a 100% por mais 15min. Ao fim de cada corrida a coluna era re-equilibrada em tampão A por 20 min. Os valores de absorbância a 250 nm foram usados para monitorar o ácido xanturênico. O fluxo utilizado foi de 1 mL por minuto.

3.3.1 - Curvas padrão de ácido xanturênico

Para a construção das curvas padrão de XA, quantidades crescentes de ácido xanturênico, diluídas em tampão A, foram aplicadas e fracionadas nas mesmas condições usadas para analisar o conteúdo intestinal. As curvas padrão foram construídas com base na área e na altura dos picos obtidos.

3.4 - Espectrometria de massa.

As análises por espectrometria de massa foram feitas pelo Dr. Richard H Valente do Departamento de Fisiologia e Farmacodinâmica, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ. Os espectros de massa foram obtidos no modo “ion-positivo” usando um espectrômetro “ion trap” Finnigan LCQ Deca XP Plus (ThermoElectron Co., San Jose, CA). A fração de

intestino médio obtida por HPLC com tempo de retenção correspondente ao do ácido xanturênico comercial foi preparada em acetonitrila 50%; ácido fórmico 0,1% e injetada por infusão direta. A fonte de spray e a voltagem do capilar foram ajustadas para 4.5 kV e 40 V, respectivamente. A temperatura do capilar foi 200°C. As fragmentações induzidas por colisão (tandem ESI-MS) foram feitas usando uma energia relativa de colisão de 40%.

3.5 - Ensaio de titulação potenciométrica do ácido xanturênico

5 mL de ácido xanturênico 7 mM foram colocados em um béquer de 15 mL sobre uma placa da agitação magnética e mantidos sob agitação moderada com auxílio de um pequeno agitador magnético. O eletrodo foi introduzido na solução e esta foi alcalinizada até pH 11,90 pela adição de NaOH 1 M. Em seguida foram adicionadas sucessivamente alíquotas de 40 μ L de uma solução de HCl 50 mM. Ao fim de cada adição e da estabilização da leitura esta era anotada para construção de uma planilha de volume de HCl adicionado X pH que foi usada para elaboração do gráfico de titulação.

3.6 - Alimentação em comedouros artificiais

As alimentações foram feitas em alimentadores artificiais que consistem em um segmento de cone, feito em vidro e “jaquetado” por um circuito onde pode correr água. Este cone tem uma abertura grande na base e outra pequena no topo. À abertura da base foi fixada uma membrana de plástico (PARAFILM “M” laboratory film) que simula a pele do doador. O cone foi cheio por intermédio de seu orifício superior com sangue ou sangue suplementado, a jaqueta foi ligada a um banho circulante ajustado a 38°C e a membrana plástica foi aproximada a tela de uma gaiola contendo mosquito. Estes são atraídos pelo

calor, aproximam-se da tela, e furam a membrana de “parafilm” com suas probóides ingerindo o conteúdo das mamadeiras.

3.6.1 - Preparação do plasma.

Um volume de aproximadamente 5 mL de sangue heparinizado de coelho, colhidos com agulha grossa (BD 21 G, 0,8 x 25 mm) para evitar hemólise, foi centrifugado à temperatura ambiente por 10 minutos a 5000 RPM (1900 X g, em centrífuga de bancada Joan modelo BR5i). O sobrenadante de plasma assim obtido foi avaliado quanto à quantidade de hemoglobina pela observação da presença ou não de alguma coloração vermelha e, caso não houvesse hemólise era usado para o experimento de alimentação com plasma.

3.6.2 - Administração das drogas com o sangue.

O metil-triptofano foi adicionado ao sangue à partir de uma solução a 10 mM (10X concentrado). Para drogas “A” e “B”, de muito baixa solubilidade, foram preparadas suspensões coloidais em PBS: cada droga foi adicionada a um microtubo contendo PBS numa concentração final de 10 mM. Este tubo, devidamente refrigerado em banho de água com gelo, foi submetido a três ciclos de sonicação de 2 segundos, com intervalos de dez segundos entre cada ciclo, em sonicador de ponteira (Branson Sonifier modelo 250), com a intensidade de saída ajustada em 40% da intensidade máxima, utilizando-se a ponteira de ponta fina. O resultado deste tratamento era uma suspensão coloidal finamente dividida (de sedimentação muito lenta e aspecto leitoso) que, suplementada ao sangue, foi bem aceita pelos mosquitos.

Para suplementação do sangue com drogas, 50 μ L da solução de metil-triptofano ou das drogas A e B na forma coloidal, todos em concentração inicial igual a 10 mM, foram adicionados a 45 μ L de sangue de coelho heparinado fresco, para concentrações finais iguais a 1 mM. Na condição controle, 450 μ L de sangue foram diluídos com 50 μ L PBS.

3.7 - Ensaio de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase do mRNA da triptofano dioxigenase do epitélio intestinal (RT-PCR)

3.7.1 - Extração de RNA total

O RNA total de epitélios intestinais, dissecados 24h após alimentação com sangue, foram purificados com o reagente TRIzol (GIBCO-BRL – Life Technology, Chomczynski, 1987), utilizando o protocolo descrito pelo fabricante. O RNA total purificado foi dosado por medida da absorção de luz a 260 nm.

3.7.2 - Síntese da primeira fita de cDNA

Foram utilizados 5 μ g de RNA total para a síntese de primeira fita, por transcrição reversa, utilizando o kit "*Superscript First-strand synthesis system for RT-PCR*" (GIBCO-BRL – *Life Technologies*), conforme o protocolo do fabricante. Para a reação foi utilizado um oligonucleotídeo Not I – dT, além dos dNTPs, DTT, tampão e a enzima transcriptase reversa do KIT (superscript II RT). Ao final de uma incubação por 2 horas a 42°C, a reação foi interrompida através da desnaturação da enzima, a 75°C, por 15 minutos. Em seguida, foi feita uma incubação a 37°C com 2 unidades de RNase H. Os cDNA foram estocados a -20°C, até serem utilizados.

3.7.3 - Desenho dos oligonucleotídeos iniciadores (primers) para reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para desenho dos primers para estudo da triptofano 2,3 dioxigenase de *Aedes aegypti*, a sequência correspondente a esta proteína, previamente anotada (BARTHOLOMAY, L.C. e cols. 2004) foi obtida do genbank (GI:42763768). Em seguida, primers específicos senso e antisenso para a reação de PCR foram escolhidos na sequência com o auxílio do programa Primer3 (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) e sintetizados por encomenda (INVITROGEN). Como controle de expressão de proteína constitutiva foi usada a sequência da actina.

3.7.4 - Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Para amplificação por PCR dos retrotranscritos do mRNA da TDO, as seguintes condições foram utilizadas: 0,3 μ M de ambos dos oligonucleotídeos iniciadores, 2,5U de Taq polimerase e 0,2 mM dos dNTPs, além do tampão adequado as condições ótimas da Taq (pH 8,3 e cloreto de magnésio numa concentração de 1,5 mM). O volume de reação foi ajustado com água milliQ até 50 μ l e a reação foi efetuada no termociclador “Gene Amp PCR System 2400” (Applied Biosystems). A reação de PCR foi realizada nas seguintes condições: pré desnaturação a 94°C por dois minutos, seguida de 35 ciclos de 94°C, por 1 minuto para desnaturação; 50°C por 1 minuto, para anelamento e 72°C por 45 segundos para extensão. Para extensão final foram usados 7 minutos a 72°C.

O produto final da amplificação foi analisado por eletroforeses em gel de agarose 1,5% conforme descrito por SAMBROOK, J. e RUSSEL, D.W. 2001.

Tabela 3.7.3 - Seqüência dos iniciadores usados para amplificar os retrotranscritos dos mRNAs da TDO e da actina de intestino médio de *Aedes aegypti*

NOME	SEQUÊNCIA
AedTDO-1	5´-ACTCCATTCGCAGCCTGTTT-3´
AedTDO-2	5´-TTTGCCCCAAAAGTTGAACC-3´
AedACrtF	5´-ATACTCCGTCTGGATCGGTG-3´
AedACrtR	5´-CACCGATCCAGACGGAGTAT-3´

3.8 - Ensaio de oxidação de fosfatidilcolina induzida por heme

3.8.1 - Oxidação da fosfatidilcolina

A oxidação da fosfatidilcolina foi monitorada pelo desaparecimento do oxigênio dissolvido com o auxílio de uma oxígrafo (Yellow Spring Instruments Co., Model 5300, USA). O volume da célula, foi de 1,5 mL e a temperatura dos ensaios foi de 25°C.

3.8.2 - Preparo de lipossomas de fosfatidilcolina

18 mg de fosfatidilcolina foram colocados em tubos contendo 1,5 mL TBS (NaCl 150 mM, TRIS 50 mM; pH ajustado com HCl) nos pHs 7,0; 7,5 e 8,0. Os lipídeos foram então sonicados em sonicador de ponteira (Branson Sonifier modelo 250), por seis ciclos de 20 segundos intercalados por 40 segundos de refrigeração em banho de gelo. Foi utilizada a ponteira de ponta fina e a intensidade de saída foi ajustada a 40% da intensidade máxima. Ao fim deste tratamento a solução de fosfatidilcolina apresentava-se translúcida.

3.8.3 - Preparo da solução de heme

Uma solução de heme 1 mM foi preparada pela adição de 6,5 mg de heme a 1 mL de NaOH 0,1 M, seguida de vigorosa agitação por 5 minutos.

3.8.4 - Curvas de consumo de O₂

Para cada curva de consumo de O₂ primeiro eram adicionados à célula 1,35 mL de TBS, 0,15 mL dos lipossomos de fosfatidilcolina e o ácido xanturênico (caso necessário; volume total da célula=1,5 mL). O sistema de registro era acionado e a linha de base era registrada por alguns minutos. Em seguida a reação era disparada pela adição do heme. O conteúdo da célula foi mantido sob agitação moderada constante com auxílio de uma placa agitadora e uma mini barra magnética.

3.9 - Ensaio de oxidação de lipossomas de fosfatidilcolina induzida por íon ferroso

3.9.1 - Oxidação da fosfatidilcolina

A oxidação da fosfatidilcolina foi monitorada pelo desaparecimento do oxigênio dissolvido com o auxílio de uma oxígrafo (Yellow Spring Instruments Co., Model 5300, USA). O volume da célula foi de 1,5 mL, a temperatura dos ensaios foi de 25°C.

3.9.2 - Preparo de lipossomas de fosfatidilcolina

Os lipossomas foram preparados do mesmo modo que foi descrito acima para o ensaio de oxidação induzida por heme.

3.9.3 - Consumo de O₂

Para cada curva de consumo de O₂ primeiro eram adicionados à célula 1,25 mL de TBS, 0,15 mL dos lipossomos de fosfatidilcolina. O sistema de registro era acionado e a linha de base era registrada por alguns minutos. Em seguida eram adicionados 15 µL de ascorbato 10 mM ([final] = 100 µM) e 15 µL de FeSO₄ 10 mM (recém preparado, [final] = 100 µM) Estas adições provocavam uma pequena queda na linha de base, esta nova linha

de base era registrada por alguns minutos e, em seguida a reação era disparada pela adição de peróxido de hidrogênio resultando num consumo linear de O₂. O efeito da posterior adição de 10 µL de ácido xanturênico 30 mM ([final] = 200 µM) foi avaliado. O conteúdo da célula foi mantido sob agitação moderada constante com auxílio de uma placa agitadora e uma mini barra magnética.

3.10 - Ensaio de deslocamento da mobilidade eletroforética do heme na presença de ácido xanturênico

3.10.1 - Preparo do gel de agarose.

O gel foi preparado com agarose a 1% em tampão fosfato de sódio 50 mM, nos pHs 7,0 e 8,0; com e sem ácido xanturênico a 1,5 mM.

3.10.2 - Tampão de corrida

Fosfato de sódio 50 mM foi usado como tampão de corrida, em pH 7,0 ou 8,0 de acordo com o pH do gel. Nos poços foram aplicados 10 e 20 µL de heme 5 mM com PEG 5000 a 5%. O PEG foi usado para aumentar a densidade da amostra garantindo seu afundamento para o poço e minimizando sua dissolução por difusão. As corridas foram realizadas com 50 mA de corrente por 2 horas. Os géis foram fotografados sem coloração uma vez que a migração do heme podia ser acompanhada na forma de uma banda marrom devido à sua coloração intrínseca.

3.11 - Ensaio de ligação do ácido xanturênico ao íon ferroso

A uma cubeta de espectrofotômetro contendo 1 mL de TRIS-Cl 50 mM pH 7,5; contendo ácido xanturênico 50 µM foram feitas adições sucessivas de uma solução recém

preparada de FeSO_4 10 mM. Ao fim de cada adição de íon ferroso a cubeta foi tampada e seu conteúdo homogeneizado por inversão da mesma. A formação do complexo verde foi acompanhada pela variação na absorbância a 550nm. Como o íon ferroso possui também uma coloração ligeiramente esverdeada, este foi adicionado a uma cubeta contendo somente tampão e a absorbância a 550 nm foi igualmente monitorada.

3.12 - Ensaio de hemólise induzida por heme

1,5 mL de sangue heparinado de coelho, recém colhido, foi diluído em 12 mL de TBS pH 7,5 (salina tamponada com TRIS: NaCl 150 mM, TRIS 50 mM pH 7,5, ajustado com NaCl). O tubo foi suavemente agitado e centrifugado (centrífuga de bancada Joan, modelo BRi) a 500 X g por 7 minutos ao fim dos quais o sobrenadante foi descartado e o precipitado de hemácias foi submetido a mais dois ciclos de lavagem. O precipitado final teve seu volume estimado e foi adicionada uma quantidade de TBS suficiente para obtenção de uma suspensão de hemácias a 5%.

As hemácias a 5% foram distribuídas em três tubos, aos quais foram adicionados ácido xanturênico para concentrações finais de zero, 0,15 mM e 1,5 mM. Cada uma destas soluções mãe foram distribuídas em quatro grupos de tubos em quadruplicata. Nestes tubos a reação de hemólise foi disparada pela adição de heme para concentrações finais iguais a zero, 5 μM , 10 μM , 15 μM e 20 μM . Os tubos foram incubados por duas horas a 37°C ao fim das quais foram centrifugados a 5000 RPM por dois minutos em microcentrífuga e a absorbância do sobrenadante foi determinada a 400 nm como medida da hemoglobina dissolvida no tampão, resultante do rompimento das hemácias. Nos tubos contendo heme a 20 μM a hemólise foi total. Como o ácido xanturênico apresenta alguma absorção a 400 nm

os dados das curvas “XA 0,15 mM” e “XA 1,5 mM” foram descontados das suas respectivas leituras nos tubos sem heme para a elaboração do gráfico.

4 RESULTADOS

4.1 Identificação do ácido xanturênico (XA) no intestino médio do mosquito

Aedes aegypti

Ao fracionarmos o intestino médio do *Aedes aegypti* com seu conteúdo por HPLC em coluna de fase reversa C-18 foi observado, aos 12 minutos de tempo de retenção, um pico bastante representativo quando monitorado a 250 nm (figura 4.1 A). Este pico apresentou o mesmo tempo de retenção do ácido xanturênico padrão (figura 4.1 B),

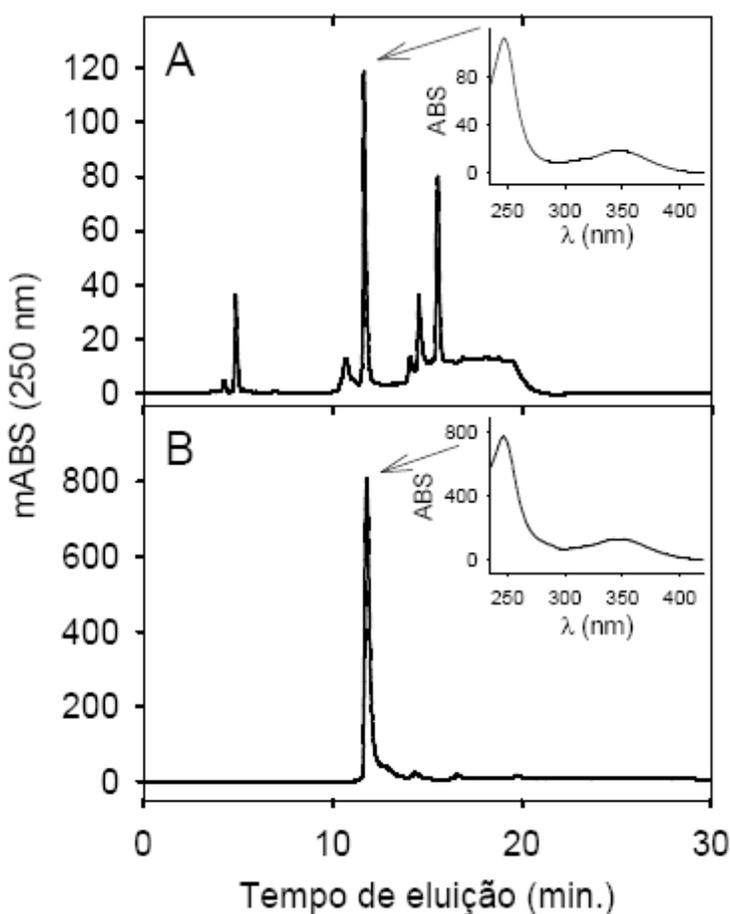


Figura 4.1.1 - Perfil de fracionamento do intestino médio do mosquito por cromatografia de fase reversa (A) e sua comparação com o perfil do ácido xanturênico padrão (B). Os insets indicam que os espectros de absorção de luz dos picos de 12 minutos são idênticos.

fracionado em condições idênticas. Além disso, usando uma unidade de “Diode Array” acoplado ao HPLC foi possível determinar que ambos os picos são compostos por moléculas com espectros de absorção virtualmente idênticos, mostrados nas figuras inseridas.

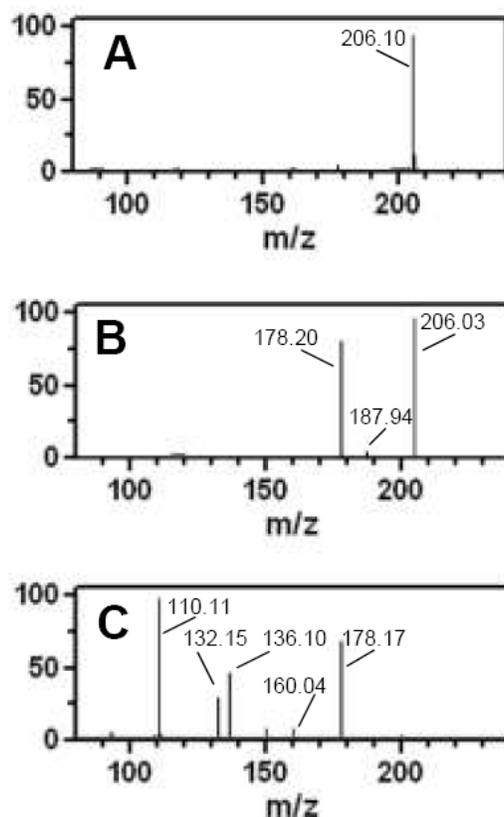


Figura 4.1.2 - Espectro de massa do pico de 12 minutos fracionado de intestino de *Aedes* A: íon molecular de 206,1 m/z; B fragmentação do íon molecular em uma espécie de 178,2 m/z; e C: fragmentação do pico de 178,2 m/z gerando espécies menores.

O pico de 12 minutos foi coletado na saída da coluna de algumas corridas iguais para acumular massa, o material foi seco e posteriormente analisado para determinação de sua massa molecular por espectrometria de massa. O espectro do íon molecular que confirma o peso esperado para do ácido xanturênico com 206UMA de peso molecular (**Figura 4.1.2 A**). O pico de 206 foi fragmentado, gerando pico de 178,20 (**Figura 4.1.2 B**). este, por sua

vez foi re-fragmentado gerando as espécies mostradas na **Figura 4.1.2 C**. O espectro de fragmentação é muito parecido com o obtido por Billker e colaboradores em 1998.

4.2 - Quantificação do XA ao longo da digestão por cromatografia de alta performance em coluna de fase reversa RP-HPLC

Para validar a utilidade do ensaio de fracionamento por HPLC como método quantitativo para a dosagem do ácido xanturênico e sua faixa de sensibilidade, bem como qual tratamento matemático seria dado para esta dosagem (como altura ou área do pico) desta molécula foram construídas as curvas padrão mostradas na **Figura 4.2.1**. Podemos

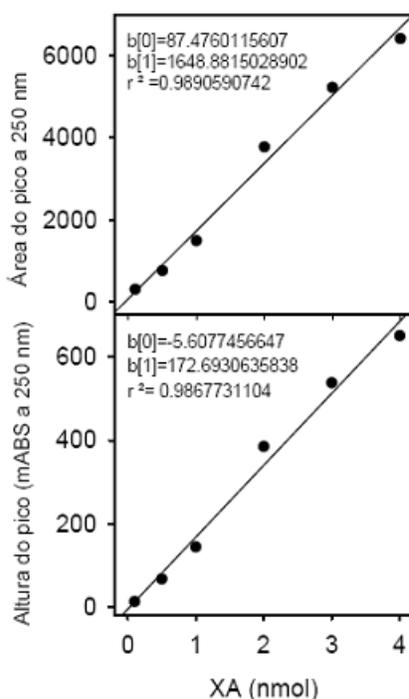


Figura 4.2.1 - Curva padrão da dosagem de XA por HPLC. Quantidades variadas de XA (0,2 a 4 nmol) foram aplicadas em coluna de fase-reversa. As curvas-padrão foram construídas com base na área (A) e na altura (B) dos picos de 12 minutos. Os coeficientes lineares ($b[0]$) e angulares ($b[1]$) e o r^2 para cada curva estão indicados nos gráficos.

observar que tanto a área como a altura do pico podem ser usadas como parâmetro para quantificação do XA de forma praticamente indistinta. Vemos também que esses dois parâmetros se relacionam de forma linear ($r^2 > 0,98$) para leituras (250 nm) até 600 mABS de intensidade. O método se mostrou bem sensível apresentando limite mínimo de detecção em 200 pmol de XA.

Uma vez estabelecidas as condições para dosagem do XA no intestino, partimos para estabelecer qual seria o curso temporal da variação do teor dessa molécula ao longo da digestão do sangue. Os mosquitos alimentados com sangue ou plasma foram dissecados (quadruplicadas) em diferentes tempos após a alimentação (zero a 48 horas). A fração solúvel do conteúdo intestinal foi então fracionada por HPLC e as quantidades de nmols de XA foram determinadas à partir da altura dos picos usando-se a curva padrão da figura **Figura 4.2.1 B** como referência. O resultado está mostrado na **figura 4.2.2**. Nela podemos observar que o XA é praticamente inexistente no momento da alimentação. Seis horas após a alimentação seu nível é ainda inferior ao limite mínimo de detecção, de 0,1 nmol/intestino. Mas de 12 a 24 horas sua concentração sobe rapidamente chegando a alcançar 15 nmol/ por intestino, o que representa uma concentração em torno de 7 mM. Nesta mesma figura, podemos observar o pronunciado efeito que a supressão das hemácias da dieta do mosquito tem sobre o perfil cinético do XA. Uma pronunciada inibição na síntese do XA (70%) é observada quando os mosquitos são alimentados somente com plasma.

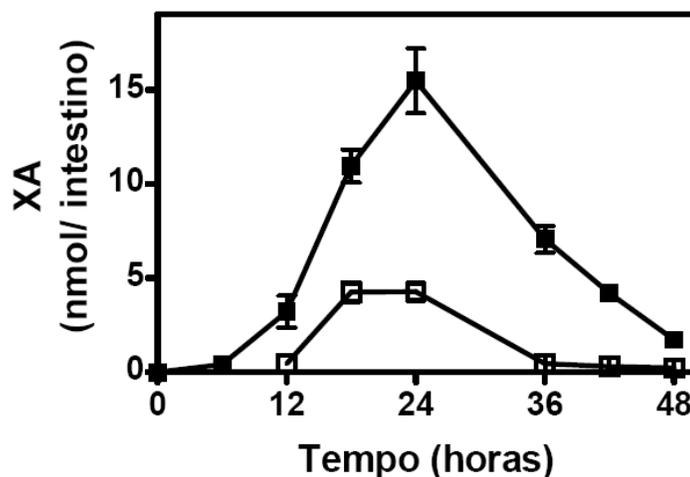


Figura 4.2.2 - Curso temporal da variação de XA no intestino do mosquito ao longo da digestão do sangue (■) e do plasma (□).

4.3 -Identificação da síntese da TDO no epitélio intestinal do *Aedes*.

O curso temporal do teor de XA no intestino sugere que esta molécula seja secretada para o intestino ao longo da digestão. Neste contexto o epitélio intestinal aparece como bom candidato para sítio de biossíntese do XA. Com o objetivo de investigar esta hipótese, realizamos um ensaio de RT-PCR usando iniciadores específicos para o mRNA da TDO de *Aedes*, como controle foram usados iniciadores específicas para actina. O resultado é indicado na **figura 4.3.1**. Nela vemos os produtos da transcrição reversa seguida de PCR realizado com 25 e 40 ciclos. A banda correspondente a TDO, com tamanho de bases correspondente a 404 pb, foi amplificada em quantidades apreciáveis neste tecido 15 ciclos antes da actina, com 635 pb(que ainda não é amplificada com 25 ciclos).

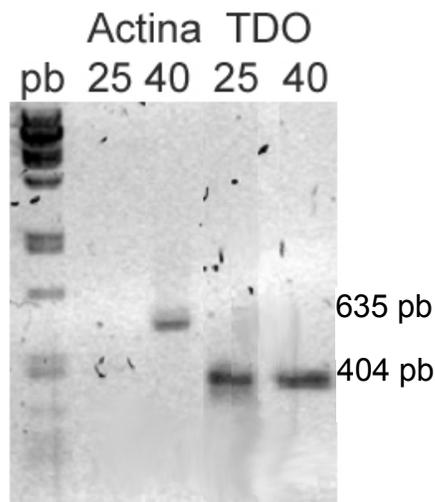


Figura 4.3.1 - Identificação do mRNA para a TDO no epitélio intestinal do *Aedes*. Os números acima da figura indicam o número de ciclos de PCR realizados. A actina apresenta produto de amplificação apenas em 40 ciclos enquanto a TDO já apresenta amplificação em 25 ciclos.

4.4 – Inibição da síntese de XA no intestino através da administração oral de inibidores da quinurenina monooxigenase (KMO).

Para confirmar a existência da síntese de XA no intestino durante a digestão do sangue alimentamos mosquitos com sangue suplementado com inibidores da oxidação do triptofano. O metil-triptofano, um inibidor utilizado para inibir a IDO em mamíferos, e dos inibidores da quinurenina hidroxilase, a enzima que oxida a quinurenina gerando hidróxi-quinurenina, o precursor imediato do XA. Os insetos foram sacrificados a 12 e a 24 horas após a alimentação, e o teor da XA foi determinado por HPLC, como descrito em métodos (**Figura 4.4.1**). Os valores de absorvância máxima dos picos correspondentes ao XA foram convertidos em número de mols por intestino com base na curva padrão mostrada na **figura 4.2.1**. O inibidor, da quinurenina hidroxilase Ro-061-2822 (m-NBA (m-nitrobenzoil)alanina) não teve nenhum efeito sobre a concentração de XA intestinal nas condições do ensaio. O inibidor da IDO 1-metil-triptofano mostrou apenas uma pequena

diminuição no XA intestinal, após 24 horas. Já o inibidor da quinurenina hidroxilase, Ro-061-8048, apresentou uma acentuada inibição na síntese do XA tanto no ponto de 12 horas como no de 24 horas.

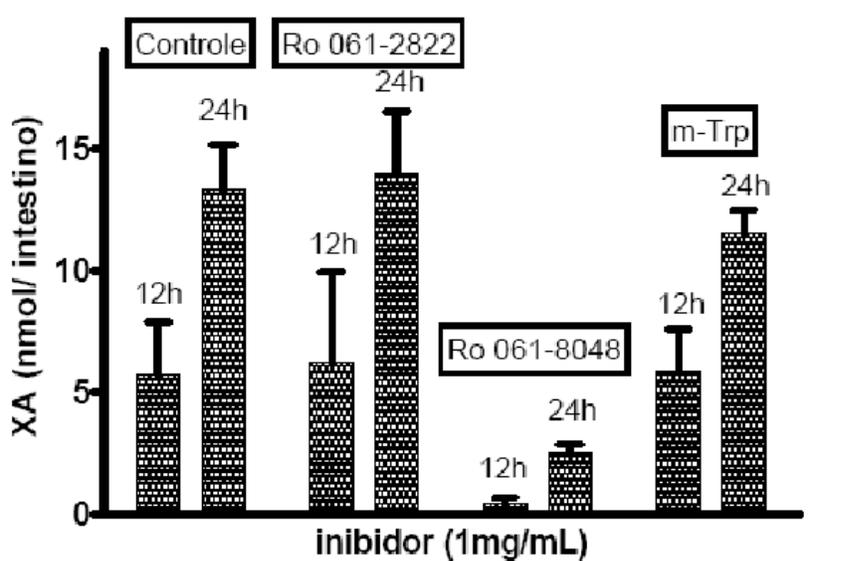


Figura 4.4.1 - Efeito de alguns inibidores via das quinureninas nos níveis de XA intestinal a 12 e a 24 horas. Os inibidores foram administrados misturados ao sangue na concentração final de 1 mg/mL (m-Trp=1-metil-triptofano).

4.5 – Oxidação de lipídeos pelo heme - efeito protetor do XA e dependência do pH

Uma vez que o XA é descrito com um ligante de ferro e como um scavenger de radical hidroxil, resolvemos testar sua atividade como antioxidante num sistema que simula em alguns aspectos o que ocorre no intestino do mosquito, onde temos heme e lipídeos. O efeito do pH sobre a exflagelação e sobre a capacidade do XA de formar o complexo verde com íon ferroso nos estimulou a realizar o ensaio em diferentes pH entre os valores de 7,0 e 8,0. Neste sistema, a adição de heme na faixa de concentração milimolar induz uma rápida oxidação de lipídeos que pode ser monitorada pelo desaparecimento do oxigênio dissolvido. O resultado é mostrado na **Figura 4.5**. Nela podemos ver que a adição de XA,

na concentração de 20 μM , resulta numa proteção dos lipídeos de uma forma dependente de pH. Em pH 7,0 o tempo para o consumo total do oxigênio aumenta de 5 minutos para 20 minutos. Em pH 7,5 o tempo para o consumo total do O_2 dissolvido passa a ser 40 minutos. Em pH 8,0 esta proteção é ainda maior, o oxigênio leva quase uma hora para ser consumido.

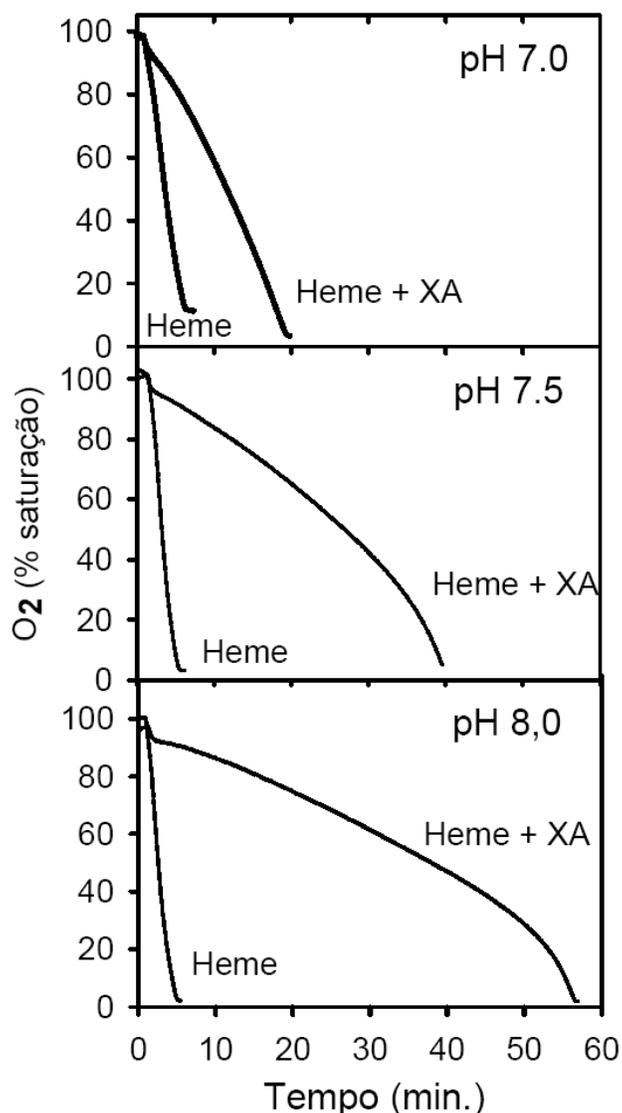


Figura 4.5 – Efeito protetor do XA na oxidação de lipídeos induzida por heme. A adição de heme (3.3 μM) a uma suspensão de micelas de fosfatidil colina provoca uma rápida oxidação dos lipídeo que pode ser monitorada pela diminuição na quantidade de O_2 dissolvido. A adição de XA (20 μM) promove uma proteção aos lipídeos que se acentua substancialmente quando o pH aumenta de 7,0 para 8,0. .

4.6 – Ligação do XA ao heme –efeito do pH

Pra a avaliar se o XA é capaz de formar um complexo com o heme foi realizado o experimento de variação da mobilidade eletroforética do heme em gel de agarose mostrado abaixo (**Figura 4.6**). Neste experimento foi avaliada a mobilidade eletroforética do heme na presença e na ausência de XA (1,5 mM) em pHs 7,0 e 8,0. Em pH 7,0 a presença de XA não foi capaz de provocar nenhuma variação na mobilidade eletroforética do heme. Já em pH 8,0 vemos que o XA provoca um acentuado aumento nesta mobilidade. Indicando a formação de uma espécie mais aniônica..

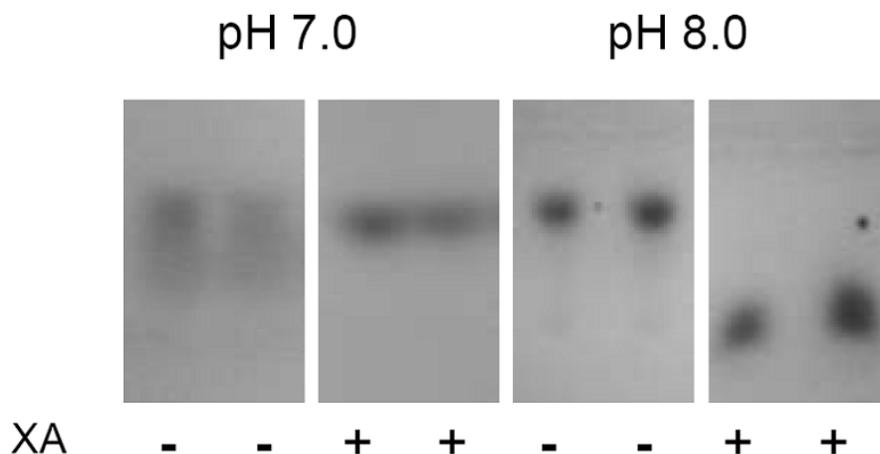


Figura 4.6 – Variação da mobilidade eletroforética do heme causado pela adição de XA em dois diferentes pHs. As imagens representam fotos de géis de agarose feitos na presença e na ausência de XA 1,5 mM (sinais + e -, na parte inferior) e em pHs 7,0 (dois painéis da esquerda) e 8,0 (dois painéis da direita)

4.7 – Efeito protetor do XA no sistema de oxidação de lipídeos induzido por íon ferroso e peróxido de hidrogênio.

O íon ferroso é capaz de induzir a oxidação de lipídeos na presença de peróxido de hidrogênio. Recentemente foi detectada a presença de um derivado de biliverdina no intestino do *Aedes*, sugerindo a existência de um sistema de degradação de heme, que resulta na produção de íon ferroso. (PEREIRA LO e cols. 2007) . Uma vez que já é sabido que o XA forma um complexo com o íon ferroso, realizamos este experimento para investigar com este complexo se comportaria frente à peroxidação de lipídeos.

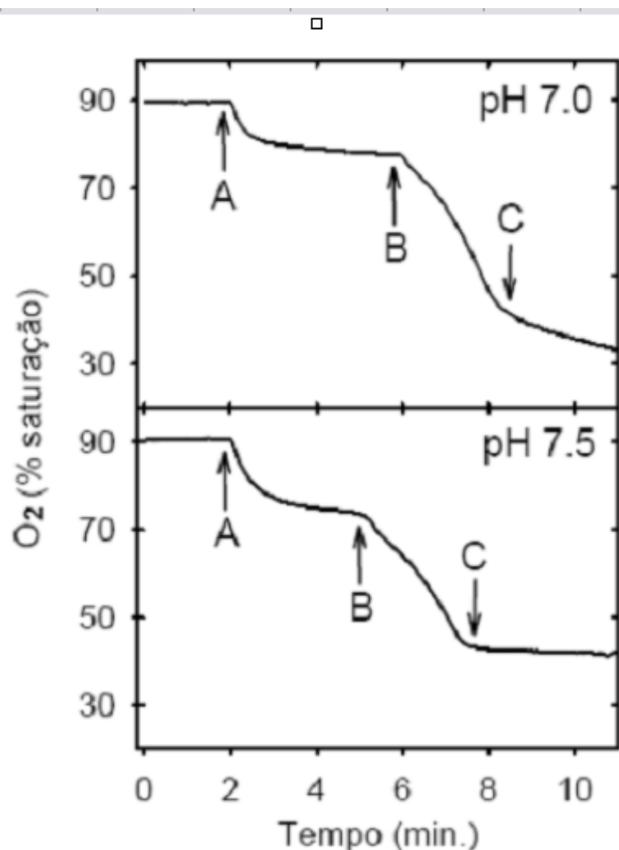


Figura 4.7 – Efeito do XA na peroxidação lipídica induzida por íon ferroso e peróxido de hidrogênio. Efeito de adições seqüenciais no consumo de O₂. Em **A** Fe²⁺ 100 µM e ascorbato 100 µM . Em **B** peróxido de hidrogênio 100 µM e em **C**: XA 200 µM.

Neste sistema, de forma parecida ao que aconteceu na **figura 4.5**, o consumo de O₂ dissolvido reflete a oxidação dos lipídeos A **Figura 4.7** mostra o resultado: No momento **A** foram adicionados o ferro e o ascorbato (agente redutor utilizado para manter o ferro na forma reduzida). Esta adição provoca uma perturbação na linha de base que se estabiliza em torno de dois minutos em seguida (momento **B**) é adicionado o peróxido que inicia a reação de oxidação de lipídeos propriamente dita. A adição de XA, no instante **C**, provoca, em pH 7,0, uma redução na velocidade de consumo de O₂. Já em pH 7,5 a presença de XA freia de forma quase que completa a oxidação dos lipossomas de fosfatidilcolina. Este resultado indica que o complexo XA:Fe²⁺ não é capaz de catalizar a formação de ROS na presença de peróxido de hidrogênio e ascorbato.

4.8 – Ligação do XA ao íon ferroso

Para determinar como é a ligação do XA ao Fe^{2+} no pH fisiológico do mosquito e ter uma idéia da afinidade desta ligação e da estequiometria desta reação realizamos a titulação mostrada na **figura 4.8**. Em uma cubeta de 1 mL contendo XA 50 μM foram feitas adições sucessivas de FeSO_4 . A formação do complexo verde foi monitorada pela absorvância em 550 nm. (**figura 4.8** ●--●). Para avaliar a contribuição dada diretamente pela coloração esverdeada íon ferroso na ABS a 550 nm um experimento em branco foi realizado na ausência de XA (**figura 4.8** ○--○). Podemos ver que o íon ferroso se liga quantitativamente ao XA até que todo XA livre termine. A inflexão na curva indica uma alta afinidade pelo ferro. O fato da inflexão ocorrer em 20 μM de ferro, indica uma estequiometria de 2 para 5 para a formação do complexo $\text{XA}:\text{Fe}^{2+}$.

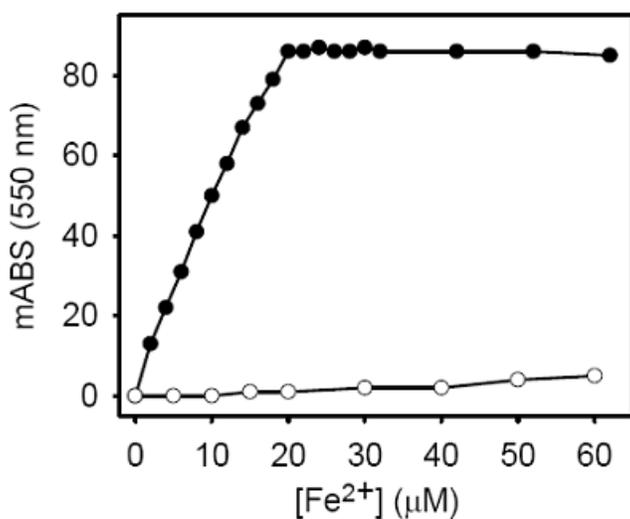


Figura 4.8 – Formação do complexo $\text{XA}:\text{Fe}^{2+}$. Adições sucessivas de íon ferroso foram feitas em uma cubeta contendo XA 50 mM. A formação do complexo $\text{XA}:\text{Fe}^{2+}$, de coloração verde, foi monitorada pela absorvância a 550 nm (●--●). A contribuição do íon ferroso para a absorvância neste comprimento de onda é mostrada num experimento sem XA (○--○)

4.9 – Titulação potenciométrica do XA.

Devido ao acentuado efeito do pH nas atividades antioxidantes do XA medidos neste trabalho e à falta de dados disponíveis na literatura sobre as constantes de protonação/desprotonação deste ácido poliprótico, realizamos uma curva de titulação potenciométrica do XA para determinar estas constantes (**Figura 4.8**). O XA foi alcalinizado com NaOH até pH próximo a 12 como descrito em métodos. e, em seguida, titulado com HCl 50 mM. A curva de titulação revelou três platôs de tamponamento, em pHs 11,5; 7,5 e 2,5. Neste último pH, um precipitado amarelo enxofre se formava sugerindo que este é o pK de formação da espécie de carga líquida zero. A adição de mais HCl ressolubiliza este precipitado indicando que um hidrocloreto de XA é formado em pH abaixo de 2,5.

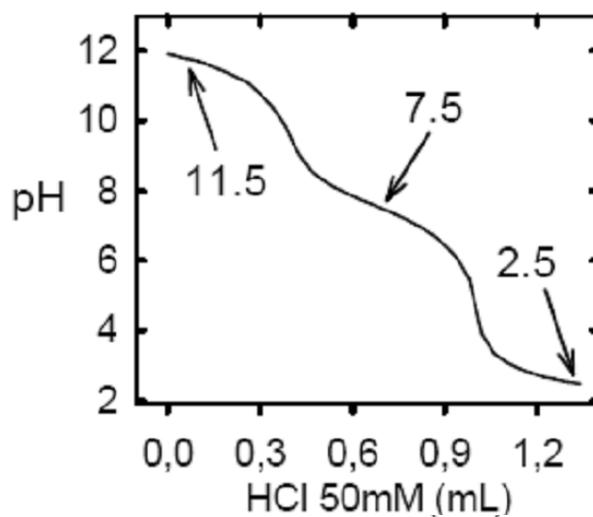


Figura 4.9 – Titulação do XA. A curva revela três patamares de protonação com pKs em 11,5; 7,5; e 2,5.

4.10 – Efeito anti-hemolítico do XA na hemólise induzida por heme.

O heme induz hemólise na faixa de concentração micromolar. Uma vez que estamos mostrando que o XA forma um complexo com o heme e que está presente em grandes concentrações no intestino do *Aedes*, resolvemos investigar como o complexo XA:heme se comportaria quanto à atividade hemolítica. O resultado é mostrado na **Figura 4.10**. Hemácias lavadas foram incubadas por duas horas com heme em concentrações crescentes (0 a 20 μM); na ausência e na presença de XA em duas concentrações (0,15 e 1,5 mM) como descrito em métodos. A hemólise foi estimada pela coloração vermelha, monitorada como absorbância a 400 nm, no sobrenadante do meio de incubação centrifugado, que reflete a hemoglobina liberada pela lise das hemácias. A adição de XA 0,15 mM foi capaz de promover uma substancial proteção às hemácias, enquanto que a presença de XA 1,5 mM promoveu uma proteção total, inativando completamente a atividade hemolítica do heme nas condições do ensaio.

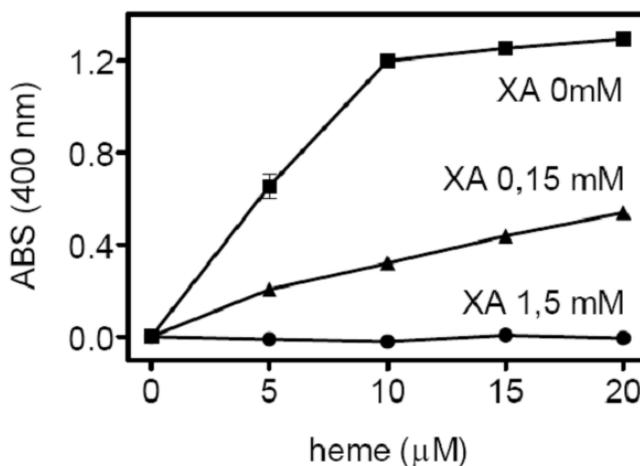


Figura 4.10 – Atividade anti-hemolítica do XA na hemólise induzida por heme. A incubação de hemácias com heme resulta numa hemólise dose-dependente. Esta atividade hemolítica do heme é atenuada na presença de XA 0,15 mM e totalmente revertida na presença de XA 1,5 mM

5 - DISCUSSÃO

5.1 – XA, um metabólito presente em grandes concentrações no intestino do *Aedes aegypti*.

Os dados de tempo de eluição na cromatografia de fase-reversa e espectro de absorção de luz (**Figura 4.1.1**); determinação de peso e padrão de quebra obtidos por espectrometria de massa (**Figura 4.1.2**) não deixam dúvida quanto à identidade do XA. As curvas-padrão apresentam um r^2 próximo a 1 (**Figura 4.2.1**). Na cinética ao longo da digestão cada ponto representa a dosagem de XA em um único mosquito, o que torna bastante confiável o dado de que o XA alcança realmente 15 nmols, que corresponde a uma concentração de 5-7,5 mM, (caso admitamos 2 ou 3 μL como volume do intestino do mosquito) durante o pico de atividade digestiva (**Figura 4.2.2**).

Os valores acima foram estimados como volume de sangue ingerido. Mas alguns fenômenos que ocorrem logo após o repasto indicam que este volume de diluição pode ser ainda menor. Um deles é a diurese, que acarreta numa considerável diminuição de volume do bolo alimentar logo após a ingestão de sangue (STOBBART R.H. 1977). Além disso temos a compartimentalização: o XA não atravessa com facilidade a membrana dos eritrócitos, ficando restrito ao espaço extra-eritrocítico, concentrando-se em apenas um compartimento.

Esta quantidade de XA no intestino era absolutamente inesperada. As quantidades de XA necessárias para disparar a exflagelação variam de 80 nM (*P. gallinaceum*) a 9 μM (*P. berguei*) (ARAI M e cols. 2001). Vale lembrar também que até agora não há nenhum trabalho implicando o intestino médio como um local de síntese do XA. Tem se postulado que o XA é sintetizado pelas glândulas salivares, secretado com a saliva, e reingerido com

o sangue hospedeiro e desta forma se faz presente no intestino médio (HIRAI M e cols. 2001). O fato do XA estar presente em alta concentração e apresentar um perfil coincidente com perfil de atividade digestiva sugere que esta molécula participa de alguma forma no processo digestivo. Interessantemente, sua síntese é bem sensível à presença de hemácias, caindo para em torno de um terço em mosquitos alimentados somente com plasma (**Figura 4.2.2**). O XA presente no intestino é oriundo de síntese *de novo*, uma vez que é sensível ao inibidor da quinurenina hidroxilase Ro 61-8048 (CHIARUGI A e MORONI F 1999) (**Figura 4.4.1**). O local de síntese do XA é, provavelmente o próprio epitélio intestinal, onde a TDO está presente como foi mostrado no ensaio de RT-PCR (**Figura 4.3.1**). O fato de apenas um dos inibidores testados ter se mostrado efetivo para diminuir a síntese do XA pode se dever a diferentes causas: Em primeiro lugar os inibidores podem sofrer algum tipo de degradação no ambiente intestinal. Em segundo lugar é possível que o inibidor não alcance o microambiente habitado pela enzima. Como a via das quinureninas ocorre no citoplasma, os inibidores precisam acessar este compartimento para apresentarem atividade. Em terceiro lugar nem a quinurenina hidroxilase nem a TDO de *Aedes aegypti* tem ainda determinado seus perfis de sensibilidade a inibidores. É possível que simplesmente a TDO não seja sensível, ao metil-triptofano, uma droga usada freqüentemente para inibir a IDO em vertebrados (KUDO Y, e cols. 2004; MUNN DH e cols. 1998), e que a KMO não seja sensível ao Ro 061-2822.

5.2 -Atividades antioxidantes do XA e ligação ao ferro e ao heme – dependência ao pH.

Durante a digestão da hemoglobina o heme necessariamente tem que ser liberado. Este é um momento perigoso do ponto de vista de formação de ROS. Um provável alvo

para oxidação induzida heme neste momento são os fragmentos de membrana produzidos durante a lise das hemácias. Neste sentido, o modelo de oxidação de fosfatidilcolina induzida por heme e ferro simulam um aspecto do ambiente intestinal. Os resultados mostram que o XA é um potente antioxidante nos dois sistemas testados.

Na oxidação de lipídios induzida por heme uma concentração de 20 μM de XA já é capaz de produzir uma substancial proteção em pH favorável (7,5 -8,0) (**Figura 4.5**). No sistema que utiliza íon ferroso como catalisador, o dano oxidativo foi praticamente eliminado pela presença de XA 200 μM . (**Figura 4.7**). Estas concentrações são muito menores do que as encontradas no intestino.

A dependência ao pH acontece de forma muito parecida tanto nos sistemas de oxidação de lipídeos induzidos por heme e ferro, quanto na ligação do XA ao heme, (avaliada pela variação na mobilidade eletroforética mostrada na **Figura 4.6**.) Estes dados sugerem que a formação de complexos XA:Fe e XA:heme são responsáveis, pelo menos por parte da atividade antioxidante do XA. O pH parece atuar favorecendo a formação da espécie de XA mais ativa na ligação ao heme e ao ferro.

5.3 - Curva de titulação ácido-base do XA e equação de protonação/desprotonação

Devido à falta de dados disponíveis a respeito das constantes de ionização do XA e a acentuada dependência ao pH que as atividades dessa molécula apresentam, foi necessário determinar uma curva de titulação potenciométrica.

O ácido xanturênico apresenta quatro grupamentos potencialmente ativos do ponto de vista ácido-base. A hidroxila quinolínica, assinalada com o número **1** na **Figura 5.3**,

tem potencial para se comportar como um ácido muito fraco desprotonando-se em meio acentuadamente alcalino. O grupamento número 2 apresenta uma hidroxila ligada ao anel aromático do cerne quinolínico portanto com uma característica fenólica e com um caráter mais ácido do que a hidroxila 1. O grupamento número 3 consiste num ácido

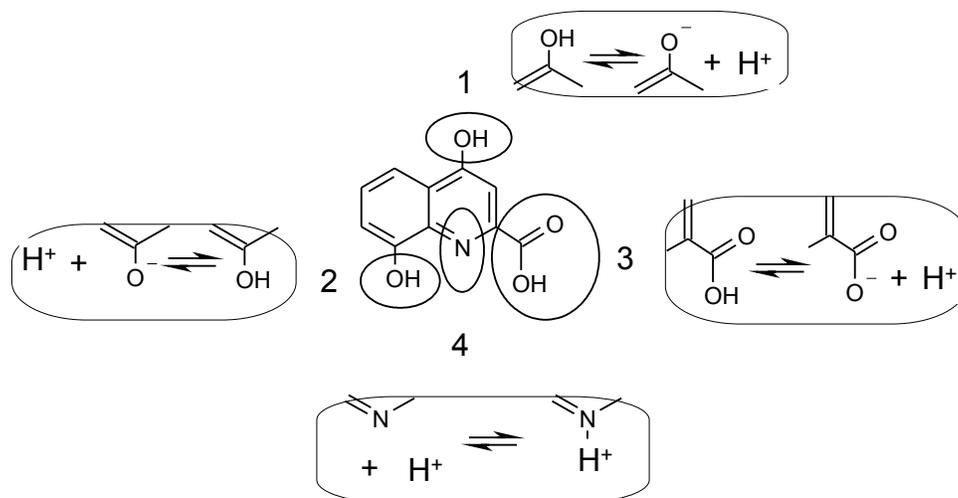


Figura 5.3.1 - Os grupamentos do ácido xanturênico ativos do ponto de vista ácido base estão assinalados com círculos e números de 1 a 4 e suas respectivas equações de protonação e desprotonação estão indicadas nas caixas à volta.

carboxílico, mais ácido ainda do que os dois primeiros grupamentos, do qual podemos esperar um pK em torno de 3,0. E, por fim, o heteroátomo de nitrogênio do cerne quinolínico tem um par de elétrons disponível para formar compostos de coordenação que pode ser protonado. Como esta é a única protonação que confere carga positiva à molécula, nós admitimos que ela é a que ocorre em meio mais ácido, sendo a responsável pela ressolubilização do ácido xanturênico em $\text{pH} < 2$.

Com base nestas premissas propomos o seguinte equação de protonação e desprotonação para o ácido xanturênico:

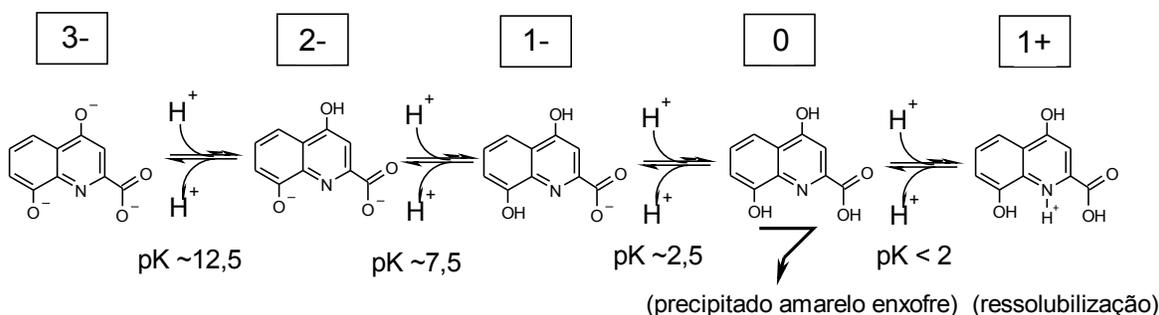


Figura 5.3.2 - Equação de protonação do ácido xanturênico. Os retângulos acima indicam a carga líquida de cada espécie. Os valores aproximados de pK vêm indicados abaixo das setas. As informações entre parênteses indicam o estado de solubilidade da molécula durante a titulação.

Segundo este modelo a hidroxila quinolínica se protona em pH 12,5; seguida da hidroxila fenólica, que se protona com pK em torno de 7,5. O próximo grupamento a de protonar é o carboxilato, produzindo a espécie não-carregada, que se precipita nos valores de pH próximos a 2,5; formando o precipitado amarelo enxofre observado durante a titulação. Uma posterior acidificação pra valores de pH inferiores 2 provoca a protonação do heteroátomo de nitrogênio desta quinolina conferindo carga monopositiva a molécula e a tornando solúvel novamente.

A espécie de XA mais abundante no intestino do mosquito é, portanto, a forma dianiônica, uma vez que o pH intestinal é 7,5-7,6 (BILLKER, O e cols. 2000), interessante esta é a espécie mais ativa na ligação ao heme e ao ferro, que também é mais abundante em pHs favoráveis à exflagelação.

5.4 - Atividade anti-hemolítica do XA

O XA apresenta uma marcante atividade anti-hemolítica num modelo de hemólise induzida por heme, sendo capaz de revertê-la totalmente (**Figura 4.10**). Este resultado é bem interessante porque é possível encontrar hemácias integras até depois de 24 horas de

digestão dentro do intestino do mosquito. (Ver **figura 5.4**) Embora essa seja uma figura ilustrativa, ela está baseada no fato de que estas hemácias podem ser vistas por microscopia e contadas em câmara de Neubauer nos tempos indicados. Durante a digestão as hemácias são lisadas aos poucos, da periferia para o centro, de uma maneira na qual hemoglobina e heme são liberados de uma forma controlada. Este tipo de comportamento não é compatível com uma hemólise induzida por heme que iria levar a uma lise descontrolada que liberaria grande quantidade de hemoglobina na luz intestinal, com potencial para liberar mais heme alimentando uma reação em cadeia muito perigosa do ponto de vista de formação de ROS.

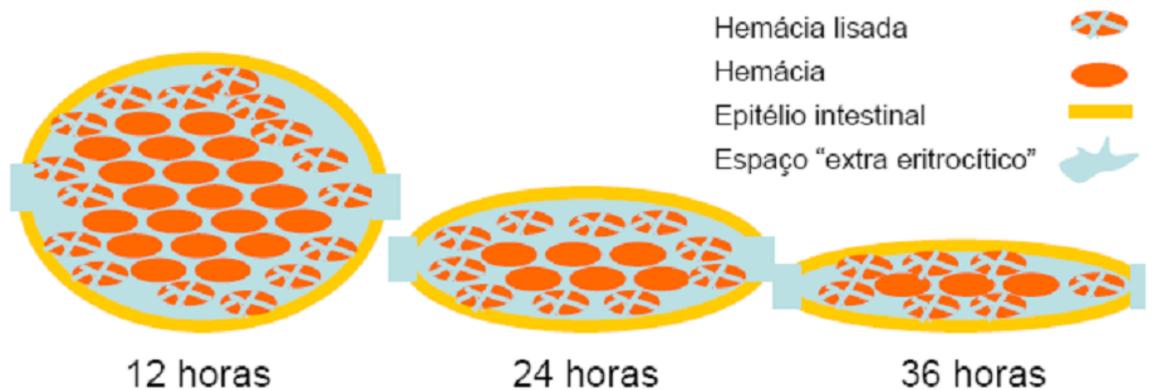


Figura 5.4 – Padrão de quebra das hemácias no intestino do *Aedes* ao longo da digestão do sangue. As hemácias são lisadas na periferia do bolo e estão presentes mesmo em estágios avançados de digestão.

5.4.1 - Compartimentos no intestino do *Aedes* e distribuição do XA.

Quando pensamos no bolo alimentar do intestino do mosquito, temos que ter em mente que o sangue é um alimento heterogêneo, onde podemos fazer uma divisão clara entre dois “grandes” microambientes: 1) o **intra-eritrocítico**, composto pelas hemácias (elemento figurado majoritário do sangue, que se mantém integras por longo tempo após a alimentação) e seu conteúdo; e 2) o **extra-eritrocítico**, composto pelo plasma hospedeiro acrescido das moléculas solúveis secretadas pelo intestino (como as enzimas digestivas e o

próprio XA) e outras, remanescentes da saliva do próprio inseto. Um terceiro componente importante no microcenário intestinal é a **matriz peritrófica**, essa estrutura acumula a 90% do heme ingerido aderido em sua superfície.

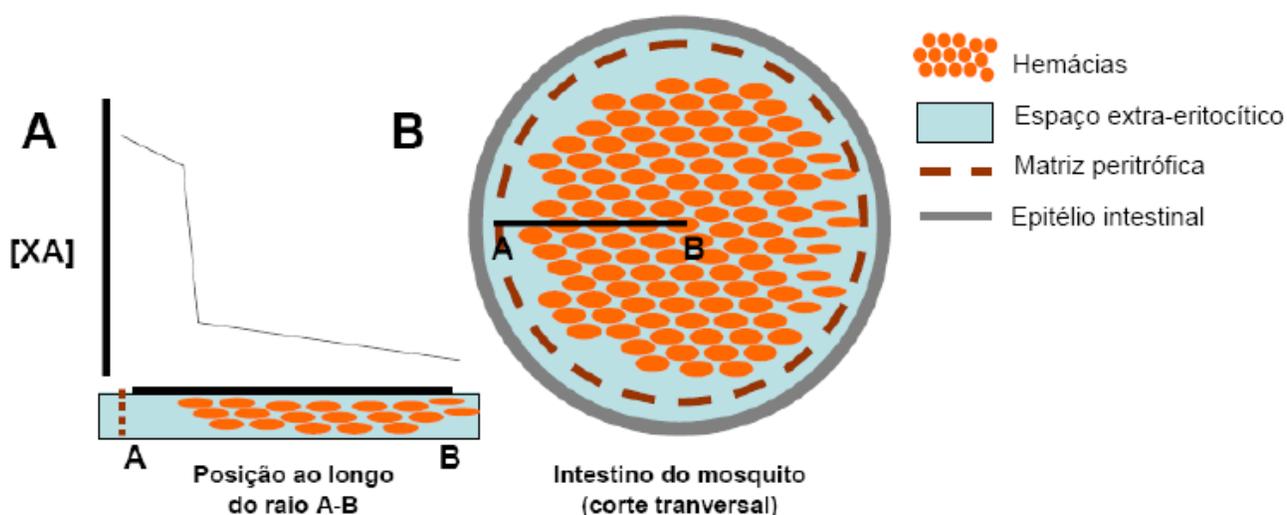


Figura 5.4.1 – Distribuição hipotética do XA num corte transversal de intestino médio.

Num ensaio realizado em nosso laboratório determinamos que as hemácias são impermeáveis ao XA (dado não mostrado). De fato, o XA é uma molécula com carga líquida $-1,5$ em pH $7,5$ e não é de se esperar que ele atravesse membranas biológicas com facilidade. Como o XA está restrito ao compartimento extra-eritrocítico, isso implica que sua concentração real pode ser bem maior que 5 mM. Se o espaço extra-eritrocítico for, por exemplo, metade do volume total do bolo alimentar, isso quer dizer que o XA poderia alcançar valores ente 10 e 15 mM. Além disso, como o XA é secretado pelo epitélio, pode existir um gradiente decrescente na concentração de XA da periferia para o meio do bolo alimentar, uma vez que a alta densidade de hemácias e consistência gelatinosa da fase fluída do bolo alimentar dificultam sua difusão. Se esta compartimentalização realmente

acontecer no intestino do *Aedes* a concentração de XA talvez seja o dobro da estimada para o espaço extra eritrocítico.

5.5 - Perspectivas: interação do XA e seus complexos com outras estruturas no intestino do *Aedes*

5.5.1 Matriz peritrófica e absorção de ferro

No sangue recém ingerido praticamente todo o heme está dentro das hemácias como grupamentos prostéticos da hemoglobina. Ao fim da digestão, em torno de 90% deste heme estará compactado na superfície da matriz peritrófica que será expelida como parte das fezes (PÁSCOA, V e cols. 2002). Existe, portanto, fluxo de heme dos “heme pockets” das moléculas de hemoglobina até a superfície da matriz peritrófica. Num ambiente com XA na faixa milimolar, boa parte do heme irá se apresentar ligado ao XA, na forma do complexo XA:heme. Isso levanta uma pergunta interessante à respeito do fluxo de heme para a matriz peritrófica: A matriz peritrófica recebe o heme na sua forma livre ou na forma XA:heme?

Essa idéia também vale para a absorção do ferro. Uma grande quantidade de ferro é absorvida para sustentar a demanda por ferro ocasionada pelo intenso crescimento ovariano que ocorre concomitantemente à digestão do sangue. Seja absorvido na forma de heme ou de íon ferroso este ferro está disponível majoritariamente na forma de quelato com o XA. Será que os receptores reconhecem preferencialmente qual forma?

Fica então indicada a suspeita de que o XA possa atuar como um sideróforo e/ou hemóforo no intestino do mosquito, tanto no processo de carregamento da matriz peritrófica como na absorção de ferro.

5.5.2 Digestão protéica

A enzima responsável por boa parte da digestão de proteínas é a tripsina tardia (NORIEGA FG e WELLS MA 1999). Esta enzima tem pico de atividade, em sincronia com o XA, a 24 horas pós-ingesta. Devido a suas propriedades de anfifilia conjugada a presença de vários grupamentos capazes de formar pontes de hidrogênio o XA pode interferir na estrutura terciária de proteínas. (MALINA HZ. 1999), este tipo de atividade desenoveladora pode ter grande importância no processo de proteólise.

5.5.3 Microbiota Intestinal.

No intestino do mosquito existe uma biota cujas funções e importância ainda não está bem entendida, mas vem ganhando crescente atenção (TURNBAUGH PJ e cols. 2006; XU J e cols. 2007)). A microbiota interage com o sistema digestivo e os patógenos que passam pelo intestino (AZAMBUJA P e cols. 2005). Um mecanismo de controle do crescimento bacteriano em drosophila foi proposto recentemente (HA EM, e cols. 2005). Por este mecanismo uma enzima produtora de radical superóxido é utilizada para controlar o crescimento bacteriano.

Se nos lembramos que o ferro pode ser um fator limitante para o crescimento bacteriano e que a abundância de triptofano pode determinar a velocidade de síntese protéica vamos ter um quadro bem interessante: A via das quinureninas oxida grandes quantidades de triptofano atuando como um freio em todo crescimento celular dentro do seu raio de ação. Além disso, essa mesma via devolve ao intestino a mesma quantidade em XA, um quelante de ferro e heme, que diminui a níveis extremamente baixos os níveis de ferro e heme livres.

Não é sabido se os complexos de XA com heme e ferro são metabolizados por bactérias ou não.

5.5.4 - Estado agregacional do XA

O XA é uma molécula plana, anfifílica, com quatro grupamentos capazes de formar pontes de hidrogênio. Estas características conferem ao XA o perfil de um ligante em potencial. De fato, o XA em forma compostos de coordenação com vários metais de transição como zinco, cálcio e ferro. Além disso, essas mesmas características moleculares do XA lhe conferem a capacidade de formar uma variedade de oligômeros que se tornam maiores e mais complexos conforme aumenta sua concentração. Alguns desses oligômeros foram identificados por nós através de espectroscopia de NMR na presença e na ausência de zinco, em diferentes concentrações XA (dado não mostrado). Existem ainda referências antigas na literatura chamando a atenção para o fato de que quinolinas podem formar longos polímeros não-covalentes helicoidais a partir de determinadas concentrações (GELLERT M e cols. 1962). Juntos, esses dados permitem especular que:

- 1) O XA esteja oligomerizado em alguma extensão. Quanto maior a concentração, maiores os oligômeros formados.
- 2) O estado de oligomrização vai interferir no tipo de atividade do XA; alterando, por exemplo, seu coeficiente de difusão podendo mesmo a chegar a determinar as propriedades físicas do bolo alimentar, caso os polímeros sejam suficientemente grandes para gelificarem o plasma.

7 - CONCLUSÕES

- Embora fosse ignorado até hoje, o XA está presente em grandes quantidades no intestino médio do *Aedes* durante a digestão do sangue. Sua síntese é realizada no epitélio intestinal após a ingestão do sangue. Sua concentração alcança valores em torno de 7 mM, o que coloca o XA entre as moléculas mais abundantes no intestino, do ponto de vista de concentração molar.
- O XA é capaz de se ligar ao ferro e ao heme, minimizando a formação de ROS catalisadas pelo ferro. As atividades pró-oxidantes do ferro e do heme são atenuadas na presença de XA. A ligação do XA ao heme e ao ferro, bem como seu potencial como anti-oxidante são favorecidas quando o pH aumenta de 7,0 para 8,0. (perfil de dependência ao pH que lembra o da própria exflagelação). Estes dados associados ao da curva de titulação potenciométrica, que revelou um pK em 7,5 sugerem que a forma ativa do XA (nos sistemas testados neste trabalho) é a forma dianiônica, que se liga ao ferro e ao heme, formando complexos inativos na formação de ROS e na lise de hemácias. De modo que o XA vem a ser o primeiro quelante de heme de baixo peso molecular descrito.
- Estes dados juntos delineam um novo cenário no intestino do mosquito e sugerem que deva ser investigado como o XA pode interagir com outras estruturas do intestino médio, como por exemplo a matriz peritrófica, que acumula a maior parte do heme ingerido; com o sistema de absorção de ferro, que transporta grande quantidade deste metal, indispensável para os ovários em crescimento; com as proteases intestinais e seus substratos (hemoglobina e albumina) e com a microbiota intestinal.

6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAI M, BILLKER O, MORRIS HR, PANICO M, DELCROIX M, DIXON D, LEY SV, SINDEN RE Both mosquito-derived xanthurenic acid and a host blood-derived factor regulate gametogenesis of Plasmodium in the midgut of the mosquito. *Mol Biochem Parasitol.* Aug;116(1):17-24. 2001
- AZAMBUJA P, GARCIA ES, RATCLIFFE NA. Gut microbiota and parasite transmission by insect vectors. *Trends Parasitol.* 2005 Dec;21(12):568-72. Epub 2005 Oct 13.
- BARTHOLOMAY,L.C., CHO,W.-L., ROCHELEAU,T.A., BOYLE,J.P., BECK,E.T., FUCHS,J.F., LISS,P., RUSCH,M., BUTLER,K.M., WU,R.C.-C., LIN,S.-P., KUO,H.-Y., TSAO,I.-Y., HUANG,C.-Y., LIU,T.-T., HSIAO,K.-J., TSAI,S.-F., YANG,U.-C., NAPPI,A.J., PERNA,N.T., CHEN,C.-C. e CHRISTENSEN,B.M. Description of the Transcriptomes of Immune Response-Activated Hemocytes from the Mosquito Vectors *Aedes aegypti* and *Armigeres subalbatus*. *Infect. Immun.* 72 (7), 4114-4126 (2004)
- BILLKER O, MILLER AJ, SINDEN RE. Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ion-selective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis. *Parasitology.* Jun;120 (Pt 6):547-51. 2000
- BILLKER O, SHAW MK, MARGOS G, SINDEN RE. The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of Plasmodium berghei *in vitro*. *Parasitology.* Jul;115 (Pt 1):1-7. 1997
- BILLKER, O.; LINDO, V.; PANICO, M.; ETIENNE A. E.; PAXTON T. ; DELL A.; ROGERS M.; SINDEN R. E.; MORRIS H.R. Identification of xanthurenic acid as the putative inducer of malaria development in the mosquito *Nature* v. 392 p. 289 1998
- BILLKER, O.; MILLER, A. J.; SINDEN R. E. Determination of mosquito bloodmeal pH in situ by ion-selective microelectrode measurement: implications for the regulation of malarial gametogenesis *Parasitology* v. 120 p. 547-551. 2000
- CHIARUGI A, e MORONI F Quinolinic acid formation in immune-activated mice: studies with (m-nitrobenzoyl)-alanine (mNBA) and 3,4-dimethoxy-[-N-4-(3-nitrophenyl)thiazol-2yl]-benzenesul fonamide (Ro 61-8048), two potent and selective inhibitors of kynurenine hydroxylase. *Neuropharmacology.* Aug;38(8):1225-33 1999

- CHRISTEN S, PETERHANS E, STOCKER R. Antioxidant activities of some tryptophan metabolites: possible implication for inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v. (7) p. 2506-10. 1990
- DANSA-PETRETSKI M, RIBEIRO JM, ATELLA GC, MASUDA H, OLIVEIRA PL. Antioxidant role of *Rhodnius prolixus* heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *J Biol Chem*. 1995 v.270 n.(18) p.10893-6.
- DEVENPORT, M.; ALVARENGA, P.H.; SHAO, L.; FUJIOKA, H.; BIANCONI, M.L.; OLIVEIRA, P.L.; JACOBS-LORENA, M. Identification of the *Aedes aegypti* peritrophic matrix protein AeIMUCI as a heme-binding protein. *Biochemistry*. 45(31) p. 9540-9. 2006
- du DHARDEMARE AM, SERRATRICE G, PIERRE JL. Synthesis and iron-binding properties of quinolobactin, a siderophore from a pyoverdine-deficient *Pseudomonas fluorescens*. *Biometals*. Dec;17(6):691-7. 2004
- FERRÉ J, REAL MD, MÉNSUA JL, JACOBSON KB. Xanthurenic acid 8-O-beta-D-glucoside, a novel tryptophan metabolite in eye-color mutants of *Drosophila melanogaster*. *J Biol Chem*. Jun 25;260(12):7509-14. 1985
- GARCIA GE, WIRTZ RA, BARR JR, Woolfitt A, Rosenberg R. Xanthurenic acid induces gametogenesis in *Plasmodium*, the malaria parasite. *J Biol Chem* v. 273 n. (20) p.12003-5. 1998
- GELLERT M, LIPSETT MN, DAVIES DR. Helix formation by guanylic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. Dec 15;48:2013-8 1962
- GRAÇA-SOUZA, A.V.; MAYA-MONTEIRO C.; PAIVA-SILVA, G. O.; BRAZ, G.R.C.; PAES, M.C; SORGINE M.H.F.; OLIVEIRA, M.F; OLIVEIRA P. L. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods *Insect Biochemistry and Molecular Biology* v. 36 p. 322–335 2006
- GRANT RS, NAIF H, THURUTHYIL SJ, NASR N, LITTLEJOHN T, TAKIKAWA O, KAPOOR V. Induction of indolamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by human immunodeficiency virus type 1 is strain dependent. *J Virol*. May;74(9):4110-5. 2000a
- GRANT RS, NAIF H, THURUTHYIL SJ, NASR N, LITTLEJOHN T, TAKIKAWA O, KAPOOR V. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by HIV-1. *Redox Rep.*;5(2-3):105-7. 2000b
- GUPTA SL, CARLIN JM, PYATI P, DAI W, PFEFFERKORN ER, MURPHY MJ Jr. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect Immun*. Jun;62(6):2277-84. 1994

- GUTTERIDGE JM, SMITH A. Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem J.* Dec 15;256(3):861-5. 1988
- HA EM, OH CT, BAE YS, LEE WJ. A direct role for dual oxidase in *Drosophila* gut immunity. *Science.* Nov 4;310(5749):847-50. 2005
- HAN Q, CALVO E, MARINOTTI O, FANG J, RIZZI M, JAMES AA, LI J. Analysis of the wild-type and mutant genes encoding the enzyme kynurenine monooxygenase of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol.* v.(5) n. 12 p. 483-90. 2003
- HAYAISHI O. An odyssey with oxygen. *Biochem Biophys Res Commun.* v. 338 n. (1) p. 2-6 2005
- HAYAISHI O. Properties and function of indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biochem (Tokyo).* Apr;79(4):13P-21P. 1976
- HAYAISHI O. Indoleamine 2,3-dioxygenase--with special reference to the mechanism of interferon action. *Biken J.* Jun;28(1-2):39-49. 1985
- HILMAS C, PEREIRA EF, ALKONDON M, RASSOULPOUR A, SCHWARCZ R, ALBUQUERQUE EX. The brain metabolite kynurenic acid inhibits alpha7 nicotinic receptor activity and increases non-alpha7 nicotinic receptor expression: physiopathological implications. *J Neurosci.* Oct 1;21(19):7463-73. 2001
- HIRAI M, WANG J, YOSHIDA S, ISHII A, MATSUOKA H. Characterization and identification of exflagellation-inducing factor in the salivary gland of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae). *Biochem Biophys Res Commun.* Oct 5;287(4): 859-64. 2001
- HIRATA F, HAYAISHI O. Possible participation of superoxide anion in the intestinal tryptophan 2,3-dioxygenase reaction. *J Biol Chem.* Dec 25;246(24): 7825-6. 1971
- HIRATA F, HAYAISHI O. Studies on indoleamine 2,3-dioxygenase. I. Superoxide anion as substrate. *J Biol Chem.* Aug 10;250(15):5960-6. 1975
- HIRATA F, OHNISHI T, HAYAISHI O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Characterization and properties of enzyme. O₂- complex. *J Biol Chem.* Jul 10;252(13):4637-42. 1977
- HOOD BD, GARNER B, TRUSCOTT RJ. Human lens coloration and aging. Evidence for crystallin modification by the major ultraviolet filter, 3-hydroxy-kynurenine O-beta-D-glucoside. *J Biol Chem.* Nov 12;274(46):32547-50. 1999

- JONES DP. Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal*. Sep-Oct;8(9-10): 1865-79. 2006
- KISS C, CERESOLI-BORRONI G, GUIDETTI P, ZIELKE CL, ZIELKE HR, SCHWARCZ R. Kynurenate production by cultured human astrocytes. *J Neural Transm*. Jan;110(1):1-14. 2003
- KNOX WE, MEHLER AH. The adaptive increase of the tryptophan peroxidase-oxidase system of liver. *Science*. Mar 2;113(2931):237-8 1951
- KOBAYASHI K, HAYASHI K, SONO M. Effects of tryptophan and pH on the kinetics of superoxide radical binding to indoleamine 2,3-dioxygenase studied by pulse radiolysis. *J Biol Chem*. Sep 15;264(26):15280-3. 1989
- KOCKI T, LUCHOWSKI P, LUCHOWSKA E, WIELOSZ M, TURSKI WA, URBANSKA EM. L-cysteine sulphinate, endogenous sulphur-containing amino acid, inhibits rat brain kynurenic acid production via selective interference with kynurenine aminotransferase II. *Neurosci Lett*. Jul 31;346(1-2):97-100. 2003
- KOTAKE, Y., e MASAYAMA, I. The intermediary metabolism of tryptophan. XVIII. The mechanism of formation of kynurenine from tryptophan, *Z. Physiol. Chem*. 243, 237-244. 1936
- KUDO Y, BOYD CA, SARGENT IL, REDMAN CW. Decreased tryptophan catabolism by placental indoleamine 2,3-dioxygenase in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol*. Mar;188(3):719-26. 2003
- KUDO Y, BOYD CA, SARGENT IL, REDMAN CW. Tryptophan degradation by human placental indoleamine 2,3-dioxygenase regulates lymphocyte proliferation. *J Physiol*. Aug 15;535(Pt 1):207-15. 2001
- KUDO Y, BOYD CA, SPYROPOULOU I, REDMAN CW, TAKIKAWA O, KATSUKI T, HARA T, OHAMA K, SARGENT IL. Indoleamine 2,3-dioxygenase: distribution and function in the developing human placenta. *J Reprod Immunol*. Apr;61(2):87-98. 2004
- KUDO Y, BOYD CA. Human placental indoleamine 2,3-dioxygenase: cellular localization and characterization of an enzyme preventing fetal rejection. *Biochim Biophys Acta*. v. 1500 n. (1) p. 119-24. 2000
- LIGHT WR 3rd, OLSON JS. The effects of lipid composition on the rate and extent of heme binding to membranes. *J Biol Chem*. Sep 15;265(26):15632-7. 1990
- LEHANE MJ, *Biology of blood-sucking insects*. The University Press, Cambridge 1991

- M de la MAZA LM, PETERSON EM. Dependence of the *in vitro* antiproliferative activity of recombinant human gamma-interferon on the concentration of tryptophan in culture media. *Cancer Res.* Jan 15;48(2):346-50. 1988
- MACKENZIE CR, LANGEN R, TAKIKAWA O, DÄUBENER W. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase in human macrophages inhibits interferon-gamma-induced bacteriostasis but does not abrogate toxoplasma-stasis. *Eur J Immunol.* Oct; 29(10):3254-61. 1999
- MALINA HZ. Xanthurenic acid provokes formation of unfolded proteins in endoplasmic reticulum of the lens epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* Nov 19;265(2):600-5.1999
- MANTHEY MK, PYNE SG, TRUSCOTT RJ. Involvement of tyrosine residues in the tanning of proteins by 3-hydroxyanthranilic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Mar 1;89(5):1954-7. 1992
- MATTHIJS S, BAYSSE C, KOEDAM N, TEHRANI KA, VERHEYDEN L, BUDZIKIEWICZ H, SCHAFER M, HOORELBEKE B, MEYER JM, DE GREVE H, CORNELIS P. The Pseudomonas siderophore quinolobactin is synthesized from xanthurenic acid, an intermediate of the kynurenine pathway. *Mol Microbiol.* v. 52 n. (2) p. 371-84. 2004
- MAYA-MONTEIRO CM, ALVES LR, PINHAL N, ABDALLA DS, OLIVEIRA PL. HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, Boophilus microplus. *J Biol Chem.* v. 275 n. (47) p. 36584-9 2000
- MAYA-MONTEIRO CM, ALVES LR, PINHAL N, ABDALLA DS, OLIVEIRA PL. HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochem Mol Biol.* Jan;34(1):81-8. 2004
- MERCK INDEX
- MOSSIALOS D, MEYER JM, BUDZIKIEWICZ H, WOLFF U, KOEDAM N, BAYSSE C, ANJALIAH V, CORNELIS P. Quinolobactin, a new siderophore of Pseudomonas fluorescens ATCC 17400, the production of which is repressed by the cognate pyoverdine. *Appl Environ Microbiol.* Feb;66(2):487-92. 2000
- MUNN DH, ZHOU M, ATTWOOD JT, BONDAREV I, CONWAY SJ, MARSHALL B, BROWN C, MELLOR AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* Aug 21;281(5380):1191-3. 1998
- NIJHOUT MM. Plasmodium gallinaceum: exflagellation stimulated by a mosquito factor *Exp Parasitol.* Aug;48(1):75-80.. 1979

- NORIEGA FG, WELLS MA. A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol.* Jul;45(7):613-620. 1999
- OHNISHI T, HIRATA F, HAYAISH O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Potassium superoxide as substrate. *J Biol Chem.* Jul 10;252(13):4643-7. 1977
- OKECH B, ARAI M, MATSUOKA H. The effects of blood feeding and exogenous supply of tryptophan on the quantities of xanthurenic acid in the salivary glands of *Anopheles stephensi* (Diptera:Culicidae). *Biochem Biophys Res Commun.* Mar 24;341(4):1113-8. Epub 2006 Jan 26. 2006
- OLIVEIRA MF, KYCIA SW, GOMEZ A, KOSAR AJ, BOHLE DS, HEMPELMANN E, MENEZES D, VANNIER-SANTOS MA, OLIVEIRA PL, FERREIRA ST. Structural and morphological characterization of hemozoin produced by *Schistosoma mansoni* and *Rhodnius prolixus*. *FEBS Lett.* v.579 n. (27) p. 6010-6. 2005
- OLIVEIRA MF, SILVA JR, DANSA-PETRETSKI M, DE SOUZA W, LINS U, BRAGA CM, MASUDA H, OLIVEIRA PL. Haem detoxification by an insect. *Nature.* Aug 5;400(6744):517-8. 1999
- OLIVEIRA PL, KAWOoya JK, RIBEIRO JM, MEYER T, POORMAN R, ALVES EW, WALKER FA, MACHADO EA, NUSSENZVEIG RH, PADOVAN GJ E MASUDA H. A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization. *J Biol Chem.* May 5;270(18):10897-901. 1995
- OLIVEIRA, M.F.; SILVA, J.R.; DANSA-PETRETSKI, M.; DE SOUZA, W.; BRAGA, C.M.; MASUDA, H.; OLIVEIRA, P.L. Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *FEBS Lett.* v.(1-2) n. 477 p. 95-8 2000
- OZAKI Y, EDELSTEIN MP, DUCH DS. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb;85(4):1242-6. 1988
- PÁSCOA, V.; OLIVEIRA P.L ; DANSA-PETRETSKI, M.; SILVA J. R; ALVARENGA P.H.; JACOBS-LORENA M ; LEMOS F. J. A . *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion *Insect Biochemistry and Molecular Biology* v. 32 p. 517–523 2002
- PEREIRA LO, OLIVEIRA PL, ALMEIDA IC, PAIVA-SILVA GO. Biglutaminyl-biliverdin IX alpha as a heme degradation product in the dengue fever insect-vector *Aedes aegypti*. *Biochemistry.* Jun 12;46(23):6822-9. Epub 2007 May 18. 2007

- PUC CETTI P. On watching the watchers: IDO and type I/II IFN. *Eur J Immunol.* Apr;37(4):876-9. 2007
- REJDAK R, KOHLER K, KOCKI T, SHENK Y, TURSKI WA, OKUNO E, LEHACI C, ZAGORSKI Z, ZRENNER E, SCHUETTAUF F. Age-dependent decrease of retinal kynurenate and kynurenine aminotransferases in DBA/2J mice, a model of ocular hypertension. *Vision Res.* Mar;44(7):655-60. 2004
- REN S, CORREIA MA. Heme: a regulator of rat hepatic tryptophan 2,3-dioxygenase? *Arch Biochem Biophys.* May 1;377(1):195-203. 2000
- REN S, LIU H, LICAD E, CORREIA MA. Expression of rat liver tryptophan 2,3-dioxygenase in *Escherichia coli*: structural and functional characterization of the purified enzyme. *Arch Biochem Biophys.* Sep 1;333(1):96-102. 1996
- RIBEIRO JM. Blood-feeding arthropods: live syringes or invertebrate pharmacologists? *Infect Agents Dis.* Sep;4(3):143-52. 1995
- ROSE MY, THOMPSON RA, LIGHT WR, OLSON JS Heme transfer between phospholipid membranes and uptake by apohemoglobin. *J Biol Chem.* Jun 10;260(11):6632-40. 1985
- SAMBROOK, J. e RUSSEL, W.R. Molecular cloning, a laboratory manual 3rd edition. *Cold Spring Harbor Laboratory Press.* Cold Spring Harbor, New York 2001
- SHIMIZU T, NOMIYAMA S, HIRATA F, HAYAISHI O. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem.* Jul 10;253(13):4700-6. 1978
- SHIRAO E, ANDO K, INOUE A, SHIRAO Y, BALASUBRAMANIAN D. Identification of a novel fluorophore, xanthurenic acid 8- O -beta-D-glucoside in human brunescant cataract. *Exp Eye Res.* Oct;73(4):421-31. 2001
- SONO M. The roles of superoxide anion and methylene blue in the reductive activation of indoleamine 2,3-dioxygenase by ascorbic acid or by xanthine oxidase-hypoxanthine. *J Biol Chem.* Jan 25;264(3):1616-22 1989
- STOB BART RH. The control of the diuresis following a blood meal in females of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (L). *J Exp Biol.* Aug;69:53-85. 1977
- STONE TW, Neuropharmacology of quinolinic and kynurenic acids. *Pharmacol Rev.* 1993 Sep;45(3):309-79. 1993
- SUGIMOTO, H.; ODA, S.; OTSUKI, T.; HINO, T.; YOSHIDA, T.; SHIRO, Y. Crystal structure of human indoleamine 2,3-dioxygenase- catalytic mechanism of

O₂ incorporation by a heme-containing dioxygenase. *PNAS* v.103 n. 8 p. 2611–2616 2006

- SUH HS, ZHAO ML, RIVIECCIO M, CHOI S, CONNOLLY E, ZHAO Y, TAKIKAWA O, BROSANAN CF, LEE SC. Astrocyte Indoleamine 2,3-Dioxygenase Is Induced by the TLR3 Ligand Poly(I:C): Mechanism of Induction and Role in Antiviral Response. *J Virol.* Sep;81(18):9838-50. Epub 2007 Jul 11. 2007
- SUN Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase--a new antioxidant enzyme. *Mater Med Pol.* Jul-Sep;21(3):244-50. 1989
- SUZUKI T e TAKAGI T. A myoglobin evolved from indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Mol Biol.* Nov 20;228(2):698-700. 1992
- SUZUKI T, TAKAGI T. A myoglobin evolved from indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Mol Biol.* Nov 20;228(2):698-700. 1992
- SUZUKI T, YUASA H, IMAI K. Convergent evolution. The gene structure of Sulculus 41 kDa myoglobin is homologous with that of human indoleamine dioxygenase. *Biochim Biophys Acta.* Jul 31;1308(1):41-8. 1996
- SUZUKI T, YUASA H, IMAI K. Convergent evolution. The gene structure of Sulculus 41 kDa myoglobin is homologous with that of human indoleamine dioxygenase. *Biochim Biophys Acta.* Jul 31;1308(1):41-8. 1996
- TAPPEL, A.L., Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. *J. Biol. Chem.* 217, 721–733. 1955
- TANIGUCHI T, HIRATA F, HAYAISHI O. Intracellular utilization of superoxide anion by indoleamine 2,3-dioxygenase of rabbit enterocytes. *J Biol Chem.* Apr 25;252(8):2774-6. 1977
- TANIGUCHI T, SONO M, HIRATA F, HAYAISHI O, TAMURA M, HAYASHI K, IIZUKA T, ISHIMURA Y. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Kinetic studies on the binding of superoxide anion and molecular oxygen to enzyme. *J Biol Chem.* May 10;254(9):3288-94. 1979
- TAYLOR MW, FENG GS. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.*v. (11) p. 2516-22. 1991
- TERNESS P, CHUANG JJ, OPELZ G. The immunoregulatory role of IDO-producing human dendritic cells revisited. *Trends Immunol.* 2006 Feb;27(2):68-73. Epub Jan 10. 2006

- THOMAS SR, STOCKER R. Redox reactions related to indoleamine 2,3-dioxygenase and tryptophan metabolism along the kynurenine pathway. *Redox Rep.*;4(5):199-220 1999
- TURNBAUGH PJ, LEY RE, MAHOWALD MA, MAGRINI V, MARDIS ER, GORDON JI. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature*. Dec 21;444(7122):1027-31 2006
- UYTENHOVE C, PILOTTE L, THÄATE I, STROOBANT V, COLAU D, PARMENTIER N, BOON T, VAN DEN EYNDE BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med*. Oct;9(10):1269-74. Epub 2003 Sep 21. 2003
- von BUBNOFF D, HANAU D, WENZEL J, TAKIKAWA O, HALL B, KOCH S, BIEBER T. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing antigen-presenting cells and peripheral T-cell tolerance: another piece to the atopic puzzle? *J Allergy Clin Immunol*. Nov;112(5):854-60. 2003
- WIRLEITNER B, NEURAUTER G, SCHROCKSNADEL K, FRICK B, FUCHS D. Interferon-gamma-induced conversion of tryptophan: immunologic and neuropsychiatric aspects. *Curr Med Chem*. n. 10 v(16) p.1581-91 2003
- XU J, MAHOWALD MA, LEY RE, LOZUPONE CA, HAMADY M, MARTENS EC, HENRISSAT B, COUTINHO PM, MINX P, LATREILLE P, CORDUM H, VAN BRUNT A, KIM K, FULTON RS, FULTON LA, CLIFTON SW, WILSON RK, KNIGHT RD, GORDON JI. Evolution of Symbiotic Bacteria in the Distal Human Intestine. *PLoS Biol*. Jun 19;5(7): 2007
- YAMAMOTO S, e HAYAISHI O. Tryptophan pyrrolase of rabbit intestine. D- and L-tryptophan-cleaving enzyme or enzymes. *J Biol Chem*. Nov 25;242(22):5260-6. 1967
- YAMAZAKI, F.; KUROIWA, T.; TAKIKAWA, O.; KIDO, R. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochem. J*. v. 230 p. 635-638 1985
- ZHANG, Y.; SEONG. S.; KANG, S. A.; MUKHERJEE, T.; BALE, S.; CRANE, B. R.; BEGLEY, T.P.; EALICK S. E. Crystal Structure and Mechanism of Tryptophan 2,3-Dioxygenase, a Heme Enzyme Involved in Tryptophan Catabolism and in Quinolate Biosynthesis. *Biochemistry* v. 46 , p. 145-155 2007

Livros Grátis

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

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

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

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

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