

Instituto Oswaldo Cruz
Mestrado em Biologia Parasitária

**ENVOLVIMENTO DA CaMKII NO EFEITO
PROLIFERATIVO DO HEME (Fe-PROTOPORFIRINA
IX) EM *Trypanosoma cruzi***

por

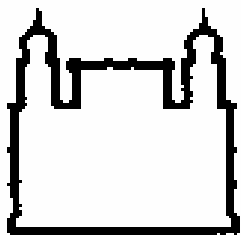
CÍNTIA FERNANDES DE SOUZA

Rio de Janeiro
2007

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.



Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto Oswaldo Cruz
Curso de Pós-Graduação em Biologia Parasitária

**ENVOLVIMENTO DA CaMKII NO EFEITO
PROLIFERATIVO DO HEME (Fe-PROTOPORFIRINA
IX) EM *Trypanosoma cruzi***

CÍNTIA FERNANDES DE SOUZA

Dissertação submetida à Coordenação de Pós-Graduação do Instituto
Oswaldo Cruz para a obtenção do grau de Mestre em Biologia Parasitária
(Área de Concentração: Protozoologia)

Orientador: Sylvio Celso Gonçalves da Costa

Rio de Janeiro
2007

Souza, Cintia Fernandes

Envolvimento da CaMKII no efeito proliferativo do Heme (Fe-Protoporfirina IX)
em *Trypanosoma cruzi* / Cintia Fernandes de Souza - Rio de Janeiro : s.n, 2007.

61p.

Dissertação de Mestrado em Biologia Parasitária

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Heme. 3. Sinalização Celular. 4. CaMKII.

**Este trabalho foi realizado no
Laboratório de Imunomodulação do
Departamento de protozoologia do Instituto
Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob orientação do
Dr Sylvio Celso Gonçalves da Costa.**

Agradecimientos

Resumo

FERNANDES DE SOUZA, C. **Envolvimento da CaMKII no efeito proliferativo do Heme (Fe-Protoporfirina IX) em *Trypanosoma cruzi***. Rio de Janeiro, 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Instituto Oswaldo Cruz.

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da Doença de Chagas, que é transmitida através de insetos vetores triatomíneos durante a alimentação no hospedeiro vertebrado. A doença de Chagas é um grave problema na América Latina, e apesar disso a quimioterapia existente para a doença ainda não é satisfatória, sendo pouco eficaz em seus estágios avançados, além de ser extremamente tóxica para o hospedeiro. Os triatomíneos chegam a ingerir em sangue de 6 a 12 vezes o seu peso original, ingerindo numa única alimentação cerca de 10 mM de heme ligado à hemoglobina. Como a forma epimastigota de *T. cruzi* vive em constante presença de heme, começamos a investigar sua participação na proliferação do parasito como molécula sinalizadora. No presente trabalho testamos diversos inibidores de proteínas quinases *in vitro*. Somente o KN93 (2 μ M), inibidor de quinases dependentes de Ca^{2+} /CaM (multifuncionais), teve um efeito inibitório da ação do heme, enquanto que os demais inibidores não alteraram a proliferação destas células. Quando utilizado o KN92, um análogo sem atividade inibitória, este não apresentou efeito, mostrando então a especificidade do KN93. A fim de identificar qual CaMK está envolvida, testamos o peptídeo Myr-AIP, um inibidor altamente específico e potente, derivado do substrato da CaMKII, e observamos que a adição do inibidor na cultura bloqueou a proliferação dos parasitos na presença de heme, confirmando o efeito específico sobre a proliferação mediada por heme, e o envolvimento da via da CaMKII. Através da técnica de *western blotting* mostramos o aumento da fosforilação da CaMKII na presença de heme, confirmando o envolvimento da CaMKII nesse processo. Posteriormente, ensaiamos a atividade da CaMKII, utilizando uma CaMKII recombinante comercial. Vimos que a adição de heme 300 μ M no meio de reação aumentou a atividade enzimática cerca de 10 vezes, corroborando o resultado obtido no *western blotting*, e sugerindo a existência de diferentes sítios de ligação para heme na CaMKII.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, Heme, Sinalização Celular, CaMKII.

Abstract

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is transmitted through triatomine vectors during their blood-meal on vertebrate host. Chagas disease is a serious health problem in Latin America, and the treatment available today for this disease is extremely toxic and poorly efficient when used against more advanced stages of the disease. These hematophagous insects ingest about 6 to 12 times its original weight, reaching in a single meal about 10 mM heme bound to hemoglobin. Since *T. cruzi* epimastigotes live in constant presence of heme, we have investigated the role of heme at cell proliferation as a signaling molecule. In the present work, we evaluated the effect of several PK inhibitors *in vitro*. Among all inhibitors tested, only KN-93, inhibitor of CaM kinases (multifunctional), had a significant effect at cell proliferation mediated by heme, while the others inhibitors had no effect on parasite growth. When KN-92, an inactive analogue, was tested there was not effect, confirming the specificity of KN-93. In order to identify the CaMK involved, we tested the peptide Myr-AIP, a highly specific and potent inhibitor, derived from the CaMKII substrate autocalmitide-2, we observed the addition of inhibitor blocked the parasite growth in the presence of heme, confirming the specific effect on parasite proliferation mediated by heme, and the involvement of CaMKII pathway. We showed the increase of CaMKII phosphorylation in the presence of heme, through western blotting, confirming the involvement of CaMKII in this process. Subsequently, we assayed the CaM kinase II activity, using a recombinant commercial CaMKII. The addition of heme 300 μ M in the medium for measuring the enzyme activity enhanced up to 10-fold, corroborating the result observed in western blotting, and suggesting different binding sites for heme in CaMKII.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, Heme, Cell Signaling, CaMKII.

Lista de figuras e tabelas

TABELA 1	Efeito dos diferentes inibidores de proteína quinase na proliferação de <i>T. cruzi</i> epimastigotas.	31
FIGURA 1	Efeito do KN-93 na proliferação da cepa Dm28c na presença de Heme	32
FIGURA 2	Efeito do KN92 na proliferação da cepa Dm28c na presença de Heme	33
FIGURA 3	Análise por Western blotting da presença da CaMKK e da CaMKIV em <i>T. cruzi</i> epimastigotas	34
FIGURA 4	Efeito do peptídeo Myr-AIP na proliferação da cepa Dm28c na presença de Heme	35
FIGURA 5	Análise por Western blotting da presença da CaMKII em <i>T. cruzi</i> epimastigotas.	36
FIGURA 6	Análise por Western blotting dos níveis de fosforilação das subunidades α e β da enzima CaMKII após tratamento com heme	37
FIGURA 7	Atividade da CaMKII ativa recombinante na presença de heme	38

Lista de abreviaturas

ADP	adenosina di-fosfato
AIP	Peptídeo inibitório derivado do autocamtide-2
AMP _c	adenosina 3', 5' - monofosfato cíclica
ATP	adenosina tri-fosfato
BHI	infusão de cérebro e coração
BIS	bisindolilmeída
BSA	albumina sérica bovina
CaM	calmodulina
CaMKP	calmodulina quinase fosfatase
CaMKs	proteínas quinases dependentes de Ca ²⁺ /CaM
cdks	quinases dependentes de ciclina
CK I	caseína quinase I
CK II	caseína quinase II
CO	monóxido de carbono
DAG	diacilglicerol
DMSO	dimetilssulfóxido
DNA	ácido desoxi ribonucleico
EDTA	ácido tetracético etilendiamino
EGTA	ácido tetracético etilenoglicol
eIF2 α	fator de inibição de elongação sensível a heme
ePKs	proteínas quinases eucarióticas
GMP _c	guanosina monofosfato cíclica
GTP	guanosina tri-fosfato
HO	heme oxigenase
IP ₃	Inositol tri-fosfato
KN-92	2-[N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine
KN-93	2-[N-(2-hydroxyethyl)-N-(4-methoxybenzenesulfonyl)]amino-N-(4-chlorocinnamyl)-N-methylbenzylamine
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
Myr-AIP	peptídeo inibitório derivado do autocamtide-2 miristoilado
OKA	ácido ocadáico

PAGE	eletroforese em gel de poliacrilamida
PAO	óxido de fenilarsina
PI3K	fosfatidilinositol 3-quinase
PI-PLC	fosfolipase C fosfatidilinositol específica
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
PKC	proteína quinase dependente de Ca ²⁺
PKG	proteína quinase dependente de GMPc
PP	proteína fosfatase
RNA	ácido ribonucleico
SDS	dodecil sulfato de sódio
SFB	soro fetal bovino
TBB	4, 5, 6, 7 - tetrabromobenzotriazol
TEMED	N,N,N',N'-Tetrametiletenodiamina
Tris	tris-(hidroximetil)-amino metano
VO ₄ ⁻³	orto-vanadato de sódio

Sumário

I – Introdução	
1) <i>Trypanosoma cruzi</i>	1
1.1) Ciclo de vida e Transmissão	1
1.2) Taxonomia e Aspectos morfológicos	4
2) A doença de Chagas	6
3) Os vetores da doença de Chagas	9
4) Heme - estrutura e papel celular	9
5) Sinalização Celular	11
6) Fosforilação de proteínas	12
7) Proteínas quinases e Ciclo Celular	13
8) Regulação do ciclo celular por vias dependentes de Ca^{2+} /Calmodulina (CaM)	14
9) Proteínas Quinase dependentes de Ca^{2+} /Calmodulina (CaMKs)	16
10) Ca^{2+} /Calmodulina Quinase II (CaMKII)	17
11) Fosfatases reguladoras da CaMKII	19
12) Sinalização Celular em <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
II – Objetivos	23
III – Material e Métodos	
1) Reagentes	24
2) Parasitas	24
3) Efeito de Inibidores de Proteínas Quinases na proliferação do parasito	25
4) Efeito do KN 93 e KN 92 na proliferação do parasito	25
5) Efeito do Myr-AIP na proliferação do parasito	25
6) Atividade CaMKII	26
7) Preparo das amostras para “Western blotting”	26
8) Dosagem de proteína	26
9) Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE)	27
10) Western blotting	27
11) Análise estatística	28

IV – Resultados	29
V – Discussão	40
VI – Conclusões	45
VII – Referências Bibliográficas	46
VIII – Anexo I	
IX – Anexo II	

I – Introdução

1) *Trypanosoma cruzi*

1.1) Ciclo de vida e Transmissão

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanossomíase Americana ou doença de Chagas (Chagas, 1909), a qual é um grande problema de saúde pública na América Latina. O *Trypanosoma cruzi* é transmitido através de vetores triatomíneos, insetos hematófagos, conhecidos popularmente como barbeiros, durante sua alimentação no hospedeiro vertebrado. O ciclo biológico do *T. cruzi* é do tipo heteroxênico, passando por uma fase de multiplicação intracelular no hospedeiro vertebrado (mamíferos) e extracelular no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) (Rey, 2001).

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

No hospedeiro vertebrado o parasito pode penetrar pelas mucosas ou por soluções de continuidade da pele. No ponto de entrada na pele ocorre uma reação inflamatória transitória, de natureza eritematosa, desenvolvendo um nódulo denominado de chagoma. Quando o parasito penetra na mucosa ocular ocorre um edema bpalpebral unilateral, fato assinalado por Chagas já em 1909. Mas o valor semiológico quanto ao diagnóstico da doença foi divulgado por Mazza em 1934; deve-se salientar que os estudos mais aprofundados sobre o assunto foram publicados pelo pesquisador argentino Cecílio Romana (1935) e por este motivo a lesão recebeu o nome de “sinal de Romana”.

O *T. cruzi* tem na sua superfície uma proteína homóloga à proteína humana reguladora do complemento DAF (decay-accelerating factor) (Voorhis *et al.*, 1993). Esta proteína está ancorada por meio de uma ligação glicosil-fosfatidil-inositol, se liga ao componente C₃b e inibe a formação da convertase C₃ e que, conseqüentemente, inibe também a via alterna do complemento. Tem sido descrito pelo menos duas proteínas diferentes na superfície do parasito envolvendo a penetração do *T. cruzi* no macrófago e em outras células; uma transialidase que remove resíduos de ácido siálico da célula hospedeira e os transfere para uma proteína da superfície do parasito (Ssp-3), que então se liga à célula do hospedeiro; uma segunda proteína, denominada “penetrina” na superfície do *T. cruzi* se liga a proteínas da matriz extracelular, como a heparina, o sulfato de heparan e o colágeno, ficando assim como mediador da invasão do parasito nas células do hospedeiro (Ortega-Barrria & Pereira, 1991; Andrews *et al.*, 1990).

O *T. cruzi* escapa da ação microbicida dos macrófagos pela saída do lisossoma, passando para o citosol das células. Nesta fase, outras proteínas estão envolvidas: 1) o parasito possui uma neuramidase que remove o ácido siálico das proteínas que estão compondo a membrana que limita o conteúdo dos lisossomas e desta forma induz a desestabilização dos mesmos; 2) estimulados pelo pH ácido do interior do lisossoma, os parasitos liberam hemolisinas que formam poros nas membranas lisossomais e sua posterior ruptura.

O *T. cruzi* pode parasitar praticamente todo tipo de célula e a modulação desta invasão celular é fundamentalmente dependente da resposta do hospedeiro (Vianna, 1911; Gonçalves da Costa *et al.*, 1984; Gonçalves da Costa *et al.*, 2002; Lenzi *et al.*, 1996). Após intensa multiplicação na célula hospedeira sob a forma de amastigotas, estas se diferenciam em tripomastigotas, exteriorizando o flagelo, e após a ruptura das células hospedeiras estas formas são liberadas e podem voltar à circulação e invadir outros órgãos penetrando em outras células.

Na doença de Chagas aguda, que é benigna na maioria dos casos, as lesões cardíacas são resultantes da invasão das células do miocárdio pelo parasito e do processo inflamatório decorrente da ruptura das células parasitadas que expõe um grande número de antígenos. A fase aguda varia desde casos cuja sintomatologia é bastante discreta levando algumas vezes o paciente a confundí-la com uma gripe até formas mais graves onde se

observa uma parasitemia elevada, dilatação progressiva do coração, linfadenopatia sistêmica e esplenomegalia. Formas mais graves podem atingir o sistema nervoso central e ocorrer uma meningoencefalite e a morte do paciente.

A doença de Chagas pode ser transmitida também por transfusão sanguínea, em áreas onde a doença é endêmica ou não, na América do Sul, na América Central e tendo sido constatada inclusive nos Estados Unidos e no Canadá (Schmunis, 1991; Grant *et al.*, 1989; Kirchhoff, 1989). Por transmissão congênita, associada a nascimentos prematuros, abortamentos e placentites, relatada em muitas áreas da América do Sul (Azogue *et al.*, 1985). A transmissão por via oral também é possível, pela ingestão de alimentos contaminados. Shikanai-Yasuda *et al.*, em 1991, analisaram um surto de doença de Chagas aguda em 26 indivíduos que estiveram reunidos e se alimentaram em uma fazenda do município de Catolé do Rocha, estado da Paraíba, Brasil, e concluem, após minucioso estudo, ter havido contaminação oral, provavelmente por caldo de cana contaminado por vetor triturado ou por excretas infectantes de vetor. Na ocasião foi contaminado um mecânico que esteve só duas horas na moenda e bebeu o caldo de cana. Shikanai-Yasuda assinala vários trabalhos experimentais de infecção animal por via oral, por ingestão de tripomastigotas sanguíneos, ou formas metacíclicas de fezes de vetores, ou por alimentos contaminados. Sabe-se que o *T. cruzi* pode permanecer infectivo em caldo de cana por períodos de 1 a 24 horas, segundo Soares *et al.*, 1987. Outro caso de contaminação oral foi sugerido após ampla investigação de uma comissão de pesquisadores comandados pelo Dr. Felipe Nery-Guimarães (do Instituto Oswaldo Cruz), que analisaram um surto ocorrido em Teutônia, município de Estrela, em Rio Grande do Sul (Silva *et al.*, 1968). Neste caso, foi verificada a presença de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos na luz das glândulas anais do gambá *Didelphis marsupialis*, importante reservatório silvestre, caracterizado pela presença de duplo ciclo nestes animais (Deane *et al.*, 1984), o que sugere a possibilidade de transmissão oral em humanos pela contaminação de alimentos com secreções infectadas de marsupiais. A amamentação é também uma via de transmissão oral, conforme descrito nos trabalhos de Mazza *et al.* (1936) e por Medina-Lopes (1988). O transplante de órgãos e os acidentes laboratoriais são vias de transmissão menos freqüentes (Tanowitz *et al.*, 1992; Brener, 1984).

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

1.2) Taxonomia e Aspectos morfológicos

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado que, taxonomicamente segundo Levine *et al.*, (1980), pertence à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatida e Gênero *Trypanosoma*, Seção Stercoraria (Hoare, 1964), Subgênero *Schizotrypanum*, Espécie *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* Chagas, 1909 (anexo 1).

A Ordem Kinetoplastida é subdividida em duas sub-ordens, Bodonina e Trypanosomatina (Vickerman, 1990), caracterizadas pela presença de uma estrutura celular típica chamada cinetoplasto. Cada uma destas subordens agrupa somente uma única família de organismos, Bodonidae e Trypanosomatidae. Juntas, estas famílias de protozoários flagelados compreendem 21 gêneros (Wallace, 1966; Vickerman, 1990). O cinetoplasto, estrutura geralmente única, presente em todos os indivíduos desta ordem, contém um agregado de DNA mitocondrial (k-DNA) que representa cerca de 30% do DNA total dos protozoários da ordem Kinetoplastida (Vickerman, 1990; Stuart & Feagin, 1992).

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

A família Trypanosomatidae é de grande importância para a medicina, além de acarretar problemas na área econômica, sendo composta por protozoários uniflagelados,

parasitos de invertebrados, vertebrados e de plantas, que podem ter seus ciclos de vida estabelecidos em um único hospedeiro (parasitos monoxênicos), ou em mais de um hospedeiro (parasitas heteroxênicos). Como exemplos de gêneros monoxênicos, principalmente encontrados em insetos e geralmente não patogênicos para humanos, temos: *Angomonas*, *Blastocrithidia*, *Crithidia*, *Herpetomonas*, *Leptomonas*, *Rhynchoidomonas* e *Wallaceina*. Contudo, entre os gêneros heteroxênicos destacam-se alguns que são patogênicos para mamíferos, como: *Leishmania*, *Trypanosoma* e *Endotrypanum*. O gênero *Phytomonas*, por outro lado, apresenta espécies patogênicas para vegetais (Hoare & Wallace, 1966; Vickerman, 1976; McGhee & Cosgrove, 1980; Vickerman, 1994).

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

Entre as organelas bastante específicas de tripanossomatídeos estão os glicossomas e os acidocalcissomas, envolvidos em vias metabólicas. Os glicossomas são responsáveis por concentrar e compartimentalizar as enzimas da via glicolítica, aumentando a eficiência do processo (De Souza, 1999). Os acidocalcissomas são organelas ácidas, que concentram cálcio e grânulos de polifosfato, e que apresentam enzimas como H^+ -ATPase, Ca^{2+} - H^+ -ATPase e pirofosfatases (V- H^+ -PPase) (Benchimol *et al.*, 1998; Lu *et al.*, 1998; Rodrigues *et al.*, 1999). Já os reservossomas são organelas de via endocítica, específicos da forma epimastigota do parasito e têm como função o acúmulo de macromoléculas endocitadas, sendo muito rico em cisteína-proteinasas (De Souza, 2002).

2) A doença de Chagas

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

O *Trypanosoma cruzi* faz parte de um ecossistema exclusivamente americano, sendo encontrado em extensas áreas do Continente, desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e do Chile. Segundo a Organização Mundial de Saúde, esta doença parasitária é a principal nesta região e a terceira no mundo, após a malária e a esquistossomose. Na América Latina constitui a quarta doença mais importante, a seguir de doenças respiratórias, diarreia e AIDS (Schofield, 1994). Entretanto, quimioterapia desta doença ainda não é satisfatória, é baseada apenas em nitrofuranos e nitroimidazóis, que agem através da indução do dano oxidativo do parasito, podendo produzir sérios efeitos tóxicos no hospedeiro e sendo pouco eficaz em seus estágios avançados (Cançado & Brener, 1979).

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

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

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

Segundo Brenner (1997), no homem, a infecção produz a doença de Chagas aguda após um período de incubação de 8 a 10 dias na transmissão vetorial. A doença de Chagas aguda pode ser aparente ou inaparente. Na aparente a evolução é rápida, com alta parasitemia, sendo a morbidade maior em crianças de pouca idade e também na raça negra (Laranja et al., 1956). Os aspectos clínicos mais importantes são: febre, astenia, cefaléia, anorexia, mal-estar geral, sudorese, dores musculares, às vezes com vômitos e diarreia, sendo possível a linfadenomegalia, esplenomegalia, hepatomegalia, edema generalizado ou de face e/ou membros inferiores, exantema e meningo-encefalite (raros); são freqüentes na forma aguda os sintomas de cardiopatia aguda, com miocardite e pericardite. A fase aguda dura de 4 a 12 semanas e, se o paciente resistir, a parasitemia e o quadro febril tendem a desaparecer, decrescem os níveis de imunoglobulinas da classe M e sobem os níveis de IgG, ocorrendo a transição para a forma crônica (Freitas *et al.*, 1976). Se houver terapia apropriada, ocorre normalmente evolução para a cura. Na forma aguda inaparente o paciente é oligossintomático e a doença é sub-clínica, podendo até passar despercebida. A forma aguda pode evoluir para a forma crônica indeterminada, o que ocorre na maioria dos casos agudos não tratados, sem sintomas ou manifestações clínicas, cardíacas, digestivas ou nervosas; ou ainda com exames clínicos, eletrocardiográficos e radiológicos do coração e/ou do tórax digestivo normais, forma evidenciada por sorologia ou métodos parasitológicos indiretos, como xenodiagnóstico, sendo a forma mais freqüente em áreas endêmicas e entre doadores de sangue infectados. Pode evoluir para a forma crônica após muitos anos ou persistir por toda a vida em 40 a 50% dos casos (Laranja, 1956). A forma

crônica indeterminada, mesmo assintomática, quando feita uma análise histopatológica, apresenta alterações inflamatórias variáveis no miocárdio e no sistema nervoso vegetativo intra-cardíaco, possivelmente progressivas e responsáveis pelo agravamento da doença, passando a formas crônicas determinadas benignas ou malignas e morte.

A forma aguda pode também evoluir para a forma sub-aguda com alterações patológicas graves, principalmente miocardite intensa e mau prognóstico. A forma crônica determinada, evolução da forma aguda ou da forma crônica indeterminada, pode apresentar manifestações digestivas, principalmente devido a megaesôfago e/ou megacólon. A forma crônica determinada pode apresentar também predominância de cardiopatia crônica chagásica, progressiva, acometendo 10 a 40% dos chagásicos crônicos em áreas endêmicas. Pode evoluir de modo lento, benigno, em muitos casos, permitindo sobrevivência de muitos anos, ou, em alguns casos, de modo intenso e grave, para a insuficiência cardíaca e morte, (evolução maligna) (Dias e Coura, 1997).

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

3) Os vetores da doença de Chagas

Os triatomíneos são insetos grandes, medindo de 1 a 4 cm de comprimento. Eles podem ser facilmente distinguidos de outros hemípteros por serem hematófagos e possuírem uma probóscida retilínea com apenas três segmentos. O *Triatoma infestans*, o *T. brasiliensis*, o *T. dimidiata*, o *Panstrongylus megistus* e o *Rhodnius prolixus*, são as espécies mais importantes na transmissão da doença (Jurberg e Galvão, 2006). Ao sul do equador a espécie mais eficiente como vetor da tripanosomíase é o *Triatoma infestans*, enquanto ao norte esse papel cabe ao *Rhodnius prolixus*. Estes insetos hematófagos chegam a ingerir em sangue de 6 a 12 vezes o seu peso original, e em uma única alimentação normalmente ingerem cerca de 10 mM de heme ligado a hemoglobina. Esta grande quantidade de sangue é continuamente digerida através de uma grande variedade de proteinases liberando aminoácidos, peptídeos e heme.

4) Heme - estrutura e papel celular

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

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

Em hemeproteínas, o heme se encontra geralmente associado a cadeias polipeptídicas através da interação do átomo de ferro com resíduos de histidina ou metionina, como um ou dois ligantes axiais. Apenas duas das seis ligações coordenadas

possíveis do átomo de ferro podem ser utilizadas em interações com ligantes, uma vez que, quatro coordenadas estão comprometidas com a ligação do átomo de ferro com o heme.

O heme catalisa uma boa parte dos processos de oxidação nos sistemas biológicos, sendo muito importante nas funções celulares e na homeostase dos organismos. É o grupamento prostético de diversas proteínas envolvidas no transporte de oxigênio (hemoglobina e mioglobina), na respiração celular (citocromo c, citocromo c oxidase, e citocromo redutase), na detoxificação de drogas (enzima P450) e em defesas anti-oxidantes (catalases e peroxidases) (Ponka, 1999). Esta molécula também está envolvida no metabolismo da biossíntese de esteróides e com proteínas que participam da transdução de sinal, além de ser parte integral da cianocobalamina (vitamina B12), que está envolvida na hematopoese e outras funções celulares.

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

Um mecanismo intracelular importante de controle da homeostase do heme é sua degradação enzimática pela heme oxigenase microssomal (HO). A HO catalisa a degradação do heme, numa reação dependente de oxigênio, em biliverdina, monóxido de carbono (CO) e ferro (Fe^{+2}) (Tenhunem *et al.*, 1969; Kikuchi *et al.*, 2005).

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

Diversas hemeproteínas auxiliam na síntese de moléculas reguladoras, como o óxido nítrico (NO sintase), hormônios esteróides (hidroxilases) e não esteróides (Fayadat *et al.*, 1999). A guanilato ciclase, também uma hemeproteína, participa da síntese de GMP cíclico, importante mensageiro secundário dos sistemas biológicos (Ignaro *et al.*, 1984).

Além disso, a classe de hemeproteínas envolvidas com sinalização celular inclui ainda histidina quinases, fosfodiesterases, proteína quinase do fator eIF2 α (fator de inibição de alongação sensível a heme), e até fatores de transcrição com domínio básico de ligação com DNA responsivos à heme (Tsiftoglou *et al.*, 2006). O heme também está envolvido em sinalização de quinases e fatores de transcrição como fatores indutores de hipóxia (Wenger, 2000), Bach1 (Oyake *et al.*, 1996), e outros como HAPs (proteína antisense de HIV) (Zhang & Guarente, 1994).

5) Sinalização Celular

Todas as células recebem e respondem a sinais vindos do ambiente ao seu redor. Em organismos multicelulares, essa comunicação célula-célula alcança altos níveis de sofisticação (Soderling *et al.*, 2000). Muitos eucariotos unicelulares também respondem a moléculas sinalizadoras, secretadas por outras células, durante seus ciclos de vida, passando por mudanças morfológicas e bioquímicas, mediadas por diferentes ligantes e/ou moléculas estimulatórias presentes no ambiente, permitindo comunicação célula-célula.

A ligação da maioria das moléculas sinalizadoras com seus receptores inicia uma série de reações intracelulares, através de vias de sinalização, que regulam virtualmente todos os aspectos do comportamento celular, incluindo metabolismo, movimento, proliferação, sobrevivência e diferenciação (Cuatrecasa, 1985). A sinalização celular é feita por sistemas de regulação, envolvendo proteínas quinases, fosfatases, proteína G e mensageiros secundários, entre outros (Neer, 1995). Um componente comum dessa cascata regulatória é a fosforilação de várias proteínas celulares, alterando suas atividades biológicas (Neer, 1995).

Muitos hormônios ou polipeptídeos se ligam a receptores na membrana celular e transmitem seus sinais via (1) elevação de adenosina 3', 5' monofosfato cíclica (AMPC) e transmissão, através de sinalização via proteína quinase dependente de AMPC (PKA); (2) estimulando a hidrólise de fosfatidilinositol 4,5 bisfosfato e ativando uma combinação de mensageiros secundários, incluindo o inositol trisfosfato (IP₃) – íons Ca⁺², e o diacilglicerol (DAG), que por sua vez ativam a proteína quinase dependente de cálcio (PKC); ou (3) estimulando níveis intracelulares de GMPc e conseqüentemente ativando uma sinalização

via guanilato ciclase (Spiegel *et al.*, 1992; Derynck & Wagner, 1995; Robbins & Hollenberg, 1999).

Nos dois primeiros casos é o receptor que transmite a informação para dentro da célula, através da membrana plasmática, por intermédio das proteínas G, que são ativadas quando se ligam à guanosina trifosfato (GTP). Estas proteínas ativam uma enzima amplificadora na parte interna da membrana, que converte moléculas precursoras em mensageiros secundários, que no caso da sinalização via AMPc é uma adenilato ciclase, diferente da sinalização via PKC, onde a enzima amplificadora é uma fosfolipase C (Derynck & Wagner, 1995; Robbins & Hollenberg, 1999).

Em contraste com os receptores ligados a proteína G, outros receptores de superfície celular são diretamente ligados a enzimas intracelulares. A ampla família destas enzimas ligadas a receptor é a família dos receptores proteínas tirosina quinase, que fosforilam suas proteínas substratos em resíduos de tirosina. Esta família inclui receptores para a maioria dos fatores de crescimento, por isso a fosforilação via tirosina quinase tem sido bem estudada, como um mecanismo sinalizador envolvido no controle do crescimento e diferenciação celular animal (Hubbard *et al.*, 1998).

6) Fosforilação de proteínas

A transdução de sinais na regulação das funções celulares envolve uma rápida modificação de proteínas celulares, pela adição ou remoção de grupos fosfato a resíduos de serina, treonina ou tirosina. Essa cadeia de reações eventualmente culmina na modulação de expressão de genes, já que algumas reações de fosforilação e desfosforilação podem regular a atividade de fatores de transcrição (Robbins & Hollenberg, 1999; Johnson, 2007).

Nos eucariotos superiores, a fosforilação reversível de proteínas em resíduos de serina, treonina, e tirosina exerce um papel principal na integração de sinais envolvendo a proliferação e diferenciação celular (Contreras *et al.*, 1995; Ishida *et al.*, 2007). A família das proteínas quinases possui centenas de membros, tendo em comum o centro catalítico, que se constitui de uma seqüência de onze sub-domínios conservados, e a capacidade de fosforilar os resíduos de serina, treonina ou tirosina (Hanks *et al.*, 1988). O estado de

fosforilação das proteínas é regulado pelas atividades opostas de proteínas quinases e fosfatases.

Essas enzimas são classificadas em dois grandes grupos baseados na sua especificidade pelo substrato: serina/treonina quinases e serina/treonina fosfatases, que agem em resíduos de serina e treonina; e tirosinas quinases e tirosinas fosfatases, que agem em resíduos de tirosina (Luan, 1998).

A fosforilação de proteínas eucarióticas ocorre predominantemente em resíduos de serina e treonina (97%) e em menor extensão em resíduos de tirosina. Em animais, a fosforilação de proteínas tem um papel bem conhecido em diversos processos celulares como metabolismo de glicogênio, controle do ciclo celular e transdução de sinais (Smith & Walker, 1996).

7) Proteínas quinases e Ciclo Celular

Grandes progressos têm sido feitos nas últimas décadas no entendimento das vias que regulam o crescimento e a diferenciação celular. O ciclo celular consiste em quatro fases primárias: G₁, a primeira fase do ciclo; fase S, na qual a síntese de DNA ocorre; G₂, fase intermediária entre a fase S e a M; e a fase M, ou mitose, na qual os cromossomos e os componentes citoplasmáticos são divididos entre duas células filhas. As transições entre essas fases do ciclo são estreitamente reguladas, e pontos de checagem durante o ciclo celular permitem a célula determinar se tudo está bem antes de começar a próxima fase do ciclo (Hanahan & Weinberg, 2000). Por exemplo, se ocorre um erro no DNA na fase G₂, a célula pode pausar e reparar o DNA antes de entrar na mitose (Elledge, 1996; Nigg, 2001).

As fases G₁, S e G₂ em conjunto são chamadas de intérfase. A mitose envolve uma série de eventos, sendo dividida em prófase, pró-metáfase, metáfase, anáfase, telófase e citocinese. Na prófase, as fitas de DNA duplicadas se condensam dentro dos cromossomos (mais compactos) e os centrossomos duplicados previamente migram separados, começando a definir pólos; na pró-metáfase, os cromossomos replicados, consistindo em pares de cromátides irmãs, que se fixam nos microtúbulos no fuso mitótico; na metáfase as células fazem uma breve pausa, na qual os cromossomos estão alinhados na região equatorial do fuso mitótico, posicionados para a segregação. A súbita separação das

cromátides irmãs marca o início da anáfase, durante a qual os cromossomos se movem em direção aos pólos opostos do fuso. Uma vez que os cromossomos chegam aos pólos, o envelope nuclear é refeito, e as cromatinas começam a ser descondensadas (telófase). Finalmente, um anel contrátil é formado, dividindo a célula em duas pela divisão citoplasmática, ou citocinese, completando a divisão celular (Nigg, 2001; Golias *et al.*, 2004).

Um grupo de proteínas que atua como um fundamental regulador das transições do ciclo celular são as quinases dependentes de ciclina (cdks). As cdks são uma família de proteínas serina/treonina quinases dependentes da ligação com ciclinas para sua atividade (Morgan, 1995; Morgan, 1997; Morgan *et al.*, 1998). Tanto as cdks quanto as ciclinas, assim como suas funções na regulação das transições entre as fases do ciclo celular são altamente conservados nos eucariotos.

8) Regulação do ciclo celular por vias dependentes de Ca^{2+} /Calmodulina (CaM)

O Ca^{2+} é um segundo mensageiro universal que regula um número diverso de processos celulares, incluindo proliferação celular, desenvolvimento, motilidade, secreção, e aprendizado e memória (Berridge *et al.*, 2000; Carafoli, 2002). Hormônios, fatores de crescimento, citocinas, e neurotransmissores, todos podem levar ao aumento do cálcio intracelular (Petersen *et al.*, 1994; Taylor, 1995). O Ca^{2+} pode atuar diretamente nas proteínas alvo ou seus efeitos podem ser mediados via ligação com proteínas.

As células precisam crescer e se dividir, e o Ca^{2+} é universalmente requerido para a proliferação celular. Embora muito seja conhecido sobre as mais diversas vias dependentes de Ca^{2+} regulando a contração muscular, secreção, aprendizado e memória, a natureza das vias dependentes de Ca^{2+} regulando o crescimento e diferenciação celular continuam pouco caracterizadas.

Durante o ciclo celular, o gradiente de Ca^{2+} tem sido caracterizado durante a G_1 e a mitose (Berridge, 1995; Santella, 1998). Gradientes de Ca^{2+} também são evidentes durante vários estágios da progressão mitótica, particularmente na transição metáfase/anáfase e durante a citocinese (Whitfield *et al.*, 1995; Whitaker & Larman, 2001).

Em todos os eucariotos o Ca^{2+} é requerido em ambos compartimento extracelular e estoques intracelulares para o crescimento e divisão celular. Nas células, o gradiente citoplasmático de Ca^{2+} é gerado pela liberação de Ca^{2+} dos *pools* intracelulares ou pela entrada de Ca^{2+} do meio extracelular via canais de Ca^{2+} na membrana plasmática. Como o Ca^{2+} é um segundo mensageiro amplamente distribuído, a complexidade temporal e espacial do gradiente de Ca^{2+} possibilita a célula de usar a sinalização de Ca^{2+} para uma variedade de respostas fisiológicas.

Independentemente do tamanho e da duração do gradiente de Ca^{2+} , o sinal do Ca^{2+} é transduzido nas células pela ligação direta do Ca^{2+} aos seus alvos ou pela ligação do Ca^{2+} aos seus receptores intracelulares, como a CaM (calmodulina), que leva o sinal aos alvos dependentes de Ca^{2+} /CaM.

Em mamíferos, a CaM possui 148 aminoácidos, é uma proteína altamente conservada, contendo quatro domínios de ligação com o Ca^{2+} (Chin & Means, 2000). Para os alvos de Ca^{2+} /CaM, essa ligação têm grandes consequências. Por exemplo, no caso da calcineurina (PP2B) e da proteína quinase dependente de Ca^{2+} /calmodulina II, um mecanismo geral pelo qual a ligação de Ca^{2+} /CaM ativa a enzima alvo, é através da liberação de autoinibição deixando então estas proteínas ativas.

A CaM regula numerosas enzimas intracelulares que incluem fosfodiesterases, adenilato ciclases, canais de íons, proteínas quinases, e proteínas fosfatases (Chin & Means, 2000). Estas vias dependentes de Ca^{2+} /CaM estão envolvidas na regulação de uma variedade de processos celulares incluindo secreção, motilidade celular, homeostase de íons, transcrição de genes, neurotransmissão e metabolismo. O estímulo de hormônios e neurotransmissores levam as células a uma variedade de respostas mediadas por Ca^{2+} /CaM (Gnegy, 1993). Inicialmente, os receptores dos hormônios são ativados, levando a uma aumento do Ca^{2+} intracelular. Um estímulo persistente pode causar mudanças na distribuição subcelular da CaM, que leva a mudanças na resposta a Ca^{2+} /CaM na dada área da célula. Estímulo de longa duração pode também levar a mudanças na concentração de CaM, tornando a célula mais ou menos sensível aos sinais do Ca^{2+} (Gnegy, 1993).

Os níveis intracelulares de CaM são regulados durante o ciclo celular. O aumento nos níveis de CaM imediatamente antes da fase S é universal, mas porque o aumento nesse ponto do ciclo ou qual o alvo da CaM na transição G_1/S continua desconhecido. Em adição,

a manipulação da expressão de CaM afeta a capacidade proliferativa das células. Seis linhagens independentes de células que superexpressaram CaM demonstraram uma relação linear entre concentração de CaM e taxa de progressão da fase G₁ (Rasmussen & Means, 1987 e 1989). Em contraste, a redução dos níveis de CaM resulta na transitória inibição da proliferação celular (Rasmussen & Means, 1989). Portanto, a quantidade de CaM na célula regula a taxa de proliferação, primariamente devido aos efeitos em G₁.

O complexo Ca²⁺/CaM liga e regula um número grande de proteínas intracelulares envolvidas numa série de vias. Entretanto, proteínas conservadas que ligam Ca²⁺/CaM e que regulam a progressão do ciclo celular ainda não foram identificadas. Sistemas genéticos, como leveduras e fungos, têm sido essenciais no isolamento de reguladores chaves do ciclo celular, em particular ciclinas e cdks (Kahl & Means, 2003).

9) Proteínas Quinase dependentes de Ca²⁺/Calmodulina (CaMKs)

A CaM é encontrada em todas as células eucarióticas, nas quais constitui 1% do total da massa proteica. A ativação alostérica da calmodulina pelo Ca²⁺ é análoga à ativação alostérica da PKA pelo AMP cíclico, exceto pelo fato do complexo cálcio/calmodulina não ser dotado, ele próprio, de atividade enzimática: atua por se ligar a outras proteínas. Em alguns casos, a calmodulina serve como uma subunidade reguladora permanente de um complexo enzimático, mas, na maioria das vezes, a ligação do Ca²⁺ permite a ligação da proteína a várias outras proteínas-alvo na célula, alterando suas atividades (Hook & Means, 2001).

Muitos dos efeitos do Ca²⁺ são indiretos e mediados por fosforilações catalizadas por uma família de proteínas quinases dependentes de Ca²⁺ e calmodulina (CaM quinases - CaMK). Todos os membros da família CaMK são ativadas em resposta à ligação Ca²⁺/calmodulina, que causa uma mudança conformacional exibindo o sítio de ligação da enzima com o substrato (Hook & Means, 2001).

Estas enzimas, à semelhança de PKA e PKC, fosforilam resíduos de serina ou de treonina e, tal como em PKA e PKC, a resposta celular depende de quais são as proteínas-alvo reguladas pelas CaMKs. As primeiras CaMKs descobertas, a quinase da cadeia leve da miosina, que ativa a contração da musculatura lisa, e a fosforilase quinase, que ativa a

degradação do glicogênio, têm especificidades restritas de substrato. Muitas CaMKs têm especificidades mais amplas, como as CaM quinases I, II e IV; algumas destas fosforilam proteínas reguladoras de genes, ativando ou inibindo a transcrição de genes específicos (Hook & Means, 2001).

No passado a cascata da CaMK foi descrita contendo 3 membros: CaMKK, CaMKI e CaMKIV (Soderling, 1999; Means, 2000). A CaMKK é a primeira enzima da cascata que ativa a CaMKI e a CaMKIV através da fosforilação de suas alças de ativação. Muitas proteínas quinases incluindo a CaMKI e a CaMKIV, possuem uma alça de ativação contendo uma Ser/Thr no qual a fosforilação aumenta fortemente suas atividade quinásica. Uma característica diferente da cascata da CaMK é a ligação de Ca^{2+} /CaM a ambos CaMKK e seus substratos, CaMKI e CaMKIV, que é necessária para a fosforilação na alça de ativação (Haribabu, 1995; Tokumitsu & Soderling, 1996).

O exemplo melhor estudado de uma CaMK multifuncional é o da CaMKII, encontrada em todas as células animais, sendo especialmente abundante no sistema nervoso e altamente concentrada nas sinapses (Hook & Means, 2001).

10) Ca^{2+} /Calmodulina Quinase II (CaMKII)

A família CaMKII possui 4 genes (α , β , γ e δ), os quais possuem *splicing* alternativo. As isoformas γ e δ são expressas em mais tecidos enquanto as isoformas α e β são mais proeminentes em tecido neural e compreende mais de 2% de proteína total do hipocampo.

A holoenzima é uma proteína oligomérica que compreende 12 subunidades de 50-60 kDa arranjadas em 2 anéis hexaméricos empilhados (Kolodziej *et al.*, 2000). O domínio de associação na porção C-terminal forma o cerne de cada anel com o domínio catalítico na porção N-terminal projetado para fora. Na ausência da ligação com o complexo Ca^{2+} /CaM, a CaMKII é mantida na sua conformação inativa devido a uma interação com o domínio autoinibitório no domínio catalítico da sua mesma subunidade.

Diferente de outras proteínas quinases, a CaMKII não contém um resíduo fosforilável nos domínios de ativação da CaMKI e da CaMKIV. Logo, a CaMKII não é fosforilada ou ativada pela CaMKK (Tokumitsu *et al.*, 1995). A partir da ativação (Figura

8) pela ligação ao complexo $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, a quinase sofre uma imediata mudança conformacional e autofosforilação na Thr 286 (número baseado na isoforma α) (Braun & Schulman, 1995). Essa autofosforilação ocorre dentro do complexo oligomérico (intramolecular), entre as subunidades adjacentes que ligam $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ (Hanson *et al.*, 1994; Mukherji & Soderling, 1994). Essa rápida autofosforilação na Thr 286 tem 2 consequências regulatórias importantes: (1) a subsequente taxa de dissociação de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ após a remoção de Ca^{2+} é diminuída por muitas ordens de magnitude (Meyer *et al.*, 1992) e (2) mesmo depois da total dissociação de $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$, a enzima retém uma atividade parcial (isto é, atividade $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ independente ou constitutiva). Para retornar ao estado inativo, precisa ocorrer a desfosforilação da CaMKII; ambas proteínas fosfatases 1 e 2A (PP1 e PP2A) parecem ter papéis importantes na desfosforilação da CaMKII (Strack *et al.*, 1997). A elevação do gradiente de Ca^{2+} intracelular pode dar uma resposta prolongada à atividade constitutiva da CaMKII autofosforilada, e essa propriedade parece ser crítica para certas funções fisiológicas da CaMKII (Soderling & Stull, 2001).

Em muitas células, a CaMKII é amplamente solúvel e distribuída livremente pela célula, porém pequenos *pools* têm sido recentemente identificados. No cérebro, a CaMKII é particularmente abundante, e parece estar associada a estruturas especializadas. Por exemplo, existem evidências de uma co-localização da isoforma β da CaMKII com o citoesqueleto (Shen & Meyer, 1999).

A CaMKII é claramente o alvo do sinal do Ca^{2+} requerido na transição da metáfase para a anáfase. Em extratos de ovos de *Xenopus*, CaMKII regula a transição metáfase/anáfase, e sua atividade leva a degradação de ciclina e inativação da *cdc2* (Lorca *et al.*, 1991, 1993 e 1994). Uma ou mais das CaMKs são requeridas para a progressão de G_1 porque na presença de KN-93, um inibidor de CaMKs multifuncionais, há um arraste nesta fase (Rasmussen & Rasmussen, 1995; Tombes *et al.*, 1995) porém, essa via ainda não está caracterizada em cultura de mamíferos. O fato do KN-93 atrasar a transição metáfase/anáfase em células HeLa sugere que a CaMKII possa ter um papel na regulação dessa transição no ciclo mitótico da célula, mas ainda não está bem esclarecido (Patel *et al.*, 1999).

11) Fosfatases reguladoras da CaMKII

Proteínas fosfatases descritas que desfosforilam e regulam a CaMKII *in vitro* são de quatro tipos: PP1, PP2, PP2C e CaMK fosfatase (CaMKP) (Shenolikar & Nairn, 1991; Barford *et al.*, 1998; Price & Mumby, 1999; Winder & Sweatt, 2001). Proteínas fosfatases que desfosforilam resíduos de Ser e Thr são classificadas nas famílias PPP (proteínas fosfatases) e PPM (proteínas fosfatases dependentes de Mg^{2+}), que são definidas pelas distintas seqüências de aminoácidos e estrutura tridimensional. PP1, PP2A e PP2B pertencem à família PPP, enquanto a PP2C e a CaMKP pertencem à família PPM.

A PP1 é uma proteína fosfatase composta por uma subunidade catalítica e subunidades regulatórias. Várias isoformas das subunidades catalítica e regulatória da PP1 têm sido identificadas. O envolvimento das subunidades regulatórias em uma variedade de funções como regulação da atividade catalítica, localização subcelular, e especificidade de substrato da PP1 têm sido descrito (Ishida *et al.*, 2003).

A PP2A ocorre em vários tipos de células e tecidos, e existe como dímero (AC) ou trímero (ABC), composto pela subunidade catalítica (C) e subunidades regulatórias (A e/ou B). Em particular, uma marcada diversidade molecular da subunidade regulatória B (BV/B/PR72), também chamada de terceira subunidade, é descrita. A diversidade de cada subunidade, em conjunto com modificações covalentes de cada subunidade e a regulação por específicos ativadores/inibidores, produzem uma elegante regulação da atividade catalítica, especificidade de substrato, e localização intracelular da PP2A (Ishida *et al.*, 2003).

A PP2C mostrou ter uma atividade fosfatásica sensível a ácido ocoadáico, requer Mg^{2+} ou Mn^{2+} para a atividade, e existe como um monômero destituído da subunidade regulatória. Recentemente, vários homólogos a PPC com uma marcada diversidade molecular têm sido identificados (Kashiwaba *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2003).

A CaMKP é uma proteína monomérica (54 kDa), a qual requer Mn^{2+} para sua atividade catalítica, é insensível a ácido ocoadáico e caliculina A, e ativada por polications. A CaMKP regula não só a CaMKII mas também a CaMKI e a CaMKIV (Ishida *et al.*, 1998; Ishida *et al.*, 1998).

As proteínas fosfatases responsáveis pela desfosforilação da autofosforilada CaMKII variam dependendo da localização desta enzima nos tecidos ou células. Provavelmente as diferenças no compartimento no qual as fosfatases e a CaMKII interagem uma com as outras influem largamente para a reação de desfosforilação da CaMKII. Por outro lado, é descrito que a Thr286 autofosforilada da CaMKII é desfosforilada na presença de excesso de ADP pela reação reversa da quinase, não por proteínas fosfatases, levando a desativação da CaMKII (Kim *et al.*, 2001).

12) Sinalização Celular em *Trypanosoma cruzi*

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* passa por diversas mudanças morfológicas e bioquímicas. Esses processos são desencadeados pela ativação de sistema de transdução de sinais, compostos por circuitos regulatórios envolvendo proteínas quinases e fosfatases, proteínas G e segundos mensageiros. Modificações em suas atividades podem ser deflagradas por sinais externos ou internos, mudanças ambientais e mecanismos cíclicos ou então, resultarem de atividades de interação ou modulação com outras proteínas. Estudos recentes têm mostrado a importância dos segundos mensageiros no desenvolvimento de tripanosomatídeos incluindo a diferenciação em *T. brucei* induzida por AMPc (Parsons & Ruben, 2000). Em relação ao *T. cruzi*, o Ca^{2+} ativa uma sinalização inositol fosfato/diacilglicerol (Do Campo & Pignataro, 1991). Malaquias & Oliveira (1999) mostraram que quando expostos a fatores mitógenos, presentes no soro fetal, estas células têm estimulada a atividade fosfolipase C fosfatidilinositol específica (PI-PLC), levando ao acúmulo de IP_3 e DAG e aumentando sua proliferação.

O AMPc parece regular negativamente a proliferação em *T. cruzi*. Altos níveis de AMPc inibem a síntese de DNA, RNA e proteína (Santos & Oliveira, 1988). Por outro lado, antes da diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos, os níveis de AMPc aumentam de três a quatro vezes induzindo tanto a diferenciação de *T. cruzi* de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas (Naula & Seebeck, 2000) quanto a diferenciação de amastigotas para epimastigotas (Castro *et al.*, 1987).

Diversas proteínas serina/treonina quinase, incluindo a PKA (Ochatt *et al.*, 1993; Ulloa *et al.*, 1988) e a PKC (Gomez *et al.*, 1989) têm sido identificadas em *T. cruzi*

epimastigotas. Pascucci *et al.* (1999) identificaram em *T. cruzi* uma nova proteína Ser/Thr quinase, a proteína quinase B (PKB), relacionada às proteínas quinases A e C. A ativação da fosfatidilinositol 3-quinase e da PKB/Akt (uma serina/treonina quinase) em *T. cruzi*, assim como nas células hospedeiras induzida pelo parasito, é um sinal para a invasão, importante para o sucesso da internalização do tripomastigota em células fagocíticas não-profissionais (Wilkowsky *et al.*, 2001) e macrófagos (Todorov *et al.*, 2000). A PI-3 quinase regula processos actina-dependentes (Rodriguez-Viciano *et al.*, 1997; Conejo & Lorenzo, 2001) assim como a exocitose (Yang *et al.*, 1996).

As proteínas caseína quinases são multifuncionais entre organismos eucarióticos, reconhecendo resíduos de serina/treonina em suas proteínas alvo, e podendo reconhecer também resíduos de tirosina, menos especificamente (Pinna, 1990; Blanquet, 2000). Em tripanossomatídeos, como *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis*, esta enzima já foi identificada (Sacerdotti-Sierra & Jaffe, 1997; Becker & Jaffe, 1997); em *T. brucei* já foi identificada uma sequência correspondente à subunidade catalítica β de CKII e duas sequências correspondentes à subunidade catalítica α , enquanto que em *T. cruzi* foi identificada uma sequência correspondente a CKI (Park *et al.*, 2002; Calabokis *et al.*, 2002).

Em 2005, com a publicação do genoma e do quinoma dos tripanossomatídeos *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*, foi mostrado que estes decodificam respectivamente 179, 156 e 171 proteínas quinases eucarióticas (ePKs), que parecem ser cataliticamente ativas, assim como 17, 20 e 19 genes para proteínas quinases atípicas (El-Sayed *et al.*, 2005; Parsons *et al.*, 2005). Isso é aproximadamente 30% do número em humanos, 33% maior que o de *Saccharomyces cerevisiae*, e o dobro em relação ao *Plasmodium falciparum* (Ward *et al.*, 2004). A maioria das ePKs são encontradas nos três genomas, entretanto cada espécie possui suas próprias proteínas quinases. Os tripanossomatídeos não possuem membros da família de tirosina quinase citosólica ou ligada ao receptor, e possuem apenas poucas ePKs com domínio transmembrana. Certos grupos de proteínas quinases são pouco representados como as CaMKs, já mencionado anteriormente, e as PKs que respondem a segundos mensageiros, como a PKA, PKG ou PKC. Por outro lado, outras são relativamente bem representados como as quinases dependentes de ciclina e as MAPKs. No *T. cruzi* foram identificadas 13 CaMKs que parecem ser ativas, em

contraste com o genoma humano que codifica 74 CaMKs. Existem também muitas ePKs em tripanosomatídeos que não apresentam grande similaridade com as famílias de ePK, sugerindo que essas enzimas diferem na estrutura e na função de ePKs de mamíferos e são, portanto, potenciais alvos para drogas. Entretanto muito pouco sobre essas ePKs tem sido estudado até hoje (Naula *et al.*, 2005).

Em 1994, Ogueta *et al.* identificaram uma proteína quinase dependente de Ca^{2+} /CaM em *T. cruzi* epimastigotas. A enzima de *T. cruzi* apresentou as subunidades de 50 e 60 kDa correspondentes à CaMKII de cérebro bovino. Assim como a CaMKII de mamífero, a TcCaMK possui especificidade ampla de substrato e composição similar das subunidades. Em 1996, Ogueta *et al.* sugeriram a possível regulação da TcCaMK, descrevendo um mecanismo regulatório entre as formas ligada a membrana e solúvel. A enzima nativa está presente numa forma inativa defosforilada, ligada à membrana. O complexo Ca^{2+} /CaM liga-se à enzima ativando-a. Essa reação liberaria a enzima ativa no citoplasma. Sucessivas autofosforilações levam a enzima ao estado autônomo, independente de Ca^{2+} /CaM, pela fosforilação de resíduos no domínio de ligação com CaM. Esse estado autônomo poderia ser revertido à forma ativa dependente de Ca^{2+} /CaM por fosfatases endógenas, provavelmente a PP2A, que pode fazer isso *in vitro*. E por fim, hipoteticamente, a forma inativa associada à membrana poderia ser restaurada por fosfatases não identificadas. Em 1998, Ogueta *et al.* mostraram o envolvimento da TcCaMK na fosforilação diferencial de substratos durante o ciclo de vida do *T. cruzi*.

A identificação e a caracterização de enzimas centrais em *T. cruzi* envolvidas no processo de transdução de sinal facilitariam os estudos sobre os mecanismos moleculares que o parasita usa com sucesso para completar diversas transições bioquímicas durante seu ciclo de vida. A forma epimastigota de *T. cruzi* vive em constante presença de heme, tornando importante o estudo dessa molécula como sinalizadora na proliferação do parasito. Entretanto muito pouco sobre o metabolismo de heme e seus mecanismos de sinalização em *Trypanosoma cruzi* é conhecido.

II – Objetivos

Considerando a importância da molécula de heme para o *Trypanosoma cruzi* e a pouca contribuição que a literatura tem a oferecer sobre seu metabolismo nestes organismos, esta tese tem por objetivo identificar os mecanismos de sinalização envolvidos na proliferação mediada por heme, presente na dieta dos vetores hematófagos, o que possibilitará a identificação de novos alvos quimioterápicos.

Objetivos Específicos:

- Identificação de diferentes proteínas quinases envolvidas na proliferação (*in vitro*) de *T. cruzi* epimastigotas na presença de heme;
- Verificar a presença de CaMKs multifuncionais em células de *T. cruzi* epimastigotas;
- Identificar qual CaMK está envolvida proliferação celular de *T. cruzi* mediada por heme;
- Analisar o nível de fosforilação das subunidades de CaMKII em células de *T. cruzi* em células tratadas com heme;
- Dosagem da atividade CaMKII, utilizando enzima comercial bovina, na presença de heme.

III – Material e Métodos

3.1) Reagentes

Coquetel de inibidores de proteases (AEBSF, aprotinina, leupeptina, bestatina, pepstatina A e E-64), EDTA, EGTA, Triton X-100, Hepes, SDS, Tris, glicina, acrilamida, TEMED e DMSO foram obtidos da firma SIGMA FINE CHEMICALS (St. Louis, MO, USA). Hemina (Heme-Cl) foi obtido da PORPHYRIN PRODUCTS. BHI foi obtido da DIFCO (Sparks, MD, USA) e SFB da CULTLAB (São Paulo, Brasil). Padrão de peso pré-colorado SeeBlue[®] (250, 98, 64, 50, 36, 30, 16, 6 e 4 kDa), anticorpos secundários anti-camundongo e anti-coelho foram obtidos da INVITROGEN CORPORATION. VO_4^{3-} , OKA, PAO, LY 294002, BIS I, H-9, H-89, Roscovitine, KN-93, KN 92, Myr-AIP e albumina sérica bovina fração V foram obtidos da CALBIOCHEM (L. Jolla, CA, USA). Fluoreto de sódio, tartarato duplo de Na^+/K^+ e molibdato de amônio foram obtidos da REAGEN (RJ, Brasil). Anticorpo monoclonal contra a CaMKIV, anticorpo monoclonal contra a CaMKK e controle positivo para a CaMKII foram obtidos da TRANSDUTION. Anticorpo policlonal contra a Fosfo-CaMKII, anticorpo monoclonal contra a CaMKII e a enzima CaMKII ativa foram obtido da UPSTATE (Piscataway, NJ). Etanol e metanol da firma MERCK. Os demais reagentes utilizados foram de pureza analítica.

3.2) Parasitos

A cepa Dm28c (CT-IOC-010) foi obtida da coleção de tripanossomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz. Culturas de células de *T. cruzi* na forma epimastigotas foram mantidas a 28 °C durante sete dias em BHI e suplementado com hemina 30 μM e 10% de SFB. As culturas foram colocadas em garrafas de 50 mL (25 cm^2), com uma densidade de $2 - 3 \times 10^7$ organismos/mL em 5 mL de meio. Os parasitos ficaram em cultura por sete dias. Posteriormente o crescimento foi monitorado pela contagem em câmara de Neubauer e para depois serem utilizados nos experimentos.

3.3) Efeito de Inibidores de Proteínas Quinases na proliferação do parasito

Foram testados *in vitro* inibidores de várias proteínas quinases. *T. cruzi* epimastigotas no 7º de crescimento em meio BHI suplementado com hemina 30 µM e 10% FCS foram centrifugados e lavados duas vezes em BHI sem adição de hemina e transferidos para BHI contendo 10 % de SFB, na presença ou na ausência de hemina 30µM bem como na presença ou ausência dos seguintes inibidores: LY (8 µM), BIS (0,05 µM), H-9 (5 µM), H-89 (0,24 µM), R (3,5 µM), KN-93 (2 µM), Heparina (10 µg/ml) ou TBB (1 µM). O inóculo inicial foi de 5×10^5 células. As células foram mantidas 5 dias em cultura e o crescimento monitorado pela contagem de células em câmara de Neubauer.

3.4) Efeito do KN-93 e KN-92 na proliferação do parasito

T. cruzi epimastigotas no 7º de crescimento em meio BHI suplementado com hemina 30 µM e 10% FCS foram centrifugados e lavados duas vezes em BHI sem adição de hemina e transferidos para BHI contendo 10 % de SFB e diferentes concentrações de KN-93 (0, 0,2 µM, 2 µM, 5 µM e 10 mM) ou KN-92 2 µM. O inóculo inicial foi de 5×10^5 células. As células foram mantidas 5 dias em cultura e o crescimento monitorado pela contagem de células em câmara de Neubauer.

3.5) Efeito do Myr-AIP na proliferação do parasito

T. cruzi epimastigotas no 7º de crescimento em meio BHI suplementado com hemina 30 µM e 10% FCS foram centrifugados e lavados duas vezes em BHI sem adição de hemina e transferidos para BHI contendo 10 % de SFB, na presença ou na ausência de heme (30 µM), bem como na presença ou ausência do peptídeo Myr-AIP (30 µM). O inóculo inicial foi de 5×10^5 células. As células foram mantidas 5 dias em cultura e o crescimento monitorado pela contagem de células em câmara de Neubauer.

3.6) Atividade CaMKII

A atividade CaMKII foi ensaiada como sugerido no CaM Kinase II Assay Kit (Upstate Biotechnologies). Como substrato utilizamos a histona IIA. As reações (50µl) foram incubadas com 50 ng de CaMKII ativa por 10 min na presença de histona IIA (1 mg/mL), inibidor de proteína quinase dependente de AMPc (2 µM), inibidor de proteína quinase dependente de Ca²⁺ (2 µM), diferentes concentrações de heme e 100 µM de [³²P]ATP (500-1000 cpm/pmol) a 30 °C. Depois da incubação foram retiradas alíquotas de 10 µL de cada ponto e transferidos para papéis de fosfocelulose. Estes foram lavados 3 vezes em ácido fosfórico 0,75% e uma vez em acetona 100%, secos, e a contagem feita no cintilador.

3.7) Preparo das amostras para “Western blotting”

Os parasitos foram incubados por 5 dias em diferentes condições, na presença ou na ausência de hemina 30 µM. Após o período de incubação, estes parasitos foram, então, centrifugados, lavados duas vezes em tampão fosfato de potássio 100 mM pH 7,4 (PBS), e o sedimento foi ressuspensão em tampão de lise (Hepes 50 mM, MgCl₂ 1 mM, Triton X-100 1%, EDTA 10 mM; pH 6.4) na presença de coquetel de inibidores de proteases (AEBSF 1,04 mM, aprotinina 800 nM, leupeptina 20 µM, bestatina 40 µM, pepstatina A 15 µM e E-64 14 µM) e na presença de inibidores de fosfatases (EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, OKA 0,075 µM, VO₄⁻³ 2 mM, molibdato de amônio 2 mM e PAO 0,18 mM). Depois de lisados os parasitos foram então centrifugados por 10 minutos a 10.000 rpm à 4°C. O sedimento foi descartado e o sobrenadante (extrato acelular) recolhido para dosagem de proteína.

3.8) Dosagem de proteína

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

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

As eletroforeses em gel de poliacrilamida na presença de SDS foram realizadas como descrito por Laemmli (1970). Foram utilizados géis contendo 12% de acrilamida e padrão de massa molecular pré-corados SeeBlue[®] miosina (250 kDa), BSA (98 kDa), Glutamina desidrogenase (64 kDa), álcool desidrogenase (50 kDa), anidrase carbônica (36 kDa), mioglobina (30 kDa), lisozima (16 kDa), aprotinina (6 kDa) e cadeia β de insulina (4 kDa).

3.10) Western blotting

Após SDS-PAGE 12%, as proteínas foram eletrotransferidas do gel para uma membrana de nitrocelulose. A eletrotransferência foi realizada em tampão Tris 25 mM, pH 8,3, glicina 192 mM, contendo metanol 20% a 210 mA por 120 minutos a 4°C (Towbin *et al.*, 1979). A transferência foi monitorada corando-se a membrana, por 5 minutos, com uma solução 0,1% (p/v) de vermelho de Ponceau, TCA 1,5% (p/v) e ácido sulfossalicílico 1,5% (p/v). Posteriormente, a membrana foi descorada por lavagem com água para visualização das bandas e obtenção do perfil proteico. Em seguida, a membrana foi totalmente descorada com Tris-HCl 10 mM pH 8,0 contendo 0,15 M de NaCl (TBS) e bloqueada com tampão TTA (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, NaCl 150 mM, contendo 5 % (p/v) de albumina sérica bovina fração V e 0,1 % (v/v) de tween 20) por 1 hora à temperatura ambiente. Após 1 hora, o tampão de bloqueio foi desprezado e a membrana incubada com anticorpo específico numa diluição de 1:2000 (Fosfo-CaMKII), 1:1000 (CaMKK, CaMKIV e CaMKII) em TTA por aproximadamente 18 horas a 4°C. Em seguida, a membrana foi lavada 5 vezes, em intervalos de 5 minutos, com 20 mL de TT (Tris-HCl 10 mM pH 8,0; NaCl 150 mM e Tween 20 0,1%). Seguiu-se uma incubação com o anticorpo secundário (anti-coelho para Fosfo-CaMKII) e (anti-camundongo para CaMKK, CaMKIV e CaMKII), numa diluição de 1:10.000 conjugado com peroxidase, por 1 hora. A membrana foi então lavada 5 vezes, em intervalos de 5 minutos, com 20 mL de TT e 3 vezes com TBS. Por fim o complexo antígeno-anticorpo foi revelado através do método de intensificação de

quimioluminescência pelo luminol (ECL). O método ECL consiste basicamente na oxidação do luminol, reação catalisada pela peroxidase em presença de peróxido de hidrogênio. Intensificadores químicos sustentam a emissão de luz do luminol, que imprime as bandas correspondentes as proteínas em filmes autorradiográficos. O filme Kodak X-OMAT foi exposto por 4 minutos, revelado e fixado adequadamente em câmara escura.

3.11) Análise estatística

Análises descritivas (média, desvio padrão, intervalo de confiança) das variáveis foram realizadas. Foi utilizado o teste de Tukey para verificar se as variáveis seguiam uma distribuição normal. Para realização do teste foi utilizado o programa “Graph Pad Prism”, Versão 3.0 (Graph Pad Software, Inc.).

IV – Resultados

Resultados do nosso grupo mostram que a proliferação de *T. cruzi* epimastigotas aumenta de maneira dose-resposta em relação à adição de heme, mesmo quando altas concentrações de heme são adicionadas ao meio de cultura. Já a adição de hemoglobina e peptídeos derivados da hemoglobina não levou a esse efeito dose-resposta (Lara *et al.*, 2007). A partir destes resultados investigamos as possíveis vias de sinalização envolvidas neste aumento da proliferação na presença de heme.

Na tabela 1 estão computados os resultados da análise farmacológica da eventual participação de diversas classes de proteínas quinases. Como podemos observar a inibição de PKA (H-89), PKC (BIS), Fosfatidilinositol 3-quinase (LY 294002), PKG (H-9), Quinase dependente de ciclina (Roscovitine) ou Caseína quinase II (Heparina e TBB) não afetou o efeito mitógeno do heme, em nossas condições experimentais, sugerindo fortemente que estas enzimas não fazem parte da(s) via(s) de sinalização do heme. É possível notar que o KN-93, inibidor de quinases dependentes de Ca^{2+}/CaM (multifuncionais), teve um efeito inibitório da ação do heme. A figura 1 mostra uma curva de concentração do KN-93, e um efeito dose-dependente do inibidor sobre a proliferação do parasito, indicando que essa via pode ser importante para a proliferação celular mediada por heme.

Como controle da influência da atividade da CaMKs na proliferação celular de *T. cruzi*, utilizamos o KN-92, um análogo inativo do KN-93. Esta molécula é comumente utilizada para testar a especificidade do KN-93, já que não possui o domínio hidroxietil (presente no KN-93) que se liga ao domínio de ligação de Ca^{2+}/CaM nas CaMKs, impedindo desta forma a sua ativação (Sumi *et al.*, 1991). O resultado pode ser observado na Figura 2.

Este resultado confirma o envolvimento de uma atividade Calmodulina quinase no aumento de proliferação aqui descrito. As CaMKs multifuncionais parecem ter papel importante no ciclo celular. A literatura mostra que o KN-93 possui efeito anti-proliferativo numa variedade de células, indicando que uma ou mais CaMKs são requeridas (Kahl and Means, 2003).

Analisamos então a presença de duas CaMKs em *T. cruzi*. A CaMKK é a primeira enzima da cascata que ativa a CaMKI e a CaMKIV através da fosforilação de suas alças de ativação. Utilizamos a técnica de “western blotting”, com anticorpos anti-CaMKK e anti-CaMKIV para identificar a presença destas duas proteínas em *T. cruzi* epimastigotas. As amostras foram preparadas como descrito em Materiais e Métodos e submetidas à eletroforese em condições desnaturantes, utilizando a mesma quantidade de proteína em todos os poços. Após transferência para membrana de nitrocelulose, o material foi bloqueado e incubado com anticorpo anti CaMKK e CaMKIV e revelado por ECL. Como podemos observar na figura 3, os anticorpos reconhecem essas proteínas em *T. cruzi*.

A fim de estudar o possível envolvimento da CaMKII, testamos o efeito do peptídeo Myr-AIP. O AIP é um peptídeo derivado do substrato da CaMKII, altamente específico e potente, autocantide-2, e o Myr-AIP é a forma miristoilada do AIP, o que o torna permeável à célula (Ishida *et al.*, 1995). A inibição do Myr-AIP não é afetada pelo complexo Ca^{2+}/CaM como ocorre com o KN-93. Na figura 4, podemos observar uma diminuição na proliferação causada pelo peptídeo na presença de heme, confirmando o efeito sobre a proliferação mediada por heme, e o envolvimento da via da CaMKII.

A partir desse resultado investigamos a presença da enzima CaMKII através da técnica de “western blotting”, utilizando anticorpo monoclonal anti-camundongo contra a CaMKII total. Como podemos observar na figura 5, o anticorpo não reagiu com proteínas de *T. cruzi*. Encontramos apenas uma banda, referente ao controle positivo para a enzima, feito com lisado de cérebro de rato, rico em CaMKII. Este resultado negativo não poderia significar a ausência desta enzima nestas células, uma vez que CaMKII já foi identificada em *cruzi*. A utilização do anticorpo monoclonal anti-camundongo pode justificar este resultado.

Dando seguimento a identificação da CaMKII em células de *T. cruzi*, foi analisada a fosforilação de suas subunidades na presença de heme, através da técnica de “western blotting”, utilizando anticorpo anti-fosfo CaMKII. Para isso, epimastigotas foram incubados por 5 dias na presença ou na ausência de heme 30 μ M. As amostras foram preparadas como descrito anteriormente utilizando anticorpo anti-Fosfo-CaMKII (figura 6).

Com base neste resultado podemos observar o aumento do nível de fosforilação da enzima de *cruzi* na presença de heme, mais precisamente da subunidade β (60 kDa),

sugerindo que o heme esteja envolvido na ativação da CaMKII de *Trypanosoma cruzi*. Desta forma então, é mostrada a forma ativa de CaMKII em epimastigotas. Mais que isso, mostramos que o nível de fosforilação da enzima está maior quando as células são cultivadas na presença de heme 30 μM . Este resultado confirma então o envolvimento da CaMKII no efeito proliferativo provocado pelo heme.

Posteriormente, ensaiamos a atividade da CaMKII, utilizando uma CaMKII recombinante comercial bovina para testarmos a possível ativação dessa enzima pelo heme. A dosagem desta atividade se baseia na fosforilação de proteínas histonas por uma enzima já ativada por conter $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$. Foram feitos controles dos pontos com heme, na ausência da enzima. A figura 7 mostra os valores obtidos da atividade de cada ponto após a subtração de seu respectivo controle.

Com base nesse resultado, podemos observar um aumento da atividade de 2 vezes ou mais na presença de 100 μM heme e um grande aumento, de cerca de 10 vezes, quando adicionado 300 μM heme, mostrando pela primeira vez a ativação de CaMKII na presença de heme.

Tratamento	Enzima alvo	% proliferação
H-9 5 μ M	PKG	103,32 \pm 2,0
H-9 5 μ M + Heme 30 μ M	PKG	100,54 \pm 5,16
H-89 0,24 μ M	PKA	103,77 \pm 2,67
H-89 0,24 μ M + Heme 30 μ M	PKA	106,25 \pm 1,47
Roscovitine 3,5 μ M	Quinase dependente de ciclina	89,18 \pm 0,73
Roscovitine 3,5 μ M + Heme 30 μ M	Quinase dependente de ciclina	100 \pm 0
Bisindolilmaleimida 0,05 μ M	PKC	91,24 \pm 3,64
Bisindolilmaleimida 0,05 μ M + Heme 30 μ M	PKC	103,41 \pm 9,64
LY 294002 8 μ M	Fosfatidilinositol 3-quinase	106,06 \pm 4,5
LY 294002 8 μ M + Heme 30 μ M	Fosfatidilinositol 3-quinase	93,12 \pm 0,65
Heparina 10 μ g/ml	Caseína quinase II	98,73 \pm 3,77
Heparina 10 μ g/ml + Heme 30 μ M	Caseína quinase II	85,57 \pm 9,74
TBB 1 μ M	Caseína quinase II	0*
TBB 1 μ M + Heme 30 μ M	Caseína quinase II	0*
KN 93 2 μ M	Calmodulina quinase	109,19 \pm 2,8
KN 93 2 μ M + Heme 30 μ M	Calmodulina quinase	67,94 \pm 0,39*

Tabela 1: Efeito dos diferentes inibidores de proteína quinase na proliferação de *T. cruzi* epimastigotas. Os valores de % de proliferação foram calculados sobre os valores absolutos dos tratados em relação aos seus respectivos controles. Os resultados foram analisados através do Teste de ANOVA One-way (Tukey) para um nível de significância de * $p < 0,001$ em relação ao controle.

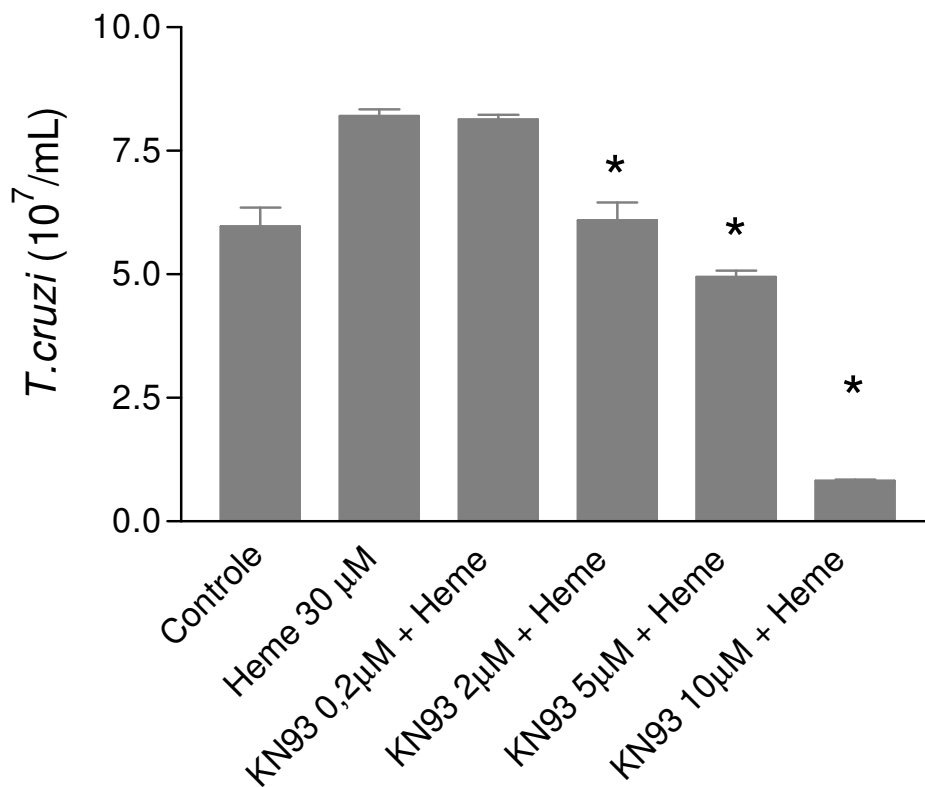


Figura 1 – Efeito do KN-93 na proliferação da cepa Dm28c na presença de Heme. Epimastigotas foram mantidos em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme 30 μM bem como na presença ou na ausência de diferentes concentrações do inibidor KN-93 (0, 0,2 μM, 2 μM, 5 μM e 10 μM). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, *p<0,01 em relação ao grupo tratado com heme 30 μM pelo teste de ANOVA One-way (Tukey). Figura representativa de três experimentos independentes realizados em duplicata.

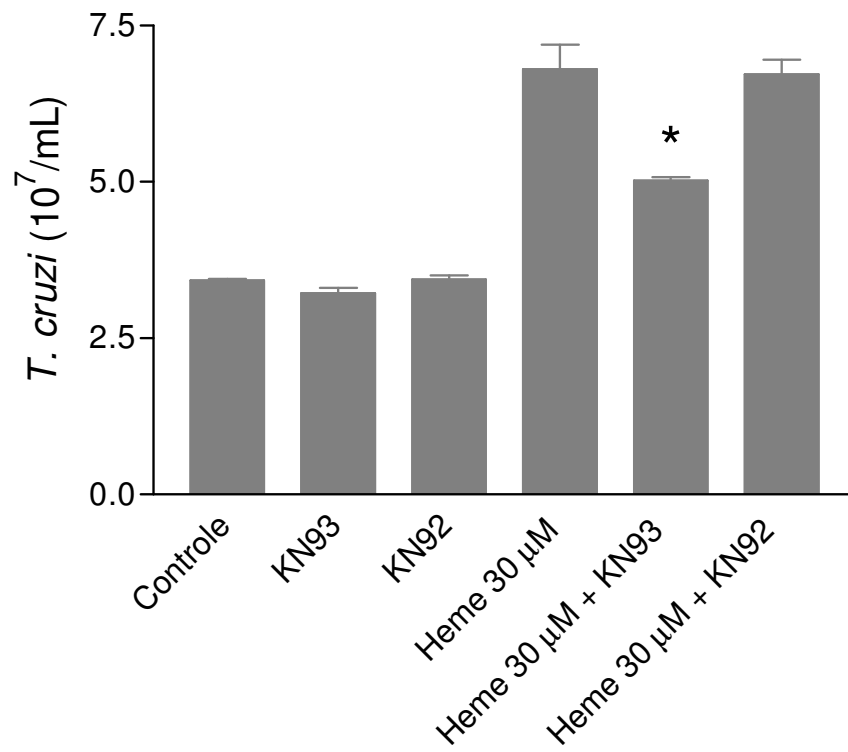


Figura 2 – Efeito do KN92 na proliferação da cepa Dm28c na presença de Heme. Epimastigotas foram mantidos em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme 30 μ M bem como na presença ou na ausência do inibidor KN92 (2 μ M, análogo inativo do KN 93). Os dados estão expressos em média \pm desvio padrão, * p <0,01 em relação ao grupo tratado com heme 30 μ M pelo teste de ANOVA One-way (Tukey). Figura representativa de três experimentos independentes, cada um realizado em duplicata.

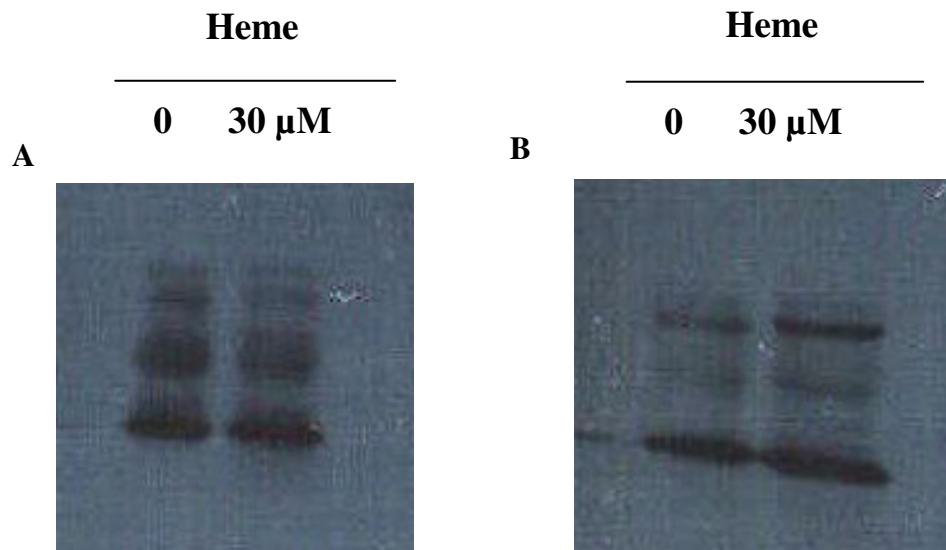


Figura 3 – Análise por Western blotting da presença da CaMKK (A) e da CaMKIV (B) em *T. cruzi* epimastigotas. Epimastigotas foram mantidos em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme 30 μM por 5 dias. Após a obtenção do extrato acelular, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE (12%) e transferidas para um membrana de nitrocelulose, que foi incubada com cada anticorpo específico e revelada com o kit ECL, como descrito em Materiais e Métodos. Figura representativa de dois experimentos independentes.

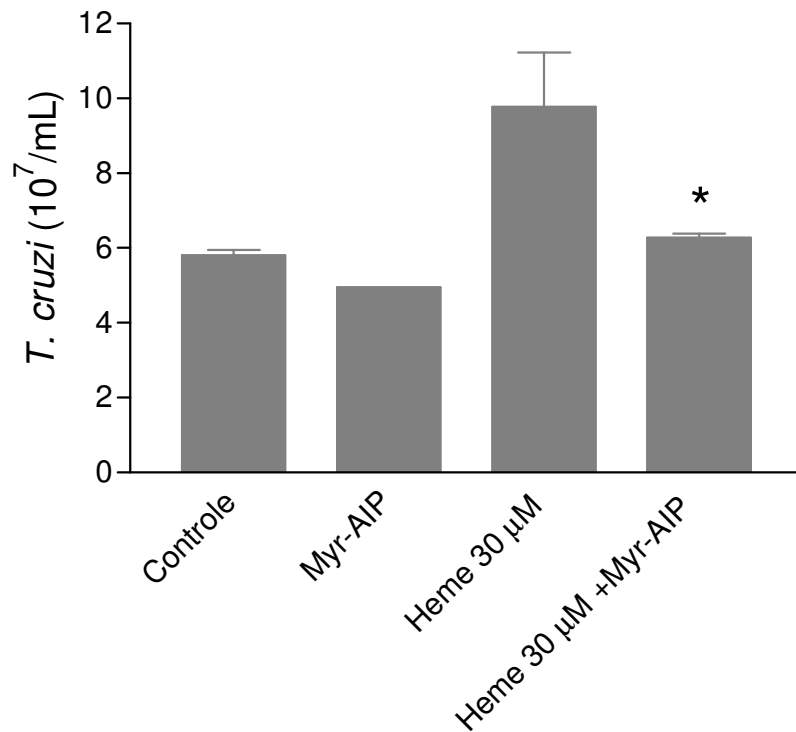


Figura 4 – Efeito do peptídeo Myr-AIP na proliferação da cepa Dm28c na presença de Heme. Epimastigotas foram mantidos em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme 30 μM bem como na presença ou na ausência do inibidor Myr-AIP (30 μM, peptídeo inibitório miristoilado). Os dados estão expressos em média ± desvio padrão, *p<0,001 em relação ao grupo tratado com heme 30 μM pelo teste de ANOVA One-way (Tukey). Figura representativa de três experimentos independentes, cada um realizado em duplicata.

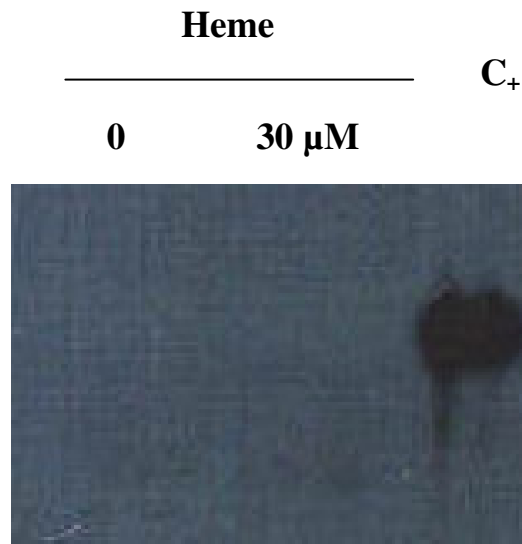


Figura 5 – Análise por Western blotting da presença da CaMKII em *T. cruzi* epimastigotas. Epimastigotas foram mantidos em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme 30 μ M por 5 dias. Após a obtenção do extrato acelular, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE (12%) e transferidas para um membrana de nitrocelulose, que foi incubada com o anticorpo anti-CaMKII e revelada com o kit ECL, como descrito em Materiais e Métodos. Figura representativa de dois experimentos independentes.

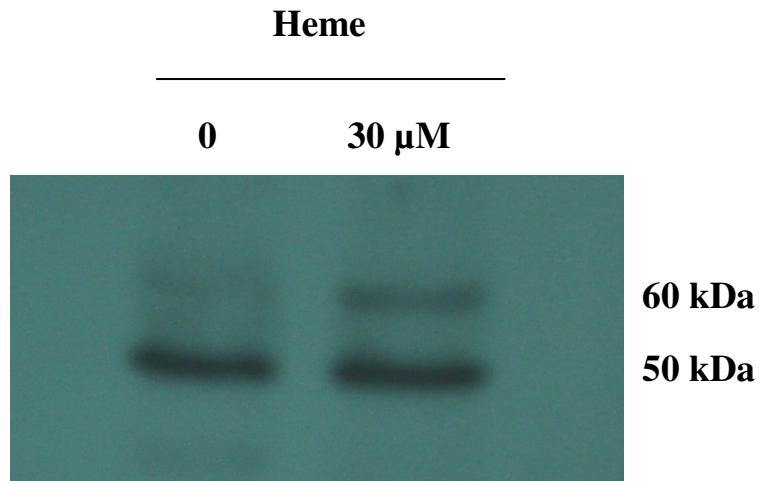


Figura 6 – Análise por Western blotting dos níveis de fosforilação das subunidades α e β da enzima CaMKII após tratamento com heme. Epimastigotas foram mantidos em BHI suplementado com 10% de SFB na presença ou na ausência de heme 30 μ M por 5 dias. Após a obtenção do extrato acelular, as proteínas foram separadas por SDS-PAGE (12%) e transferidas para um membrana de nitrocelulose, que foi incubada com o anticorpo anti-fosfoCaMKII e revelada com o kit ECL, como descrito em Materiais e Métodos. Figura representativa de três experimentos independentes.

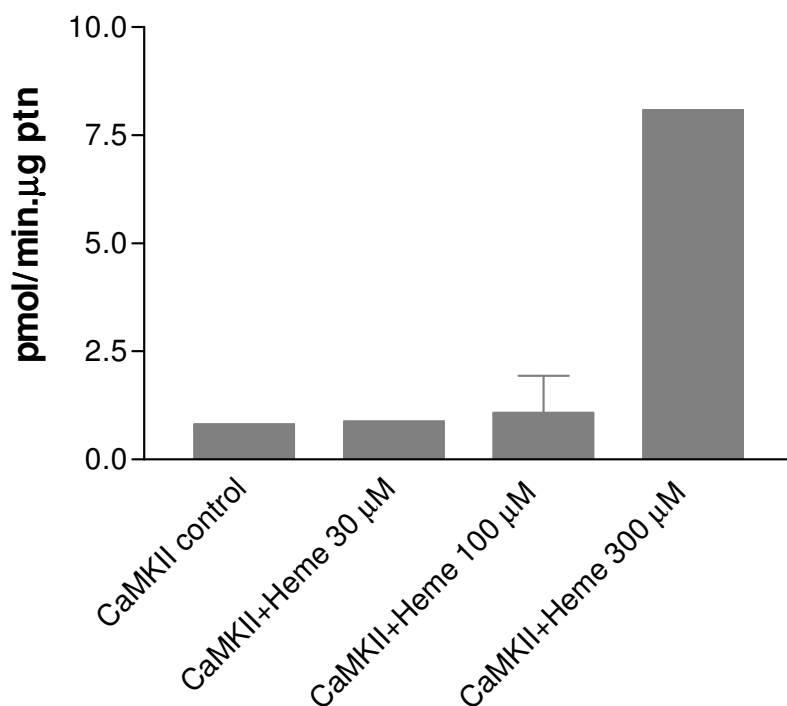


Figura 7 – Atividade da CaMKII ativa recombinante na presença de heme. A atividade CaMKII foi ensaiada como sugerido no CaMK II Assay Kit (Upstate Biotechnologies). As reações (50µl) foram incubadas com 50 ng da CaMKII ativa por 10 min na presença de histona IIA (1 mg/mL), inibidor de proteína quinase dependent de AMPc (2 µM), inibidor de proteína quinase dependent de Ca²⁺ (2 µM), diferentes concentrações de heme and 100 µM de [³²P]ATP (500-1000 cpm/pmol) a 30 °C.

V – Discussão

Os ciclos de vida dos tripanossomatídeos são extremamente complexos envolvendo diversas mudanças na sua morfologia. A manutenção da infectividade destes parasitos, assim como sua relação com o hospedeiro e o vetor, são processos primordiais na vida destes protozoários. Tais processos são extremamente complexos e envolvem várias cascatas de sinalização, como podemos observar através de nossos resultados e pelos dados já descritos na literatura. O estudo dos fatores que modulam esses processos podem ser de grande valor na tentativa do controle da Doença de Chagas. Diversas linhas de pesquisas têm mostrado a família de proteínas quinases como alvo para o desenvolvimento drogas no tratamento de tripanosomíases e leishmanioses. Muitas proteínas quinases têm sido mostradas como sendo essenciais para proliferação e/ou viabilidade em diferentes estágios do ciclo de vida destes parasitos. E também com a publicação do genoma e quinoma desses tripanossomatídeos, foi mostrado que suas proteínas quinases apresentam diferenças significantes em relação às suas homólogas em mamíferos, o que as torna potenciais alvos para quimioterapia (Naula *et al.*, 2005). Embora muitas quinases já tenham sido descritas nestes parasitos, pouco se sabe sobre seus sistemas de sinalização. Deste modo, torna-se fundamental o desenvolvimento de estudos que visem o entendimento destas vias, assim como sua importância no ciclo destes parasitos.

Dados da literatura mostram que a interação do heme livre com o neutrófilo humano leva a uma reorganização do citoesqueleto de actina e à geração de espécies reativas de oxigênio através da indução da atividade da proteína quinase C (PKC), e também pelo aumento da expressão de IL-8 (Graça-Souza *et al.*, 2002). Arruda *et al.* (2004) mostraram que o heme atrasa a apoptose espontânea de neutrófilos *in vitro*. Esse efeito requer a atividade HO, e depende da produção de espécies reativas de oxigênio. A inibição da ERK ou PI3K aboliu o efeito protetor do heme sobre os neutrófilos humanos, sugerindo o envolvimento das vias Ras/Raf/MAPK e PI3K nesse efeito. Dados recentes na literatura têm mostrado outras funções do heme, tais como na proliferação de linfócitos (Smith *et al.*, 1997) e de células HeLa (Ye and Zhang, 2004).

Embora alguns gêneros de tripanossomatídeos sejam patogênicos para humanos, animais ou plantas, as vias de transdução de sinais destes parasitos ainda são pouco

conhecidas (Parsons and Ruben, 2000). De modo a investigar quais vias estão envolvidas nessa proliferação celular mediada por heme, testamos diversos inibidores de proteínas quinases *in vitro*. Somente um inibidor apresentou efeito sobre esta proliferação, o KN-93, inibidor de quinases dependente de Ca^{2+} /CaM (Multifuncionais, CaMKI, CaMKII e CaMKIV) (Figura 1), os demais inibidores não alteraram a proliferação destas células (Tabela 1). A proliferação das células tratadas com KN-93 difere totalmente do grupo não-tratado (Figura 1), mostrando que esse grupo de proteínas atua como regulador fundamental da proliferação do parasito.

Como já descrito na literatura, o KN-93 possui efeito anti-proliferativo numa variedade de células (Kahl and Means, 2003). Lorca *et al.*, 1994, mostraram que a CaMKII é o alvo do sinal do Ca^{2+} requerido na transição da metáfase para a anáfase em extratos de ovos de *Xenopus*. O fato do KN-93 atrasar a transição metáfase/ anáfase em células HeLa sugere que a CaMKII possa ter um papel na regulação dessa transição no ciclo mitótico da célula, mas ainda não está bem esclarecido (Patel *et al.*, 1999). Outros resultados mostram o efeito do KN-93 na transição G_2/M , quando células HeLa sincronizadas na fase S são tratadas com KN-93, este provoca um arraste em G_2/M (Patel *et al.*, 1999). Também foi visto que as CaMKs são requeridas para a progressão de G_1 , já que na presença de KN-93 há um arraste nesta fase (Rasmussen and Rasmussen, 1995; Tombes *et al.*, 1995). Sobre todos esses estudos com células HeLa, a maior diferença entre eles é o estado proliferativo em que as células se encontravam no momento do tratamento com KN-93. Uma explicação é que as células em G_1 contêm cerca de 50% menos CaM do que na fase S e, portanto, são mais sensíveis ao tratamento com KN-93 em G_1 . Já quando estão na fase S, o arraste em G_1 já foi evitado, o que torna possível a passagem para G_2/M (Kahl and Means, 2003). Na inibição da proliferação aqui observada, o KN-93 possivelmente está agindo em alguma dessas fases do ciclo, não permitindo que as células cheguem à mitose e consigam se dividir.

Como controle da influência da atividade da CaMKs na proliferação celular de *T. cruzi*, utilizamos o KN-92, um análogo sem atividade inibitória, que não possui o domínio catalítico do KN-93, comumente utilizada para testar a especificidade da inibição. E quando testado o KN-92 na cultura, este não apresentou efeito sobre a proliferação (figura 2),

confirmando o envolvimento de uma atividade CaMK no aumento de proliferação aqui descrito.

Confirmamos a presença de CaMKs em *T. cruzi*, utilizando anticorpos anti-CaMKK e anti-CaMKIV (figura 3). Podemos observar a presença da CaMKK, a primeira enzima da cascata, que ativa a CaMKI e a CaMKIV. A CaMKIV também mostrou-se presente nessas células, e a CaMKI não foi investigada.

Diferentemente do KN-93, o Myr-AIP é um peptídeo inibitório altamente específico para CaMKII. O AIP e o Myr-AIP apresentam uma substituição da treonina por uma alanina na posição 9, o que não permite que sejam fosforilados pela CaMKII, inibindo especificamente essa atividade. Esses peptídeos são cerca de 50 e 500 vezes mais potentes que o CaMK-(281-302 Ala²⁸⁶) e o KN-93, respectivamente, comumente usados para inibição de CaMKII (Ishida *et al.*, 1995; Ishida *et al.*, 1998). O KN-93 inibe as CaMKs em geral porque inibe a ligação do complexo Ca²⁺/CaM, característica comum necessária para a ativação das enzimas dessa família. Já o AIP e o Myr-AIP agem especificamente sobre a CaMKII porque inibem a sua autofosforilação, mecanismo próprio desta enzima, diferentemente da CaMKI e da CaMKIV, que são fosforiladas pela CaMKK (Sumi *et al.*, 1991; Ishida *et al.*, 1995).

Testamos então o efeito do Myr-AIP *in vitro* e observamos que a adição do inibidor na cultura bloqueou a proliferação dos parasitos na presença de heme (figura 4), confirmando o efeito específico sobre a proliferação mediada por heme, e o envolvimento da via da CaMKII.

A partir desse resultado investigamos a presença da CaMKII, e a fosforilação de suas subunidades na presença de heme, através de *western blotting*, utilizando anticorpos contra a enzima total (figura 5) e anti-fosfo CaMKII (figura 6). O fato de existir um aumento do nível de fosforilação da enzima na presença de heme, sugere fortemente que o heme esteja envolvido na ativação da CaMKII de *Trypanosoma cruzi*.

No *blotting* contra a CaMKII total só encontramos uma banda, referente ao controle positivo para a enzima, feito com lisado de cérebro de rato, rico em CaMKII. O anticorpo contra CaMKII total não reagiu com as proteínas de *T. cruzi* (figura 5), em contraste com o resultado obtido quando utilizado o anticorpo contra a enzima ativa (figura 6). O anticorpo anti-fosfo CaMKII é feito contra as subunidades α/β fosforiladas (Thr 286/287), enquanto o

anticorpo contra CaMKII total utilizado é feito contra a subunidade alfa da enzima, para uma região diferente do sítio catalítico. Isso pode ser explicado pelo fato de que as proteínas quinases de tripanosomatídeos tem diferenças significantes em relação às suas homólogas em mamíferos. A região para qual o anticorpo foi desenhado no caso da enzima total pode não ser conservada em *T. cruzi*. Já os sítios catalíticos de enzimas costumam ser regiões mais conservadas entre as espécies.

Quando ensaiamos a atividade da CaMKII, utilizando uma CaMKII recombinante comercial, na presença de heme, vimos que a adição de heme 300 μM no meio de reação aumentou a atividade enzimática cerca de 10 vezes (figura 7), entretanto não conseguimos ver aumento desta atividade na presença de 30 μM de heme. Este resultado pode ser explicado pelo fato da enzima já estar ativa, e desta forma pode ser que seja necessário uma concentração mais alta de heme para que possamos ver esse efeito. Já em cultura de *T. cruzi*, o efeito foi observado na presença de 30 μM de heme (Fig. 1 e 4). Neste caso, é possível propor que o heme possa estar ativando a CaMKII por promover: (i) influxo de Ca^{2+} (a partir do meio extracelular), (ii) efluxo de Ca^{2+} (a partir dos estoques dos acidocalcissomas) e/ou (iii) pelo aumento da expressão de CaM. Por outro lado, no ensaio da atividade utilizando a enzima purificada, o heme não poderia estar aumentando a atividade da enzima por meio da elevação do nível de Ca^{2+} e/ou CaM, sugerindo então a existência de diferentes sítios de ligação para heme na CaMKII.

Existem poucas citações sobre heme e CaMKII na literatura, tornando importante esse conjunto de resultados. Masuya *et al* (1999), mostraram que o heme leva à ativação do proto-oncogen *c-fos* via CaMKII em células humanas. Células HeLa ou células de fibroblastos humanos tratadas com heme tiveram a uma indução tempo e dose-dependente do RNA_m de *c-fos*. Essa indução foi ausente nas células tratadas com actinomicina D, indicando que a indução de *c-fos* pelo heme ocorre em nível de transcrição. O uso de inibidores de MAPK não afetou essa indução, de todos os inibidores testados, só o KN-62, específico para CaMKII, inibiu a indução do RNA_m de *c-fos* pelo heme. Também foi observado o aumento da fosforilação da subunidade de 60 kDa da CaMKII nas células tratadas com heme tal qual observamos em *T. cruzi*.

Esses resultados são a primeira demonstração de que a indução da proliferação de *T. cruzi* induzida por heme ocorre via cascata de fosforilação de proteínas, e futuros experimentos serão feitos para elucidar essa ativação da CaMKII pela molécula de heme, e os mecanismos envolvidos nessa regulação. Já estão sendo feitos ensaios para a atividade CaMKII em extratos de epimastigotas mediante diferentes tratamentos, visando a caracterização dessa atividade em *T. cruzi*, além da enzima recombinante.

Futuros experimentos serão desenvolvidos, incluindo a identificação da CaMKII de *T. cruzi* por Espectrometria de Massa e o estudo de suas potenciais proteínas alvos, usando anticorpo anti-fosfoserina em resposta ao tratamento das células com heme por técnicas de eletroforese bidimensional e sequenciamento.

VI – Conclusões

- Somente o inibidor de CaMKs, KN-93, teve efeito inibitório sobre a proliferação mediada por heme em *T. cruzi* epimastigotas, indicando a importância dessa família de quinases para a sinalização do heme.
- O efeito do Myr-AIP *in vitro*, bloqueando a proliferação dos parasitos na presença de heme, confirmou o efeito específico sobre a proliferação mediada por heme, e o envolvimento da via da CaMKII.
- Observamos a presença de proteínas homólogas à CaMKK e CaMKIV de mamíferos em células de *T. cruzi* epimastigotas.
- Foi visto um aumento do nível de fosforilação da enzima CaMKII na presença de heme, sugerindo fortemente o envolvimento do heme na ativação dessa enzima em *T. cruzi*.
- O ensaio da atividade CaMKII, utilizando uma CaMKII recombinante comercial, na presença de heme, mostrou que a adição deste leva a um grande aumento da atividade enzimática, mostrando novamente a ativação vista no *western blotting* anti-fosfoCaMKII, e sugerindo a existência de diferentes sítios de ligação para heme na CaMKII.

VII – Referências Bibliográficas

- Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell** 1990; 61: 1277-87.
- Arruda MA, Rossi AG, Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Graça-Souza AV. Heme inhibits human neutrophil apoptosis: involvement of phosphoinositide 3-kinase, MAPK, and NF- κ B. **J. Immunol.** 2004; 173(3): 2023-30.
- Azogue E, La Fuente C, Darras CH. Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1985; 79: 176-180.
- Barford D, Das AK, Egloff MP. The structure and mechanism of protein phosphatases, insights into catalysis and regulation. **Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.** 1998; 27: 133-164.
- Becker S, Jaffe CL. Effect of protein kinase inhibitors on the growth, morphology and infectivity of *Leishmania* promastigotes. **Parasitol. Res.** 1997; 83: 273-280.
- Benchimol M, De Souza W, Vanderheyden N, Zhong L, Lu H-G, Moreno S, Docampo R. Functional expression of a vacuolar-type H⁺-ATPase in the plasma membrane and intracellular vacuoles of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.** 1998; 332: 695-702.
- Berridge MJ. Calcium signalling and cell proliferation. **Bioessays** 1995; 17: 491-500.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. The versatility and universality of calcium signalling. **Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.** 2000; 1: 11-21.
- Blanquet PR. Casein Kinase II as a potentially important enzyme in the nervous system. **Prog. Neurobiol.** 2000; 60: 211-246.
- Braun AP, Schulman H. The multifunctional calcium/calmodulin-dependent protein

kinase: from form to function. **Ann. Rev. Physiol.** 1995; 57: 417-445.

- Brener Z. Formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. In Brener Z and Andrade Z (eds). ***Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979. p. 450.
- Brener Z. Laboratory acquired Chagas disease: an endemic disease among parasitologists. In: Morel C (ed). **Genes and antigens of parasites**. 2 ed. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p. 3-9.
- Calabokis M, Kurza L, Wilkesmanb J, Galan-Caridada JM, Mollera C, Gonzattia MI, Bubisa J. Biochemical and enzymatic characterization of a partially purified casein kinase-1 like activity from *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Int.** 2002; 51: 25-39.
- Calabrese KS. Immunosuppressive drugs as a tool to explore immunopathology in Experimental Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1999; 94: 273-276.
- Cançado JR, Brener Z. Terapêutica. In Brener Z and Andrade Z (eds). ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Guanabara Koogan, 1979. p. 362-424.
- Carafoli E. Calcium signaling: a tale for all seasons. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 2002; 99: 1115-1122.
- Castro SL, Meirelles MNL, Oliveira MM. *Trypanosoma Cruzi*: Adrenergic Modulation of Cyclic AMP Role In Proliferation and Differentiation of Amastigotes In Vitro. **Exp. Parasitol.** 1987; 64: 368-375.
- Chagas C. Nova tripanomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1909; 1: 159-218.
- Chagas C. Sobre um trypanosome do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculatus*. Possibilidade de ser o tatu um depositário do *Trypanosoma cruzi* no mundo exterior. **Brazil Médico** 1912; 26: 305-306.

- Chagas C. Revisão do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. **Brazil Médico** 1913; 27: 225.
- Chagas C. Sobre a verificação do *Trypanosoma cruzi* em macacos do Pará (*Chrysothrix sciureus*). **Scien. Med** 1924; 2: 75-76.
- Chin D, Means AR Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends Cell. Biol.** 2000; 10: 322-328.
- Conejo R, Lorenzo M. Insulin signaling leading to proliferation, survival, and membrane ruffling in C2C12 myoblasts. **J. Cell. Physiol.** 2001; 187: 96-108.
- Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific expression preceds morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1995; 14: 83-96.
- Coura JR, Junqueira ACV, Fernandes O, Valente SAS, Miles MA. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. **Trends in Parasitol.** 2002; 18: 171-176.
- Cuatrecasas P. Hormones receptors, membrane phospholipids, and protein kinases. **Harvey Lect.** 1985; 128: 80-89.
- De Souza W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1999; 94:17-36.
- De Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol. Res.** 2002; 88: 1013-1025.
- Deane MP, Lenzi HL, Jansen A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1984; 79: 513-515.
- Derynck R, Wagner EF. Cell differentiation. **Curr. Opin. Cell. Biol.** 1995; 7: 843-844.
- Dias JCP, Coura JR. Epidemiologia – Vetores e reservatórios do *T. cruzi*. In Dias JCP

and Coura JR (Orgs). **Clínica e Terapêutica da doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997.

- Docampo R, Pignataro OP. The inositol phosphate/diacylglycerol signaling pathway in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.** 1991; 275: 407-11.
- Elledge SJ. Cell cycle checkpoints: preventing an identity crisis. **Science** 1996; 274:1664-1672.
- El-Sayed NM. et al. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science** 2005; 309: 409-15.
- Fayadat L, Niccoli-Sire P, Lanet J, Franc J. Role of heme in intracellular trafficking of thyroperoxidase and involvement of H₂O₂ generated at the apical surface of thyroid cells in autocatalytic covalent heme binding. **J. Biol. Chem.** 1999; 274: 10522-10538.
- Freitas G, Gonçalves da Costa S, Pereira NM, Quintão LG, Souza JG. Imunoglobulinas na fase crônica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1976; 74 (2): 183-190.
- Gnegy ME. Calmodulin in neurotransmitter and hormone action. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 1993; 33: 45-70.
- Golias CH, Charalabopoulos A, Charalabopoulos K. Cell proliferation and cell cycle control: a mini review. **Int. J. Clin. Pract.** 2004; 58 (12): 1134-1141.
- Gomes ML, Erijman L, Torres HN, Téllez-Iñon MT. Protein kinase C in *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms: partial purification and characterization. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1989; 36: 101-108.
- Gonçalves da Costa SC, Lagrange PH, Hurtrel B, Kerr I, Alencar A. Role of lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. Histopathological Studies. **Ann. Immunol.** (Inst. Pasteur) 1984; 135 C: 317-332.
- Gonçalves da Costa SC, Calabrese KS, Valle TZ, Lagrange PH. *Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes. **Histol.**

Histopathol. 2002; 17 (3): 837-844.

- Graça-Souza AV, Arruda MA, Freitas MS, Barja-fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory process. **Blood** 2002; 99: 4160.
- Grant IH, Gold JW, Wittner M, Tanowitz HB, Nathan C, Mayer K, *et al.* Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. **Ann. Intern. Med.** 1989; 111: 849-851.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.
- Hanks SK, Quinn AM, Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. **Science** 1988; 241: 42-51.
- Hanson PI, Meyer T, Stryer L and Schulman H. Dual role of calmodulin in autophosphorylation of multifunctional CaM kinase may underlie decoding of calcium signals. **Neuron** 1994; 12: 943-56.
- Haribabu B, Hook SS, Selbert MA, Goldstein EG, Tomhave ED, Edelman AM, Snyderman R, Means AR. Human calcium-calmodulin dependent protein kinase I: cDNA cloning, domain structure and activation by phosphorylation at threonine-177 by calcium-calmodulin dependent protein kinase I kinase. **EMBO J.** 1995; 14: 3679-86.
- Hoare CA, Wallace FG. Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. **Nature** 1966; 212: 1385-1386.
- Hoare CA. The Trypanosomes of Mammals. A zoological monograph. Oxford, Edinburgh: Backwell Scientific Publications., 1972.
- Hook SS, Means AR. Ca²⁺/CaM-dependent kinases: from activation to function. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** 2001; 41: 471-505.
- Hubbard SR, Mohammadi M, Schlessinger J. Autoregulatory mechanisms in protein-tyrosine kinases. **J. Biol. Chem.** 1998; 273: 11987-11990.

- Ignarro LJ, Marletta MA, Wolin MS. Regulation of purified soluble guanylate cyclase by porphyrins and metalloporphyrins: a unifying concept. **Adv. Cyclic Nucleotide Protein Phosphorylation Res.** 1984; 17: 267-274.
- Ishida A, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Fujisawa H. A novel highly specific and potent inhibitor of calmodulin-dependent protein kinase II. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1995; 212: 806-812.
- Ishida A, Kameshita I, Fujisawa H. A Novel Protein Phosphatase That Dephosphorylates and Regulates Ca²⁺/Calmodulin-dependent Protein Kinase II. **J. Biol Chem.** 1998; 273: 1904-1910.
- Ishida A, Okuno S, Kitani I, Fujisawa H. Regulation of Multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinases by Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase Phosphatase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1998; 253: 159-163.
- Ishida A, Shigerib Y, Tatsub Y, Uegakib K, Kameshitaa I, Okunoo S et al. Critical amino acid residues of AIP, a highly specific inhibitory peptide of calmodulin-dependent protein kinase II. **FEBS Lett.** 1998; 427: 115-118.
- Ishida A, Shigeri Y, Taniguchi T, Kameshita I. Protein phosphatases that regulate multifunctional Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinases: from biochemistry to pharmacology. **Pharmacol. Ther.** 2003; 100: 291-305.
- Ishida A, Kameshita I, Sueyoshi N, Taniguchi T, Shigeri Y. Recent Advances in Technologies for Analyzing Protein Kinases. **J. Pharmacol. Sci.** 2007; 103: 5-11.
- Johnson L. Protein kinases and their therapeutic exploitation. **Biochem. Soc. Trans.** 2007; 35: 7-11.
- Kahl CR, Means AR. Regulation of Cell Cycle Progression by Calcium/Calmodulin – Dependent Pathways. **Endocr. Rev.** 2003; 24 (6): 719-736.
- Kashiwaba M, Katsura K, Ohnishi M, Sasaki M, Tanaka H, Nishimune Y et al. A

novel protein phosphatase 2C family member (PP2C) is able to associate with ubiquitin conjugating enzyme 9. **FEBS Lett.** 2003; 538: 197-202.

- Kikuchi G, Toshida T, Noguchi M. Heme oxygenase and Heme degradation. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2005; 338: 558-567.
- Kim SA, Hudmon A, Volmer A, Waxham MN. CaMkinase II dephosphorylates Thr286 by a reversal of the autophosphorylation reaction. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2001; 282: 773-780.
- Kirchhoff LV, Gam AA, Gilliam FC. American trypanosomiasis (Chagas' disease) in central american immigrants. **Am. J. Med.** 1987; 82: 915-920.
- Kolodziej SJ, Hudmon A, Waxham MN, Stoops JK. Three-dimensional Reconstructions of Calcium/Calmodulin-dependent (CaM) Kinase II α and Truncated CaM Kinase II α Reveal a Unique Organization for Its Structural Core and Functional Domains. **J. Biol. Chem.** 2000; 275: 14354-9.
- Lara FA, Sant'Anna C, Laranja GAT, Lemos D, Coelho MG, Salles IS et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2007; *in press*
- Laranja FS, Dias E, Nóbrega G, Miranda A. Chagas' disease: A Clinical, Epidemiological and Pathologic Study. **Circulation** 1956; 14: 1035-1060.
- Lenzi HL, Oliveira DN, Lima MT, Gattass CR. Trypanosoma cruzi: paninfectivity of CL strain during murine acute infection. **Exp. Parasitol.** 1996; 84: 16-27.
- Levine ND, Crliss JO, Cox FEG, Deroux G, Grain J, Honingberg BM, *et al.* A newly revised classification of the Protozoa. **J. Protozool.** 1980; 27: 37-58.
- Li MG, Katsura K, Nomiyama H, Komaki K, Ninomiya-Tsuji J, Matsumoto K, Kobayashi T, Tamura S. Regulation of the interleukin-1-induced signaling pathways by a novel member of the protein phosphatase 2C family (PP2Ce). **J. Biol. Chem.** 2003; 278:

12013- 12021.

- Lombardo ME, Araújo LS, Batlle A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 2003; 35: 1263-1271.
- Lorca T, Galas S, Fesquet D, Devault A, Cavadore JC, Doree M. Degradation of the proto-oncogene product p39 mos is not necessary for cyclin proteolysis and exit from meiotic metaphase: requirement for a Ca²⁺-calmodulin dependent event. **EMBO J.** 1991; 10: 2087-2093.
- Lorca T, Cruzalegui FH, Fesquet D, Cavadore JC, Mery J, Means A, Doree M. Calmodulin-dependent protein kinase II mediates inactivation of MPF and CSF upon fertilization of *Xenopus* eggs. **Nature** 1993; 366: 270-273.
- Lorca T, Abrieu A, Means A, Doree M. Ca²⁺ is involved through type II calmodulin-dependent protein kinase in cyclin degradation and exit from metaphase. **Biochim. Biophys. Acta** 1994; 1223: 325-332.
- Lu H-G, Zhong L, De Souza W, Benchimol M, Moreno SJN, Docampo R. Ca²⁺ content and expression of an acidocalcisomal calcium pump are elevated in intracellular forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Cell Biol.** 1998; 18: 2309-2323.
- Luan S. Protein phosphatase and signaling cascades in higher plants. **Trends Plant Sci.** 1998; 3 (7): 271-275.
- Malaquias AT, Oliveira MM. Phospholipid signalling pathways in *Trypanosoma cruzi* growth control. **Acta Tropica** 1999; 73: 93-108.
- Masuya Y, Kameshita I, Fujisawa H, Kohno H, Hioki K, Tokunaga R, Taketan S. MAP Kinase-Independent Induction of Proto-oncogene *c-fos* mRNA by Hemin in Human Cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1999; 260: 289-295.
- Mazza S, Montama A, Benitez C, Janzi EZ. Transmission del *Schizotrypanum cruzi* al nino por leche de la madre com enfermedad de Chagas. Mepra, Misión de Estudios e

Patologia Regional Argentina 1936; 28: 41-46.

- McGhee RB, Cosgrove WB. Biology and physiology of the lower Trypanosomatidae. **Microbiol. Ver.** 1980; 44: 140-173.
- Means AR. Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. **Mol. Endocrinol** 2000; 14: 4-13.
- Medina Lopes MD. Transmissão do *T. cruzi* em um caso, durante aleitamento, em área não endêmica. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** 1988; 21: 151-153.
- Meyer T, Hanson PI, Stryer L, Schulman H. Calmodulin trapping by calcium-calmodulin-dependent protein kinase. **Science** 1992; 256: 1199-202.
- Moore MR. International review of drugs in acute porphyria. **Int. J. Biochem.** 1980; 12: 1089-1097.
- Morgan DO. Cyclin-dependent kinases: engines, clocks, and microprocessors. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** 1997; 13: 261-291.
- Morgan DO, Fisher RP, Espinoza FH, Farrell A, Nourse J, Chamberlin H, Jin P. Control of eukaryotic cell cycle progression by phosphorylation of cyclin-dependent kinases. **Cancer J. Sci. Am.** 1998; 4(Suppl 1): S77-S83.
- Morgan DO. Principles of CDK regulation. **Nature** 1995; 374: 131-134.
- Mukherji S, Soderling TR. Regulation of Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II by inter- and intrasubunit-catalyzed autophosphorylations. **J. Biol. Chem.** 1994; 269: 13744-7.
- Naula C, Seebeck T. Cyclic AMP Signaling in Trypanosomatids. **Parasitol. Today** 2000; I: 35-38.
- Naula C, Parsons M, Mottram JC. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. **Biochim. Biophys. Acta** 2005; 1754: 151-159.

- Neer EJ. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. **Cell** 1995; 80: 249-257.
- Nery-Guimarães F, Silva NN, Clausel DT, Mello AL, Rapone T, Snell T. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutonia (Estrela – Rio Grande do Sul). **O Hospital** 1968; 73 (6): 73.
- Nigg EA. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.** 2001; 2: 21-32.
- Ochatt CM, Ulloa RM, Torres HN, Téllez-Iñon MT. Characterization of the catalytic subunit of *Trypanosoma cruzi* cyclic AMP-dependent protein kinase. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1993; 57: 73-81.
- Ogueta S, Solari A, Téllez-Iñon MT. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes forms possess a Ca²⁺-calmodulin dependent protein kinase. **FEBS Lett.** 1994; 337: 293-297.
- Ogueta S, Intosh GM, Téllez-Iñon MT. Regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1996; 78: 171-183.
- Ogueta S, Macintosh GC and Téllez-Iñon MT. Stage-Specific Substrate Phosphorylation by a Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase in *Trypanosoma cruzi*. **J. Euk. Microbiol.** 1998; 45 (4): 392-396.
- Ortega-Barria E, Pereira ME. A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes in to mammalian cells. **Cell** 1991; 67: 411-421.
- Oyake T, Itoh K, Motohashi H, Hayashi N, Hoshino H, Nishizawa M, et al. Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with Mafk and regulate transcription through the NF-E2 site. **Mol. Cell Biol.** 1996; 16 (11): 6083-6095.
- Park JH, Brekken DL, Randall AC, Parsons M. Molecular cloning of *Trypanosoma*

brucei CK2 catalytic subunits: the α isoform is nucleolar and phosphorylates the nucleolar protein Nopp44/46. **Mol. Bioch. Parasitol.** 2002; 119: 97-106.

- Parsons M, Ruben L. Pathways involved in Environmental sensing in Trypanosomatids. **Parasitol. Today** 2000; 16: 56-62.
- Parsons M, Worthey EA, Ward PN, Mottram JC. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics** 2005; 6: 127.
- Pascuccelli V, Labriola C, Tellez-Inon MT, Parodi AJ. Molecular and biochemical characterization of a protein kinase B from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.** 1999; 102: 21-33.
- Patel R, Holt M, Philipova R, Moss S, Schulman H, Hidaka H, Whitaker M. Calcium/calmodulin-dependent phosphorylation and activation of human Cdc25-C at the G2/M phase transition in HeLa cells. **J. Biol. Chem.** 1999; 274: 7958-7968.
- Petersen OH, Petersen CC, Kasai H. Calcium and hormone action. **Annu. Rev. Physiol.** 1994; 56: 297-319.
- Pinna LA. Casein Kinase II: na “eminence grise” in cellular regulation. **Biochem. Biophys. Acta** 1990; 104: 267-284.
- Ponka P. Cell Biology of Heme. **Am. J. Med. Sc.** 1999; 318: 241-256.
- Price NE, Mumby MC. Brain protein serine/threonine phosphatases. **Curr. Opin. Neurobiol.** 1999; 9: 336-342.
- Rasmussen CD, Means AR Calmodulin is involved in regulation of cell proliferation. **EMBO J.** 1987; 6: 3961-3968.
- Rasmussen CD, Means AR Calmodulin is required for cell cycle progression during G1 and mitosis. **EMBO J.** 1989; 8: 73-82.

- Rasmussen G, Rasmussen C. Calmodulin-dependent protein kinase II is required for G1/S progression in HeLa cells. **Biochem. Cell Biol.** 1995; 73: 201-207.
- Rey L. Tripanossomiase por *Trypanosoma cruzi* (Doença de Chagas): O Parasito. In: Rey L. **Parasitologia**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. p. 151-159.
- Robbins SM, Hollenberg MD. Plasma membrane-localized signal transduction. In: **Current topics in membranes-membrane permeability**. London, Academic Press 1999 48: 351-395.
- Rocha A, Meneses ACO, Silva AM, Ferreira MS, Nishioka SA, Burgarelli MKN, *et al.* Pathology of patients with Chaga's disease and acquired immunodeficiency syndrome. **Am J. Trop. Med. Hyg.** 1994; 50 (3): 261-268.
- Rodrigues CO, Scott DA, Docampo R. Characterization of a vacuolar pyrophosphatase in *Trypanosoma brucei* and its localization to acidocalcisomes. **Mol. Cell Biol.** 1999; 19: 7712-7723.
- Rodriguez-Viciana P, Warne PH, Khwaja A, Marte BM, Pappin D, Das P. Role of phosphoinositide 3-OH kinase in cell transformation and control of the actin cytoskeleton by Ras. **Cell** 1997; 89: 457-467.
- Sacerdoti-Sierra N, Jaffe CL. Release of ecto-protein kinases by the protozoan parasite *Leishmania major*. **J. Biol. Chem.** 1997; 272: 30760-30765.
- Salzman TA, Stella AM, Xifra W, Batlle AM, DoCampo R, Stoppani AO. Porphyrin biosynthesis in parasite hemoflagellates: functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol. B** 1982; 72: 663-7.
- Santella L. The role of calcium in the cell cycle: facts and hypotheses. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1998; 244: 317-324.
- Santos DO, Oliveira MM. Effect of cAMP on macromolecule synthesis in the pathogenic protozoa *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Ins. Oswaldo Cruz** 1988; 83: 287-292.

- Schmidt GD, Roberts LS. Kinetoplastida: Trypanosomes and their skin. In: **Foundations of Parasitology**. 4 ed. Times Mirror/ Mosby College Publishing, 1989. p. 55-80.
- Schmunis GA. *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas disease: status in the blood supply in endemic and non- endemic countries. **Transfusion** 1991; 31: 547-557.
- Schofield CJ. Triatominae – Biology and Control. In: **Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg.** 1994; 88: 606.
- Schofield CJ, Jannin J, Salvatella R. The future of Chagas disease control. **Trends Parasitol.** 2006; 22: 583-588.
- Shen K, Meyer T. Dynamic control of CaMKII translocation and localization in hippocampal neurons by NMDA receptor stimulation. **Science** 1999; 284: 162-166.
- Shenolikar S, Nairn AC. Protein phosphatases: recent progress. **Adv. Second. Messenger Phosphoprotein Res.** 1991; 23: 1-121.
- Shikanai-Yashuda MA, Brisola-Marcondes C, Guedes LA, Siqueira GS, Barone AA, Dias JCP, *et al.* Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Méd. Trop.** 1991; 33: 351-357.
- Silva NN, Clausell DT, Núbilos H, Mello AL, Ossanay J, Rapone T, Snell T. Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Ver. Inst. Med. Trop.** 1968; 10: 265-276.
- Smith A, Eskew JD, Borza CM, Pendrak M, Hunt RC. Role of heme-hemopexin in human T-lymphocyte proliferation. **Exp. Cell. Res.** 1997; 232: 246-254.
- Smith RD, Walker JC. Plant protein phosphatases. **Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.** 1996; 47: 101-125.
- Soares VA, Dias JCP, Marsden PD, Garcia-Zapata MT. Sobrevivência do *T. cruzi* em

caldo de cana: resultados preliminares. **Ver. Soc. Bras. Med. Trop.** 1987; 20: 38.

- Soderling TR. The Ca-calmodulin-dependent protein kinase cascade. **Trends in Biochem.** 1999; 24: 232-235.
- Soderling TR, Chang B, Brickey D. Cellular Signaling through multifunctional Ca²⁺/Calmodulin-dependent protein kinase II. **J. Biol. Chem.** 2000; 276: 3719-3722.
- Soderling TR, Stull JT. Structure and regulation of calcium/calmodulin-dependent protein kinases. **Chem. Ver.** 2001; 101: 2341-2352.
- Spiegel AM, Shenker A, Weinstein LS. Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal-transduction. **Endocr. Ver.** 1992; 13: 536.
- Strack S, Barban MA, Wadzinski BE, Colbran RJ. Differential inactivation of postsynaptic density-associated and soluble Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II by protein phosphatases 1 and 2A. **J. Neurochem.** 1997; 68: 2119-2128.
- Stuart K, Feagin JE. Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. **Int. Ver. Cytol.** 1992; 141: 65-88.
- Sumi M, Kiuchi K, Ishikawa T, Ishii A, Hagiwara M, Nagatsu T, Hidaka H. The newly synthesized selective Ca²⁺/calmodulin dependent protein kinase II inhibitor KN-93 reduces dopamine contents in PC12h cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 1991; 181: 968-97.
- Tanowitz HB, Kirchhoff LV, Simon D, Morris SA, Weiss LM, Wittner M. Chagas disease. **Clin. Microbiol. Rev.** 1992; 5: 400-419.
- Taylor CW. Why do hormones stimulate Ca⁺² mobilization? **Biochem. Soc. Trans.** 1995; 23: 637-642.
- Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. Microsomal heme oxygenase. Characterization of the enzyme. **J. Biol. Chem.** 1969; 244: 6388-6394.
- Todorov AG, Einicker-Lamas M, Castro SL, Oliveira MM, Guilherme AL. Activation

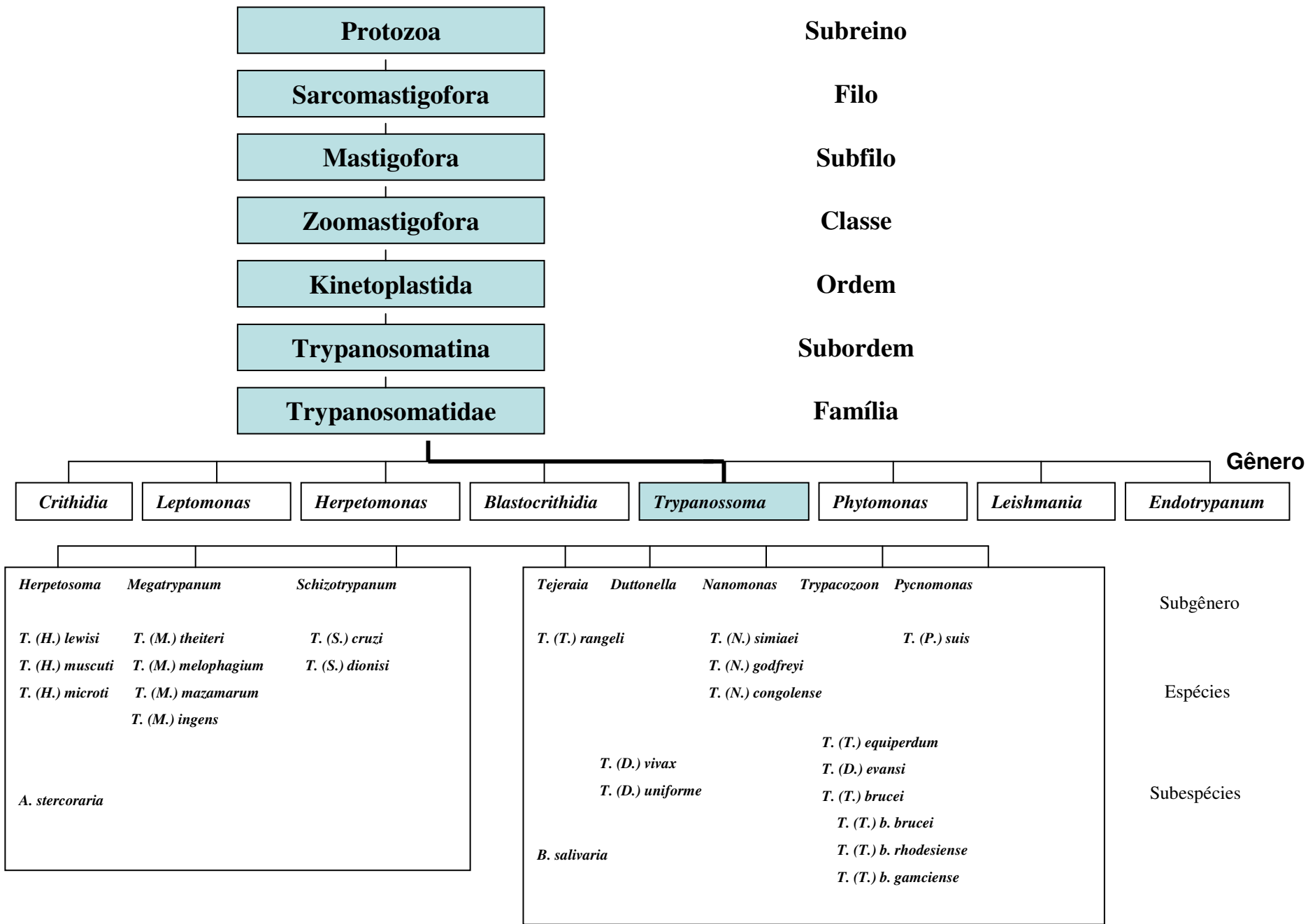
of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** 2000; 275: 32182-32186.

- Tokumitsu H, Enslin H, Soderling TR. Characterization of a Ca²⁺/ Calmodulin-dependent Protein Kinase Cascade. **J. Biol. Chem.** 1995; 270: 19320-4.
- Tokumitsu H and Soderling TR. Requirements for Calcium and Calmodulin in the Calmodulin Kinase Activation Cascade. **J. Biol. Chem.** 1996; 271: 5617-22.
- Tombes RM, Grant S, Westin EH, Krystal G. G1 cell cycle arrest and apoptosis are induced in NIH 3T3 cells by KN-93, an inhibitor of CaMK-II (the multifunctional Ca²⁺/CaM kinase). **Cell Growth Differ.** 1995; 6: 1063-1070.
- Torres CM. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1941; 36: 391-404.
- Tsiftoglou AS, Tsamadou AI, Papadopoulou LC. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. **Pharmacol. Ther.** 2006; 111(2): 327-45.
- Ulloa RM, Mesri E, Esteva M, Torres HN, Téllez-Iñon MT. Cyclic AMP-dependent protein kinase activity in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.** 1988; 255: 319-326.
- Vianna G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica da “Moléstia de Carlos Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 1911; 3: 276-294.
- Vickerman K. The diversity of the kinetoplastid flagellates. In: Lumsden WHR, Evans DA (ed). **Biology of the Kinetoplastida**. 1 ed. London: Academic Press; 1976. p. 1-30.
- Vickerman K. Phylum Zoomastigina - Class Kinetoplastida. In: **Handbook of Protoctista**. Boston: James and Bartlett Publishers; 1990. p. 215-238.
- Vickerman K. The evolutionary expansion of the tripanosomatid flagellates. **Int. J. Parasitol.** 1994; 24: 1317-1331.

- Wallace FG. The trypanosomatids parasites of insects e arachnids. **Exp. Parasitol.** 1966; 18: 124-193.
- Ward P, Equinet L, Packer J, Doerig C. Protein kinases of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*: the kinome of a divergent eukaryote. **BMC Genomics** 2004; 5: 79.
- Wenger R. Mammalian oxygen sensing, signalling and gene regulation. **J. Exp. Biol.** 2000; 203(8): 1253-1263.
- Whitaker M, Larman MG. Calcium and mitosis. **Semin. Cell. Dev. Biol.** 2001; 12: 53-58.
- Whitfield JF, Bird RP, Chakravarthy BR, Isaacs RJ, Morley P. Calcium-cell cycle regulator, differentiator, killer, chemopreventor, and maybe, tumor promoter. **J. Cell Biochem. Suppl.** 1995; 22: 74-91.
- WHO. Chagas' disease. In: **Weekly Epidemiological Record, World Health Organization.** Genova, 2002; 2: 10-12.
- Wilkowsky SE, Barbieri MA, Stahl P, Isola LD. *Trypanosoma cruzi*: Phosphatidylinositol 3-Kinase and Protein Kinase B Activation Is Associated with Parasite Invasion. **Exp. Cell Res.** 2001; 264: 211-218.
- Winder DG, Sweatt JD. Roles of serine/threonine phosphatases in hippocampal synaptic plasticity. **Nat. Rev. Neurosci.** 2001; 2: 461- 474.
- Yang J, Clarke JF, Ester CJ, Young PW, Holman GD. Phosphoinositol 3- kinase acts at na intracellular membrane site to enhance GLUT4 exocytosis in 3T3-L1 cells. **Biochem. J.** 1996; 313: 125-131.
- Ye W, Zhang L. Heme controls the expression of cell cycle regulators and cell growth in HeLa cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 2004; 15: 546-554.
- Zhang L, Guarente L. HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence

of heme. **J. Biol. Chem.** 1994; 269: 14643-14647.

ANEXO I



Classificação Taxonômica - Gênero *Trypanosoma*.

ANEXO II

Manuscrito em preparação

CaM KINASE II IN CELL SIGNALLING MEDIATED BY HEME
(Fe-PROTOPORPHYRIN) IN *Trypanosoma cruzi*

Souza, C.F.[#], Carneiro, A.B.[¶], Silveira, A.B.[¶], Laranja, G.A.T.^{*}, Silva-Neto, M.A.C.[¶],
Gonçalves da Costa, S. C.[#] and Paes, M.C.^{*‡}

*Laboratório de Interação Tripanosomatídeos e Vetores - Departamento de Bioquímica,
IBRAG – UERJ; # Laboratório de Imunomodulação - Departamento de Protozoologia,
Instituto Oswaldo Cruz – FIOCRUZ; ¶ Laboratório de Sinalização Celular - Instituto de
Bioquímica Médica – UFRJ.

[‡]Corresponding author: Marcia Cristina Paes

Tel.: +55-21-25876143; Fax: +55-21-25876136.

E-mail address: mcpaes@uerj.br

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

Abstract

Trypanosoma cruzi, the etiologic agent of Chagas disease, is transmitted through triatomine vectors during their blood-meal on vertebrate host. These hematophagous insects usually ingest in a single meal about 10 mM heme bound to hemoglobin. The first transformation into epimastigotes occurs in the crop and initiates few hours after parasite ingestion. We have investigated the role of heme at cell proliferation and showed the addition of heme increased significantly the parasite proliferation in a dose-dependent manner in *T. cruzi* epimastigotes Dm28c strain (Lara *et al.*, 2007). To investigate whether the proliferative effect of heme was determined by protein kinases (PK) mediated signaling pathway, we evaluated the effect of several PK inhibitors. Only KN93, a classical inhibitor of CaM kinases, had a significant effect at cell proliferation mediated by heme but when KN92 (an inactive analogue) was tested there was no effect, confirming the CaM Kinase involvement. CaMKII is the principal enzyme involved in this process since the increase of proliferation was blocked when Myr-AIP was used. The results were confirmed by western blotting after antibody phospho-CaMKinase II treatment where in the presence of heme CaMKII is more phosphorylated. *In vitro*, the heme molecule also increased the CaM kinase II activity, suggesting that its pathway is involved on the proliferation increased by heme.

Keywords: heme, *T. cruzi*, Ca²⁺/Calmodulin Kinase II

Introduction

Heme (iron protoporphyrin IX) is a tetrapyrrole containing a central iron ion. It is an important molecule in basic metabolism of all living organisms. It is involved in oxygen transport, respiration and drug detoxification (Ponka, P. 1999). It is well established that similarly to other trypanosomatids, except those infected with symbiotic bacteria, *T. cruzi* needs heme to its metabolism. In nature, *T. cruzi* must acquire extracellular heme from their hosts. The most of heme is present in hemoglobin (Hb), and particularly in the midgut of the hematophagous insects, after Hb digestion high free heme concentration is released. Heme is a nutritional cofactor and incorporates it in various essential hemoproteins (i.e. cytochromes c1 and c5 from the electron transport respiratory complexes, cytochrome P450 involved in xenobiotic detoxification, etc).

Recently we showed that *T. cruzi* epimastigotes (EPI) acquires extracellular heme from their invertebrate vectors and the addition of heme increases significantly the parasite proliferation in a dose-dependent manner (Lara *et al.*, 2007). Tremendous progress has been made in the last few decades in understanding key pathways that regulate cell growth and division. Common to all the regulatory transitions of the cell cycle is the ubiquitous second messenger, Ca^{+2} , and the universally important Ca^{+2} intracellular receptor, calmodulin (CaM). In the past several years, progress has been made in understanding how Ca^{+2} /CaM regulates cell cycle transitions. Therefore, the amount of CaM in a cell regulates proliferative rates (Schmalzigaug *et al.*, 2001). The multifunctional CaMKs are a family of serine/threonine protein kinases that include CaMKI, CaMKII, and CaMKIV (Schulman and Braun, 1999; Means, 2000; Hook, 2001). CaMKII is a major mediator of calcium signaling in brain, heart, and others tissues (Hunter and Schuman, 2005) and it is markedly activated by autophosphorylation at Thr²⁸⁶.

Ogueta *et al.* (1996, 1998) identified CaMKII in *T. cruzi* by monoclonal antibodies against rat brain CaMKII. In this work, we are showing for the first time this activity was the major involved at cell proliferation mediated by heme. Furthermore, our results indicates an CaMKII activation *in vitro* in the presence of heme.

Materials and Methods

Reagents

Protease inhibitor cocktail (AEBSF, aprotinin, leupeptin, bestatin, pepstatin A and E-64), EDTA, EGTA, Triton X-100, Hepes, SDS, Tris base, glycine, acrilamide, TEMED and DMSO were purchased from SIGMA FINE CHEMICALS (St. Louis, MO, USA). Hemin (Heme-Cl) was from PORPHYRIN PRODUCTS. BHI (brain-heart infusion medium) was obtained from DIFCO (Sparks, MD, USA). Fetal calf serum (FCS) was purchased from CULTLAB (São Paulo, Brasil). SeeBlue[®] pre-stained standard (250, 98, 64, 50, 36, 30, 16, 6 e 4 kDa), anti-mouse or anti-rabbit secondary antibodies were from INVITROGEN CORPORATION. Sodium orthovanadate (VO_4^{3-}), okadaic acid (OKA), phenilarsyn oxid (PAO), LY 294002 (LY), bisindolylmaleimide I (BIS), H-9, H-89, roscovitine (R), 2-[*N*-(2-hydroxyethyl)-*N*-(4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-*N*-(4-chlorocinnamyl)-*N*-methylbenzylamine (KN-93), (2-[*N*-(4-methoxybenzenesulfonyl)] amino-*N*-(4-chlorocinnamyl)-*N*-methylbenzylamine) (KN 92), myristoylated form of autocamtide-2-related inhibitory peptide Myr-AIP and bovine serum albumin fraction V were purchased from CALBIOCHEM (L. Jolla, CA, USA). Sodium fluoret, Na^+/K^+ double tartarat and amonium molibdate were from REAGEN (RJ, Brasil). The polyclonal anti-phospho CaMKII and the activated enzyme CaMKII were from UPSTATE. The anti-CaMKK and anti-CaMKIV monoclonal antibodies were from TRANSDUTION. The anti- α -tubulina monoclonal antibody was from MOLECULAR PROBES. Ethanol and methanol were purchased from MERK. All other reagents used from analytical purity.

Parasites

Trypanosoma cruzi strain Dm 28c (CT-IOC-010) was provided by the Trypanosomatid Collection of the Oswaldo Cruz Institute, Fiocruz, Brazil. The protozoa were grown at 28 °C for 7 days in brain-heart infusion medium (BHI) and supplemented with 30 μM heme and 10% fetal calf serum (FCS). Cultures were kept in 100 mL bottles, with an initial density of 20-30 $\times 10^6$ cells / ml in 30 ml of medium. Growth was monitored by cell counting in a Neubauer chamber.

Effect of Kinase inhibitors on the parasite proliferation

Different kinase inhibitors were tested *in vitro*, epimastigotes were grown in BHI with 10% FCS, in the absence or in the presence of 30 μ M heme as well as in the absence or in the presence of the following inhibitors: LY (8 μ M), BIS (0,05 μ M), H-9 (5 μ M), H-89 (0,24 μ M), R (3,5 μ M), Heparin (10 μ g/mL), TBB (1 μ M) or KN 93 (2 μ M). The initial parasite concentration was 5 x 10⁵ cells. Cell densities were determined by using a hemocytometer.

Effect of KN 93 and KN 92 on parasite proliferation

T. cruzi epimastigotes on the 7th day of growth in BHI supplemented with heme 30 μ M with 10% FCS were washed twice in BHI free from heme and incubated with different concentrations of KN 93 (0, 0,2 μ M, 2 μ M, 5 μ M e 10 mM) or KN 92 2 μ M. The initial parasite concentration was 5 x 10⁵ cells. The cells were maintained for 7 days and the cell density were determined using a hemocytometer.

Effect of the Myr-AIP peptide on the parasite proliferation

T. cruzi epimastigotes on the 7th day of growth in BHI supplemented with heme 30 μ M with 10% FCS were washed twice in BHI free from heme and incubated in the absence or in the presence of heme (30 μ M) as well as in the absence or in the presence of the Myr-AIP peptide (30 μ M). The cells were maintained for 7 days and the cell density were determined a hemocytometer.

Western blot analysis

The epimastigotes, at the exponential phase, were maintained in BHI supplemented with 10% FCS at 28°C and 30 μ M heme. The cells were washed in BHI supplemented with 10% FCS without heme. After washing, the cells were lysed, proteins were separated in a 12% sodium dodecyl sulfate sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and blotted to nitrocellulose membrane. For evaluation of CaMKII levels, 80 μ g of lysates from parasites cells were used and the membrane were blocked in Tris-buffered saline (TBS) supplemented with Tween 0,1% and Bovine Serum Albumin (BSA) 5% before incubation overnight in primary antibody phospho-CaMKinase II (UPSTATE). After removal of primary antibody and washing, membrane was incubated in the secondary antibody conjugated to mouse peroxidase (Amersham). Washed blots were incubated with chemiluminescence ECL

kit (Amersham). Some blots were stripped by incubation at 50 °C for 30 min in 100 mM 2-mercaptoethanol, 2% SDS, and 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8.

Enzyme Assays

CaMK activity was assayed as suggested by the manufacturer (Upstate Biotechnologies, Piscataway, NJ) from this kit using Histone IIA and [³²P]ATP (Amersham Biosciences, 6000 Ci/mmol) as substrates. Reactions (50 µl) were incubated with 50 ng activated CamKII 10 min in the presence of 100 µM Histone IIA, 2 µM cAMP-dependent protein kinase peptide inhibitor, 2 µM protein kinase C peptide inhibitor, different concentrations of heme and 100 µM [³²P]ATP (500-1000 cpm/pmol) at 30 C. Aliquots were then removed, spotted in phosphocellulose discs, washed three times in 0.75% phosphoric acid and one time in acetone, dried, and counted by liquid scintillation.

Others procedures

SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (1970). Protein concentrations were determined by the method of Lorry *et al* (1951) with bovine serum albumin as a standard

Statistical analysis

Data will be presented as mean ± SE and all experiments were repeated at least three times. Statistics treatment used analysis of the Student's *t*-test, with 95% confidence interval.

Results

Heme group is involved in *T. cruzi* cell proliferation in a dose-dependent manner while this effect is not observed when the cells are in the presence of hemoglobin or globin-derived peptides (Lara et al., 2007). To investigate whether the proliferative effect of heme was determined by a protein kinase (PK) in this process, we evaluated the effect of several PK inhibitors (Table 1). Among all inhibitors tested, only KN93 (2 μ M), a classical inhibitor of CaM kinases, had a significant effect at cell proliferation mediated by heme. The other inhibitors did not inhibit the induction by heme.

CaMKs are enzymes usually kept inactive due to the presence of an autoinhibitory domain (Means, 2000). Upon an increase in intracellular calcium, the binding of calcium-CaM complex to the enzyme disrupts the interaction of autoinhibitory domains. KN-93 binds to Ca^{+2} /CaM site inhibiting the enzyme. In several cells, for example, fibroblast and HeLa, KN-93 causes antiproliferative effects (Rasmussen and Rasmussen, 1995). In order to test the specificity of KN-93 effects, the drug was added to medium in different concentrations and the results show an important decrease at cell proliferation when the concentration of drugs is increased (Fig. 1A). KN-92, an inactive analog of KN-93, was also used and no effect on epimastigotes proliferation was observed (Fig. 1B) indicating that the inhibition of cell proliferation is dependent on CaMK.

The CaMK cascade has been described that contains three members: CaM-KK, CaMKI and CaMKIV. CaMKK is the upstream member of the cascade which activates CaMKI and CaMKIV through phosphorylation of their “activation loop” that contain a Ser/Thr in which phosphorylation strongly augments kinase activity (Soderling and Stull, 2001). These enzymes can be inhibited by KN-93. Thus, we used antibody anti-CaMKK and CaMKIV in order to investigate the presence of these enzymes in *T. cruzi* cells (Fig. 2). This result shows the presence of CaMKK and CaMKIV in epimastigote form and in the presence of 30 μ M heme CaMKIV has its level of expression increased. On the other hand, it was not observed in CaMKK case.

It has been reported that CaMKII is markedly inhibited by AIP or Myr-AIP by binding to the substrate-binding site for autophosphorylation. The myristoylated autoclamide-2 related inhibitory peptide (Myr-AIP) (KKALRRQEAVDAL) is a peptide derived from the CaMKII substrate autocamide -2, but alanine is substituted for threonine at the 9-position, which turns it into a highly specific and potent inhibitor of CaM kinase II. Unlike KN series inhibitors, AIP or Myr-AIP are not affected by Ca^{+2} /CaM (Ishida *et al.*, 1998). Thus, this reagent was added

to parasites culture to test for their ability to block the proliferation heme mediated (Fig. 3). According the results, Myr-AIP is able blocking at the same rate when compared to KN 93.

For further examine whether CaMKII is involved in heme mediated proliferation, immunoblotting with anti-phospho-CaMKII antibody was carried out to assess stimulation of CaMKII. As shown in Fig. 4, the level of phospho-CaMKII increased by heme treated showing the involvement of this enzyme in this process.

The recombinant CaMKII has been largely used to examine the enzyme activity. Thus, this bovine CaMKII was used for testing the heme activation *in vitro* (Fig. 5). As showed, different concentrations of heme were added to the medium and the activity in the presence of heme enhanced by 2- fold or more when 100 μ M heme was added to the medium or 10-fold 300 μ M heme was added.

Discussion

Heme is an important proliferate factor for *T. cruzi* (Lara *et al.*, 2007). The increase of cell proliferation in the presence of heme is totally exclusively abolished by CaMK inhibition (Table 1). KN-93 is a selective CaMK inhibitor and demonstrated antiproliferative effects in a variety of cells (Kahl and Means, 2003). *T. cruzi* treated by KN93 differ dramatically from untreated group (Fig.1) showing this group of proteins acts as a fundamental regulator of the parasite proliferation. The multifunctional CaMKs, including CaMKI, CaMKII, and CaMKIV, have been associated to cell cycle transitions (Kahal and Means, 2003).

The most intensely investigated member of the multifuncional CaMKs is CaMKII. Unlike many other protein kinases, CaMKII does not contain a phosphorylated residue analogous to the activation domains of CaMKI and CaMKIV. Thus, CaMKII is not phosphorylated by CaMKK (Soderling and Stull, 2001). The addition of Myr AIP in the culture blocked the proliferation in the presence of heme (Fig. 3). On the other hand, the addition of heme in the medium for measuring the enzyme activity enhanced up to 10-fold (Fig. 5), suggesting different mechanism for heme activation in CaMKII. The results are reinforced when the phosphorylation of CaMKII in heme-treated cells increased (Fig. 4).

The cell cycle consists of four primary phases: G₁, the first gap phase; S phase, in which DNA synthesis occurs; G₂, the second gap phase; and M phase, or mitosis, in which the chromosomes and cytoplasmic components are divided between two daughter cells. In HeLa cells, KN-93 causes a G₁ arrest (Rasmussen and Rasmussen, 1995) and in normal fibroblasts the KN-93 treatment arrested cells in G₁ with low levels of cdk4 activity, an important activity in cell cycle (Morris *et al.*, 1998).

The Proto-oncogene *c-fos* mRNA is induced by heme (Masuya et al., 1999) in HeLa cells and this induction is MAP-Kinase-Independent. Interestingly, in the presence of CaMKII inhibitor the induction was reduced and the level of phospho-CaMKII rapidly increased by hemin treatment. Only these results in the literature show the heme molecule involved with CaMKII cascade.

Here, we are showing for the first time that heme-induced parasite proliferation occurs through the modulation protein phosphorylation cascades and future efforts are been directed towards elucidating the mechanism by which heme increase CaMKII activity.

Tables, Figures and Legends

TREATMENT	TARGET	PROLIFERATION %
H-9 5 μ M	PKG	103,32 \pm 2,0
H-9 5 μ M + 30 μ M heme	PKG	100,54 \pm 5,16
H-89 0,24 μ M	PKA	103,77 \pm 2,67
H-89 0,24 μ M + 30 μ M heme	PKA	106,25 \pm 1,47
Roscovitine 3,5 μ M	Cyclin-dependet kinase	89,18 \pm 0,73
Roscovitine 3,5 μ M + 30 μ M heme	Cyclin-dependet kinase	100 \pm 0
Bisindolylmaleimide 0,05 μ M	PKC	91,24 \pm 3,64
Bisindolylmaleimide 0,05 μ M + 30 μ M heme	PKC	103,41 \pm 9,64
Ly 294002 8 μ M	PI3-K	106,06 \pm 4,5
Ly 294002 8 μ M + 30 μ M heme	PI3-K	93,12 \pm 0,65
Heparin 10 μ g/mL	CK2	98,73 \pm 3,77
Heparin 10 μ g/mL + 30 μ M heme	CK2	85,57 \pm 9,74
TBB 1 μ M	CK2	0
TBB 1 μ M + 30 μ M heme	CK2	0
KN93 2 μ M	CaM K	109,19 \pm 2,8
KN93 2 μ M + 30 μ M heme	CaM K	67,94 \pm 0,39

Table 1

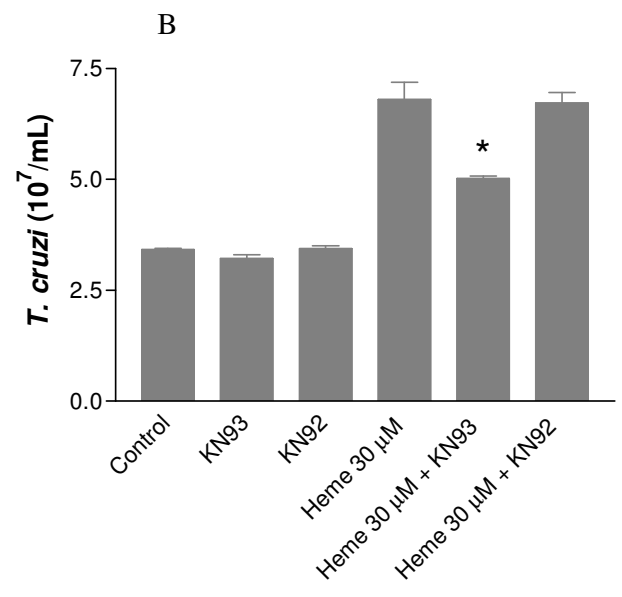
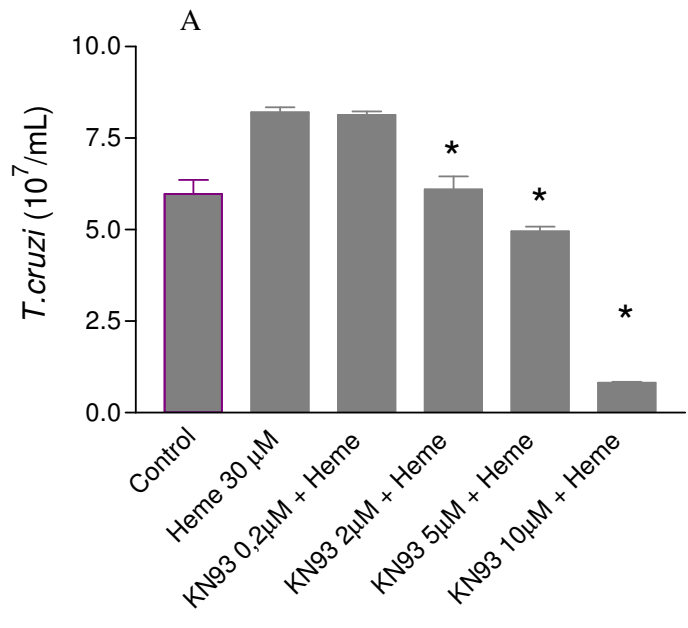


Figure 1A and 1B

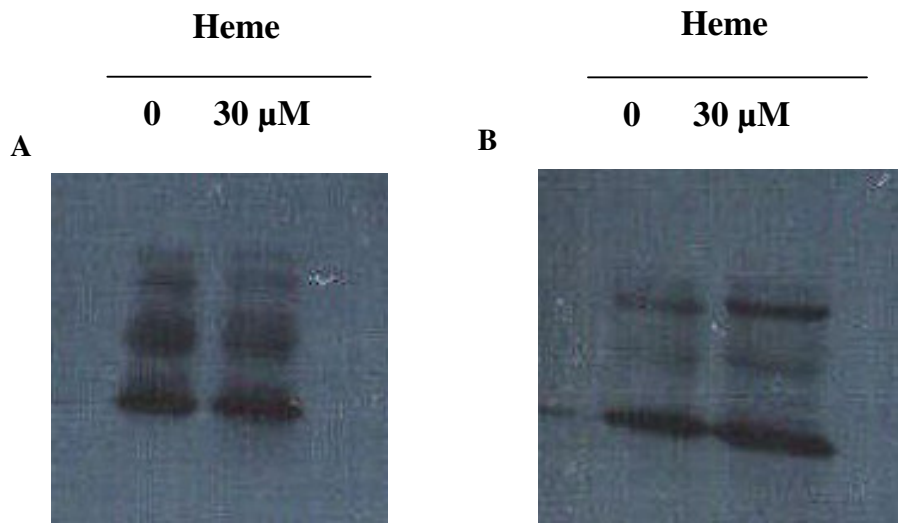


Figure 2A and 2B

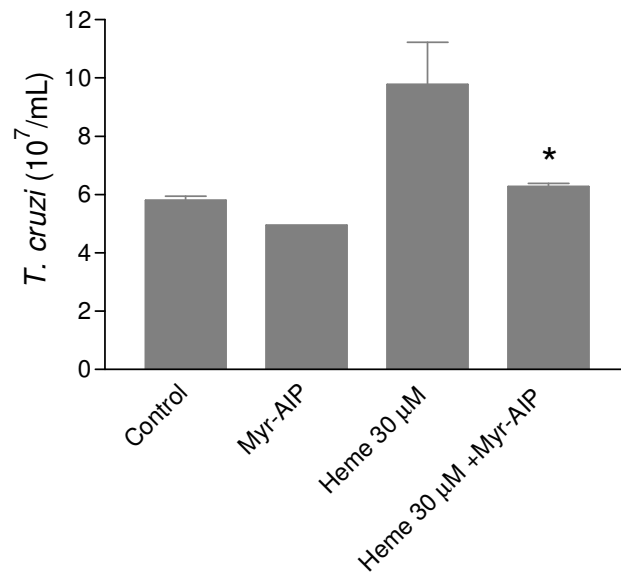


Figure 3

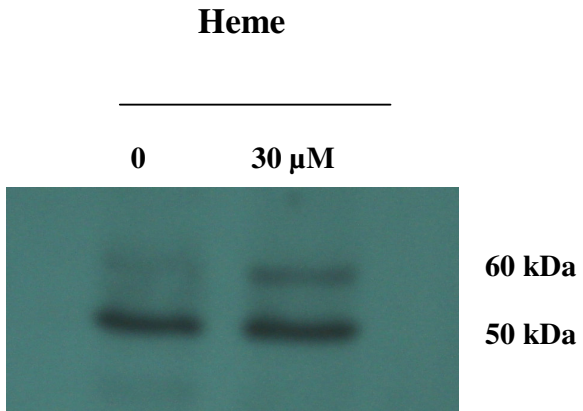


Figure 4

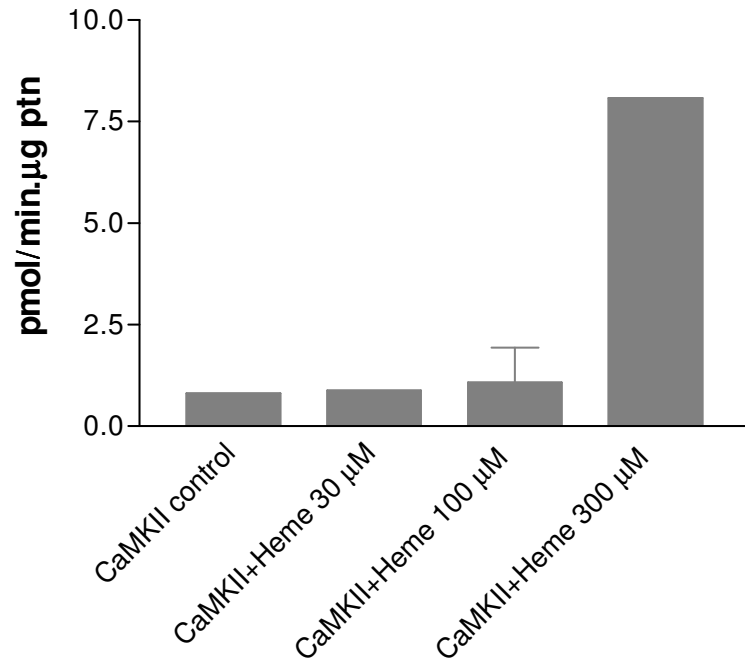


Figure 5

Table 1 - Effect of different PK inhibitors in *T. cruzi* epimastigotes proliferation. Percentage values of cell proliferation were calculated based on absolute values of treated parasites related with its respective controls. *P< 0.001 in relation to the control group by Tukey test.

Fig. 1 - *T. cruzi* epimastigotes were maintained for 5 days in BHI supplemented with 10% FBS in the absence or in the presence of (A) heme 30 μ M as well as in the presence of different concentrations of KN93 (μ M, a classical inhibitor of CaM kinases). (B) Cells were incubated in the presence of KN92 (2 μ M, inactive analog of KN-93). All data are presented as means \pm SD *P< 0.01 in relation to the group heme 30 μ M by Tukey test. Results are representative of three independent experiments.

Fig. 2 - Epimastigotes were maintained for 5 days in BHI supplemented with 10% FCS in the absence or in the presence of heme 30 μ M for 5 days. Cells were lysated, proteins were separated in a 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose, which was incubated with a polyclonal anti-phospho CaMKK and anti-CaMKIV and revealed with ECL kit. Data represent two independent experiments.

Fig. 3 - *T. cruzi* epimastigotes were maintained for 5 days in BHI supplemented with 10% FBS in the absence or in the presence of heme 30 μ M as well as in the presence or in the absence of Myr-AIP (30 μ M, a myristoylated inhibitory peptide). All data are presented as means \pm SD *P< 0.001 in relation to the group heme 30 μ M by Tukey test.

Fig. 4 - *T. cruzi* epimastigotes Dm28c strain were maintained for 5 days in BHI supplemented with 10% FCS in the absence or in the presence of heme 30 μ M for 5 days. *T. cruzi* were lysated, proteins were separated in a 10% SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose, which was incubated with a polyclonal phospho-CaM Kinase II antibody and revealed with ECL kit. Data represent three independent experiments.

Fig. 5 - Protein kinase activity of recombinant active CaMKII in the presence of heme. PK assays were carried out following the instructions recommended by the manufacturer (CaM Kinase II Assay Kit (Upstate Biotechnologies), using histone IIA as substrate.

References

- Hook SS and Means AR 2001 Ca^{+2} /CaM-dependent kinases: from activation to function. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 41:471–505
- Hunter, T and Shulman, H. 2005 CaMKII Structure – An elegant Desing. *Cell* 123: 765-767.
- Ishida A, Shigeri Y, Tatsu Y, Uegaki K, Kameshita I, Okuno S, Kitani T, Yumoto N and Fujisawa 1998 Critical amino acid residues of AIP, a highly specific inhibitory peptide of calmodulin-dependent protein kinase II *FEBS Letters* 427: 115-118
- Kahl CR and Means AR 2003 Regulation of cell cycle progression by calcium/calmodulin-dependent pathways. *Endocrine Reviews*. 24:719-736.
- Laemmli, UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 21-37
- Lara FA, Sant'Anna C, Lemos D, Laranja GAT, Coelho M G, Reis Salles I, Michel A, Oliveira PL, Cunha-e-Silva N, Salmon D and Paes MC 2007 Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. 2007, *Biochemical and Biophysical Research Communications*, no prelo.
- Lowry, OH, Rosebrough, NJ, Farr AL, Randall, RJ 1951 Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, p. 265 – 275.
- Masuya Y, Kameshita I, Fujisawa H, Kohno H, Hioki K, Tokunaga R and Taketani S 1999 MAP Kinase-Independent induction of Proto-oncogene *c-fos* mRNA by hemin in human cells *260*: 289-295.
- Means AR 2000 Regulatory cascades involving calmodulin-dependent protein kinases. *Mol Endocrinol* 14:4–13

Morris TA, DeLorenzo RJ and Tombes RM 1998 CaMK-II inhibition reduces cyclin D1 levels and enhances the association of p27 kip1 with Cdk2 to cause G1 arrest in NIH 3T3 cells. *Exp. Cell Res* 240: 218-227.

Ogueta S, MacIntosh G, Téllez-Iñon T 1996 Regulation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 78:171-183

Ogueta S, MacIntosh G, Téllez-Iñon T 1998 Stage-Specific Substrate Phosphorylation by a Ca²⁺/Calmodulin-Dependent Protein Kinase in *Trypanosoma cruzi*. *J. Euk. Microbiol* 45:392-396

Ponka P 1999 Cell biology of heme. *Am J Med Sci.* 318: 241-56

Rasmussen G and Rasmussen C 1995 Calmodulin-dependent protein kinase II is required for G1/S progression in HeLa cells. *Biochem Cell Biol* 73: 201-207.

Schmalzigaug R, Ye Q, Berchtold MW 2001 Calmodulin protects cells from death under normal growth conditions and mitogenic starvation but plays a mediating role in cell death upon B-cell receptor stimulation. *Immunology* 103:332–342

Schulman H, and Braun A 1999 Calcium/calmodulin-dependent protein kinases. In: Carafoli E, Klee CB, eds. *Calcium as a cellular regulator*. New York: Oxford University Press; 311–335

Soderling TR, Stull JT 2001 Structure and Regulation of Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinases. *Chem. Rev.* 101:2341-2351

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](#)