



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE BIOQUÍMICA MÉDICA

A estanho protoporfirina-IX inibe as
principais vias de detoxificação de heme no
intestino médio de *Rhodnius prolixus*

Carlo Donato Caiaffa de Carvalho

Rio de Janeiro

2008

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

LOMBADA

A estanho protoporfirina-IX
inibe as principais vias de detoxificação de heme
no intestino médio de *Rhodnius prolixus*

UFRJ

V.I

Carlo Donato Caiaffa de Carvalho

A estanho protoporfirina-IX inibe as principais vias de detoxificação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*

Dissertação 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 Química Biológica.

Orientador: Pedro Lagerblad de Oliveira

Rio de Janeiro

2008

FICHA CATALOGRÁFICA

CAIAFFA, CARLO DONATO

A estanho protoporfirina-IX inibe as principais vias de detoxificação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus* /

Carlo Donato Caiaffa de Carvalho

Rio de Janeiro, 2008.

xiv, 96 f. : il

Dissertação (Doutorado em Química Biológica) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Bioquímica Médica, 2008.

Orientador: Pedro Lagerblad de Oliveira

1. Biliverdina.

2. Hemozoína.

3. *Rhodnius prolixus* - Teses.

I. Oliveira, Pedro Lagerblad.

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

III. A estanho protoporfirina-IX inibe as principais vias de detoxificação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Carlo Donato Caiaffa de Carvalho

A estanho protoporfirina-IX inibe as principais vias de detoxificação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*

Rio de Janeiro, 16 de julho de 2008.

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

(Mário Alberto Cardoso da Silva Neto, Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica Centro de Ciências da Saúde (CCS)- Universidade Federal do Rio de Janeiro).

(Marcelo Bozza, Pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz - Fundação Oswaldo Cruz).

(Glória Braz, Professora Adjunta do Departamento de Bioquímica Médica, Universidade Estadual do Rio de Janeiro).

(Kátia Calp Gondim, Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica - Centro de Ciências da Saúde (CCS) - Universidade Federal do Rio de Janeiro).

(Flavio Alves Lara, Professor Adjunto do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Centro de Ciências da Saúde (CCS) – Universidade Federal do Rio de Janeiro).

ÍNDICE

	Páginas
ABREVIATURAS	X
LISTA DE FIGURAS	XI
RESUMO	XIII
ABSTRACT	XIV
1) INTRODUÇÃO	
1.1) O triatomíneo <i>Rhodnius prolixus</i>	1
1.2) Evolução da Hematofagia	4
1.3) Toxicidade do Heme	6
1.4) Adaptações do <i>Rhodnius prolixus</i> a hematofagia	9
1.5) Cristalização de heme no intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i>	14
1.6) Arsenal de enzimas antioxidantes no genoma de <i>Rhodnius prolixus</i>	17
1.7) <i>Rhodnius</i> heme binding protein	19
1.8) A via de produção de biliverdina em <i>Rhodnius prolixus</i>	21
2) OBJETIVOS	
3) MATERIAIS E MÉTODOS	
3.1) Seleção das fêmeas adultas de <i>Rhodnius prolixus</i>	28
3.2) Alimentação artificial	28
3.2.1) Preparação de hemoglobina	28
3.2.2) Preparação de globina	28
3.2.3) Preparação de metalo-globinas	29
3.2.4) Dietas modificadas experimentalmente	33
3.3) Efeitos das dietas modificadas experimentalmente na oviposição	33
3.4) Dissecção de <i>Rhodnius prolixus</i>	34

3.5) Detecção de heme, biliverdina e intermediários da via de clivagem por HPLC	34
3.6) Caracterização da formação de hemozoína <i>in vivo</i>	37
3.7) Caracterização da formação de hemozoína <i>in vitro</i>	37
3.8) Avaliação de dano oxidativo aos tecidos do trato digestivo	38
3.9) Medida da ligação de heme em proteínas da hemolinfa.	38

4) RESULTADOS

4.1) Identificação da via de degradação de heme no intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i>	39
4.2) Comportamento da via de degradação de heme em resposta a SnPP-IX no intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i>	46
4.3) Interação entre as principais vias de detoxificação de heme no intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i>	55

5) DISCUSSÃO

6) REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abreviaturas

DMSO – dimetilsulfóxido

Hb – Hemoglobina

HRPs – proteínas ricas em histidina

Hz – Hemozoína

PMVM – membranas perimicrovilares

nm – nanômetros

OH^\bullet – radical hidroxil

PBS – tampão fosfato em solução salina

R^\bullet – radical alquil

RHBP – *Rhodnius* Heme Binding Protein

RO^\bullet – radical alcóxil

ROO^\bullet – radical peróxil

ROOH – hidroperóxido orgânico

ROS – espécies reativas de oxigênio

SDS – dodecil sulfato de sódio

HPLC – cromatografia líquida de alta performance

Lista de Figuras

	Páginas
Introdução	
Figura 1: O barbeiro <i>Rhodnius prolixus</i> em sua fase adulta, durante os cinco estágios de ninfa e ovo	2
Figura 2: O Heme, representação química da molécula de Ferri-protoporfirina IX.	7
Figura 3: Heme e Ferro promovem peroxidação lipídica através de mecanismos diferentes.	8
Figura 4: Representação esquemática do trato digestivo de <i>Rhodnius prolixus</i> .	10
Figura 5: As principais defesas dos animais hematófagos contra a toxicidade do heme estão concentradas no intestino médio.	13
Figura 6: via de degradação de heme em <i>Rhodnius prolixus</i> .	24
Figura 7: A- Fotografia do coração de <i>Rhodnius prolixus</i> ; B- Fotografia do trato digestivo de <i>Rhodnius prolixus</i> (AG - intestino anterior; PG - intestino posterior); C- Perfil cromatográfico demonstrando a migração cromatográfica, em coluna de fase reversa do tipo C-18, do heme, RpBv, e dos intermediários 1 e 2 da via de degradação de heme; D- Perfil cromatográfico demonstrando a migração cromatográfica, em coluna capilar de fase reversa, do heme, RpBv, e dos intermediários 1, 2, 3 e 4 da via de degradação de heme.	26
Figura 8: Preparo do veículo da SnPP-IX. A estanho-globina.	31
Figura 9: Dessalinização do veículo da SnPP-IX. A estanho globina.	32
Figura 10: Curva padrão de biliverdina IX- α .	36
Figura 11: Perfil cromatográfico típico do epitélio intestinal de um <i>Rhodnius prolixus</i> utilizado como controle.	42
Figura 12: Espectros de absorção de luz do pico do heme e dos picos localizados em 50 e 45 minutos.	43
Figura 13: Espectros de absorção de luz dos picos da RpBv e dos picos localizados em 40,2 e 40,6 minutos.	44
Figura 14: Espectros de absorção de luz dos picos A-E.	45
Figura 15: Efeito da SnPP-IX na via de degradação de heme no intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i> .	48
Figura 16: Efeito da SnPP-IX na via de degradação de heme no intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i> .	49

Figura 17: Efeito da SnPP-IX na via de degradação de heme no intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i> .	50
Figura 18: Sobreposição dos espectros de absorção luminosa dos Intermediários da via de degradação de heme, após alimentação com SnPP-IX.	51
Figura 19: Efeito da Sn-PP IX na formação de RpBV no intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i> .	52
Figura 20: Efeito da Sn-PP IX nos intermediários anteriores a atividade da heme-oxigenase presentes no epitélio do intestino médio de <i>Rhodnius prolixus</i> .	53
Figura 21: Comportamento dos picos A e B, nos animais alimentados com SnPP-IX.	54
Figura 22: Aumento da concentração de SnPP-IX na luz intestinal e inibição da polimerização de heme pela SnPP-IX in vivo.	57
Figura 23: Inibição da cristalização de heme in vitro pela SnPP-IX na presença de membranas perimicrovilares (PMVM) de <i>Rhodnius prolixus</i> .	58
Figura 24: Efeito da cloroquina sobre a via de degradação de heme.	59
Figura 25: Efeito da cloroquina sobre a produção de RpBv.	60
Figura 26: Dano oxidativo no epitélio intestinal de <i>Rhodnius prolixus</i> sob o efeito da SnPP-IX.	63
Figura 27: Titulação de heme-proteínas da hemolinfa de <i>Rhodnius prolixus</i> alimentados com SnPP-IX.	64
Figura 28: Efeito da SnPP-IX na oviposição de <i>Rhodnius prolixus</i> .	65

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao professor Pedro pela oportunidade de trabalhar no seu laboratório, por todo o incentivo durante o desenvolvimento deste projeto e pelo suporte financeiro que permitiu o desfecho desta tese.

Gostaria de agradecer a professora Gabriela, pelas excelentes idéias e discussões durante o desenvolvimento deste trabalho.

Gostaria de agradecer a aluna de doutorado Renata Stiebler, por ser uma excelente companheira de trabalho e por me ajudar e facilitar os experimentos de síntese de hemozoína *in vitro*.

Gostaria de agradecer ao professor Marcus, pela colaboração neste projeto.

A todos os membros da banca de defesa desta tese, Flávio, Glória, Kátia, Marcelo e Mário, manifesto aqui meus agradecimentos sinceros, pelo aceite do convite em participar desta etapa muito importante do meu desenvolvimento profissional.

Agradeço também aos professores Ednildo e Masuda, que apesar de não participarem diretamente deste trabalho, contribuíram bastante durante a discussão dos resultados, com boas idéias e sugestões.

Gostaria de agradecer as professoras Mônica e Georgia, por participarem da minha comissão de acompanhamento e me ajudarem com excelentes idéias e forte motivação no início do desenvolvimento deste projeto.

Gostaria de agradecer a Juliette por revisar o inglês do paper e por me dar apoio e suporte nos momentos mais difíceis desta tese.

Agradeço também a Christine, uma boa amiga que discutiu muitas vezes os resultados desta tese, uma de suas especialidades, e sua quase inseparável companheira Fabi, que participou com um sorriso cordial ou uma bala juquinha ou um pedacinho de chocolate.

Aos companheiros do grupo de pesquisa do professor Orlando, Cynthia, Vivian, Aline, Alex, Sylvia, Wellington, Carla e Ricardo, agradeço a convivência agradável e a troca de idéias durante as reuniões para discussão de resultados.

Aos companheiros do lab. Pedro, Roberto, Zé, Renata, Clara, Luíza, Martha, Juliana, Liliane, Ellen, Ana Caroline, Kathleen, Tiago, Milane e Rachel agradeço pelo excelente convívio e por compartilharem comigo as dependências comuns do lab, além das reuniões de apresentação de resultados.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos companheiros do lab. Masuda, Heloísa, Horácio, Denise, Lize e Paulinha por todo o apoio e a Angélica e ao David, por toda a ajuda no período em que foram responsáveis pela colônia de barbeiros.

Agradeço também aos companheiros de pós graduação em Química Biológica, de uma forma geral e praticamente sem exceções, todos eles são muito cordiais principalmente no que diz respeito a boas conversas, um excelente futebol além da costumeira troca de reagentes, podendo citar grandes camaradas como Leandro, Adriano, Charles, Renato, Jordano, Fernando, Daniel, Brian, Emerson e Luciano. Devo citar também outros camaradas, que apesar de não jogarem futebol, também apresentam sua contribuição com uma conversa da melhor qualidade, como é o caso do Diucênio e do Marco, Ana Paula, Andrea e Joana.

Ao meu camarada seu João, grande Botafoguense e companheiro de almoço, além das boas conversas, agradeço também pelo seu excelente trabalho organizando a rotina do laboratório.

Agradeço aos amigos da CPG, Tereza, Patrícia e Leandro por todo o apoio na defesa desta tese.

Agradeço a minha família, meu pai, minha mãe e minha irmã, por formar meu caráter e me preparar para a vida com amor e honestidade, este trabalho é dedicado a vocês.

Agradeço também ao professor Paulo Ferreira por me dar a oportunidade de entrar no programa de pós-graduação do IBqM e por me dar a liberdade de escolher meu próprio caminho.

A hematofagia é um hábito alimentar que implica na ingestão de uma grande quantidade de heme. O hemíptero hematófago *Rhodnius prolixus* é adaptado com muitos recursos genéticos para proteger as células contra o dano oxidativo induzido por heme. A primeira barreira contra o ataque de heme livre resulta na polimerização de hemozoína na luz do intestino médio. A segunda adaptação que *Rhodnius prolixus* desenvolveu é a degradação enzimática de heme através de uma via singular que produz dicysteinyl-biliverdina IX gama. Ainda assim, o heme atinge a hemolinfa onde a RHBP, uma proteína de ligação de heme, participa atenuando os efeitos deletérios do heme. Neste trabalho nós mostramos, pela primeira vez, os efeitos *in vivo* de um análogo de heme, Sn-protoporfirina, que inibe a via singular de degradação de heme em *Rhodnius prolixus*. Quando concentrações maiores do análogo de heme estão presentes na luz intestinal é possível observar um efeito paralelo obstruindo a formação de hemozoína. O aumento das concentrações de heme no trato digestivo induz dano oxidativo no epitélio do intestino médio posterior. Os resultados deste trabalho suportam a hipótese de que a degradação de heme no intestino é um mecanismo protetivo contra os efeitos deletérios do heme.

Hematophagy is a feeding habit that implies on the ingestion of huge amounts of heme. The hematophagous hemipteran *Rhodnius prolixus* is adapted with many genetic resources to protect cells against heme induced oxidative damage. The first barrier against free heme attack results in the hemozoin polymerization in the midgut lumen. The second adaptation that *Rhodnius prolixus* evolved is the enzymatic degradation of heme in a very specific way that produces a dicysteinybiliverdin IX gamma. Furthermore, heme reaches the hemolymph where Rhbp, a heme-binding protein, play a role attenuating heme deleterious effects. In this work we show, for the first time, the *in vivo* effects of an heme analogous, Sn-protoporphyrin, that inhibits a unique heme degradation pathway in *Rhodnius prolixus*. When higher doses of the heme analogous are present in the intestinal lumen it is possible to observe a parallel effect obstructing the hemozoin formation. The increasing heme concentrations in the lumen induces an oxidative damage in the midgut epithelium. Taken all together these results support the hypothesis that heme degradation in the gut is a protective mechanism against heme deleterious effects.

INTRODUÇÃO

1.1) O triatomíneo *Rhodnius prolixus*

Reduviidae é a maior família dentre os hemípteros terrestres. São conhecidos como “*assassin bugs*” e já foram descritas cerca de 6250 espécies e subespécies em 913 gêneros e 25 subfamílias (Ambrose, 2000). Dentre os Reduviidae, os triatomíneos compreendem uma sub-família composta por aproximadamente 120 espécies bem caracterizadas por serem hematófagos obrigatórios. Estes insetos são vetores do protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*, agente causador da tripanosomíase americana, também conhecida como doença de Chagas, que é um dos principais problemas de saúde pública em toda a América Latina (García *et al.*, 2001). Os Rhodniini compreendem uma das cinco tribos de Triatominae e incluem dois gêneros, *Rhodnius* com 14 espécies descritas, e *Psammolestes* com 3 espécies descritas. A maioria destes possui hábitos silvestres, mas diversas espécies de *Rhodnius* também colonizam áreas rurais e são importantes vetores da doença de Chagas (Monteiro *et al.*, 2000).

Todos os animais da ordem Hemiptera são hemimetábolos, e sofrem metamorfose incompleta durante seu ciclo de vida. O triatomíneo *Rhodnius prolixus* passa por cinco estádios de ninfa, bem sincronizados com cada período de alimentação sanguínea e jejum prolongado. Após este período, que pode durar alguns meses, tanto os machos quanto as fêmeas atingem a fase adulta e desenvolvem aptidão reprodutiva e asas (Aldana *et al.*, 2001).



Figura 1 - O barbeiro *Rhodnius prolixus* em sua fase adulta, durante os cinco estádios de ninfa e ovo. Fotografia de Roberto Eizemberg.

Em organismos ovíparos, incluindo insetos, o desenvolvimento embrionário ocorre fora do organismo materno e ,portanto ,necessita de material armazenado previamente. Este material é o vitelo, que é constituído de proteínas, lipídios, açúcares, além de outros componentes minoritários. Durante o acúmulo de vitelo em triatomíneos o corpo gorduroso, um órgão extra-ovariano, produz proteínas que são acumuladas no interior do ovócito. Após a fertilização ocorre o início da embriogênese, evento em que o vitelo é gradualmente utilizado de acordo com as necessidades específicas celulares, para que o ovo dê origem a um novo organismo, uma ninfa de primeiro estágio (Atella *et al.*,2005).

Após o terceiro dia da primeira alimentação na fase adulta é possível observar, nas fêmeas, que os ovários estão repletos de ovócitos, e após o sexto dia ocorre o início da oviposição. Cada ninfa eclode aproximadamente

quinze dias após a postura, quando passam a se alimentar de sangue, dando continuidade ao ciclo de vida hematófago.

Em 1933, Vincent Wigglesworth mostrou que o ciclo de vida e a biologia básica do *Rhodnius prolixus* são altamente sincronizados e regulados por uma refeição sanguínea. Desde então ele adotou o barbeiro em estudos de excreção e desenvolvimento pós-embriônico, como seu inseto experimental, reconhecendo no *R. prolixus* um modelo ideal. Seus experimentos foram a base para a criação da fisiologia de insetos como uma disciplina, descrevendo em detalhes as transformações da epiderme durante o desenvolvimento pós-embriônico, identificando os principais componentes do sistema endócrino envolvidos no controle do crescimento, da muda e da reprodução (Edwards, 1998).

O triatomíneo *Rhodnius prolixus* é um dos principais vetores da doença de Chagas e se encontra distribuído por todo o norte da América do Sul e na América Central (Chaves *et al.*, 2004), além do fato de ocupar a posição de modelo clássico da fisiologia de insetos (Billingsley & Downe, 1989; Wigglesworth, 1943; Edwards, 1998). Tal situação aponta a relevância e necessidade de estudos sobre a fisiologia e os mecanismos de adaptação à hematofagia adquiridos ao longo da história evolutiva deste inseto.

1.2) Evolução da Hematofagia

Estima-se que entre 145 e 65 milhões de anos atrás, a hematofagia ou o desenvolvimento dependente de alimentação com sangue, tenha surgido independentemente, no mínimo seis vezes durante o Cretáceo e o Jurássico. Esta origem polifilética possibilitou que aproximadamente 15000 espécies de 400 gêneros de artrópodes hematófagos adquirissem uma grande diversidade de recursos genéticos para digerir e utilizar o sangue (Mans & Neitz, 2004; Lehane, 1991).

Ainda assim, pode ser dito que sugar sangue é um hábito alimentar relativamente raro entre os insetos. Se os insetos hematófagos são definidos como aqueles que possuem peças bucais adaptadas para perfurar e sugar, alimentando-se de animais muito maiores, então existem apenas quatro ordens em que este hábito alimentar é importante: Anoplura (piolhos), Heteroptera, Diptera (moscas) e Siphonaptera (pulgas). No caso dos Anoplura e Siphonaptera, absolutamente todos os membros destas ordens são hematófagos obrigatórios, no entanto para dípteros e heterópteros apenas 10% das famílias incluem sugadores de sangue. A hematofagia ocorre apenas esporadicamente nas outras ordens (Lukashevich & Mostovski, 2003).

Os animais hematófagos da sub-ordem heteróptera são os indivíduos da família Cimicidae, os Polyctenidae (parasitas de morcegos) e alguns reduvídeos da sub-família Triatominae (Lukashevich & Mostovski, 2003). Parece lógico afirmar que os triatomíneos hematófagos surgiram a partir de reduvídeos predatórios em resposta à disponibilidade de fontes alimentares de vertebrados e invertebrados nos refúgios de animais maiores. No entanto, a

transição para a hematofagia pode não ter seguido um caminho direto, pois requer um conjunto de fatores como, por exemplo, a evolução de anti-trombinas para prevenir a coagulação sanguínea que interfere com a alimentação e impede a ingestão de quantidades suficientes de sangue (Gaunt & Miles, 2000).

Os insetos hematófagos podem ingerir, em uma única refeição, uma enorme quantidade de sangue de vertebrados, que possui aproximadamente 10mM de heme ligado à hemoglobina (Oliveira *et al.*, 1995; Dansa-Petretsky *et al.*, 1995). Todas as adaptações metabólicas necessárias, em uma dieta rica em sangue, devem permitir a manutenção das atividades celulares na presença de grandes quantidades de heme livre, que torna o ambiente celular extremamente pró-oxidante (Graça-Souza *et al.*, 2006). Os artrópodes hematófagos precisaram desenvolver vias eficientes que diminuíssem a toxicidade do heme, além de um conjunto de defesas antioxidantes para prevenir a formação de radicais ou eliminar espécies reativas de oxigênio (Nagem *et al.*, 2001). O combate aos efeitos deletérios do heme, um agente da seleção natural, deve ser considerado uma força motriz durante a evolução. A partir deste conceito foi proposto que a origem polifilética da hematofagia em diferentes grupos de artrópodes gerou uma diversidade de mecanismos protetores (Graça-Souza *et al.*, 2006).

A questão sobre como os artrópodes hematófagos lidam com grandes quantidades de sangue ingerido tem sido alvo de pesquisa em nosso grupo, que busca elucidar os diferentes mecanismos de adaptação a hematofagia.

1.3) Toxicidade do Heme

O heme é um composto praticamente ubíquo, sendo constituído por uma molécula de protoporfirina-IX complexada com um átomo de Fe^{++} . Tem importância em diversas reações bioquímicas fundamentais, como respiração, transporte de oxigênio em fluidos extracelulares, fotossíntese, detoxificação de drogas e transdução de sinais (Beale & Yeh, 1999). A molécula de heme também pode ser conhecida como a forma “aprisionada” do ferro, no qual a reatividade incontrolável e o perigo potencial do átomo metálico é contido em uma cela planar formada pelos átomos de nitrogênio de quatro grupos pirrólicos de um macrociclo porfirínico (Beale & Yeh, 1999). Nas hemeoproteínas a reatividade do átomo de ferro pode ser controlada em um ambiente protetor provido pela estrutura da proteína, que pode ancorar os átomos de ferro ou o cofator heme em um domínio de ligação (Beale & Yeh 1999, Dunkov & Georgieva, 2006). No entanto, heme livre é um potente pró-oxidante, levando à formação de espécies reativas de oxigênio que podem oxidar lipídios, proteínas e DNA (Aft, *et al.*, 1983; Schacter, 1988, Schmitt *et al.*, 1993).

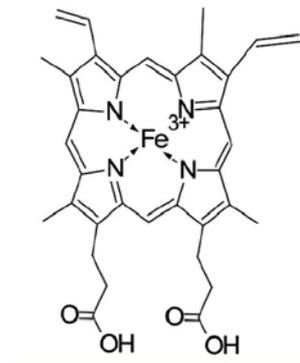


Figura 2 - O heme; representação química da molécula de Ferri-protoporfirina IX.

Além de formar espécies reativas de oxigênio, o heme livre pode associar-se com membranas fosfolipídicas e alterar a estrutura da bicamada, levando ao rompimento celular (Chou & Fitch, 1980; Schmitt *et al.*, 1993). Referências à citotoxicidade do heme podem ser bastante encontradas na literatura, mas a base molecular desta toxicidade é frequentemente subestimada.

As vias biossintéticas e catabólicas do heme geram compostos pro e antioxidantes e influenciam a sensibilidade celular aos compostos oxidantes porque ambas as vias estão ligadas à ciclagem do ferro intracelular (Ryter & Tyrrel, 2000). A toxicidade potencial do heme e hemoproteínas apontam para uma necessidade crucial para a degradação de heme no metabolismo celular. Esta hipótese surgiu a partir da observação da ativação da heme-oxigenase (HO), uma enzima ubíqua na natureza, em resposta celular ao estresse oxidativo. Os produtos de reação da atividade da HO, em mamíferos, são a biliverdina, o monóxido de carbono (CO) e ferro livre (Fe) e concomitante

produção de bilirrubina. Tanto a biliverdina como a bilirrubina são importantes agentes no controle da homeostase devido à sua característica antioxidante (Halliwell & Gutteridge, 1999).

O ferro é essencial para quase todos os organismos, mas também é potencialmente tóxico pois induz a produção de espécies reativas de oxigênio. A reação química de Fenton é um exemplo primordial de reações de radicais livres danosas catalisadas por metais de transição. Uma mistura de H_2O_2 com um sal de Fe^{2+} oxida muitas moléculas orgânicas diferentes. Fenton foi o primeiro a reportar, em 1876, a oxidação de um composto orgânico neste sistema, neste caso o ácido tartárico. Mais de 120 anos depois ainda existe um debate sobre o mecanismo de oxidação de compostos orgânicos por $\text{Fe}^{2+}/\text{H}_2\text{O}_2$. Este sistema envolve provavelmente diversas espécies oxidantes, sendo o radical hidroxil o melhor caracterizado (Halliwell & Gutteridge, 1999).

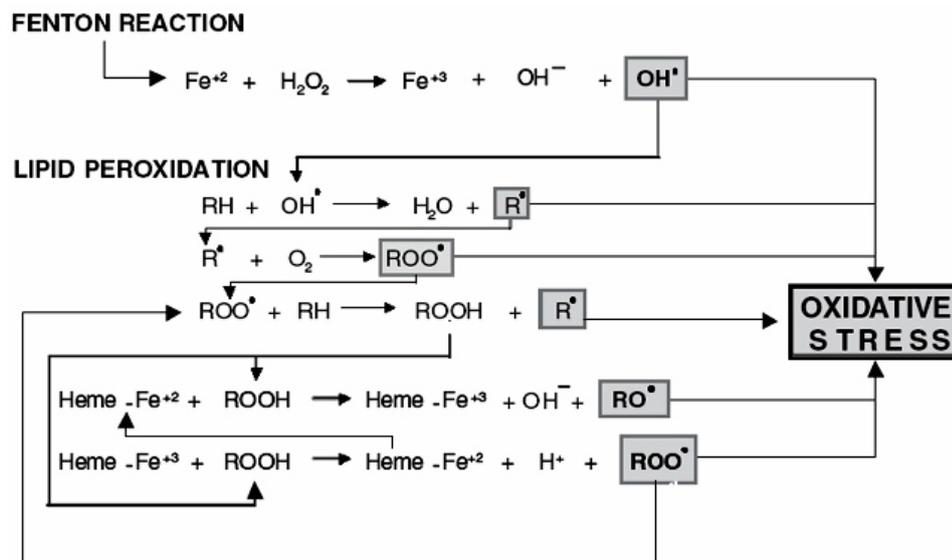


Figura 3 - Heme e ferro promovem peroxidação lipídica através de mecanismos diferentes (Graça-Souza *et al.*, 2006).

Embora alguns trabalhos tenham concluído que a produção de radicais hidroxil pode ocorrer a partir de heme livre em solução ou ligado a hemeproteínas como a hemoglobina (Sadrzadeh *et al.*, 1984), existem evidências consistentes indicando que a peroxidação lipídica induzida por heme é exercida principalmente pela decomposição de hidroperóxidos orgânicos, em vez de H₂O₂, em radicais alcoxil e peroxil (Kalyanaraman *et al.*, 1983; van der Zee *et al.*, 1996) (Fig. 3). Por outro lado, os hidroperóxidos lipídicos seriam formados durante a peroxidação lipídica iniciada por outra fonte de espécies reativas, como o superóxido formado pela NADPH oxidase ou durante a respiração mitocondrial, sugerindo que a ação pró-oxidante do heme pode ser melhor descrita como uma amplificação da formação de espécies reativas, dependendo da ocorrência e magnitude de outras fontes de radicais livres para exercer plenamente sua toxicidade (Graça-Souza *et al.*, 2006).

1.4) Adaptações do *Rhodnius prolixus* à hematofagia

O trato digestivo do *Rhodnius prolixus* é composto por um par de glândulas salivares, pelo estômago ou intestino médio anterior, pelo segmento posterior do intestino médio e pelo reto (Fig.4)(Wigglesworth, 1943). O *Rhodnius prolixus* suga entre cinco e dez vezes seu próprio peso em cada refeição sanguínea (Lehane, 1991). Após a refeição, o sangue ingerido é armazenado no estômago e a água proveniente da alimentação é rapidamente excretada pelos túbulos de Malpighi (Kappagoda *et al.*, 1979). A diurese, sofrida logo no início do processo digestivo, concentra o bolo alimentar que passa a ser lentamente liberado do intestino médio anterior para a porção

posterior do intestino médio, onde ocorre a digestão. O conteúdo alimentar presente no lúmen do intestino médio é acompanhado por um processo de secreção de proteases, sendo muito bem caracterizadas as amino-peptidases, carboxi-peptidases, cisteíno-proteinases e aspártico-proteinases (Terra *et al.*, 1988; Ferreira *et al.*, 1988).

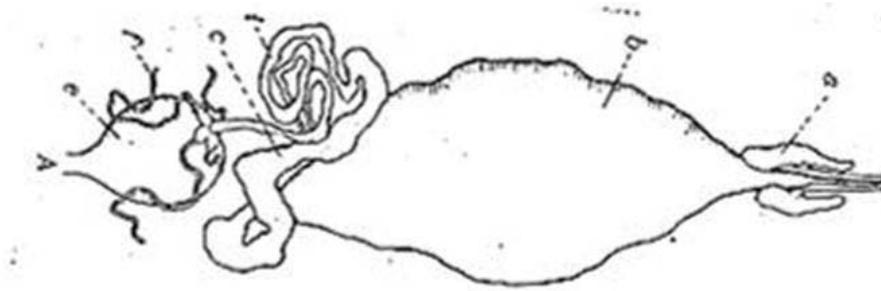


Figura 4. Representação esquemática do trato digestivo de *Rhodnius prolixus*.

a) glândulas salivares, b) intestino médio anterior, c) segmento anterior do intestino médio posterior, d) segmento posterior do intestino médio posterior, e) intestino médio anterior, f) túbulos de Malpighi. (Wigglesworth, 1943).

A hemoglobina é desnaturada durante a digestão do sangue, promovendo um aumento das concentrações de heme no lúmen do trato digestivo. Os mecanismos de adaptação a uma dieta oxidante evoluíram através de uma estratégia de prevenção ao estresse oxidativo, onde as principais linhas de defesa estão concentradas no trato digestivo (Oliveira *et al.*, 1995; Graça-Souza *et al.*, 2006).

Uma das adaptações desenvolvidas para proteger as células do epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus* contra os efeitos deletérios do heme, é a cristalização do heme livre gerado no lúmen intestinal em um pigmento insolúvel de cor marrom-escuro denominado hemozoína (Oliveira *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2007). Esta primeira linha de defesa pode ser considerada um processo extremamente eficiente e contribui com a polimerização de aproximadamente 70% do conteúdo total de heme no intestino médio (Graça-Souza *et al.*, 2006).

Outra linha de defesa importante é constituída por um arsenal de enzimas antioxidantes, que protegem as células de danos provocados por radicais livres (Paes & Oliveira, 1999; Paes *et al.*, 2001). Os estudos sobre enzimas antioxidantes encontrados com maior frequência envolvem a atividade de três famílias de enzimas: as superóxido dismutases (SOD), as catalases e as glutathione peroxidases (Graça-Souza *et al.*, 2006).

Integrando o conjunto de defesas antioxidantes de *R. prolixus*, foi caracterizada uma heme-proteína, *Rhodnius* Heme Binding Protein (RHBP), presente na hemolinfa e ovócitos (Oliveira *et al.*, 1995). A associação do grupamento heme a proteínas possibilita o transporte desta molécula em uma forma menos tóxica, tanto no interior das células, como no meio extracelular (Smith & Hunt, 1990). O valor adaptativo das proteínas de ligação a heme deve ser compreendido como um mecanismo eficiente de controlar a reatividade potencialmente perigosa do heme livre e desta forma atenuar sua toxicidade (Graça-Souza *et al.*, 2006).

O papel das defesas antioxidantes no intestino médio é impedir a danificação das células e do tecido epitelial, e neste sentido o ajuste fino da

disponibilidade de heme e ferro se tornou essencial. A degradação enzimática de heme através da heme oxigenase (HO) exerce uma participação crucial na regulação de ambos processos. Até 2004 nenhuma atividade enzimática do tipo heme oxigenase havia sido identificada em insetos, quando Zhang publicou a clonagem da HO de *Drosophila melanogaster*. Paiva-Silva *et al.* (2006) identificaram uma via singular de degradação de heme em *R. prolixus*, onde o produto final da degradação de heme nesse inseto é uma biliverdina conjugada com resíduos de cisteína, que confere um caráter mais hidrofílico à molécula (Paiva-Silva *et al.*, 2006).

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes. A importância da manutenção do balanço redox é um aspecto crítico na evolução da hematofagia e sua compreensão deve ser o alvo de pesquisa para melhor elucidar as características naturais de insetos vetores como é o caso do *Rhodnius prolixus*.

Oliveira e colaboradores (2006) publicaram recentemente uma revisão que re-afirma a hipótese de que, enquanto os animais hematófagos se protegem da toxicidade do heme, ocorre a criação de um ambiente seguro para os patógenos que eles transmitem (Fig. 5).

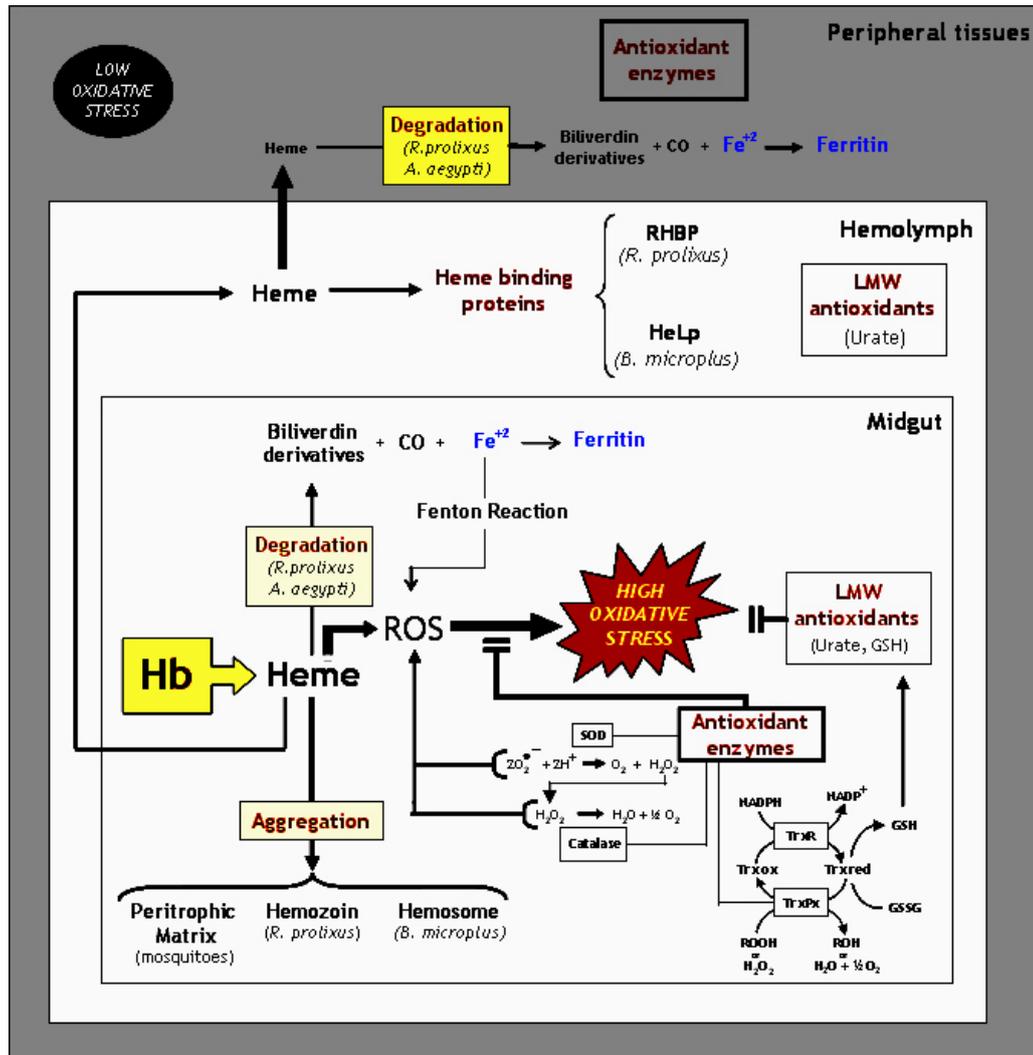


Figura 5 - As principais defesas dos animais hematófagos contra a toxicidade do heme estão concentradas no intestino médio (Graça-Souza *et al.*, 2006).

1.5) Cristalização de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*

Em 1846 o psiquiatra Meckel registrou diversos grânulos de cor marrom escura, no sangue e no baço de um paciente que havia morrido em um hospital para pacientes com insanidade. A formação desse pigmento marrom-escuro é uma característica distintiva do parasita da malária e Meckel estava observando, sem saber, parasitas. Ele pensou que o pigmento era melanina e descreveu a condição como “melanemia” (Meckel, 1847 *apud* Hempelmann, 2007). Poucos anos depois Virchow determinou que o pigmento marrom originado da destruição do sangue ocorria devido à febre malárica (Virchow, 1849 *apud* Hempelmann, 2007). Em 1880 a relação causal entre o parasita e a pigmentação foi determinada por Laveran, um cirurgião do exército francês. Guiado pelos trabalhos de Meckel e Virchow, ele examinou microscopicamente amostras de sangue, fresco e não-corado, de 44 pacientes que sofriam de malária e reconheceu os corpos pigmentados nas células vermelhas (Laveran, 1880, Hempelmann, 2007). Devido a imperfeições da técnica, estes resultados foram recebidos com bastante ceticismo e somente após o exame espectroscópico do pigmento malárico por Carbone (1891) e Brown (1911) foi provado que o pigmento malárico não era melanina e sim hematina.

O pigmento malárico é química e estruturalmente semelhante a um pigmento de hematina distinto, chamado β -hematina (Fitch & Kanjananggulpan, 1987). O termo β -hematina foi cunhado por Hamsik (1925) para denominar a hematina insolúvel em bicarbonato de sódio. Os fatos de que as β -hematinas são insolúveis em solução de bicarbonato de sódio, que os ésteres de hematina não são transformáveis em β -hematina e que as β -hematinas são

convertidas em ésteres de hemina, indicam que os grupos ácidos carboxílicos da hematina estão envolvidos na formação da β -hematina. Lemberg & Legge (1949) usaram o termo β -hematina para ressaltar a presença de uma ligação específica em que o ferro de uma unidade hematina está ligada ao grupo ácido propiônico de outra. Esta definição continua sendo usada hoje em dia, inclusive para cristais de hematina sintéticos (Hempelmann, 2007).

A estrutura da hemozoína foi resolvida recentemente (Pagola *et al.*, 2000) e sua presença, identificada inicialmente no parasita *Plasmodium falciparum*, agente causador da malária, também foi detectada no trato digestivo do *R. prolixus* (Oliveira *et al.*, 1999), no parasita *Schistosoma mansoni*, agente causador da esquistossomose humana (Oliveira *et al.*, 2000) e no protozoário *Haemoproteus columbae* (Chen *et al.*, 2001). A agregação de heme pode ocorrer em um ambiente intracelular, como ocorre no vacúolo digestivo do *Plasmodium*, onde a hemoglobina é hidrolisada, ou em um ambiente extra-celular, como nos casos do *R. prolixus* e *S. mansoni* (Oliveira *et al.*, 1999, 2000).

A hemozoína é formada através de um processo de biomineralização ou biocristalização (Egan *et al.*, 2001). Este processo forma cristais em ambientes hidrofóbicos, a partir de materiais orgânicos de baixo peso molecular (Hempelmann *et al.*, 2003). O mecanismo preciso de formação de hemozoína ainda não foi entendido por completo e tem sido ponto de controvérsia na literatura (Graça-Souza *et al.*, 2006). Foi sugerido que o primeiro passo para a formação do pigmento é a remoção da água da aquaferriprotoporfirina IX, indicando que a reação *in vivo* seja dependente da presença de lipídeos. O ambiente lipídico pode favorecer a formação da ligação ferro-carboxilato do

dímero da β -hematina. A água, em alta concentração (55.5 M) nas soluções aquosas, pode competir com os grupos carboxilato pelos centros de Fe(III) (Egan, 2002). Em ambientes hidrofóbicos a ligação ferro-carboxilato parece ser mais estável devido à baixa concentração de água. Além disso, durante a formação do cristal, os lipídeos podem promover a ligação de hidrogênio às cadeias laterais de propionato assegurando rigidez e complexidade ao cristal (Fitch, 2004). Fisiologicamente, este ambiente hidrofóbico poderia ser constituído pelas membranas perimicrovilares, que são membranas fosfolipídicas extracelulares secretadas pelo intestino de *R. prolixus*.

A formação de hemozoína é favorecida por valores de pH ácido (4.8-5.0), próximos ao pK_a das cadeias laterais propiônicas do anel porfirínico, uma condição próxima ao ambiente encontrado no vacúolo digestivo de *P. falciparum* e no intestino médio de *R. prolixus* (Terra *et al.* 1988, Slater & Cerami, 1992).

O sequestro de moléculas tóxicas em agregados cristalinos é uma maneira bastante eficiente de detoxificação. A polimerização de heme no intestino médio pode ser considerada a primeira linha de defesa contra os efeitos da liberação de heme pela digestão de hemoglobina. O seqüestro de heme em uma forma insolúvel e menos reativa pode levar à sua eliminação nas fezes do inseto (Oliveira *et al.*, 1999).

Após uma refeição sanguínea, o epitélio intestinal do *R. prolixus* não fica em contato direto com o bolo alimentar, devido à presença de membranas perimicrovilares, que embainham as células epiteliais e podem ser observadas desde a base até o topo das microvilosidades e se alongando por todo o lúmen intestinal (Silva *et al.*, 1995). Um extrato lipídico das membranas

perimicrovilares é capaz de induzir a agregação de heme em hemozoína, fato que ressalta a importância de um ambiente hidrofóbico criado por lipídeos promovendo a formação de hemozoína (Silva *et al.*, 2007).

A síntese de hemozoína também representa a principal via de detoxificação de heme em outros organismos hematófagos, como é o caso do *Schistosoma mansoni*. O efeito anti-malárico da cloroquina e de outros derivados quinolínicos, por exemplo, tem sido em grande parte atribuído a capacidade destes compostos inibirem a formação de hemozoína. Oliveira e colaboradores (2004) mostraram que o tratamento *in vivo* de camundongos infectados com *S. mansoni* apresentaram parasitemia reduzida após tratamento com cloroquina.

O efeito protetivo da síntese de hemozoína em *R. prolixus* é eficaz, mas precisa ser complementado por outros mecanismos direcionados contra a toxicidade do heme (Oliveira *et al.*, 2000).

1.6) Arsenal de enzimas antioxidantes no genoma de *Rhodnius prolixus*

Pode ser considerado um antioxidante qualquer substância presente em baixas concentrações em relação às concentrações de um substrato passível de oxidação, capaz de diminuir significativamente ou prevenir a oxidação deste substrato. Considerando-se que não existe um antioxidante universal, é importante examinar o potencial de um antioxidante no sentido de compreender o que ele pode fazer *in vitro* e quais evidências existem para que esta ação seja importante *in vivo* (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Durante a redução do oxigênio para água na mitocôndria, aproximadamente 1 a 2% do consumo de oxigênio total dá origem ao superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), espécies potencialmente citotóxicas (Chance *et al.*, 1979). Durante a reação de Fenton, o peróxido de hidrogênio na presença de ferro (II) gera radical hidroxil que é o radical de oxigênio mais reativo.

A descoberta da família de enzimas superóxido dismutases (SOD) levou à teoria da toxicidade do oxigênio através do superóxido, que propõe que $O_2^{\bullet-}$ é um fator principal na toxicidade do O_2 e que as SODs são uma defesa essencial contra este. É bastante aceito que a função biológica da SOD é expulsar o $O_2^{\bullet-}$, que é conhecido por ser gerado *in vivo* em quantidades crescentes, de acordo com a exposição ao O_2 (Fridovich, I 1995). Paes *et al.* (2001) determinaram a atividade da superóxido dismutase em diversos tecidos de *Rhodnius prolixus*. A atividade específica mais elevada foi encontrada em amostras do epitélio intestinal. O produto de reação da superóxido dismutase é o peróxido de hidrogênio, o substrato da catalase (CAT). A atividade da catalase também foi encontrada em diversos tecidos de *R. prolixus*, sendo bastante elevada nas amostras do epitélio intestinal, de acordo com a distribuição da SOD (Paes *et al.*, 2001). Estes resultados indicaram um padrão de cooperação ativa entre SOD e CAT, demonstrando que a detoxificação de peróxido de hidrogênio é de extrema importância na estratégia antioxidante do epitélio intestinal.

Um conteúdo significativo de peróxido de hidrogênio pode difundir a partir da mitocôndria (Turrens & Boveris, 1980, Turrens *et al.*, 1985). Além da

catalase, outra forma de defesa, em células eucarióticas, contra a toxicidade do H_2O_2 é a glutathione peroxidase (GPx).

A glutathione peroxidase (GPx) é uma enzima antioxidante, contendo selenocisteína, e sua atividade é responsável pela redução do peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos orgânicos utilizando a glutathione (GSH) como um doador de hidrogênio (Halliwell & Gutteridge, 1999). A redução da forma oxidada da glutathione (GSSG) para a regeneração de GSH é catalisada pela glutathione reductase (GR). A principal função da GPx, em condições normais, é a detoxificação do peróxido de hidrogênio da mitocôndria e citoplasma.

Paes e Oliveira também determinaram a atividade da glutathione peroxidase em todos os tecidos de fêmeas adultas de *Rhodnius* e encontraram uma atividade específica particularmente elevada na hemolinfa. Associada aos dados de aumento da atividade GPx na hemolinfa durante o desenvolvimento, esta descoberta revelou a necessidade de uma proteção antioxidante, consistente com o fato de que a hidrólise de hemoglobina é uma fonte de estresse oxidativo em animais hematófagos (Paes & Oliveira, 1999).

1.7) *Rhodnius* heme binding protein

Os diversos mecanismos de defesa antioxidante compreendem as proteínas que minimizam a disponibilidade de pró-oxidantes como os íons ferro, íons cobre ou heme. Transferrinas, haptoglobinas, hemopexina e metalotioneína são exemplos bastante estudados deste mecanismo de defesa (Halliwell & Gutteridge, 1999).

A composição das defesas antioxidantes difere de tecido para tecido, e de tipo celular para tipo celular em um determinado tecido. Os fluidos extracelulares possuem diferentes mecanismos protetores comparados aos ambientes intracelulares. Dentro das células, o ferro parece estar em trânsito constante, seja associado a um “pool” de compostos de baixa massa molecular, seja estocado associado a ferritina ou cumprindo seu destino final associado à heme em proteínas funcionais. O estresse oxidativo pode levar à liberação de mais ferro e isto explica porque as células precisam de mecanismos eficientes de defesas antioxidantes. É importante remover espécies reativas antes de entrar em contato com íons metálicos de transição (Halliwell & Gutteridge, 1999).

Tanto os ovos quanto a hemolinfa de *Rhodnius prolixus* possuem uma coloração rosada característica. Wigglesworth mostrou em 1943 que o pigmento presente na hemolinfa e nos ovos estava associado com uma proteína, “katahemoglobina”, que ele acreditava ser produzida através da digestão parcial da hemoglobina do hospedeiro vertebrado. No entanto, Oliveira *et al.* mostraram que *R. prolixus* sintetiza uma proteína específica de ligação de heme de 15 kDa, que passou a ser conhecida como *Rhodnius* heme-binding protein (RHBP). Neste mesmo trabalho foi provado que anticorpos específicos para a RHBP não reagem com hemoglobina de coelho. Esta descoberta apresentou a primeira proteína de ligação a heme em insetos hematófagos (Oliveira *et al.*, 1995), que se acumulava nos ovócitos, em grânulos de vitelo, organelas especializadas no armazenamento de material para o crescimento do embrião, sugerindo que a RHBP poderia ser uma fonte

de heme ou ferro durante a embriogênese (Machado *et al.*, 1998; Braz *et al.*, 2002).

Os barbeiros são dependentes de dietas ricas em heme desde o início de seu desenvolvimento e, como já foi discutido na seção 1.1, necessitam de uma boa refeição sanguínea durante cada etapa de seu desenvolvimento. Uma fêmea de barbeiro adulta pode ingerir mais de 200 μ L de sangue vertebrado em uma única refeição, que contém o equivalente a 10 mM de heme ligado a hemoglobina (Dansa-Petretsky *et al.*, 1995).

A hemina é conhecida por aumentar a peroxidação *in vitro* de ácidos graxos poli-insaturados. Dansa-Petretski e colaboradores (1995) apresentaram evidências da ação da RHBP como um agente antioxidante capaz de bloquear a peroxidação lipídica induzida por heme. A RHBP apresenta um polipeptídeo único de cadeia simples de 15 kDa e pode ser encontrada na hemolinfa em sua forma simples (apoRHBP) ou associada a uma molécula de heme (holoRHBP). A ligação de heme na apoRHBP circulante protege o animal da peroxidação lipídica induzida por heme criando um complexo menos reativo do ponto de vista redox (Dansa-Petretsky *et al.*, 1995).

1.8) A via de produção de biliverdina em *Rhodnius prolixus*

Um componente importante no controle celular da homeostase de heme é a atividade da enzima heme oxigenase, que quebra heme produzindo biliverdina, Fe^{++} e CO. Este mecanismo de ação envolve, na maioria dos organismos, a hidroxilação de um dos meso-carbonos do anel porfirínico, a eliminação dependente de O_2 do meso-carbono hidroxilado formando CO e

verdoheme e a clivagem oxidativa de verdoheme produzindo biliverdina IX em uma reação que depende de equivalentes redutores e O_2 , com a concomitante liberação de Fe^{++} (Wilks, 2002). A detoxificação do heme a partir desta via promove a reciclagem do ferro, além do fato de biliverdina e CO apresentarem participação em importantes eventos fisiológicos, com funções antioxidantes e anti-inflamatórias, respectivamente (Stocker, 2004).

O primeiro pesquisador que associou a lise de células vermelhas à presença de biliverdina foi Virchow em 1847 (Wagener *et al.*, 2003), mas a primeira evidência, de que a enzima heme-oxigenase estava envolvida na conversão de heme para biliverdina/bilirrubina, foi apresentada por Tenhunen e colaboradores em 1968, que purificaram a HO a partir da fração microssomal de fígado e baço e descreveram que a atividade HO tinha um requerimento absolutamente estequiométrico para NADPH e O_2 gerando quantidades equimolares de bilirrubina e CO. O mesmo grupo também mostrou que, além da atividade de degradação de heme, o sistema HO microssomal também participava da biodegradação de xenobióticos (Tenhunem *et al.*, 1969).

Até o momento três isoformas de heme oxigenase foram identificadas em humanos, HO-1, HO-2 e HO-3, que possuem massa molecular de 32, 36 e 33 kDa, respectivamente. Cada isoforma é produto de um gene diferente e sua expressão difere bastante quanto ao tipo celular, distribuição tecidual e regulação (Wagener, *et al.*, 2003).

As proteínas HO estão ancoradas ao retículo endoplasmático através de uma sequência de aminoácidos hidrofóbicos localizados na região carboxi-terminal da proteína. HO-1 e HO-2 apresentam apenas 40% de similaridade em suas sequências de aminoácidos, enquanto HO-2 e HO-3 apresentam 90% de

similaridade. A heme oxigenase é expressa em praticamente todas as formas de vida, desde organismos procariotos até fungos, plantas e humanos, regulando um amplo espectro de processos celulares (Terry *et al.*, 2002).

Após a quebra do heme, a biliverdina é rapidamente reduzida a bilirrubina através da enzima citoplasmática biliverdina redutase. A redução de biliverdina a bilirrubina ocorre em todos os mamíferos, porém em pássaros, anfíbios e répteis a biliverdina é o produto final do catabolismo de heme (Wagener, *et al.*, 2003). Esses pigmentos podem ser encontrados em diversos insetos, porém a degradação de heme nestes animais tem recebido muito pouca atenção. Apesar da enzima heme-oxigenase ter sido estudada em diferentes modelos, apenas recentemente o primeiro cDNA homólogo em insetos foi clonado a partir de *Drosophila melanogaster* (Zhang *et al.*, 2004).

A importância fisiológica da degradação de heme em insetos ainda não foi completamente elucidada. No caso da coloração verde no tegumento de lagartas, devido à presença de biliverdina associada a carotenóides, foi sugerido um papel no mimetismo desta, em relação às plantas onde se alimentam (Kawooya *et al.*, 1985). Também existe a possibilidade dos pigmentos estarem envolvidos na proteção de insetos contra o dano-oxidativo induzido pela luz (McDonagh, 2001).

Wigglesworth descreveu em 1943, a existência de depósitos de ferro nas células pericardiais e no epitélio do intestino médio, órgãos onde ocorre intensa degradação de heme. Além do notável acúmulo de ferro nestes órgãos, Wigglesworth também descreveu a presença de pigmentos verdes semelhantes à biliverdina, cuja presença foi atribuída a quebra de heme liberado pela digestão da hemoglobina (Wigglesworth, 1943).

Paiva-Silva *et al.* descreveram em 2006, a via de degradação de heme em *R. prolixus* (fig. 6). Este trabalho apresentou a capacidade das células pericardiais quebrarem heme, que é transportado da hemolinfa para o coração através da RHBP.

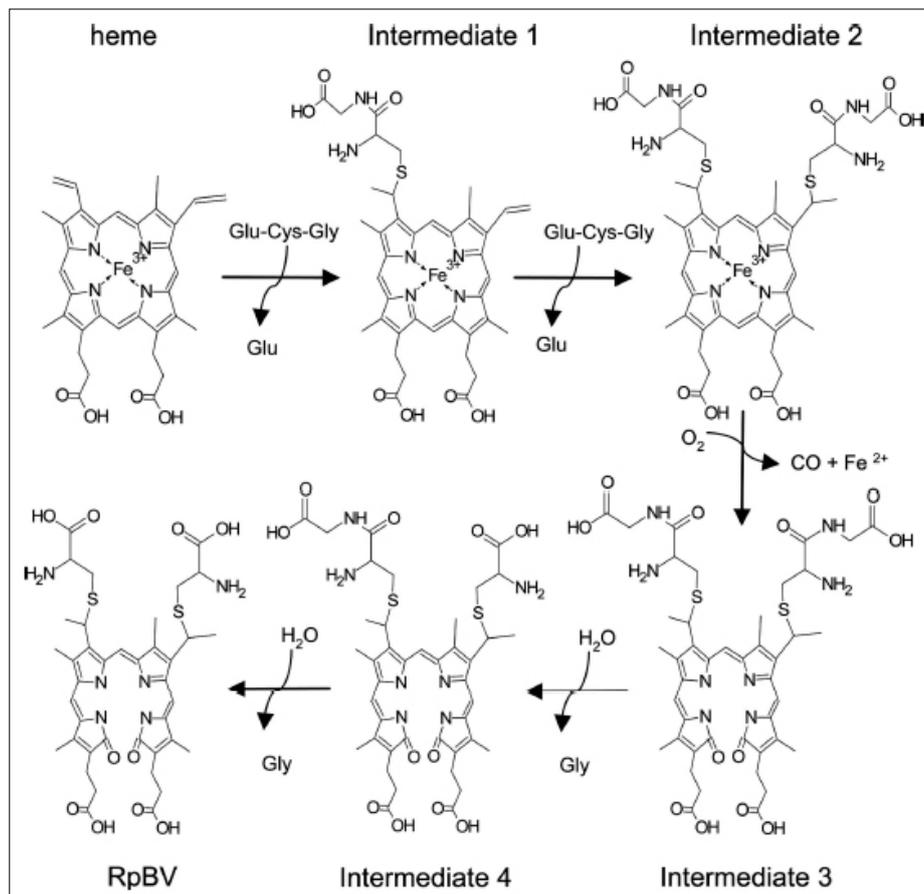


Figura 6: Via de degradação de heme em *Rhodnius prolixus*

O catabolismo de heme em *R. prolixus* envolve três etapas. A primeira etapa requer a modificação do heme através de duas adições consecutivas de dipeptídeos cisteinil-glicina ou glutatona, no último caso seguido da remoção

de resíduos glutâmicos. A segunda etapa envolve a clivagem oxidativa do anel porfirínico, que é modificado de dicisteinil-glicina-heme para dicisteinil-glicina-biliverdina IX gama. O terceiro passo requer a hidrólise da ligação peptídica entre cisteína e glicina por uma dipeptidase, liberando o produto final RpBV (*Rhodnius prolixus* biliverdin).

A significância fisiológica e bioquímica da adição de resíduos hidrofílicos à moléculas de heme, durante a via de degradação em *Rhodnius prolixus*, ainda não foi esclarecida. A presença de RpBv é notável em diversos órgãos deste inseto: o coração é verde (Figura 7 A), o trato digestivo em jejum também é verde (Figura 7 B), mesmo quando se observa cada segmento separadamente (AG - papo ou intestino médio anterior, PG - intestino médio posterior). A coloração verde observada é um forte indicativo da presença de biliverdina nesses órgãos.

O trabalho de Paiva-Silva *et al.* (2006) é uma referência fundamental para este trabalho, pois identifica cada intermediário presente na via de degradação através de um perfil cromatográfico bastante reprodutível (Figura 7 B e C). Foi possível identificar a via de degradação de heme, presente no coração de *Rhodnius prolixus*, e revelar seu papel como um mecanismo de antioxidante.

Nesta tese, verificamos a presença e a atividade da via de degradação de heme no intestino médio em fêmeas adultas de barbeiro, uma vez que, após um repasto sanguíneo, esse órgão fica exposto a elevadas concentrações de heme, liberado durante a digestão de hemoglobina.

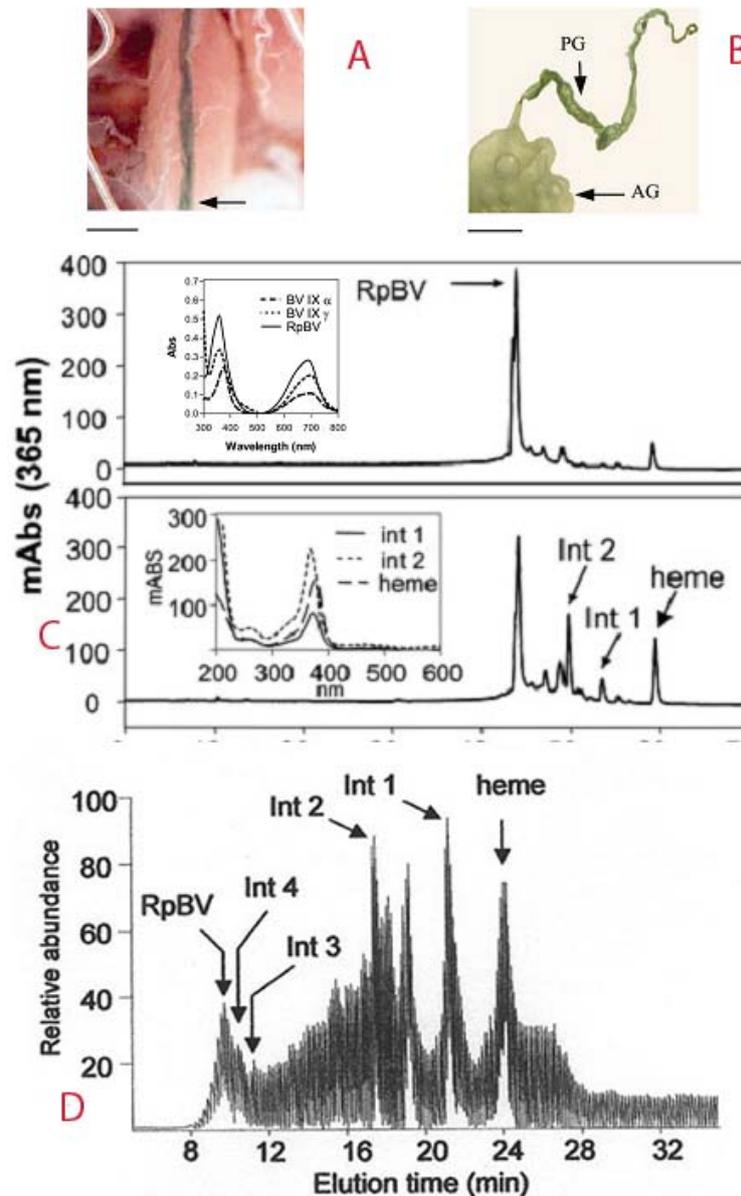


Figura 7- A- Fotografia do coração de *Rhodnius prolixus*; B- Fotografia do trato digestivo de *Rhodnius prolixus* (AG - intestino médio anterior; PG - intestino médio posterior); C- Perfil cromatográfico demonstrando a migração cromatográfica, em coluna de fase reversa do tipo C-18, do heme, RpBv, e dos intermediários 1 e 2 da via de degradação de heme; D- Perfil cromatográfico demonstrando a migração cromatográfica, em coluna capilar de fase reversa, do heme, RpBv, e dos intermediários 1, 2, 3 e 4 da via de degradação de heme.

OBJETIVOS

Em função de aprimorar o conhecimento sobre a degradação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus* e desvendar sua relevância fisiológica durante o desenvolvimento, este trabalho tem como objetivos principais:

Identificar e caracterizar o mecanismo de degradação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*;

Compreender o funcionamento dos principais mecanismos de detoxificação de heme presentes no intestino médio;

Determinar a relevância fisiológica das principais vias de detoxificação de heme em *Rhodnius prolixus*.

MATERIAL E MÉTODOS

3.1) Seleção das fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus*

As fêmeas adultas de *Rhodnius prolixus* foram retiradas da colônia de barbeiros, do Instituto de Bioquímica Médica da UFRJ, onde são mantidas a 28°C e 80% de umidade relativa. Todos os animais da colônia são alimentados utilizando-se sangue de coelho, porém as dietas experimentais foram administradas artificialmente. Após a primeira alimentação como adultos, os grupos de animais foram mantidos em jejum por 35-40 dias. Durante este período todos os ovos postos e animais mortos foram retirados dos frascos. Após este período as fêmeas adultas foram submetidas à experimentação através de alimentação artificial.

3.2) Alimentação artificial

3.2.1) Preparação de hemoglobina

Uma solução contendo 150 mg/ml de hemoglobina bovina, adquirida da Sigma, foi preparada e dialisada exaustivamente contra água destilada.

3.2.2) Preparação de globina

Um protocolo adaptado de Teale (1959) foi utilizado para clivar a ligação heme-proteína da hemoglobina dialisada utilizando-se metil-etil-cetona.

Este método requer o ajuste da solução de hemoglobina com ácido clorídrico 0,1M até atingir pH 2. Esta solução final foi mantida reservada em

gelo. Um outro frasco de metil-etil-cetona foi mantido separadamente em gelo. Quando as duas soluções atingiram a temperatura de 4°C, um volume e meio de metil-etil-cetona foi adicionado à solução de hemoglobina. Esta solução foi bem misturada, através de agitação manual, e mantida em gelo até a visualização de duas fases distintas. A fase orgânica foi descartada, logo em seguida. A fase aquosa contendo a globina desnaturada e praticamente livre de heme foi submetida à diálise exaustiva contra água destilada. O produto final desta reação é uma solução de globina em água, com coloração levemente avermelhada.

3.2.3) Preparação de metaloglobinas

A globina obtida como descrito acima foi reconstituída através da adição equimolar de estanho-protoporfirina (Fig. 8). Para adicionar metaloporfirinas em soluções aquosas deve-se solubilizá-las em um solvente que pode ser hidróxido de sódio ou dimetil-sulfóxido (DMSO). Neste trabalho optamos por solubilizar a estanho-protoporfirina em DMSO. Esta solução foi adicionada à solução de globina em água.

Para retirar o DMSO da solução final de estanho-protoporfirina/globina foi utilizada uma pequena coluna de gel filtração, contendo 7mL de resina Sephadex G-25, (Amersham) (Fig. 9). O fluxo utilizado foi de 10 mL/min e o material coletado em frações de 1 mL. A quantificação de proteínas foi feita pelo método de Bradford e o pico principal contendo Estanho-protoporfirina/globina em água, com coloração rubra característica, foi armazenado a 4°C. O armazenamento de metaloglobinas em água, após este

processo, não deve ser feito em temperaturas inferiores a 4°C, pois o congelamento desta solução desnatura o produto final. Esta é uma exigência deste protocolo que requer uma preparação fresca de metalo-globinas para cada experimento realizado.

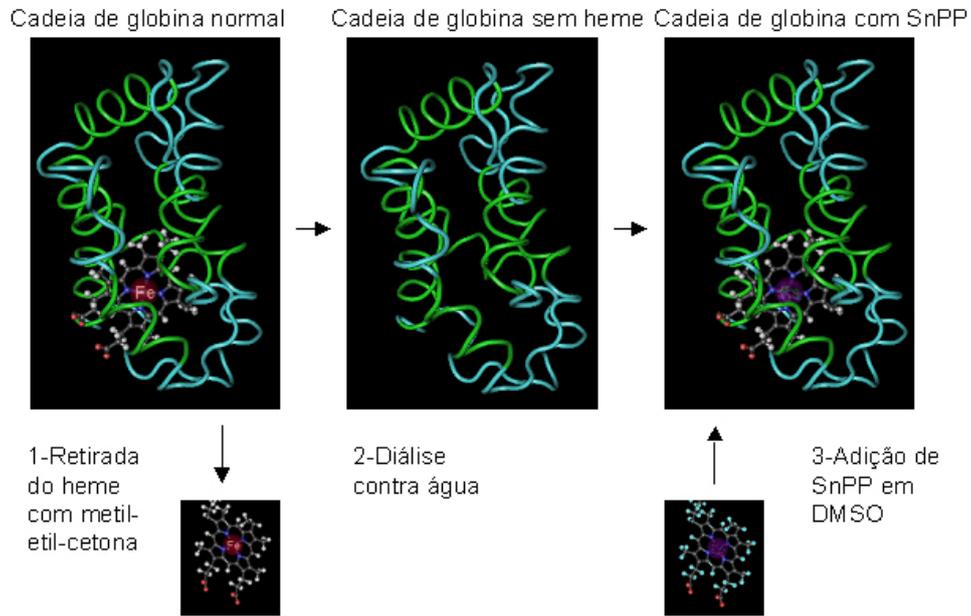


Figura 8 – Obtenção da estanho-globina, o veículo da SnPP-IX.

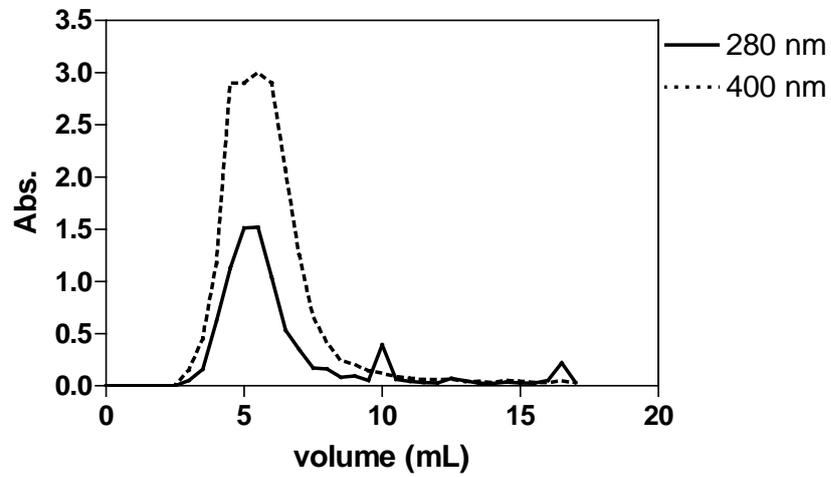


Figura 9 – Purificação do veículo da SnPP-IX/globina.

Após reconstituição da globina com a SnPP-IX (Figura 8), a SnPP-IX/globina foi isolada em coluna de filtração em gel, SEPHADEX-G-25 *medium*. Na figura são mostrados os valores de absorvância a 280 nm e a 400 nm.

3.2.4) Dietas modificadas experimentalmente

As fêmeas de *Rhodnius prolixus* foram alimentadas com dietas experimentalmente modificadas, trinta dias após a primeira alimentação sanguínea do estágio adulto. Utilizamos um sistema artificial, contendo uma mistura de sangue de coelho em um terço do volume final, adicionado de 33, 100 e 330 μM do análogo de heme, avolumadas com PBS e/ou metalo-globina antes da alimentação artificial.

A refeição experimental foi administrada em alimentadores artificiais específicos para a alimentação de animais hematófagos. Estes alimentadores são fabricados em vidro e possuem um sistema de circulação interno que permite o acoplamento a um banho de circulação de água. Desta forma foi possível manter a refeição experimental a 37°C. Após a alimentação artificial, selecionamos as fêmeas de acordo com a dilatação do trato digestivo, de forma que apenas as fêmeas completamente cheias de sangue fossem utilizadas no estudo.

3.3) Efeitos das dietas modificadas experimentalmente na oviposição

Os animais alimentados experimentalmente foram separados individualmente em pequenos frascos de vidro transparente, lacrados com uma tampa com uma pequena abertura de ventilação, e contendo um pedaço de papel de filtro para a sustentação do animal e drenagem das fezes. Cada frasco foi observado durante o período posterior à alimentação para a contagem de ovos.

3.4) Dissecção de *Rhodnius prolixus*

Todos os animais experimentados com a finalidade de dissecção tiveram a hemolinfa coletada e foram dissecados quatro dias após a alimentação artificial. A hemolinfa, o conteúdo do intestino médio posterior e o epitélio do intestino médio foram reservados em uma mistura de inibidores de proteases, e congelados para posterior análise.

Os tratos digestivos dos animais utilizados em análises cromatográficas foram inicialmente separados em duas frações: epitélio do intestino médio posterior e lúmen. Após dissecção, o epitélio do intestino médio posterior era pinçado em uma de suas extremidades, que por sua vez foi mantida em contato com 100 μ L de água até liberar todo o conteúdo luminal presente em cada amostra. Em seguida cada epitélio do intestino médio posterior era armazenado em tubo previamente preparado contendo 200 μ L de solução A para corrida cromatográfica em fase reversa. As amostras de conteúdo luminal, recolhidas em 100 μ L de água, foram adicionadas com 400 μ L de solução A para corrida cromatográfica em fase reversa.

3.5) Detecção de heme, biliverdina e intermediários da via de clivagem de heme por HPLC

Um cromatógrafo de alta “performance” de marca Shimadzu, modelo LC-10AT, equipado com uma coluna de fase reversa do tipo C18 e um detector com arranjo de diodos foi utilizado para quantificar e fracionar heme, biliverdina e os intermediários da via de degradação de heme.

Foi utilizado um gradiente de concentração de 5 a 80% de acetonitrila, contendo ácido trifluoracético (TFA) 0,1%, pH 2,5.

Cada corrida começou com a coluna equilibrada em acetonitrila 5% TFA 0,1% (solução A). O fluxo aplicado foi de 0,4 mL/min e a adsorção da amostra ocorreu em solução A por 10 minutos. Após esta etapa programamos o início de um gradiente de 5% acetonitrila e TFA 0,1% (solução A) até 80% acetonitrila e TFA 0,1% (solução B) durante 40 minutos. Durante a formação do gradiente foi possível fracionar e observar a separação dos intermediários da via de degradação de heme através de um arranjo de diodos acoplado ao HPLC, que permite a varredura do espectro entre 220 e 800 nm durante cada corrida. Desta forma foi possível identificar inicialmente a presença de cada componente da via de degradação.

Para quantificar os picos dos componentes da via de degradação de heme, já identificados por Paiva-Silva *et al.* (2006), identificamos a área do pico em cada cromatograma. Para determinar a massa de RpBv foi possível estabelecer uma curva padrão de biliverdina- α , obtida comercialmente, utilizando-se o mesmo protocolo (Fig. 10).

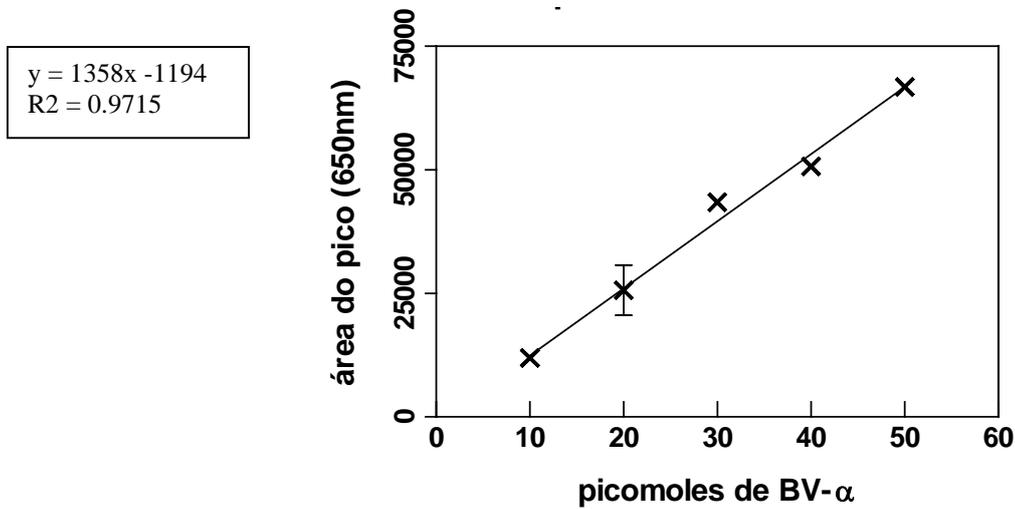


Figura 10 – Curva padrão de massa de biliverdina IX- α . Amostras de biliverdina IX- α foram diluídas em tampão A e aplicadas em coluna de C-18 para fracionamento de acordo com a metodologia descrita. A área de cada pico no cromatograma foi utilizada para composição da curva padrão, empregando leitura da absorvância no comprimento de 650 nm. Os valores de área dos picos são expressos em unidades arbitrárias e calculados pelo programa do aparelho.

3.6) Caracterização da formação de hemozoína *in vivo*

A dosagem da formação de hemozoína foi feita de acordo com protocolo previamente estabelecido por nosso grupo (Oliveira *et al.*; 2004)

Os animais experimentais foram dissecados e tiveram o conteúdo do intestino médio posterior cuidadosamente coletado. Para o material de cada intestino médio posterior foi adicionado 1 ml de PBS. As amostras foram agitadas e centrifugadas a 12000g por 5 minutos, e o material precipitado foi submetido a extração de hemozoína.

Este precipitado foi lavado cinco vezes em NaHCO₃ 0,1M, SDS 2,5%, pH 9,1. Após esta etapa foram feitas três lavagens em água deionizada, e o material precipitado foi solubilizado em NaOH 0,1M. A quantidade de heme foi determinada em espectrofotômetro (400 nm).

A curva padrão foi feita utilizando-se de 5 a 50 µM de heme em NaOH 0,1M.

3.7) Caracterização da formação de hemozoína *in vitro*

Um grupo de animais foi alimentado com plasma sanguíneo de coelho e o intestino médio foi dissecado por inteiro em PBS. O tecido foi homogeneizado e o conteúdo protéico foi medido pelo ensaio de Bradford (1976). Uma concentração fixa do homogenato (100µg) foi utilizada com heme 100 µM diluído em NaOH 0,1 mM, durante o ensaio. Para estabelecer os efeitos da Sn-protoporfirina IX, nós utilizamos 1, 5, 10 e 50 µM. Todos os tubos foram mantidos a 28°C por 24 horas. Após este procedimento, medimos a quantidade

de hemozoína formada seguindo-se o mesmo protocolo de extração de hemozoína *in vivo*.

3.8) Avaliação de dano oxidativo aos tecidos do trato digestivo

A peroxidação lipídica nos tecidos foi medida através do ensaio de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (Ohkami *et. al.*, 1978).

No quarto dia após a alimentação, dissecamos o intestino médio posterior de cada fêmea e armazenamos em tubos contendo 200 uL de solução de fosfato de sódio 50 mM pH7,4. Em seguida adicionamos 200 uL de TBA 1% em ácido acético/água (1:1). As amostras foram incubadas a 97°C por 50 minutos e resfriadas em gelo. Ao final desta etapa os tubos foram centrifugados a 12000g por 5 minutos e a absorbância dos sobrenadantes foi determinada a 532 nm.

3.9) Medida da ligação de heme em proteínas da hemolinfa.

A hemolinfa de cada fêmea foi coletada no quarto dia após a alimentação artificial. Para cada animal utilizamos um volume de 5 uL de hemolinfa diluídos em 1 mL de PBS. Realizamos então sucessivas adições de heme à hemolinfa. Após cada adição obtivemos um espectro de absorção por varredura de comprimento de onda. A absorbância no pico de Soret em 412nm foi determinada para cada adição.

RESULTADOS

4.1 – Identificação da via de degradação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*

Utilizamos neste estudo a alimentação artificial contendo sangue adicionado de estanho-protoporfirina IX (SnPP-IX), uma metaloporfirina extensivamente utilizada na literatura envolvendo a atividade da enzima heme-oxigenase.

Realizamos algumas tentativas de diluição simples de SnPP-IX no sangue utilizado para a alimentação artificial, porém encontramos algumas dificuldades dependendo do veículo utilizado. Assim como as outras metaloporfirinas disponíveis, suas propriedades químicas requerem sua utilização após dissolução do composto em hidróxido de sódio ou dimetil-sulfóxido (DMSO), que inibiam a alimentação dos insetos, quando presentes em concentração elevada.

Com o objetivo de padronizar a dieta experimental, passamos a empregar a alimentação com sangue enriquecido com globina reconstituída com SnPP-IX, a estanho-globina. Esta metodologia permitiu encontrar um veículo de solubilização da metaloporfirina que simulasse as condições naturais de alimentação, apresentando como característica principal uma maior capacidade de solubilização, e assim, permitindo boa aceitação e ingestão de concentrações elevadas da metaloporfirina.

A degradação de heme foi avaliada no intestino médio de *R. prolixus*, no quarto dia após a alimentação artificial, utilizando-se cromatografia de fase reversa em coluna C18. Como exemplo podemos observar o registro de um

cromatograma de um dos insetos controle, que representa o perfil de um epitélio do intestino médio, limpo do conteúdo do lúmen (Figura 11).

Além da observação dos picos do heme e da RpBv, presentes nas amostras de epitélio intestinal, encontramos dois picos com espectro de absorção de luz com banda de Soret evidente, semelhantes ao espectro do heme (Figuras 11 e 12). Este fato associado à apresentação de mesma mobilidade dos intermediários I e II, já identificados anteriormente (Paiva-Silva *et al.*, 2006), indicou que estes picos representavam os intermediários da via de degradação anteriores à quebra do anel porfirínico. A partir desta verificação decidimos manter a nomenclatura proposta no trabalho original, identificando-os como intermediários I e II.

A RpBv possui espectro de absorção de luz com máximos em 365 e 650 nm, típico de biliverdinas (Figuras 13). Além deste pico foi possível observar dois outros picos de menor expressão porém nítidos em 650 nm, localizados em uma região bastante próxima ao pico da RpBv. Estes picos possuem espectro de absorção de luz característico de biliverdinas, uma indicação de que estes picos poderiam representar os intermediários III e IV (Figuras 11 e 13), também identificados anteriormente por Paiva-Silva e cols. (2006) no coração, onde foram observados através do uso de colunas de nano HPLC acopladas a um espectrômetro de massa.

Os cromatogramas de epitélio intestinal também continham cinco outros picos com intensidade significativa em 400 nm, apresentando banda de Soret evidente, motivo pelo qual foram assinalados como A, B, C, D e E (Figuras 11 e 14). A importância da anotação destes picos se deve à possibilidade de que

estes representem outros intermediários da via de degradação de heme, que ainda não foram descritos.

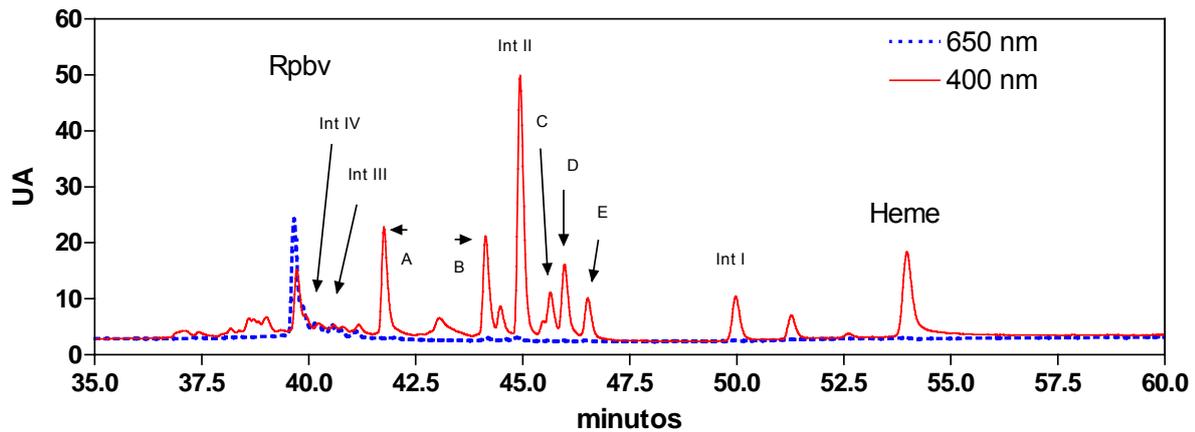


Figura 11- Perfil cromatográfico típico do epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus*.

Fêmeas adultas foram dissecadas no quarto dia após a alimentação com sangue diluído em PBS e o epitélio do intestino médio foi fracionado em coluna de fase reversa como descrito nos Material e Métodos. Os valores de absorbância obtidos a 400 nm e 650 nm são mostrados.

Os picos dos componentes da via de degradação de heme em *R. prolixus* estão indicados de acordo com Paiva-Silva e cols. (2006).

Os picos marcados como A, B, C, D e E, ainda não foram caracterizados.

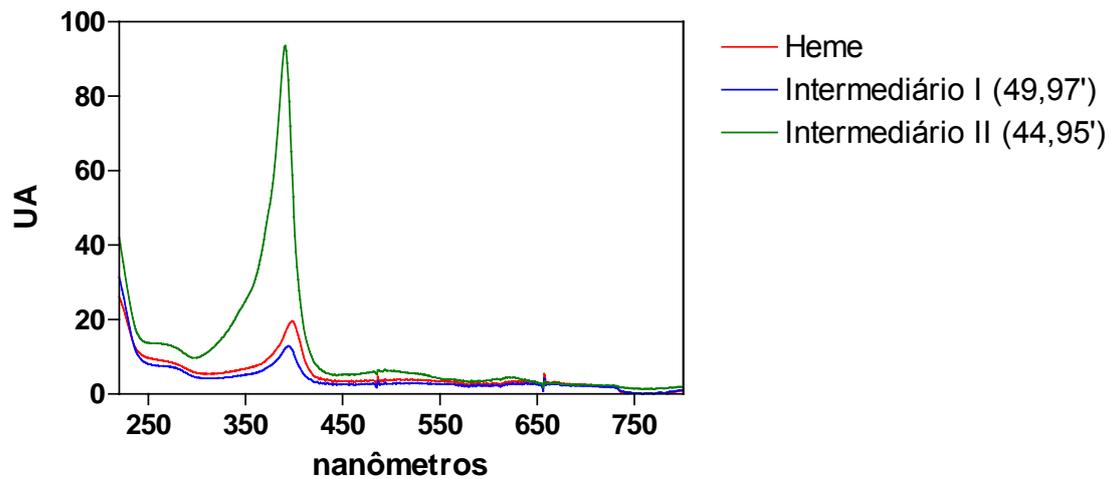


Figura 12- Espectros de absorção de luz do pico do heme e dos intermediários I e II.

Os espectros de absorção de luz foram obtidos a partir do cromatograma exposto na Figura 11 e sugerem que estes picos representem os intermediários I e II, descritos por Paiva-Silva e cols. (2006).

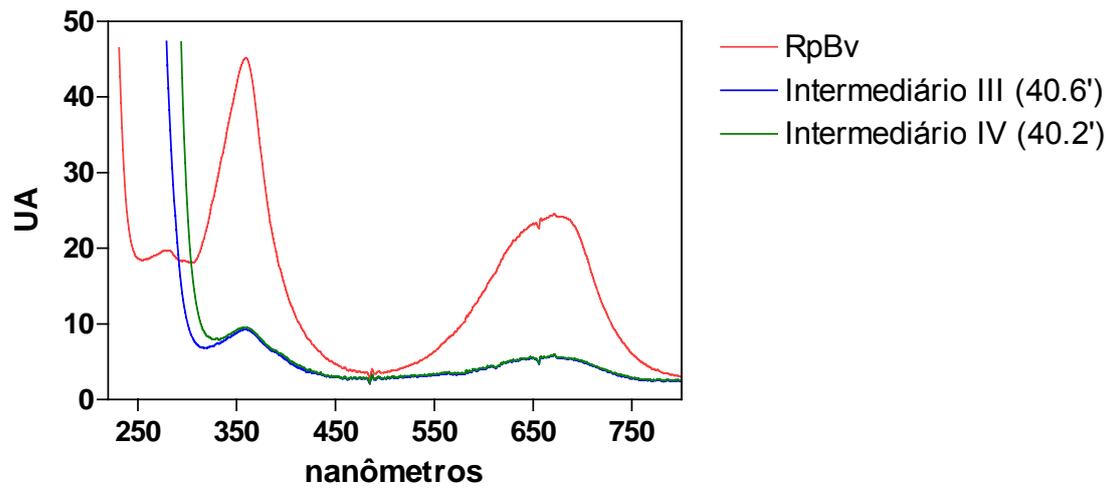


Figura 13- Espectros de absorção de luz do pico da RpBv e dos picos dos intermediários III e IV.

Os espectros de absorção de luz foram obtidos a partir do cromatograma exposto na Figura 11 e sugerem que estes picos representem os intermediários III e IV, descritos por Paiva-Silva e cols. (2006).

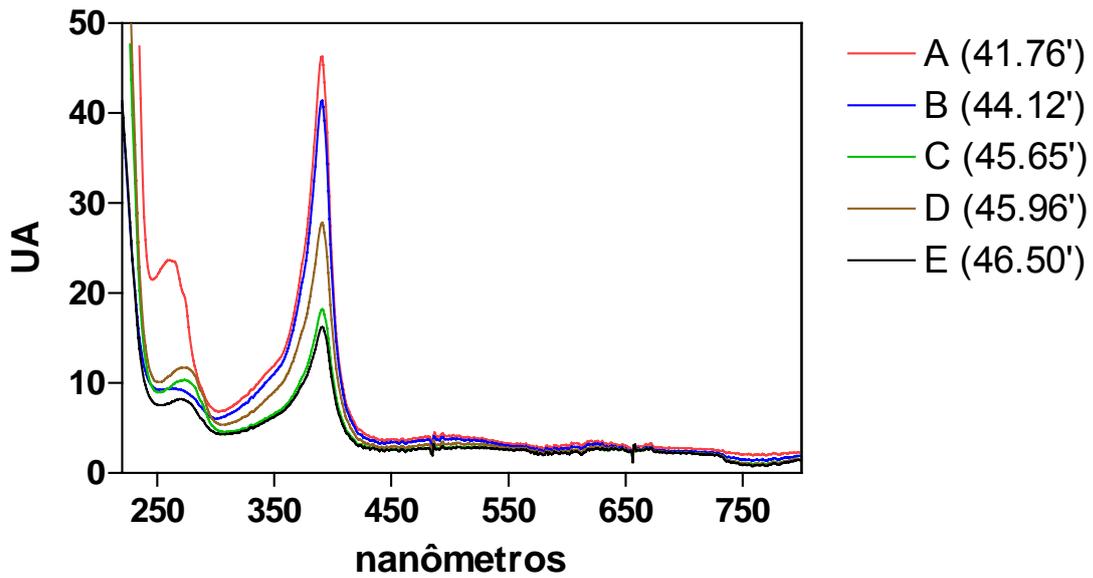


Figura 14- Espectros de absorção de luz dos picos A-E.

Os espectros de absorção de luz foram obtidos a partir do cromatograma exposto na Figura 11.

4.2 – Comportamento da via de degradação de heme em resposta à SnPP-IX no intestino médio de *Rhodnius prolixus*

Quando comparamos os resultados obtidos a partir da alimentação com sangue contendo 330 μM de SnPP-IX, com a ingestão de sangue e PBS, podemos observar que a dieta enriquecida com a metaloporfirina resultou em alteração significativa do perfil cromatográfico, que pode ser notada principalmente através do aumento do pico do heme (Figura 15) e do intermediário I (Figura 16), além da redução do pico da biliverdina (Figura 17).

Este resultado é consistente com a identificação dos picos já caracterizados por Paiva-Silva *et al.*, ainda assim, em um esforço para aumentar a consistência desta anotação, podemos comparar os espectros de absorção de luz de cada componente da via de degradação de heme, e notar diferenças significativas. O efeito da SnPP-IX sobre os componentes da via, em posição anterior à atividade da heme-oxigenase, se acumulam, e os componentes posteriores à sua atividade, diminuem (Figura 18). Este efeito pode ser observado com clareza através da sobreposição de cada espectro.

Quando os insetos foram alimentados com diferentes concentrações de SnPP-IX, foi possível detectar uma inibição dose-dependente na quantidade de RpBv, quando se analisa o conteúdo da luz intestinal separada do epitélio (Figura 19 A). Por outro lado, o perfil observado nas amostras de epitélio isolado apresenta variações muito mais modestas na concentração de RpBv em resposta a SnPP-IX (Figura 19 B). O somatório das duas curvas mostra que o efeito global da SnPP-IX sobre a produção de RpBv no intestino é de inibição dose-dependente (Figura 19 C).

Além da inibição geral da produção de biliverdina, foi possível observar nas mesmas amostras, analisadas no comprimento de onda de 400 nm, o acúmulo de heme e dos picos I (Figura 20). Os picos classificados como I e II apresentaram banda de Soret evidente, além de acúmulo em resposta ao inibidor, representando possivelmente os intermediários da via de degradação anteriores à clivagem do anel porfirínico (Figura 18), o pico II, no entanto não apresentou um aumento estatisticamente significativo. A análise de dois outros picos majoritários nos cromatogramas de epitélio intestinal, anotados como A e B, e que também possuem banda de Soret, não apresentou alterações relevantes em função da ingestão de SnPP-IX, como pode ser observado na Figura 21.

A inibição da produção de RpBv foi acompanhada por um aumento na quantidade de heme livre, como esperado. Porém, o acúmulo de heme observado (Figura 20) foi muito mais acentuado nas amostras de epitélio intestinal isolado, que a inibição da produção de RpBv (Figura 19), fato que sugeriu a possibilidade de interferência em outra via de detoxificação de heme, a síntese de hemozoína, nos insetos alimentados com SnPP-IX.

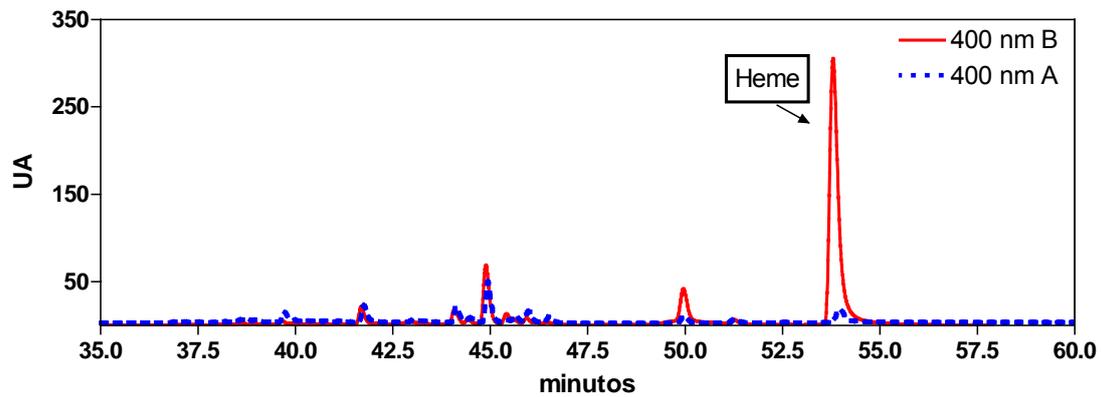


Figura 15- Efeito da SnPP-IX na via de degradação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*.

O acúmulo de heme pode ser observado após sobreposição dos perfis cromatográficos de epitélio intestinal de animais controle e experimental. Fêmeas adultas foram dissecadas no quarto dia após a alimentação com sangue diluído em PBS (A- controle) ou sangue adicionado com 330 μM de SnPP-IX (B). O homogeneizado de epitélio do intestino médio foi fracionado em coluna de fase reversa como descrito nos Material e Métodos. São mostrados os valores de absorvância obtidos a 400 nm.

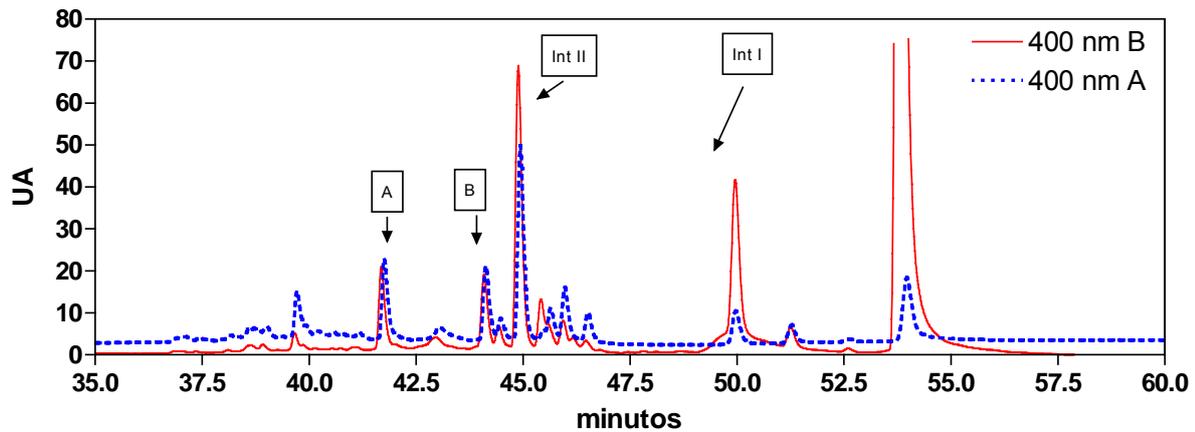


Figura 16- Efeito da SnPP-IX na via de degradação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*.

O acúmulo dos intermediários I e II pode ser observado após sobreposição dos perfis cromatográficos de epitélio intestinal de animais controle e experimental. Fêmeas adultas foram dissecadas no quarto dia após a alimentação com sangue diluído em PBS (A- controle) ou sangue adicionado com 330 μM de SnPP-IX (B). O homogeneizado de epitélio do intestino médio foi fracionado em coluna de fase reversa como descrito nos Material e Métodos. Os valores de absorbância obtidos a 400 nm.

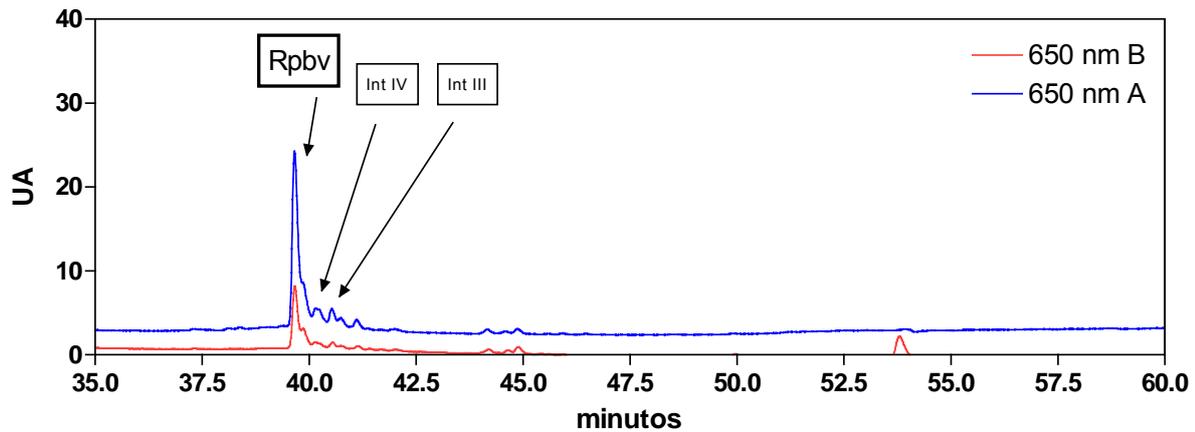


Figura 17- Efeito da SnPP-IX na via de degradação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*.

A inibição da produção de RpBv pode ser observada após sobreposição dos perfis cromatográficos de epitélio intestinal de animais controle e experimental. Fêmeas adultas foram dissecadas no quarto dia após a alimentação com sangue diluído em PBS (A- controle) ou sangue adicionado com 330 μM de SnPP-IX (B). O homogeneizado de epitélio do intestino médio foi fracionado em coluna de fase reversa como descrito nos Material e Métodos. São mostrados os valores de absorbância obtidos a 650 nm.

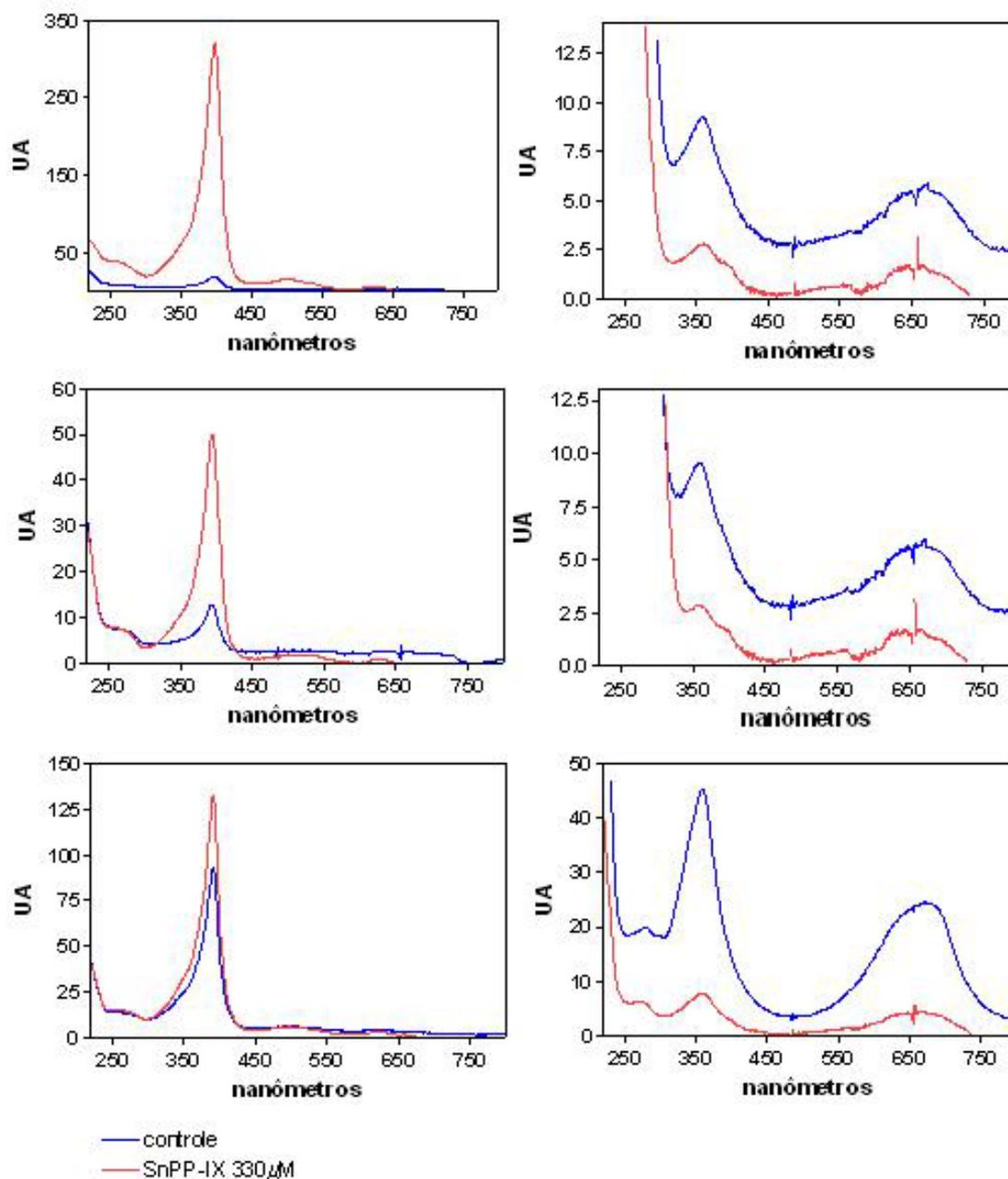


Figura 18 – Espectros de absorção de luz dos componentes da via de degradação de heme, após alimentação com SnPP-IX.

A- Heme; B- Intermediário I; C- Intermediário II; D- Intermediário III; E- Intermediário IV; F- RpBv. Os espectros de absorção de luz foram obtidos a partir dos cromatogramas expostos na Figura 15 e sugerem que estes picos representam os intermediários I, II, III e IV, já descritos por Paiva-Silva e cols. (2006).

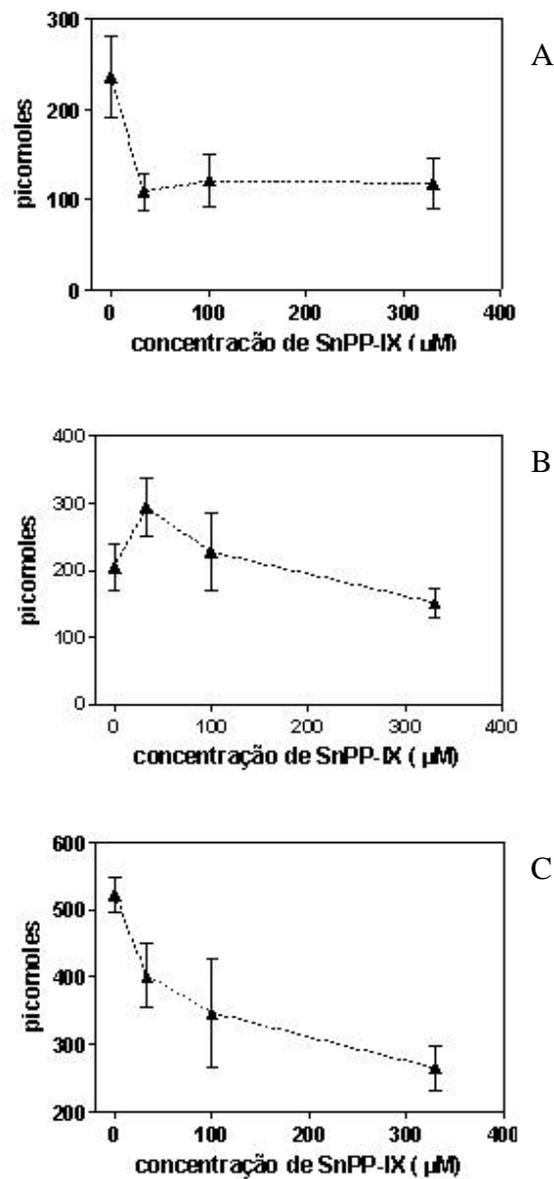


Figura 19– Efeito da Sn-PP IX na formação de RpBV no intestino médio de *Rhodnius prolixus*.

(A) RpBv na luz intestinal; (B) RpBv no epitélio intestinal; (C) conteúdo total de RpBv do intestino (A+B).

A área do pico a 650 nm foi utilizada para estimar a quantidade de RpBV presente nas amostras, como descrito em Material e Métodos. Os valores representam a média (\pm SEM) de 5 cromatogramas independentes.

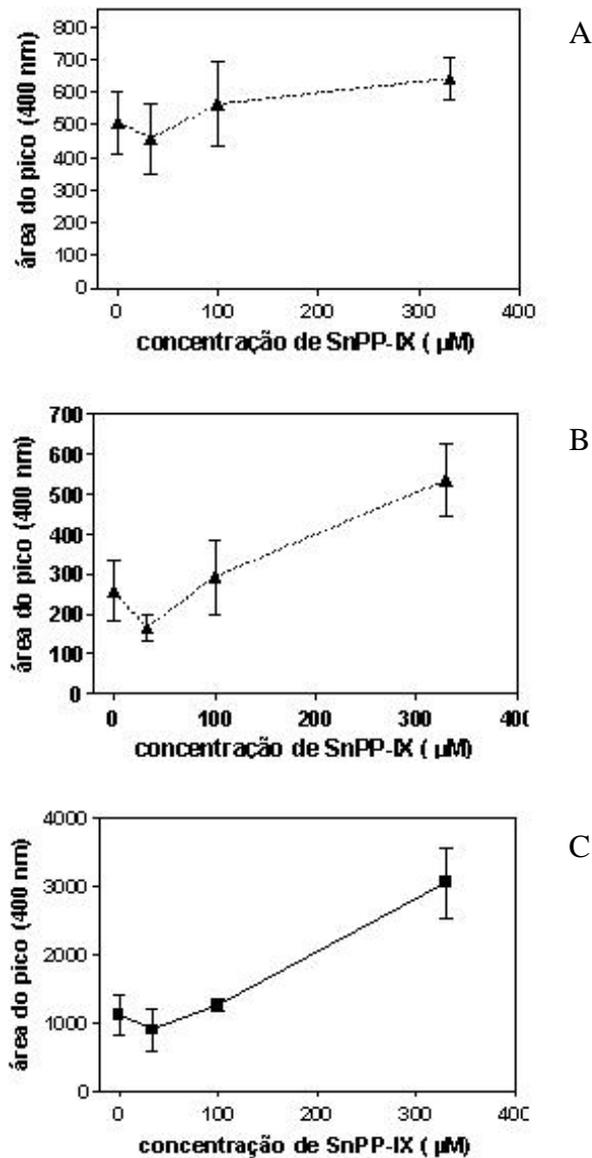


Figura 20– Efeito da SnPP-IX nos intermediários anteriores à atividade da heme-oxigenase presentes no epitélio do intestino médio de *Rhodnius prolixus*. (A) intermediário II; (B) intermediário I; (C) heme.

A área do pico a 400 nm foi utilizada para estimar a quantidade relativa de RpBV presente nas amostras. Os valores representam a média (\pm SEM) de 5 cromatogramas independentes.

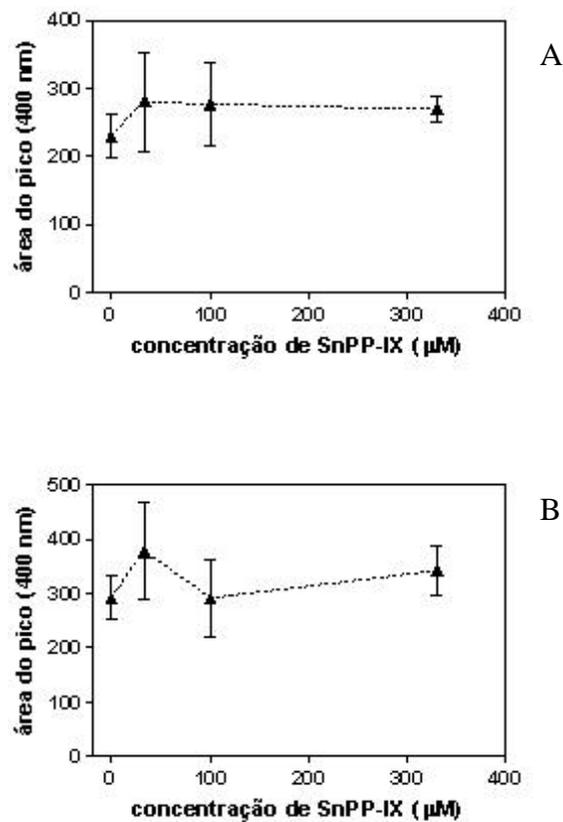


Figura 21- Comportamento dos picos A e B, nos animais alimentados com SnPP-IX.

Os valores de absorvância foram extraídos de cromatogramas similares ao descrito na Figura 16. São mostrados dados relativos a amostras de epitélio intestinal.

4.3 – Interação entre as principais vias de detoxificação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*

A síntese de hemozoína ocorre na luz do intestino médio de *Rhodnius prolixus* e é a principal via de detoxificação do heme proveniente da alimentação (Oliveira *et al.*, 1999; Graça-Souza *et al.* 2006; Silva *et al.* 2007). Decidimos avaliar a quantidade de hemozoína formada nos animais tratados com SnPP-IX, pois a inibição da via de degradação de heme, no epitélio, poderia permitir que quantidades maiores de heme fossem polimerizadas em hemozoína, no lúmen.

A análise cromatográfica das amostras do conteúdo da luz do intestino médio mostrou aumento na concentração de SnPP-IX, proporcional à dose administrada. Ao contrário do que esperávamos, a alimentação com SnPP-IX determinou uma inibição quase completa da formação de hemozoína *in vivo* (figura 22). Esta descoberta é o primeiro relato da ação da estanho-protoporfirina interferindo na polimerização de hemozoína *in vivo*.

O intestino médio do *Rhodnius prolixus* produz membranas perimicrovilares (PMVM), capazes de estimular a síntese de hemozoína (Oliveira *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007). Utilizando um ensaio de polimerização de hemozoína *in vitro*, contendo uma fração enriquecida de PMVM obtida de animais alimentados com plasma de coelho, foi possível demonstrar um efeito inibitório direto da SnPP-IX sobre a síntese de hemozoína (Figura 23).

O efeito da SnPP-IX sobre a formação de hemozoína nos levou a analisar o que poderia acontecer com a via de degradação, na presença de um interferente clássico da polimerização de heme. Para isso, realizamos um

experimento em que os insetos foram alimentados com sangue adicionado de 100 μ M de cloroquina. A sobreposição do cromatograma de epitélio intestinal de um animal alimentado com sangue e PBS, com o cromatograma de um animal alimentado com sangue e cloroquina representa o efeito inibitório desta droga sobre todos os componentes da via de degradação de heme (Figura 24), resultando em consequente inibição da produção de RpBv (Figura 25).

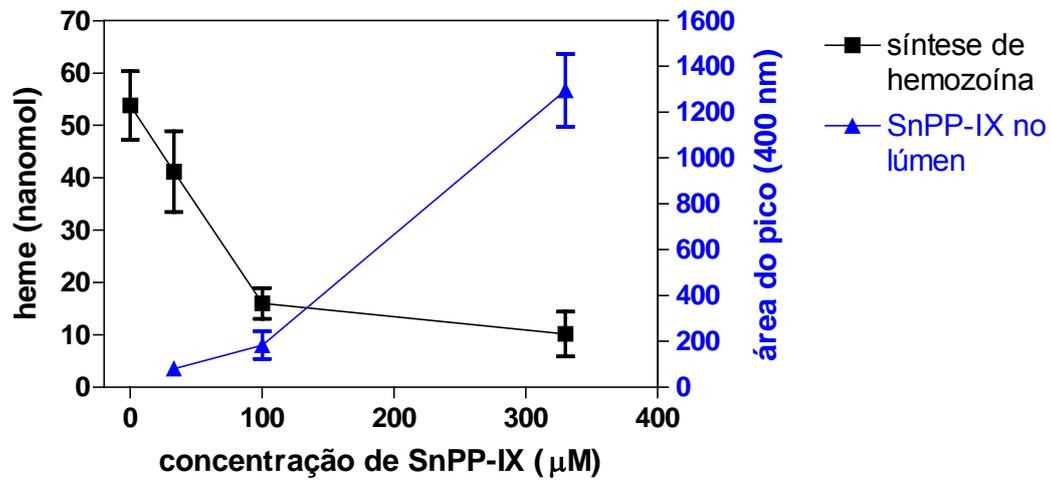


Figura 22 – Aumento da concentração de SnPP-IX na luz intestinal e inibição da polimerização de heme pela SnPP-IX *in vivo*.

Fêmeas adultas foram alimentadas com sangue enriquecido com diferentes concentrações de SnPP-IX. O conteúdo da luz intestinal foi obtido como descrito em Material e Métodos e a quantidade de SnPP-IX foi avaliada por cromatografia em fase reversa, a partir dos valores de absorvância a 400 nm. A quantidade de heme aferida sob a forma de hemozoína foi medida como descrito nos Métodos. Os dados mostrados são a média \pm SEM (n=6).

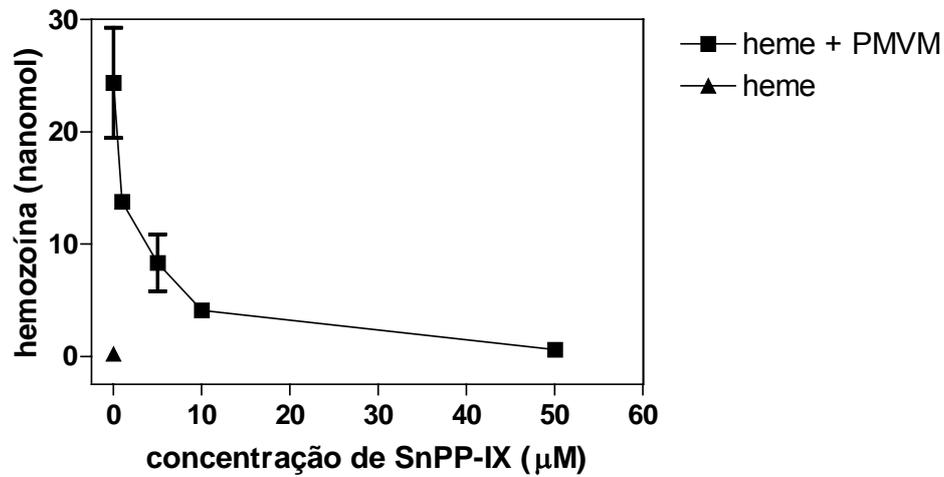


Figura 23- Inibição da cristalização de heme *in vitro* pela SnPP-IX na presença de membranas perimicrovilares (PMVM) de *Rhodnius prolixus*.

Uma preparação de PMVM, contendo 100 µg de proteína, foi incubada na presença de 100 µM de heme e diferentes concentrações de SnPP-IX (■), como descrito em Métodos. Um controle foi realizado na ausência de PMVM (▲).

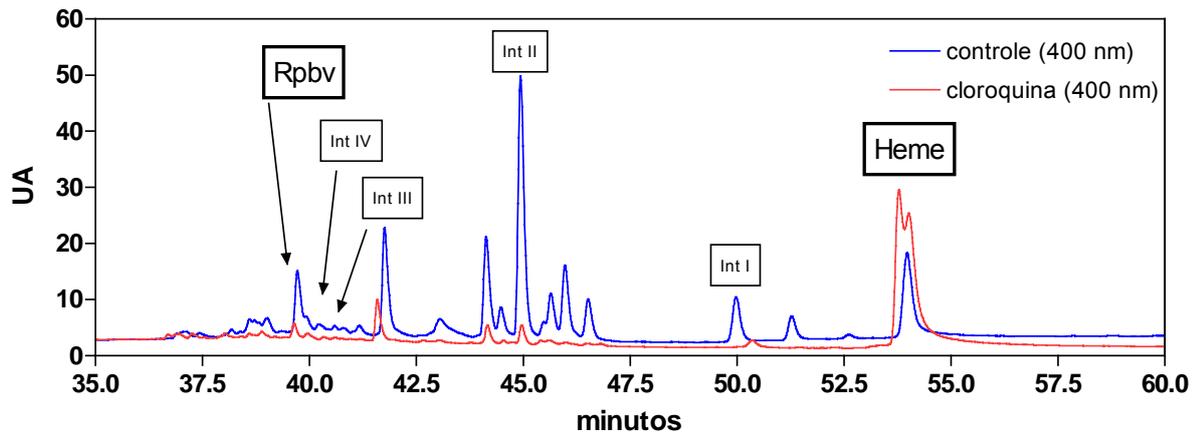


Figura 24- Efeito da cloroquina sobre a via de degradação de heme.

Fêmeas adultas foram alimentadas com sangue adicionado de 100 μ M de cloroquina. O epitélio foi dissecado e as amostras processadas como descrito em Material e Métodos. A sobreposição de um cromatograma típico deste experimento e de animais controle é mostrada, com os valores de absorvância a 400 nm utilizados para registro.

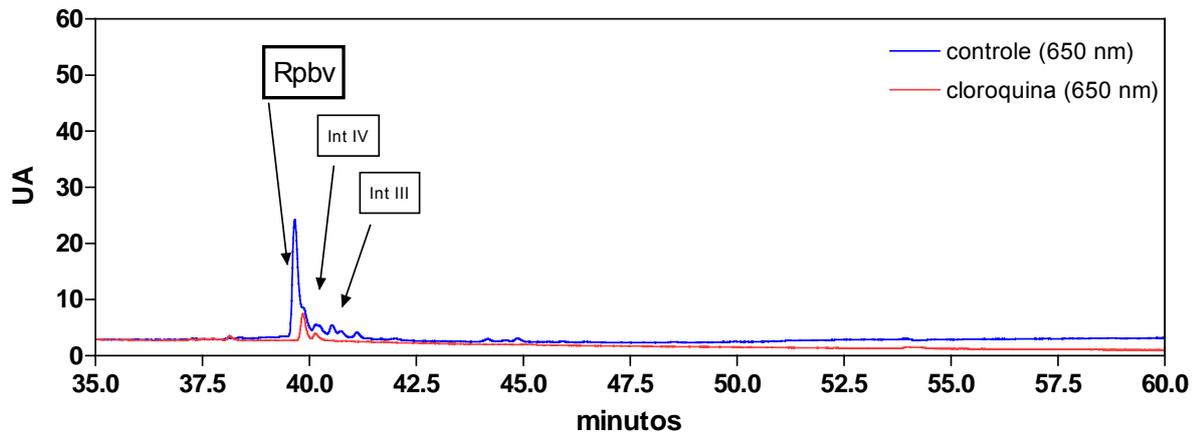


Figura 25- Efeito da cloroquina sobre a produção de Rpbv.

Fêmeas adultas foram alimentadas com sangue adicionado de 100 μ M de cloroquina. O epitélio foi dissecado e as amostras processadas como descrito em Material e Métodos. A sobreposição de um cromatograma típico deste experimento e de animais controle é mostrada com os valores de absorbância a 650 nm utilizados para registro.

4.4 – Papel fisiológico das vias de detoxificação de heme em *Rhodnius prolixus*

Tendo em vista o caráter pró-oxidante do heme e considerando o efeito inibitório sobre a via de produção de RpBv e sobre a síntese de hemozoína, decidimos investigar se a interferência simultânea nestes mecanismos de detoxificação seria capaz de determinar dano oxidativo ao tecido epitelial. Os resultados expostos na Figura 26 demonstram que a peroxidação lipídica no intestino médio aumentou significativamente de acordo com a atividade duplamente inibitória da estanho-protoporfirina.

Apesar de existirem mecanismos de detoxificação bastante sofisticados no trato digestivo de *Rhodnius prolixus*, parte do heme liberado em condições normais, durante o processo digestivo, atravessa a barreira intestinal e atinge a hemolinfa (Dansa-Petretsky *et al.*, 1995). A presença de apoRHBP, uma proteína de ligação a heme presente na hemolinfa, permite uma forma de defesa antioxidante, protegendo o tecido do inseto contra o estresse oxidativo. A associação do heme a RHBP da hemolinfa foi acompanhada através da leitura do espectro de absorção de luz, e a absorbância máxima em 412 nm, foi utilizada como registro do experimento. A hemolinfa dos animais alimentados com sangue adicionado com SnPP-IX apresentou menos sítios de ligação a heme disponíveis em relação ao controle, sugerindo um maior aporte de heme para a hemolinfa (Figura 27).

A presença de RHBP associada ao heme (holo-RHBP) é responsável pela coloração rosada dos ovócitos de *Rhodnius prolixus*. A RHBP é acumulada pelos ovócitos em crescimento através de endocitose mediada por

receptor e é direcionada aos grânulos de vitelo (Machado *et al.*, 1998). Embora outros órgãos e tecidos possam incorporar a RHBP, o ovário é o órgão mais requisitado para o acúmulo de RHBP. A oviposição das fêmeas foi avaliada sob a influência da SnPP-IX. Nossos resultados mostraram que a produção de ovos diminuía de acordo com a quantidade de SnPP-IX administrada (Figura 28), mostrando que os efeitos deletérios da droga sobre o inseto não estão limitados ao intestino.

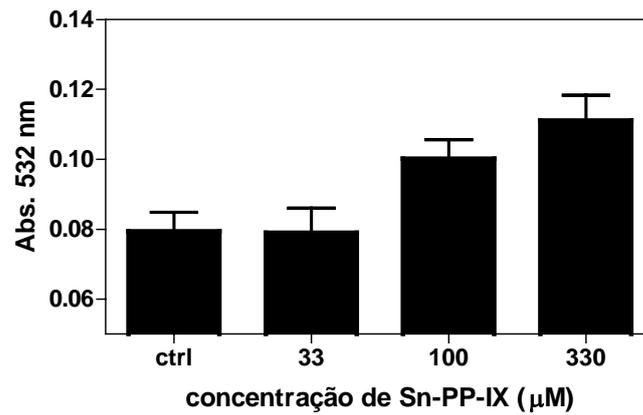


Figura 26- Dano oxidativo no epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus* sob o efeito da SnPP-IX.

Fêmeas adultas foram alimentadas com sangue enriquecido com diferentes concentrações de SnPP-IX. Os epitélios foram dissecados e os níveis de peroxidação lipídica foram avaliados pela formação de TBARS, como descrito em Material e Métodos. Os dados mostrados são médias \pm SEM (n=8). (*) $p < 0.05$ comparando com o controle (Teste de Bonferroni).

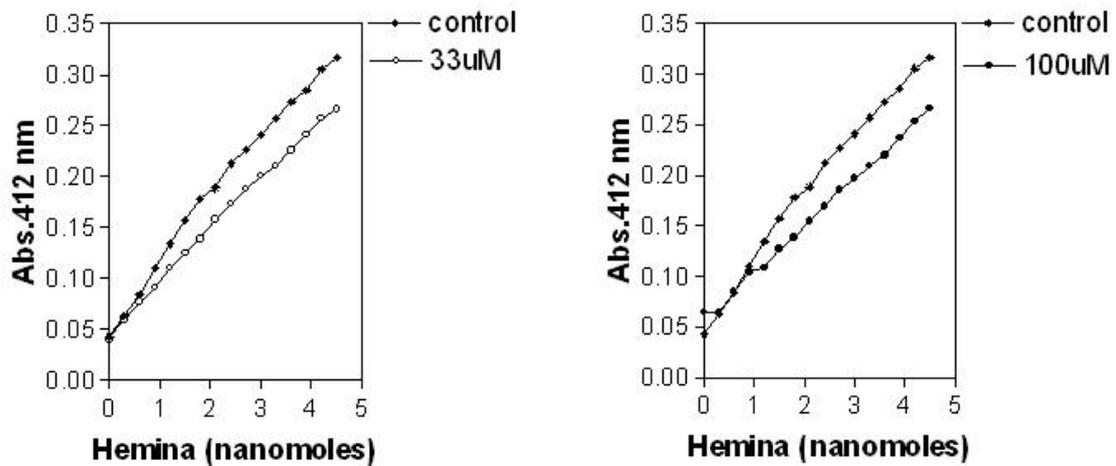


Figura 27- Titulação de heme-proteínas da hemolinfa de *Rhodnius prolixus* alimentados com SnPP-IX

Fêmeas adultas foram alimentadas com sangue (controle), e sangue enriquecido com 33 μM (A) e 100 μM (B) de SnPP-IX. As amostras de hemolinfa (1 μL) foram tituladas com heme medindo-se a absorvância a 412 nm.

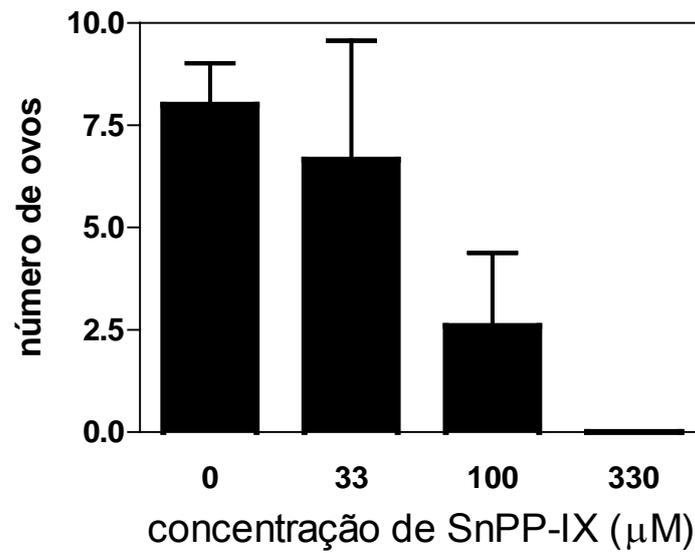


Figura 28- Efeito da SnPP-IX na oviposição de *Rhodnius prolixus*.

Fêmeas adultas foram alimentadas com sangue enriquecido com diferentes concentrações de SnPP-IX e o número de ovos postos foi contado. Os dados mostrados são média \pm SEM (n=5).

DISCUSSÃO

5.1 – Hematofagia, biossíntese e degradação de heme em diferentes organismos

A digestão de sangue em insetos hematófagos proporciona uma enorme quantidade de heme livre, que é liberado no trato digestivo durante a proteólise da hemoglobina. Braz e colaboradores (1999; 2001) demonstraram que o barbeiro *Rhodnius prolixus* possui a via de biossíntese de heme completamente operante (Braz *et al.*, 2001), mesmo diante da possibilidade de absorção de heme proveniente da dieta. Vale ressaltar que existem organismos hematófagos que perderam a capacidade de sintetizar este grupamento prostético ao longo da evolução, como é o caso do carrapato *Boophilus microplus* e alguns tripanossomatídeos e bactérias patogênicas (Braz *et al.*, 1999).

O heme (ferro-protoporfirina IX) é um tetrapirrol contendo um íon central de ferro, sendo considerado, por diversos autores, uma molécula ubíqua na natureza essencial à vida de diversos organismos. Ele pode participar como grupo prostético em proteínas e também pode atuar como molécula sinalizadora, controlando eventos celulares e moleculares fundamentais, como o empacotamento de proteínas complexas ou transdução de sinais (Beale & Yeh, 1999; Halliwell & Gutteridge, 1999; Mense & Zhang, 2006).

As vias de biossíntese e degradação de heme estão intimamente ligadas à ciclagem do ferro intracelular, e em determinadas etapas geram espécies reativas de oxigênio (EROs) afetando o metabolismo oxidante celular. Além disso, a molécula de heme em estado livre representa um perigo em potencial, pois pode

promover efeitos deletérios como o dano oxidativo a membranas (Ryter & Tyrrell, 2000).

Tanto a biliverdina quanto a bilirrubina são pigmentos derivados da degradação do heme, em uma via que também pode ser notada através da mudança de cores, que variam desde o vermelho (heme), passando pelo verde-azulado (biliverdina), até o amarelo-dourado (bilirrubina), refletindo a sequência de reações catalisadas pelas enzimas heme-oxigenase e biliverdina redutase, respectivamente (Milgrom, 1997, McDonagh, 2001).

A enzima microssomal heme-oxigenase tem sido estudada extensivamente em diferentes modelos. Além de ser um importante mecanismo intracelular de controle da homeostase de heme e ferro, a heme-oxigenase possui um papel importante como mecanismo antioxidante e em eventos de sinalização celular que empregam CO como mensageiro (Ryter & Tyrrell, 2000; Converso, *et al.*, 2006).

Em um estudo pioneiro sobre a hematofagia, Wigglesworth (1943) descreveu a presença de pigmentos verdes nas células pericardiais e no epitélio intestinal de *R. prolixus*, sugerindo a presença de biliverdinas. De fato, Paiva-Silva *et al.* (2006) demonstraram a existência de um pigmento biliar no coração e no trato digestivo durante o jejum (Figura 7 A e B), já se sabe que a coloração verde típica destes órgãos se deve à presença da RpBv. Este pigmento é o produto final de uma via complexa de degradação de heme, única nos sistemas biológicos descritos até o momento. Naquela ocasião, em estudo realizado sobre a degradação de heme no coração do inseto, foram identificados quatro intermediários entre o heme e seu produto final de degradação em *Rhodnius*, a dicisteinil-biliverdina IX-γ ou RpBv (Figura 6) (Paiva-Silva *et al.* 2006).

A heme-oxigenase ainda não foi identificada no barbeiro, porém Paiva-Silva e colaboradores (2006) demonstraram que existe uma etapa na via de degradação de heme em *R. prolixus*, localizada entre o segundo e o terceiro intermediário, onde ocorre a clivagem oxidativa do anel porfirínico e consequente liberação do íon ferroso e monóxido de carbono (Figura 6).

Neste trabalho procuramos investigar o funcionamento da via de degradação de heme no intestino médio de *Rhodnius prolixus*, além de verificar a sua significância fisiológica como um mecanismo de detoxificação do heme proveniente da digestão.

Em um fracionamento por cromatografia de fase reversa, utilizando-se um gradiente de acetonitrila como fase móvel, os componentes da via de degradação são separados de acordo com a sua hidrofobicidade (Figura 11). Embora o perfil geral obtido, nas amostras de epitélio intestinal, seja semelhante àquele descrito por Paiva-Silva e cols. (2006) no coração, foi possível identificar dois picos que apresentavam espectro de biliverdina, além da RpBv (Figura 13), que foram identificados tentativamente como intermediários III e IV. Estes picos não eram visíveis nos cromatogramas daquele trabalho, quando sua identificação foi realizada utilizando-se uma coluna capilar em nano-HPLC acoplado a um espectrômetro de massa, para identificação. Provavelmente, o coração possui a via de degradação de heme funcionando em menor intensidade, comparado ao intestino, fato que explicaria esta observação.

Além da identificação dos intermediários I e II (Figuras 11 e 12), a diferença mais significativa, no entanto, foi a identificação de cinco outros picos, com banda de Soret característica, denominados A, B, C, D e E, que estavam presentes nos

cromatogramas de epitélio do intestino médio de *Rhodnius prolixus* (Figuras 11 e 14). Os intermediários I e II desta via são mais hidrofílicos que o heme porque foram modificados em uma etapa anterior à clivagem oxidativa do anel porfirínico, através da adição de um (intermediário I), ou dois resíduos de cisteinil-glicina (intermediário II) (Figura 6). Esta alteração na estrutura do heme nunca tinha sido descrita até então, e o envolvimento de uma glutathione S-transferase tem sido proposto como uma hipótese que permitiria a transferência de resíduos de glutathione, um tripeptídeo composto por ácido glutâmico, glicina e cisteína, seguida pela ação de uma peptidase envolvida na retirada do ácido glutâmico. No trabalho de Paiva-Silva e cols. (2006) não foi possível identificar estes intermediários e é possível que os picos aqui denominados A, B, C, D e E representem intermediários ainda não descritos. Neste caso poderia ser possível que a remoção dos resíduos de ácido glutâmico acontecesse tanto após a adição da segunda glutathione, como antes. A caracterização destas substâncias por espectrometria de massas permitiria saber com precisão o mecanismo de preparação da molécula de heme para a clivagem oxidativa, no entanto ainda não obtivemos sucesso neste experimento. Porém essa abordagem será necessária para a confirmação da existência e caracterização definitiva dos intermediários desta via, em amostras de epitélio de intestino médio.

5.2 – O papel da SnPP-IX nas principais vias de detoxificação de heme

A estanho-protoporfirina é uma metaloporfirina amplamente utilizada em estudos envolvendo a atividade da enzima heme-oxigenase, também sendo usada

em trabalhos de caracterização de outras heme-proteínas como a óxido nítrico sintase e a guanilato ciclase (Drummond & Kappas, 1981; Ignarro *et al.*, 1984; Appleton *et al.*, 1999).

Seguindo os dados de um recente trabalho publicado por nosso grupo (Lara *et al.*, 2005), que utilizava a globina como veículo de metaloporfirinas em estudos de microscopia de fluorescência, encontramos uma alternativa viável para o desenvolvimento deste trabalho. Lara e colaboradores utilizaram uma adaptação do protocolo de Teale (1959) que retira o heme da hemoglobina utilizando metil-etil-cetona, um composto orgânico que, adicionado à solução de hemoglobina, promove o fracionamento do heme na fase orgânica e da globina na fase aquosa. Desta forma é possível renaturar a globina, após diálise em água e adicioná-la em uma solução de metaloporfirinas diluída em DMSO (Figura 8). Assim foi possível utilizar o arcabouço protéico da globina como veículo de metaloporfirinas.

O produto final da adaptação do protocolo de Teale era a globina renaturada que continha estanho-protoporfirina no sítio antes ocupado pelo heme. Esta molécula foi chamada de estanho-globina ao longo deste trabalho e foi considerada uma alternativa viável de inserção de metaloporfirinas, em dietas experimentalmente modificadas para estudos em animais hematófagos.

Quando a estanho-protoporfirina-IX foi administrada através de um sistema de alimentação artificial, observamos um acúmulo significativo de heme no epitélio intestinal de *Rhodnius prolixus* quando comparados com animais controle (Figuras 15, 18 e 20C). O intermediário I também mostrou aumento, o que seria esperado, uma vez que estas moléculas estão presentes na via de degradação de heme, em uma etapa anterior à clivagem oxidativa (Figuras 16, 18, 20A e 20B). A produção

de RpBv sofreu inibição significativa (Figuras 17, 18 e 19), assim como os intermediários III e IV, embora nestes casos os níveis de absorvância sejam reduzidos o bastante para tornar a quantificação imprecisa (Figura 18).

A alimentação de fêmeas de *R. prolixus* com sangue contendo diferentes concentrações de SnPP-IX foi analisada separadamente na luz do intestino médio e no epitélio do intestino médio, após dissecação cuidadosa do trato digestivo. Após análise da curva de concentração de SnPP-IX na luz do intestino, pode-se perceber que a produção de RpBv sofreu uma inibição significativa em todos os pontos da curva (Figura 19 A), porém quando analisamos as amostras de epitélio intestinal isoladamente, observamos um efeito bem mais modesto do inibidor (Figura 19 B). O somatório das duas curvas representa a produção total de RpBv no intestino médio, mostrando um efeito de inibição dose-dependente ao longo da curva de concentração de SnPP-IX (Figura 19 C). Estes resultados poderiam ser explicados pela formação intracelular de RpBv, seguida de secreção para a luz do intestino através de algum sistema de transporte utilizado apenas a partir de uma determinada concentração, pois enquanto a curva obtida na luz do intestino apresentou um perfil de queda na excreção desde o ponto contendo 33 μ M de SnPP-IX, a curva obtida nas amostras de epitélio apresentou a manutenção da concentração de RpBv intracelular praticamente estável (Figura 19).

Seguindo na tentativa de identificar a existência de intermediários desta via de degradação, que ainda não foram descritos, analisamos o comportamento dos picos denominados A e B, com banda de Soret característica, presentes nos cromatogramas de epitélio do intestino médio de *Rhodnius prolixus* (Figuras 21 A

e B). Estas substâncias sofreram pequena alteração neste experimento, fato que pode ser explicado por eles não pertencerem à via de degradação. Esta pergunta só poderá ser respondida após análise dos picos A, B, C, D e E, por espectrometria de massas.

A inibição da produção de RpBv (Figura 19) deveria permitir que quantidades maiores de heme fossem detoxificadas por outras vias. A maior parte da detoxificação de heme no intestino médio de *R. prolixus* é alcançada externamente, através da polimerização do heme livre presente no conteúdo da luz intestinal (Oliveira *et al.*, 1999; Graça-Souza *et al.* 2006; Silva *et al.* 2007). No entanto, a produção de hemozoína diminuiu na mesma proporção de SnPP-IX adicionada (figura 25), sugerindo um efeito inibitório duplo do análogo de heme em duas vias principais de detoxificação de heme. Esta descoberta é o primeiro relato da ação da estanho-protoporfirina interferindo na polimerização de hemozoína *in vivo*. Porém, um artigo previamente publicado por Cole e colaboradores (2000) já havia demonstrado o efeito de metaloporfirinas inibindo a síntese de β -hematina (hemozoína) *in vitro*, a 60° C, incubando 10 mM de heme na presença de 12 M de acetato de sódio, a pH 4,8. Os nossos dados de polimerização de heme *in vitro* (Figura 26) foram feitos em condições mais brandas, próximas de uma situação fisiológica (37° C, 100 μ M de heme, pH 4,8 e 0,5 M de tampão acetato). No entanto, a maior diferença quando comparamos as condições experimentais dos nossos experimentos com as de Cole e cols. (2000), reside no emprego de uma preparação de membranas perimicrovilares (PMVM), obtidas do intestino de animais alimentados com plasma, as quais possuem capacidade de induzir a

síntese de hemozoína (Oliveira *et al.*, 2000; Silva *et al.*, 2007). Utilizando nosso sistema de polimerização *in vitro*, a SnPP-IX apresentou forte atividade de inibição da formação de hemozoína, com aproximadamente 50% de inibição sendo obtido com apenas 1 μ M da metaloporfirina.

A formação de hemozoína é um processo que acontece *in vivo*, mas suas bases moleculares ainda são um assunto bastante discutido entre os pesquisadores da área. Relatos da literatura, publicados nos últimos 20 anos, sugerem a possibilidade da formação de hemozoína decorrer de um processo autocatalítico, dependente da existência de hemozoína pré-formada (Egan, *et al.*, 2001), alguns trabalhos também sugerem que a agregação de heme seria dependente da presença de fosfolipídeos (Oliveira *et al.*, 2005), hipótese esta que foi reforçada pela demonstração de que a formação de hemozoína é muito aumentada em interfaces hidrofóbicas/hidrofílicas (Correa-Soares *et al.*, 2007).

Os trabalhos de Egan e cols. e de Hempelmann e cols. discutem que o primeiro passo para a formação deste pigmento é a remoção da água da aquaferritoproporfirina IX, que provavelmente é conduzida por lipídios. O ambiente lipídico pode prover condições que favorecem a formação da ligação carboxilato-ferro do dímero da β -hematina. A formação desta ligação em soluções aquosas tem uma energia de ativação alta que requer condições não-fisiológicas de temperatura e força iônica para promover a formação de cristais de hemozoína *in vitro*. Em soluções aquosas, a alta concentração de água (55.5 M) pode competir com os grupos carboxilatos pelos centros Fe(III). Então a formação da ligação ferro-carboxilato provavelmente é termodinamicamente desfavorável. Em

um ambiente hidrofóbico, a ligação ferro-carboxilato se torna mais estável devido à baixa concentração de água e isto pode contribuir para uma redução significativa da energia de ativação, fato que favorece o papel de lipídios promovendo a ligação de hidrogênio entre as cadeias laterais do propionato, provendo rigidez e complexidade para os cristais de hemozoína em formação (Hempelmann, 2007).

Por outro lado, Sullivan e cols. (1996) mostraram que uma proteína rica em histidina, presente no vacúolo digestivo de *Plasmodium*, era capaz de promover a formação de hemozoína *in vitro*, dado que foi questionado mais tarde, uma vez que o nocaute do gene desta proteína não impediu a formação da hemozoína *in vivo* (Akompong *et al.*, 2002). Mais recentemente, a proposta de envolvimento de uma proteína como catalisador da formação de hemozoína em *P. falciparum* ganhou força após a descoberta da HDP, cujo nocaute resultou em linhagens do protozoário incapazes de formar hemozoína *in vivo* (Bonilla *et al.*, 2007). A inibição da formação de hemozoína pela SnPP-IX reforça a proposição original de nosso grupo, de que um componente protéico das membranas perimicrovillares esteja envolvido, uma vez que a inibição da formação de hemozoína é obtida em uma reação com um excesso molar de heme, cinquenta vezes maior que a quantidade de SnPP-IX, fato que pode ser explicado pela ligação desta metaloporfirina em sítios específicos, presentes em baixa concentração, essenciais para a formação do agregado (Figura 26).

A demonstração do efeito inibidor da SnPP-IX sobre a formação de hemozoína, por outro lado, nos levou a procurar relacionar as duas vias de detoxificação de heme, através da administração de cloroquina, um inibidor da formação de hemozoína (Egan *et al.*, 2005). Mais uma vez, também esperávamos

que a inibição de uma via de detoxificação de heme, neste caso a síntese de hemozoína permitiria maior fluxo de heme para a via de degradação. Porém nossos resultados mostraram inibição da via de degradação de heme, determinando redução de todos os componentes da via, com exceção do próprio heme (Figuras 22, 23 e 24). Esse resultado poderia ser explicado através da ligação da cloroquina com o heme livre na luz do intestino, que poderia impedir a entrada de heme no epitélio intestinal. Por outro lado, também seria possível que a cloroquina se associasse com o heme e os demais intermediários impedindo sua modificação e quebra durante as principais etapas da via de degradação.

5.3 – A importância fisiológica das principais vias de detoxificação de heme

O grupamento heme é conhecido por promover a formação de radicais livres em soluções aquosas, participa da formação de espécies reativas e pode se associar a membranas fosfolipídicas alterando a estrutura da bicamada e levando ao rompimento das células (Halliwell & Gutteridge, 1999; Ryter & Tyrrel, 2000). Tappel demonstrou (1953, 1955) que ácidos graxos poli-insaturados podem ser oxidados através de um mecanismo de decomposição de peróxidos orgânicos em reação catalisada por hematina. Neste mecanismo, a hematina catalisa a cisão hemolítica de um peróxido orgânico para formar radical alcóxil e radical hematina, sem modificações na valência do ferro.

O efeito duplamente inibitório da SnPP-IX sobre dois dos principais mecanismos de detoxificação de heme nos levou a investigar o dano oxidativo causado por essa droga, através da análise dos níveis de peroxidação lipídica

causada pelo estresse oxidativo no epitélio intestinal. Os resultados expostos na figura 27 apresentaram um aumento significativo de peroxidação lipídica no intestino médio, em uma relação dose dependente. O aumento da peroxidação lipídica observado principalmente nos pontos mais altos da curva de concentração de SnPP-IX comprovaram a importância do funcionamento do sistema de degradação de heme e da polimerização de hemozoína, localizados no trato digestivo de *Rhodnius prolixus*, como barreiras importantes desenvolvidas contra um hábito alimentar pró-oxidante. Neste momento passamos a lidar com a hipótese de maior absorção de heme, aumentando o fluxo deste grupamento prostético até outros órgãos do inseto.

Em situações normais, apesar de toda a maquinaria de detoxificação adquirida pelo *R. prolixus*, alguma quantidade de heme atravessa a barreira do trato digestivo e atinge a hemolinfa, onde a disponibilidade de apo-RHBP neste tecido é uma importante defesa contra a toxicidade de heme livre (Dansa-Petretski, *et al.*, 1995). Nós medimos a capacidade de ligação de heme a proteínas da hemolinfa com o objetivo de avaliar o fluxo de heme do intestino médio para a hemolinfa. Quando a hemoína está ligada a proteínas, o coeficiente de extinção máxima está em 412 nm e a saturação da apo-proteína é demonstrada por uma diminuição do coeficiente de extinção neste comprimento de onda (Figura 28 A e B). A hemolinfa dos animais experimentais apresentou uma baixa capacidade de ligação de heme, sugerindo saturação da RHBP, fato que seria consistente com um grande aporte do heme, proveniente da dieta, para a hemolinfa.

Machado e colaboradores (1988) demonstraram que a disponibilidade de holo-RHBP, na presença de níveis normais de vitelogenina e lipoforina, estimula a produção de ovos. Contrariamente, a observação da oviposição em fêmeas adultas alimentadas com sangue e SnPP-IX revela que estes animais põem um número bastante inferior de ovos e, nos casos onde a concentração de SnPP-IX presente na dieta é mais elevada ($330\mu\text{M}$), não ocorre oviposição (Figura 29). Este fato pode ser explicado através do dano promovido pelo estresse oxidativo ou possivelmente pela entrada de SnPP-IX na hemolinfa, onde poderia ocorrer interação entre este análogo de heme com a apo-RHBP, causando interferência no transporte do heme para outros tecidos. Uma explicação alternativa para este fato seria a necessidade da atividade da heme oxigenase nos ovários em desenvolvimento, representando um possível fator importante para a oviposição.

REFERÊNCIAS

Aft R. L.; Mueller, G. C. (1983). Hemin mediated DNA strand scission. *J. Biol. Chem.* 19: 12069 – 12072

Ambrose, D. P. (2000). Assassin Bugs (Reduviidae excluding Triatominae), p. 695-712. In: C. W. Schaefer & A. R. Panizzi (eds.). *Heteroptera of economic importance*. CRC Press, Boca Raton, U. S. A., 828p.

Appleton, S. D., Chretien, B. E., McLaughlin, B. E., Vreman, H. J., Stevenson, D. K., Brien, J. F., Nakatsu, K., Maurice, D. H., Marks, G. S. (1999) Selective inhibition of heme oxygenase, without inhibition of nitric oxide synthase or soluble guanylyl cyclase, by metalloporphyrins at low concentrations. *Drug metabolism and disposition.* 27(10): 1214-1219.

Atella, G. C., Gondim, K. C., Machado, E. A., Medeiros, M. N., Silva-Neto, M. A. C., Masuda, H. (2005) Oogenesis and egg development in triatomines: a biochemical approach. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 77(3):405-430

Beale, S. I., Yeh, J. I. (1999). Deconstructing heme. *Nature Structural Biology.* Vol.06(10): 903-5

Billingsley, P. F., Downe, A. E. (1989). The effects of artificial diets on the anterior intestinal cell ultrastructure of *Rhodnius prolixus* (Hemiptera:Reduviidae). *Int J Parasitol.* 19(3):291-9.

Braz, G. R., Abreu, L., Masuda, H., Oliveira, P. L. (2002) Rhodnius heme-binding protein (RHBP) is a heme source for embryonic development in the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus* (Hemiptera, Reduviidae). *Insect Biochem Mol Biol.* 2002 Apr;32(4):361-7.

Braz, G. R., Abreu, L., Masuda, H., Oliveira, P. L. (2001). Heme biosynthesis and oogenesis in the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Insect Biochem Mol Biol.* 2001 Mar 15;31(4-5):359-64.

Braz, G. R., Coelho, H. S., Masuda, H., Oliveira, P. L. (1999). A missing metabolic pathway in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Curr Biol.* 1999 Jul 1;9(13):703-6

Brown, W. H. (1911) Malarial pigment (so-called melanin): its nature and mode of production. *J Exp Med* 13:290-300

Carbone, T. (1891) Sulla natura chimica del pigmento malarico. *G R Accad Med Torino* 39:901-906

Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Hydrogen peroxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Ver* 59:527-625

Chaves, L. F., Hernandez M. J., Revilla T. A., Rodriguez D. J., Rabinovich J. E. (2004). Mortality profiles of *Rhodnius prolixus* (Heteroptera: Reduviidae), vector of Chagas disease. *Acta Trop.* 92(2):119-25.

Chen, M. M., Shi, L., Sullivan Jr., D. J. (2001) *Haemoproteus* and *Schistosoma* synthesize heme polymers similar to *Plasmodium* hemozoin and β -hematin. *Mol. Biochem. Parasitol.* 113, 1-8.

Chou, A. C., Fitch, C. D. (1980). Hemolysis of mouse erythrocytes by ferriprotoporphyrin IX and chloroquine. Chemotherapeutic implications. *J. Clin. Invest.* 66(4):856-8.

Converso, D. P., Taillé, C., Carreras, M. C., Jaitovich, A., Poderoso, J. J., Boczkowski, J. (2006) HO-1 is located in liver mitochondria and modulates mitochondrial heme content and metabolism. *FASEB Journal* 20(8): 1236-8

Dansa-Petretski, M., Ribeiro, J. M. C., Atella, G. C., Masuda, H., Oliveira, P. L. (1995). Antioxidant Role of *Rhodnius prolixus* Heme-binding Protein: Protection against heme-induced lipid peroxidation. *J Biol Chem*,270, 10893-10896

Drummond, G. S., Kappas, A. (1981) Prevention of neonatal hyperbilirubinemia by tin protoporphyrin IX, a potent competitive inhibitor of heme oxidation. *PNAS* 78(10): 6466-6470.

Dunkov, B. Georgieva, T., (2006). Insect iron binding proteins: Insights from the genomes. *Insect biochemistry and molecular biology*.

Edwards, J. S. (1998). Sir Vincent Wigglesworth and the coming age of insect development. *Int. J. Dev. Biol.* 42: 471-473

Egan, T. J. (2002) Physico-chemical aspects of hemozoin (malaria pigment) structure and formation. *J Inorg Biochem* 91:19-26

Falk, J. E. (1964). *Porphyrins and Metalloporphyrins*. Elsevier, Amsterdam p181-188.

Fitch, C. D. & Kanjananggulpan, P. (1987). The state of ferriprotoporphyrin IX in malaria pigment. *J Biol Chem* 262:15552-15555.

Fitch, C. D. (2004) Ferriprotoporphyrin IX, phospholipids, and the antimalarial actions of quimoline drugs.

García, B. A., Moriyama, E. N., Powell, J. R. (2001). Mitochondrial DNA Sequences of Triatomines (Hemiptera: Reduviidae): Phylogenetic Relationships. *Entomological Society of America*, (38):675-83

Gaunt, M. and Miles, M. The ecotopes and evolution of Triatomine bugs (Triatominae) and their associated trypanosomes. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. Vol 95(4):557-565.

Graça-Souza, A. V., Maya-Monteiro, C., Paiva-Silva, G. O., Braz, G. R., Paes, M. C., Sorgine, M. H., Oliveira, M. F., Oliveira, P. L. (2006). Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. Insect Biochem Mol Biol. 36(4):322-35.

Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C. (1999) Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford Science Publications.

Hamsik, A. (1925) Zur darstellung des oxyhämins. Hoppe-Seyler Z Physiol Chem 148:99-110

Hempelmann, E. (2007) Hemozoin biocrystalization in *Plasmodium falciparum* and the antimalarial activity of crystallization inhibitors. Parasitol. Res. 100:671-676.

Ignarro, L. J., Ballot, B., Wood, K. S. (1984) Regulation of soluble guanylate cyclase activity by porphyrins and metalloporphyrins. JBC 259(10) 6201-6207.

Kalyanaraman, B., Mottley, C., Mason, R. P., (1983). A direct electron spin resonance and spin-trapping investigation of peroxy free radical formation by hematin/hydroperoxide systems. J. Biol.Chem. 258, 3855–3858.

Kappagoda, C. T., Knapp, M. F., Linden, R. J., Pearson, M. J., Whitaker, E. M. (1979). Diuresis from left atrial receptors: effect of plasma on the secretion of the Malpighian tubules of *Rhodnius prolixus*. *J Physiol.* 291:381-91.

Kawooya, J. K., Keim, P. S., Law, J. H., Riley, C. T., Ryan, R. O., Shapiro, J. P. (1985) Why green caterpillars are green? In: Hedin, P. A. (Ed.), *Bioregulators for pest control.* ACS Symposium series 276:511-521

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

Laveran, C. L. A. (1880) A newly discovered parasite in the blood of patients suffering from malaria. *Tropical Medicine and Parasitology. Classic Investigations.* Vol 1, 1978.

Lehane, M. J. (1991). *Biology of blood-sucking insects.* Harper Collins Academic: 1-288.

Lemberg, R. & Legge, J. W. (1949) *Hematin compounds and bile pigments.* Interscience, New York

Lukashevich, E. D. and Mostovski, M. B. (2003) Hematophagous insects in the fossil record. *Paleontological Journal,* vol. 37 n° 2, 153-161.

Machado, E. A., Oliveira, P. L., Moreira, M. F., Souza, W., Masuda, H. (1998) Uptake of *Rhodnius* heme binding protein (RHBP) by the ovary of the *Rhodnius prolixus*. Arch. Insect Biochem Physiol. 31: 185-196.

Mans, B. J. and Neitz, A. W. H. (2004) Adaptations of ticks to a blood feeding environment: evolution from a functional perspective. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 34: 1- 17.

McDonagh, A. F. (1972) Turning green to gold. Nat Struct Biol 8:198-200

Meckel, H. (1847) Ueber schwarzes pigment in der milz und dem blute einer geisteskranken. Zeitschr f psychiatrie IV:198-226.

Monteiro, F. A., Wesson, D. M., Dotson, E. M., Schofield, C. J., Beard, C. B. (2000). Phylogeny and molecular taxonomy of the rhodniini derived from mitochondrial and nuclear DNA sequences. Am. J. Trop. Med. Hyg. 62(4)460-5

Mottaran E, Stewart SF, Rolla R, Vay D, Cipriani V, Moretti M, Vidali M, Sartori M, Rigamonti C, Day CP, Albano E. (2002). Lipid peroxidation contributes to immune reactions associated with alcoholic liver disease. Free Radic Biol Med. 32:38-45.

Nagem, R. A., Brandao Neto, J. R., Forrer, V. P., Sorgine, M. H., Paiva-Silva, G. O., Masuda, H., Meneghini, R., Oliveira, P. L., Polikarpov, I. (2001)

Crystallization and preliminary X-ray study of haem-binding protein from the bloodsucking insect *Rhodnius prolixus*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57(Pt 6):860-1.

Oliveira, P. L., Kawooya, J. K., Ribeiro J. M. C., Meyer, T., Poorman R., Alves E. W., Walker F. A., Machado E. A., Nussenzveig R. H., Padovan G. J., Masuda H. (1995). A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 270(18):10897-901

Oliveira, M. F., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Lins, U., Braga, C. M., Masuda, H., Oliveira, P. L. (1999). Haem detoxification by an insect. *Nature.* Aug 5;400(6744):517-8

Oliveira, M. F., d'Ávila, J. C. P., Torres, C. R., Braga, C. M. S., Tempone, A. J., Rumjanek, F. D., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., Oliveira, M. A., Souza, W., Oliveira, P. L. and Ferreira, S. T. (2000) Haemozoin in *Schistosoma mansoni*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 111, 217-221.

Oliveira, M. F., Silva, J. R., Dansa-Petretski, M., de Souza, W., Braga, C. M., Masuda, H., Oliveira, P. L. (2000) Haemozoin formation in the midgut of the blood-sucking insect *Rhodnius prolixus*. *FEBS Lett.* 14:477(1-2):95-8.

Oliveira, M. F., d'Avila, J. C., Tempone, A. J., Soares, J. B., Rumjanek, F. D., Ferreira-Pereira, A., Ferreira, S. T., Oliveira, P. L. (2004). Inhibition of heme aggregation by chloroquine reduces *Schistosoma mansoni* infection. *J. Infect. Dis.* 190, 843-852.

Oliveira, M. F., Gandara, A. C., Braga, C. M., Silva, J. R., Mury, F. B., Dansa-Petretski, M., Menezes, D., Vannier-Santos, M. A., Oliveira, P.L. (2006) Heme crystallization in the midgut of triatomine insects. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.* Dec19 [Epub ahead of print]

Paes, M. C., Oliveira, P. L. (1999) Extracellular glutathione peroxidase from the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 41:171-177

Paes, M. C., Oliveira, M. B., Oliveira, P. L. (2001) Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. *Archives of Insect Biochemistry and Physiology.* 48:63-71

Pagola, S., Stephens, P. W., Bohle, D. S., Kosar, A. D. and Madsen, S. K. (2000). The structure of malaria pigment beta-hematin. *Nature* 404, 307-310.

Paiva-Silva, G.O., Cruz-Oliveira, C., Nakayasu, E. S., Maya-Monteiro, C. M., Dunkov, B. C., Masuda, H., Almeida, I. C., Oliveira, P.L. (2006). A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. *Proc Natl Acad Sci* 23;103(21):8030-5.

Ryter, S. W. & Tyrrel, R. M. (2000). The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 28, no. 2, pp. 289-309

Sadrzadeh, S. M. H., Graf, E., Panter, S. S., Hallaway, P. E., Eaton, J. W., (1984). Hemoglobin, a biological Fenton reagent. *J. Biol.Chem.* 259, 14354–14356.

Schacter, B. A. (1988). *Semin. Hematol.* 25: 349-369.

Schmitt, T. H.; Frezzatti, W. A.; Schreier S. (1993). Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 307: 96-103

Silva, C. P., Ribeiro, A. F., Gulbenkian, S. Terra, W. R. (1995) Organization, origin and function of the outer microvillar (perimicrovillar) membranes of *Dysdercus peruvianus* (Hemiptera:Pyrrhocoridae) midgut cells. *J Insect Physiol* 41: 1093-1103

Silva, J. R., Mury, F. B., Oliveira, M. F., Oliveira, P. L., Silva, C. P., Dansa-Petretsky, M. (2007) Perimicrovillar membranes promote hemozoin formation into *Rhodnius prolixus* midgut. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 37:523-531

Slater, A. F., Cerami, A. (1992) Inhibition by chloroquine of a novel haem polymerase enzyme activity in malaria trophozoites. *Nature* 355:167-169

Smith, A., Hunt, R. C. (1990). Hemopexin joins transferrin as representative members of a distinct class of receptor-mediated endocytic transport systems. *Eur J Cell Biol.* 53 (2):234-45

Sambrook , J.; MacCallum, P.; Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*

Stal, C. (1859). Monographie der Gattung "Conorhinus" und Verwandten. *Berliner Ent. Zeitschr.* 3:99-117

Stocker R. (2004) Antioxidant activities of bile pigments. *Antioxid Redox Signal.* 6(5):841-9.

Tappel, A. L. (1953). The mechanism of the oxidation of unsaturated fatty acids catalyzed by hematin compounds. *Arch. Biochem. Biophys.* 44:378-395

Tappel, A. L. (1955). Unsaturated lipid oxidation catalyzed by hematin compounds. *J. B. C.* 217:721-733

Tatusova, T. A.; Madden, T. L.; (1999). BLAST 2 Sequences, a new tool for comparing protein and nucleotide sequences. *FEMS Microbiol Lett.* 174(2):247-50.

Teale, F. W. (1959). Cleavage of the haem-protein link by acid methylethylketone. *Biochim Biophys Acta*, (35):543

Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid R. (1968). The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. *PNAS* 61:748-755.

Tenhunen, R., Marver, H. S. and Schmid R. (1968). Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. *JBC* 244:6388-6394.

Terra, W. R., Ferreira, C., Garcia, E. S. (1988) Origin, distribution, properties and functions of the major *Rhodnius prolixus* midgut hydrolases. *Insect Biochemistry* 18:423-434

Terry, M. J., Linley, P. J., Kohchi, T. (2002) Making light of it: the role of plant haem oxygenases in phytochrome chromophore synthesis. *Biochem Soc Trans* 30:604–609.

TsuiTsui, K and Mueller GC (1982). Affinity chromatography of heme-binding proteins: An improved method for the synthesis of hemin-agarose. *Anal Biochem* 121, 244-250.

Turrens, J. F., Boveris, A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. *Biochem J* 191:421-427

Turrens, J. F., Alexandre, A., Lehninger, A. L. (1985) The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 127:401-410

Van der Zee, J., Barr, D. P., Mason, R. P., (1996). ESR Spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-butyl hydroperoxide. *Free Rad. Biol. Med.* 20, 199–206.

Virchow, R. (1847) Die pathologischen pigments. *Arch Pathol Anatomie* 1:379-486

Virchow, R. (1849) Zur pathologischen physiologie des blutes. *Arch Pathol Anatomie* 2:587-598

Wargener, F. A. D. T. G., Volk, H. D., Willis, D., Abraham, n. G., Soares, M. P., Adema, G. J., Figdor, C. G. (2003) Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation. *Pharmacological Reviews* 55:551-571.

Wigglesworth, V. B. (1943). The fate of hemoglobin in *Rhodnius prolixus* (Hemiptera) and other blood-sucking arthropods. Proceedings of Royal Society of London 131:313-39

Wilks, A. (2002) Heme oxygenase: evolution, structure, and mechanism. Antioxid Redox Signal. 4(4):603-14.

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

Nome: Carlo Donato Simões Caiaffa Feliciano de Carvalho

Nascimento: 23/09/1977

Naturalidade: Niterói

Formação Acadêmica:

Graduação em Biologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (1999)

Mestrado em Biociências e Biotecnologia pela Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro (2001).

Doutorado em Química Biológica pelo Instituto de Bioquímica Médica - UFRJ (2008).

Comunicações em Congresso:

- 16 comunicações em congressos nacionais

- 01 comunicação em congresso internacional

Publicação:

Caiaffa, C. D. C., Stiebler, R., Oliveira, M., Paiva-Silva, G. O., Oliveira, P. L. (2008). Sn-Protoporphyrin inhibits both heme degradation and polymerization in *Rhodnius prolixus*. (em fase de submissão ao Journal: Insect Biochemistry and Molecular Biology.)

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](#)