

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Renata de Lima Sales Gonçalves

# **Metabolismo mitocondrial na relação inseto vetor-parasita**

**Instituto de Bioquímica Médica  
Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Rio de Janeiro, Julho de 2010.**

# **Livros Grátis**

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

Milhares de livros grátis para download.

2010

Rio de Janeiro, 2010

**LOMBADA**

Renata de Lima Sales Gonçalves

**Metabolismo mitocondrial na relação inseto  
vetor-parasita**

UFRJ

V. I

*Dedico esta Tese a Dona Maria Anunciada de Lima, nascida em Alagoas, data não registrada, aproximadamente 77 anos, analfabeta, minha avó, que com orgulho verá sua neta defender o doutorado.*

Renata de Lima Sales Gonçalves

Metabolismo mitocondrial na relação inseto vetor-parasita

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

Orientador: Marcus Fernandes de Oliveira

2010

## FICHA CATALOGRÁFICA

Gonçalves, Renata de Lima Sales

**Metabolismo mitocondrial na relação inseto vetor-parasita**

/ Renata de Lima Sales Gonçalves. Rio de Janeiro, 2010.  
xxi, 210 f.: 29,7 cm

Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Química Biológica) –  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto  
de Bioquímica Médica , 2006.

Orientador: Marcus Fernandes de Oliveira

1.Mitocôndria. 2.Mosquito *Aedes aegypti* 3.Mosquito *Anopheles gambiae* 4.*Trypanosoma cruzi* 5.imunidade 6.Geração de Peróxido de Hidrogênio – Teses.

I. Oliveira, Marcus Fernandes

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

III. **Metabolismo mitocondrial na relação inseto vetor-parasita**

Esta tese foi desenvolvida no Laboratório de Bioquímica Redox e Laboratório de Artrópodes Hematófagos no Instituto de Bioquímica Médica (IBqM) através de auxílios concedidos pelo CNPq, CAPES, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia (INCT) de Biologia Estrutural e Bioimagem, INCT em Entomologia Molecular, International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) e Howard Hughes Medical Institute (HHMI).

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Renata de Lima Sales Gonçalves

### Metabolismo mitocondrial na relação inseto vetor-parasita

Rio de Janeiro, ..... de ..... de 2....

➤ **Banca Examinadora:**

---

(**Prof. Mario Henrique de Barros**, Professor Adjunto do departamento de Microbiologia do ICB/USP. Doutor em Ciências Biológicas (Biologia Genética) (2000) pela Universidade de São Paulo).

---

(**Prof. Mario Alberto Cardoso da Silva Neto**, Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ. Doutor em Bioquímica (1996) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro).

---

(**Profª. Maria Cristina Machado Motta**, Professora Adjunta do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. Doutora em Ciências (Biofísica) (1996) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro).

➤ **Revisor/Suplente interno:**

---

(**Profª. Martha Meriwether Sorenson**, Professora Adjunta do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ. Doutora em Biology (1969) University of Washington).

➤ **Suplente externo:**

---

(**Profª. Denise Pires de Carvalho**, Professora Associada do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, UFRJ. Doutora em Ciências (Biofísica) (1994) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro).

➤ **Orientador:**

---

(**Prof. Marcus Fernandes de Oliveira**, Professor Adjunto do Instituto de Bioquímica Médica/CCS/UFRJ. Doutor em Química Biológica (2001) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro).



Gonçalves, Renata de Lima Sales. Metabolismo mitocondrial na relação inseto vetor-parasita. Rio de Janeiro, 2010. Tese (Doutorado em Ciências, área de concentração Química Biológica) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

A mitocôndria representa a organela onde a maior parte do ATP celular é produzido. Além disso, esta organela tem uma participação importante na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs). Nosso grupo de pesquisa vem trabalhando para o melhor entendimento das adaptações desenvolvidas pelos organismos hematófagos, não somente no contexto da utilização de sangue como fonte nutricional, mas também na interação parasito-vetor. Neste sentido, esta tese foi dividida em dois capítulos, sendo o primeiro deles dedicado a avaliar as alterações na função mitocondrial na musculatura de vôo do mosquito *A. aegypti* após a alimentação com sangue. Observamos que após o repasto sanguíneo há uma redução do consumo de oxigênio e da geração de ROS nas mitocôndrias isolados do músculo de vôo, eventos estes que são paralelos ao processo digestivo apresentando o pico de inibição em 24 horas após a alimentação. Além disso, a alimentação com sangue promoveu um aumento da fusão mitocondrial observado tanto por análises ultra-estruturais deste tecido quanto pelo aumento da expressão dos genes, *mitofusina* e *OPA*, envolvidos na fusão mitocondrial. Concluímos que a alimentação com sangue promove alterações na função e na morfologia das mitocôndrias do músculo de vôo do *A. aegypti*. Estas alterações podem representar adaptações importantes à hematofagia. Usando o epitélio intestinal do mosquito *A. gambiae* não observamos alterações no consumo de O<sub>2</sub> ou na geração de ROS após a alimentação com sangue não-infectado ou infectado com *Plasmodium berghei*. No entanto, identificamos uma proteína, que nomeamos AgMC1 (*A. gambiae* mitochondrial carrier 1), que é importante para manutenção do acoplamento mitocondrial. A redução da expressão de AgMC1 por RNA de interferência no epitélio intestinal promoveu um aumento da respiração em estado 4 e uma redução do potencial de membrana e da geração de ROS. Os mosquitos cuja expressão de AgMC1 foi reduzida apresentavam menor resistência à infecção pelo *P. berghei*. Estes dados sugerem que as espécies reativas geradas pela mitocôndria desempenham um papel importante na resposta à infecção nestes insetos. Olhando de um outro ponto de vista, o do patógeno, observamos que a única mitocôndria que o *Trypanosma cruzi* possui, apresenta diferenças marcantes dependendo do ambiente em que este parasito se encontra. Investigamos as alterações na função mitocondrial em dois estágios distintos do seu ciclo de vida e observamos que as formas epimastigotas, que habitam o trato digestivo do vetor triatomíneo, exibem altas taxas de consumo de oxigênio e alto potencial de membrana mitocondrial além de apresentarem alta sensibilidade a inibidores da cadeia transportadora de elétrons e menor geração de ROS quando comparado às formas tripomastigotas sanguíneas. Concluímos que estas alterações na função mitocondrial devem ser importantes para a adaptação destes parasitos aos diferentes ambientes que habitam. O conjunto de resultados apresentados nesta tese indica que o remodelamento funcional e estrutural das mitocôndrias parece ser um mecanismo fundamental para a adaptação e sobrevivência dos vetores e parasitos às diferentes condições fisiopatológicas encontradas por estes organismos ao longo do seu ciclo de vida.

Gonçalves, Renata de Lima Sales. **Mitochondrial metabolism in vectors and parasites**. Rio de Janeiro, 2010. PhD thesis (Biological Chemistry) - Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Mitochondria are the powerhouse of the cell, generating most of the ATP. During this process reactive oxygen species (ROS) are generated. Our research is focused on the studies of hematophagous insects mainly because they are vectors for important human diseases. Our concern is how these insects are adapted to use blood as main protein source and also to understand mitochondrial metabolism during vector-pathogen interaction. This thesis addresses two aspects: In the first chapter, oxygen consumption and hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) of flight muscle mitochondria of *Aedes aegypti* during the blood digestion were evaluated. Both O<sub>2</sub> consumption and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation after a blood meal were reduced in parallel with blood digestion. Ultrastructural analysis revealed that more mitochondria are fused 24 hours after the blood meal. Strikingly, mitofusin and Opa, genes involved in mitochondrial fusion, are up-regulated at the same time point. In conclusion, blood-feeding triggers functional and structural changes in hematophagous insect mitochondria, which may represent an important adaptation to blood feeding. In approach, the relationship between mitochondrial metabolism and *Plasmodium* susceptibility was investigated using *Anopheles gambiae* as a model. A novel mitochondrial transporter, AgMC1 (*A. gambiae* mitochondrial carrier 1), with unknown function, was identified as a central element for mitochondrial coupling in the intestinal epithelium. The silencing of this gene resulted in a phenotype of increased state-4 like respiration and reduced mitochondrial membrane potential and ROS generation. Interestingly, these metabolic changes enhanced *A. gambiae* susceptibility to *Plasmodium* infection. We conclude that mitochondrial ROS generation is important to control *A. gambiae* resistance to infection. Finally, in the last chapter, differences in mitochondrial function in two distinct evolutive forms of the parasite *Trypanosoma cruzi* were investigated. The bloodstream trypomastigotes displayed reduced oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential. Also, they were more resistant to respiratory inhibitors and generated more ROS than the epimastigote forms, which inhabits the triatomine digestive tract. These results indicate that mitochondrial remodeling during the *T. cruzi* life cycle would be important for the parasite's adaptation to different environments. Taken together, the results presented in this thesis indicate that vectors and parasites undergo functional and structural mitochondrial alterations that may represent a survival strategy to adapt/ inhabit different environments during their life cycle.

---

## Lista de Abreviaturas

$\Delta\psi_m$ .....	Potencial de membrana mitocondrial
$\Delta p$ .....	Força próton-motriz
COX.....	Citocromo c oxidase
CTE.....	Cadeia transportadora de elétrons
CuZn- SOD.....	Cobre zinco – superóxido dismutase
DMEM.....	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
FBS.....	Soro fetal bovino
FCCP.....	Carbonil cianeto <i>p</i> -trifluorometoxifenil- hidrazona
Fe-S.....	Ferro – enxofre
G3P.....	Glicerol 3- fosfato
G3PDH.....	Glicerol 3- fosfato desidrogenase
HO.....	Heme oxigenase
HRP.....	Peroxidase de rabanete
IC <sub>50</sub> /2h.....	Quantidade de droga necessária para causar a morte de 50 % dos parasitos em 2 horas
LIT.....	Triptose infusão de fígado
Mn-SOD.....	Manganês - superóxido dismutase
NO.....	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	Superóxido
OH <sup>-</sup> .....	Anion hidroxila

OH <sup>·</sup> .....	Radical hidroxila
PBS.....	Salina tamponada com fosfato
PI.....	Iodeto de propídeo
Pi.....	Fosfato inorgânico
Qn.....	Região da membrana interna mitocondrial mais próxima à matriz.
Qp.....	Região da membrana interna mitocondrial mais próxima ao espaço intermembrana.
RCR.....	Razão de controle respiratório
RHBP.....	Rhodnius Heme-Binding Protein
RO <sup>·</sup> .....	Radical alcoxil
ROO <sup>·</sup> .....	Radical peroxil
ROS.....	Espécies reativas de oxigênio
SDH.....	Succinato desidrogenase
SHAM.....	Ácido salicilidroxâmico
STE.....	Sistema transportador de elétrons
TMRE.....	Tetrametilrodamina etiléster
Ub.....	Ubiquinona
UQ <sup>-</sup> .....	Semiquinona ou ubisemiquinona
UbH <sub>2</sub> .....	Ubiquinol

---

## Lista de Figuras e Tabelas

<b>Figuras</b>	<b>Página</b>
Figura 1.....	3
Figura 2.....	5
Figura 3. ....	8
Figura 4.....	9
Figura 5.....	10
Figura 6.....	12
Figura 7.....	13
Figura 8.....	14
Figura 9.....	17
Figura 10.....	19
Figura 11.....	23
Figura 12.....	26
Figura 13.....	31
Figura 14.....	32
Figura 15.....	35
Figura 16.....	42
Figura 17.....	46
Figura 18.....	48
Figura 19.....	108
Figura 20.....	110

<b>Figura 21.....</b>	<b>113</b>
<b>Figura 22.....</b>	<b>121</b>
<b>Figura 23.....</b>	<b>123</b>
<b>Figura 24.....</b>	<b>124</b>
<b>Tabela 1.....</b>	<b>120</b>
<b>Tabela 2.....</b>	<b>122</b>
<b>Tabela 3.....</b>	<b>125</b>

---

## Apresentação da Tese

Esta tese está dividida em dois capítulos.

No primeiro capítulo tratarei do metabolismo energético em insetos com ênfase no metabolismo mitocondrial e como se dão as reações de interconversão de energia. Ainda neste capítulo, abordo o sistema imune em invertebrados e suas relações com o metabolismo energético.

Existem dois manuscritos associados ao capítulo I. O primeiro se encontra na secção Resultados I e foi fruto do meu trabalho de doutorado no Instituto de Bioquímica Médica. Este trabalho está publicado no periódico PLoS One e o mosquito *Aedes aegypti* foi utilizado como modelo. O segundo manuscrito associado a este capítulo foi desenvolvido durante o meu estagio de doutorado sanduíche no National Institutes of Health (NIH) no laboratório da doutora Carolina Barillas-Mury. Este trabalho está submetido ao periódico JBC e o mosquito *Anopheles gambiae* foi utilizado como modelo.

No capítulo II abordo as diferenças mitocondriais entre as formas epimastigotas e tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*. Estes dados foram compilados na forma de um manuscrito que submetemos para o periódico Acta Tropica. A versão enviada à revista se encontra no anexo I desta tese.

## Capítulo I: O metabolismo mitocondrial em mosquitos

### Introdução

1.1 O mosquito <i>Aedes aegypti</i> .....	2
1.2 Metabolismo energético em <i>Aedes aegypti</i> .....	6
1.2.1 O metabolismo durante o voo.....	11
1.3 O sistema de transporte de oxigênio em insetos.....	12
1.3.1 O consumo de oxigênio após a alimentação com sangue.....	15
1.4 A mitocôndria e os processos de transdução de energia.....	17
1.5 O sistema de transporte de elétrons.....	20
1.5.1 Os carreadores de elétrons .....	20
1.5.2 A oxidação dos substratos reduzidos do metabolismo convergem na redução da ubiquinona.....	22
1.5.3 O ciclo Q.....	25
1.6 A fosforilção oxidativa.....	28
1.7 O vazamento de elétrons e a geração de Espécies Reativas de Oxigênio (ROS).....	32
1.8 Os supercomplexos.....	35
1.9 O que sabemos sobre ROS e o sistema imune em invertebrados.....	36
1.9.1 Nada é de graça: O custo energético de uma sistema imune hiper eficiente...	38
1.10 A hematofagia como um desafio.....	40
<b>Objetivos I.....</b>	<b>43</b>



<b>Objetivos II.....</b>	<b>44</b>
<b>Material e Métodos</b>	<b>45</b>
<i>a) Criação dos Mosquitos.....</i>	<b>45</b>
<i>b) Isolamento das mitocôndrias do músculo de vôo - Aedes aegypti.....</i>	<b>45</b>
<i>c) Consumo de Oxigênio.....</i>	<b>46</b>
<i>c.1.) Mitocôndrias isoladas do músculo de vôo - Aedes aegypti.....</i>	<b>46</b>
<i>c.2.) Intestino medio -Anopheles gâmbia.....</i>	<b>47</b>
<i>d) Medição da geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).....</i>	<b>48</b>
<i>e. Atividade das enzimas mitocondriais.....</i>	<b>49</b>
<i>f) Hidrolise de ATP sensível a Azida.....</i>	<b>49</b>
<i>g) Determinação do conteúdo de citocromos.....</i>	<b>50</b>
<i>h) primers usados nesta tese.....</i>	<b>50</b>
<i>i) Clonagem e seqüenciamento do AgMCI.....</i>	<b>51</b>
<i>j) Quantificação da expressão gênica.....</i>	<b>51</b>
<i>l) síntese do RNA dupla fita e silenciamento gênico por RNA de interferência.....</i>	<b>52</b>
<i>m) Microscopia eletrônica de transmissão.....</i>	<b>52</b>
<b>Resultados I</b>	<b>54</b>
Manuscrito publicado no periódico PloS one.....	<b>55</b>
Perspectivas I.....	<b>70</b>
<b>Resultados II</b>	<b>71</b>

Manuscrito submetido ao periódico Journal of Biological Chemistry.....	72
Perspectivas II.....	97
<b>Discussão do capítulo I.....</b>	<b>98</b>
<b>Capítulo II: Remodelamento mitocondrial no parasito</b>	<b>107</b>
<i>Trypanosoma cruzi</i>	
<b>Introdução</b>	
2.1 Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	108
2.2 Metabolismo energético em tripanosomatídeos.....	111
2.3 O metabolismo mitocondrial em tripanosomatídeos.....	114
<b>Objetivos.....</b>	<b>115</b>
<b>Material e Métodos</b>	
a) <i>Ética animal</i> .....	116
b) <i>Parasitas</i> .....	116
c) <i>Obtenção e purificação de tripomastigotas sanguíneos</i> .....	116
d) <i>Citometria de fluxo</i> .....	117
e) <i>Consumo de O<sub>2</sub></i> .....	118
f) <i>Geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i> .....	118
g) <i>Sensibilidade ao SHAM</i> .....	119
h) <i>Análise estatística</i> .....	119
<b>Resultados</b>	<b>120</b>

1) As formas tripomastigotas sanguíneas apresentam um menor consumo de oxigênio e potencial de membrana em relação aos epimastigotas.....	120
2) As mitocôndrias dos tripomastigotas sanguíneos produzem mais peróxido de hidrogênio.....	125
<b>Discussão capítulo II.....</b>	<b>126</b>
<b>Conclusão e perspectivas</b>	<b>130</b>
<b>Conclusão geral da tese</b>	<b>131</b>
<b>Participação nos manuscritos</b>	<b>132</b>
<b>Anexo I: manuscrito submetido ao periódico Acta Tropica</b>	<b>133</b>
<b>Referências</b>	<b>160</b>

Estava realmente decidida a não fazer uma seção de agradecimentos porque em geral as pessoas que se interessam em olhar a tese somente o fazem com o intuito de ler esta parte, que embora seja lúdica me custou no máximo um dia para escrever... No entanto, tive uma idéia que me soou um tanto interessante. Ao invés de escrever sobre os outros e as contribuições que esta ou aquela pessoa tiveram para o fim de mais esta etapa, decidi pedir as pessoas que escrevessem sobre mim. No entanto, o efeito será o mesmo; aqueles que escreveram estarão sendo agradecidos. Obrigada!

*“Ela não é uma pessoa comum. E tudo que faz dela incomum a faz ser ainda mais querida por todos nós”.*

Paula Moreira Rangel

*“Aproveito esse espaço para agradecer à Renata por tanto nos divertir, todos esses anos, com sua espontaneidade inigualável; por ser uma mãezona, com direito a conselhos e comida caseira; por ser um exemplo de mulher, que batalha por seus objetivos com tanta dignidade; por ser uma pessoa do bem, sempre disposta a ajudar e, principalmente, por ser uma grande amiga de todas as horas. Parabéns por mais essa conquista! Beijos”.*

Juliana Neiva

*"Além da menina inteligente que trabalhou muito nessa tese de doutorado, a Renata é super sorridente e brincalhona de um jeitinho único que nos faz querer ficar cada vez mais próximos dela.”*

Fabiana MacCord

*“Renata é uma pessoa incrível, até quando vem te cutucar no pior dia possível... Essa rapariga entrou na minha turma de colégio já aos 40 minutos do 2º tempo para a formatura e ainda assim se enturmou muito bem, tornando-se uma de minhas melhores amigas. Depois entrou na Biologia como minha caloura - não perdendo a oportunidade de me dar um esporro no trote... a amizade tira qualquer respeito hierárquico - e fez um esforço enorme para se formar em menos tempo. Entrou no mestrado, terminou antecipadamente, logo entrou no doutorado, que também tirará de letra - incrível a determinação. Não é a toa que vive reclamando de excesso de trabalho... Além de ótima amiga e pessoa, me traz muita alegria acompanhar todo seu sucesso - mas és muito apressadinha, querida Renata. Acho que é do nome... Estamos (os amigos) aqui para lhe dar um impurrãozinho, caso precise. ;) Beijos,”*

Lorian Cobra Straker

*"Sorrindo, a Renata está sempre fazendo um milhão de coisas. Cozinha, viaja, estuda, trabalha, diverte os amigos, desafiando as horas do relógio com muita competência e sempre com seu jeitinho autêntico e brincalhão, superando as dificuldades sem se deixar abater. É um prazer e um privilégio fazer parte da sua alegria! Parabéns por mais essa conquista! Beijão!"*

Ana Benevides

*"Renata: uma pessoa determinada a fazer aquilo que quer"*

Willy Jablonka

*"Uma pessoa com um imenso leque de características admiráveis. Inteligência, determinação e competência são as mais destacadas. Ah! E o sêço de humor sarcástico? Singular!"*

Felipe de Almeida Dias

*"Não quero ser no seu trabalho o início do fim, nem o fim de um começo, mas um início de um começo sem fim."*

Ana Carolina Loyola Machado

*"Para não misturar banana com laranja vou falar aqui apenas da minha relação profissional com a Renata. Com toda a certeza de 10 anos de convivência no lab posso dizer que a criatividade na hora de pensar no experimento e a força de trabalho na bancada são as qualidades que mais se destacam na Renata. No meu julgamento a Renata está chegando ao fim de seu doutorado com uma produção expressiva e definitivamente formada cientificamente, altamente capaz de encarar os desafios que virão. Boa sorte!"*

José Henrique M. C. Oliveira

*"Renata foi minha aluna quando fazia o CAP e eu iniciava o meu doutorado. Tendo a mim como primeiro contato científico, deu no que deu... Mas tenho fé de que ela nem se lembre desse período (irritante para mim). Me lembro de tentar convence-la (sem nenhum sucesso) de que sacudindo um frasco de PBS semi-congelado no banho maria conseguiríamos obter o precioso líquido (lembrando que estávamos no Lab. do Prof Pedro) em menor tempo. Quem melhor resumiu a Renata, de maneira que sempre que converso com ela lembro dessa pessoa, foi o Prof. Marcos Sorgine. Ele disse com seu ar professoral: "...a Renata tem um senso de humor só dela".*

Mas num desabafo ele escreve: *"acho extremamente narcisista no único trecho da tese em que vc fala de outras pessoas, vc arrumar um jeito pra falar de vc... mas se vc nao censurar nada vai ficar bem legal!"*

Flavio Lara

*“Adoro perceber as transformações que um bebê sofre até que seja uma criança que se comunica e que tem até opinião própria. Sinceramente, acho emocionante! Isso não seria diferente com você, já que te conheci bebezinha na ciência e hoje você é isso tudo. Parabéns, você é guerreira e eu admiro isso. Sinto-me um pouquinho sua mãe. Mesmo que seja aquela mãe que está ensinando, somente através de seus próprio exemplos, o que você não deve fazer. Minha querida, depois de adquirir tanto saber científico, espero que você consiga saber o que te trará felicidade. Pro famoso Nietzsche, “Saber é compreender as coisas que mais nos convém.”  
Beijos. Sucesso!”*

Marta Citelli

*“A Renata pode sob condições especiais ser extensivamente mensurada em função análoga a um cilindro polivalente, de maneira a recairmos novamente sobre o Equívoco de Paterson. De qualquer forma, o veredicto predominante costuma ser: Renata = Muito Maneira”.*

Eduardo Fox

– É dele o interessante desenho do mosquito abaixo!! Muito obrigada Fox

Por fim gostaria de agradecer enormemente aos meus pais, Maria Luiza e José Eduardo, por todo o incentivo e dedicação.

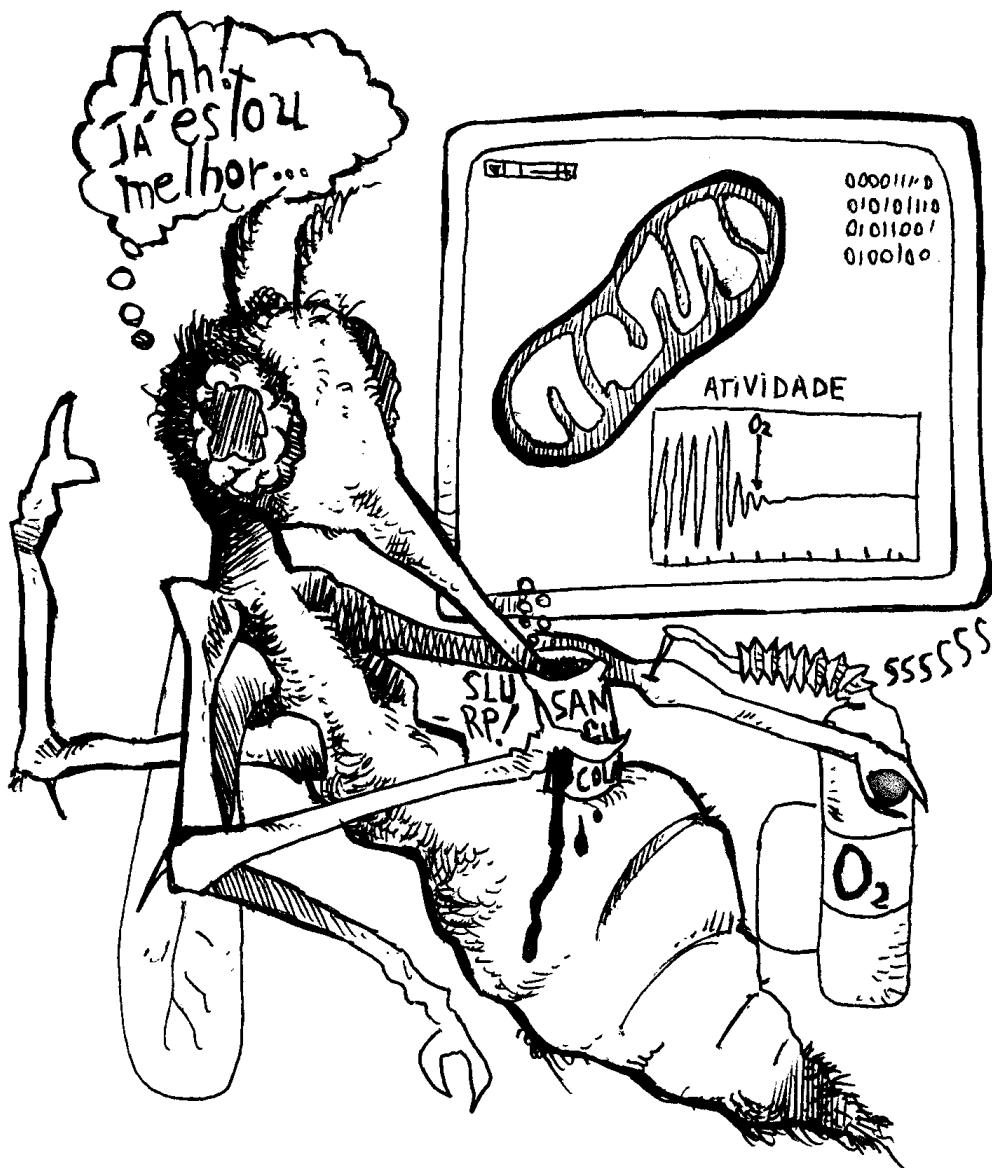
Não posso deixar de agradecer ao professor Pedro L Oliveira por 10 anos de paciência e confiança. Também aos professores Marcos Sorgine e Gabriela Paiva por todas as ajudas (e foram muitas).

À professora Martha Sorenson que, com paciência, corrigiu meus inúmeros erros.

E por fim por fim, meu orientador, Marcus F Oliveira, que esteve comigo desde o fim da iniciação científica me orientando durante o mestrado e doutorado me dando broncas construtivas, deixando-me livre para ter as minhas idéias e confiando em mim. Tudo isso ajudou a me tornar parte da pesquisadora que sou hoje.

# Capítulo I:

## O metabolismo mitocondrial em insetos vetores



## 1.1 Biologia dos mosquitos

O desenvolvimento do hábito hematofágico foi um evento que aconteceu diversas vezes durante a evolução; se por um lado este hábito alimentar possibilitou aos insetos nutrientes suficientes para sustentar a produção de uma prole extensa, por um outro abriu um novo caminho para a entrada de patógenos contidos na circulação dos vertebrados.

Os mosquitos são insetos bastante conhecidos do homem, principalmente pelo fato de se alimentarem de sangue e por serem vetores de doenças de alto impacto para a saúde pública mundial como malária, dengue, febre amarela e a filariose. São da ordem Díptera, pertencentes à família Culicidae, que é subdividida em três sub-famílias: Anophelinae, Culicinae e Toxirhynchitinae. As sub-famílias Anophelinae e Culicinae agrupam gêneros importantes, como o *Anopheles* e o *Aedes*, vetores da malária e da dengue, respectivamente (Eldridge, 2005). Os mosquitos estão envolvidos na transmissão de mais de 200 arboviroses, atingindo não apenas o homem, mas também os animais (Lehane, 1991). O *Anopheles* e o *Aedes*, assim como os demais Díptera, são holometábolos, ou seja, durante seu desenvolvimento sofrem metamorfose completa, passando por estágios de ovo, larva, pupa e, finalmente, o estágio adulto (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994).

Os mosquitos *Aedes aegypti* e *Anopheles gambiae* (Figura 1) são as espécies que mais se destacam por sua importância médica. O *A. aegypti* é o principal vetor da febre amarela urbana na África e nas Américas Central e do Sul (Bates, 1970) e é um dos principais vetores da dengue. A dengue é uma doença que acomete mais de 100 países em todo o mundo, exceto na Europa, e infecta anualmente 50 milhões de pessoas, sendo que 500.000 casos são de dengue hemorrágica, levando à morte de 22 mil pessoas, na sua maioria crianças (WHO).



O *A. gambiae* é o principal vetor da malária no continente africano, doença que causa a morte anual de aproximadamente 1 a 3 milhões de pessoas, principalmente de crianças com idade inferior a cinco anos (WHO). Isto significa que a cada 30 segundos uma criança morre de malária na África, ressaltando a urgência de se estudar e entender a biologia básica destes insetos vetores.

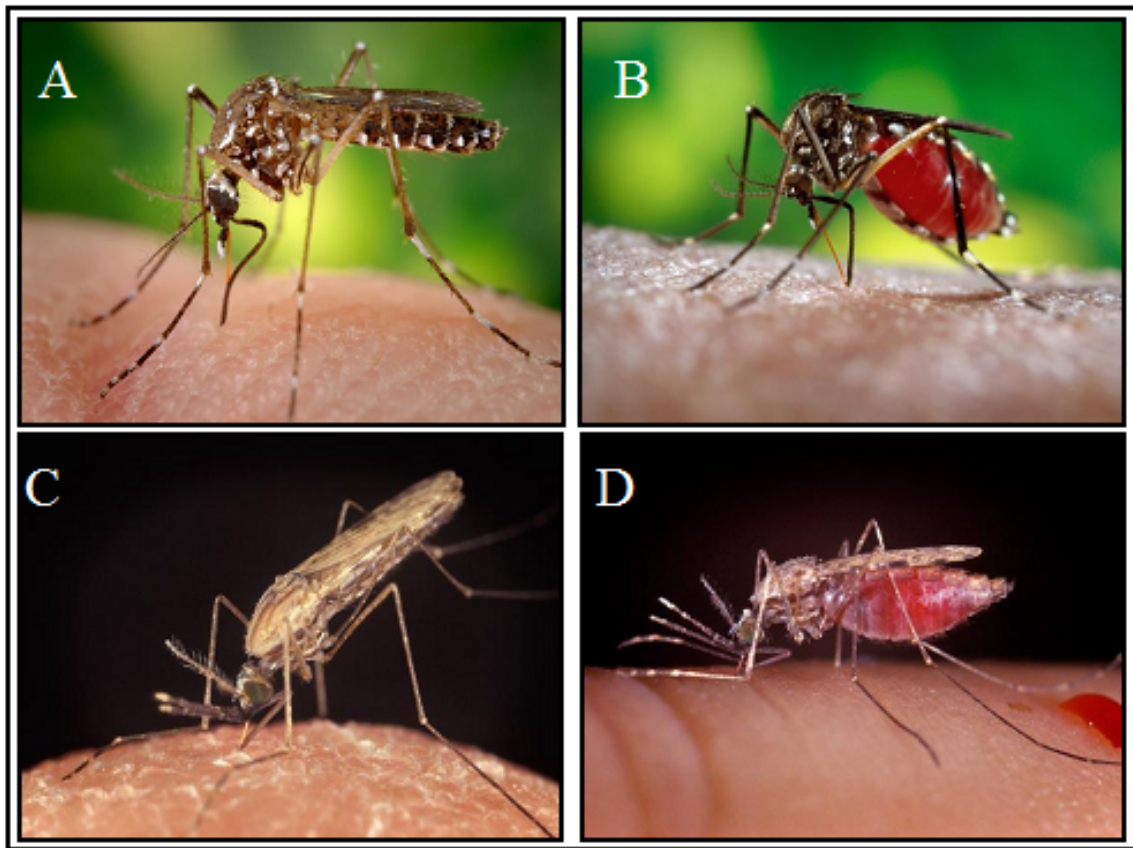


Figura 1. Fêmeas adultas de *A. aegypti* (A-B) e *A. gambiae* (C-D) antes (A e C) e depois (B e D) da alimentação com sangue. As fêmeas destas duas espécies podem em um único repasto sanguíneo, ingerir cerca de 2,5 vezes o seu peso em sangue. Isto seria o equivalente a um homem de 70 kg comer 175 kg de alimento. Fotos retiradas do banco de dados de imagens do site: <http://www.vectorbase.org/>

Nestes mosquitos, o hábito hematofágico é restrito às fêmeas. Na natureza os machos, por sua vez, se alimentam do néctar das flores ou com soluções açucaradas quando criados em cativeiro. As fêmeas também recorrem aos líquidos adocicados para se hidratarem e como fonte de carboidratos. (Lehane, 1991). O *A. aegypti* apresenta hábitos crepusculares e abrigam-se preferencialmente no peri-domicílio e utilizam qualquer recipiente que contenha água limpa e parada para a ovoposição (Lehane, 1991). Já os anofelinos se alimentam preferencialmente nas horas mais altas da noite e usam as margens de rios ou açudes que apresentem água de pouca correnteza para ovipor (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). Antes de se tornarem adultos, os mosquitos passam por estágios larvais e um estágio de pupa (Zhou e cols., 2005) (Figura 2). Os estágios larvais são divididos em quatro fases onde ambientes aquáticos, lânticos e criadouros artificiais são preferenciais (Consoli e Lourenço-de-Oliveira, 1994). A duração do estágio larval está diretamente relacionada à temperatura da água, aos nutrientes e à densidade de larvas no meio. As pupas também são aquáticas e são um estágio de transição entre o mosquito e a larva. Cerca de dois dias após o aparecimento das primeiras pupas, os insetos adultos já começam a emergir (Eldridge, 2005). Os machos emergem em geral primeiro, completando, portanto, sua maturação sexual antes das fêmeas emergirem, aumentando assim as chances de cópula, que alguns autores acreditam ocorrer próximo ao local da ovoposição (Eldridge, 2005). Outros, porém, acreditam que o ponto de encontro entre machos e fêmeas, no caso do mosquito *A. aegypti*, ocorre provavelmente no hospedeiro vertebrado (Clements, 1992). O encontro e o acasalamento do mosquito *A. gambiae* ocorre dentro de um enxame formado por uma alta densidade de machos (Manoukis e cols., 2009).

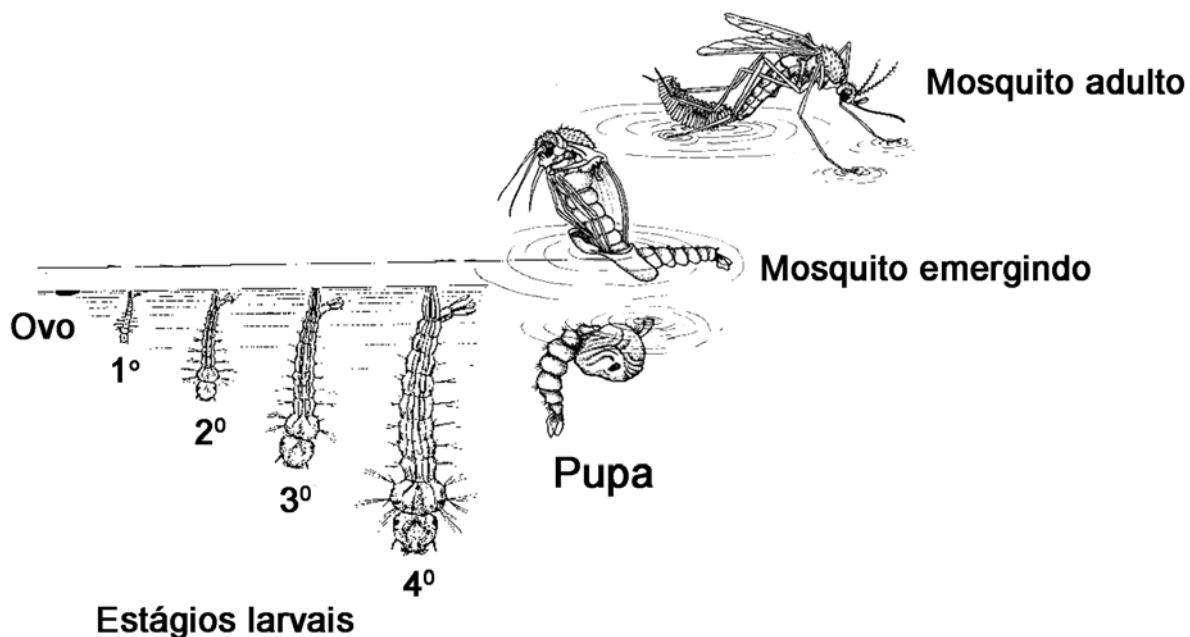


Figura 2. O ciclo de vida dos mosquitos. Cerca de 72 horas após se alimentarem de sangue as fêmeas estão aptas para ovipor. Dos ovos eclodem pequenas larvas que passarão por quatro estágios até sofrerem transformação para a fase de pupa. Dois após dias o aparecimento das primeiras pupas os mosquitos adultos começam a emergir. Esquema adaptado do site: <http://www.onken-beecher.com/mosquitos.html>

Para completarem seu ciclo de vida, as fêmeas destas duas espécies de mosquitos precisam se alimentar de sangue e chegam a ingerir cerca de 2,5 vezes o seu peso em sangue (Figura 1), que será posteriormente digerido pela ação de serino-proteases do tipo tripsina (Graf e cols., 1991; para revisão ver Wu e cols., 2009). Ingerir esta grande quantidade de sangue de uma só vez parece ter sido um mecanismo adaptativo importante para diminuir o seu tempo de exposição perante o homem, minimizando o risco de serem percebidas e mortas (Lehane, 1991).

Os mosquitos *A. aegypti* e *A. gambiae* são de fácil criação e possuem a dieta manipulável, ou seja, é possível alimentá-los com uma variada gama de soluções, sejam elas sangue ou não. Além disso, ambos os mosquitos já possuem seu genoma completamente seqüenciado (Nene e

cols., 2007; Holt e cols., 2002;), tornando possível estudos moleculares com técnicas mais avançadas como, por exemplo, a genética reversa.

## 1.2 O metabolismo energético em insetos vetores.

A capacidade dos mosquitos em armazenar nutrientes é diretamente proporcional à massa corporal, ou seja, fêmeas grandes se alimentam mais e são capazes de armazenar mais energia e também de produzir mais ovos (Briegel, 1990). As fêmeas precisam superar um desafio metabólico muito importante, pois dividem a energia proveniente de sua alimentação entre atividades metabólicas muito dispendiosas como o vôo, a ovogênese, a conversão dos nutrientes, o metabolismo basal, a reprodução e a excreção (Bursell e Taylor, 1980). Neste contexto, as fêmeas que se alimentam com sangue infectado com um patógeno, seja ele o vírus da dengue ou o plasmódio da malária, ainda precisam dividir sua energia combatendo a infecção (Atella e cols., 2009) (para maiores detalhes ver secção 9.1). Deste modo, não é surpreendente observar uma queda na performance de ovoposição de fêmeas infectadas (Ye e cols., 2009).

A ovogênese pode ser considerada a tarefa que demanda mais energia dentre a variada gama de atividades metabólicas ressaltadas acima. Cerca de 50 % das proteínas obtidas da alimentação com sangue são convertidas em componentes do ovo (Zhou e cols., 2005). A ovogênese é uma atividade tão custosa para as fêmeas que em algumas situações o próprio músculo de vôo é degradado, sendo utilizado para suprir a demanda de carboidratos, lipídeos e proteínas para os ovários num processo conhecido como histólise (Lorenz, 2007). Por outro lado, o vôo também demanda uma grande quantidade de energia. Um dado empírico mostra que após se alimentarem com sangue, as fêmeas crescidas e mantidas em condições de laboratório não voam ativamente, mantendo-se em repouso até a ovoposição (Gonçalves *et al.*, dados não

publicados). Mesmo assim, há relatos de que na natureza fêmeas alimentadas de *A. aegypti* podem voar até 800 metros em 6 dias (Honorio e cols., 2003). Numa outra abordagem, 12.000 fêmeas marcadas com o corante azul de metileno foram soltas de uma balsa ancorada a 1 km da costa (Shannon e Davis, 1930). Neste experimento apenas oito fêmeas foram re-capturadas, mas ficou evidente a capacidade de vôo deste mosquito. No entanto, um aumento na capacidade de vôo está diretamente relacionado com uma queda na ovoposição e vice-versa (síndrome vôo-ovogênese) (Dingle, 1972). Este conceito ganha ainda mais força quando o transcriptoma do mosquito *A. gambiae* mostrou que proteínas diretamente relacionadas ao vôo como a miosina, actina e “flightina” preteinas integrais da musculatura de vôo, têm sua expressão reprimida após a alimentação com sangue (Ribeiro, 2003).

Existem substâncias essenciais que os insetos não são capazes de sintetizar e que, portanto, necessitam ser ingeridas pela alimentação, como aminoácidos essenciais, alguns ácidos graxos, vitaminas, minerais e colesterol (Ziegler, 1996). Embora o sangue seja um alimento rico em proteínas e lipídeos, é particularmente pobre em carboidratos. Deste modo, as fêmeas, além de se alimentarem com sangue, ainda necessitam de uma fonte de carboidratos que é suprida com soluções açucaradas (em laboratório) ou com néctar (na natureza). O intestino do mosquito é dividido em dois compartimentos distintos: o pró-ventrículo ou *crop* (Figura 3) que armazena soluções açucaradas como o néctar ou a solução de sacarose oferecida quando em cativeiro. Estes carboidratos podem ser realocados do *crop* para o outro compartimento, o intestino médio que também é o responsável por armazenar e digerir o sangue (Figura 3) (Nayar e Van Handel, 1970). Os carboidratos são usados como fonte energética primordial para sustentar o vôo em mosquitos ao contrário de triacilglicerídeos e outros lipídeos que são os principais substratos energéticos para o vôo de insetos migratórios (Nayar e Van Handel, 1970; Oliveira e cols., 2006).

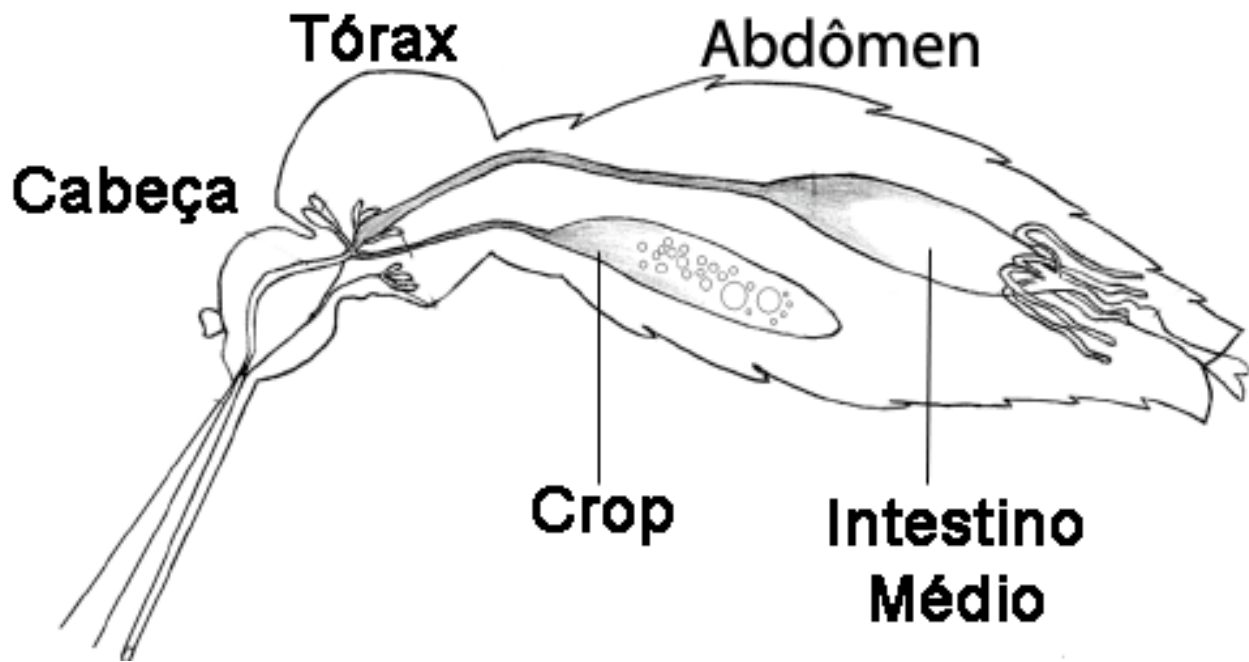


Figura 3. Representação esquemática do intestino de um mosquito. O *crop* é um divertículo do intestino e se localiza na região onde os intestinos anterior e médio se dividem. É neste pequeno compartimento onde os carboidratos são armazenados. O sangue é armazenado no intestino médio e é envolto pela matriz peritrófica (PM). É neste compartimento onde ocorre a digestão. Figura adaptada de [Gusmao e cols., 2007](#).

Cerca de 90 % do peso seco do sangue é composto por proteínas ([Lehane, 1991](#)) e a digestão desta grande quantidade de proteínas gera uma enorme quantidade de aminoácidos. Alguns  $\alpha$ -cetoácidos, produtos da deaminação dos aminoácidos provenientes da digestão do sangue, podem ser utilizados como precursores para a biosíntese de lipídeos do ovo ou ainda como fonte energética ([Zhou cols., 2005](#)) (Figura 4). Os aminoácidos podem ser convertidos a carboidratos através da gliconeogênese e são uma excelente fonte energética, pois são hidrossolúveis e fáceis de mobilizar, principalmente para os músculos durante o vôo. Os aminoácidos podem ainda ser convertidos em lipídeos, que são armazenados principalmente no corpo gorduroso (órgão com características análogas ao fígado em mamíferos) ([Zhou cols., 2005](#)).

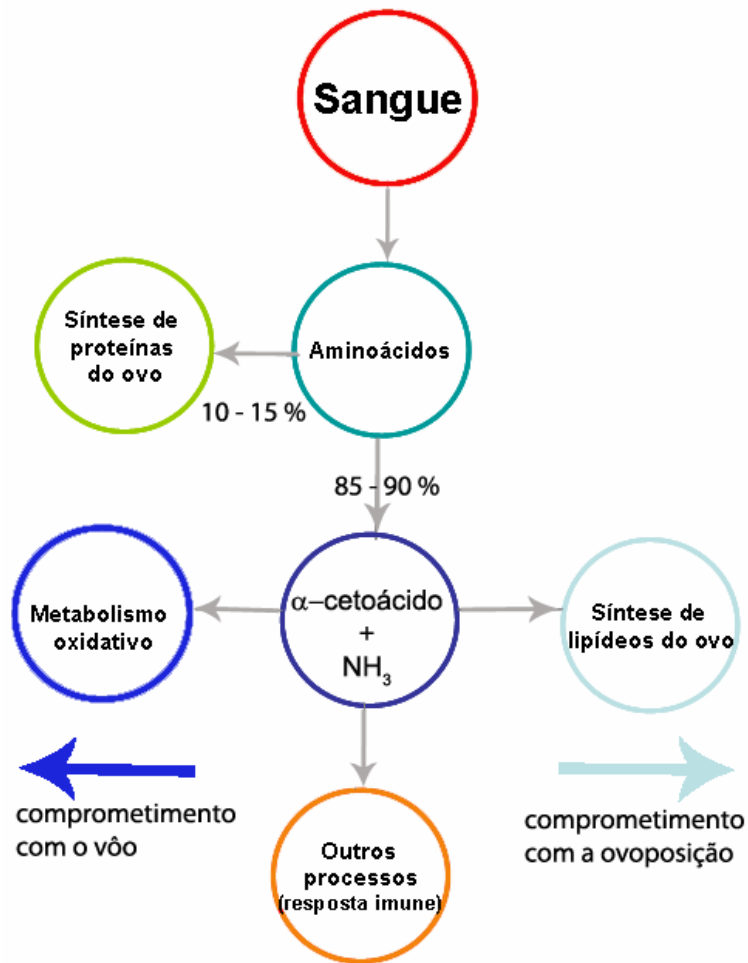


Figura 4. A metabolização dos aminoácidos nos insetos. A alimentação com sangue promove a entrada de uma grande quantidade de nutrientes que são realocados de acordo com as necessidades energéticas do inseto. A degradação do sangue no intestino libera aminoácidos. Parte destes aminoácidos (10 – 15 %) é desviada para a síntese de proteínas do ovo. A outra parte (85 – 90 %) é deaminada e utilizada como precursor energético para o metabolismo oxidativo, para a síntese de lipídeos dos ovos e em outros processos como o sistema imune, gerando energia para combater situações de infecção. A quantidade de  $\alpha$ -cetoácidos desviada para cada um destes processos depende do momento metabólico do inseto. Sendo assim, insetos comprometidos com o vôo vinculam uma maior quantidade de energia para o metabolismo oxidativo (seta azul escura), enquanto que insetos comprometidos com a ovoposição para a produção de ovos (seta azul clara). Adaptado de [Zhou et al., 2005](#).

A utilização de aminoácidos como fonte de energia ainda parece ser uma alternativa vantajosa para insetos que se alimentam de grandes quantidades de proteína. O tórax apresenta

adaptações que permitem a utilização de aminoácidos para sustentar o vôo, como altas atividades de enzimas relacionadas ao metabolismo de aminoácidos. O *A. aegypti* compartilha com outros insetos a capacidade de armazenar grandes quantidades do aminoácido prolina na hemolinfa (Figura 5) e mobilizá-lo para o tórax a fim de sustentar o vôo (Auerswald e Gade, 1995; Bursell, 1975; Clements, 1992; Sacktor e Childress, 1967; Bursell, 1975; Auerswald e Gade, 1995; Scaraffia e Wells, 2003).

É interessante notar que protozoários pertencentes ao grupo dos tripanosomatídeos, sejam eles transmitidos por mosquitos, barbeiros ou flebotomíneos, quando na sua forma evolutiva dentro do hospedeiro invertebrado, se aproveitam da grande quantidade de prolina na hemolinfa destes insetos para atender suas próprias demandas energéticas (para revisão ver Bringaud e cols., 2006).

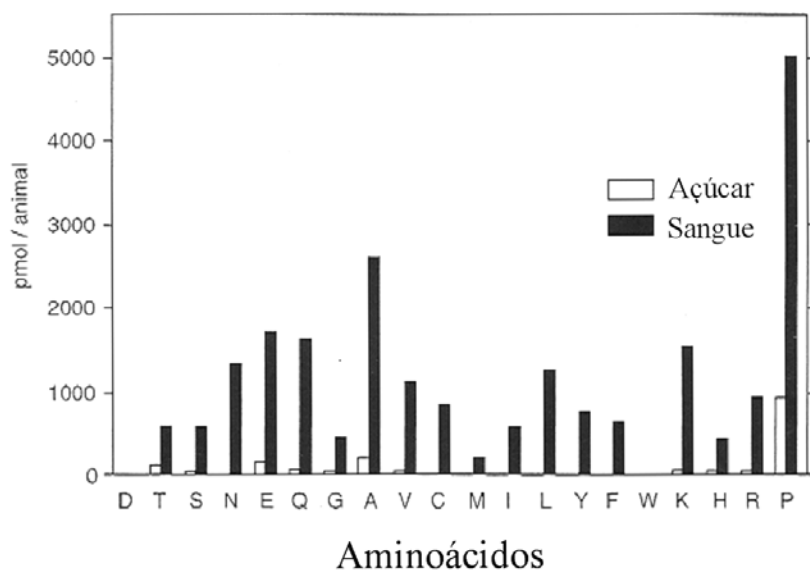


Figura 5. Concentração dos aminoácidos livres na hemolinfa de fêmeas do mosquito *Aedes aegypti*. As letras se referem ao código utilizado para cada aminoácido. Observa-se que o aminoácido majoritário na hemolinfa 24 horas após a alimentação é a prolina (P). As barras indicam a alimentação que os mosquitos receberam. Barras brancas, açúcar e barras pretas, sangue. Figura adaptada de Zhou e cols., 2005.



### 1.2.1 O metabolismo durante o vôo.

O músculo de vôo dos insetos é o tecido metabolicamente mais ativo encontrado na natureza. Durante o vôo há um aumento de 50 – 100 vezes no consumo de oxigênio (O<sub>2</sub>) (Sacktor, 1965), que é cerca de 10 vezes maior do que o experimentado pelos vertebrados durante o exercício (Zhou e cols., 2005). Esse enorme aumento no consumo de O<sub>2</sub> é de suma importância para sustentar o aumento da demanda energética necessária à contração e ao relaxamento das fibras musculares durante o vôo (Ziegler, 1996)<sup>1</sup>.

O músculo de vôo do mosquito *A. aegypti* possui um metabolismo essencialmente oxidativo (Sacktor, 1965). Os carboidratos e a prolina são as principais fontes de energia utilizadas durante o vôo e os níveis de prolina no tórax diminuem 50 % após 30 minutos de vôo (Scaraffia e Wells, 2003). A biossíntese de prolina ocorre no corpo gorduroso, e se inicia através da atividade da enzima alanina aminotransferase, que transfere um grupamento amino da alanina para o  $\alpha$ -cetoglutarato, gerando glutamato. Posteriormente, o glutamato é convertido a prolina, que é transportada do corpo gorduroso para o tórax, sendo então convertida novamente a  $\alpha$ -cetoglutarato (Figura 6) (Scaraffia e Wells, 2003). Este  $\alpha$ -cetoácido é um intermediário do ciclo de Krebs (para revisão ver Owen e cols., 2002) que produz, dentre outras moléculas, o NADH, substrato do complexo I da cadeia transportadora de elétrons (CTE) mitocondrial. Através deste mecanismo, a prolina contribui para a transdução de energia sob a forma de ATP pela mitocôndria. As elevadas concentrações de prolina no tórax, somadas às altas taxas metabólicas dos insetos, possibilitam a grande produção de ATP para sustentar o vôo.

---

<sup>1</sup> Um adulto humano requer cerca de 2000- 3000 kcal por dia. Caso um homem de 68 kg consumisse tanta energia quanto um gafanhoto (*Locusta*, por exemplo) o primeiro necessitaria de 7500 kcal por hora. Isso significaria comer o equivalente a 9 – 11 kgs de batata por hora. (Ziegler, 1996)

É interessante ressaltar que as mitocôndrias de insetos são as maiores mitocôndrias já descritas na natureza (Sogl e cols., 2000 *apud* Brosemer e cols., 1963). Durante o voo os diversos substratos metabólicos oxidáveis, em especial prolina, piruvato e glicogênio (Sacktor e Wormser-Shavit, 1966), tem seus níveis diminuídos, acarretando no enorme aumento da respiração (Sacktor, 1965).

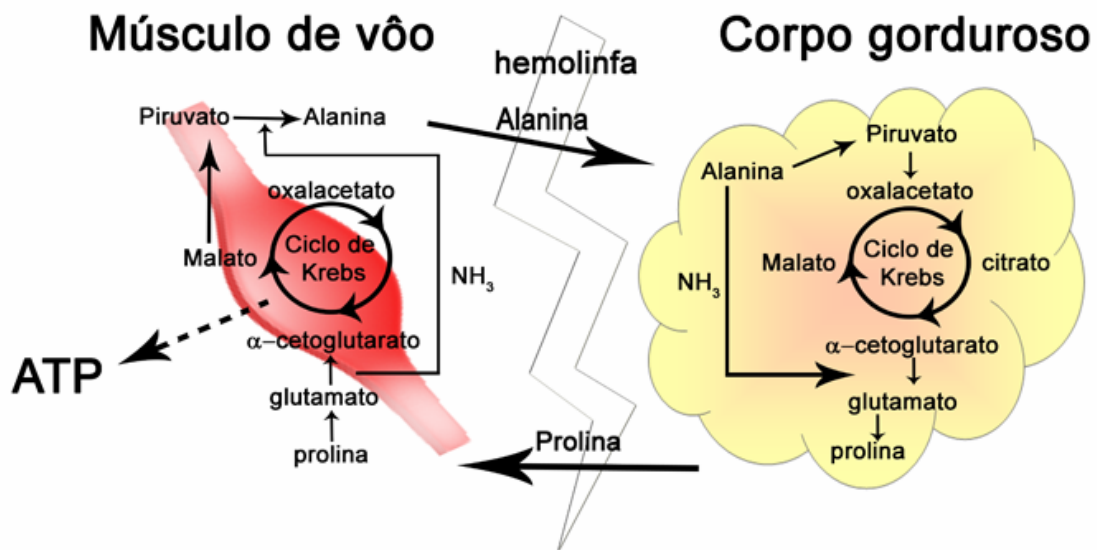


Figura 6. Representação esquemática do metabolismo de prolina em insetos. Figura adaptada de Zhou e cols., 2005.

### 1.3 O sistema de transporte de oxigênio em insetos

A maioria dos insetos utiliza o sistema traqueal para realizar as trocas gasosas (Brusca e Brusca, 1990). As traquéias são invaginações tubulares extremamente ramificadas da epiderme que conectam o meio exterior diretamente à cavidade geral do corpo (hemocele) ou aos órgãos mais internos do inseto (Brusca e Brusca, 1990). A abertura externa das traquéias é chamada espiráculo, que está sob controle de uma válvula que regula sua abertura ou o seu fechamento

conforme a diferença da pressão parcial de  $O_2$  ou  $CO_2$  (Hetz e Bradley, 2005) ou a demanda de  $O_2$ . Nos insetos as trocas gasosas não são mediadas pela hemolinfa (o líquido que banha os órgãos dos insetos - equivalentes ao sangue em mamíferos) e sim diretamente através do contato direto entre as traquéias e as células do inseto (Figura 7).

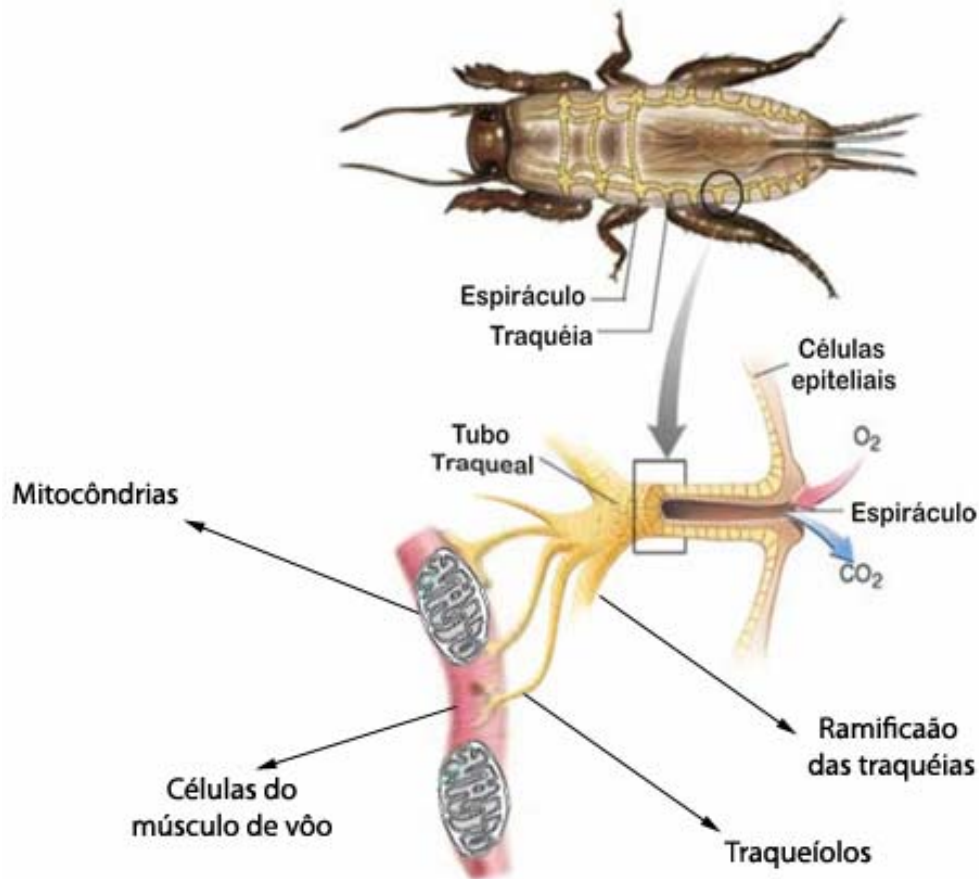


Figura 7. Sistema de transporte de  $O_2$  em insetos. Na figura do topo está desenhado o plano básico de um inseto, mostrando o sistema traqueal e a abertura externa das traquéias, os espiráculos. Abaixo, um esquema do sistema traqueal. As traquéias se ramificam, originando segmentos menores, os traqueíolos. Estes adentram as fibras musculares, chegando bem próximo das mitocôndrias. Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/FisiologiaAnimal/respiracao2.php>

Embora o transporte de  $O_2$  através do sistema traqueal possa parecer menos eficiente, cálculos recentes indicam que este transporte passivo de gases é mais do que suficiente para

sustentar o metabolismo oxidativo, até mesmo em insetos bem grandes (Hetz e Bradley, 2005). As traquéias são preenchidas de ar, facilitando o transporte de gases através do corpo, uma vez que a difusão de O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> pelo ar atmosférico são, respectivamente, 10<sup>6</sup> e 10<sup>4</sup> vezes maiores do que em meios líquidos como o sangue (Hetz e Bradley, 2005).

Como adaptação às altas taxas metabólicas, o tecido muscular dos insetos encontra-se arranjado de uma forma muito particular. As fibras musculares são extremamente grandes e intercaladas com uma grande quantidade de mitocôndrias (Figura 8) (cerca de 40 % do volume do tecido muscular é devido à presença de mitocôndrias) (Sacktor, 1965). Nos insetos, estas organelas são altamente invaginadas, pois possuem uma área interna muito grande, o que as torna muito densas. Outra característica importante que possibilita as altas taxas metabólicas é a proximidade entre mitocôndrias e traquéias, uma vez que estas últimas adentram as fibras musculares tão profundamente que praticamente tocam as mitocôndrias (Figura 7 e Figura 8, setas vermelhas) (Sacktor, 1965).

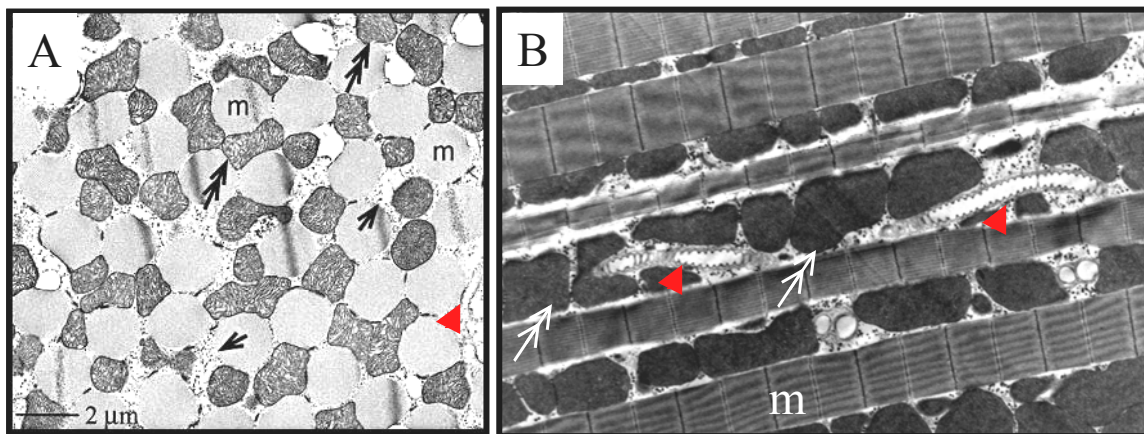


Figura 8. Ultraestrutura do músculo de vôo ressaltando a proximidade entre traquéias e mitocôndrias. (A) Seção transversal do tórax de *Drosophila melanogaster* evidenciando o arranjo típico das fibras musculares entremeadas com mitocôndrias gigantes neste tecido (adaptado de Magwere e cols., 2006). (B) Seção longitudinal do tórax do mosquito *A. aegypti* não alimentado com sangue (Ampliação: 4400 vezes) (Gonçalves e cols., dados não publicados). As setas duplas indicam as enormes mitocôndrias; as setas simples os grânulos de glicogênio e m = fibras musculares. Além disso, é possível observar a abertura das traquéias bem próxima à mitocôndria (cabeça de seta vermelha).

Nos insetos em repouso os espiráculos estão fechados e as trocas dos gases O<sub>2</sub> e CO<sub>2</sub> ocorrem apenas durante curtos períodos de tempo. Este fenômeno é conhecido como ciclo de troca de gases descontínua (DGC) (Chown e cols., 2006). Embora não exista um consenso sobre o porquê deste fenômeno, acredita-se que ele seja importante para reduzir a toxicidade do oxigênio (Hetz e Bradley, 2005), reduzir a perda de água (Lehmann e cols., 2000) e evitar a entrada de patógenos (Chown e cols., 2006). Estudos conduzidos na década de 70 avaliaram o comportamento dos espiráculos no mosquito *A. aegypti*. Durante o repouso, assim como descrito para outros insetos, os espiráculos se abrem e fecham de forma sincronizada e o grau de abertura dos espiráculos é mínimo. Tanto o vôo, quanto as baixas tensões de oxigênio, induzem a abertura mais prolongada dos espiráculos (Krafsur e cols., 1970; Krafsur e Graham, 1970). Embora existam poucos estudos sobre o comportamento dos espiráculos em animais em movimento ou voando, acredita-se que durante o exercício a DGC cesse e os espiráculos se abram por um maior período de tempo para suprir as necessidades energéticas do inseto (Lehmann e cols., 2000).

### **1.3.1 O consumo de oxigênio após a alimentação com sangue.**

A alimentação com sangue representa a entrada repentina de uma grande quantidade de suprimentos energéticos. O período entre o repasto sanguíneo e a ovoposição é de aproximadamente 72 horas. Deste modo, alguns tecidos precisam trabalhar em conjunto para digerir, absorver e processar um equivalente em sangue 2,5 vezes maior do que o próprio peso do mosquito. Não seria surpreendente pensar, portanto, que cada tecido apresente um metabolismo muito particular nesta situação.

Uma abordagem interessante é avaliar o consumo de oxigênio de cada parte separada do inseto alimentado em comparação com o não-alimentado. Numa abordagem mais global, pode-se medir o consumo de oxigênio do mosquito inteiro nas variadas condições metabólicas.

Em 2002, um trabalho de campo realizado em colaboração com a escola nacional de medicina em Mali, na África, conduzido pelo pesquisador Alon Warburg (Warburg, 2002), gerou um relatório que tive acesso e discutirei brevemente os dados a seguir. Neste relatório, ainda não publicado, o pesquisador descreve um aparato onde 10 fêmeas de *A. aegypti* eram posicionadas e tanto o consumo de O<sub>2</sub> quanto a produção de CO<sub>2</sub> foram medidas. A taxa de consumo de oxigênio global de fêmeas de *A. aegypti* não alimentadas tende a não mudar durante o período avaliado neste experimento (Figura 9, quadrados brancos). Curiosamente, as fêmeas que foram alimentadas com sangue de galinha não infectado ou naïve apresentam taxas maiores de consumo de O<sub>2</sub>, que atingem um pico 48 horas após a alimentação com sangue (Figura 9, triângulos azuis). Neste momento o metabolismo do corpo gorduroso e do ovário está ativado em virtude da ovoposição. É interessante ressaltar que os mosquitos alimentados com sangue infectado com *Plasmodium gallinaceum* apresentam uma taxa de consumo de O<sub>2</sub> superior aos mosquitos alimentados com sangue naïve. Estes dados reforçam o conceito de que a infecção impõe um desafio energético aos insetos infectados e estes precisam aumentar o metabolismo para suprir mais esta demanda.

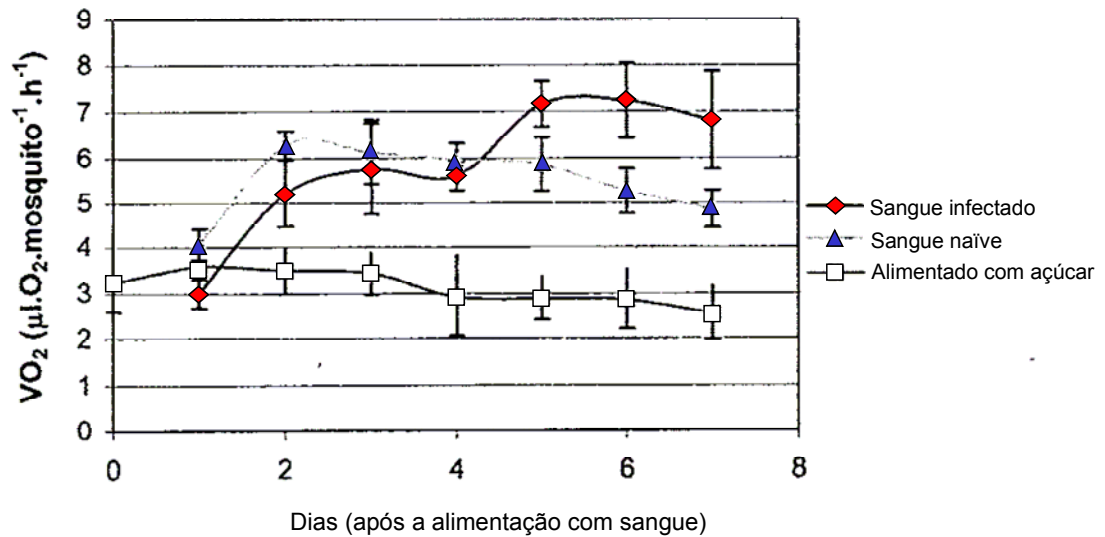


Figura 9. Consumo de  $O_2$  (Média  $\pm$  SD) de fêmeas de *A. aegypti* alimentadas com açúcar (quadrados brancos), sangue naíve (triângulos azuis) ou sangue infectado com *Plasmodium gallinaceum* (losangos vermelhos). Figura modificada de Warburg, 2002.

Relatos anteriores ao de Warburg indicam que o consumo de  $O_2$  de *A. aegypti* após a ingestão de sangue aumenta em torno de seis vezes em relação ao inseto não alimentado (Heusner e cols., 1973). O interessante é que o aumento do consumo de  $O_2$  é diretamente proporcional à quantidade de sangue ingerida.

#### 1.4 A mitocôndria e os processos de transdução de energia

A mitocôndria é a organela celular responsável por consumir cerca de 90 % do  $O_2$  de células aeróbicas (Kagawa e cols., 1999) bem como pela geração da maior parte do ATP através de um processo conhecido por fosforilação oxidativa. No entanto, ela está envolvida em uma série de outras atividades como a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) e a apoptose (Yoneda e cols., 1995; Saraste, 1999). Esta organela é delimitada por uma membrana externa,

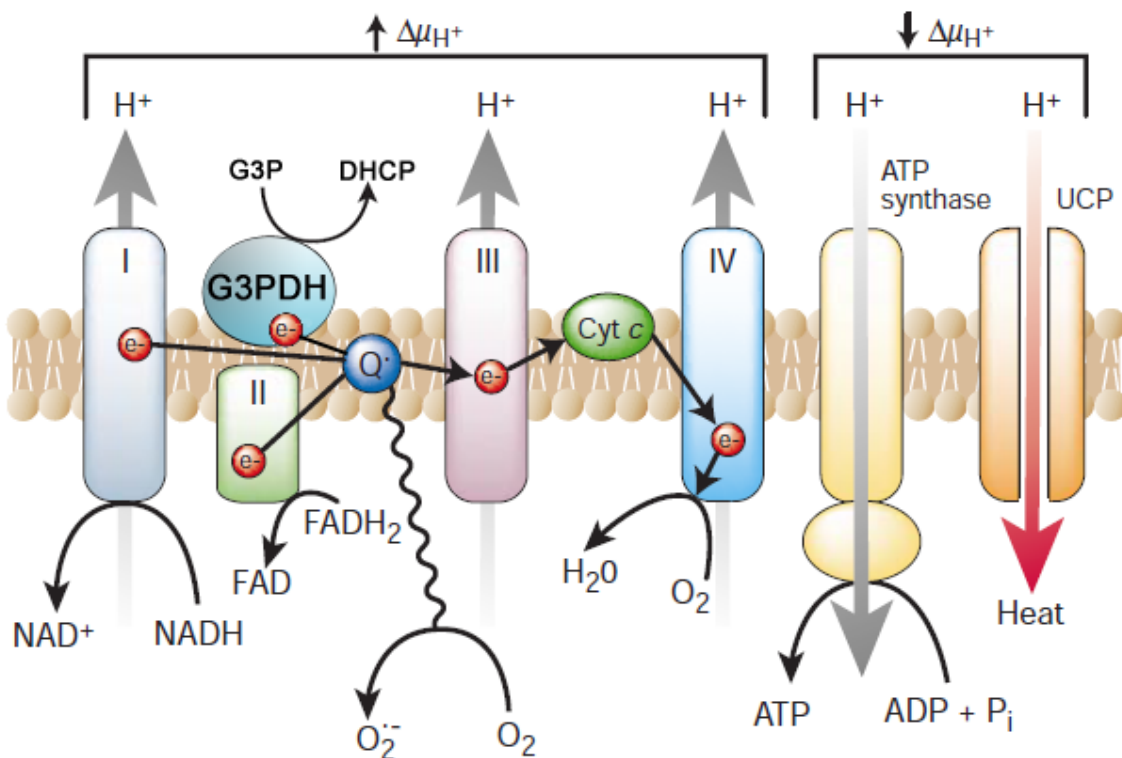
pouco seletiva, e uma membrana interna rica em proteínas e altamente seletiva. Estas membranas delimitam espaços bem definidos, como a matriz mitocondrial e o espaço intermembrana. De acordo com a *teoria simbiótica*, proposta pela pesquisadora Lynn Margulis, diversas evidências apontam para o fato de que a bactéria ancestral que originou a mitocôndria foi englobada por células primitivas, dando origem às células aeróbicas que conhecemos hoje ([para revisão ver Gray e cols., 1999 apud Margulis, 1970](#)). Uma observação que suporta esta teoria é o fato da mitocôndria possuir material genético próprio, na forma de um DNA circular, e da transcrição dos genes mitocondriais proceder de forma análoga à transcrição nas bactérias, com uma origem única de replicação para cada fita de DNA ([para revisão ver Kagawa e cols., 1999](#)).

Para realizar a fosforilação oxidativa, a energia livre oriunda da oxidação de substratos é utilizada para a formação de um gradiente eletroquímico de prótons, que permite a síntese de ATP pela F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP sintase ([para revisão ver Saraste, 1999](#)). A membrana mitocondrial interna possui complexos proteicos comumente enumerados de I a V ([para revisão ver Nicholls e Ferguson, 2002](#)) (Figura 10). O complexo I (NADH: ubiquinona oxidoreductase), oxida o NADH, oriundo principalmente do ciclo de Krebs, enquanto o complexo II (succinato desidrogenase) oxida o succinato. Ambos os complexos transportam seus elétrons para a ubiquinona (Coenzima Q), uma molécula hidrofóbica que se localiza entre os fosfolípidos da membrana interna mitocondrial. Da ubiquinona (Ub), estes elétrons são transportados para o complexo III (ubiquinol: ferricitocromo c oxidoreductase), posteriormente para o citocromo c e por fim para o complexo IV (citocromo c oxidase) onde o O<sub>2</sub> será completamente reduzido a H<sub>2</sub>O ([para revisão ver Saraste, 1999](#)). A energia liberada durante o transporte de elétrons pela membrana mitocondrial interna é acoplada ao transporte de prótons da matriz para o espaço intermembrana. Pelo fato da membrana interna ser bastante impermeável aos prótons, é estabelecido um gradiente eletroquímico ([Mitchell, 1978](#)). Este gradiente possui dois componentes, sendo uma



química ( $\Delta pH$ ) e outra elétrica ( $\Delta\psi$ ), que juntas compõem a força próton-motriz ( $\Delta p$ ). A energia livre deste gradiente é então aproveitada pelo complexo V ( $F_1F_0$ -ATP sintase) para sintetizar ATP a partir de ADP e  $P_i$  (Mitchell, 1961), acoplando, assim, o consumo de  $O_2$  à síntese de ATP (Figura 10).

Apesar da maior parte dos prótons retornar à matriz mitocondrial através da  $F_1F_0$ -ATP sintase, permitindo o aproveitamento da energia livre do  $\Delta p$  para a síntese de ATP, os prótons podem também seguir caminhos alternativos, dissociando a respiração da síntese de ATP. Assim, nesta situação, diz-se que o consumo de  $O_2$  está desacoplado da síntese de ATP. Este desacoplamento pode ocorrer farmacologicamente, através de agentes desacopladores como o 2,4 dinitrofenol (DNP) que, por ser um ácido fraco e solúvel em lipídeos, é protonado no espaço intermembrana e desprotonado ao alcançar a matriz mitocondrial, desfazendo assim o  $\Delta\psi_m$  (Brand, 2000). Além disso, o consumo de  $O_2$  desacoplado da síntese de ATP pode ocorrer fisiologicamente através das chamadas proteínas desacopladoras (UCP) (para revisão ver Krauss e cols., 2005) (Figura 10).



**Figura 10. Esquema representativo da fosforilação oxidativa mostrando os componentes da membrana interna mitocondrial. Os complexos I e II doam os elétrons para a ubiquinona (Ub) que os passa para o complexo III. Deste complexo, os elétrons são encaminhados para o citocromo c (Cyt c), e chegam ao complexo IV, onde reduzem o  $O_2$  a  $H_2O$ . Os complexos I, III e IV transportam prótons da matriz para o espaço intermembrana contribuindo para o aumento do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\mu_{H^+}$ ). Durante a respiração há o escape de elétrons da cadeia gerando espécies parcialmente reduzidas de  $O_2$  ( $O_2^{\cdot-}$ ). A  $F_1F_0$ -ATP sintase e a UCP são capazes de transportar estes prótons de volta para a matriz. Figura adaptada de [Brownlee, 2001](#).**

---

## 1.5 O sistema de transporte de elétrons.

### 1.5.1 Os carreadores de elétrons

A redução do  $O_2$  a água pelos tecidos, processo conhecido como respiração, não ocorre através da reação direta deste gás com os diversos metabólitos. Ao contrário, a transferência de elétrons e prótons procede a partir de alguns substratos reduzidos, como o NADH, o succinato, o glicerol 3-fosfato e ácidos graxos, para complexos enzimáticos específicos, numa reação orquestrada, partindo sempre de complexos enzimáticos de menor potencial redox para os de maior potencial redox ([para revisão ver Brand, 2000](#)). Os elétrons provenientes destes substratos reduzidos convergem na ubiquinona (Ub). Com esta visão de que a Ub representa o ponto de encontro dos elétrons, o termo cadeia transportadora de elétrons (CTE) será preterido a favor do termo sistema transportador de elétrons (STE) (Figura 11).

Os primeiros centros redox foram descritos ainda no século XIX e foram caracterizados primeiramente como pigmentos presentes em diversos organismos por um pesquisador chamado MacMunn ([Keilin, 1925](#)). Segundo a sua descrição da época “estes pigmentos eram encontrados em todo o reino animal,..., em vários tecidos era encontrada uma classe de pigmentos cujo espectro de absorção mostrava-se muito semelhantes entre si,..., Suas bandas eram intensificadas

por agentes redutores e eram enfraquecidas quando agentes oxidantes eram adicionados,..., Eram, portanto, respiratórios”<sup>2</sup>. Assim, alguns anos mais tarde, um pesquisador britânico chamado David Keilin, cunhou o termo citocromo. Utilizando um microespectrofotômetro um tanto rudimentar, analisou estes pigmentos em vários organismos (Keilin, 1925), graças às características distintas dos citocromos, que absorvem muito bem no espectro visível devido ao seu grupo prostético, o heme.

De forma geral, a mitocôndria possui três classes distintas de citocromos, chamados de *a*, *b* e *c*, que diferem pela presença dos grupamentos laterais presentes nos heme *a*, *b* e *c*. Pelas suas características físico-químicas os citocromos são capazes de absorver a luz visível diferentemente, dependendo do seu estado de oxi-redução (Sacktor, 1965). Quando reduzidos, os citocromos *a*, *b* e *c* apresentam um pico de absorção, respectivamente, nos comprimentos de onda de 605 nm, 563 nm e 550 nm. Embora os citocromos *b* e *a* façam parte, respectivamente, dos complexos III e IV, que são ancorados à membrana interna, o citocromo *c* é uma hemoproteína que se encontra associada ao folheto externa da membrana mitocondrial interna, basicamente por interações fracas com o fosfolípido cardiolipina, sendo, portanto bastante móvel. (para revisão ver Orrenius, 2004). Mais recentemente, com o desenvolvimento da espectroscopia de ressonância eletrônica paramagnética (EPR) os centros ferro/enxofre (Fe/S) puderam ser caracterizados. Estes centros estão contidos em algumas proteínas da cadeia transportadora de elétrons e transportam apenas um elétron (Nicholls e Ferguson, 2002). Um outro carreador de elétrons muito importante é a Ub que, assim como o citocromo *c*, é bastante móvel, embora seja extremamente hidrofóbica, transportando elétrons através dos fosfolípidos da membrana interna e conectando os complexos I, II, G3P-desidrogenase e flavoproteína

---

<sup>2</sup> “Thus from echinoderms to man throughout the animal kingdom, we find in various tissues a class of pigment whose spectra show a remarkable resemblance to each other,... ,Their bands are intensified by reducing agents and enfeebled by oxidizing agents; they accordingly appear to be capable of oxidizing and reduction and are therefore respiratory.” (Keilin, 1925).

transferidora de elétrons (ETF)-ubiquinona oxidoreductase ao complexo III. Sua hidrofobicidade é consequência de uma cadeia de poliisopreno de aproximadamente 50 carbonos ligada covalentemente a uma quinona (Nicholls e Ferguson, 2002). Ao contrário dos citocromos e dos centros Fe/S, a UQ pode ser reduzida por  $2H^+ + 2e^-$ , gerando sua forma totalmente reduzida chamada de ubiquinol (UQH<sub>2</sub>). No entanto, a Ub pode ser parcialmente reduzida gerando a ubisemiquinona (UQ<sup>•-</sup>).

### **1.5.2 A oxidação dos substratos reduzidos do metabolismo convergem na redução da ubiquinona.**

A respiração tem início com a entrada de elétrons na cadeia transportadora pelo complexo I através da oxidação de NADH e pelo complexo II através da oxidação de succinato, ambos gerados no ciclo de Krebs (para revisão ver Brand, 2005). Um outro sítio de entrada de elétrons na cadeia transportadora é através da oxidação de glicerol 3-fosfato (G3P), mediado pela enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (G3PDH), que utiliza tanto o G3P proveniente da conversão de dihidroxicetona fosfato (DHAP) à G3P pela via glicolítica quanto o G3P oriundo da mobilização de triacilglicerol (Chowdhury e cols., 2005). A ETF:ubiquinona oxidoreduase transfere os elétrons provenientes da oxidação de ácidos graxos. Assim, os elétrons oriundos dos complexos I, II, G3PDH e da ETF são em última análise utilizados para a redução da Ub (Figura 11).

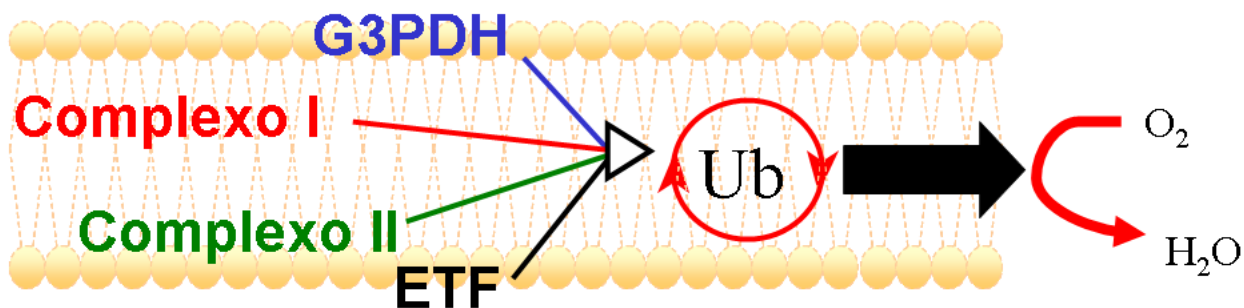


Figura 11. Figura representativa mostrando a ubiquinona (Q) como ponto de convergência dos elétrons provenientes do sistema transportador de elétrons (STE). G3PDH, glicerol 3-fosfato desidrogenase; ETF, flavina transferidora de elétrons: ubiquinona oxidoreductase. Figura adaptada de [Gnaiger, 2009](#).

O complexo I ou NADH:ubiquinona oxidoreductase de eucariotos é extremamente complexo, contendo 45 subunidades resultando numa massa molecular aparente de aproximadamente 1 MDa ([Carroll e cols., 2006](#); para revisão ver [Friedrich e Bottcher, 2004](#)). Este complexo multimérico catalisa a transferência de dois elétrons do NADH para a Ub, acoplando este processo à transferência de quatro prótons da matriz para o espaço intermembrana (Figura 10) (para revisão ver [Brand, 2005](#)). O transporte de elétrons no complexo I pode ser bloqueado por alguns inibidores como a rotenona, o amital ou a piericidina, impedindo a passagem de elétrons dos centros Fe/S para a Ub. O transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana promove uma diferença de carga entre os dois compartimentos, sendo que há um acúmulo de cargas positivas no espaço intermembrana, tornando-o mais positivo em relação à matriz. O mecanismo pelo qual o complexo I acopla a oxidação de NADH ao transporte de prótons através da membrana interna só foi proposto recentemente através da resolução da estrutura completa do complexo I de *Thermus thermophilus* ([Efremov e cols., 2010](#)).

A succinato desidrogenase (SDH), também chamada de complexo II, é a única enzima do ciclo de Krebs associada à membrana mitocondrial interna. Desta maneira os elétrons provenientes da oxidação do succinato à fumarato no ciclo de Krebs também contribuem para o “*pool*” de elétrons da fosforilação oxidativa. A estrutura desta enzima foi determinada em 2003 (Hederstedt, 2003 *apud* Yankovskaya e cols., 2003) evidenciando seu grau de complexidade. Ela possui quatro subunidades, das quais duas são integrais de membrana, enquanto que as outras duas estão voltadas para a matriz mitocondrial (Hederstedt, 2003). As subunidades voltadas para a matriz possuem moléculas de FAD<sup>+</sup> ligadas covalentemente e também possuem três centros Fe/S. É importante ressaltar que a redução da Ub pela oxidação de succinato não está associada ao transporte de prótons para o espaço intermembrana (Hederstedt, 2003), como acontece no complexo I (Figura 10). O complexo II pode ser inibido pelo substrato análogo, o malonato, que se liga competitivamente à porção flavoproteica da enzima (Scheffler, 2008).

A glicerol 3-fosfato desidrogenase (G3PDH) possui duas isoformas, uma citosólica (cG3PDH) e outra mitocondrial (mG3PDH). A mG3PDH está acoplada à membrana interna mitocondrial voltada pra o espaço intermembrana (Klingenberg, 1970). A atividade desta enzima está intimamente associada à oxidação do NADH citossólico proveniente da via glicolítica, regenerando o “*pool*” NAD<sup>+</sup> da glicólise. A mG3PDH juntamente com a cG3PDH, fazem parte de um conhecido atalho metabólico que interconverte G3P à dihidroxicetona fosfato, transferindo os equivalentes redutores da glicólise para a cadeia transportadora de elétrons (Chowdhury e cols., 2005). A mG3PDH não está presente em todos os tecidos de mamíferos e possui uma baixa atividade na maioria dos tecidos em que se encontra, resultando numa baixa atividade deste atalho metabólico além de um menor fluxo glicolítico (Chowdhury e cols., 2005). No entanto, sabe-se que em insetos a atividade da mG3PDH é bastante alta (Estabrook e Sacktor, 1958). Existem alguns inibidores descritos que impedem o funcionamento da G3PDH, tanto

indiretamente, como o versene ([Estabrook e Sacktor, 1958](#)), quanto diretamente, como o oleato de sódio ([Chowdhury e cols., 2005](#); [Drahota e cols., 2002](#)).

Os elétrons provenientes dos complexos I e II ou da G3PDH reduzem a ubiquinona (Ub) gerando o ubiquinol (UbH<sub>2</sub>) (Figura 11). O complexo que catalisa a transferência dos elétrons do UbH<sub>2</sub> para o citocromo *c* é o complexo III, também chamado de ubiquinol: citocromo *c* oxidoreductase. O transporte de elétrons do UbH<sub>2</sub> para o citocromo *c* está acoplado ao transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna, que ocorre durante o ciclo Q ([para revisão ver Hunte e cols., 2003](#)).

### 1.5.3 O ciclo Q

A estrutura do complexo III mostrou que este é um dímero, cujas subunidades são incapazes de funcionar independentemente ([para revisão ver Saraste, 1999](#)). Os centros redox deste complexo são compostos por grupamentos 2Fe/2S localizados numa porção conhecida como *Rieske*, um citocromo *b*, que possui dois grupamentos heme do tipo *b* (*b<sub>L</sub>* e *b<sub>H</sub>*) e pelo citocromo *c<sub>1</sub>*. A presença de dois sítios ativos no complexo III é uma característica essencial para o funcionamento do ciclo Q ([para revisão ver Saraste, 1999](#)). Um dos sítios é responsável pela oxidação de dois UbH<sub>2</sub> e pelo transporte de prótons para o espaço intermembrana (Figura 12) e se localiza próximo ao lado citoplasmático da membrana interna (Q<sub>p</sub>). O outro sítio é responsável por reduzir a Ub, captando elétrons do lado interno da membrana e está localizado próximo ao lado da matriz (Q<sub>n</sub>) (Figura 12). Pelo fato de a UbH<sub>2</sub> doar dois elétrons e os citocromos serem reduzidos por apenas um implica que essa transferência de elétrons, do UbH<sub>2</sub> para o complexo III, seja bifurcada. Sendo assim, um dos elétrons será transferido para o centro Fe-S do *Rieske*, reduzindo o citocromo *c<sub>1</sub>* e depois o citocromo *c*, e o outro elétron será

transferido para o heme  $b_L$  do citocromo b (para revisão ver Saraste, 1999). No primeiro passo, um  $UbH_2$  será oxidado no sítio Qp da membrana e um dos seus elétrons é transferido para o *Rieske* e o outro para o heme  $b_L$ . No segundo passo, os elétrons transferidos para *Rieske* alcançam o citocromo  $c_1$  e depois o citocromo  $c$ . No terceiro, e último, passo, os elétrons do heme  $b_L$  do citocromo  $b$  serão transferidos para o heme  $b_H$ , que reduzirão a  $Ub$  à ubisemiquinona ( $UQ\cdot^-$ ) (Figura 12). No entanto, para completar o ciclo, um segundo  $UbH_2$  precisa ser oxidado no sítio Qp e a oxidação deste, leva à redução do heme  $b_H$  que reduzirá a  $UQ\cdot^-$  a  $UbH_2$ , recomeçando o ciclo (para revisão ver Hunte e cols., 2003) (Figura 12).

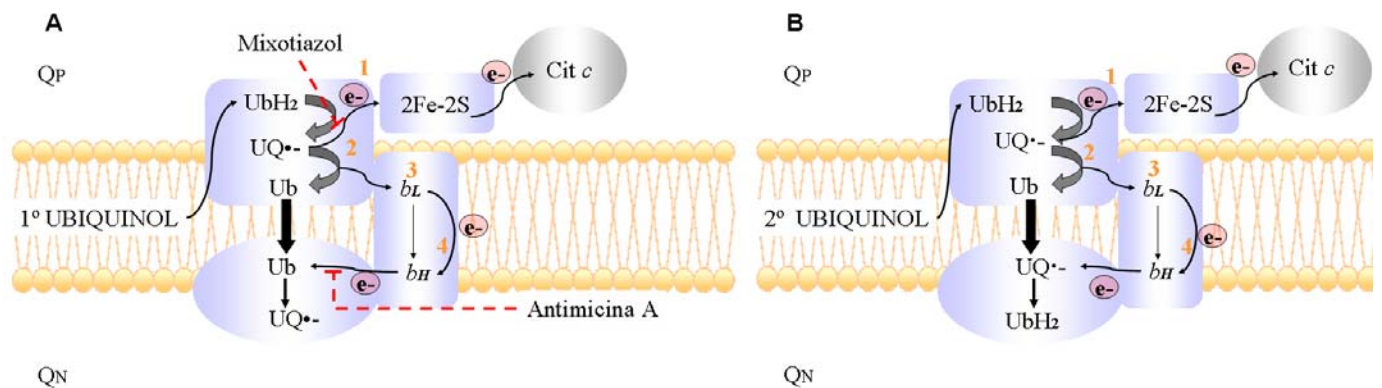


Figura 12. O ciclo Q e o transporte de elétrons do  $UbH_2$  para o citocromo  $c$ . (A) Um dos elétrons do  $UbH_2$  (círculos vermelhos) reduz diretamente o citocromo  $c_1$  (não indicado na figura) e é transferido para o citocromo  $c$  (1). O outro elétron (círculos rosa) percorre um caminho pelo complexo III, já bem definido (2), reduzindo o heme  $b_L$  do citocromo  $b$  (3) e depois o heme  $b_H$  (4) até reduzir novamente a ubiquinona ( $Ub$ ), formando o radical ubisemiquinol ( $UQ\cdot^-$ ). (B) Com a chegada de outra molécula de  $UbH_2$  os mesmos passos descritos acima ocorrem; no entanto, o elétron proveniente do heme  $b_L$  (4) reduz o radical  $UQ\cdot^-$  formado no passo anterior gerando  $UbH_2$ , fechando o ciclo. As setas tracejadas indicam os sítios de inibição das drogas capazes de inibir o complexo III. Figura adaptada de Nicholls e Ferguson, 2002.

Existem dois motivos fundamentais para que a passagem de elétrons seja bifurcada do  $UbH_2$  para os citocromo  $c_1$  e citocromo  $b$ . O primeiro, e o mais evidente, é o fato da  $Ub$  ser reduzida por dois elétrons e dois prótons, enquanto o citocromo  $c$  por apenas um elétron. O outro



motivo é estrutural, uma vez que o centro *Rieske* Fe/S do complexo III é móvel e se direciona ao citocromo *c* para reduzi-lo, retornando em seguida para o sítio Q<sub>p</sub> (Zhang e cols., 1998). Assim, no momento em que o centro *Rieske* Fe/S está próximo ao citocromo *c*, ele encontra-se muito distante do sítio Q<sub>p</sub> para receber o outro elétron da UbH<sub>2</sub>. Deste modo, este outro elétron não tem outro caminho a seguir se não reduzir o citocromo *b<sub>L</sub>* (Zhang e cols., 1998). Alguns inibidores são capazes de bloquear a transferência de elétrons nos diferentes pontos do ciclo Q, como a antimicina A, o mixotiazol e a estigmatelina (Figura 12).

Do citocromo *c* os elétrons são finalmente transferidos para o complexo IV, também conhecido por ferrocitocromo *c*: O<sub>2</sub> oxidoreductase ou ainda citocromo *c* oxidase (COX). A COX de mamíferos é um complexo protéico composto por 13 subunidades que catalisam a reação de transferência de elétrons do citocromo *c* reduzido para o O<sub>2</sub>, reduzindo-o a duas moléculas de água. O mecanismo de transporte de elétrons do citocromo *c* reduzido para o O<sub>2</sub> está acoplado ao transporte de prótons da matriz mitocondrial para o espaço intermembrana (para revisão ver Papa e cols., 2004). Para tanto, conta com dois centros de cobres (Cu<sub>A</sub> e Cu<sub>B</sub>) e dois citocromos, *a* e *a<sub>3</sub>*. O ferro do citocromo *a<sub>3</sub>* possui uma de suas coordenações livres, o que permite a ligação do O<sub>2</sub>, enquanto o citocromo *a* é incapaz de ligar-se ao O<sub>2</sub> (para revisão ver Saraste, 1999). Assim como outras heme-cobre oxidases, a COX conserva a energia livre disponibilizada durante a redução do O<sub>2</sub> à H<sub>2</sub>O acoplando a formação do Δp (para revisão ver Papa e cols., 2004). Algumas moléculas são capazes de se ligar no mesmo sítio que o O<sub>2</sub>, inibindo ou modulando a atividade da COX, como faz o cianeto (CN<sup>-</sup>), o monóxido de carbono (CO) e o óxido nítrico (NO). Este último é capaz de se ligar reversivelmente ao ferro do citocromo *a<sub>3</sub>*, o que torna o NO um importante modulador da atividade deste complexo (Cleeter e cols., 1994).

## 1.6 A fosforilação oxidativa

Segundo a teoria quimiosmótica, proposta pelo pesquisador britânico Peter Mitchell, a energia livre derivada da diferença de concentração de prótons e carga entre o espaço intermembrana e a matriz mitocondrial, a chamada força próton-motriz ( $\Delta p$ ), representa o mecanismo pelo qual ocorre a síntese de ATP (Mitchell e Moyle, 1967). Esta síntese seria promovida pela dissipação do  $\Delta p$  através da passagem de prótons por um complexo enzimático chamado  $F_1F_0$ -ATP sintase (Mitchell e Moyle, 1967). Posteriormente, um conjunto de evidências demonstradas ao longo dos anos pelos grupos dos pesquisadores Paul Boyer e John Walker (Abrahams e cols., 1994; Stock e cols., 1999; para revisão ver Boyer, 2002) propôs que a síntese de ATP pela  $F_1F_0$ -ATP sintase ocorreria por um mecanismo cooperativo, envolvendo mudanças conformacionais alternadas nas subunidades  $\beta$  desta enzima, promovidas pela passagem de prótons através deste complexo (para revisão ver Boyer *et al.*, 1997). A  $F_1F_0$ -ATP sintase, ou ainda complexo V, é um complexo enzimático que pode ser funcionalmente reversível, visto que ela pode ser capaz de sintetizar ATP, usando para isso a  $\Delta p$ , quanto pode hidrolisar ATP bombeando prótons contra o gradiente eletroquímico, como fazem os complexos I, III e IV (Almeida e cols., 2001). Com o avanço das técnicas de cristalização de proteínas e resolução estrutural atômica por difração de raios-x, foi possível determinar a estrutura da  $F_1F_0$ -ATP sintase (Abrahams e cols., 1994). Sabe-se hoje que esta enzima possui dois grandes domínios: a  $F_0$ , inserida na membrana interna mitocondrial, e a  $F_1$ , catalítica, voltada para a matriz mitocondrial e composta por cinco subunidades diferentes -  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  e  $\epsilon$  (para revisão ver Saraste, 1999). A dissipação da  $\Delta p$  ocorre pela porção  $F_0$ , através da protonação de suas subunidades que impõem um movimento de rotação a esta porção (para revisão ver Boyer, 1997; Noji e cols., 1997). O movimento rotacional da porção  $F_0$  é transferido, por meio de mudanças conformacionais, às subunidades  $\beta$  da porção  $F_1$ , através da rotação da subunidade  $\gamma$ . Como as

interações entre a subunidade  $\gamma$  e cada uma das três subunidades  $\beta$  são distintas, as rotações da subunidade  $\gamma$  fazem com que cada uma das subunidades  $\beta$  adote uma das três conformações descritas na catálise de ATP: aberta, frouxa e fechada ([para revisão ver Boyer, 1997](#)). Quando uma subunidade  $\beta$  adota a conformação aberta, ocorre a liberação do ATP da enzima, enquanto a subunidade  $\beta$  vizinha adota a conformação frouxa, ligando ADP e  $P_i$ , e a terceira subunidade  $\beta$  encontra-se na conformação fechada, expulsando  $H_2O$ , permitindo a síntese de ATP ([para revisão ver Boyer \*et al.\*, 1970 e Boyer, 2002](#)).

Na maioria dos tecidos de mamíferos diz-se que o consumo de  $O_2$  e a síntese de ATP são processos acoplados. Isto significa que a inibição do STE por rotenona, antimicina A ou cianeto, por exemplo, são capazes de inibir a síntese de ATP. Por outro lado, inibidores da ATP sintase, como a oligomicina ou a azida, são capazes de reduzir drasticamente o consumo de  $O_2$ . A teoria quimiosmótica explica a dependência do fluxo de elétrons para que haja a síntese de ATP. Quando o retorno dos prótons à matriz é impedido por inibidores da ATP sintase, o fluxo de elétrons e o concomitante transporte de prótons para o espaço intermembrana prosseguem, até que a  $\Delta p$  esteja tão alto (já que os prótons não retornam mais para matriz), que a energia necessária para transportar mais prótons para o espaço intermembrana se iguala ou excede a energia livre disponibilizada durante a transferência de elétrons do NADH ao  $O_2$ . Deste modo, o fluxo de elétrons é reduzido, assim como o consumo de  $O_2$  ([Nicholls e Ferguson, 2002](#)). O mesmo é verdadeiro quando o fluxo de elétrons é impedido, pois não há transporte de prótons, condição absolutamente necessária para a síntese de ATP. Isto explica porque na presença de ADP e  $P_i$  (respiração em estado 3) o consumo de  $O_2$  é alto, enquanto na ausência de ADP e  $P_i$  (respiração em estado 4) o consumo de  $O_2$  é mais baixo. Desta maneira, a  $\Delta p$  não só regula a síntese de ATP, como também regula a velocidade de transferência de elétrons pela membrana mitocondrial interna.

Em algumas situações fisiológicas onde há uma redução dos níveis de ATP ou mesmo em alguns tipos celulares, a rotação da porção  $F_0$  da ATP sintase não ocorre no sentido canônico, onde o retorno dos prótons à matriz está associado à síntese de ATP. Nestas condições, a ATP sintase pode funcionar no sentido reverso, hidrolizando ATP e transportando os prótons da matriz para o espaço intermembrana (Almeida e Bolanos, 2001). Embora este funcionamento reverso possa parecer estranho, é de fundamental importância para a manutenção do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) evitando, por exemplo, a ativação de mecanismos envolvidos com a apoptose (Almeida e Bolanos, 2001).

O estudo *in vitro* do estado redox dos componentes da cadeia transportadora de elétrons<sup>3</sup> possibilitou a identificação dos estados metabólicos mitocondriais descritos por Chance e Williams, 1955 (Figura 13). O estado 1 é um estado basal, onde a mitocôndria isolada ainda tem um pouco de substrato endógeno que é incapaz de promover a redução plena de  $NAD^+$ . A adição de ADP no estado 1, leva a oxidação completa dos substratos endógenos levando a respiração para o estado 2, que é caracterizada pela presença de ADP e ausência de substratos o consumo de oxigênio observado é residual. A subsequente adição de substratos no estado 2, leva a mitocôndria para o estado 3. Neste estado, ocorre um aumento significativo da oxidação de NADH que é acompanhado do aumento do consumo de  $O_2$  e da síntese de ATP, e é considerado o estado da **fosforilação oxidativa (P)**, na Figura 13). Quando todo o ADP é fosforilado a ATP, tem-se início o estado 4 que é marcado por uma diminuição no consumo de  $O_2$ . A respiração observada neste estado reflete a permeabilidade natural da membrana interna aos prótons do espaço intermembrana, sendo assim este estado é comumente chamado de **leak** (do inglês, vazamento; **L**, na Figura 13). A adição de mais ADP no estado 4 induz novamente ao estado 3. À

---

<sup>3</sup> Neste parágrafo me refiro a cadeia transportadora de elétrons (CTE) ao invés de sistema transportador de elétrons (ETS), pois Chance e Williams estimularam apenas um dos complexos para descrever os estados metabólicos mitocondriais. Deste modo, não faria sentido pensar na Ub como ponto de convergência dos elétrons dos diversos complexos. ETS faz sentido quando estimulamos a respiração com múltiplos substratos.

medida que o  $O_2$  vai sendo consumido, a concentração de  $O_2$  no meio diminui progressivamente chegando ao estado de anóxia, estabelecendo, portanto, o estado 5.

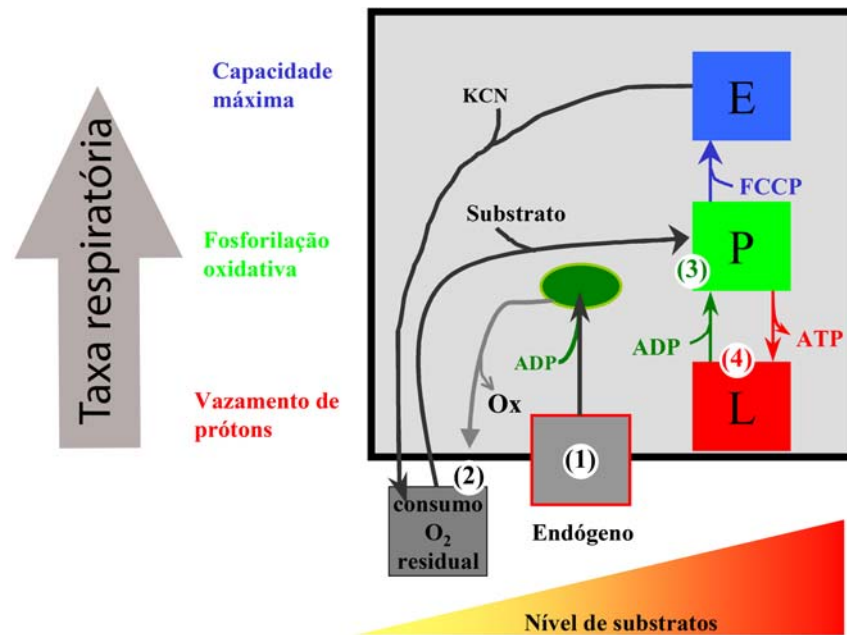


Figura 13. Representação esquemática dos estados metabólicos mitocondriais descritos por **Chance e Williams, 1955**. O eixo (x) representa a quantidade de substrato, que aumenta da esquerda para a direita. O eixo (y) representa a taxa respiratória e os estados metabólicos mitocondriais. Estado 1 = baixa concentração de substratos e de ADP, respiração lenta. Estado 2 = Adição de ADP que por sua vez depleta os níveis de substratos respiratórios endógenos, respiração lenta, cujo componente limitante são os substratos respiratórios. Estado 3 = Adição de substratos, respiração acelerada, o componente limitante é a fosforilação oxidativa (P). Estado 4 = Esgotamento do ADP que foi completamente esterificado como ATP. O estado 4 pode ser alcançado com a adição de oligomicina, inibidor da ATP sintase. Este estado pode ser chamado de *leak* (L). O estado que avalia a capacidade máxima respiratória, sem o limitante da fosforilação oxidativa, é alcançado com a adição do ionoforo de prótons FCCP (E) (**Gnaiger, 2009**).

É interessante ressaltar que na própria definição dos estados mitocondriais descrita por Chance e Williams, o estado 3 (embora não seja limitado pelos substratos), é limitado pela própria fosforilação oxidativa. Sendo assim, este estado não é usado para avaliar a **capacidade máxima respiratória** que é alcançada pela adição de drogas que desacoplam a respiração da síntese de ATP como, por exemplo, o FCCP. Este estado não foi descrito por **Chance e Williams, 1955**.

### 1.7 O vazamento de elétrons e a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS).

A maior parte do  $O_2$  consumido pela célula (mais de 90 %) é completamente reduzida a  $H_2O$  pela citocromo c oxidase. No entanto, de 0,1 até 4% do total de  $O_2$  consumido pela mitocôndria é reduzido parcialmente (Nicholls & Ferguson, 2002), gerando espécies reativas de oxigênio (ROS) (Figura 14).

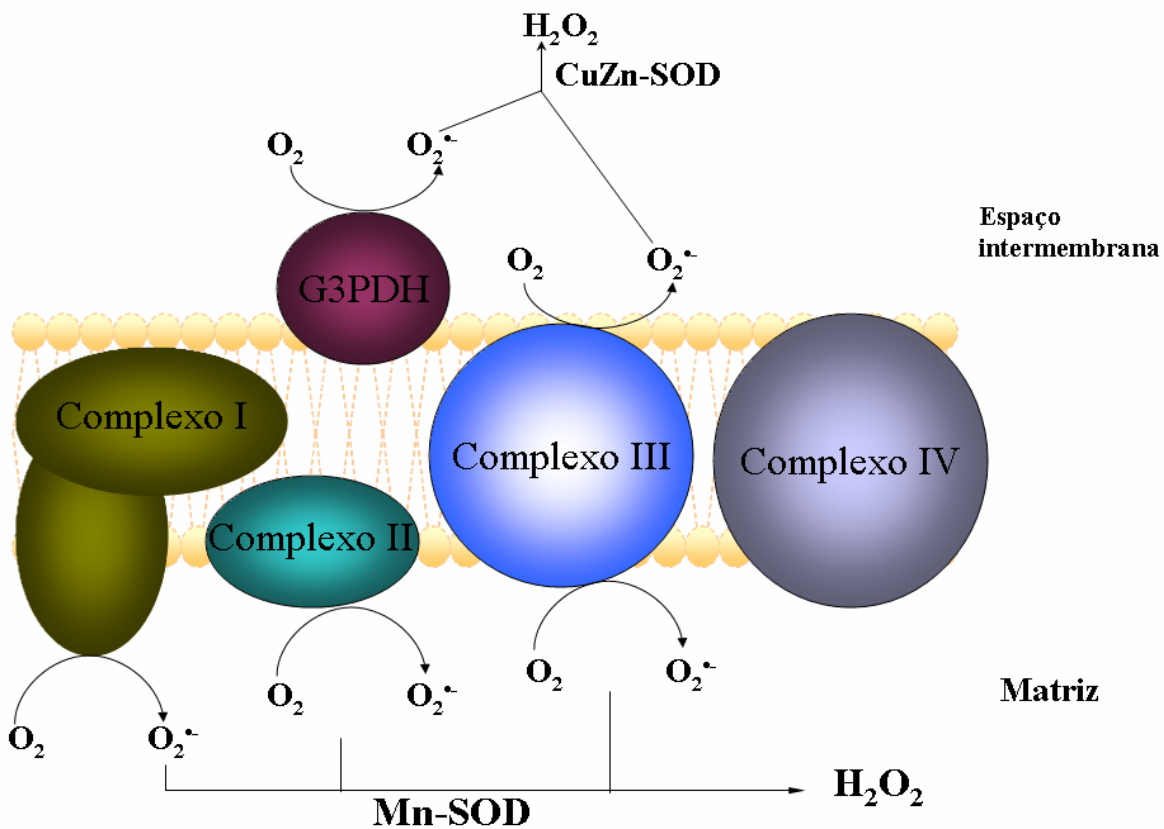


Figura 14. O vazamento de elétrons no STE e a geração de ROS. Diversos complexos do sistema transportador de elétrons são capazes de reduzir parcialmente o  $O_2$ , gerando o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ). Este radical pode ser convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela ação das isoformas da superóxido dismutase (Mn-SOD e CuZn-SOD). Figura adaptada de Turrens, 2003.

A redução parcial do  $O_2$  pelos elétrons que são passados pelo STE gera o radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), um radical livre. Um radical livre pode ser definido como qualquer átomo ou

molécula que possua pelo menos um elétron desemparelhado em um orbital (Halliwell e Gutteridge, 1999). Na realidade, o STE é capaz de gerar não apenas radicais livres, como o  $O_2^{\cdot-}$ , mas também espécies reativas de  $O_2$  (ROS) como o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ). O termo ROS é utilizado para descrever não só espécies radicalares contendo um elétron desemparelhado no átomo de  $O_2$ , como o  $O_2^{\cdot-}$ , mas também espécies não-radicalares dotadas de alta reatividade, como é o caso do  $H_2O_2$  (Halliwell e Gutteridge, 1999). Pelo fato dos radicais livres possuírem elétrons desemparelhados, são dotados de alta reatividade, pois tendem a atingir a estabilidade doando ou removendo elétrons de biomoléculas adjacentes, como açúcares, lipídeos e proteínas, resultando na modificação destas. O acúmulo de biomoléculas danificadas por radicais livres está associado a uma infinidade de alterações funcionais nas células, como apoptose, mutações, inibição de atividades enzimáticas e estresse oxidativo (Halliwell e Gutteridge, 1999).

Os sítios da cadeia transportadora que estão associados ao vazamento de elétrons e a geração de  $O_2^{\cdot-}$  são basicamente os complexos I (Cadenas e cols., 1977; Turrens e Boveris, 1980), II (Gredilla e cols., 2001) e III (Boveris e cols., 1976; Cadenas e cols., 1977). A contribuição dos diversos complexos da cadeia transportadora depende da velocidade do fluxo de elétrons e do  $\Delta\psi_m$  (Boveris e Chance, 1973; Korshunov e cols., 1997). Deste modo, nos estados metabólicos mais ativos (estado 3 e desacoplado), o fluxo de elétrons é maior e a  $\Delta p$  menor, refletindo na menor geração de ROS (Boveris e Chance, 1973). Os complexos I e III são capazes de gerar grandes quantidades de  $O_2^{\cdot-}$  e  $H_2O_2$  (Boveris e Chance, 1973; Turrens e Boveris, 1980), principalmente quando a cadeia transportadora se encontra inibida (por antimicina A) e a mitocôndria desacoplada (por FCCP) (Boveris e Chance, 1973). Nesta situação, os elétrons não têm outro caminho a seguir senão reduzirem parcialmente o  $O_2$ , gerando  $O_2^{\cdot-}$  que será dismutado a  $H_2O_2$  pela atividade da enzima Mn- superóxido dismutase (Mn-SOD) (McCord e Fridovich, 1969).

A ubiquinona também possui uma participação muito grande na geração de  $H_2O_2$  (Boveris e cols., 1976). Na verdade, o ubiquinol ( $UbH_2$ ) e a ubisemiquinona ( $UQ^{\cdot-}$ ) são apontados como a maior fonte geradora de  $H_2O_2$  (Boveris e cols., 1976) na mitocôndria. A oxidação do  $UbH_2$  no sítio  $Q_p$  forma o radical  $UQ^{\cdot-}$  que, em algumas situações, pode doar seu elétron não enzimaticamente para o  $O_2$  reduzindo-o parcialmente. Ainda no sítio  $Q_p$ , a  $UQ^{\cdot-}$  é oxidada à  $UQ$  e os elétrons transportados para o citocromo  $b_L$ . No entanto, esta oxidação está intimamente associada ao transporte de prótons da matriz para o espaço intermembrana. Sendo assim, quanto maior for a  $\Delta p$ , menor será o transporte de  $H^+$  contra o gradiente, aumentando a meia-vida da  $UQ^{\cdot-}$ , e, por conseguinte, aumentando também a redução parcial do  $O_2$  a  $O_2^{\cdot-}$  (Korshunov e cols., 1997). Enquanto a geração de  $O_2^{\cdot-}$  pelo complexo III ocorre tanto para a matriz mitocondrial quanto para o espaço intermembrana e é altamente dependente da  $\Delta p$ , a geração de  $O_2^{\cdot-}$  pelo complexo I ocorre essencialmente para o espaço intermembrana e não depende da  $\Delta p$  (Turrens, 2003). Além disso, a inibição do complexo I pela rotenona é capaz de estimular a geração de  $O_2^{\cdot-}$  (St-Pierre e cols., 2002). Além dos complexos I e II, a G3PDH também é capaz de gerar  $H_2O_2$  sendo que em insetos sua contribuição na geração de  $H_2O_2$  é bastante significativa (Drahota e cols., 2002; Miwa e cols., 2003). A geração de ROS pela G3PDH é essencialmente citossólica, uma vez que o sítio ativo desta enzima está voltado para o espaço intermembrana (Miwa e cols., 2003). A COX catalisa a transferência seqüencial de quatro elétrons para o  $O_2$  e neste processo diversos intermediários são formados até que o  $O_2$  seja completamente reduzido à água. No entanto, pelo fato da COX ter alta afinidade por estes intermediários e não liberá-los até a formação de  $H_2O$ , ela não contribui para a geração de  $H_2O_2$  (Turrens, 2003; Nichols e Ferguson, 2002).

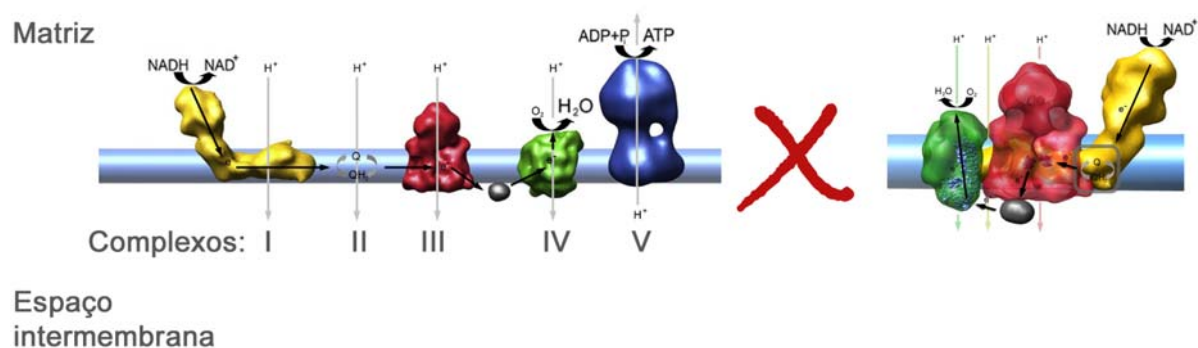
O grande avanço no campo da fisiologia mitocondrial se deve, em parte, à facilidade de obtenção de grandes quantidades de preparações mitocondriais provenientes de tecidos de



mamíferos, como fígado e coração, que permitiu o melhor entendimento da cadeia transportadora de elétrons, da fosforilação oxidativa e do mecanismo de síntese de ATP. No entanto, a ênfase dada a estes mecanismos em mamíferos pode ter de alguma forma, obscurecido sutilezas muito interessantes sobre as mitocôndrias de outros organismos como plantas, fungos, parasitas e insetos.

### 1.8 Os supercomplexos

A visão clássica de que a cadeia transportadora de elétrons funciona de fato como uma cadeia (Figura 15, painel A) onde um complexo enzimático é seguido do próximo e os elétrons são passados seqüencialmente através de um gradiente de eletronegatividade, não parece acontecer fisiologicamente (Gnaiger, 2009). Diversas evidências indicam que, no contexto celular, a mitocôndria opera com múltiplos substratos que convergem na redução da ubiquinona. Além disso, os complexos do STE não estão organizados de forma isolada na mitocôndria, mas sim formando organizações supramoleculares conhecidas por supercomplexos (Figura 15, painel B) (para revisão ver Boekema e Braun, 2007; Schagger e Pfeiffer, 2000). Os supercomplexos são conservados desde bactérias, fungos e plantas até mamíferos (Schagger, 2002; Schagger e Pfeiffer, 2000; Eubel e cols., 2004). Os componentes do STE que compõem os supercomplexos variam entre os tecidos e as espécies.



**Figura 15. O modelo sólido da cadeia transportadora de elétrons confrontado pelo modelo fluido, onde os complexos formam associações supramoleculares que variam entre os tecidos e as espécies mas que é conservado de bactérias a mamíferos. Os maiores supercomplexos possuem aproximadamente 2.100 kDa e envolvem a associação dos complexos I, III<sub>2</sub> e IV<sub>1-4</sub>. Figura adaptada de Vonck e Schafer, 2009.**

---

As associações entre os supercomplexos já descritas envolvem: i.) V<sub>2</sub>, dímeros do complexo V (ATP sintase na forma dimérica), ii.) I + III<sub>2</sub>, o complexo I associado a duas cópias do complexo III, iii.) III<sub>2</sub> + IV<sub>1-4</sub>, associação de duas cópias do complexo III com 1 a 4 cópias do complexo IV. E, finalmente a maior associação de supercomplexos iv.) I + III<sub>2</sub> + IV<sub>1-4</sub> (para revisão ver Boekema e Braun, 2007). Estas associações supramoleculares assumem pesos moleculares superiores a 1.500 kDa e podem ser facilmente isolados através de uma técnica conhecida por BN-PAGE (do inglês, blue-native polyacrylamide gel electrophoresis) (Wittig e cols., 2006). Devido ao fato da associação entre os complexos I + III<sub>2</sub> + IV<sub>1-4</sub> ser capaz de consumir oxigênio mesmo fora do contexto mitocondrial, os supercomplexos são conhecidos também como respirassomos (Schagger e Pfeiffer, 2000). A vantagem desta organização esta em aumentar a eficiência da fosforilação oxidativa, direcionar os substratos e reduzir o vazamento de elétrons.

### **1.9 O que sabemos sobre ROS e o sistema imune em invertebrados.**

O sistema imune de insetos é primordialmente inato (Lemaitre e Hoffmann, 2007) e vem sendo amplamente estudado em *Drosophila melanogaster* desde 1996, quando Lemaitre e colaboradores demonstraram que a via Toll, até então unicamente relacionada ao desenvolvimento dorso-ventral da mosca, também estava intimamente envolvida na defesa contra infecções (Lemaitre e cols., 1996). Estes dados chamaram atenção para o estudo do

sistema imune em invertebrados aonde os insetos vetores vêm recebendo, mais recentemente, bastante atenção e diversas moléculas homólogas às previamente descritas para *D. melanogaster* foram descritas também em *A. aegypti* (Waterhouse e cols., 2007) e *A. gambiae* (Waterhouse e cols., 2007).

O estudo do sistema imune destes insetos vetores é de grande relevância para o entendimento das interações entre o vetor e o patógeno, abrindo novas possibilidades de estratégias de controle. Diversos grupos se destacam no Brasil e no mundo estudando formas de controlar a transmissão de doenças por mosquitos vetores. Se pudéssemos categorizar estes estudos em dois grandes grupos estes seriam: i) a interação parasita-vetor, visando entender os mecanismos envolvidos na capacidade vetorial em conjunto ii) com o estudo de alvos moleculares que viabilizariam a geração de mosquitos transgênicos que são incompetentes em transmitir os patógenos. A interação destas duas principais frentes de pesquisa levou a geração de mosquitos transgênicos criados em laboratório que expressavam genes “anti-patógeno” e que, portanto seriam resistentes à infecção (Ito e cols., 2002). No entanto, as tentativas de estabelecer estas linhagens no campo vem enfrentando dificuldades técnicas e éticas.

Do ponto de vista do patógeno que tenta invadir o corpo do hospedeiro invertebrado o sistema imune do inseto é redundante, dotado de defesas que se sobrepõem (Dionne e Schneider, 2008). Estas defesas compreendem a atividade de peptídeos antimicrobianos, o processo de melanização e a ação microbicida das espécies reativas de nitrogênio (RNS) ou de oxigênio (ROS). As espécies reativas de nitrogênio, produzidas pela enzima citossólica oxido nítrico sintase (NOS), são uma importante defesa do mosquito *Anopheles gambiae* contra o *Plasmodium falciparum* (Gupta e cols., 2009) e o silenciamento da NOS por RNA de interferência (RNAi) aumenta a susceptibilidade do mosquito ao patógeno (Gupta e cols., 2009). Diversas reações celulares levam a produção de ROS sendo as mais estudadas, por serem induzidas na presença de

patógeno, as enzimas NADPH-oxidases (NOX) e as Dual-oxidases (DUOX) (Lambeth, 2004). Uma outra importante fonte de ROS que vem sendo negligenciada no contexto imune é a mitocôndria.

A geração de ROS pela mitocôndria pode significar até 4% de todo o O<sub>2</sub> consumido pela célula (Nichols e Fergunson, 2002). Embora a geração exacerbada de ROS possa ser extremamente tóxica para a célula, a produção destas mesmas moléculas em níveis controlados desempenha um papel crucial na sinalização celular (Murphy, 2009) e na competência vetorial (Molina-Cruz e cols., 2008). No entanto, nada se sabe sobre a contribuição das espécies reativas geradas pela mitocôndria no contexto da resposta imune em insetos.

### **1.9.1 Nada é de graça: O custo energético de um sistema imune hiper eficiente.**

A razão pela qual um inseto infectado por um patógeno morre é pouco estudada e muito se deve à carência de parâmetros fisiológicos que atestem se este está ou não “doente”. O principal diagnóstico atualmente consiste em registrar a sobrevivência dos insetos infectados, sem saber ao certo os mecanismos que levam este à morte. Sabe-se que a infecção por bactérias ou fungos causa uma alta mortalidade em *D. melanogaster* (Dionne e Schneider, 2008). Do mesmo modo, os mosquitos *A. gambiae* e *A. aegypti* têm sua sobrevivência significativamente reduzida após a infecção por bactérias gram positivas e negativas (Magalhaes e cols., 2010; Molina-Cruz e cols., 2008). A geração de ROS/RNS e os componentes celulares do sistema imune do mosquito desempenham um papel crucial no combate à infecção (Peterson e cols., 2007; Molina-Cruz e cols., 2008). No entanto, os mecanismos envolvidos na resposta dos insetos a uma infecção e sua contribuição na mortalidade destes insetos ainda é desconhecida.

Assim como em mamíferos, a via de sinalização da insulina é um importante marcador da severidade da infecção (Dionne e cols., 2006; Van den Berghe e cols., 2009). Moscas infectadas pela bactéria intracelular *Mycobacterium marinum* apresentam um defeito nesta via que leva a redução dos níveis sistêmicos de insulina. Isso culmina num fenótipo onde as moscas exibem uma alta mortalidade, pois tem seus estoques energéticos reduzidos (Dionne e cols., 2006). Além disso, os níveis sistêmicos de insulina destas moscas podem ser reduzidos através da superexpressão da via Toll especificamente no corpo gorduroso (importante órgão do sistema imune e de estoque de lipídeos), induzindo um remodelamento metabólico que prioriza o combate à infecção ao invés do crescimento (Diangelo e cols., 2009).

Um conceito muito interessante que surge é o custo energético que um sistema imune eficiente demanda. Neste contexto, a seleção de moscas ao longo de dez gerações triadas pela resistência à infecção por *Pseudomonas aeruginosa* culminou em insetos 70% mais resistentes a este patógeno. Contudo, as fêmeas selecionadas, além de apresentarem diminuição na longevidade, exibiam uma postura de ovos reduzida (Ye e cols., 2009). O custo energético da ativação do sistema imune também é observado na linhagem L3-5 do mosquito *A. gambiae* resistente à infecção pelo *P. falciparum*. Esta linhagem apresenta fecundidade reduzida em relação à linhagem controle e a alimentação com sangue induz mais precocemente a expressão dos genes relacionados às defesas antioxidantes (DeJong e cols., 2007; Kumar e cols., 2003). Além disso, nestes mosquitos resistentes, os transcritos para diversos genes relacionados ao metabolismo energético, em especial aqueles que compõem o STE, estão aumentados. Portanto, este conjunto de dados salienta que a mitocôndria deve participar da imunidade e sugere que o remodelamento energético após a infecção, fruto de uma disfunção mitocondrial, pode ser uma característica ancestral compartilhada por insetos e mamíferos (Singer e cols., 2004; Singer, 2008).

### 1.10 A hematofagia como um desafio.

A hematofagia parece ter surgido independentemente em vários organismos e representa uma importante adaptação para as espécies que a desenvolveram, principalmente para os artrópodes, que são o grupo com o maior número de espécies do planeta (Brusca e Brusca, 1990). A alimentação com sangue é bastante vantajosa, pois é uma fonte abundante e de alto valor nutricional, composta de proteínas e lipídeos, mas poucos carboidratos, fornecendo energia para a ovogênese, o crescimento e o desenvolvimento (Lehane, 1991; Romoser, 1996). A hemoglobina é a proteína mais abundante no sangue de mamíferos, atingindo uma concentração aproximada de 150 mg/mL, o que representa 60 % do conteúdo total de proteínas do sangue (para revisão ver Graca-Souza e cols., 2006) e sua digestão libera não apenas peptídeos e aminoácidos, mas também uma enorme quantidade de seu grupamento prostético, o heme. Uma vez livre, o heme pode exercer uma série de efeitos deletérios para as células (para revisão ver Ryter e Tyrrell, 2000). Por ser uma molécula anfifílica, pode particionar para a membrana celular causando a desestabilização da mesma, podendo culminar na lise celular (Schmitt e cols., 1993). O heme também é uma molécula pró-oxidante (Gutteridge e Smith, 1988), pois pode participar da decomposição de peróxidos orgânicos, contribuindo para a geração de ROS, como radicais alcóxil (RO $\cdot$ ) e peróxil (ROO $\cdot$ ) (van der Zee e cols., 1996). Em determinadas situações, quando o anel porfirínico do heme é degradado, ocorre a liberação do átomo de ferro central de sua estrutura. O ferro pode contribuir ainda mais para a geração de espécies radiculares altamente danosas, como o radical hidroxila (OH $\cdot$ ), através da reação de Fenton (Graca-Souza e cols., 2006).

Neste contexto, os insetos hematófagos apresentariam um cenário metabólico muito favorável ao estresse oxidativo, pois além de gerarem ROS como produto natural do metabolismo aeróbio mitocondrial, ainda liberam grandes quantidades de heme após a digestão, o que potencializaria esta condição.

Nosso grupo tenta entender os mecanismos adaptativos que os organismos hematófagos adquiriram para se defenderem da grande quantidade de sangue que ingerem. Diversos destes mecanismos já foram descritos: i.) No barbeiro *Rhodnius prolixus*, foi descoberta uma proteína capaz de ligar heme, a *Rhodnius* Heme Binding Protein (RHBP), minimizando os efeitos deletérios do heme quando livre (Oliveira e cols., 1995). ii.) Este inseto também é capaz de detoxificar o heme na forma de hemozoína, um cristal que é excretado junto das fezes (Oliveira e cols., 1999a). iii) Foi descrita também a atividade da enzima heme oxigenase (HO), que é capaz de degradar o heme, gerando como um de seus produtos a biliverdina (Paiva-Silva e cols., 2006). iv.) No caso do carrapato bovino *Boophilus microplus*, a maior parte do heme, derivado da digestão da hemoglobina, é agregado numa organela chamada hemossomo (Lara e cols., 2003). O carrapato também possui uma proteína, chamada Help, capaz de ligar o heme na hemolinfa diminuindo seus efeitos pró-oxidantes (Maya-Monteiro e cols., 2000; Maya-Monteiro e cols., 2004a.).

Um outro mecanismo proposto surgiu após a observação na literatura de que helmintos e parasitas de vida livre, após se alimentarem com sangue, mudam seu metabolismo do oxidativo para o fermentativo, como se a troca do metabolismo representasse uma espécie de defesa antioxidante preventiva (Oliveira e Oliveira, 2002). O racional desta hipótese, batizada pelo nosso grupo de “a hipótese dos vampiros”, baseia-se na idéia de que a redução da utilização de O<sub>2</sub> nas mitocôndrias dos organismos hematófagos diminuiria a geração de ROS justamente no

momento em que passariam a ingerir uma dieta altamente pró-oxidante, como é o sangue (Oliveira e Oliveira, 2002).

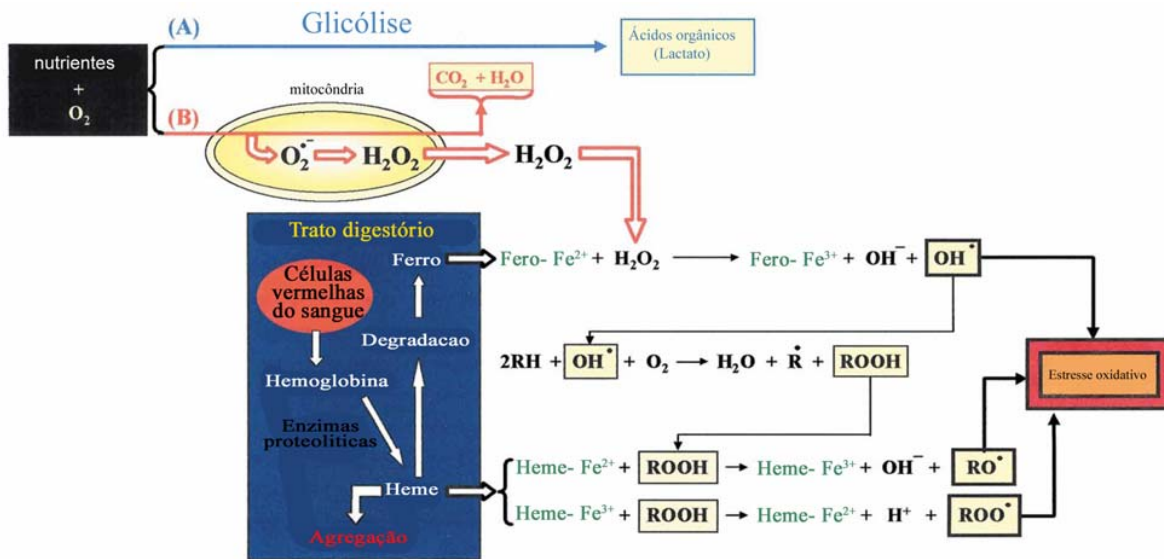


Figura 16. Resumo do metabolismo de parasitas hematófagos. Os nutrientes reduzidos do metabolismo podem ser completamente oxidados pela mitocôndria ou parcialmente oxidados através da via glicolítica. A respiração mitocondrial não é 100 % eficiente e gera como produto o  $H_2O_2$ . No entanto, nos organismos hematófagos a interação desta molécula com os produtos da digestão do sangue é potencialmente danosa uma vez que a reação do Ferro com o  $H_2O_2$  pode levar a geração do radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ) uma espécie reativa de  $O_2$  altamente tóxica e pode gerar um quando de estresse oxidativo. Adaptado de (Oliveira e Oliveira, 2002).



---

# Objetivos I

## Objetivos gerais

Avaliar as alterações na função das mitocôndrias do músculo de vôo de fêmeas dos mosquitos *A. aegypti* nos tempos subseqüentes a alimentação com sangue.

## Objetivos específicos



Avaliar o consumo de oxigênio das mitocôndrias do músculo de vôo de fêmeas alimentadas somente com uma solução de sacarose e das fêmeas alimentadas com sangue.



Medir a atividade dos componentes do STE das fêmeas alimentadas com sacarose ou das que comeram sangue 24 horas após a alimentação.



Avaliar a geração de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) das mitocôndrias do músculo de vôo de fêmeas alimentadas com sacarose e com sangue.



Analisar a ultra-estrutura do tórax de fêmeas antes e depois da alimentação com sangue.

---

## Objetivos II

### Objetivos gerais

Relacionar o metabolismo mitocondrial com a susceptibilidade ao *Plasmodium berghei* no mosquito *Anophles gambiae*.

### Objetivos específicos



Avaliar os substratos ideais para o consumo de oxigênio do intestino de fêmeas do mosquito *A. gambiae*.



Avaliar a respiração do intestino de fêmeas do mosquito *A. gambiae* alimentadas com uma solução de sacarose, após a alimentação ou após a alimentação com sangue de camundongo infectado com *P. berghei*.



Identificar possíveis genes relacionados ao metabolismo mitocondrial cujo silenciamento seja capaz de mudar a função mitocondrial e a susceptibilidade do mosquito ao *P. berghei*.

---

## Material e Métodos

### *a) Criação dos Mosquitos:*

Fêmeas adultas de *Aedes aegypti* da linhagem Red eyesd com idade entre 4 e 7 dias foram cedidas gentilmente pela colônia de mosquitos do laboratório do professor Pedro L Oliveira. Os mosquitos foram mantidos 28°C e umidade 70-80 % e a densidade da gaiola era de aproximadamente 200 fêmeas por 2 litros mantidas num ciclo de claro-escuro de 12 horas. As fêmeas foram mantidas em solução de sacarose 10 % *ad libitum* e, quando necessário para os experimentos, as fêmeas eram alimentadas com sangue de coelhos mantidos no biotério.

As fêmeas dos mosquitos *A. gambiae* foram criadas na colônia de mosquitos do laboratório de malaria e pesquisa de vetores (LMVR) do NIH sob a supervisão do D. Tovi Lehman. As fêmeas com idade entre 2-7 foram utilizadas nos experimentos e sob as mesmas condições de criação dos mosquitos *A. aegypti*. No entanto, sangue de camundongo foi utilizado para alimentar os mosquitos.

### *b) Isolamento das mitocôndrias do músculo de vôo - Aedes aegypti.*

Aproximadamente 100 tórax de fêmeas controles, não alimentadas com sangue, ou alimentadas com sangue e dissecadas em diferentes horas após a alimentação (Figura 17) foram colocados em tampão de isolamento [Sacarose 250 mM, Albumina Bovina livre de Ácidos Graxos (BSA-FAF) 1%, Tris-HCl 5mM, EGTA 2mM], pH 7.4, mantido no gelo. Os tórax eram homogeneizados em um Potter de 15 mL, contendo 10 mL tampão de isolamento a 4 °C. O homogenato foi centrifugado a 4 °C por 3 minutos a 150 x g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e

centrifugado a 4 °C por 10 minutos a 10000 x g e o material precipitado foi re-suspenso em 100 µL de meio próprio para respiração [KCl 120 mM, EGTA 1 mM, BSA-FAF 0,2 %, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, HEPES 3 mM] pH 7,2. Para determinar a concentração de proteína o método de Lowry foi utilizado tendo albumina bovina como padrão protéico (Lowry e cols., 1951).

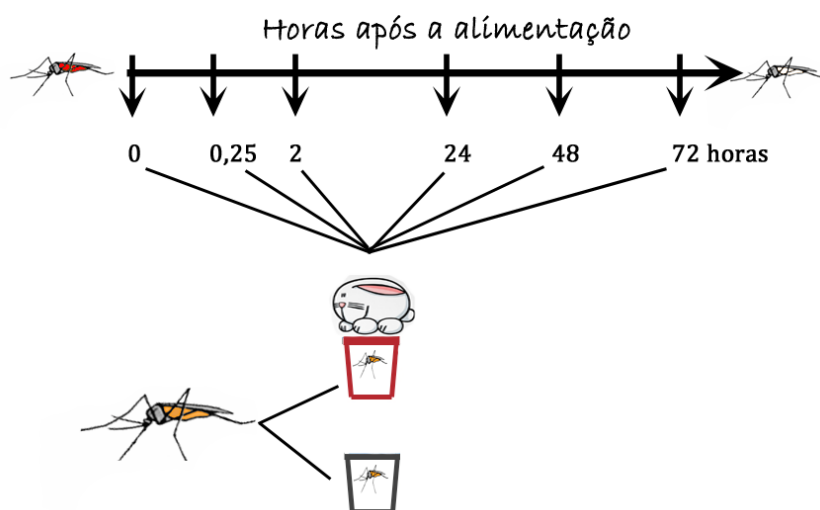


Figura 17. Esquema da alimentação dos mosquitos *A. aegypti*. Dois grupos de mosquitos foram elaborados. Um grupo de fêmeas foi apenas alimentado com sacarose 10 % *ad libitum* (copo cinza). O outro grupo foi alimentado com sangue de coelho (copo vermelho) e após os tempos descritos na figura (0; 0,25; 2; 24; 48 e 72 horas) estas fêmeas foram dissecadas e as mitocôndrias do músculo de vôo foram isoladas. No tempo de 0 horas os mosquitos estavam completamente ingurgitados, ao passo que no tempo de 72 horas o sangue já havia sido completamente digerido.

### c) Consumo de Oxigênio:

#### c.1.) Mitocôndrias isoladas do músculo de vôo - *Aedes aegypti*.

O consumo de oxigênio foi medido num oxígrafo de alta resolução (OROBOROS Oxygraph-2k – Oroboros Instruments). Aproximadamente 0,3 mg da preparação enriquecida em mitocôndrias de músculo de vôo de *A. aegypti* eram utilizadas por cubeta. Para garantir a acuidade nas leituras realizadas no oxígrafo, este foi previamente calibrado com tampão de respiração por 20 min, ao final deste tempo as mitocôndrias foram adicionadas para avaliar o consumo de oxigênio.

Substratos para os complexos I (10 mM de piruvato/prolina) ou para a glicerol 3-fosfato desidrogenase (10 mM G3PDH) foram adicionados à cubeta após o consumo de oxigênio mitocondrial se estabilizar. Neste momento o consumo de oxigênio ainda não era máximo, pois as mitocôndrias ainda não possuíam todos os substratos necessários ao seu funcionamento pleno. Isto ocorreu após a adição de 1 mM ADP, que induz o estado 3 mitocondrial, e se caracteriza pelas altas taxas respiratórias associadas à síntese de ATP. Após a depleção do ADP o consumo de O<sub>2</sub> volta a diminuir induzido o estado 4, que também pode ser alcançado com a adição de oligomicina (5µg/mL). O consumo máximo de oxigênio foi titulado na presença de até 5 µM do ionóforo de prótons, FCCP, que é capaz de se protonar no espaço intermembranas e atravessar a membrana interna liberando os prótons na matriz, desacoplando assim a respiração da síntese de ATP.

#### *c.2.) Intestino médio -Anopheles gambiae*

O consumo de oxigênio de 30 intestinos de fêmeas de mosquitos *A. gambiae* foi avaliado com o auxílio do oxígrafo Hansatech (Hansatech instruments, Inglaterra). Quatro grupos experimentais foram criados: i) fêmeas que não foram alimentadas com sangue ou que foram ii) alimentadas com sangue de camundongo e dissecadas 24 horas após a alimentação, estes dois grupos foram mantidos à 28 °C. Em outros dois grupos, iii) fêmeas foram alimentadas com sangue ou iv) sangue de um camundongo previamente infectado com *Plasmodium berghei* (causador da malária murina). Este dois últimos grupos foram mantidos à 21 °C, temperatura permissiva para a infecção nos mosquitos, e dissecados 24 horas após a alimentação. Os intestinos das fêmeas alimentadas foram cuidadosamente lavados para retirar o conteúdo, dissecados e mantidos em tampão de isolamento até o experimento. Após a dissecação dos 30 intestinos os tecidos foram acondicionados na cubeta do oxígrafo contendo o tampão de respiração suplementado com

0,05% de digitonina (um detergente brando que permiti a permeabilização das células garantindo a entrada de substratos). Após a estabilização da respiração adicionávamos simultâneamente 10 mM dos substratos energéticos piruvato, prolina e succinato que são capazes de aumentar a respiração do tecido. A adição subsequente de 1 mM de ADP potencializa o consumo de O<sub>2</sub> para o chamado estado 3 (estado fosforilativo). O estado 4 foi induzido com oligomicina (5 µg/mL) e o estado desacoplado por até 5µM de FCCP.

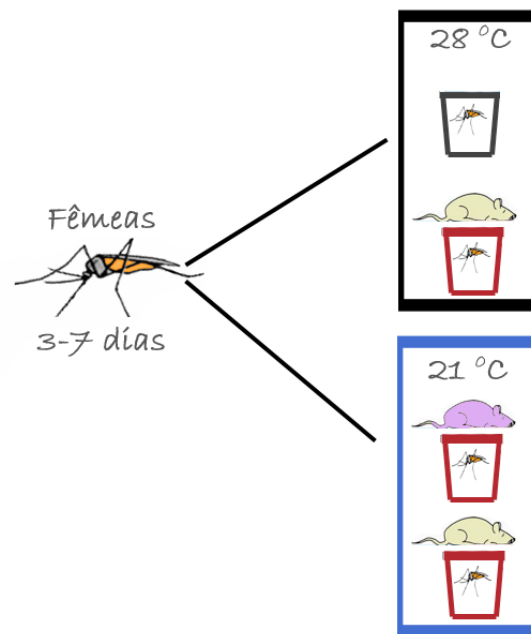


Figura 18. Esquema da alimentação dos mosquitos *A. gambiae*. Quatro grupos experimentais foram elaborados. Nos dois primeiros grupos (retângulo preto) *i*) as fêmeas não-alimentadas (copo cinza) ou *ii*) alimentadas com sangue não infectado (copo vermelho) foram mantidas a 28 °C. As fêmeas dos dois outros grupos foram alimentadas com sangue (copo vermelho), no entanto, um deles *iii*) foi alimentado com um camundongo previamente infectado com *Plasmodium berghei* (camundongo lilás) e mantido a 21°C (retângulo azul), temperatura permissiva da infecção. O quarto grupo, *iv*) foi alimentado com sangue não-infectado e mantido a 21°C como controle.

*d) Medição da geração de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>):* A geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi avaliada na presença da sonda fluorescente Amplex Red (Molecular Probes). De forma sucinta, 5 µM desta sonda na presença de 1 U/mL de peroxidase de rabanete (HRP) foram adicionadas ao meio de

respiração contendo 0,3 mg de mitocôndria isolada, no caso no mosquito *A. aegypti* ou em meio PBS contendo 30 intestinos, no caso dos mosquitos *A. gambiae*. A fluorescência do produto de oxidação do amplex red pelo  $H_2O_2$ , a resorufina, foi avaliada num espectrofluorímetro (Ex – 571; Em – 585). A quantidade de peróxido de hidrogênio gerada foi determinada por uma curva padrão usando  $H_2O_2$  como referência ( $\epsilon_{240nm} = 40 / M.cm^{-1}$ ).

*e. Medida das Atividades enzimáticas mitocondriais*

Atividade dos complexos I-III e II-III foram determinadas espectrofotometricamente a 25 °C usando 70 $\mu$ g de partículas de membranas submitocôndriais obtidas por congelamento e descongelamento das amostras de mitocôndria isoladas já descritas acima. As partículas foram re-suspensas em tampão fosfato de potássio 100mM pH 7,4. Para medir a atividade do complexo NADH-citocromo *c* redutase (complexo I-III) e da Succinato citocromo *c* redutase (complexo II), às subpartículas, foram adicionados 200  $\mu$ M NADH ou succinato 5 mM, 50  $\mu$ M de citocromo *c* (oxidado) e 1 mM KCN. Rotenona e malonato foram usados para inibir as atividades dos complexos I e II, respectivamente. Os gráficos mostram as atividades sensíveis aos seus respectivos inibidores. O ensaio foi monitorado a 550 nm ( $\epsilon = 19 / M.cm^{-1}$ ) e expresso em nanomoles de citocromo *c* por miligrama de proteína.

De forma análoga a atividade do complexo IV foi monitorada a 550 nm. O meio de reação consistia em 100 mM de tampão fosfato de potássio, 50  $\mu$ M de citocromo previamente reduzido por ditionito de sódio e 70  $\mu$ g de proteína. A reação foi inibida por 1 mM de KCN.

*f. Hidrolise de ATP sensível a Azida*

As preparações de sub-partículas mitocondriais (50  $\mu$ g) foram incubadas com MOPS-Tris (pH 7,0) 50 mM,  $MgCl_2$  2,5 mM, ATP 2 mM, KCl 100 mM,  $NaN_3$  5 mM por 5 min a 30 °C. Após

este período 100 µL de TCA 50 % foi usado para parar a reação. As soluções de molibdato [Molibdato de amônia 27 mM (33 g em 500 mL de água), adicionar 110 µL de Acido sulfúrico concentrado e Avolumar para 1 L] e Redutor [0,25 g de 1- amino 2-naftol 4 –sulfônico e 0,5 g sulfito de sódio (Na<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), dissolver em 50 g de água. 15 g de bissulfito de sódio (NaHSO<sub>3</sub>) dissolver em 50 mL de água. As soluções de molibdato de o redutor foram utilizadas para revelar a reação que foi lida 15 minutos depois no espectrofotômetro a 660 nm. A curva padrão foi feita usando P<sub>i</sub> como padrão.

*g. Determinação do conteúdo de citocromos.*

As subpartículas mitocondriais (100µg) foram adicionadas em tampão fosfato de potássio 100 mM e Triton X- 100 0,5 %. A absorção de luz foi avaliada num espectrofotômetro (GBC, GBC instrumens, USA) entre os comprimentos de onda de 500 nm e 600 nm. Estas medidas foram feitas na presença de substrato (succinato 5 mM) e após a leitura uma pequena quantidade de ditionito de sódio foi adicionado à mesma cubeta sendo repetida a leitura. O ditionito de sódio foi adiciono a fim de detectar os citocrômox reduzidos. Deste modo, com o espectro de absorção dos citocrômox oxidados e reduzidos, foi possível realizar uma análise diferencial destes espectros. O conteúdo dos citocromos foi calculado a partir da absorção nos comprimentos de onda de 550 nm (citocromo c) e 600 (citocromo a+a<sub>3</sub>).

*h) Oligonucleotídeos iniciadores utilizados nesta tese:*

Oligonucleotídeos	Senso	Anti-senso
1. <i>A. aegypti</i> RP (qPCR)	GCTATGACAAGCTTGCCCCCA	TCATCAGCACCTCCAGCT
2. <i>A. aegypti</i> Mitofusina (qPCR)	CCACACGGAAGCTGAAGTTG	ATCGACAACGCGACACAATC
3. <i>A. aegypti</i> Opa (qPCR)	CTGGCGTATCCAACAGGTGA	TTCTCGTCGTCTTCGCCATA



4. <i>A. gambiae</i> S7 (qPCR)	GGCGATCAT CATCTACGTGC	GTAGCTGCTGCAAACCTCGG
5. <i>A. gambiae</i> AgMC1 (qPCR)	TTGTGAAATCAAACCCAGCA	CCACGTCCAGTGGAGTCATA
6. Clonagem LacZ	GAGTCAGTGAGCGAGGAAGC	TATCCGCTCACAATTCCACA
7. Clonagem AgMc1	TGCACTCGTTCTATTTTCTACTGC	CGAAGTGGAGGAACTGCTACTAA
8. Síntese do dsRNA AgMC1	TAATACGACTCACTATAGGG AGCAAGCGTCCCCTACACT	TAATACGACTCACTATAGGG CGTTTTGACCACGTCGAAC

*i) Clonagem e seqüenciamento do AgMC1:*

O RNA foi extraído com Trizol (Invitrogen, USA) do intestino de fêmeas de *A. gambiae* alimentadas com sacarose seguindo o protocolo do fabricante. O cDNA foi sintetizado através da transcriptase reversa do Kit QuantiTec (Qiagen). A seqüência completa do gene AgMC1 com 1498 pares de base (pb) foi amplificada utilizando os pares de oligonucleotídeos 7 da tabela acima e clonada através do Kit TOPO TA (Invitrogen) seguindo o protocolo do fabricante. Os primers foram desenhados utilizando a seqüência de cDNA predita pela anotação do gene AgMC1 no banco de dados do genoma do *A. gambiae* (GenBank accession No. AGAP001297-PA).

*j) Quantificação da expressão gênica*

A extração de RNA dos mosquitos *A. gambiae* foi realizada como descrito acima. Para os mosquitos *A. aegypti*, o RNA foi extraído do tórax de fêmeas alimentadas com sangue (24 h) ou com sacarose utilizando Trizol e a transcriptase reversa do Kit High-Capacity (Applied Biosystems, USA). A expressão gênica foi avaliada utilizando o reagente SYBR green (DyNAmo HS; New England Biolabs ou Applied Biosystems, USA). O método Ct foi utilizado para avaliar as alterações na expressão gênica (Pfaffl, 2001).

*l) Síntese do RNA dupla fita e silenciamento gênico por RNA de interferência:*

Para a síntese do RNA de interferência do gene AgMC1 um fragmento de 698 pares de base (pb) foi amplificado usando par de oligonucleotídeos 8 da tabela acima (a região em negrito caracteriza a sequência T7 de reconhecimento da RNA polimerase) . O fragmento amplificado foi clonado no vetor pCRII-TOPO. Este fragmento, agora com as sequências dos promotores T7 foi utilizado com molde para a síntese do RNA dupla fita (*dsRNA*) *in vitro* utilizando o Kit MEGAscript RNAi (Ambion). O *dsRNA* foi purificado através da coluna de purificação fornecida pelo fabricante do Kit e eluído em água e concentrado para 3µg/µL utilizando o filtro Microcon YM-100 (Millipore). Uma estratégia similar foi empregada para a clonagem e síntese do *dsRNA* para o gene bacteriano LacZ (par de oligos 6), utilizado como controle nos experimentos de silenciamento. A sequência T7 foi incorporada neste fragmento amplificando esta sequência com os oligonucleotídeos: M13F-GTAAAACGACGGCCAGT e M13R-CTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGCAGGAAACAGCTATGAC. As fêmeas de *A. gambiae* com 1-2 dias após emergirem foram injetadas com 69 nl de uma solução 3 µg/µl de *dsRNA* para o gene AgMC1. Os mosquitos controle foram injetados com o *dsRNA* para o LacZ. Dois dias após a injeção os dois grupos (*dsAgMC1* e *dsLacZ*) foram utilizados nos experimentos. O silenciamento foi confirmado por qPCR em dois experimentos independentes.

*m) Microscopia eletrônica de transmissão:*

O tórax, o epitélio intestinal e o corpo gorduroso de *Aedes aegypti*, foram fixados em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4 contendo 1 % de glutaraldeído e 4 % de formaldeído por 12 horas, à temperatura ambiente. Os tecidos fixados foram lavados e pós-fixados em 1 % OsO<sub>4</sub>, 0.8 % K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> e 5 mM CaCl<sub>2</sub>, por 1 hora. As amostras foram desidratadas em acetona e embebidas em uma resina de epoxy Polybed (Polyscience). Seções ultrafinas das amostras foram coradas

com acetato de uranila, citrato de chumbo, e foram observadas num microscópio eletrônico Zeiss 109 (Zeiss, Alemanha).

---

## Resultados I

Os resultados apresentados neste artigo mostram que o consumo de oxigênio e a geração de  $H_2O_2$  das mitocôndrias isoladas do músculo de vôo do mosquito *A. aegypti* são reduzidos após a alimentação com sangue. Estes eventos ocorrem logo após a ingestão do sangue (15 min.) e são potencializados no pico da digestão, 24 horas. Os mecanismos envolvidos nesta alteração da função mitocondrial envolvem uma redução na atividade do complexo IV assim como uma redução no conteúdo de citocromos do STE. Além disso, a avaliação morfométrica do músculo de vôo revelou que 24 horas após a alimentação com sangue o número de mitocôndrias por área é reduzido, mas o tamanho das mitocôndrias é aumentado, indicando fusão mitocondrial. O aumento da expressão relativa de mitofusina e Opa, genes relacionados à fusão destas organelas, corroborou os dados morfométricos. Assim, a alimentação com sangue promove alterações na função e na morfologia das mitocôndrias do músculo de vôo do *A. aegypti*. Estas alterações podem representar adaptações importantes à hematofagia.

Estes resultados foram publicados no periódico PLoS One em 2009.

# Blood-Feeding Induces Reversible Functional Changes in Flight Muscle Mitochondria of *Aedes aegypti* Mosquito

Renata L. S. Gonçalves<sup>1,2,3</sup>, Ana Carolina L. Machado<sup>1,2</sup>, Gabriela O. Paiva-Silva<sup>3,4</sup>, Marcos H. F. Sorgine<sup>3,4</sup>, Marisa M. Momoli<sup>5</sup>, Jose Henrique M. Oliveira<sup>3,4</sup>, Marcos A. Vannier-Santos<sup>6</sup>, Antonio Galina<sup>7</sup>, Pedro L. Oliveira<sup>3,4</sup>, Marcus F. Oliveira<sup>1,2\*</sup>

**1** Laboratório de Bioquímica Redox, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **2** Laboratório de Inflamação e Metabolismo, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **3** Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **4** Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Rio de Janeiro, Brazil, **5** Laboratório de Biologia Molecular de Plantas, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil, **6** Laboratório de Biomorfologia Parasitária, Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fiocruz, Salvador, Bahia, Brazil, **7** Laboratório de Bioenergética & Fisiologia Mitochondrial, Instituto de Bioquímica Médica, Programa de Bioquímica e Biofísica Celular, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

## Abstract

**Background:** Hematophagy poses a challenge to blood-feeding organisms since products of blood digestion can exert cellular deleterious effects. Mitochondria perform multiple roles in cell biology acting as the site of aerobic energy-transducing pathways, and also an important source of reactive oxygen species (ROS), modulating redox metabolism. Therefore, regulation of mitochondrial function should be relevant for hematophagous arthropods. Here, we investigated the effects of blood-feeding on flight muscle (FM) mitochondria from the mosquito *Aedes aegypti*, a vector of dengue and yellow fever.

**Methodology/Principal Findings:** Blood-feeding caused a reversible reduction in mitochondrial oxygen consumption, an event that was parallel to blood digestion. These changes were most intense at 24 h after blood meal (ABM), the peak of blood digestion, when oxygen consumption was inhibited by 68%. Cytochromes *c* and *a+a<sub>3</sub>* levels and cytochrome *c* oxidase activity of the electron transport chain were all reduced at 24 h ABM. Ultrastructural and molecular analyses of FM revealed that mitochondria fuse upon blood meal, a condition related to reduced ROS generation. Consistently, BF induced a reversible decrease in mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation during blood digestion, reaching their lowest values at 24 h ABM where a reduction of 51% was observed.

**Conclusion:** Blood-feeding triggers functional and structural changes in hematophagous insect mitochondria, which may represent an important adaptation to blood feeding.

**Citation:** Gonçalves RLS, Machado ACL, Paiva-Silva GO, Sorgine MHF, Momoli MM, et al. (2009) Blood-Feeding Induces Reversible Functional Changes in Flight Muscle Mitochondria of *Aedes aegypti* Mosquito. PLoS ONE 4(11): e7854. doi:10.1371/journal.pone.0007854

**Editor:** Marcelo Hermes-Lima, Universidade de Brasília, Brazil

**Received:** April 27, 2009; **Accepted:** October 21, 2009; **Published:** November 16, 2009

**Copyright:** © 2009 Gonçalves et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (through Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia 2008), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ) (MFO through Jovens Cientistas do Nosso Estado 2007), International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB), World Health Organization-Tropical Disease Research (WHO-TDR-SSI, A60265), and Howard Hughes Medical Institute (HHMI). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript. PLO, AG, MAVS, MHFS and MFO are research scholars from CNPq.

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

\* E-mail: maroli@bioqmed.ufrj.br

## Introduction

Mitochondria are organelles involved not only on aerobic energy transduction from nutrient oxidation to allow ATP synthesis through the oxidative phosphorylation, but also in redox balance, representing one of the major sources of cellular reactive oxygen species (ROS). A small portion of the oxygen consumed by mitochondria is partially reduced to superoxide (O<sub>2</sub>•<sup>-</sup>) radicals and to hydrogen peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) [1,2], which diffuses through the cell playing both signaling and harmful roles [2]. Essentially, O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> radicals are generated within the mitochondrial matrix, at the intermembrane space and the outer membrane, which are

then dismutated to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> by superoxide dismutases [2]. In insects, an additional mechanism involved in mitochondrial O<sub>2</sub>•<sup>-</sup> production is the activity of glycerol 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) [3,4]. Mitochondrial ROS generation is highly regulated and depends on different factors such as the i) electron flux through the inner membrane, ii) the magnitude of the mitochondrial membrane potential (ΔΨ<sub>m</sub>), iii) the oxygen tension, iv) substrate availability, v) NADH/NAD<sup>+</sup> ratio in the matrix and vi) mitochondrial morphology [1–8]. Mitochondria are very dynamic organelles that may fuse or divide, changing their morphology in response to many different stimuli [9]. In this regard, mitochondrial fission is being correlated to increased ROS generation

whereas fusion has been associated to protective events [10] leading to a decrease in  $H_2O_2$  production [6,7].

Flying insects have been used as models to study energy metabolism because the FM has the highest respiratory activity among all animal tissues and possess giant mitochondria [11]. In insects, oxygen is delivered to cells through a highly branched system, called tracheae, which open externally in valve-like structures responsible to control gas exchange. The tracheolar invaginations are branched in such a way that their finest branches lie adjacent to tissues, exposing them to a much higher oxygen concentration when compared to oxygen levels in mammalian tissues [12,13]. The opening of the tracheolar system is tightly regulated by the oxygen availability and it seems to act as a preventive antioxidant mechanism regulating gas exchange during resting/activity cycles [13]. Another point that attracts much interest is that mitochondrial ROS generation seems to play a key role in respiratory capacity and aging [14–16]. There is strong evidence linking the chronic accumulation of oxidatively damaged biomolecules to a decrease in respiratory capacity and energy transduction in mitochondria during the aging process [14,17]. Mitochondria-generated reactive species are central players in this process [18] and long-term reduction in quantity and quality of the ingested food is the only intervention known to increase life span from worms and yeasts to mammals [19–22].

Blood-feeding insects are vectors of several important infectious diseases, such as leishmaniasis, malaria, dengue and yellow fever. Additionally, hematophagous insects rely, at least in a part of their life-cycle, on the ingestion of a considerable amount of vertebrate blood to meet their energy demands as well as to drive oogenesis [23,24]. The threat of oxygen toxicity is especially critical to blood-feeding insects, as, in addition to the oxidative challenge resulting from the ROS produced by mitochondrial metabolism, they have to cope with a powerful pro-oxidant diet composed mainly of hemoglobin and its highly reactive digestion products, heme and iron [25].

Here, we investigated the effects of blood feeding on functional and structural mitochondrial parameters obtained from the FM of *Aedes aegypti* female mosquitoes. We observed that blood feeding caused a transient reduction in oxygen consumption that is correlated with reduced cytochromes *c* and *a + a<sub>3</sub>* levels and reduced cytochrome *c* oxidase activity. Interestingly, blood feeding also promoted mitochondrial fusion, a condition related to reduced ROS generation. Consistently, we observed that blood feeding induced a reversible decrease in mitochondrial  $H_2O_2$  formation during blood digestion. We speculate that mitochondrial remodeling triggered by blood feeding may represent an important adaptive mechanism for hematophagous insects.

## Materials and Methods

### Ethics Statement

All animal care and experimental protocols were conducted following the guidelines of the institutional care and use committee (Committee for Evaluation of Animal Use for Research from the Federal University of Rio de Janeiro, CAUAP-UFRJ) and the NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ISBN 0-309-05377-3). The protocols were approved by CAUAP-UFRJ under the registry #IBQM001. Technicians dedicated to the animal facility at the Institute of Medical Biochemistry (UFRJ) carried out all aspects related to rabbit husbandry under strict guidelines to insure careful and consistent handling of the animals.

### Insects

*Aedes aegypti* (Red eyes strain) were maintained at 28°C, 70–80% relative humidity with a photoperiod of 12 h light/dark (L:D,

12:12 h). Larvae were reared on a diet consisting of commercial dog chow. Adults were kept at the same temperature, humidity and photoperiod. On average 200 mosquitoes were placed in 5 L cages. After moulting, adult female mosquitoes were allowed to feed *ad libitum* on pads soaked with 10% (w/v) sucrose solution. Two experimental groups were designed to determine whether *A. aegypti* mitochondrial function would be affected by blood-feeding. In one group, the sugar-fed (SF) female adult mosquitoes 2–5 days after emergence were allowed to feed *ad libitum* only on the pads soaked with sucrose. The other group were blood-fed (BF) female adult mosquitoes 2–5 days after emergence that, besides sucrose, were also allowed to feed on rabbit blood. The mosquitoes were allowed to feed for 30 minutes directly on an ear of an immobilized and anesthetized rabbit at the Institute of Medical Biochemistry animal care facility in Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ). Then, flight muscle (FM) mitochondrial preparations were obtained from SF and BF insects at different times.

## Mitochondria

Isolation of mitochondria from *A. aegypti* FM was carried out by using a method described in the literature with modifications [3]. About 150 female mosquitoes were immobilized by chilling on ice and then dissected to obtain the thoraxes, which were gently homogenized in a 15 mL Potter-Elvehjem tissue grinder in a Teflon pestle with 10 mL of ice-cold isolation medium (250 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 1% (w/v) fatty acid free bovine serum albumin, pH 7.4). The preparation was maintained at 4°C throughout the subsequent washing and centrifugation procedures. The liquid was passed through cotton gauze in order to get rid of mosquito's legs, wings and remains of thoraxes and was immediately centrifuged twice at 300 ×g for 5 min in a Eppendorf centrifuge model 5810-R with a rotor F34-6-38. The supernatant was centrifuged at 10,000 ×g for 10 min. The brown pellet was carefully re-suspended in approximately 100 μL of respiration medium (120 mM KCl, 5 mM  $KH_2PO_4$ , 3 mM Hepes, 1 mM EGTA, 1 mM  $MgCl_2$ , and 0.1% fatty acid free bovine serum albumin, pH 7.2), to give preparations with an average protein concentration of 25 mg/mL. Protein concentration was determined by the Lowry method, using bovine serum albumin as standard [26]. Usually this method yields about 8.62 mg mitochondrial protein/g of mosquito thorax.

## Mitochondrial Respiration

The rates of mitochondrial respiration were assessed at different metabolic states [27] by measuring the oxygen consumption in the presence of oxidizable substrates alone (state 2), and supplemented with sequential additions of ADP (state 3), oligomycin (state 4-like) and FCCP (carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone) (uncoupled) in an oxygraph (Yellow Springs Instruments, model 5300) fitted with Clark-type electrode in a water-jacketed glass chamber or in a high-resolution oxygraph (O2k, Oroboros Inc., Austria). For all the experiments, the temperature was maintained at 27.5°C and the total reaction volume was 1.0 mL for the measurements in the YSI oxygraph and 2.0 mL in the Oroboros oxygraph. Freshly isolated mitochondria (0.44 mg of protein) were added to the respiration buffer and allowed to equilibrate for 30 s.  $NAD^+$ -linked substrates (10 mM pyruvate plus 10 mM proline-pyr/pro) were added to the chamber and allowed to equilibrate, followed by the addition of ADP (1 mM final concentration). The concentration of substrates used to induce ADP-stimulated state 3 respiration were established based on previous experiments showing that, in this condition, oxygen consumption was at its maximum (data not shown). State 4-like respiration was achieved by adding 4 μg/mL oligomycin, and the

respiratory control ratio (RCR) was calculated by dividing the state-3 respiratory rates to oligomycin-induced state 4-like respiratory rates. Afterwards, the proton ionophore FCCP (up to 7  $\mu\text{M}$ ) was added to induce oxygen consumption in a complete uncoupled state.

### Cytochrome *c* Oxidase (COX) Activity

Activity of cytochrome *c* oxidase (COX) was measured in triplicate at room temperature, in a total reaction volume of 1 mL, using a GBC spectrophotometer UV/VIS 920 (GBC Scientific Equipment, Australia). Enzyme activity was measured by following the decrease in absorbance due to the oxidation of ferrocytochrome *c*, ( $\epsilon = 18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) [28]. The reaction mixture consisted of 100 mM potassium phosphate, pH 7.4, 50  $\mu\text{M}$  reduced cytochrome *c*. The reaction was initiated by the addition of freeze-thawed mitochondria (70  $\mu\text{g}$  of protein) and the reduction in absorbance at 550 nm was monitored. KCN (1 mM) was added to inhibit cytochrome *c* oxidase activity, which was considered as the cyanide-sensitive rate of cytochrome *c* oxidation.

### Cytochrome Content

*A. aegypti* mitochondrial preparations were diluted to 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  in potassium phosphate buffer 100 mM (pH 7.2) and 5% Triton X-100. Light absorption spectra were obtained between 500 nm and 600 nm in a GBC spectrophotometer UV/VIS 920 (GBC Scientific Equipment, Australia). The oxidized cytochrome spectra were obtained in the presence of 5 mM succinate while for reduced cytochromes spectra, small quantities of sodium dithionite crystals were added to the 1 mL sample cuvettes. The relative amount of cytochrome was calculated by subtracting oxidized spectra from the equivalent reduced ones, using the millimolar absorbance coefficients of  $18.5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (for cytochrome *c*) and  $16 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  (for cytochromes *a* + *a<sub>3</sub>*) at 550 nm [28].

### Transmission Electron Microscopy (TEM) and Morphometry

Thoraxes from SF and BF mosquitoes were fixed in electron microscopy-grade 1% glutaraldehyde (Sigma, USA), 4% formaldehyde and 5 mM  $\text{CaCl}_2$  in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), postfixed in 1% osmium tetroxide and 0.08% potassium ferricyanide, dehydrated in an acetone series and embedded in Polybed resin (Polysciences Inc., USA). Thin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate, and then observed under a Zeiss EM 109 transmission electron microscope. Morphometric analyses of *A. aegypti* FM mitochondria were carried out by TEM using the software AnalISYS (Soft Imaging System, Germany). To determine mitochondrial density and area, twenty-two fields from BF and twenty-two fields from SF samples, which excluded nuclear areas, were randomly selected. The number of mitochondria per field ( $n = 58$  for SF and  $n = 41$  for BF), as well as their area, were calculated using the magnifications of 7,000 x and 12,000 x. Mitochondrial density was expressed as the number of organelles per  $10 \mu\text{m}^2$ , whereas mitochondrial area was calculated by measuring absolute mitochondrial size and dividing by the absolute area of myofibrils.

### RNA Extraction and qRT-PCR Analysis

Total RNAs from thoraxes were extracted from SF and BF (24 h) female mosquitoes using the TRIzol<sup>®</sup> reagent (Invitrogen, USA), following the manufacturer's instructions. RNA was treated with DNase I (Invitrogen, USA) and first-strand cDNA synthesis was carried out using High-Capacity cDNA Reverse transcription kit (Applied Biosystems, USA). Quantitative PCR was performed

in a 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, USA) using SYBR-GREEN PCR master MIX (Applied Biosystems, USA). The comparative Ct method was used to evaluate changes in gene expression levels [29]. The *A. aegypti* ribosomal protein 49 gene *RP49* was used as endogenous control (accession number AAT45939), according to previous methods [30]. Analysis of expression of the two orthologous genes related to mitochondrial fusion mitofusin (*Mfn*, accession number XM\_001649176) and *optic atrophy 1* (*OPA1*, accession number XM\_001657256) was carried out by using the following primers: *Mfn*: MFN-F 5'-CCACACGGAAGCTGAAGTTG 3' and MFN-R 5'-ATCGA-CAACGCGACACAATC 3'; *OPA1*: OPA-F 5'-CTGGCGTAT-CCAACAGGTGA 3' and OPA-R 5'-TTCTCGTCTGCT-TCGCCATA 3'; *RP49*: RP49-F 5'-GCTATGACAAGCTTG-CCCCCA 3' and RP49-R 5'-TCATCAGCACCTCCAGCT 3'. The relative quantification of *Mfn* and *OPA1* was determined using the comparative Ct method, also known as the  $\Delta\Delta\text{Ct}$  method, or the  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  method [29], having the constitutive gene *RP49* as the endogenous control. Standard curves were constructed for *Mfn*, *OPA1* and *RP49* primers to validate the application of the comparative Ct method. Data analysis was carried out using Excel software (Microsoft, USA) and statistics were performed using  $\Delta\text{Ct}$  values.

### Hydrogen Peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Release

$\text{H}_2\text{O}_2$  production was assessed by monitoring resorufin fluorescence due to the oxidation of 5  $\mu\text{M}$  amplex red (Invitrogen, USA) in the presence of 1.0 unit/mL horseradish peroxidase (Sigma, USA). The incubation media contained the "respiration buffer" and 10 mM pyruvate and 10 mM proline. The rate of amplex red oxidation was recorded at room temperature using a Cary Eclipse spectrofluorimeter (Varian, USA) adapted with a continuous stirring device, operating at excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively. After each measurement, a standard curve of reagent grade  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Merck, Germany) was performed. The "absolute" levels of  $\text{H}_2\text{O}_2$  detected fluorimetrically through this and other methodologies reflect the balance between the generated and detoxified  $\text{H}_2\text{O}_2$  since mitochondria has their own antioxidant defences.

### Data and Statistics

Data in graphs were presented as bars with mean  $\pm$  SEM values for each condition. Comparisons between groups were done by one-way ANOVA and *a posteriori* Tukey's test for pair-wise comparisons. When appropriate, unpaired Student's t-tests were employed. Differences of  $p < 0.05$  were considered to be significant. Student's t-test, ANOVA and Tukey's *a posteriori* tests were performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, USA).

## Results

### *A. aegypti* FM Mitochondria Use both $\text{NAD}^+$ and $\text{FAD}^+$ -Linked Substrates

In agreement with data obtained from other insects [3,14,31], *A. aegypti* FM mitochondria from SF or BF mosquitoes were able to oxidize the  $\text{NAD}^+$ -linked substrates, pyruvate and proline (pyr/pro), and also the  $\text{FAD}^+$ -linked substrate, glycerol 3-phosphate (G3P) (Figure S1). In SF mosquitoes, there were no differences in the mean oxygen consumption rates between pyr/pro and G3P in both ADP-induced (state 3) ( $p = 0.295$ ) and FCCP-induced (uncoupled) ( $p = 0.105$ ) respiration (compare Figures S1A and S1B full lines and Table 1). This result is in agreement with the recently reported findings of Giulivi and colleagues and re-inforces

**Table 1.** Effects of blood-feeding on oxygen consumption rates in different metabolic states in *A. aegypti* FM mitochondria.

	pyruvate +proline	ADP	Oligo	FCCP	RCR
<b>SF</b>	17.81±2.02 (n=13)	139.01±15.52 (n=13)	14.58±1.18 (n=13)	114.5±9.57 (n=8)	9.53±1.06 (n=13)
<b>BF</b>	7.64±1.24 (n=14) <i>b</i>	43.47±5.09 (n=14) <i>b</i>	6.57±1.25 (n=13) <i>b</i>	44.21±8.55 (n=14) <i>b</i>	6.6±0.78 (n=14) <i>a</i>
% reduction (to SF)	57,10%	68,70%	54,90%	61,40%	30,70%
	Glycerol-3 phosphate	ADP	Oligo	FCCP	RCR
<b>SF</b>	104.2±12.48 (n=7)	175.9±35.78 (n=7)	93.97±13.8 (n=7)	185.5±45.58 (n=6)	1.87±0.38 (n=7)
<b>BF</b>	70.4±9.3 (n=8) <i>a</i>	101.15±25.17 (n=8)	56.44±3.8 (n=8) <i>a</i>	125.68±7.32 (n=8)	1.73±0.37 (n=8)
% reduction (to SF)	32,80%	42,50%	39,90%	32,30%	7,41%

Values were expressed as mean ± SEM of nmols oxygen consumed/min/mg protein in four different mitochondrial metabolic states using: pyruvate + proline or Glycerol-3 phosphate, followed by the addition of 1 mM ADP (ADP), 4 µg/mL oligomycin (Oligo) and 5–7 µM FCCP. RCR (respiratory control ratios) were calculated by dividing the rates of oxygen consumption in state 3 (ADP-stimulated) by those of state 4 (in the presence of oligomycin). The inhibition of oxygen consumption promoted by blood feeding were expressed as the percentage relative to their respective metabolic states in SF. SF = sugar fed; BF = 24 h ABM. Statistical analyses between groups were performed by using the Student's t-test. *a*,  $p < 0.05$ ; *b*,  $p < 0.0001$  both relative to SF.  
doi:10.1371/journal.pone.0007854.t001

the idea that proline and G3P-induced oxygen consumption occurs in a similar extent in insects [31]. Oligomycin-induced state 4-like respiration in SF mosquitoes using G3P was significantly higher ( $p < 0.0001$ ) when compared to pyr/pro (Figures S1A and S1B – dashed lines and Table 1). Also, the differences between state 3 and state 4-like respiratory rates were more evident when NAD<sup>+</sup>-linked substrates were used, as previously reported for *Drosophila* [3,14]. Consequently, the ratios between state 3 and state 4-like respiratory rates (the respiratory control ratio, RCR), a parameter that measure the integrity of inner mitochondrial membrane, were significantly higher for pyr/pro compared to G3P ( $9.53 \pm 1.06$  vs.  $1.87 \pm 0.37$ ,  $p < 0.0001$ , see Table 1).

### Mitochondrial Oxygen Consumption Is Reduced upon Blood Feeding

The effects of blood feeding on *A. aegypti* FM mitochondrial respiration were first assessed at 24 h ABM, a time point considered by the literature to be the peak of blood digestion [32]. At this time, we observed a reduction in oxygen consumption in all mitochondrial metabolic states respiring both pyr/pro and G3P (Figures S1A and S1B, compare full with dashed lines and Table 1). These changes were more pronounced when mitochondria oxidize pyr/pro (Table 1), where significant differences between SF and BF mosquitoes were detected in all four metabolic states analyzed ( $p < 0.0001$ ). In fact, the reduction observed at 24 h ABM with pyr/pro-induced respiration in both state 3 and uncoupled (FCCP) (68.7% and 61.4% respectively) respiratory rates were much higher than with G3P (42.5% and 32.2%, respectively). Therefore, a significant change in the respiratory control ratio (RCR) was only observed when pyr/pro were used as substrates, mainly due to a more potent decline in the state 3 respiratory rates. We also observed that in BF insects addition of the uncoupler FCCP did not restore the electron flow and oxygen consumption rates to levels compared to those exhibited by SF insects, suggesting that the phosphorylation apparatus (F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, Adenine Nucleotide Translocator and the phosphate carrier) were not involved in this phenomena. In fact, blood feeding did not affect the mitochondrial azide-sensitive ATPase activity (Figure S2A).

### Blood-Feeding Induces a Time-Dependent Reversible Inhibition of Mitochondrial Oxygen Consumption

It is well known that BF causes important physiological and metabolic changes in *A. aegypti* females [33–35]. After a blood meal,

proline levels in *A. aegypti* hemolymph reach about 100 mM, being the most abundant aminoacid in this fluid [33] and its oxidation is capable of sustaining flight not only in *A. aegypti* [36] but also in other insects [37]. The respiratory activity sustained by pyr/pro is a direct consequence of the uptake by mitochondria, the activity of pyruvate dehydrogenase, proline oxidase, the enzymes of TCA cycle and the ETC complexes. Since mitochondrial proline oxidation in insects renders higher RCR indexes compared to G3P [3,14] (Table 1), we further investigated the dynamics of mitochondrial functional changes triggered by blood feeding on *A. aegypti* FM using pyr/pro as substrates. Representative traces of mitochondrial oxygen consumption in SF and BF mosquitoes after 0.25 h, 2 h, 24 h, 40 h and 72 h ABM are shown in Figure S3. Comparing the traces of SF and BF, at different times after blood feeding, we can observe a transient reduction in mitochondrial oxygen consumption rates in all metabolic states, particularly at state 3 and uncoupled respiration (Table 2). Curiously, just 0.25 h after blood intake, a marked decrease in the respiratory rates were observed in all metabolic states, being of 28.1% at state 3 and 26.1% at the uncoupled respiration (Table 2). However, further inhibition of respiration was potentiated up to 24 h ABM, when the highest inhibitory effects of BF on oxygen consumption were detected (68.7% at state 3 and 61.4% at uncoupled respiration) (Table 2). After complete blood digestion, at 72 h ABM, oxygen consumption rates returned to levels found before BF (Figure S3 and Table 2). We conclude that the inhibitory effects of blood feeding on *A. aegypti* FM mitochondrial respiration were parallel to blood digestion. Also, since FCCP was unable to restore the oxygen consumption rates in BF mosquitoes to the levels found in SF insects, a putative underlying mechanism could be the impairment of electron transport through the mitochondrial complexes at the inner membrane.

### Cytochrome *c* Oxidase Activity and ETC Cytochrome Levels Were Reduced after Blood Feeding

Measurement of mitochondrial ETC complex activity indicates that despite blood feeding did not affect the rotenone-sensitive NADH-induced cytochrome *c* reduction or the antimycin *a*-sensitive G3P-induced cytochrome *c* reduction (Figures S2B and S2C, respectively) it specifically reduces cytochrome *c* oxidase (COX) activity at 24 h ABM (Figure 1A,  $p = 0.0157$ ). Similar results were obtained when COX activity was assessed by using a mixture of TMPD-ascorbate as substrates (data not shown). Consistently, significant decreases in both cytochrome *c* ( $p = 0.0127$ ) and



**Table 2.** Oxygen consumption rates in FM mitochondria from SF and BF *A. aegypti* along the blood digestion process oxidizing pyruvate and proline.

	pyruvate +proline	% red.	ADP	% red.	Oligo	% red.	FCCP	% red.	RCR	% red.
<b>SF</b>	17.81±2.02 (n=13)	–	139.01±15.52 (n=13)	–	14.58±1.18 (n=13)	–	114.5±9.57 (n=8)	–	9.53±1.06 (n=13)	–
<b>BF 0.25 h</b>	10.85±0.92 (n=14) b	39,10%	99.94±7.08 (n=17)	28,10%	10.42±1.07 (n=17)	37,70%	84.57±13.58 (n=17)	26,10%	10.99±0.78 (n=17)	0%
<b>BF 2 h</b>	9.29±1.04 (n=16) c	47,80%	100.81±13.12 (n=16)	27,50%	11.45±1.38 (n=16)	21,50%	59.29±12.90 (n=15) a	48,20%	8.81±1.4 (n=16)	7,55%
<b>BF 24 h</b>	7.64±1.24 (n=14) c	57,10%	43.47±5.09 (n=14) c	68,70%	6.57±1.25 (n=13) b	54,90%	44.21±8.55 (n=14) b	61,40%	6.6±0.78 (n=14)	30,70%
<b>BF 40 h</b>	7.38±0.62 (n=14) c	58,60%	52.85±6.56 (n=16) c	62%	7.97±1.21 (n=18) a	45,30%	n.d.	n.d.	6.63±0.82 (n=16)	30,40%
<b>BF 72 h</b>	15.99±1.41 (n=15)	10,20%	110.91±6.67 (n=15)	20,20%	18.96±1.81 (n=14)	0%	101.62±7.96 (n=15)	11,20%	5.85±0.35 (n=15)	38,60%

Oxygen consumption was determined in SF and in BF insects five different times ABM (0.25 h, 2 h, 24 h, 40 h and 72 h). Values were expressed as mean ± SEM of nmols oxygen consumed/min/mg protein in four different mitochondrial metabolic states using: 10 mM pyruvate + proline, followed by the addition of 1 mM ADP (ADP), 4 µg/mL oligomycin (Oligo) and 5–7 µM FCCP. RCR (respiratory control ratios) were calculated by dividing the rates of oxygen consumption in state 3 (ADP-stimulated) by those of state 4 (in the presence of oligomycin). Inhibition of oxygen consumption promoted by BF was expressed as the percentage relative to their respective metabolic states in SF (% red). Statistical analyses between groups were performed by using ANOVA and *a posteriori* Tukey's test. *a*,  $p < 0.05$ ; *b*,  $p < 0.01$ ; *c*,  $p < 0.001$  all relative to their respective metabolic states in SF. doi:10.1371/journal.pone.0007854.t002

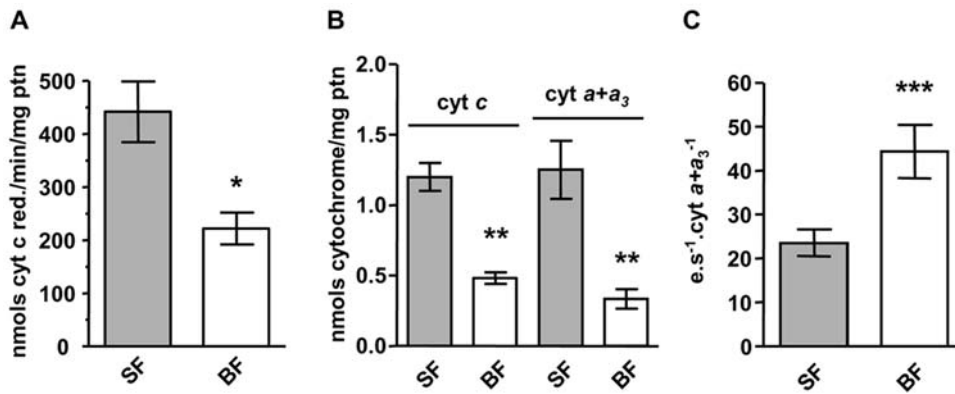
cytochromes *a* + *a*<sub>3</sub> ( $p = 0.0139$ ) levels were also observed in BF insects (Figure 1B). Turnover numbers for COX were significantly higher ( $p = 0.0017$ ) in mitochondria isolated from BF mosquitoes suggesting that enzyme inhibition results in a compensatory mechanism in response to a diminished electron flow (Figure 1C).

### A. *aegypti* Mitochondria Fuses upon Blood Meal

Figure 2 shows transmission electron microscopy (TEM) images of *A. aegypti* FM from transversal (Figures 2A and 2B) and longitudinal (Figures 2C and 2D) sections of SF (Figures 2A and 2C) and BF (Figures 2B and 2D) mosquitoes. The expected organization pattern of muscle fibers, being wrapped with large mitochondria presenting highly packed cristae, is clearly seen in all images as has been described for other insects [11]. The gross organization and structure of *A. aegypti* FM mitochondria did not change at 24 h ABM, seen both in transversal (compare Figures 2A and 2B) and longitudinal sections (compare Figures 2C and 2D). However, significant quantitative morphological changes were observed after a blood meal, such as a 41% decrease in mitochondrial density (number of mitochondria per field area, Figure 2E,  $p < 0.0001$ ). Parallel to this, we also observed an increase of about 46% in mitochondrial size, expressed as mitochondrial area relative to the myofibril area (Figure 2F,  $p < 0.05$ ). Key components of the mitochondrial fusion system are mitofusin (Mfn) and optic atrophy 1 (OPA1) proteins. Mfn is located at the outer mitochondrial membrane, whereas OPA1 locates at the inner membrane. These two proteins interact together to promote the organelle fusion. Analysis of gene expression of both *Mfn* and *OPA1* genes in *A. aegypti* FM revealed a significant increase in their expression 24 h ABM (Figure 2G,  $p < 0.05$ ). Therefore, reduced organelle density and increased area, as showed by morphometric analysis was corroborated by the gene expression pattern of the fusion proteins and led us to conclude that blood feeding induces mitochondrial fusion.

### Blood-Feeding Induces a Time-Dependent Reversible Inhibition of Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Generation

A potential consequence of mitochondrial fusion could be a reduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation, as demonstrated by other models [6,7]. To determine whether the mitochondrial functional (Tables 1 and 2 as well as Figures S1 and S3,) and morphological (Figure 2) changes promoted by BF could affect reactive oxygen species (ROS) generation, we measured H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in mitochondrial preparations from SF and BF mosquitoes using pyr/pro as substrates (Figure 3). Comparing all the traces shown in Figure 3, we can observe that, similar to other insects, *A. aegypti* mitochondria were capable of producing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced by NAD<sup>+</sup>-linked substrates in a protonmotive force-dependent fashion. In samples from BF mosquitoes a reduction in mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production took place as early as 2 h ABM. However, this effect was further potentiated at 24 h ABM when H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation, in both states 3 and 4-like, were significantly ( $p < 0.001$ ) reduced (Table 3). Reduction of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation caused by BF was also observed when G3P was used as substrate (Figure S4). Interestingly, when blood digestion was completed (at 72 h ABM), mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation was restored to levels indistinguishable from those exhibited by SF. Although not statistically significant, there was also a clear transient reduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation during the digestive process in the presence of the uncoupler FCCP (Table 3). The subsequent addition of the complex III inhibitor antimycin a, a procedure that maximally stimulates H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production [1], results in similar levels of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in all groups (Figure 3 and table 3). Curiously, BF significantly ( $p < 0.01$ ) increased the relative effect of antimycin a on the



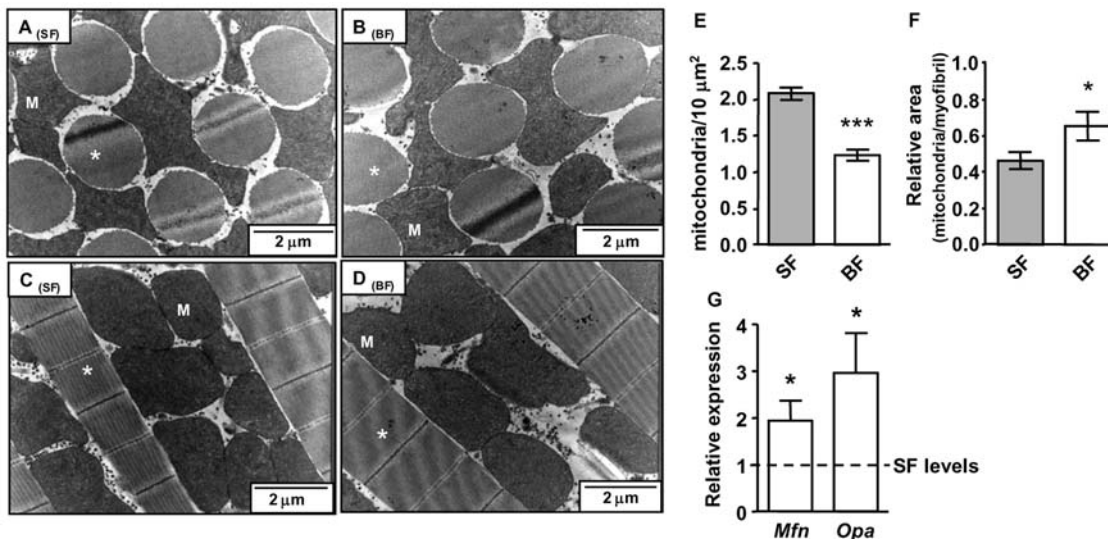
**Figure 1. Blood feeding reduces cytochrome *c* oxidase activity and cytochromes content in *A. aegypti* FM mitochondria.** Comparison of cytochrome *c* oxidase (COX) activity, cytochrome content and electron turnover number of COX were assessed in sugar-fed (SF, grey bars) and 24 h ABM (BF, white bars) *A. aegypti* FM mitochondria. (A) COX activity was measured as the KCN-sensitive rate of ferrocytochrome *c* oxidation at 550 nm in freeze-thawed mitochondria preparations (SF, n=21 vs. BF, n=10; \*  $p=0.0157$ ). (B) Quantification of cytochromes *c* (cyt *c*) and *a+a<sub>3</sub>* (cyt *a+a<sub>3</sub>*) in fresh mitochondrial preparations (cyt *c*: SF, n=2 vs. BF, n=3; \*\*  $p<0.01$ ; cyt *a+a<sub>3</sub>*: SF, n=2 vs. BF, n=3; \*\*  $p<0.01$ ). (C) Electron turnover number of cytochrome *c* oxidase was obtained in freeze-thawed mitochondria preparations (SF, n=21 vs. BF, n=10; \*\*\*  $p=0.0017$ ). Bars represent mean  $\pm$  SEM. Statistical analysis was performed using Student's t-test. doi:10.1371/journal.pone.0007854.g001

induction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation, particularly at 24 h ABM, when a 5.3 fold increase was observed compared to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production rates in the uncoupled state (Figure 3, *inset*). This result shows that the potential to generate ROS is still present in the mitochondria of BF insects, indicating that a regulatory mechanism is acting to prevent ROS formation.

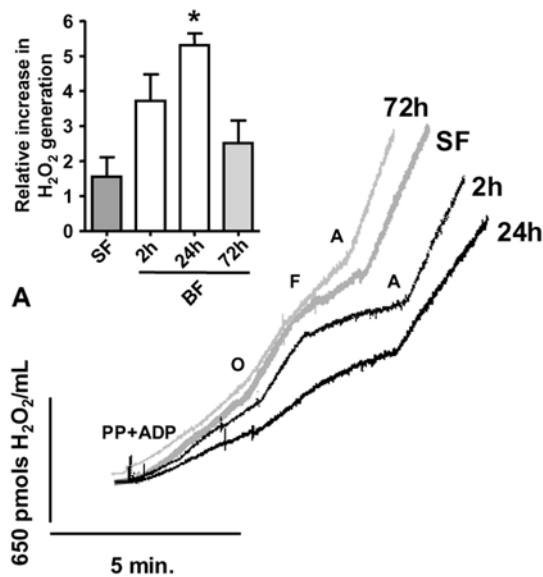
## Discussion

The pioneer studies of Gonda and Avi-Dor were the first to show oxygen consumption and phosphate esterification induced

by TCA cycle substrates in a particulated fraction from whole SF *A. aegypti* [38,39]. Since then, a number of physiological and metabolic effects triggered by blood meal were identified in hematophagous vectors [31–36,40–44]. Despite the medical importance, a detailed evaluation of mitochondrial function in a blood-feeding organism was lacking. The present report represents the first assessment of mitochondrial structure and function in a hematophagous model during the entire blood digestion cycle. The data presented here indicates that blood feeding induces reversible functional changes in mitochondria of *A. aegypti* FM, which occur in parallel to the course of blood digestion. A



**Figure 2. Mitochondrial fusion triggered by blood meal in *A. aegypti* FM.** Transmission electron microscopy of transversal sections of *A. aegypti* FM fed on (A) sugar or (B) blood 24 h ABM showing the general architecture of myofibrils (asterisks) and the giant mitochondria (M). Longitudinal sections of *A. aegypti* FM fed on (C) sugar or (D) blood showing the myofibrils (asterisks) and the giant mitochondria (M). Scale bars represent 2 μm. (E) Mitochondrial density in sugar-fed (SF, grey bars) and 24 h ABM (BF, white bars) was calculated by dividing the number of organelles (SF, n=23 vs. BF, n=18; \*\*\*  $p<0.0001$ ) per 10 μm<sup>2</sup>. (F) Relative mitochondrial area in sugar-fed (SF, grey bars) and 24 h ABM (BF, white bars) was calculated by measuring absolute mitochondrial size and dividing by the absolute area of myofibrils (SF, n=61 vs. BF, n=41; \*  $p<0.05$ ). (G) Expression of mitofusin (*Mfn*) and optic atrophy 1 (*Opa*) mRNA levels evaluated by qPCR in sugar-fed (dashed line) and 24 h ABM (white bars) (\*  $p<0.05$ ). Bars represent mean  $\pm$  SEM and statistical analysis between groups was performed using Student's t-test. doi:10.1371/journal.pone.0007854.g002



**Figure 3. Blood feeding induces a time-dependent reversible inhibition of mitochondrial  $H_2O_2$  generation.** Representative traces of  $H_2O_2$  formation from sugar fed (SF, thick gray line) and three different times ABM (2 h, 24 h and 72 h) of *A. aegypti* FM mitochondria using 10 mM of the substrates pyruvate-proline. Additions were 10 mM pyruvate-proline and 1 mM ADP (PP + ADP). The non-phosphorylating state 4-like respiration was induced by the addition of 4  $\mu$ g/mL oligomycin (O). Uncoupled respiration was measured after the addition of up to 5  $\mu$ M FCCP (F). To assess the maximum  $H_2O_2$  generation rate, 4  $\mu$ g/mL of antimycin a (A) was added after FCCP. **The inset.** The maximum capacity of mitochondrial  $H_2O_2$  formation was measured by the addition of antimycin a after FCCP-stimulated uncoupled respiration. Values were expressed as the relative increase (folds) of antimycin a on  $H_2O_2$  formation compared to FCCP and represent mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses between groups were performed using ANOVA and *a posteriori* Tukey's test. (\*  $p < 0.01$ , relative to SF). doi:10.1371/journal.pone.0007854.g003

summary of the observed effects induced by blood meal on FM mitochondria is schematically depicted in Figure 4.

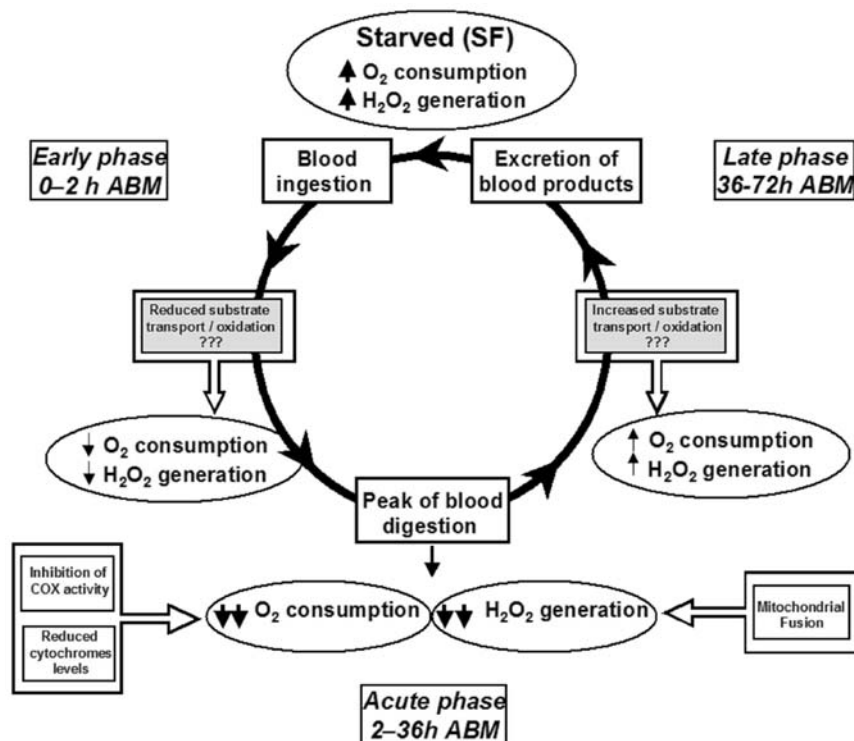
We propose three distinct phases of mitochondrial structure and function changes which were identified during blood meal digestion in *A. aegypti*. The first one is the “early” phase (up to 2 h ABM), when both respiration and  $H_2O_2$  generation at state 3 were slightly reduced by 27.5% and 18%, respectively (Tables 2 and 3). Possibly, signals released by the large distention of the midgut may be required at that time to promote the rapid changes

observed in mitochondrial function. The “acute” phase (between 2 h and 36 h) represents the time period, which the effects of BF on mitochondrial structure and function were further potentiated with oxygen consumption and  $H_2O_2$  generation decreased by 68.7% and 51.6% at state 3, respectively (Tables 2 and 3). Interestingly, both parameters were reversibly inhibited, reaching their lowest levels at 24 h ABM (Figures S3 and S4, Tables 2 and 3) when the digestion of host blood is at its maximum [32]. In this sense, changes in the hemolymphatic levels of the steroid hormone ecdysone and the terpenoid juvenile hormone (JH) could be involved in repressing oxygen consumption and  $H_2O_2$  production observed at this time point. It is known that ecdysone levels increase whereas JH drops in the first hours of blood digestion, reaching the maximum changes at 24 h ABM [44]. It is important to note that the observed alterations promoted by blood feeding were not due to an overall mitochondrial shutdown since the activity of some inner membrane complexes, such as the  $F_1F_0$  ATPase, complex I-III and G3PDH-complex III remained unchanged (Figure S1). Rather, our data shows that BF induces selective changes on FM mitochondrial function since cytochrome *c* oxidase activity and the contents of cytochromes *c* and *a+a<sub>3</sub>* were significantly reduced 24 h ABM (Figure 1). We speculate that mitochondrial fusion (Figure 2) may also be involved in the reduction of oxygen consumption and, especially, on the  $H_2O_2$  production observed at 24 h ABM. Finally, in the “late” phase (between 36 h and 72 h), most of the mitochondrial aspects studied here were restored to levels comparable to SF. Particularly relevant to notice is that mitochondrial oxygen consumption is reversibly decreased in such a way that addition of the uncoupler FCCP did not restore the respiratory rate to the levels exhibited by SF insects (Figures S1 and S3; Tables 1 and 2). This indicates that either substrate transport/oxidation is decreased or ETC is somehow impaired. However, it is unlikely that reductions in oxygen consumption observed in BF insects would be a consequence of nitric oxide-induced cytochrome *c* oxidase inhibition [45] since *Aedes aegypti* does not code for a canonical nitric oxide synthase (Silva-Neto, MAC – personal communication). Nevertheless, since cytochrome *c* oxidase activity is significantly reduced 24 h ABM this indicates that reduction in electrons flow at this ETC complex affects respiratory rates, despite the increase in electron turnover (Figure 1C). Moreover, at this time point, mitochondria from BF mosquitoes were in a more fused state (Figure 2) an event that was preceded by a reduction in  $H_2O_2$  generation (Figure 3 and Table 3). Taken together, our data shows that mitochondrial remodeling is part of a finely regulated program triggered by blood feeding in *A. aegypti*, which may represent an important adaptation to hematophagy.

**Table 3. Rates of hydrogen peroxide generation in FM mitochondria from SF and BF *A. aegypti* along the blood digestion process oxidizing pyruvate and proline.**

	PP + ADP	% red.	Oligo	% red.	FCCP	% red.	AA	% red.
SF	419.1 $\pm$ 89.6 (n = 9)	–	714.1 $\pm$ 124.3 (n = 9)	–	368.1 $\pm$ 104.4 (n = 9)	–	827.4 $\pm$ 205.3 (n = 9)	–
BF 2 h	341.4 $\pm$ 8.43 (n = 11)	18,50%	563.1 $\pm$ 32.7 (n = 9)	21,10%	193.9 $\pm$ 30.6 (n = 11)	47,30%	721.1 $\pm$ 146.0 (n = 3)	12,85%
BF 24 h	203.0 $\pm$ 15.5 (n = 17) <sup>c</sup>	51,60%	281.6 $\pm$ 55.7 (n = 7) <sup>c</sup>	60,60%	128.2 $\pm$ 20.1 (n = 7)	65,20%	681.1 $\pm$ 42.8 (n = 4)	17,68%
BF 72 h	268.0 $\pm$ 42.21 (n = 12)	36,10%	426.5 $\pm$ 70.9 (n = 11)	40,20%	187.4 $\pm$ 48.9 (n = 13) <sup>b</sup>	49,10%	634.6 $\pm$ 145.8 (n = 10)	23,30%

$H_2O_2$  formation in SF and in BF three different times ABM (2 h, 24 h and 72 h) *A. aegypti* FM mitochondria was determined. Values were expressed as mean  $\pm$  SEM of pmols  $H_2O_2$  generated/min/mg protein in four different mitochondrial metabolic states using: 10 mM pyruvate + proline + 1 mM ADP (PP+ADP), followed by the addition 4  $\mu$ g/mL oligomycin (Oligo) and 5  $\mu$ M FCCP. To assess the maximum  $H_2O_2$  generation rates, 4  $\mu$ g/mL antimycin a (A) were added after FCCP. Inhibition of  $H_2O_2$  formation induced by BF were expressed as percentage relative to their respective metabolic states in SF. Statistical analyses between groups were performed by using ANOVA and *a posteriori* Tukey's test. <sup>b</sup>,  $p < 0.01$ ; <sup>c</sup>,  $p < 0.001$ , relative to SF. doi:10.1371/journal.pone.0007854.t003



**Figure 4. Schematic representation of the effects promoted by blood feeding on *A. aegypti* FM mitochondria.** In starved insects (sugarfed, SF) the oxygen consumption and  $H_2O_2$  generation rates the levels of cytochromes *c* and *a + a<sub>3</sub>*, as well as the activity of COX, are high. Also, in SF mosquitoes mitochondria are less fused. Ingestion of vertebrate blood triggers a cascade of events that change over time after blood meal (ABM), which takes around 72 h (inner bold black circle). Our results indicate three distinct phases in which changes in mitochondrial structure and function occurs over time in *A. aegypti* FM. These events paralleled blood intake and digestion. First is the “early” phase, which occurs in the first two hours ABM and is characterized by a mild reduction in both oxygen consumption and  $H_2O_2$  generation rates. We speculated that midgut distention induced the release of factors that would reduce substrate transport/oxidation, which mechanistically could explain these events [58]. In the “acute” phase, between 2 h and 36 h ABM, the effects of BF on mitochondrial structure and function are further potentiated being oxygen consumption and  $H_2O_2$  generation drastically reduced. At this phase, COX activity and cytochrome levels were significantly reduced and mitochondria are more fused. Finally, at the “late” phase, between 36 h and 72 h ABM, most of the mitochondrial changes observed here are restored to levels similar to SF. doi:10.1371/journal.pone.0007854.g004

A hypothesis previously raised by our group postulated that a reduction in mitochondrial function, observed in several blood feeding parasites would represent an adaptive response to avoid the synergistic effects of mitochondrial ROS generation and pro-oxidant products of blood digestion [46]. We observed here that significant reductions of both oxygen consumption (Figures S1 and S3; Tables 1 and 2) and  $H_2O_2$  production (Figure 3, Figure S4 and Table 3) occurred at 24 h ABM when blood digestion is at its maximum [32]. In this context, trypsin is the major endoprotease in *A. aegypti* [42] that breaks down blood proteins into aminoacids used both as energy and carbon skeleton sources for egg maturation and to replenish maternal reserves. Trypsin expression and secretion behaves biphasically along the blood-feeding process [42]. The “early” form of this enzyme appears in the midgut in the first 4–6 h ABM, whereas the “late” form, that is responsible for most of the proteolytic activity in midgut during blood digestion, occurs between 8 h and 36 h ABM. As changes in mitochondrial oxygen consumption in *A. aegypti* began almost immediately ABM, even 15 minutes after feeding (Figure S3, Table 2) when blood digestion has not started yet, the involvement of blood digestion products on the mitochondrial changes observed here could only be considered in later times (24 h–40 h). Therefore, at this early period, alterations in mitochondrial function can be related to other signals, such as mechanical distention of the midgut. At later time points, heme and/or iron, derived from blood digestion,

could reach *A. aegypti* hemolymph and act both as stressors and as signaling compounds, as it has been reported for the kissing bug *R. prolixus* [25,47]. In this regard, previous works have demonstrated that reduction in the mitochondrial protein frataxin, affect mitochondrial iron metabolism [48] and oxidative phosphorylation [49]. Whether frataxin mediates blood meal-induced mitochondrial remodeling in *A. aegypti* remains to be elucidated. Notwithstanding, recent evidence from Zhou and co-workers [50] has shown that in *A. aegypti* females most of the blood meal-derived iron is excreted and the remaining is essentially directed to the eggs. Curiously, hemolymphatic levels of iron do not significantly change over *Aedes* digestion cycle [50]. Further research is needed to determine which factors are implicated in the mitochondrial functional and morphological changes triggered by blood feeding.

Microarray analysis of whole *Anopheles gambiae* 24 h ABM revealed that 64 transcripts related to intermediary metabolism were down regulated; more specifically 28 linked to oxidative phosphorylation and 9 to glycolytic pathway [40]. A further study has shown that in *A. gambiae* 171 transcripts related to intermediary metabolism were differently expressed during blood feeding [41]. Particular interesting is the reduced expression of pyrroline-5-carboxylate reductase, an enzyme involved in proline utilization as an energy substrate during flight in *A. aegypti* [41]. Therefore, the microarray data showing down regulation of both oxidative and fermentative metabolism were interpreted as a change in energy

demand by blood-engorged female, whose energy priority would be shifted towards oogenesis while the starved mosquito has to invest energy in flight to get the blood meal. The huge blood meal intake presents an enormous payload to the flight muscle since *A. aegypti* ingests, in a single meal, about 2.5 times its own body weight in blood. Afterwards, keeping a high metabolic demand in FM would compete for substrates in tissues with an emerging demand to support the oogenesis/embryogenesis (ovaries) [44]. However, some apparent discrepancies were found between the data presented here for *Aedes* and the microarray studies conducted in *Anopheles*, which showed reduced expression of genes related to oxidative phosphorylation and TCA cycle after blood feeding [40,41]. In this sense, despite the reduced expression of glycerol-3-phosphate dehydrogenase, six subunits of NADH-ubiquinone oxidoreductase, four subunits of ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase and six subunits of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>ATP synthase ABM [51] in *Aedes* midgut, the functional analyses conducted here shows that these mitochondrial components were not affected in FM after a blood feeding (Figure S2). On the other hand, reductions in both cytochrome *c* oxidase activity and cytochromes *a*+*a*<sub>3</sub> levels (Figure 1) in *Aedes aegypti* were in agreement with reduced expression of six subunits of the mitochondrial ETC complex in *Anopheles* [40]. Nevertheless, reductions in FM mitochondrial activity and oxygen consumption may represent a strategy developed by this insect to divert substrates utilization to other tissues with increased metabolic demands involved in activities other than flight. Thus, in addition to the consequences of the redox balance on mitochondrial remodeling observed here, the present study provides a strong bioenergetic explanation of reduced locomotion observed in blood-engorged mosquitoes.

Despite the obvious role in energy and redox metabolism as well as in apoptosis, mitochondria are very dynamic organelles, varying in size and shape in different cells under diverse stimuli. Although the first evidence of mitochondrial dynamics was reported almost 40 years ago [52] the molecular mechanisms that underlie mitochondrial fission and fusion are still being elucidated [53,54]. Mitochondrial fusion was related to protective events since the organelle can exchange damaged DNA and even rescue membrane potential [10,55]. It has also been shown that high glucose concentrations increased both ROS production and mitochondrial fission in rat heart muscle cells [6,7]. Inhibition of fission machinery, and consequently maintenance of fused mitochondria, abrogates ROS generation, suggesting that mitochondria fuse to control ROS production [6,7]. Induction of mitochondrial hyperfusion in cells exposed to specific stresses results in a highly interconnected mitochondrial network, representing a novel adaptive pro-survival response against different stresses [56]. Based on the data shown in figure 2, blood-feeding in *A. aegypti* triggers signaling responses, leading to an activation of both *Mfn* and *OPA1*, and resulting in mitochondrial fusion, an event parallel to a reduction in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (Figure 3, Table 3). However, in *A. aegypti*, observation of reduced H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation (2 h ABM, Figure 3 and Table 3) occurs prior to the increase in expression of fusion genes (14 h ABM, data not shown), indicating that mitochondrial fusion is a later event that takes place after the reduction of ROS levels. Nevertheless, recent evidence obtained in *Drosophila* has pointed out the key role of *OPA1* on reduced ROS generation, resistance to oxidative stress and lifespan [57]. This aspect deserves additional studies to further elucidate the relationship between mitochondrial redox metabolism and dynamics in *A. aegypti*.

The rate of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production represents the steady-state level between molecules produced by mitochondria and those that are detoxified by the antioxidant systems. After

blood feeding, the transcript abundance of important antioxidant enzymes, such as catalase and superoxide dismutase, was increased in *Aedes* midgut and whole *Anopheles* mosquitoes [40,51]. One could argue that reduced rates of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation observed in *Aedes* FM mitochondria upon blood feeding (Figure 3, Table 3) could be explained by the increased levels of the antioxidant defenses. However, the rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production in isolated FM mitochondria were decreased by 18.5% and 47.3% in state 3 and FCCP-induced respiration, respectively, 2 h ABM (Figure 3 and Table 3) a time point where there is no increase in the transcript levels of antioxidant enzymes [51]. The same conclusion is reinforced by the observation that maximal H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation rates, measured after the addition of antimycin A [1], were not altered between SF and any of the BF time points (Figure 3 and Table 3). In fact, the relative increment in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation was even increased 24 h ABM (Figure 3 *inset*) indicating that the potential to generate ROS is still present in BF mosquitoes and that increased levels of antioxidant defenses can not explain, *per se*, the transient reduction of mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation. We also need to consider that the microarray study conducted in *Aedes* [51] was carried out using the insect midgut and not the FM, tissues with very different functions and therefore with distinct metabolic demands. Mechanistically, reductions in mitochondrial oxygen consumption and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation triggered by a blood meal could be explained by reduced electron flow in the ETC produced by either diminished mitochondrial substrate uptake [58] and/or oxidation.

Taken together, the results presented here show that changes in *A. aegypti* FM mitochondrial metabolism and structure are linked to blood intake and may represent an important adaptive mechanism to hematophagy. Further analysis of this system will provide insights not only into the consequences of changes in mitochondrial function induced by blood feeding on the energy and redox metabolism but also on the signaling pathways involved in these events.

## Supporting Information

**Figure S1** Blood meal reduces oxygen consumption in *A. aegypti* FM mitochondria. Representative oxygen consumption traces of sugar fed (SF, solid lines) and 24 h ABM (BF, dashed lines) *A. aegypti* FM mitochondria using 10 mM of the substrates pyruvate-proline (PP) (A) and glycerol 3-phosphate (G3P) (B). The phosphorylating state 3 respiration was induced by the addition of 1 mM ADP (ADP) and is indicated by the dotted lines. The non-phosphorylating state 4-like respiration was induced by the addition of 4 μg/mL oligomycin (o). Uncoupled respiration was measured by using up to 5 μM FCCP (F).

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007854.s001 (2.43 MB TIF)

**Figure S2** Mitochondrial yield and purity do not change regardless the *A. aegypti* diet. Comparison of enzyme activities in sugar-fed (SF, gray bars) and 24 h ABM (BF, white bars) *A. aegypti* FM mitochondria. (A) Azide-sensitive F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATPase activity was measured in frozen-thawed mitochondrial preparations (SF, n = 7 vs. BF, n = 5; *p* = 0.7803). (B) NADH-cytochrome *c* oxidoreductase (complexes I - III) measured as the rotenone-sensitive rate of NADH-stimulated reduction of ferricytochrome *c* at 550 nm (SF, n = 17 vs. BF, n = 7; *p* = 0.4447). (C) G3P-cytochrome *c* oxidoreductase (complexes II - III), measured as the antimycin A-sensitive rate of G3P-stimulated reduction of ferricytochrome *c* at 550 nm (SF, n = 14 vs. BF, n = 7; *p* = 0.3629). Bars represent mean ± SEM. Statistical analyses were performed by using the Student's *t*-test.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007854.s002 (0.02 MB PDF)

**Figure S3** Blood meal induces a time-dependent reversible inhibition of mitochondrial oxygen consumption. Representative traces of oxygen consumption in sugar fed (SF, solid black line) and five different times ABM (0.25 h, 2 h, 24 h, 40 h and 72 h - solid grey, dashed and dotted lines) *A. aegypti* FM mitochondria using 10 mM of the substrates pyruvate-proline (PP). The phosphorylating state 3 respiration was induced by the addition of 1 mM ADP (ADP), and the non-phosphorylating state 4-like respiration was induced by the addition of 4 µg/mL oligomycin (O). Uncoupled respiration was measured by using 5 µM FCCP (F). Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007854.s003 (2.43 MB TIF)

**Figure S4** Blood-feeding reduces mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation induced by G3P. Representative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation traces of sugar fed (SF, gray line) and 24 h ABM (BF, black line) *A. aegypti* FM mitochondria using 10 mM of glycerol 3-phosphate + 1 mM ADP (G3P+ADP). Found at: doi:10.1371/journal.pone.0007854.s004 (2.43 MB TIF)

## References

1. Boveris A, Chance B (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 134: 707–716.
2. Brookes PS, Levonen AL, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM (2002) Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 33: 755–764.
3. Miwa S, St Pierre J, Partridge L, Brand MD (2003) Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic Biol Med* 35: 938–948.
4. Miwa S, Brand MD (2005) The topology of superoxide production by complex III and glycerol 3-phosphate dehydrogenase in *Drosophila* mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1709: 214–219.
5. Korshunov SS, Skulachev VP, Starkov AA (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett* 416: 15–18.
6. Yu T, Sheu SS, Robotham JL, Yoon Y (2008) Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovasc Res* 79: 341–351.
7. Yu T, Robotham JL, Yoon Y (2006) Increased production of reactive oxygen species in hyperglycemic conditions requires dynamic change of mitochondrial morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2653–2658.
8. Nishikawa T, Edelstein D, Du XL, Yamagishi S, Matsumura T, et al. (2000) Normalizing mitochondrial superoxide production blocks three pathways of hyperglycaemic damage. *Nature* 404: 787–790.
9. Riva A, Tandler B, Lesnefsky EJ, Conti G, Loffredo F, et al. (2006) Structure of cristae in cardiac mitochondria of aged rat. *Mech Ageing Dev* 127: 917–921.
10. Detmer SA, Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 870–879.
11. Sacktor B (1965) Energetic and respiratory metabolism of molecular contraction. In: Rockstein M, ed. *The Physiology of Insecta*. New York and London: University of Miami School of Medicine, Florida. Academic Press, Vol. 2, Vol. 2. pp 483–580.
12. Wigglesworth VB, Lee WM (1982) The supply of oxygen to the flight muscles of insects: a theory of tracheole physiology. *Tissue Cell* 14: 501–518.
13. Hetz SK, Bradley TJ (2005) Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature* 433: 516–519.
14. Ferguson M, Mockett RJ, Shen Y, Orr WC, Sohal RS (2005) Age-associated decline in mitochondrial respiration and electron transport in *Drosophila melanogaster*. *Biochem J* 390: 501–511.
15. Yan IJ, Levine RL, Sohal RS (1997) Oxidative damage during aging targets mitochondrial aconitase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11168–11172.
16. Yan IJ, Sohal RS (1998) Mitochondrial adenine nucleotide translocase is modified oxidatively during aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 12896–12901.
17. Lenaz G, Bovina C, D'Aurelio M, Fato R, Formiggini G, et al. (2002) Role of mitochondria in oxidative stress and aging. *Ann N Y Acad Sci* 959: 199–213.
18. Sohal RS, Weindruch R (1996) Oxidative stress, caloric restriction, and aging. *Science* 273: 59–63.
19. Mair W, Piper MD, Partridge L (2005) Calories do not explain extension of life span by dietary restriction in *Drosophila*. *PLoS Biol* 3: e223.
20. Schulz TJ, Zarse K, Voigt A, Urban N, Birringer M, et al. (2007) Glucose restriction extends *Caenorhabditis elegans* life span by inducing mitochondrial respiration and increasing oxidative stress. *Cell Metab* 6: 280–293.
21. Magwere T, Goodall S, Skepper J, Mair W, Brand MD, et al. (2006) The effect of dietary restriction on mitochondrial protein density and flight muscle mitochondrial morphology in *Drosophila*. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 61: 36–47.
22. Lin SJ, Defossez PA, Guarente L (2000) Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by caloric restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 289: 2126–2128.
23. Briegel H, Lea AO (1975) Relationship between protein and proteolytic activity in the midgut of mosquitoes. *J Insect Physiol* 21: 1597–1604.
24. Zhou G, Pennington JE, Wells MA (2004) Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. *Insect Biochem Mol Biol* 34: 919–925.
25. Graca-Souza AV, Maya-Monteiro C, Paiva-Silva GO, Braz GR, Paes MC, et al. (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 322–335.
26. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
27. Chance B, Williams GR (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 217: 409–427.
28. Chance B, Williams GR (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra. *J Biol Chem* 217: 395–407.
29. Pfaffl MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
30. Gentile C, Lima JB, Peixoto AA (2005) Isolation of a fragment homologous to the rp49 constitutive gene of *Drosophila* in the Neotropical malaria vector *Anopheles aquasalis* (Diptera: Culicidae). *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100: 545–547.
31. Giulivi C, Ross-Inta C, Horton AA, Luckhart S (2008) Metabolic pathways in *Anopheles stephensi* mitochondria. *Biochem J* 415: 309–316.
32. Noriega FG, Wells MA (1999) A molecular view of trypsin synthesis in the midgut of *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 45: 613–620.
33. Goldstrohm DA, Pennington JE, Wells MA (2003) The role of hemolymph proline as a nitrogen sink during blood meal digestion by the mosquito *Aedes aegypti*. *J Insect Physiol* 49: 115–121.
34. Zhou G, Pennington JE, Wells MA (2004) Utilization of pre-existing energy stores of female *Aedes aegypti* mosquitoes during the first gonotrophic cycle. *Insect Biochem. Mol. Biol* 34: 919–925.
35. Sanders HR, Evans AM, Ross LS, Gill SS (2003) Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 1105–1122.
36. Scaraffia PY, Wells MA (2003) Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *J Insect Physiol* 49: 591–601.
37. Bursell E (1975) Substrates of oxidative metabolism in dipteran flight muscle. *Comp Biochem Physiol B* 52: 235–238.
38. Gonda O, Traub A, Avi-Dor Y (1957) The oxidative activity of particulate fractions from mosquitoes. *Biochem J* 67: 487–493.
39. Avi-Dor Y, Gonda O (1959) Studies on the adenosine triphosphate-phosphate exchange and the hydrolysis of adenosine triphosphate catalysed by a particulate fraction from the mosquito. *Biochem J* 72: 8–14.
40. Ribeiro JM (2003) A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 865–882.
41. Marinotti O, Nguyen QK, Calvo E, James AA, Ribeiro JM (2005) Microarray analysis of genes showing variable expression following a blood meal in *Anopheles gambiae*. *Insect Mol Biol* 14: 365–373.
42. Lu SJ, Pennington JE, Stonehouse AR, Mobula MM, Wells MA (2006) Reevaluation of the role of early trypsin activity in the transcriptional activation of the late trypsin gene in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 36: 336–343.
43. Pascoa V, Oliveira PL, Dansa-Petretski M, Silva JR, Alvarenga PH, et al. (2002) *Aedes aegypti* peritrophic matrix and its interaction with heme during blood digestion. *Insect Biochem Mol Biol* 32: 517–523.
44. Clements AN (1992) Development, Nutrition and Reproduction. In: Chapman & Hall, ed. *The Biology of mosquito*. New York.

## Acknowledgments

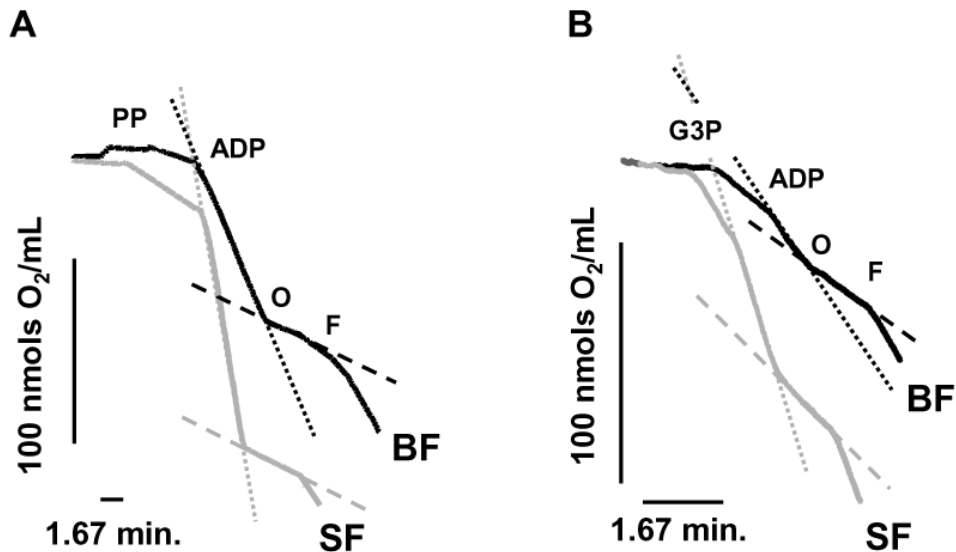
We are indebted to Prof. Ednildo A. Machado for the kind support of the mosquito facility. We would like to thank Dr. Ryan C. Jochim for the excellent editorial assistance. We are also thankful to MSc. Claudio Figueira for the technical support on electronic microscopy, to Mr. João V. de Oliveira Neto and to Mrs. Kátia Anastácio Laia for the excellent technical assistance.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: RLSG GOPS MHFS MMM MFO. Performed the experiments: RLSG ACLM MMM JHMO MFO. Analyzed the data: RLSG ACLM JHMO MAVS AG plo MFO. Contributed reagents/materials/analysis tools: RLSG GOPS MHFS MMM MAVS AG plo MFO. Wrote the paper: RLSG GOPS MHFS MAVS AG plo MFO.

45. Cleeter MW, Cooper JM, Darley-USmar VM, Moncada S, Schapira AH (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett* 345: 50–54.
46. Oliveira PL, Oliveira MF (2002) Vampires, Pasteur and reactive oxygen species. Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites? *FEBS Lett* 525: 3–6.
47. Dansa-Petretski M, Ribeiro JM, Atella GC, Masuda H, Oliveira PL (1995) Antioxidant role of Rhodnius prolixus heme-binding protein. Protection against heme-induced lipid peroxidation. *J Biol Chem* 270: 10893–10896.
48. Radisky DC, Babcock MC, Kaplan J (1999) The yeast frataxin homologue mediates mitochondrial iron efflux. Evidence for a mitochondrial iron cycle. *J Biol Chem* 274: 4497–3399.
49. Ristow M, Pfister MF, Yee AJ, Schubert M, Michael L, et al. (2000) Frataxin activates mitochondrial energy conversion and oxidative phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 12239–12243.
50. Zhou G, Kohlhepp P, Geiser D, Frasquillo MC, Vazquez-Moreno L, et al. (2007) Fate of blood meal iron in mosquitoes. *J Insect Physiol* 53: 1169–1178.
51. Sanders HR, Evans AM, Ross LS, Gill SS (2003) Blood meal induces global changes in midgut gene expression in the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* 33: 1105–1122.
52. Tandler B, Erlandson RA, Smith AL, Wynder EL (1969) Riboflavin and mouse hepatic cell structure and function. II. Division of mitochondria during recovery from simple deficiency. *J Cell Biol* 41: 477–493.
53. Hales KG, Fuller MT (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90: 121–129.
54. McQuibban GA, Lee JR, Zheng L, Juusola M, Freeman M (2006) Normal mitochondrial dynamics requires rhomboid-7 and affects *Drosophila* lifespan and neuronal function. *Curr Biol* 16: 982–989.
55. Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, et al. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 27: 433–446.
56. Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, et al. (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28: 1589–1600.
57. Tang S, Le PK, Tse S, Wallace DC, Huang T (2009) Heterozygous mutation of Opa1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One* 4: e44.
58. Neretti N, Wang PY, Brodsky AS, Nyguen HH, White KP, et al. (2009) Long-lived Indy induces reduced mitochondrial reactive oxygen species production and oxidative damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 106: 2277–2282.

Supporting information



**Figure S1:**

Figure S1.

Blood meal reduces oxygen consumption in *A. aegypti* FM mitochondria. Representative oxygen consumption traces of sugar fed (SF, solid lines) and 24 h ABM (BF, dashed lines) *A. aegypti* FM mitochondria using 10 mM of the substrates pyruvate-proline (PP) (A) and glycerol 3-phosphate (G3P) (B). The phosphorylating state 3 respiration was induced by the addition of 1 mM ADP (ADP) and is indicated by the dotted lines. The non-phosphorylating state 4-like



respiration was induced by the addition of 4  $\mu\text{g/mL}$  oligomycin (o). Uncoupled respiration was measured by using up to 5  $\mu\text{M}$  FCCP (F).

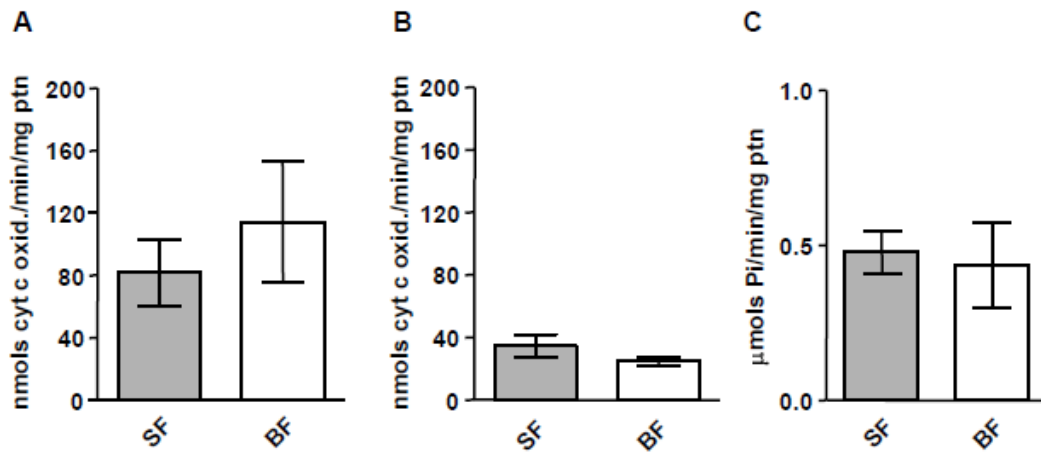


Figure S2.

Mitochondrial yield and purity do not change regardless the *A. aegypti* diet. Comparison of enzyme activities in sugar-fed (SF, gray bars) and 24 h ABM (BF, white bars) *A. aegypti* FM mitochondria. (A) Azide-sensitive  $F_1F_o$ -ATP activity was measured in frozen-thawed mitochondrial preparations (SF,  $n = 7$  vs. BF,  $n = 5$ ;  $p = 0.7803$ ). (B) NADH-cytochrome c oxidoreductase (complexes I - III) measured as the rotenone-sensitive rate of NADH-stimulated reduction of ferricytochrome c at 550 nm (SF,  $n = 17$  vs. BF,  $n = 7$ ;  $p = 0.4447$ ). (C) G3P-cytochrome c oxidoreductase (complexes II - III), measured as the antimycin a-sensitive rate of

G3P-stimulated reduction of ferricytochrome c at 550 nm (SF, n = 14 vs. BF, n = 7; p = 0.3629).

Bars represent mean  $\pm$  SEM. Statistical analyses were performed by using the Student's t-test.

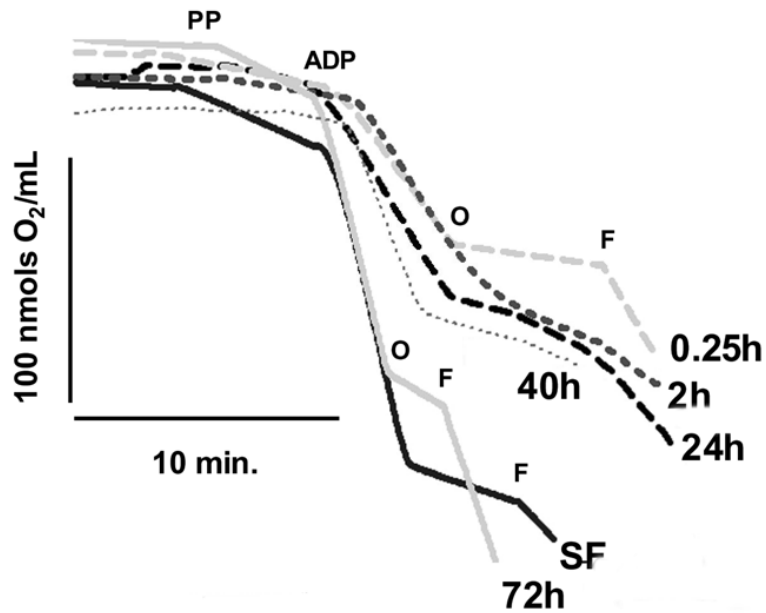
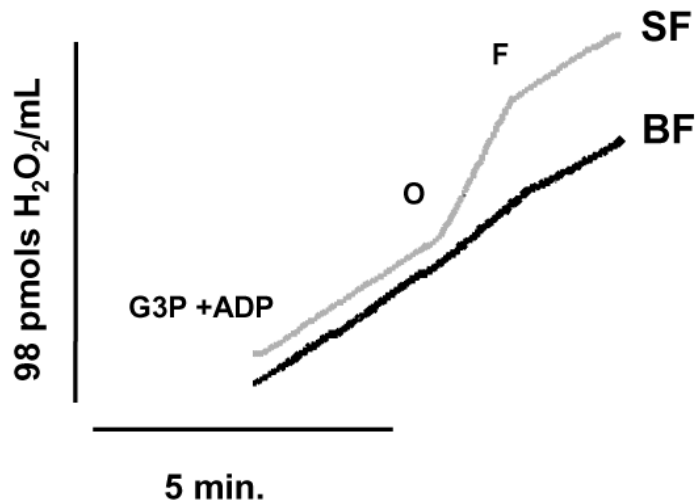


Figure S3.

Blood meal induces a time-dependent reversible inhibition of mitochondrial oxygen consumption. Representative traces of oxygen consumption in sugar fed (SF, solid black line) and five different times ABM (0.25 h, 2 h, 24 h, 40 h and 72 h - solid grey, dashed and dotted lines) *A. aegypti* FM mitochondria using 10 mM of the substrates pyruvate-proline (PP). The

phosphorylating state 3 respiration was induced by the addition of 1 mM ADP (ADP), and the non-phosphorylating state 4-like respiration was induced by the addition of 4  $\mu\text{g/mL}$  oligomycin (O). Uncoupled respiration was measured by using 5  $\mu\text{M}$  FCCP (F).



**Figure S4:**

Figure S4.

Blood-feeding reduces mitochondrial  $\text{H}_2\text{O}_2$  generation induced by G3P. Representative  $\text{H}_2\text{O}_2$  formation traces of sugar fed (SF, gray line) and 24 h ABM (BF, black line) *A. aegypti* FM mitochondria using 10 mM of glycerol 3-phosphate + 1 mM ADP (G3P+ADP).

---

## Perspectivas I



Avaliar a contribuição da digestão do sangue para a alteração do metabolismo mitocondrial. Para isso suplementaremos o sangue com uma droga capaz de inibir a digestão de sangue do mosquito, o SBTI (inibidor de tripsino-proteases).



Avaliar se outras dietas, que não o sangue, são capazes de alterar as taxas de consumo de oxigênio. Para isso, alimentaremos os mosquitos com plasma de coelho ou outras fontes protéicas como uma solução de albumina com concentração de proteínas similar ao sangue.



Avaliar a atividade e a expressão de enzimas anti-oxidantes no tórax do mosquito *A. aegypti* ao longo da digestão.



Avaliar as alterações dos supercomplexos mitocondriais pela técnica de BN-PAGE ao longo da digestão.

---

## Resultados II

Os dados apresentados neste manuscrito mostram a participação da mitocôndria na resposta imunológica que o mosquito *A. gambiae* monta contra o *Plasmodium berghei*. Descrevemos uma proteína que está relacionada com a manutenção do acoplamento mitocondrial. Denominamos esta proteína AgMC1 (Anopheles gambiae mitochondrial carrier 1). O silenciamento de AgMC1 reduz o acoplamento e o potencial de membrana da mitocôndria. Por consequência observamos uma redução na geração de ROS. Desta forma, identificamos que alterações na função mitocondrial diminuem a resistência do mosquito a infecção pelo *Plasmodium berghei*. Este manuscrito é fruto do meu estágio de doutorado-sanduiche no grupo da Dr. Carolina Barillas-Mury no Laboratory of Malarial and Vector research (LMVR), NIAID, NIH e foi custeado com recursos da CAPES e do NIH.

Este manuscrito encontra-se em revisão no periódico Journal of Biological Chemistry (JBC).

**MITOCHONDRIAL UNCOUPLING IN THE MOSQUITO *ANOPHELES GAMBIAE*  
ENHANCES *PLASMODIUM* INFECTION**

**Renata L. S. Gonçalves<sup>1,2,4,6</sup>, José Henrique M. Oliveira<sup>1,3,4</sup>, John F. Andersen<sup>4</sup>, Marcus F. Oliveira<sup>2,5</sup>, Pedro L. Oliveira<sup>3,6</sup>, and Carolina Barillas-Mury<sup>4</sup>**

<sup>2</sup>Laboratório de Bioquímica Redox, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>3</sup>Laboratório de Bioquímica de Artrópodes Hematófagos, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; <sup>4</sup>Laboratory of Malaria and Vector Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health, Rockville, MD 29892; <sup>5</sup>Laboratório de Inflamação e Metabolismo, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBE), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil; and <sup>6</sup>Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia em Entomologia Molecular (INCT-EM), Brazil

Running head: Mosquito mitochondrial uncoupling and *Plasmodium* infection

Address correspondence to: Carolina Barillas-Mury, LMVR, NIAID, NIH, Twinbrook III, MSC 8130, 12735 Twinbrook Parkway, Room 2E-20A Bethesda, MD 20892-8130. Fax: 301-480-1337; E-mail: cbarillas@niaid.nih.gov

<sup>1</sup>These authors contributed equally to this work.

**Mitochondria perform multiple roles in cell biology, acting as the site of aerobic energy-transducing pathways and as an important source of reactive oxygen species (ROS) that modulate redox metabolism. Here, we demonstrate that a novel member of the mitochondrial transporter protein family, *Anopheles gambiae* mitochondrial carrier 1 (AgMC1), is required to maintain mitochondrial membrane potential in mosquito midgut cells. AgMC1 silencing increases proton-leak respiration, uncoupling oxidative phosphorylation and reducing mitochondrial membrane potential. This leads to a significant reduction in midgut ROS generation. Interestingly, these metabolic changes decrease *An. gambiae* resistance to *Plasmodium* infection. We provide direct experimental evidence suggesting that ROS derived from mitochondria can modulate mosquito epithelial responses to *Plasmodium* infection.**

Malaria is a deadly disease caused by *Plasmodium* parasites and results in more than one million deaths every year, mainly of African children (1) *Plasmodium* is transmitted by anopheline mosquitoes, and the establishment of this protozoan parasite in the insect vector can be greatly hindered by the ability of mosquitoes to mount effective antiplasmodial responses (2;3). Ookinete invasion of midgut epithelial cells results in irreversible damage that leads to apoptosis (4). Epithelial cells respond to invasion by inducing expression of nitric oxide synthase (NOS) and

peroxidase genes that are thought to mediate protein nitration (5). As ookinetes emerge from the midgut epithelial cells, they come in contact with components of the mosquito immune system present in the hemolymph, such as thioester-containing protein 1 (TEP1), and suffer major parasite losses during the ookinete to oocyst transition (6). Activation of the STAT pathway also mediates a late-phase response, through activation of NOS expression, which reduces the number of early oocysts that survive and form mature oocysts (7).

Previous studies have shown that reactive oxygen species (ROS) levels are elevated in a *An. gambiae* strain refractory to *Plasmodium* infection (8) and that ROS are required for mosquitoes to mount effective immune responses against bacteria and *Plasmodium* (9). The classical source of ROS associated with the immune response is NADPH oxidase/NOX or Duox family of proteins present in the epithelia of both vertebrates (10–12) and invertebrates (13;14). Recent studies in vertebrates revealed that other cellular sources of ROS, such as mitochondria, play an important role in macrophage-mediated immunity (15;16). Mitochondria perform multiple roles in cell biology, acting as the site of aerobic energy-transducing pathways, and are also an important source of cellular ROS (17). A family of proteins involved in the import of solutes required for oxidative phosphorylation, known as solute carrier family 25 (SLC25), are associated with the mitochondrial membrane. The most studied members of the SLC25 family are the uncoupling

proteins (UCP), the adenine nucleotide translocators (ANT) and the phosphate carriers (PiC) (18). Members of SLC25 are structurally and functionally related (18) and are conserved across species, but are poorly explored in insects.

Under normal circumstances, a small portion of electrons leak from the ETC before reaching cytochrome *c* oxidase (complex IV), giving rise to partially reduced oxygen species, commonly known as ROS (19). It is known that small changes in mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) can drastically affect ROS generation (20), and several lines of evidence indicate that pharmacological (21) and/or physiological (21-24)) collapse of  $\Delta\Psi_m$  uncouples oxidative phosphorylation and reduces ROS generation. Furthermore, UCP and ANT are known to promote mitochondrial uncoupling and to reduce ROS production (22, 25). Disruption of UCP2 in a murine model confers resistance to *Toxoplasma gondii* infection through a mechanism that involves increased ROS generation (15).

In this work, mitochondrial function was investigated in *Anopheles gambiae* midgut epithelial cells under different physiological conditions, and a mitochondrial carrier protein of the SLC25 family, mitochondrial carrier 1 (AgMC1), was characterized. In an effort to understand how mitochondrial metabolism contributes to the *An. gambiae* immune response to *Plasmodium*, we explored the hypothesis that mitochondrial respiration in the mosquito midgut is an important source of ROS when epithelial cells respond to ookinete invasion. Our studies reveal a novel link between mitochondrial metabolism and mosquito midgut epithelial immunity and indicate that mitochondrially derived ROS can modulate *An. gambiae* antiplasmodial responses.

## Experimental Procedures

**Insects.** *An. gambiae* (G3 strain) mosquitoes were reared at 28°C, 75% humidity, under a 12-h light/dark cycle and maintained on a 10% sucrose solution during adult stages.

**Midgut Respiration.** Midguts from 30 adult *An. gambiae* females were dissected in isolation buffer consisting of 250 mM sucrose, 5 mM Tris-HCl, 2 mM EGTA, 1% (w/v) fatty acid-free bovine serum albumin (BSA), pH 7.4 and placed on an oxygraph chamber with respiration buffer (120

mM KCl, 5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 3 mM HEPES, 1 mM EGTA, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , and 0.1% fatty acid-free BSA, pH 7.2) supplemented with 0.0025 % digitonin. After 1 min of equilibration, both  $\text{NAD}^+$ -linked substrate (10 mM pyruvate + 10 mM proline) and  $\text{FAD}^+$ -linked substrate (10 mM succinate) were added to the chamber. Subsequently, 1 mM ADP was added to induce the state 3 respiratory rate. State 4-like (oligomycin-stimulated) and uncoupled respiratory rates (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenylhydrazone; FCCP-stimulated) were measured upon addition of 7  $\mu\text{g}$  of oligomycin and up to 7  $\mu\text{M}$  FCCP, respectively. The RCR was calculated by dividing the state 3 respiratory rates to those obtained by the oligomycin-induced state 4 respiratory rates (2 min after oligomycin addition). Oxygen ( $\text{O}_2$ ) consumption was recorded in an oxygraph fitted with a Clark-type electrode in a water-jacketed chamber (Oxytherm). For all experiments, temperature was maintained at 27.5°C and the total reaction volume was 1.0 ml. The respiratory inhibitors rotenone, antimycin A, and cyanide were all capable of completely inhibiting the midgut  $\text{O}_2$  consumption. All mosquitoes used for the respiration assay were 4–7 days old. All mitochondrial respiration results represent the average oxygen consumption of at least six different midgut preparations analyzed in three independent experiments.

## Infection of Mosquitoes with *P. berghei*. Cloning and Sequencing of AgMC1 cDNA. dsRNA Synthesis.

### Gene Silencing.

**Quantitation of Gene Expression.** see Supporting Information [SI]

### Midgut hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) Production.

$\text{H}_2\text{O}_2$  production was assessed by monitoring resorufin fluorescence due to the oxidation of 5 mM Amplex Red (Invitrogen) in the presence of 1.0 unit/ml HRP (Sigma). Five midguts were dissected in PBS and incubated at room temperature and dim light in PBS with Amplex Red and HRP for 30 min. Fluorescence intensity was measured in the supernatant in a spectrofluorometer plate reader (SpectraMax Gemini XPS; Molecular Devices) operating at excitation and emission wavelengths of 530 nm and 590 nm, respectively. Background fluorescence generated as unspecific Amplex Red

oxidation by the midgut in the absence of HRP was subtracted. After each experiment, a standard curve of reagent grade H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Germany) was performed.

**ROS Production in Midgut Cultures.** Midguts of sugar-fed mosquitoes were dissected in PBS and incubated at room temperature in dim light in RPMI supplemented with 10% FBS containing 5  $\mu$ M of the intracellular ROS-sensitive dye DHE (Molecular Probes) for 20 min. Midguts were washed with fresh media, mounted in glass slides, and immediately photographed under a fluorescence microscope (Leica, Solms, Germany). Figure 3F is a representative image of 13 midguts analyzed in each condition (LacZ or AgMC1) from two independent batches of silenced mosquitoes that generated similar results.

**Midgut Mitochondrial Staining.** Females were fed with a solution containing PBS + MitoTracker Red (CM-H2-XRos; Molecular Probes) (20 mM) + ATP (0.5 mM), pH 7. One hour after feeding, the midguts were dissected in PBS, fixed with paraformaldehyde (4 %) for 40–60 minutes in the dark, washed twice with PBS, permeabilized with Triton X-100 (0.01 %) for 3–5 min, and washed again. F-actin was stained with Phalloidin-Alexa 488 (Molecular Probes) (165 nM) diluted in PBS + BSA 1% at room temperature for 20 min followed by two washings with PBS. Finally, the midguts were transferred to glass slides and mounted with VectaShield with DAPI (Vector Laboratories). Images were acquired on a SP2 confocal microscope (Leica). Figure 3E is a representative image of three independent experiments.

**Early Oocyst Count.** see Supporting Information [SI]

**Molecular Modeling of AgMC1.** The sequence of AgMC1 was submitted for automated molecular modeling using the Phyre protein fold recognition server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/>), which identifies homologs with known structures using PSI-BLAST and generates a homology-based model using the three-dimensional coordinates and the amino acid sequence alignment information (26).

## RESULTS

### **Effect of Blood Feeding and *Plasmodium berghei* Infection on Mitochondrial Oxygen Consumption of *An. gambiae* Midgut Epithelial Cells.**

Mitochondrial respiration was investigated in permeabilized *An. gambiae* midgut preparations. Addition of three different substrates that feed electrons to the ETC (see Supporting Information [SI], Fig. S1)—proline, pyruvate and succinate—increased the ADP-stimulated respiratory rates (state 3) to different extents (Fig. 1A). The addition of oligomycin, an inhibitor of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase that is used to evaluate phosphorylation-independent oxygen consumption (state 4), significantly reduced the respiratory rates for most substrates (Fig. 1B). Noteworthy, addition of proline alone barely stimulated oxygen consumption (Fig. 1A) and subsequent addition of oligomycin did not significantly alter the respiratory rate (Fig. 1B). Simultaneous addition of the three oxidizable substrates resulted in the highest rate of state 3 respiration (Fig. 1A) and the highest respiratory control ratio (RCR = state 3/state 4 respiration, an index used to assess mitochondrial inner membrane integrity) (Fig. 1C); therefore this mixture of substrates was used in all subsequent experiments. The RCR was obtained by dividing the rate of oxygen consumption at state 3 by the rate of oxygen consumption at the state 4-like respiration. The effect of blood feeding and *P. berghei* infection on the midgut respiratory capacity was evaluated. Midguts of sugar-fed and blood-fed mosquitoes 24 h post feeding have similar oxygen consumption rates in both state 3 and oligomycin-induced state 4 respiration at 28°C (Fig. 1D and E). *P. berghei*-infected mosquitoes were maintained at 21°C, the permissive temperature for development of this *Plasmodium* species in mosquitoes. *Plasmodium* infection also did not affect either state 3 or state 4 mitochondrial respiration (Fig. 1D and E). Interestingly, both state 3 and state 4 oxygen consumption were reduced significantly in blood-fed mosquitoes kept at 21°C compared with mosquitoes kept at 28°C (Figure 1D and E), probably due to a general reduction in the metabolic rate at a lower temperature. This effect persists *in vitro*, as all respiration assays were done at 27.5°C. Neither temperature nor feeding status (sugar-fed, blood-fed or blood-fed infected)



have a significant effect on the RCR (Fig. 1F). As the electrochemical gradient in the intermembrane space can limit the rate of oxygen consumption, addition of the proton ionophore FCCP disrupts the gradient and makes it possible to measure the maximal respiratory capacity (or uncoupled oxygen consumption). Temperature and feeding status do not affect the mitochondrial maximal respiratory capacity (Fig. S2).

**Characterization of the Mitochondrial Carrier AgMC1.** Previous studies showed that expression of some genes related to the mitochondrial ETC are induced in the *Plasmodium*-resistant *An. gambiae* (L3-5 strain) (27), suggesting that differences in mitochondrial metabolism may affect mosquito susceptibility to *Plasmodium* infection. We found that midgut mRNA levels of a previously uncharacterized member of the SCL25 family, AgMC1 (accession number AGAP001297-RA) increase 24 h after blood feeding (Fig. 2A), and expression increases further in response to *P. berghei* infection (Fig. 2B). The deduced amino acid sequence of AgMC1, based on the cDNA sequence, is shown in Fig. S3. Phylogenetic analysis of the protein sequence alignment of mitochondrial transporters from different species indicates that AgMC1 has the highest homology to the *Aedes aegypti* and *Drosophila melanogaster* putative ortholog genes. AgMC1 clusters with the mammalian SLC25 family members 39 and 40, SLC25A39 and 40 SLC25A40, respectively (Figure 2C). Mammalian SLC25A39, SLC25A40, and insect MC1 transporters also cluster with the yeast manganese trafficking protein 1 (MTM). SLC25 transporters share three conserved domains of approximately 100 amino acids that are the signature feature of mitochondrial carriers (Fig. 2D, top). The predicted secondary structure of AgMC1 is shown as a schematic diagram in Fig. 2D (bottom) and follows the same color scheme (blue, green, and red) as the upper linear diagram. It consists of six predicted transmembrane domains (H 1-6) joined together by the mitochondrial matrix (M 1-3) and cytosolic domains. Each mitochondrial carrier domain comprises a set of two transmembrane helices and one matrix loop.

A molecular model of the AgMC1 three-dimensional structure was constructed using the automated Phyre fold recognition server (Fig. 2E). A number of structures with significant

similarity were detected, but the strongest match was with the bovine ADP/ATP ANT or mitochondrial ADP/ATP carrier protein (28). The PSI-BLAST alignment of the two proteins indicated that all of the structural elements of the ADP/ATP carrier were present in AgMC1. The structure consists of six transmembrane  $\alpha$ -helices and three matrix loop elements that, by analogy with the ADP/ATP carrier, would be located on the matrix side of the inner membrane. In the ADP/ATP carrier protein, the matrix loop structures are quite similar, with each containing a short, approximately three-turn  $\alpha$ -helical segment. The AgMC1 sequence differs from that of the ADP/ATP carrier in having a 29-amino acid residue insertion in matrix loop 1 and a 14-residue insertion in matrix loop 3, while matrix loop 2 is similar in length to the ADP/ATP carrier. No attempt was made to model these portions of AgMC1; they are shown in Fig. 2E as being similar to the corresponding segments of the ADP/ATP carrier protein. It is not possible to predict the natural AgMC1 ligand based on the molecular model, but the sequence clearly lacks the RRRMMM hexapeptide signature sequence of ADP/ATP transporters that occurs at the C-terminal end of transmembrane helix 5; however, like the ADP/ATP carrier, the binding depression of AgMC1 is also lined with a variety of charged and polar amino acid side chains.

#### **Participation of AgMC1 in Mitochondrial Coupling and ROS Generation in the Midgut.**

AgMC1's gene function was explored by reducing gene expression using dsRNA-mediated gene silencing. Sugar-fed mosquitoes were injected with AgMC1 dsRNA, and midgut AgMC1 mRNA levels decreased by 93% 2 days post injection relative to the dsLacZ control group (Fig. 3A). A detailed comparison of mitochondrial respiration between control and AgMC1-silenced midgut revealed that there is no difference in ADP-stimulated state 3 respiration (Fig. 3B). State 4 respiration, however, is significantly higher in AgMC1-silenced midguts ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3B), indicating decreased mitochondrial coupling. As a consequence, the respiratory control ratio (RCR), which is the ratio of state 3/state 4 respiration, is significantly lower ( $p < 0.005$ ) (Fig. 3C). A similar mild uncoupling of mitochondrial respiration and a corresponding reduction in the RCR was observed in AgMC1-silenced midguts infected with

*P. berghei* (24 h post injection) (Fig. 3D). To investigate the impact of AgMC1 silencing on the mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), adult females were fed a solution containing MitoTracker Red, a fluorescent cationic dye that is selectively pumped into polarized mitochondria. MitoTracker Red uptake was greatly reduced in AgMC1-silenced midguts (Fig 3E), indicating decreased  $\Delta\Psi_m$ . Collectively, these data indicated that AgMC1 is required to maintain  $\Delta\Psi_m$ .

Because small changes on the  $\Delta\Psi_m$  can greatly affect ROS generation (20), the effect of AgMC1 silencing on ROS levels was investigated. Midguts were incubated with dihydroethidium (DHE), a dye that can be used to monitor ROS *in vivo*, as the products of intracellular DHE oxidation are highly fluorescent. Midguts from AgMC1-silenced insects consistently exhibit reduced fluorescence when incubated with DHE (Fig. 3F), suggesting reduced intracellular ROS levels. Midgut hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) production was also measured directly using the Amplex Red detection system, and reduced  $H_2O_2$  generation was also observed in AgMC1-silenced midguts ( $P < 0.05$ ) (Fig. 3G). Together, these data show that AgMC1 silencing decreases  $\Delta\Psi_m$ , causing mitochondrial uncoupling, and reduces midgut ROS production.

**AgMC1 Silencing Increases *Plasmodium* Infection.** The effect of AgMC1 silencing by systemic injection of dsRNA was evaluated. The number of developing oocysts was significantly higher in AgMC1-silenced females 8 days post infection ( $P < 0.04$ ) (Fig. 4A). To determine whether this enhanced survival is due to an increase in ookinete survival and oocyst formation, the effect of AgMC1 silencing on infection was also evaluated at an earlier time, by detecting early oocysts using immunofluorescence staining. Two days post infection, the number of early oocysts is already significantly higher in AgMC1-silenced females (Fig. 4B), indicating higher ookinete survival and early oocyst formation ( $P < 0.05$ ). Although most parasites were still melanized, AgMC1 silencing increases the number of mature oocysts that developed *An. gambiae* refractory (L35) females significantly ( $P < 0.01$ ) (Fig. S4, left panel), as well as the prevalence of infection, from 23% to 56% ( $P < 0.001$ ) (Fig. S4, right panel). Because in the L35 strain parasites are killed and melanized

during the ookinete-to-oocyst transition, these findings also indicate that AgMC1 silencing promotes survival of early stages of *Plasmodium* in the mosquito midgut.

## DISCUSSION

Previous studies have shown that mitochondria isolated from the *Anopheles stephensi* ASE cell line can use pyruvate, proline, or succinate as substrates (29). In the present study, digitonin-permeabilized midguts were used to characterize mitochondrial function in *An. gambiae*. We observed that simultaneous addition of a mixture of pyruvate, proline, and succinate renders the highest oxygen consumption rates and RCR values (Fig. 1A and C). This mixture of substrates simultaneously feeds the ETC through both complex I and II (Fig. S1). It was recently reported that in *Ae. aegypti* females, blood feeding reduces oxygen consumption and  $H_2O_2$  generation in flight muscle mitochondria (30). Interestingly, blood-feeding or *P. berghei* infection did not affect the respiratory rate in *An. gambiae* midguts (Fig. 1 D–F). This indicates that there might be important physiological differences in the response of *Aedes* and *Anopheles* mosquitoes to blood feeding or, alternatively, between the response of muscle and midgut mitochondria.

Reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS) can be harmful to the host but are important effectors of the immune system. The midgut of *An. gambiae* is an important barrier against a variety of pathogens including bacteria and *Plasmodium*, and ROS/RNS production has been shown to limit *Plasmodium* infection in anopheline mosquitoes (7, 9, 31). NO is generated in response *Plasmodium* infection, accumulates in the hemolymph as nitrite/nitrate, and levels peak 7 days post infection (31). Ookinete-invaded cells also express high levels of NOS around 24 h post infection (4) and exhibit protein nitration (5). Although NO can inhibit mitochondrial respiration (32), *Plasmodium* infection does not affect the midgut maximum respiratory capacity (in the presence of FCCP) 24 h post infection (Fig. S2). Nitration responses are well restricted to the invaded cells (5) and do not appear to affect mitochondrial function of neighboring healthy uninfected cells.

In humans, there are 43 solute carrier families; the SCL25 family is the largest, with 46 members (33), and all members share three conserved

mitochondrial carrier domains. The most studied SCL25 proteins are UCPs (SLC25A7–9) and ANTs (SLC25A4–6). Phylogenetic analyses revealed that AgMC1 and human SLC25A39 and SLC25A40 cluster with the yeast manganese trafficking to mitochondria 1 (MTM1) protein (Fig. 2C). Manganese transport by MTM1 has been shown to be important for the enzymatic activity of Mn-SOD (34). This is unlikely to be the function of AgMC1, because a reduction of Mn-SOD activity would increase mitochondrial ROS levels and we find that AgMC1 silencing had the opposite effect, as it decreases ROS generation. The function of SLC25A39 and SLC25A40 in mammals is not known (33). The binding region of the predicted AgMC1 protein structure (Fig. 2E) is lined with charged and polar amino acid chains and lacks an ADP/ATP binding consensus sequence, suggesting that AgMC1 carries a polar substrate other than ADP/ATP.

The reduced RCR values in AgMC1-silenced midguts (Fig. 3C and D) are due to an increase in state 4 respiration (Fig. 3B), indicating increased proton leakage. The mechanisms that regulate the basal rate of proton leak are not clear, but it is known that mitochondrial carriers, such as ANT (25, 35) and the 2-oxoglutarate transporter (36) can affect mitochondrial coupling. AgMC1 silencing in *An. gambiae* increased state 4 respiration, without altering state 3 (Fig. 3B), indicating increased mitochondrial uncoupling that reduces the mitochondrial membrane potential and ROS production (Fig. 3 E–G).

It is not clear how AgMC1-silencing affects mitochondrial coupling, but one can speculate that it could increase proton permeability by triggering the re-organization of the proteins in the inner membrane of the mitochondrion. Alternatively, AgMC1 could act as a repressor of UCPs, limiting

the proton conductance mediated by these proteins.

Mitochondrial ROS generation is regulated by a number of factors such as the oxygen pressure, substrate availability, efficiency of the electron flow and mitochondrial membrane potential; and changes in any of these parameters can potentially modulate the host's susceptibility to infection. For example, knockdown of UCP2 in mice increases  $\Delta\Psi_m$  and confers resistance to *Toxoplasma* infection in a mechanism that involves increased ROS production (15).

We have previously shown that reducing H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> detoxification by silencing catalase enhances *An. gambiae* resistance to *P. berghei* infection. Conversely, decreasing ROS, by oral administration of antioxidants, decreases resistance to bacterial (9) and prevents melanization of *Plasmodium* parasites (8). The fact that AgMC1 silencing reduces mitochondrial membrane potential and ROS production in the midgut and decreases resistance to *Plasmodium* infection, strongly suggest that mitochondria can be an important source of intracellular ROS that modulates antiplasmodial responses. However, other sources of intracellular ROS such as NADPH-oxidase (Nox) are also likely to play an important role in epithelial responses to invasion. Also, other effects of AgMC1 on *Plasmodium* parasites not mediated by ROS cannot be ruled out.

We explored mitochondrial function in the *An. gambiae* midgut and characterized a novel member of the mitochondrial carrier gene family, AgMC1, that modulates midgut mitochondrial membrane potential and ROS production. Our studies revealed a novel link between mitochondrial metabolism and mosquito epithelial responses to *Plasmodium* invasion.

## REFERENCES

1. World Health Organization (2009) 10 Facts on Malaria, 2009 at: <http://www.who.int/features/factfiles/malaria/en/>
2. Jaramillo-Gutierrez, G., Rodrigues, J., Ndikuyeze, G., Povelones, M., Molina-Cruz, A., and Barillas-Mury, C. (2009) *BMC Microbiol.* **9**, 154.
3. Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Religio, A., Morlais, I., Kafatos, F. C., and Christophides, G. K. (2009) *PLoS Pathog.* **5**, e1000542.
4. Han, Y. S., Thompson, J., Kafatos, F. C., and Barillas-Mury, C. (2000) *EMBO J.* **19**, 6030-6040.
5. Kumar, S., Gupta, L., Han, Y. S., and Barillas-Mury, C. (2004) *J Biol Chem.* **279**, 53475-53482.

6. Blandin, S., Shiao, S. H., Moita, L. F., Janse, C. J., Waters, A. P., Kafatos, F. C., and Levashina, E. A. (2004) *Cell* **116**, 661-670.
7. Gupta, L., Molina-Cruz, A., Kumar, S., Rodrigues, J., Dixit, R., Zamora, R. E., and Barillas-Mury, C. (2009) *Cell Host.Microbe* **5**, 498-507.
8. Sinden, R. E., Alavi, Y., and Raine, J. D. (2004) *Insect Biochem.Mol.Biol.* **34**, 625-629.
9. Molina-Cruz, A., DeJong, R. J., Charles, B., Gupta, L., Kumar, S., Jaramillo-Gutierrez, G., and Barillas-Mury, C. (2008) *J.Biol.Chem.* **283**, 3217-3223.
10. Babior, B. M., Lambeth, J. D., and Nauseef, W. (2002) *Arch.Biochem.Biophys.* **397**, 342-344.
11. Lambeth, J. D. (2004) *Nat.Rev.Immunol.* **4**, 181-189.
12. Leto, T. L. and Geiszt, M. (2006) *Antioxid.Redox.Signal.* **8**, 1549-1561.
13. Ha, E. M., Oh, C. T., Bae, Y. S., and Lee, W. J. (2005) *Science* **310**, 847-850.
14. Kumar, S., Molina-Cruz, A., Gupta, L., Rodrigues, J., and Barillas-Mury, C. (2010) *Science* **327**, 1644-1648.
15. Arsenijevic, D., Onuma, H., Pecqueur, C., Raimbault, S., Manning, B. S., Miroux, B., Couplan, E., Alves-Guerra, M. C., Gubern, M., Surwit, R., Bouillaud, F., Richard, D., Collins, S., and Ricquier, D. (2000) *Nat.Genet.* **26**, 435-439.
16. Bai, Y., Onuma, H., Bai, X., Medvedev, A. V., Misukonis, M., Weinberg, J. B., Cao, W., Robidoux, J., Floering, L. M., Daniel, K. W., and Collins, S. (2005) *J.Biol.Chem.* **280**, 19062-19069.
17. Kowaltowski, A. J., Souza-Pinto, N. C., Castilho, R. F., and Vercesi, A. E. (2009) *Free Radic.Biol.Med.* **47**, 333-343.
18. Palmieri, F. (2004) *Pflugers Arch.* **447**, 689-709.
19. Murphy, M. P. (2009) *Biochem.J.* **417**, 1-13.
20. Korshunov, S. S., Skulachev, V. P., and Starkov, A. A. (1997) *FEBS Lett.* **416**, 15-18.
21. Boveris, A. and Chance, B. (1973) *Biochem.J.* **134**, 707-716.
22. Negre-Salvayre, A., Hirtz, C., Carrera, G., Cazenave, R., Troly, M., Salvayre, R., Penicaud, L., and Casteilla, L. (1997) *FASEB J.* **11**, 809-815.
23. Nishikawa, T., Edelstein, D., Du, X. L., Yamagishi, S., Matsumura, T., Kaneda, Y., Yorek, M. A., Beebe, D., Oates, P. J., Hammes, H. P., Giardino, I., and Brownlee, M. (2000) *Nature* **404**, 787-790.
24. Echtay, K. S., Roussel, D., St Pierre, J., Jekabsons, M. B., Cadenas, S., Stuart, J. A., Harper, J. A., Roebuck, S. J., Morrison, A., Pickering, S., Clapham, J. C., and Brand, M. D. (2002) *Nature* **415**, 96-99.
25. Brand, M. D., Pakay, J. L., Ocloo, A., Kokoszka, J., Wallace, D. C., Brookes, P. S., and Cornwall, E. J. (2005) *Biochem.J.* **392**, 353-362.
26. Kelley, L. A. and Sternberg, M. J. (2009) *Nat.Protoc.* **4**, 363-371.
27. Kumar, S., Christophides, G. K., Cantera, R., Charles, B., Han, Y. S., Meister, S., Dimopoulos, G., Kafatos, F. C., and Barillas-Mury, C. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 14139-14144
28. Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J., and Brandolin, G. (2003) *Nature* **426**, 39-44.
29. Giulivi, C., Ross-Inta, C., Horton, A. A., and Luckhart, S. (2008) *Biochem.J.* **415**, 309-316.
30. Goncalves, R. L., Machado, A. C., Paiva-Silva, G. O., Sorgine, M. H., Momoli, M. M., Oliveira, J. H., Vannier-Santos, M. A., Galina, A., Oliveira, P. L., and Oliveira, M. F. (2009) *PLoS.One.* **4**, e7854.
31. Luckhart, S., Vodovotz, Y., Cui, L., and Rosenberg, R. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 5700-5705.
32. Cleeter, M. W., Cooper, J. M., Darley-Usmar, V. M., Moncada, S., and Schapira, A. H. (1994) *FEBS Lett.* **345**, 50-54.
33. Haitina, T., Lindblom, J., Renstrom, T., and Fredriksson, R. (2006) *Genomics* **88**, 779-790.
34. Luk, E., Carroll, M., Baker, M., and Culotta, V. C. (2003) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **100**, 10353-10357.

35. Shabalina, I. G., Kramarova, T. V., Nedergaard, J., and Cannon, B. (2006) *Biochem.J.* **399**, 405-414.
36. Yu, X. X., Lewin, D. A., Zhong, A., Brush, J., Schow, P. W., Sherwood, S. W., Pan, G., and Adams, S. H. (2001) *Biochem.J.* **353**, 369-375.

## FOOTNOTES

<sup>1</sup> This work was supported by the Intramural Research Program of the Division of Intramural Research, National Institute of Allergy and Infectious Diseases, National Institutes of Health. We thank Alvaro Molina-Cruz for his comments and insights, André Laughinghouse and Kevin Lee for insectary support and Brenda Rae Marshall for editorial assistance. R.L.S.G. was funded by a fellowship from the Brazilian Government through CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior); J.H.M.O. was funded by CAPES and CNPq-Brazil (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). M.F.O. and P.L.O. are research scholars from CNPq.

<sup>2</sup> The abbreviations used are:  $\Delta p$ , protonmotive force;  $\Delta Y_m$ , mitochondrial membrane potential; AgMC1, *Anopheles gambiae* mitochondrial carrier 1; ANT, Ade nucleotide translocator ; DHE, dihydroethidium; ETC, electron transport chain; NOS, nitric oxide synthase; PiC, phosphate carrier; RCR, respiratory control ratio; RNS, reactive nitrogen species; ROS, reactive oxygen species; UCP, uncoupling protein.

<sup>3</sup> This article contains supporting information online at:

Figure S1. Schematic representation of the electron transport chain (ETC).

Figure S2. Effect of blood feeding and *Plasmodium berghei* infection on maximal oxygen consumption (uncoupled respiration).

Figure S3. AgMC1-deduced amino acid sequence.

Figure S4. Sequence alignment of members of the mitochondrial family from different species.

Figure S5. Effect of AgMC1 silencing on *Plasmodium berghei* survival in the refractory *Anopheles gambiae* L35 strain.

Supplemental Experimental Procedures

## FIGURE LEGENDS

Fig. 1. Mitochondrial oxygen consumption in intact *Anopheles gambiae* midguts. The oxygen consumption of groups of 30 midguts from sugar-fed (SF) mosquitoes permeabilized with digitonin was analyzed. (A) State 3 (ADP-induced) respiratory rate stimulated by the addition of proline, pyruvate, succinate or by the simultaneous addition of pyruvate/proline/succinate. (B) State 4-like oxygen consumption was evaluated by adding oligomycin after acquisition of state 3. (C) The respiratory control ratio (RCR) was determined by dividing state 3 and state 4-like oxygen consumption rates. (D) ADP-induced oxygen consumption (state 3) of groups of 30 permeabilized midguts from SF or blood-fed (BF) females kept at 28°C and analyzed 24 h post feeding. Control mosquitoes fed on a healthy (BF) or a *Plasmodium berghei*-infected (BFI) mouse were maintained at 21°C and dissected 24 h post feeding. (E) State 4-like oxygen consumption was recorded after the addition of oligomycin. (F) RCR was calculated by dividing state 3 by state 4-like oxygen consumption rates. Bars represent means  $\pm$  SEM. Treatments that are significantly different are indicated by using different letters above the bar graphs (shown in *italics*). Samples labeled with the same letter are not significantly different. Samples that are not significantly different from any other one do not have a letter. ( $P < 0.01$ ; ANOVA and Tukey's test).

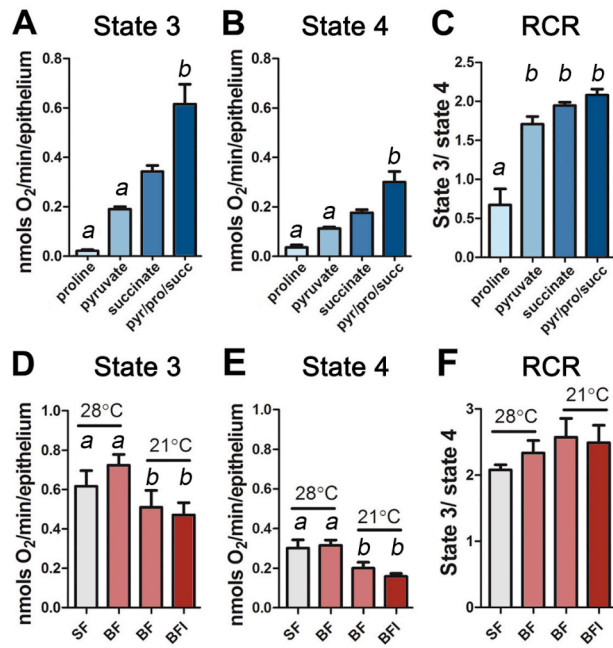
Fig. 2. *Anopheles gambiae* mitochondrial carrier 1 (AgMC1) expression profile, homology, and predicted structure. (A) AgMC1 relative expression in midguts from sugar-fed (SF) and blood-fed (BF) mosquitoes kept at 28°C and analyzed 24 h post-feeding. (B) AgMC1 relative expression in control mosquitoes fed on a healthy (BF) or a *Plasmodium berghei*-infected (BFI) mouse kept at 21°C and dissected 24 h post feeding. (C) Phylogenetic tree based on the sequence alignment of the deduced amino acid sequence of AgMC1 (AGAP001297-PA) and the putative *Aedes aegypti* (AaMC1, AAEL001329) and *Drosophila melanogaster* (DmMC1, CG14209) putative ortholog genes, human mitochondrial carriers HsSLC25A-39 (NP\_057100) and SLC25A-40 (NP\_061331), and yeast manganese trafficking factor for mitochondrial (ScMTM1, EDN61842); human uncoupling protein 5 (HsUCP, accession No. NP\_003942), *An. gambiae* (AgUCP, accession No. AGAP011839-PA), *Ae. aegypti* (AaUCP, accession No. AAEL011842) and *D. melanogaster* (DmUCP, accession No. CG7314-RB) uncoupling proteins; human SLC25A6 adenine nucleotide translocator (HsANT, accession No. NP\_001142), yeast ANT (ScANT, accession No. AAA97484), *An. gambiae* (AgANT, accession No. AGAP006782-PA), *Ae. aegypti* (AaANT, accession No. AAEL004855), and *D. melanogaster* (DmANT, accession No. CG16944) putative adenine translocators; human SLC25A3 phosphate carrier (HsPiC, accession No. NP\_005879), yeast phosphate carrier (ScPiC, accession No. NP\_010973), and *An. gambiae* (AgPiC, accession No. AGAP003586-PA), *Ae. aegypti* (AaPiC, accession No. AAEL011184) and *D. melanogaster* (DmPiC, accession No. CG4994-PA) putative phosphate carriers. (D) Schematic representation of the AgMC1 protein sequence coding for three mitochondrial carrier domains (mito carr, top panel) highlighted in blue, green and red, and of the predicted secondary structure (bottom panel), consisting of six transmembrane domains (H1 to H6), three matrix domains, (M1 to M3), and cytosolic domains. (E) Predicted tertiary structure based on the amino acid sequence of the AgMC1 based on the known structure of bovine ADP/ATP adenine nucleotide translocator (ANT) or mitochondrial ADP/ATP carrier protein. Ribbon diagram of the predicted structure of AgMC1 from a lateral view (left), or viewed from either the matrix (top right) or intermembrane space side of the mitochondrial membrane (bottom right).

Fig. 3. Effect of AgMC1 silencing on mitochondrial uncoupling and reduced ROS generation in the midgut. (A) Two-day-old sugar-fed mosquitoes were injected with LacZ (control) or AgMC1 double-stranded (ds) RNA, and the relative expression of AgMC1 in the midgut was evaluated 2 days later. (B) Oxygen consumption of midguts from sugar-fed mosquitoes injected with dsLacZ or dsAgMC1 after the addition of ADP, oligomycin (oligo), or carbonyl cyanide

p-trifluoromethoxyphenylhydrazine (FCCP). (C) RCR from sugar-fed mosquitoes and (D) from *Plasmodium berghei*-infected mosquitoes 24 h post infection. (E) Effect of AgMC1 silencing midgut on mitochondrial membrane potential. Confocal analysis of control (dsLacZ) and silenced (dsAgMC1) midguts stained with MitoTracker Red (CM-H<sub>2</sub>-XRos) to evaluate membrane potential. Nuclei were stained with DAPI (blue) and F-actin with green phalloidin. Scale bar = 8  $\mu$ m. (F) Effect of AgMC1 silencing on midgut ROS generation. Control (dsLacZ) and silenced (dsAgMC1) midguts from sugar-fed mosquitoes were incubated with dihydroethidine (DHE), a dye that becomes fluorescent in response to ROS. DIC images of the same midguts are shown in the inset. Scale bar = 100  $\mu$ m. (G) Effect of AgMC1 silencing on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in groups of five midguts incubated with Amplex red and peroxidase. Resorufin fluorescence was measured at 590 nm. Bars represent means  $\pm$  SE. Significant differences are indicated by the asterisk ( $P < 0.05$ ; Student's *t*-test).

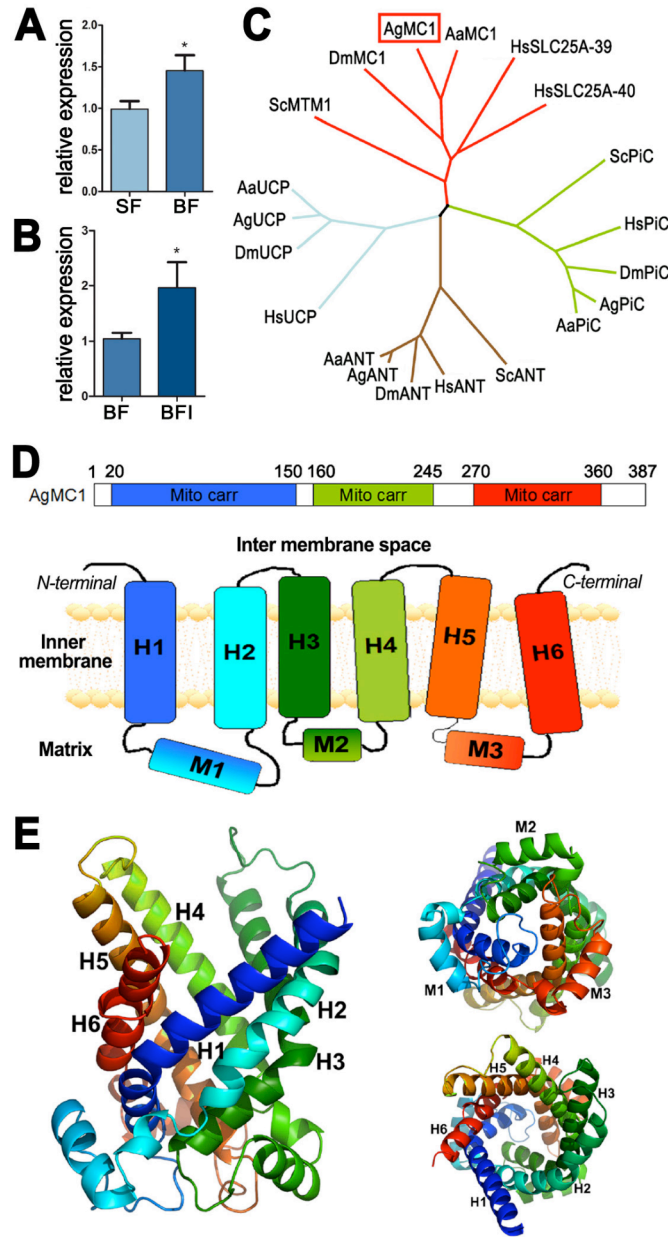
Fig. 4. Effect of AgMC1 silencing on *An. gambiae* susceptibility to *P. berghei* infection. Control (dsLacZ) and silenced (dsAgMC1) females were fed on *Plasmodium berghei*-infected mice and midguts dissected (A) 8 days post feeding to count mature oocysts or (B) 2 days post feeding to count early oocysts. Medians are indicated by the line. Distributions were compared using the Kolmogorov-Smirnov test.

Figure 1.





**Figure 2.**



**Figure 3.**

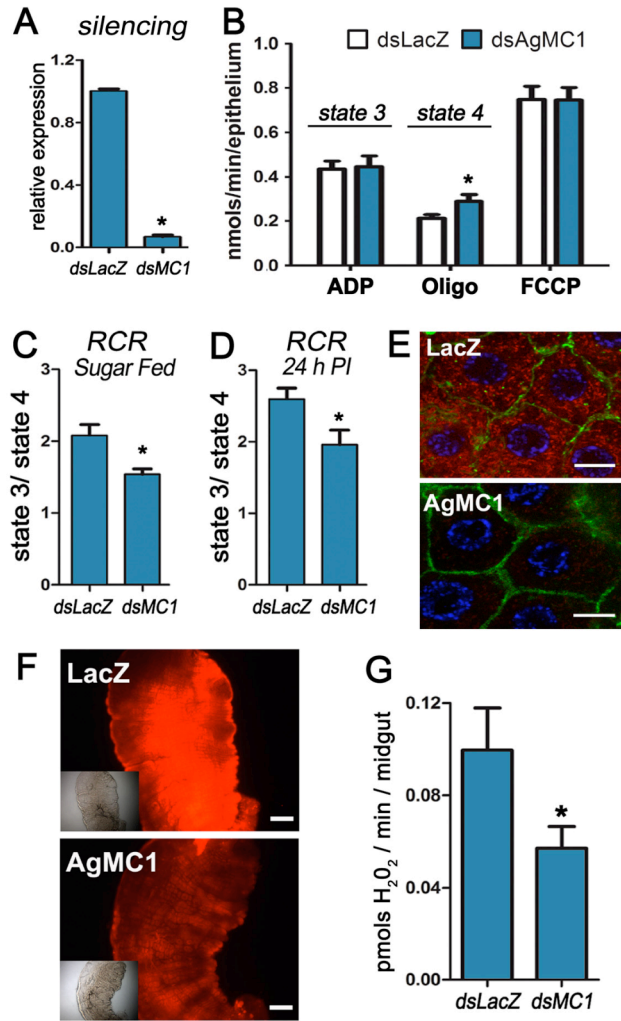
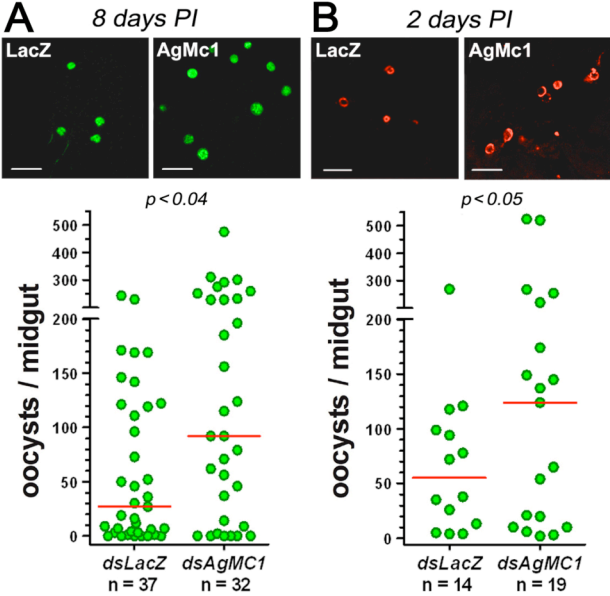


Figure 4.



**Mitochondrial uncoupling in the mosquito *Anopheles gambiae* enhances *Plasmodium* infection**

**Renata L. S. Gonçalves<sup>2</sup>, José Henrique M. Oliveira<sup>2</sup>, John F. Andersen, Marcus F. Oliveira,**

**Pedro L. Oliveira, and Carolina Barillas-Mury<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: cbarillas@niaid.nih.gov.

<sup>2</sup>These authors contributed equally to this work.

**Supporting Information**

Figure S1. Schematic representation of the electron transport chain (ETC).

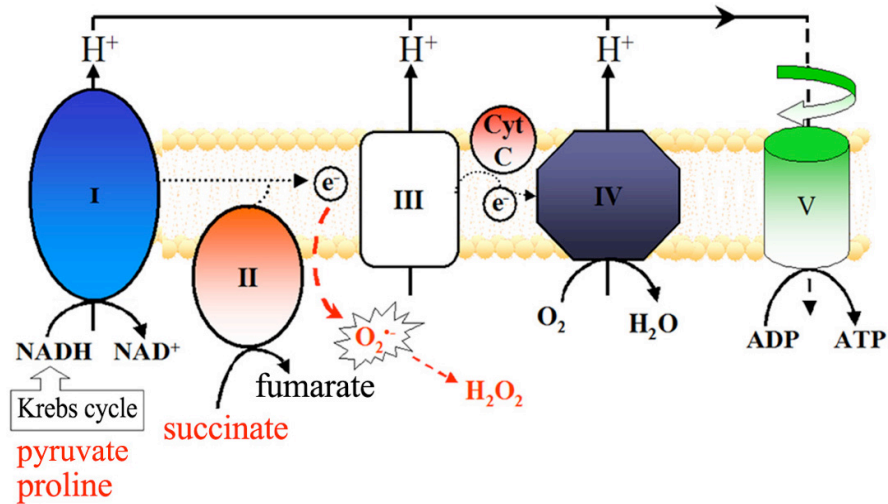
Figure S2. Effect of blood feeding and *Plasmodium berghei* infection on maximal oxygen consumption (uncoupled respiration).

Figure S3. AgMC1-deduced amino acid sequence.

Figure S4. Sequence alignment of members of the mitochondrial family from different species.

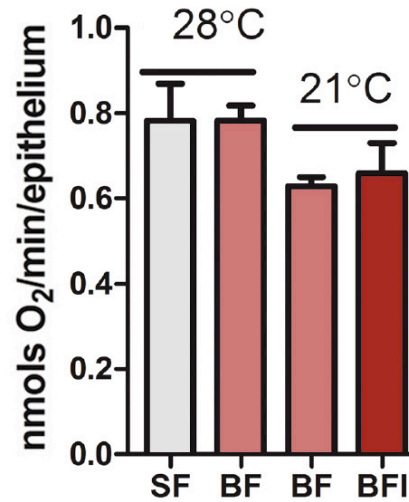
Figure S5. Effect of AgMC1 silencing on *Plasmodium berghei* survival in the refractory *Anopheles gambiae* L35 strain.

Supplemental Experimental Procedures



**Fig. S1.** Schematic representation of the electron transport chain (ETC). Oxidation of reduced metabolic substrates takes place in the mitochondria through the activity of the ETC complex. Complex I (blue) oxidizes the NADH produced by the Krebs cycle through oxidation of pyruvate and proline. Complex II (light red) oxidizes succinate to fumarate. The electrons from the oxidation of NADH and succinate are sequentially transferred throughout the ETC, reaching complex IV, the final oxidase that transfers these electrons to oxygen ( $O_2$ ), reducing it to water ( $H_2O$ ). Complexes I, III, and IV pump protons ( $H^+$ ) to the intermembrane space as electrons flow through the ETC, building the electromotive force used by complex V (ATP synthase, shown in green) to drive ATP synthesis, as  $H^+$  flow back into the mitochondrial matrix. Up to 4% of the  $O_2$  consumed by the cell escapes the ETC, partially reducing  $O_2$  to superoxide ( $O_2^{\bullet -}$ ) that will be converted to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) by superoxide dismutases.

*uncoupled respiration*



**Fig. S2.** Effect of blood feeding and *Plasmodium berghei* infection on maximal oxygen consumption (uncoupled respiration). Oxygen consumption was determined in groups of permeabilized midguts from sugar-fed (SF) or blood-fed (BF) mosquitoes that were kept at 28°C and dissected 24 h post feeding. Control mosquitoes fed on a healthy (BF) or a *P. berghei*-infected (BFI) mouse were maintained at 21°C and dissected 24 h post feeding. Midgut uncoupled oxygen consumption was determined after the addition of the proton ionophore carbonyl cyanide p-trifluoromethoxyphenylhydrazone (FCCP).

MARSVGSSVAVAPGEDMDDSRFRIRPYQQILSSC  
SGALVTSLSFMTPLDVVKTRLQAQKVLISNKCYL  
YCNGLMDHICPCGPNGPMAPSTISKRPLHLTGTI  
DAFTKISRYEGVPSLWSGLGPTLILALPTTVIYF  
VAYEQFRIRLKELYQRRKGRDAELPIWLPLLAGS  
SARVLAVTIVNPLELIRTKMQSEKLSYREVGQAF  
RSMLRVQGILGLWKGFFPTILRDVPFSGIYWTTY  
ESFKKHFNVSQPTFAFSFAGGAISSGVAAFFTVP  
FDVVKTHQQIAFGEQFLYAQNGDSKAAGPKKPV  
SIGTFETMGRIFQMNGIRGLFAGLTPRLVKVAPA  
CAIMIASFEYGKNFFYRYNVQRYQERKDRVASGS  
GDGSVVSSSSSTSKGEFCR

**Fig. S3.** AgMC1-deduced amino acid sequence. Three conserved mitochondrial carrier domains are highlighted in blue, green, and red. The predicted organization of these three domains in the mitochondrial membrane is shown in Fig. 2D and the model of AgMC1 tertiary structure in Fig. 2E.

CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

```

AgMC1      -----MARSVGS-- 7
AeMC1      -----MTAESGSR 9
DmMC1      -----MATREACGQFAAASAAMAA 19
HsSLC25A40
HsSLC25A39
ScMTM1
AgANT
AeANT
DmANT      -----MGN 3
HsANT
ScANT      -----MSS 3
AgUCP5
AeUCP
DmUCP
HsUCP5      -----MGIFPGIILIFLRVKFATAA 20
AgPiC      MFAGLLDAARNSPFRTPFTRVHCDDGTEKAVVPGRSVQAAASRECDAGTVAPVGRSIAA 60
AePiC      MFSALLDAARNSPFRTPFKTKAQCD-----AAAPSENPKSLIA--SGRTLAA 44
DmPiC      MFSSFFETARNSPFRTPMSMARCD-----AAAPVVEPQ---PVEGRQIAA 42
HsPiC      MFSSVAHLARANPFNTPHLQLVHDG-----LGDLRSSSPGPTGQPRRPRNLAA 48
ScPiC1     -----MESNKQP----- 7
    
```

```

AgMC1      -SVAVAPGEDMDDSRFRIRPYQQILSSCSGALVTSLFMTPLDVVKTRLQAQQKVLISN-- 64
AeMC1      ESPLPAPGVDMDDSRFRIRPYQQILSSCSGALVTSLFMTPLDVVKTRLQTQQKMLLSN-- 67
DmMC1      ASSQNPSKATMTDPRFRIRPLQQVASACTGAMVTACFMTPLDVVKTRLQAQQQALLSN-- 77
HsSLC25A40 -----MDPETRGQEI IKVTPLQQMLASCTGAILTSVIVTPLDVVKIRLQAQNNPLP---- 51
HsSLC25A39 -----MADQDPAGISPLQQMVASGTGAVVTSLFMTPLDVVKVRLQSQRPMSASELM 51
ScMTM1     -----MSDRNTSNLTLKERMLSAGAGSVLTLILTPMDVVIRLQQQQMIPDCSCD 52
AgANT      -----MT-KKADPYGFAKDFLAGGISAAVSKTAVAPIERVKLLLQVQ-AASKQIA- 48
AeANT      -----MSGKKADPYGFAKDFLAGGISAAVSKTAVAPIERVKLLLQVQ-AASKQIA- 49
DmANT      ISASITTSQSKMGKDFDAVGFKDFVAGGISAAVSKTAVAPIERVKLLLQVQ-HISKQIS- 61
HsANT      -----MGDHAWSFLLKDFLAGGVAAVSKTAVAPIERVKLLLQVQ-HASKQIS- 46
ScANT      NAQVKTPLPPAPAPKESNFLIDFLMGGVSAAVAKTAASPIERVKLLIQNDQEMIKQGT- 62
AgUCP5     -----MSDIR--DWRPFVYGGMASIMAEFGTFPIDTTKTRLQIQGQKTRDRSH- 45
AeUCP      -----MGEIR--DWRPFYGGVASITAEFGTFPIDTTKTRLQIQGQKIDQSH- 45
DmUCP      -----MGEVK--DWRPFVYGGVASITAEFGTFPIDTTKTRLQIQGQKIDQSF- 45
HsUCP5     VIVSGHQKSTTVSHEMGLNWKPFVYGGLASIVAEFGTFPVDLTKTRLQVQGGSIDARF- 79
AgPiC      AAT-----DEVEFGSTKFFLLCGLGGIISCGSTHTFVVPLDLVKCRLQVD----- 105
AePiC      AAS-----DEVEFGSTQFYLLCGVGGIISCGSTHTFVVPLDLVKCRLQVD----- 89
DmPiC      AATPVANQDSCFEFGSTKYFALCGIGGILSCGTTHTFVVPLDLVKCRLQVD----- 93
HsPiC      AAVEEQ---YSCDYGSGRFFILCGLGGIISCGTHTHTALVPLDLVKCRMQVD----- 96
ScPiC1     -----RKIQLYTKEFYATCTLGGI IACGPTHSSITPLDLVKCRLQVN----- 49
    
```

. . . : \*:: : :\* :

```

AgMC      -----KCYLYCNG---LMDHICPCGPNGPMAPSTISKRPLHLTGTIDAFTKI 108
AeMC1     -----KCYLYCNG---LMDHLCPCGPNG----TAFAPKPLHFTGTIDAFVKI 107
DmMC1     -----KCFLYCNG---LMDHICPCGPDTPN--PAAAKPAPRFSGTIDAFIKI 119
HsSLC25A40 -----KGKCFVYSNG---LMDHLCVCEEG---NKLWYKKPGNFQGTLDAFFKI 94
HsSLC25A39 PSSRLWLSYTKWKCLLYCNG---VLEPLYLCPNGAR--CATWFQDPTRFTGTMDAFVKI 106
ScMTM1     GAAEVPNAVSSGSKMKFTTNVGGQNLNNAKIFWESACFOELHCKNSSLKFNGLTLEAFTKI 112
AgANT      -----VDQQYKGI VDCFVRI 63
AeANT      -----ADKQYKGI VDCFVRI 64
DmANT      -----PDKQYKGMVDCFIRI 76
HsANT      -----AEKQYKGI IDCVVRI 61
ScANT      -----LDKKYSGI VDCFKRT 77
AgUCP5     -----SELYRGM TDAFVKI 60
AeUCP      -----AELKYRGM TDAFVKI 60
DmUCP      -----SQLRYRGM TDAFVKI 60
HsUCP5     -----KEIKYRGM FHALFRI 94
AgPiC      -----QAKYKNV FHGFKLT 119
AePiC      -----QAKYKNL FHGFKVS 103
DmPiC      -----QAKYKNL VHGFKVT 107
HsPiC      -----PQKYKGI FNGFSVT 110
ScPiC1     -----PKLYTSNLQGFRI 63
    
```

. . .



AgMC1 SRYEGVPSLWSGLGPTLILALPTTVIYFVAYEQFRIRLKELYQRRKGRD-----AEL 160  
AeMC1 SHHEGVKSLWSGLSPTLVLALPTTVIYFVAYEQFRLRLKEFYLRKRDKS-----AEL 159  
DmMC1 SRTEGIGSLWSGLSPTLISALPSTIIYFVAYEQFKARFTDIHYKYTRRPDTIAHDIPHI 179  
HsSLC25A40 IRNEGIKSLWSGLPPTLVMAVPATVIYFTCYDQLSALLRSKLGLEN----- 139  
HsSLC25A39 VRHEGTRTLWSGLPATLVMTVPATAIYFTAYDQLKAFKALCGRALTS----- 151  
ScMTM1 ASVEGITSLWRGISLTLMAIPANMVYFSGYEYIRDVSPIASTYP----- 157  
AgANT PKEQGI GAFWRGNLANVIRYFPTQALNF-AFKDVYKQVFLGGVDKNTQF-----WR 113  
AeANT PKEQGF GAFWRGNLANVIRYFPTQALNF-AFKDVYKQIFLGGVDKNTQF-----WR 114  
DmANT PKEQGF SFWWRGNLANVIRYFPTQALNF-AFKDKYKQVFLGGVDKNTQF-----WR 126  
HsANT PKEQGR LSFWRGNLANVIRYFPTQALNF-AFKDKYKQFLGGVDRHKQF-----WR 111  
ScANT AKQEG L ISFWRGNLANVIRYFPTQALNF-AFKDKIKLMF--GFKKEEGY-----GK 125  
AgUCP5 SRQEGVKALYSGIWPAVLRQATYGTIKFGTYITLKKVATDRGLLHDKAG-----NE 111  
AeUCP SKQEGMKALYSGIWPAVLRQATYGTIKFGTYITLKKVAIEKGLVVKSG-----NE 111  
DmUCP SREELRALYSGIWPAVLRQATYGTIKFGTYITLKKLANERGLLINEDG-----SE 111  
HsUCP5 CKEEGVLALYSGIAPALLRQASYGTIKIGIYQSLKRLFVER--LED-----E 139  
AgPiC LAEDGSRGLVKGWAPTFFGYSAQGAFFKGLYEVFKVQYANMLGEENAYL-----Y 169  
AePiC VAEEGA KGLVKGWAPTFFGYSAQGAFFKGLYEVFKVQYANVLGEENAYL-----Y 153  
DmPiC VAEEGA RGLAKGWAPTLLGYSAQGLCKFGLYELFKVKYAEIIGEEENAYL-----Y 157  
HsPiC LKEDGVRGLAKGWAPTFLGYSMQGLCKFGFYEVFKVLYSNMLGEENTYL-----W 160  
ScPiC1 IANEGWKKVYTGFGATFVGYSLQGAGKYGGYEFKHLYSWLSWG----- 108

: \* . \* . . :

AgMC1 PIWLP LLAGSSARVLA VTI VNP LELIRTKMQSEK-----LSYREVQAFRSMRLVQ 211  
AeMC1 PFWLP L VAGGSARVMA VTI VNP LELIRTKMQSEK-----LSYTEVGRGFRSMLKMQ 210  
DmMC1 PFLV P LLAGVSGRILAVTCVSPVELIRTKMQSQR-----MTHAEMFGTIRQVVQSQ 230  
HsSLC25A40 ETCIPIVAGI VARFGAVTVI SPLELIRTKMQSKK-----FSYVELHRFVSKKVSQD 190  
HsSLC25A39 DLYAPMVAGALARLGTVTVI SPLELMRTKLAQAH-----VSYRELGACVRTAVAQ 202  
ScMTM1 -TLNPLFCGAIARVFAATSIAPLELVKTKLQSI PRSSKSTKTKWMMVKDLLNETRQEMKMV 216  
AgANT YFLGNL GSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLGADV---RGAGEREFNGLDCLKKTVKSD 170  
AeANT YFMGNL GSGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLGADV---RAGAEREYNGLIDCLKKTVKSD 171  
DmANT YFAGNL ASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADTG---KGG-QREFTGLGNCLTKIFKSD 182  
HsANT YFAGNL ASGGAAGATSLCFVYPLDFARTRLAADVG---KGAQREFHGLGDCI IKIFKSD 168  
ScANT WFAGNL ASGGAAGALSLLFVYSLDYARTRLAADSKSS-KKGGARQFNGLIDVYKKTLSKSD 184  
AgUCP5 SLWCNAACATMAGAISSAIANPTDVLKVRMQVHGR-----GTSVGLVQCFREIYVHE 164  
AeUCP NVWCNAGCATIAGAVSSAIANPTDVLKVRMQVHGR-----GTNNAGLARCFKEIYVHE 164  
DmUCP RVWSN ILCAAAGA ISSAIANPTDVLKVRMQVHGR-----GQ-HKGLLGCFGEIYKYE 163  
HsUCP5 TLLINMICGVVSGVISSTIANPTDVLKIRMQAQQ-----SLFQGS MIGSFI DIYQQE 191  
AgPiC RTWLYLGASASAEFFADMALSPFEAAKVKIQT-MPG-----FASN MREAMPKMMGEE 220  
AePiC RTWLYLAASASAEFFADIALSPMEAAKVKIQT-MPG-----FAGTLREAMPKMMGEE 204  
DmPiC RTSLYLAASASAEFFADIALAPFEAAKVKIQT-IPG-----YANNFREAVPKMLKEE 208  
HsPiC RTSLYLAASASAEFFADIALAPMEAAKVRIQT-QPG-----YANTLRDAAPKMYKEE 211  
ScPiC1 -VTVYLMASATAEFLADIMLCPFEAIKVKQQTMP-----FCNNVVDGWKKMYAES 159

. . . : . : :

AgMC1 G-ILGLWKGFPTLILRDVPFSGIYWTYTESFKKHFN-----VSQPTFAFSFAGG 259  
AeMC1 G-IMGLWKGFPTLILRDVPFSGIYWTYETFKKRCN-----VTQPTFGVSFVGG 258  
DmMC1 G-VLGLWRGLPPTLILRDVPFSGIYWTCEYELKSSFG-----VVEPTFSFSFAAG 278  
HsSLC25A40 G-WISLWRGWAPTILRDVPFSAMYWNYEILKKWLCEKSG-----LYEPTFMINFTSG 242  
HsSLC25A39 G-WRSLWLWGWPALTRDVPFSALYWFNYELVKS WLN GFRP-----KDQTSVGM S FVAG 254  
ScMTM1 GPSRALFKGLEITLWRDVPFSAIYWSSYELCKERLWLDSTRFA-SKDANWVHFINSFASG 275  
AgANT G-IIGLYRGFNVSVQGI IYRAAYFGCFDTAKGMLPD-----PKNTSIFVSWAIA 219  
AeANT G-LIGLYRGFNVSVQGI IYRAAYFGCFDTAKGMLPD-----PKNTSIFVSWAIA 220  
DmANT G-IVGLYRGFNVSVQGI IYRAAYFGFYDTARGMLPD-----PKNTPIYISWAIA 231  
HsANT G-LRGLYQGFNVSVQGI IYRAAYFGVYDTAKGMLPD-----PKNVHIFVSWMIA 217  
ScANT G-VAGLYRGF LPSVVGIVVYRGLYFGMYDSLKPLLLTG-----SLEGSFLASFLLG 234  
AgUCP5 G-IRGLWRGVGPTAQRAAVIAAVELPVYDFCKLHLMET-----FGDQVANHFISS 213  
AeUCP G-VRGLWRGVGPTAQRAAVIAAVELPVYDFCKLHLMET-----FGDQVANHFISS 213  
DmUCP G-VRGLWRGVGPTAQRAVVIASVELPVYDFCKLQLMNA-----FGDHVGNHFISS 212  
HsUCP5 G-TRGLWRGVVPTAQRAAIVVGVLPVYDITKKHLILSG-----MMGDTILTHFVSS 242  
AgPiC G-IMAFYKGLVPLWCRQIPYTMKFACFEKTVELLYAYVVVPKPRDQCSKGEQLIVTFAAG 279  
AePiC G-ITAFYKGLVPLWCRQIPYTMKFACFEKTVELLYAYVVVPKPRDQCSKGEQLLVTFAG 263  
DmPiC G-VNAFYKGLVPLWMRQIPYTMKFACFERTVELLYKYVVVPKPRADCTKGEQLIVTFAAG 267  
HsPiC G-LKAFYKGVAPLWMRQIPYTMKFACFERTVEALYKFAVVVPKPRSECSKPEQLVTFVAG 270  
ScPiC1 GGMKAFYKGI VPLWCRQIPYTMCKFTSF EKIVQKIYS-VLPKKKEEMNALQQIISVSVFVGG 218

\* . : : \* : : . : .

AgMC1 AISGGVAAFFTVPFVVKTHQOIAFGEQFLYAQNGDSKA-----AG 300  
AeMC1 AISGGVAAFLTVPFDVVKTHQOIEFGEKFLYAENGEK----- 295  
DmMC1 AISGSVAATITTPFDVVKTHEQIEFGEKFI FSDNPPK----- 315  
HsSLC25A40 ALSGSFAAVATLFPFDVVKTKQKQTQLWT---YESHKISM----- 277  
HsSLC25A39 GISGTVAAVLTLPFDVVKTRQVALGA---MEAVRVN----- 288  
ScMTM1 CISGMIAAICTHPFDVGKTRWQISMNN---NSDPKG----- 308  
AgANT QVVTTASGII SYPFDTVRRRMMMQSGRA----- 247  
AeANT QVVTTASGVI SYPFDTVRRRMMMQSGRA----- 248  
DmANT QVVTTVAGIVSYPFDTVRRRMMMQSGRK----- 259  
HsANT QSVTAVAGLVSYPFDTVRRRMMMQSGRK----- 245  
ScANT WVVTGASTCSYPLDTVRRRMMMTSG----- 260  
AgUCP5 FIASLGSAIASTPIDVIRTRLMNQRRVHQLQPSITP-----AATTTTT 256  
AeUCP FIASLGSAVASTPIDVIRTRLMNQRRVQLQVHNLGPGGGGGGGRGVAGGGGLAAVANPS 273  
DmUCP FIASLGSAIASTPIDVIRTRLMNQRPV SITMN-----GVVTA 251  
HsUCP5 FTCGLAGALASNPVDVVRTRMMNQRAIVGHVD----- 274  
AgPiC YIAGVFCAIVSHPADVVVSKLNQAKGS----- 306  
AePiC YIAGVFCAIVSHPADVVVSKLNQAKGS----- 290  
DmPiC YIAGVFCAVSHPADVVVSKLNQAKGA----- 294  
HsPiC YIAGVFCAIVSHPADSVVSVLNKEKGS----- 297  
ScPiC1 YLAGILCAAVSHPADVMVSKINSEKANK----- 246

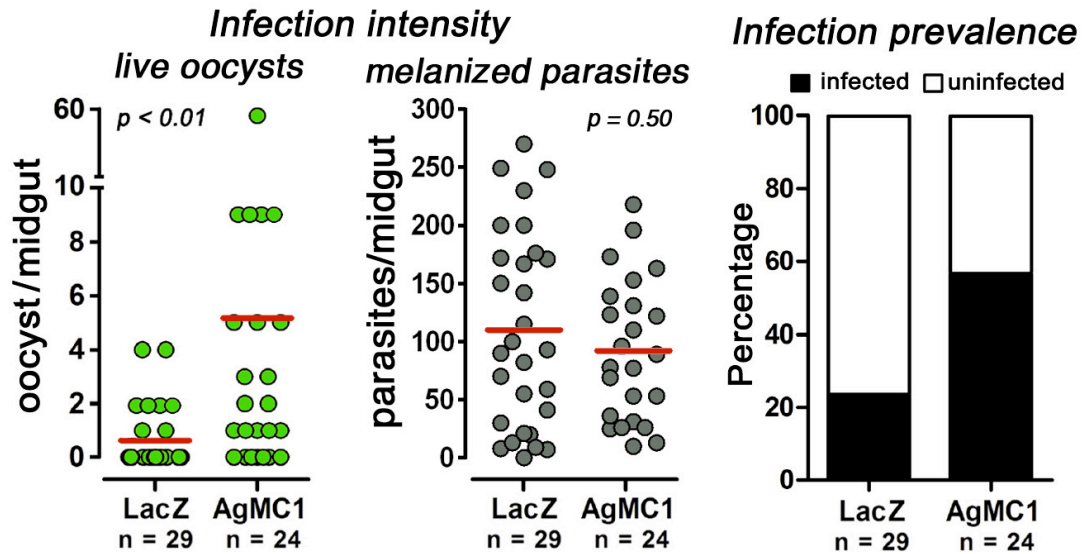
. : \* \*

AgMC1 PKKPVRSIGTFETMGRIFQMNGIRGLFAGLTPRLVKVAPACAIMIASFEYGNFFYRYNV 360  
AeMC1 -KKPQKSSGTFETMRNIYVRNGIKGLFAGLTPRLVKVAPACAIMIASFEYGNFFYRYNV 354  
DmMC1 ---QVATKSVAMRLAS IYRMGGVPAIFSGLGPRLFKVAPACAIMISSFEYGKSFYHYNI 372  
HsSLC25A40 ---PLHMS-TWIMKNIVAKNGFSLGSLIPRLIKIAPACAIMISTYEFGKAFFQKQNV 333  
HsSLC25A39 ---PLHVDSTWLLLRIRAESGTKGLFAGFLPRI IKAAPSCAIMISTYEFGKSFQRLNQ 345  
ScMTM1 ---GNRSRNMFKFLET IWRTEGLAALYTGLAARVIK IAPSCAIMISSYEISKVVFGNKLH 365  
AgANT -KSEVMYKNTLDCWVK IAKQEGSGAFFKGAFSNVLR-GTGGALVLFYDEVKALLG---- 301  
AeANT -KSEIMYKNTLDCWVK IAKTEGSSAFFKGAFSNVLR-GTGGALVLFYDEVKALMG---- 302  
DmANT -ATEVIYKNTLHCWAT IAKQEGTGAFKGAFSNLR-GTGGAFVLFVYDEIKKVL---- 312  
HsANT -GADIMYTGTVDCWRK IAKDEGAKAFFKGAWSNVLR-GMGGAFLVLFYDEIKKYV---- 298  
ScANT --QAVKYDGAFDCLRK IVAEEGVGSLFKGCGANILR-GVAGAGVISMYDQLQMLFGKKF 317  
AgUCP5 TTPRLYYTGSVDCAVQTVRNEGFRALYKGF IPTWVRMGPWNI IFFITYEQLKQFY----- 311  
AeUCP SPSAKIYTGSLDCAIQTVRNEGFRALYKGF IPTWVRMGPWNI IFFITYEQLKQMY----- 328  
DmUCP TP--KLYSGSLDCAVQTIRNEGLPALYKGF IPTWVRMGPWNI IFFITYEQLKQY----- 303  
HsUCP5 -----LYKGTVDGILKMWKHEGFFALYKGFWPWNLRLGPWNI IFFITYEQLKRLQI---- 325  
AgPiC -----SAIDVAKQLGFMGMWNLMPRI IMIGTLTALQWFIYDGVKVALSIPRP 354  
AePiC -----SAFDVAKQLGFMGMWNLMPRI IMIGTLTALQWFIYDGVKVALNIPRP 338  
DmPiC -----SAISVAKSLGFSGMWNLTPRI IMIGTLTALQWFIYDGVKVALGIPRP 342  
HsPiC -----SASLVKRLGFKGVWKGFLFARI IMIGTLTALQWFIYDSVKVYFRLRP 345  
ScPiC1 -----ESMSVASKRIYQKIGFTGLWNLMPVIRVMIGTLTSFQWLIYDSF----- 290

\* . . : \* . . : :

AgMC1 QRYQERKDRVASGSGDGSVSSSSSTS--- 387  
AeMC1 TRYQARWE-----KDQGALIKTKKHTGVGY 379  
DmMC1 DQHNRSNQ---ATKGPGS----- 387  
HsSLC25A40 RRQQY----- 338  
HsSLC25A39 DRLLGG----- 351  
ScMTM1 Q----- 366  
AgANT -----  
AeANT -----  
DmANT -----  
HsANT -----  
ScANT K----- 318  
AgUCP5 -----  
AeUCP -----  
DmUCP -----  
HsUCP5 -----  
AgPiC PPPEMPESLKKKLG VQ----- 370  
AePiC PPPEMPESLKKKLG VQ----- 354  
DmPiC PPPEMPASLKAKQH----- 356  
HsPiC PPPEMPESLKKKLG L TQ----- 362  
ScPiC1 -----

**Fig. S4.** Sequence alignment of members of the mitochondrial family from different species. AgMC1 (AGAP001297-PA) and the putative *Aedes aegypti* (AaMC1, AAEL001329) and *Drosophila melanogaster* (DmMC1, CG14209) putative ortholog genes, human mitochondrial carriers HsSLC25A-39 (NP\_057100) and SLC25A-40 (NP\_061331), and yeast manganese trafficking factor for mitochondrial (ScMTM1, EDN61842); human uncoupling protein 5 (HsUCP, NP\_003942), *An. gambiae* (AgUCP, AGAP011839-PA), *Ae. aegypti* (AaUCP, AAEL011842) and *D. melanogaster* (DmUCP, CG7314-RB) uncoupling proteins; Human SLC25A6 (HsANT, NP\_001142) and yeast (ScANT, AAA97484) adenine nucleotide translocators, *An. gambiae* (AgANT, AGAP006782-PA), *Ae. aegypti* (AaANT, AAEL004855) and *D. melanogaster* (DmANT, CG16944) putative adenine translocators; human SLC25A3 (HsPiC, NP\_005879) and yeast (ScPiC, NP\_010973) phosphate carriers, and *An. gambiae* (AgPiC, AGAP003586-PA), *Ae. aegypti* (AaPiC, AAEL011184) and *D. melanogaster* (DmPiC, CG4994-PA) putative phosphate carriers.



**Fig. S5.** Effect of AgMC1 silencing on *Plasmodium berghei* survival in the refractory *Anopheles gambiae* L35 strain. AgMC1 expression was silenced by dsRNA injection, and a control group was injected with dsLacZ. Mosquitoes were fed on a *P. berghei*-infected mouse, and the number of mature oocysts and melanized parasites was determined 7 days post feeding. AgMC1 silencing significantly increases the number of live oocysts (right panel;  $P < 0.01$ , Kolmogorov-Smirnov test) and the prevalence of infection from 23% to 56% (left panel;  $P < 0.001$ ,  $\chi^2$ ).

## Supplemental Experimental Procedures

**Infection of Mosquitoes with *P. berghei*.** Mosquitoes were infected with *P. berghei* (GFP-CON transgenic 259cl2 strain) (1) by feeding them on anesthetized infected BALB/c mice. Mouse infectivity was established by determining the parasitemia and by performing an *in vitro* exflagellation assay, as described previously (2). In all the studies, mouse parasitemia was 4–5 % and the number of exflagellations/field was 1–2 under a 40× objective. Blood-fed mosquitoes were kept at 21°C and 80% humidity. Infection phenotypes were determined 7–8 days post infection by fixing for 30 min in 4% formaldehyde and mounting the midguts in glass slides with VectaShield (Vector Laboratories). Distribution of parasite numbers in individual mosquitoes between the dsLacZ (control) and dsAgMC1 (experimental) groups was scored in a fluorescence microscope and compared using the Kolmogorov-Smirnov test. Phenotypes were confirmed in three independent experiments.

**Cloning and Sequencing of AgMC1 cDNA.** RNA was extracted from midguts of sugar-fed mosquitoes with Trizol (Invitrogen, San Diego, CA) according to the manufacturer's protocol. First-strand cDNA was synthesized using QuantiTect Reverse Transcriptase (Qiagen). The full-length AgMC1 sequence (1498 bp) was amplified using the following primers: F-TGCACTCGT TCTATTTTCTACTGC and R-CGAAGTGGAGGAACTGCTACTAA and cloned with TOPO TA cloning kit (Invitrogen) following standard procedures. Primers were designed based on the cDNA sequence predicted by the bioinformatics annotation of the AgMC1 gene in the *An. gambiae* genome sequence (GenBank accession No. AGAP001297-PA).

**Quantitation of Gene Expression.** RNA extraction and cDNA synthesis were performed as described above. Gene expression was assessed by SYBR green quantitative real-time PCR (qPCR) (DyNamo HS; New England Biolabs) in a Chromo4 system (Bio-Rad). PCR involved an initial denaturation at 95°C for 15 min, followed by 44 cycles of 10 s at 94°C, 20 s at 56°C, and 30 s at 72°C. Fluorescence readings were taken at 72°C after each cycle. A final extension at 72°C for 5 min was completed before deriving a melting curve (70°C–95°C) to confirm the identity of the PCR product. qRT-PCR measurements were made in triplicate. Relative quantitation results were normalized with *An. gambiae* ribosomal protein S7 as an internal standard and analyzed by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method (3). The primers used to evaluate gene expression were AgMC1, F-TTG TGAAATCAAACCCAGCA and R-CCACGTCCAGTGGAGT CATA. S7, F-GGCGATCAT CATCTACGTGC and R-GTAGCTGCTGCAAACCTTCGG.

**dsRNA Synthesis.** A 218-bp fragment of the lacZ gene was amplified using the primers (5' to 3') F-GAGTCAGTGAGCGAGGAAGC and R-TATCCGCTCACAATTCCACA and cloned into the pCRII-TOPO vector. T7 promoters were incorporated onto this fragment by amplifying the cloned insert using the following primers: M13F-GTAAAACGACGGCCAGT and M13R-CTCGAGTAATACGACTCACTATAGGGCAGGAAACAGCTATGAC. The PCR product was used as a template to synthesize dsRNA *in vitro* using a MEGAscript RNAi kit (Ambion). dsRNA was loaded to an RNA purification column supplied by the kit, eluted with water and concentrated to 3 µg/µl using a Microcon YM-100 filter (Millipore). A similar cloning strategy was used for the AgMC1. The cDNA from AgMC1 was used to generate dsRNA templates of 698 bp using the following primers: AgMC1 (5' to 3') F-TAATACGACTCACTATAGGGAGCAAGCGTCCCCTAC ACT and R-TAATACGACTCACTATAGGGCGTTTTGACCACGTCGAAC.

**Gene Silencing.** Female mosquitoes were injected with 69 nl of a 3- $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  solution of dsRNA from the gene of interest at 1–2 days post emergence. Control mosquitoes were injected with dsLacZ. Two days later, females from both groups (dsLacZ and dsAgMC1) were used. Gene silencing phenotypes were confirmed in at least two independent experiments.

**Early Oocyst Count.** Assessment of early oocyst numbers in the midgut was done 48 h post-infection, using immunofluorescence staining with anti-Pbs21 antibodies to detect the parasites. Midguts were dissected in ice-cold PBS, fixed for 30 s in 4% paraformaldehyde and returned to ice-cold PBS to stop the fixation. The midgut was opened longitudinally to remove the blood and the epithelia was carefully cleaned, fixed overnight with 4% paraformaldehyde at 4°C and washed twice with PBS. Midguts were permeabilized and blocked for 2 h at room temperature with PBT (1% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS) under gentle shaking. Midguts were incubated with primary Ab (anti-Pbs21; mouse; 1:300 dilution) overnight at 4°C followed by three washing steps of 20 min with PBT at room temperature. The incubation with the secondary Ab (anti-mouse IgG-Cy3; 1:1000) carried out for 2 h at room temperature. The samples were then washed as described above and mounted using VectaShield. The number of early oocysts was scored in a Leica fluorescence microscope under the 40 $\times$  objective.

1. Franke-Fayard B, et al. (2004) A *Plasmodium berghei* reference line that constitutively expresses GFP at a high level throughout the complete life cycle. *Mol Biochem Parasitol* 137:23–33.
2. Billker O, Shaw MK, Margos G, Sinden RE (1997) The roles of temperature, pH and mosquito factors as triggers of male and female gametogenesis of *Plasmodium berghei* *in vitro*. *Parasitology* 115 (Pt 1):1–7.
3. Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-DDC(T)) method. *Methods* 25:402–408.

---

## Perspectivas II



Identificar análogos de AgMC1 em *Aedes aegypti*.



Verificar, através de genética reversa, se a redução deste análogo em *A. aegypti* altera a resistência a infecção.



Encontrar outros alvos que, de forma contrária ao AgMC1, quando silenciados resultem num aumento da geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mitocondrial em *A. aegypti*.



Avaliar a susceptibilidade dos mosquitos *A. gambiae* ao *P. berghei* após o silenciamento deste possível gene.

---

## Discussão

A hematofagia é desafio metabólico e redox importante para os organismos que se utilizam desta estratégia (Graca-Souza e cols., 2006). Se por um lado este hábito alimentar possibilitou a produção de uma prole extensa, em virtude do conteúdo energético desta dieta, impôs também uma adaptação aos altos níveis de proteína, principalmente a hemoglobina, liberados pela digestão. A hidrólise desta molécula libera o seu grupo prostético, o heme, que livre é altamente pró-oxidante. O nosso grupo de pesquisa se dedica há algumas décadas à tentar entender as adaptações redox de alguns organismos hematófagos. Como descrito na seção 10 (“*a hematofagia como um desafio*”) vários destes mecanismos já foram identificados. Nossa hipótese inicial era a de que os insetos hematófagos sofriam um grave estresse oxidativo após a alimentação com sangue e que o aumento da expressão de diversas enzimas anti-oxidantes (Paes e Oliveira, 1999; Paes e cols., 2001) e dos sortidos sistemas para ligar o heme, diminuindo sua reatividade (Oliveira e cols., 1999b; Maya-Monteiro e cols., 2000; Maya-Monteiro e cols., 2004b; Lara e cols., 2007) ajudaria o inseto a conter o desafio oxidativo. No entanto, alguns dados obtidos nos últimos anos nos fizeram mudar um pouco a nossa hipótese inicial. Os dados apresentados nesta tese em adição aos dados obtidos pelo aluno de doutorado Jose Henrique MC Oliveira ajudaram a montar um painel um pouco distinto. Assim, nos próximos parágrafos pretendo contar um pouco desta história.

Diversas evidências na literatura mostravam que alguns parasitas quando passavam a habitar a circulação sanguínea reduziam o seu metabolismo oxidativo, podendo sobreviver, por exemplo, dias na presença de cianeto de potássio (Yanagisawa, 1965) e se tornavam fermentativos (Yanagisawa, 1965; Jacobasch e cols., 1990). Este conjunto de dados levou o então aluno de doutorado Marcus F. Oliveira (agora professor desta instituição e meu orientador) e seu então orientador Pedro L. Oliveira em 2002 a sugerir a seguinte hipótese: A



mudança do metabolismo aeróbico para o anaeróbico nestes parasitas hematófagos representaria um mecanismo antioxidante preventivo (Oliveira e Oliveira, 2002)? Nesta hipótese eles discutem o fato do metabolismo oxidativo requerer a participação da mitocôndria cuja atividade, gera dentre outros produtos, o  $H_2O_2$ . A potencial interação desta molécula com o ferro, produto da degradação do heme, poderia resultar na geração do radical hidroxila ( $OH^\bullet$ ), uma espécie reativa de oxigênio (ROS) muito tóxica. A produção desta espécie estaria relacionada com o quadro de estresse oxidativo. Para evitar este cenário, os parasitas hematófagos, ao se encontrarem na circulação sanguínea, teriam convergido o seu metabolismo para o fermentativo, onde a mitocôndria teria uma participação limitada favorecendo uma situação de baixa geração de ROS. À luz destas evidências decidimos avaliar se adaptações parecidas aconteciam também em insetos hematófagos. No entanto, como mencionado acima, acreditávamos inicialmente que estes organismos estariam vivenciando uma condição de estresse oxidativo após a alimentação com sangue.

A nossa primeira abordagem foi avaliar o metabolismo mitocondrial do músculo de vôo do mosquito *A. aegypti*. A escolha do músculo de vôo se deu pela praticidade de isolar a grande quantidade de mitocôndrias funcionais presentes neste tecido. Durante o mestrado, estabeleci os protocolos para isolar as mitocôndrias do músculo de vôo de *A. aegypti* e gerei dados preliminares onde comparei o consumo de  $O_2$  e a geração de  $H_2O_2$  dos mosquitos alimentados somente com uma solução de sacarose com os insetos alimentados com sangue (somente no tempo de 24 horas após a alimentação). Para a nossa surpresa, após a alimentação com sangue havia uma redução das taxas de consumo de oxigênio e da geração de ROS (Goncalves e cols., 2009). Ao mesmo tempo, o estudante de doutorado Jose Henrique M.C. de Oliveira estava avaliando a dinâmica de produção de ROS usando um outro tecido do mosquito, o intestino. Este tecido, ao contrario do tórax, está em contato direto com o sangue. Os dados do aluno Jose Henrique mostram que logo após a ingestão do sangue a produção de

ROS é drasticamente reduzida, e esta redução permanece até o mosquito excretar todo conteúdo intestinal. Desta forma, os mosquitos parecem não vivenciar um estresse oxidativo após a alimentação com sangue, já que há uma redução nos níveis de ROS tanto no tórax quanto no intestino.

Durante o doutorado, mostrei que a redução das taxas respiratórias e da geração de  $H_2O_2$  eram eventos paralelos à digestão do sangue. Contudo, o tórax (onde estão os músculos de vôo) não está em contato direto com o sangue e dados da literatura sugerem que os níveis de ferro, oriundos da dieta sanguínea, não mudam neste tecido após a ingestão de sangue (Zhou e cols., 2007). Além disso, nossos dados mostram que ocorrem reduções significativas no consumo de  $O_2$  e na geração de ROS em momentos muito precoces da ingestão de sangue (Goncalves e cols., 2009) onde pouca atividade proteolítica é observada. (Barillas-Mury e cols., 1995). Alguns dados preliminares sugerem ainda que provavelmente não é a alimentação com sangue em si que causa a redução no consumo de  $O_2$  uma vez que oferecer plasma ou sangue suplementado com SBTI (inibidor de tripsina, que impede a digestão e liberação do produtos pró-oxidantes do sangue) aos mosquitos, impacta da mesma forma a respiração (dados não mostrados). Estes resultados sugerem que é a distensão do intestino do mosquito após a alimentação que induz as alterações observadas no consumo de  $O_2$ , sugerindo a participação de hormônios neste evento, o que é corroborado com a velocidade extremamente rápida com que a ingestão do sangue impacta o metabolismo mitocondrial do tórax. Outros dados importantes sugerem que as atividades de algumas enzimas glicolíticas não mudam após a alimentação com sangue (dados não mostrados), sugerindo que não ocorre uma mudança para o metabolismo mais fermentativo, mesmo estes insetos apresentando uma redução do metabolismo oxidativo. Sendo assim, acreditamos que o músculo de vôo enfrenta um estado metabólico quiescente após a alimentação com sangue.

Os dados discutidos acima poderiam levar a conclusão errônea de que após a alimentação com sangue há uma redução global do metabolismo do músculo de vôo. No entanto, os nossos dados não suportam esta afirmação. Ao avaliarmos a atividade das enzimas do STE observamos que há uma redução específica da atividade da citocromo *c* oxidase e do conteúdo dos citocromos *c* e  $a + a_3$  do STE. Além disso, não observamos alterações na atividade da F<sub>0</sub>F<sub>1</sub> ATP sintase. A análise ultraestrutural do músculo de vôo revelou que as mitocôndrias dos mosquitos alimentados com sangue (24 h) apresentam tamanho aumentado sugerindo estarem mais fusionadas (Goncalves e cols., 2009). O aumento da expressão dos genes de fusão, *mtf* e *opa*, suportam estes achados.

Além do remodelamento ultraestrutural que observamos há também um remodelamento da forma pela qual os complexos mitocondriais se organizam na cadeia transportadora. Os complexos da STE não se organizam de uma forma sólida (Introdução parte I, secção 8), ao contrário eles estão estruturados na forma de supercomplexos. Estas supra-associações podem ser visualizadas através da técnica de *blue native polyacrylamide gel electrophoresis* (BN-PAGE) (Wittig e cols., 2006). Utilizando esta técnica pudemos observar que após a alimentação com sangue há uma re-estruturação dos supercomplexos mitocondriais (dados não mostrados). Alguns indícios na literatura indicam que a formação dos supercomplexos é importante para direcionar os substratos pela ETS aumentando a eficiência respiratória e reduzido a geração de ROS.

Nossos dados sugerem que a alimentação com sangue promove um remodelamento metabólico. Acreditamos que estas alterações em períodos precoces da alimentação não estejam relacionadas com a digestão do sangue, mas sim com a distensão do tórax digestivo que desencadeia uma sinalização hormonal. No entanto, em momentos mais tardios, onde a atividade digestiva se encontra elevada, não podemos rejeitar a hipótese de que produtos da digestão do sangue contribuam para as alterações observadas. Sugerimos que o

remodelamento do metabolismo do músculo de vôo após a alimentação com sangue seja importante para direcionar os substratos provenientes da digestão, não para o vôo, mas sim para os ovários, maximizando a ovoposição.

Utilizando um outro modelo hematófago, o inseto *Rhodnius prolixus*, observamos que a alimentação com sangue também promove uma redução no consumo de O<sub>2</sub> e na geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3 dias após a ingestão de sangue (dados não mostrados). Usar o *R. prolixus* como modelo será bastante conveniente, pois ele é um inseto grande facilitando a dissecação de diferentes órgãos. Embora este modelo não possua seu genoma seqüenciado, existem muitos dados acerca de sua fisiologia. Um conjunto de dados muito interessantes gerados durante a tese da estão aluna Giselle Almeida de Oliveira, caracterizou o transporte de lipídeos para os diversos tecidos deste inseto. Ao contrário do *A. aegypti*, que utiliza carboidratos como fonte de energia para sustentar o vôo, o *R. prolixus* utiliza principalmente lipídeos (Oliveira e cols., 2006). No entanto, os lipídeos também são usados em grandes quantidades pelos ovários durante a ovogênese. Portanto, não é difícil de imaginar que, se os insetos alimentados voarem, menos substratos energéticos serão direcionados a ovoposição. De fato, após o vôo existe um direcionamento de lipídeo para o músculo de vôo e conseqüentemente uma redução da disponibilidade lipídica para os ovários, impactando no número de ovos que estes insetos colocam (Oliveira e cols., 2006). Nos primeiros dias após a digestão do sangue a quantidade de nutrientes é grande nos insetos e machos submetidos ao vôo extenuante no 2º dia após a alimentação apresentam alta capacidade de vôo. No entanto, a partir do segundo dia há uma redução na capacidade de vôo (Oliveira, 2007), indicando que há um determinado ponto em que o inseto está tão comprometido com a reprodução que ele não consegue mais investir em outras atividades como, por exemplo, o vôo.

Ao observar as alterações na função mitocondrial do músculo de vôo após a alimentação com sangue tanto no *A. aegypti* quanto no *R. prolixus*, hipotetizamos que esta era

uma estratégia adotada por todos os insetos hematófagos. Desta maneira, durante o meu estágio de doutorado sanduíche tive a oportunidade de usar outro inseto vetor como modelo, o mosquito *Anopheles gambiae*. Para a nossa surpresa, não observamos nenhuma alteração na função mitocondrial do músculo de vôo destes insetos após a alimentação com sangue (dados não mostrados). Contudo, dados muito preliminares usando o flebótomo *Lutzomyia longipalpis* sugeriram uma redução do consumo de O<sub>2</sub> 24 horas após a digestão do sangue (dados não mostrados).

Ainda não podemos generalizar os resultados de que a alimentação com sangue promove uma redução no consumo de O<sub>2</sub> e da geração de ROS no músculo de vôo de insetos hematófagos. Entretanto, acreditamos que as alterações observadas nestes modelos constituem uma importante adaptação á hematofagia.

Embora não tenhamos sido capazes de mostrar que numa espécie próxima do *Aedes aegypti*, o mosquito *Anopheles gambiae*, também altera seu metabolismo após a alimentação com sangue, descobrimos mecanismos importantes acerca das relações entre o metabolismo mitocondrial e a imunidade inata nestes insetos. Os experimentos realizados com o mosquito *A. gambiae* foram realizados no laboratório da Dra. Carolina Barillas-Mury no National Institutes of Health em conjunto com o estudante de doutorado José Henrique M C de Oliveira. Nossa motivação para o estagio no laboratório da Dra. Barillas-Mury foi o fato de que ela possuía em seu laboratório duas linhagens distintas de *A. gambiae*, as linhagens G3 e a L3-5. Os mosquitos da linhagem L3-5 (Collins e cols., 1986) apresentam uma peculiaridade muito interessante que é o fato de que estes são resistentes à malária. Isto significa que estes insetos são incapazes de se infectar e, portanto de transmitir a doença. Tendo em vista que a malária tem uma importância médica muito grande, pois anualmente causa a morte de mais de um milhão pessoas principalmente de crianças africanas com idade inferior a 5 anos de idade, pode-se imaginar a importância médica de um mosquito que não transmita esta doença. Em

1997 o grupo do professor Frank Collins (Zheng e cols., 1997) descreveu que uma região do braço direito do cromossomo 2 deste mosquito estava associada ao fenótipo de resistência. Esta região é conhecida com Pen1 (de: *Plasmodium encapsulation 1*). Esta região é formada por algumas centenas de genes inclusive diversos genes do metabolismo mitocondrial. No entanto, o que chamou nossa atenção era o fato de que nesta região havia um gene que era similar a uma proteína desacopladora (UCP). As proteínas desacopladoras têm um papel importante na termogenese e no controle da geração de ROS, pois elas são capazes de desacoplar a respiração da síntese de ATP promovendo uma redução do potencial de membrana mitocondrial (Krauss e cols., 2005). Além disso, um único trabalho havia mostrado que camundongos deletados para o gene da UCP2 apresentavam um aumento da geração de ROS e uma maior resistência a infecção por *Toxoplasma gondii* (Arsenijevic e cols., 2000). A nossa hipótese inicial, embora um tanto ambiciosa, postulava que o possível ortólogo de UCP presente na região Pen1 que era o que conferia a refratoriedade aos mosquitos L3-5. Esta hipótese fazia muito sentido uma vez que os mosquitos desta linhagem apresentam um polimorfismo nesta região Pen1 o que conferia aos genes deste locus a perda ou o ganho de função. Os dados publicados pelo grupo da Dra. Barillas-Mury indicavam que os mosquitos L3-5 apresentavam uma maior geração de ROS (Kumar e cols., 2003) e que diversos genes do metabolismo mitocondrial eram alterados nestes mosquitos quando comparados aos da linhagem G3 (Kumar e cols., 2003). Se o gene da UCP nos mosquitos L3-5 estivesse truncado de fato, estes mosquitos apresentariam uma incapacidade de desacoplar a mitocôndria e, portanto, manteriam alto o seu potencial de membrana favorecendo a maior produção de ROS. O aumento da geração de ROS seria importante para levar a morte dos parasitos quando estes cruzam a monocamada de células do intestino visando alcançar a hemocele. Para corroborar a nossa hipótese, mosquitos da linhagem G3, portanto que eram susceptíveis a

malária, quando silenciados para o gene da catalase apresentavam maiores níveis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e eram mais resistentes a infecção por *P. berghei* (Molina-Cruz e cols., 2008).

Uma análise mais detalhada deste gene, revelou, no entanto, que este não se tratava de uma UCP. Na verdade, a alta similaridade com esta proteína era devido ao fato de que ambos pertenciam a mesma família de carreadores de soluto para a matriz mitocondrial (SLC25) (para revisão ver Palmieri, 2004). A única informação que conseguimos obter, até este momento, era que esta seqüência apresentava alta similaridade com os membros 39 e 40 da família SLC25 de humanos cujas funções não eram conhecidas (Haitina e cols., 2006). Além deste fato, o ortólogo destes membros em levedura aparentava ser importante para o transporte de manganês para a matriz mitocondrial e, portanto para a atividade da superóxido desmutase (Luk e cols., 2003).

A nossa primeira abordagem perante o ortólogo de *A. gambiae* aos membros 39 e 40 da família SLC25 foi o silenciamento deste gene e seu impacto na infecção por *P. berghei*. Felizmente, observamos que após o silenciamento o número de oocitos no intestino das fêmeas alimentadas com sangue de camundongo infectado era significativamente maior do que as fêmeas controle. Estes dados sugeriam que este gene, que nomeamos de AgMC1 (de: *A. gambiae* Mitochondrial Carrier 1), era importante para o controle da infecção. O ineditismo dos dados apresentados neste trabalho envolvem a associação da alteração na função mitocondrial impactando a imunidade dos insetos.

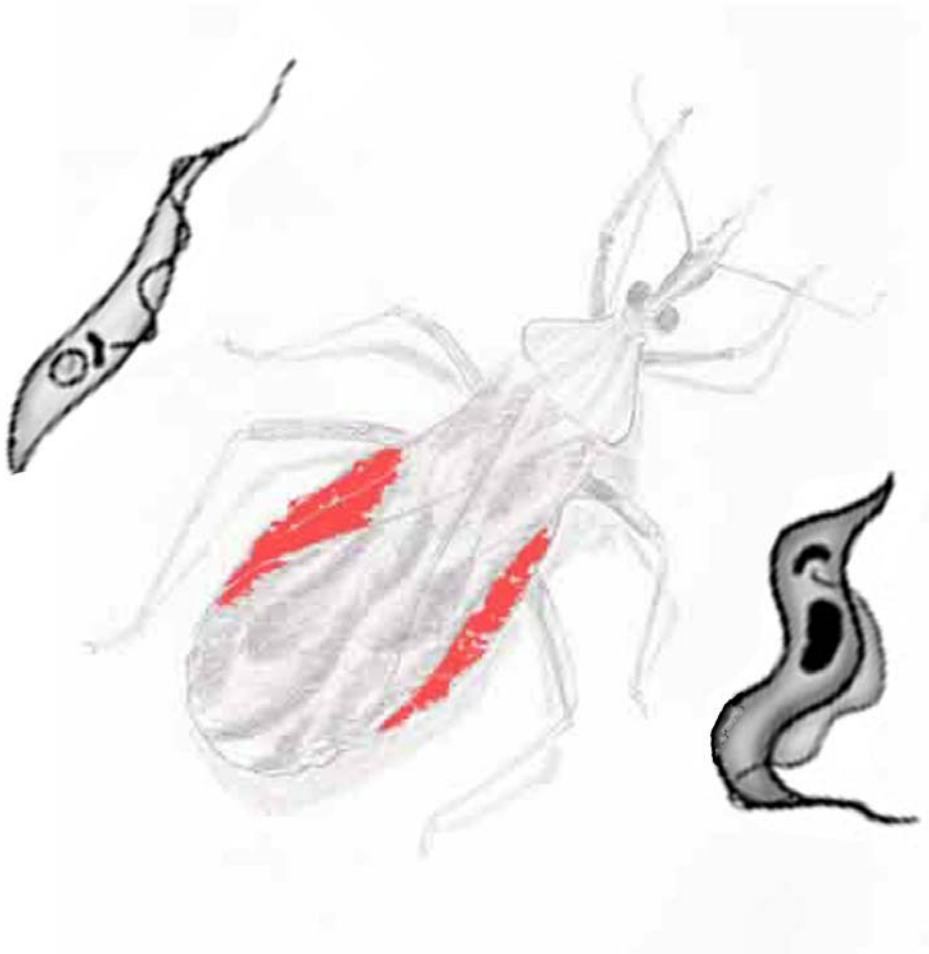
Ao analisamos parâmetros da função mitocondrial como o consumo de oxigênio, observamos que o estado 4 mitocondrial dos mosquitos silenciados para o AgMC1 era maior do que os mosquitos controle. Estes dados indicavam que esta proteína era importante para manter o acoplamento mitocondrial. Notavelmente, tanto o potencial de membrana quanto a geração de ROS mitocondrial dos mosquitos silenciados eram menores. Os dados gerados no manuscrito intitulado “*Mitochondrial uncoupling in the mosquito Anopheles gambiae*

*enhances plasmodium infection*” anexado a esta tese, colocam num mesmo plano o metabolismo mitocondrial e a susceptibilidade ao *P. berghei*, ressaltando a mitocôndria no contexto da imunidade inata de invertebrados.



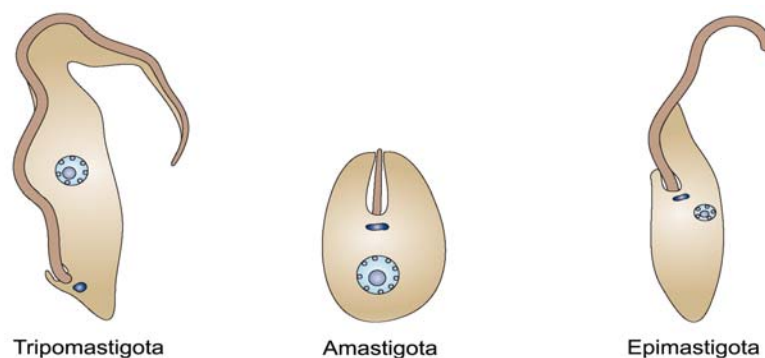
# Capítulo II:

## Remodelamento mitocondrial no parasito *Trypanosoma cruzi*



### 2.1 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*

Os insetos triatomíneos, popularmente conhecidos como barbeiros, dentre os quais se inclui o *Rhodnius prolixus*, são os vetores do *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da doença de Chagas que acomete 12 a 14 milhões de pessoas (Dias, 2007). O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado que pertence à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e, assim como outros membros desta ordem, tem destacada importância clínica. O ciclo de vida deste parasito é complexo e envolve o inseto vetor, um hospedeiro vertebrado e quatro diferentes formas evolutivas (Figura 1).



**Figura 19.** Desenho representativo evidenciando as formas evolutivas do *T. cruzi*. A forma tripomastigota nesta representação engloba tanto a forma sanguínea quanto a forma metacíclica do hospedeiro invertebrado. (Figura modificada de (Docampo e cols., 2005), por Rubem Menna-Barreto).

No hospedeiro invertebrado, a forma epimastigota proliferativa habita a porção dilatada do intestino médio do inseto, conhecida como estômago. No entanto, é na porção posterior do intestino médio que os epimastigotas se dividem repetidas vezes por divisão binária. O intestino médio apresenta alta atividade digestória e, portanto, acredita-se que

grande parte dos metabólitos provenientes da digestão do sangue sejam liberados neste compartimento, possibilitando, teoricamente, o estabelecimento dos epimastigotas. Contudo, é na porção final do intestino, no reto, onde encontram-se as maiores densidades populacionais de epimastigotas. Estes se diferenciam nas formas tripomastigotas metacíclicas, que são eliminadas junto às fezes do inseto, sendo capazes de infectar qualquer tipo celular (Garcia e cols., 2007). Uma vez no meio intracelular, as formas tripomastigotas se diferenciam nas formas proliferativas amastigotas. Ainda dentro das células, uma nova diferenciação ocorre agora de amastigotas para tripomastigotas sanguíneos, que irão romper as células, alcançando a corrente sanguínea disseminando a infecção para outros órgãos e tecidos, fechando o ciclo quando um novo inseto se alimentar do hospedeiro infectado (Figura 20). É importante salientar que durante seu ciclo de vida, o parasito precisa se adaptar aos diferentes ambientes por onde transita: a circulação sanguínea e o ambiente intracelular nos hospedeiros vertebrados, assim como diferentes segmentos do sistema digestório do hospedeiro invertebrado.

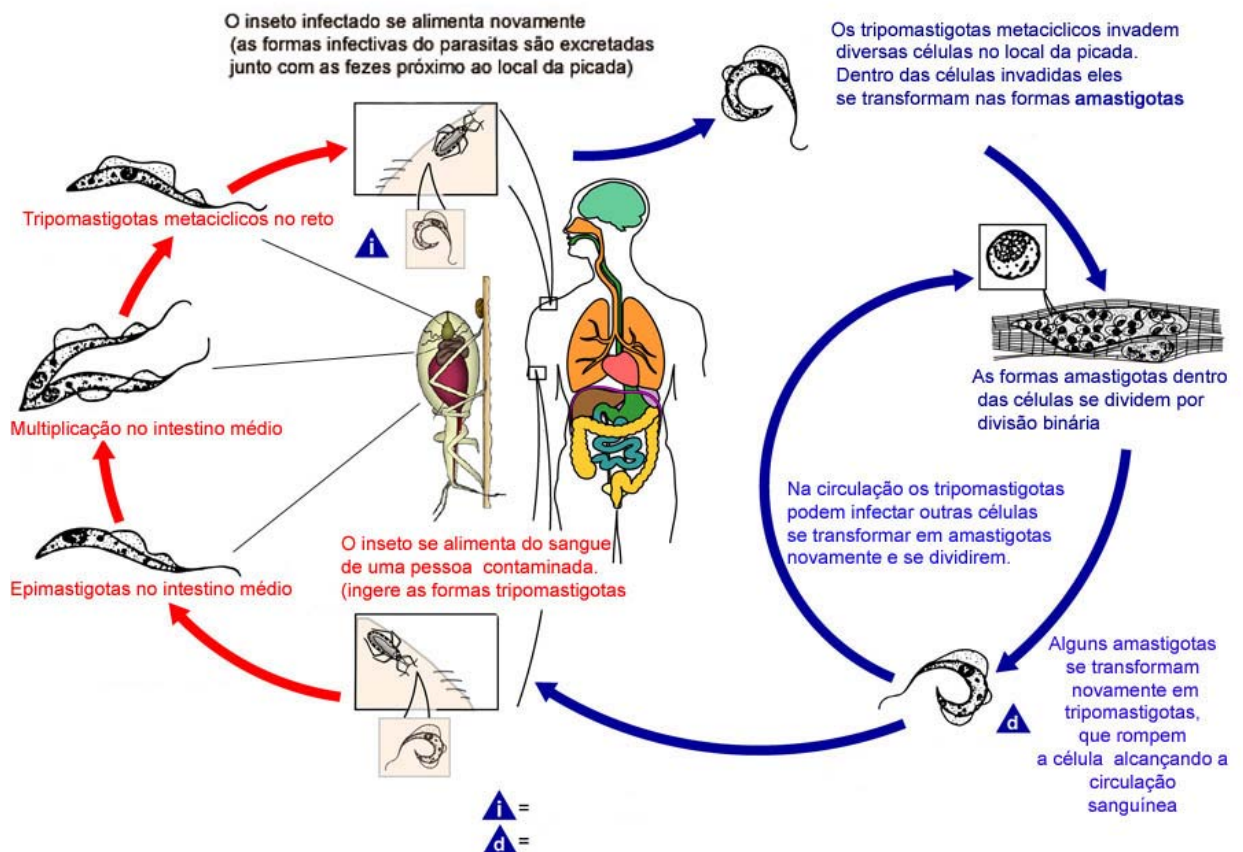


Figura 20. Ciclo de vida do *T. cruzi* envolvendo o hospedeiro invertebrado, o inseto triatomíneo e o vertebrado, o homem. Figura adaptada do centro de controle de doenças (CDC) <http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/TrypanosomiasisAmerican.htm> e (Garcia e cols., 2007).

O início do processo de invasão da célula do hospedeiro vertebrado pelo *T. cruzi* é estritamente dependente da carga energética do parasito. Formas metacíclicas do *T. cruzi* de duas linhagens geneticamente distantes têm seu potencial invasivo drasticamente reduzido quando previamente incubadas num meio pobre em substratos (Martins e cols., 2009). Sendo assim, o estudo do metabolismo energético deste parasito é de fundamental importância para melhor entender as relações tecidas com os seus hospedeiros, visando identificar formas mais eficazes de controle da doença de Chagas.

## 2.2 Metabolismo energético em tripanosomatídeos:

Os tripanosomatídeos constituem um modelo interessante para o estudo do metabolismo energético, uma vez que na mesma espécie as diferentes formas evolutivas apresentam peculiaridades metabólicas acentuadas. O metabolismo energético destes parasitos difere significativamente do hospedeiro vertebrado, representando um alvo interessante para o desenvolvimento de fármacos. Uma diferença marcante é a compartimentalização da via glicolítica em uma organela peculiar denominada de glicossoma. Além disso, os tripanosomatídeos apresentam uma única mitocôndria que se ramifica ao longo da célula.

No *T. brucei*, as formas sanguíneas são altamente dependentes dos níveis de glicose presentes na circulação do hospedeiro vertebrado. Desta forma, manter de 20 a 30% das enzimas da via glicolítica num compartimento especializado confere às formas sanguíneas uma maior eficiência da glicólise (Oppenheimer, 1987). Além disso, o glicossoma nestas formas é muito ativo, possibilitando um alto fluxo glicolítico, e permitindo a síntese da maior parte do ATP (Clayton e Michels, 1996; Michels e cols., 2006). Nas formas sanguíneas, é improvável que a mitocôndria contribua para os estoques de ATP do parasito, tendo em vista que os centros ferro-enxofre, alguns citocromos da ETS e diversas enzimas do ciclo de Krebs estão ausentes nesta organela (Oppenheimer, 1987). Surpreendentemente, embora estas formas apresentem uma mitocôndria quiescente, a atividade da  $F_0F_1$  ATP sintase se mantém preservada (Oppenheimer e cols., 1977a; Oppenheimer e cols., 1977b). O funcionamento da ATP sintase nestas formas é fundamental para a manutenção do potencial de membrana mitocondrial (Nolan e Voorheis, 1992) (ver também seção 1.6, capítulo I).

Uma outra característica interessante dos tripanosomatídeos é a presença de uma ETS ramificada (Chaudhuri e cols., 2006; Njogu e cols., 1980). Este termo designa a presença de uma oxidase acessória à citocromo *c* oxidase (complexo IV), conhecida como oxidase alternativa (AOx). Esta oxidase é sensível ao ácido salicilhidroxâmico (SHAM) ao invés de

cianeto de potássio (KCN). Nas formas sanguíneas do *T. brucei*, a oxidase alternativa (AOx) é muito ativa. Embora estas formas apresentem uma mitocôndria quiescente (Figura 3), com participação limitada na síntese de ATP, a presença da AOx nesta organela é fundamental para a manutenção do alto fluxo glicolítico. Isto acontece, pois nestes organismos os equivalentes redutores gerados durante a degradação da glicose ao invés de serem re-oxidados pela lactato desidrogenase, são oxidados pela isoforma mitocondrial da enzima glicerol 3-fosfato desidrogenase (G3PDH), reduzindo o oxigênio molecular através da atividade da AOx. Embora a AOx seja capaz de consumir oxigênio, esta enzima não contribui para o potencial de membrana mitocondrial e, conseqüentemente não contribui para a síntese de ATP. Embora diversos estudos tratem da AOx do *T. brucei* (Chaudhuri e cols., 1998; Chaudhuri e cols., 2006) não há relatos da caracterização desta enzima em *T. cruzi*, muito embora esta espécie apresente uma seqüência homologa à AOx-2 de *T. brucei* (Chaudhuri e cols., 2006).

No *T. cruzi* a transição do tripomastigota sanguíneo para as formas amastigotas intracelulares está associada a uma drástica redução no conteúdo de transportadores de glicose e por um aumento de enzimas relacionadas á oxidação de ácidos graxos (Atwood, III e cols., 2005) (Figura 21 A). Esta mudança metabólica reflete a adaptação ao novo ambiente em que este parasito se insere, onde o aporte de glicose não é abundante e outras formas de obtenção de energia passam a estar mais ativas. Curiosamente, quando as formas sanguíneas de *T. brucei* se diferenciam nas formas procíclicas, a mitocôndria se torna funcional, capaz de oxidar substratos através do ciclo de Krebs e utilizando a oxidase terminal sensível ao KCN, a citocromo *c* oxidase (Tielens e van Hellemond, 1998; van Hellemond e cols., 2005). De forma geral, as formas sanguíneas utilizam a abundante quantidade de glicose presente nos fluídos dos hospedeiros vertebrados como principal fonte de energia (Bringaud e cols., 2006). No entanto, no hospedeiro invertebrado (Figura 21 B), altas concentrações de aminoácidos,

principalmente de prolina, estão presentes e estas formas adaptativas do parasita passam a usar estas moléculas para a conversão de energia (Atwood, III e cols., 2005; Bringaud e cols., 2006). No caso do *R. prolixus*, altas concentrações de histidina estão presentes na hemolinfa e nas fezes (Harington, 1961 a e b) e o *T. cruzi* (ao contrário do *T. brucei* e da *Leishmania major*) possui a peculiar habilidade de converter histidina em glutamato (Atwood, III e cols., 2005), que por sua vez pode ser convertido a prolina e usado com fonte de energia pela mitocôndria (Figura 21 B). Uma outra curiosidade é o fato do *T. cruzi* possuir uma enzima capaz de converter L-prolina em D-prolina pela atividade da enzima prolina racemase. Já foi mostrado, por exemplo, que a forma secretada desta enzima é importante para a evasão do parasito do sistema imune dos vertebrados (Reina-San-Martin e cols., 2000).

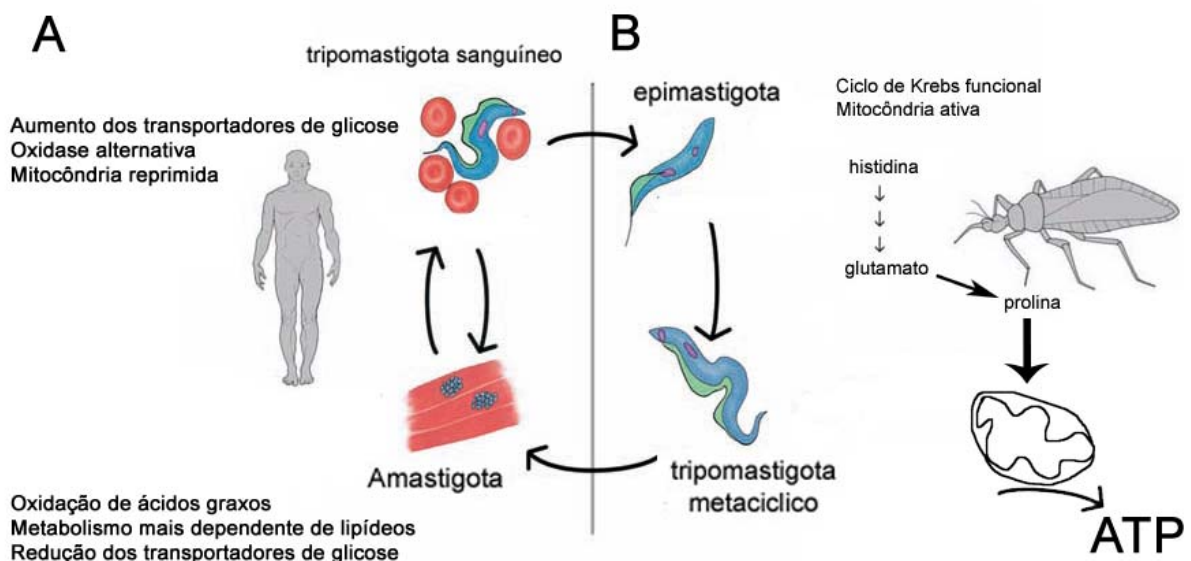


Figura 21. Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi* e das principais características metabólicas das formas evolutivas no hospedeiros vertebrado (A) e invertebrado (B). Figura adaptada de (Atwood, III e cols., 2005).

### 2.3 O metabolismo mitocondrial em tripanosomatídeos.

Ao contrário dos seus hospedeiros vertebrados, o *T. cruzi* não possui um complexo I funcional (Carranza e cols., 2009). Embora este parasito possua todas as subunidades essenciais para a transferência de elétrons, as quatro subunidades responsáveis pelo transporte de prótons para o espaço intermembrana são ausentes (Carranza e cols., 2009). De fato, substratos dependentes de NADH não são capazes de estimular a respiração em mitocôndrias isoladas do parasita (Turrens, 1989).

Nestes parasitos o produto final de degradação da glicose não é o piruvato, mas sim o succinato. Este substrato é gerado tanto no glicossoma quanto na mitocôndria, sendo fruto da atividade da enzima fumarato redutase dependente de NADH. Esta enzima é presente nas formas epimastigotas de *T. cruzi* (Boveris e cols., 1986) e na maioria dos tripanosomatídeos; entretanto, é ausente em mamíferos. A atividade da fumarato redutase é importante para a re-oxidação do NADH e para a produção de succinato, principal doador de elétrons destes parasitos (Denicola-Seoane e cols., 1992).

A geração de  $H_2O_2$  pela mitocôndria é pouco estudada em tripanosomatídeos. Contudo, sabe-se que frações microsossomais, citosólicas e mitocondriais geram  $H_2O_2$  em taxas relativamente altas que podem chegar a 4 % do oxigênio consumido (Boveris e Stoppani, 1977). Nenhum trabalho até o presente momento avaliou as alterações do metabolismo mitocondrial entre as formas epimastigotas e tripomastigotas no tocante ao consumo de  $O_2$  e à geração de  $H_2O_2$ . No entanto, diversos relatos mostram o aumento da geração de ROS após o tratamento com drogas que afetam a viabilidade do parasito como algumas naftoquinonas (Boveris e cols., 1978; Cruz e cols., 1978). Recentemente, foi descrito que o mecanismo de ação desses compostos envolve a disfunção mitocondrial e a geração de ROS por esta organela (Menna-Barreto e cols., 2009).



## Objetivo geral

Realizar uma análise comparativa da função mitocondrial de duas diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*: os epimastigotas que habitam o intestino no inseto *R. prolixus* e as formas tripomastigotas sanguíneas

## Objetivos específicos



Avaliar a susceptibilidade das formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas ao inibidor de AOX, o ácido salicilhidroxâmico (SHAM).



Quantificar o potencial de membrana mitocondrial das duas formas do parasito estudadas.



Comparar o consumo de oxigênio entre as formas sanguíneas e as formas epimastigotas.



Medir a geração de  $H_2O_2$  mitocondrial das duas formas do parasito estudadas, comparando a susceptibilidade do parasito à incubação com esta molécula.

---

## Material e Métodos

### *a) Ética animal*

Todos os experimentos envolvendo animais foram conduzidos de acordo com as diretrizes do Comitê de Ética Animal (comitê que avalia o uso de animais para pesquisa na Fundação Oswaldo Cruz, CEUA-FIOCRUZ). Os protocolos usados foram aprovados pelo CEUA-FIOCRUZ sob o registro L-028/09.

### *b) Parasitos*

A cepa Y de *T. cruzi* foi usada para todos os experimentos que serão mostrados a seguir. Os epimastigotas foram mantidos de forma axênica a 28°C em meio LIT (*liver infusion triptose*) suplementado com 10 % de soro fetal bovino (FBS). As trocas do meio eram feitas semanalmente. Os parasitos utilizados nos experimentos foram coletados do meio durante a fase exponencial de crescimento (5 dias de cultura).

### *c) Obtenção e purificação de tripomastigotas sanguíneas*

Camundongos albinos suíços foram infectados com as formas tripomastigotas sanguíneas ( $5 \times 10^5$  parasitos/camundongo) por via intraperitoneal. Sete dias após a infecção, os camundongos sofreram eutanásia, e alíquotas de aproximadamente 1 mL de sangue com citrato foram coletadas por punção cardíaca. As hemácias e os leucócitos foram removidos por centrifugação diferencial ( $500 \times g$ , 30 min). O sobrenadante foi coletado com os parasitos purificados. Visando aumentar o rendimento de parasitos, o precipitado de células do sangue foi re-suspenso em 1 mL de DMEM (Sigma, St. Louis, MO, USA) suplementado com 10 % FBS e centrifugado novamente ( $500 \times g$ , 30 min). Este procedimento era repetido mais duas vezes e na última etapa os parasitos purificados no sobrenadante eram centrifugados ( $1500 \times g$ , 15 min) e re-suspenso em DMEM + 10 % FBS. Finalmente, os parasitos foram lavados

em PBS e mantidos no gelo até a hora do experimento. O rendimento desta preparação era de  $2,5 \times 10^7$  parasitos/camundongo.

#### *d) Citometria de fluxo*

Para estabelecer a concentração de digitonina necessária para permeabilizar os tripomastigotas sanguíneos e os epimastigotas, os parasitos tratados com diferentes concentrações de digitonina foram incubados com 30  $\mu\text{g/mL}$  de iodeto de propídio (PI) por 15 min. Por causa do seu grande tamanho, esta molécula é apenas capaz de penetrar células cuja membrana esteja permeabilizada, levando ao aumento da fluorescência nas células permeabilizadas deslocando portanto a população para a direita do gráfico (Figura 21 B e D). A concentração de digitonina escolhida foi aquela capaz de deixar mais de 90% dos parasitos positivamente (+) marcados com o PI.

Para os experimentos comparando o potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) entre tripomastigotas e epimastigotas, os parasitos foram incubados com 50 nM de TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester) por 20 min. Esta sonda é um derivado de rhodamina 123 que possuem características lipofílicas e se acumulam na mitocôndria direcionada pelo  $\Delta\Psi_m$ . A especificidade do ensaio foi avaliada após a adição de 1  $\mu\text{M}$  do ionóforo de prótons FCCP. Os experimentos foram realizados no citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA) equipado com o *software Cell Quest* (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA) usando os comprimentos de onda de excitação de 488 nm e emissão 590-635 nm. SSC = side scattering (parâmetro que mede a granulosidade/complexidade da membrana da célula). FSC = forward scattering (parâmetro que mede o tamanho da célula).

#### *e) Consumo de O<sub>2</sub>*

As taxas de consumo de O<sub>2</sub> de epimastigotas (2 mg proteína) e tripomastigotas (0,5 mg proteína) foram avaliadas num oxígrafo de alta resolução (Oroboros Co., modelo 2k, Innsbruck, Áustria). A adição de 64 µM de digitonina foi usada para a permeabilização dos parasitos, permitindo a entrada dos substratos respiratórios dentro da célula. Succinato (5 mM) e ADP (1 mM) foram usado para induzir a respiração em estado 3. A respiração em estado 4 foi avaliada após a adição de oligomicina (2 µg/mL), como previamente mostrado (Vercesi e cols., 1991). A capacidade máxima respiratória foi obtida após a adição de FCCP (0,5 µM). O consumo de oxigênio cianeto-sensível foi avaliado através da inibição da respiração por 1 mM de KCN. A temperatura foi mantida a 28°C para os experimentos realizados com as formas epimastigotas e a 37°C para as formas tripomastigotas sanguíneas. O volume final da cubeta era de 2 mL e o meio usado para a respiração era composto de 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7,2), 1 mM MgCl<sub>2</sub> e 2,5 mM fosfato de potássio (Vercesi e cols., 1991).

#### *f) Geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

A produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida pelo método amplex red/ peroxidase (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) (Votyakova e Reynolds, 2004). Os epimastigotas (2 mg de proteína) ou os tripomastigotas (0,5 mg de proteína) foram incubados no tampão de respiração descrito anteriormente suplementado com 5 µM de amplex red e 3 U/mL de peroxidase de rabanete (HRP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado pela mitocôndria é capaz de promover a oxidação do amplex red, gerando o produto resorufina, cuja fluorescência é monitorada nos comprimentos de excitação e emissão de 563 nm (slit 5 nm) e 587 nm (slit 5 nm), respectivamente, utilizando um espectrofluorímetro Varian (Cary Eclipse Model,

Oberkochen, Germany). A calibração do experimento foi feita usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como padrão na presença de HRP.

g) Sensibilidade ao SHAM

Os parasitos foram incubados com 3 mM de SHAM e a lise foi avaliada através de contagem em câmara de Neubauer com os parasitos vivos (não fixados). Parâmetro: batimento flagelar.

h) *Análise estatística*

O test *t* de student (não-pareado) foi usado para comparar os dados gerados entre epimastigotas e tripomastigotas. As análises foram feitas no *software Graph Prism* versão 5.5 para *Windows* (GraphPad Software, San Diego, USA).

---

## Resultados

### 1) As formas tripomastigotas sanguíneas apresentam um menor consumo de oxigênio e potencial de membrana em relação aos epimastigotas

Estudos prévios mostraram que as ultraestruturas mitocondriais são similares entre as formas sanguíneas e epimastigotas (de Souza e cols., 2009; Menna-Barreto e cols., 2009). A primeira abordagem adotada para comparar a função mitocondrial das duas diferentes formas foi avaliar a susceptibilidade a antimicina a (AA), uma droga que inibe a atividade do complexo III mitocondrial. Os parasitos foram incubados por 2 horas com diferentes concentrações de AA e o IC<sub>50</sub>/2 h, ou seja, a quantidade de AA necessária para levar a morte de 50 % dos parasitas, foi significativamente maior nos tripomastigotas do que nos epimastigotas (193,4 vs 40,6 μM, respectivamente;  $p < 0,02$ ). Estes dados indicam que as formas sanguíneas são menos dependentes do fluxo de elétrons mitocondrial do que as formas epimastigotas (Tabela 1). O experimento onde os parasitos são incubados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> será discutido a seguir.

**Tabela 1 - Efeitos da antimicina a e do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) na viabilidade das formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*<sup>a</sup>.**

	epimastigotas	tripomastigotas
Antimicina a	40,6 ± 5,9	193,4* ± 13,3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	694,2 ± 33,1	1430,5* ± 140,6

<sup>a</sup> Os valores estão expressos como média ± SD dos valores IC<sub>50</sub> de viabilidade de cada composto (μM) após um tempo de incubação de 2 horas. Os valores apresentados são representativos de 3 experimentos independentes. \*,  $p < 0,02$  usando o teste *t de student* (não-pareado) e comparando tripomastigotas com epimastigotas.

O consumo de oxigênio da fração mitocondrial das formas epimastigotas de *T. cruzi* já havia sido previamente descrito (Affranchino e cols., 1985). No entanto, decidimos utilizar o protocolo previamente estabelecido (Vercesi e cols., 1991) onde o consumo de oxigênio do

parasito inteiro e permeabilizado eram avaliados. Primeiramente estabelecemos a concentração ótima de digitonina capaz de permeabilizar os parasitos. Neste experimento incubamos as formas evolutivas com o iodeto de propídio (PI) e diferentes concentrações de digitonina. Observamos por citometria de fluxo que 64  $\mu$ M de digitonina foram capazes de permeabilizar mais de 90% dos parasitos (Figura 21).

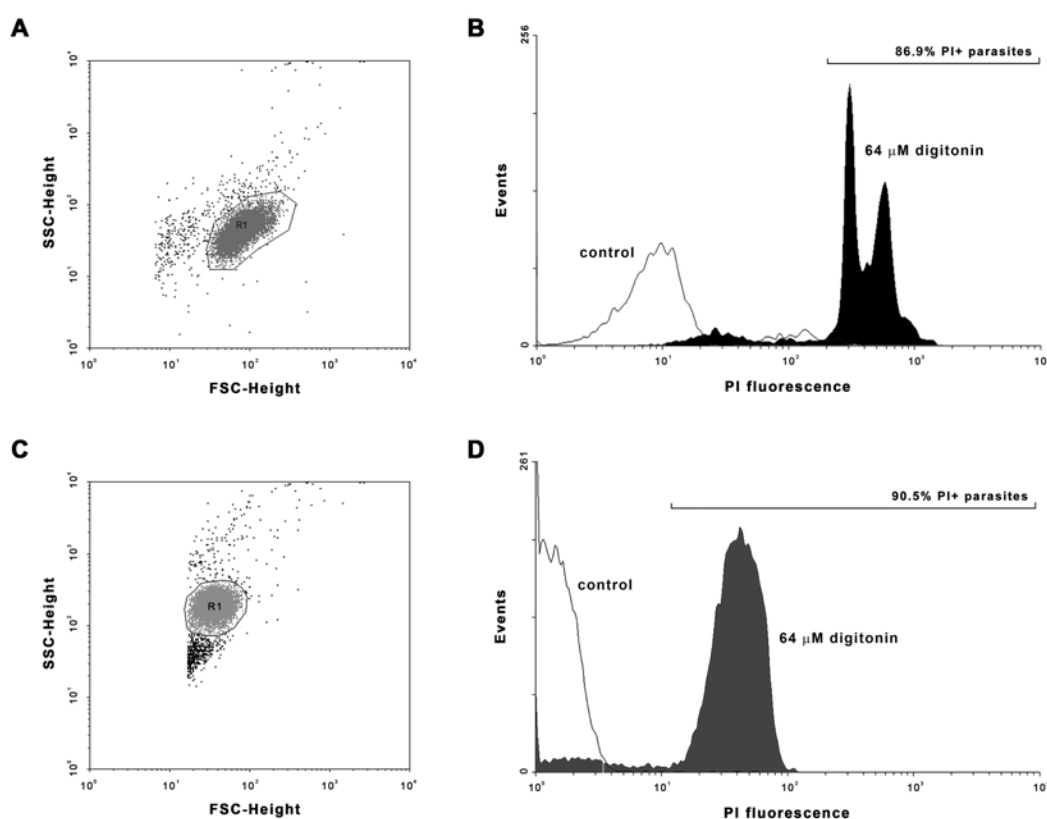


Figura 22. Efeito da permeabilização com 64  $\mu$ M de digitonina na marcação dos parasitos com iodeto de propídio (PI). (a,b) epiastigotas e (c,d) tripomastigotas. (a,c) mostram o gráfico de dispersão de pontos evidenciando a dispersão típica de cada forma evolutiva do parasito após a incubação com digitonina. Os pontos delimitados (R1) indicam os parasitos marcados com PI. (b,d) histograma representando a alteração da intensidade de fluorescência do PI após a incubação dos parasitos com digitonina. A incubação com digitonina e PI promove o deslocamento da fluorescência para a direita (área preta e cinza para tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente) indicando que mais de 85 % dos parasitos estão permeabilizados.

Após garantirmos que a concentração de digitonina usada estava realmente permeabilizando as duas formas evolutivas dos parasitos, comparamos as taxas de consumo

de O<sub>2</sub>. Como havia sido previamente mostrado (Vercesi e cols., 1991), a adição de 5 mM de succinato aos epimastigotas permeabilizados foi capaz de estimular o consumo de oxigênio (12,2 ± 2,4 nmoles O<sub>2</sub> .min<sup>-1</sup> .mg proteína<sup>-1</sup>). A adição subsequente de ADP (estado 3) elevou o consumo de O<sub>2</sub> para 13,7 ± 2,1 nmoles O<sub>2</sub> .min<sup>-1</sup> .mg proteína<sup>-1</sup>. Podemos afirmar que na forma epimastigota o potencial de membrana (ΔΨ<sub>m</sub>) regula as taxas de consumo de oxigênio, uma vez que a inibição da ATP sintase pela a adição de oligomicina (estado 4) reduz significativamente o consumo de O<sub>2</sub> para 8,6 ± 2, nmoles O<sub>2</sub> .min<sup>-1</sup> .mg proteína<sup>-1</sup> (p<0,05). A capacidade máxima respiratória foi avaliada após a adição de FCCP, que estimulou o consumo de O<sub>2</sub> para níveis similares aos do estado 3 (12,0 ± 2,3 nmoles O<sub>2</sub> .min<sup>-1</sup> .mg proteína<sup>-1</sup>).

Ao avaliar a respiração dos tripomastigotas sanguíneos permeabilizados, observamos que a adição de succinato causou um leve aumento do consumo de oxigênio (5,4 ± 2,3 nmoles O<sub>2</sub> .min<sup>-1</sup> .mg proteína<sup>-1</sup>) quando comparado aos epimastigotas. Curiosamente, a adição de ADP levou a uma pequena redução da respiração (2,7 ± 0,4 nmoles O<sub>2</sub> .min<sup>-1</sup> .mg proteína<sup>-1</sup>). As adições de oligomicina e FCCP não induziram alterações importantes na respiração (Tabela 2). Em geral o consumo de O<sub>2</sub> dos epimastigotas são de 2,3 - 5 vezes maior do que os tripomastigotas sanguíneos.

**Tabela 2- Consumo de oxigênio dos parasitos permeabilizados com digitonina na presença de succinato com substrato <sup>a</sup>.**

	epimastigotas	tripomastigotas
<b>succinato</b>	12,2 ± 2,4	5,4* ± 2,3
<b>+ADP</b>	13,7 ± 2,1	2,7* ± 0,4
<b>+oligomicina</b>	8,6 ± 2,0	1,7* ± 0,5
<b>+FCCP</b>	12,0 ± 2,3	3,2* ± 1,2
<b>+KCN</b>	0,03 ± 0,03	0,45 ± 0,48

<sup>a</sup> Os valores estão expressos como média ± SD do consumo de O<sub>2</sub> (nmoles O<sub>2</sub> .min<sup>-1</sup> .mg proteína<sup>-1</sup>). Os valores apresentados são representativos de 4 experimentos independentes. \*, p< 0,05 usando o teste *T-student* e comparando tripomastigotas com epimastigotas.



As formas sanguíneas também são mais sensíveis a SHAM, um inibidor de AOX (Figura 22). Como esperado, as formas tripomastigotas sanguíneas sofrem mais lise quando incubadas com 3 mM de SHAM do que os epimastigotas.

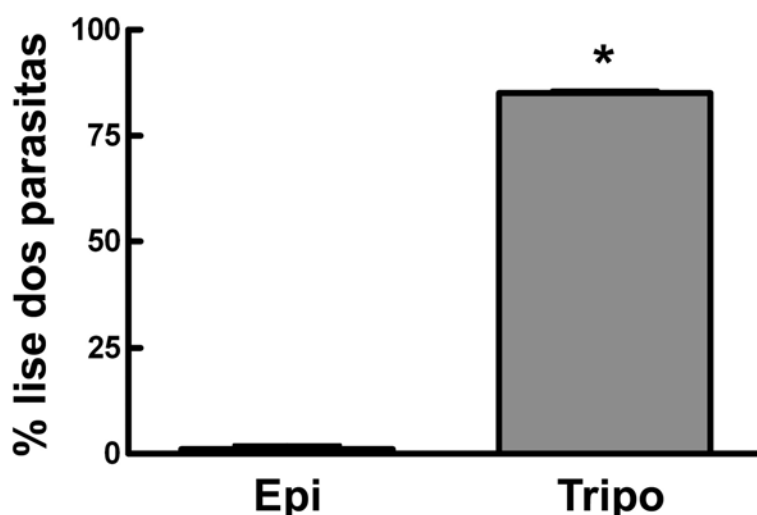


Figura 23. Os epimastigotas são mais resistentes à incubação com o inibidor de oxidase alternativa, SHAM, do que os tripomastigotas. A lise dos epimastigotas (epi) e dos tripomastigotas (tripo) foi avaliada após exposição a 3 mM de SHAM. As barras representam média  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  comparando os valores entre epimastigotas e tripomastigotas por teste *t* de student (não pareado).

O  $\Delta\Psi_m$  foi avaliado por citometria de fluxo em parasitos não permeabilizados após a incubação com a sonda fluorescente TMRE. Esta sonda é direcionada e acumulada somente em mitocôndrias energizadas. Na figura 23 A e B podemos observar histogramas típicos obtidos no citômetro de fluxo evidenciando os perfis de epimastigotas e tripomastigotas após a incubação com TMRE na presença ou ausência do desacoplador FCCP. Os parasitas incubados com FCCP apresentam um deslocamento da fluorescência para a direita indicando perda de potencial de membrana (Figuras 23 A e B área branca). Com a quantificação da fluorescência dos gráficos A e B da figura 23 concluímos que  $\Delta\Psi_m$  é significativamente

maior em epimastigotas do que nas formas sanguíneas (2,7 vezes maior em epimastigotas,  $p < 0,05$ ; Figura 23 C). Para dar especificidade ao ensaio e garantir que estávamos avaliando o potencial de membrana mitocondrial, adicionamos o ionóforo de prótons FCCP que reduziu significativamente a fluorescência do TMRE (Figura 23 D). O menor  $\Delta\Psi_m$  que as formas sanguíneas apresentam fortalecem a idéia de que a redução na função mitocondrial é uma característica do processo de diferenciação em tripomastigota sanguíneo.

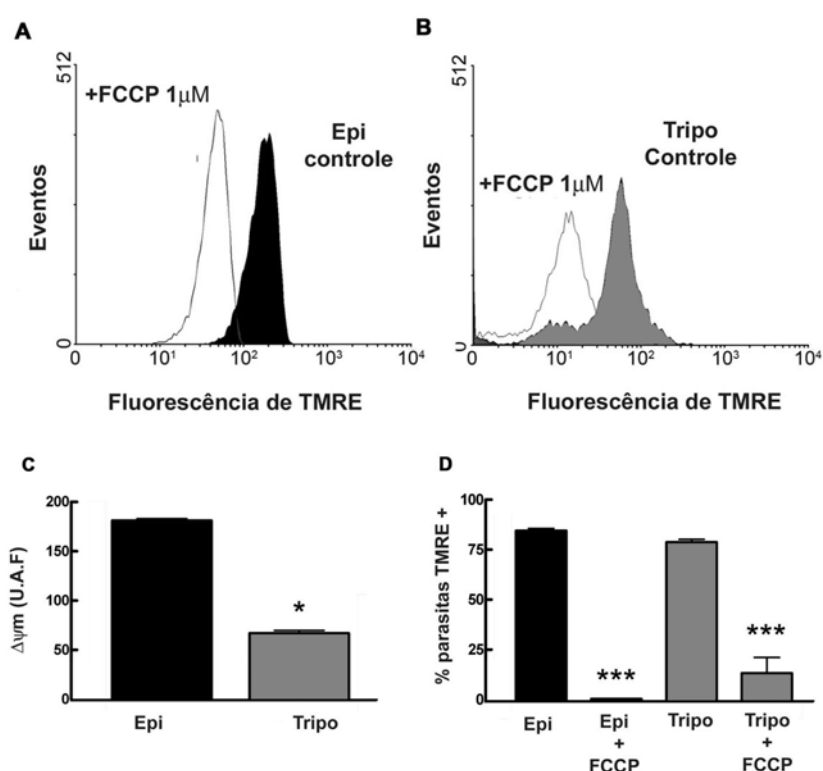


Figura 24. Epimastigotas apresentam maior  $\Delta\Psi_m$  do que as formas tripomastigotas sanguíneas. Histograma típico mostrando a fluorescência do TMRE em epimastigotas (A, preto) e tripomastigota (B, cinza). O efeito do ionóforo de prótons na redução da fluorescência do TMRE está mostrado nas áreas brancas. Os parasitos controle quando incubados com TMRE apresentam  $\Delta\Psi_m$  e portanto são carregados com a sonda, após a despolarização com FCCP há a redução do  $\Delta\Psi_m$  e a população é deslocada para a esquerda. (C) Quantificação da fluorescência do TMRE em epimastigotas (epi, barra preta) e nos tripomastigotas (tripo, barra cinza). (D) porcentagem de epimastigotas marcados com TMRE (epi, barras pretas) e de tripomastigotas (tripo, barras cinzas) evidenciando o efeito do FCCP na redução do  $\Delta\Psi_m$ . As barras representam média  $\pm$  SEM. \*,  $p < 0,05$  comparando os valores entre epimastigotas e tripomastigotas. \*\*\*,  $p < 0,001$  comparando os parasitas sem e com FCCP. U.A.F. = unidades arbitrárias de fluorescência.

## 2) As mitocôndrias dos tripomastigotas sanguíneos produzem mais peróxido de hidrogênio

A geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi medida fluorimetricamente em parasitas permeabilizados com digitonina através do método amplex red/peroxidase (Tabela 3). Neste experimento, independente do estado metabólico mitocondrial a taxa de geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi sempre maior nas formas tripomastigotas sanguíneas (Tabela 3, p< 0,05). Estes resultados indicam que apresentar um menor consumo de oxigênio, no caso das formas tripomastigotas, está associado a um aumento na geração de ROS. Curiosamente, estas formas evolutivas são duas vezes mais resistentes à incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno do que os epimastigotas (Tabela 1).

**Tabela 3 – Geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em parasitas permeabilizados com digitonina na presença de succinato como substrato<sup>a</sup>.**

	epimastigotas	tripomastigotas
<b>Succinato</b>	3,6 ± 2,2	16,9* ± 3,7
<b>ADP</b>	6,3 ± 3,7	13,5* ± 2,1
<b>Oligomicina</b>	9,4 ± 5,8	18,0* ± 7,7
<b>FCCP</b>	7,2 ± 3,2	12,5* ± 3,2
<b>KCN</b>	16,6 ± 9,3	15,0 ± 2,5

<sup>a</sup> Os valores estão expressos como média ± SD da geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (pmoles H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> .min<sup>-1</sup> .mg proteína<sup>-1</sup>). Os valores apresentados são médias de 4 experimentos independentes. \*, p< 0,05 usando o teste *t* de student (não pareado) e comparando tripomastigotas com epimastigotas.

---

## Discussão

A mitocôndria é uma organela central no metabolismo energético e redox e está presente em todas as formas evolutivas do *T. cruzi*. Alguns trabalhos anteriores já haviam tratado do consumo de oxigênio (Affranchino e cols., 1985; Vercesi e cols., 1991) e da atividade de algumas enzimas do ciclo de Krebs (Adroher e cols., 1988) nas formas epimastigotas isoladamente. No entanto, faltava uma análise comparativa entre as formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*. Os dados obtidos neste capítulo de tese mostram um menor consumo de O<sub>2</sub> e uma maior geração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pelas formas tripomastigotas sanguíneas em comparação às formas epimastigotas. Acreditamos que as alterações no metabolismo mitocondrial sejam reflexo do ambiente em que estes parasitos vivem. Enquanto na circulação sanguínea há um suprimento constante de glicose suportando altos fluxos glicolíticos do parasito neste ambiente, no intestino do hospedeiro invertebrado a principal fonte de energia é proveniente da oxidação de aminoácidos, requerendo uma mitocôndria ativa, que de fato observamos nos epimastigotas.

A circulação sanguínea e o ambiente intracelular no hospedeiro vertebrado e o trato digestivo no hospedeiro invertebrado impõem uma grande diferença na disponibilidade de substratos. A circulação sanguínea é um ambiente rico em carboidratos, e de uma forma geral as formas sanguíneas são mais glicolíticas do que as formas que estão no inseto (Bienen e cols., 1991; Bringaud e cols., 2006). Além disso, diversos relatos mostram que estas formas preferem oxidar glicose em detrimento de outras fontes de carbono, como aminoácidos livres (Bringaud e cols., 2006). As formas sanguíneas, também, são as mais eficientes em transportar glicose em comparação com as outras formas (Silber e cols., 2009).

No momento em que o parasito é ingerido e entra em contato com o trato digestório do inseto, a qualidade dos substratos muda. O intestino dos insetos apresenta baixa concentração

de carboidratos, mas altas concentrações de aminoácidos livres em virtude do intenso processo digestivo. As formas que estão no intestino do hospedeiro invertebrado precisam se adaptar a esta nova situação. As formas epimastigotas são adaptadas, por exemplo, a converter os altos níveis de histidina, presentes tanto na hemolinfa quanto nas fezes do barbeiro (Harington, 1961 a e b), em glutamato (Atwood, III e cols., 2005) que em última instância será convertido em succinato e utilizado como doador de elétrons na mitocôndria (Bringaud e cols., 2006). De forma análoga, outros tripanosomatídeos se favorecem dos elevados níveis de aminoácidos livres na hemolinfa dos insetos, como é o caso do *T. brucei*, que utiliza a prolina presente em altas concentrações na hemolinfa do hospedeiro invertebrado como fonte de energia (Evans e Brown, 1972).

Os resultados apresentados nesta parte da tese corroboram as evidências presentes na literatura que mostram que as formas tripomastigotas sanguíneas usam glicose como principal fonte de carbono. Nossas evidências são: i.) as formas tripomastigotas são menos dependentes da mitocôndria (Tabela 1), ii.) o consumo de O<sub>2</sub> (Tabela 2) e o  $\Delta\Psi_m$  (Figura 6) são menores nos tripomastigotas em relação aos epimastigotas. iii.) a susceptibilidade a SHAM, o inibidor de AOX, é maior nas formas sanguíneas. Um dado interessante é observado na análise do proteoma do *T. cruzi* (Atwood, III e cols., 2005) onde a transição das formas sanguíneas para as formas amastigotas intracelulares é acompanhada da dramática redução dos transportadores de glicose e do aumento da expressão de enzimas relacionadas à oxidação de ácidos graxos (Figura 3). Estes dados sugerem que as alterações metabólicas ocorrem em resposta ao novo ambiente que o parasito se encontra (Atwood, III e cols., 2005).

Recentemente, um conjunto de dados publicados por Coustou e cols. mostrou que nas formas procíclicas de *T. brucei* os níveis intracelulares de ATP permanecem inalterados mesmo após a incubação destes parasitos em meio rico em glicose suplementado com oligomicina. Estes dados sugerem que a fosforilação oxidativa não é importante para a

manutenção dos níveis de ATP celular nestas formas (Coustou e cols., 2003). No entanto, a diminuição dos níveis da enzima glicolítica piruvato cinase, diretamente envolvida na síntese de ATP através da fosforilação ao nível do substrato, não só reduziu os níveis de ATP como aumentou o tempo de replicação dos parasitos (Coustou e cols., 2003). Em um estudo subsequente do mesmo grupo, estes experimentos foram repetidos, no entanto os níveis de glicose foram limitados, mimetizando, por exemplo, o trato digestivo dos insetos. Nesta situação a captação de prolina aumentou e as formas procíclicas antes insensíveis à oligomicina se tornaram sensíveis a esta droga (Lamour e cols., 2005). Estes dados indicam que, em situações de glicose escassa, a fosforilação oxidativa é responsável pela síntese de ATP celular. Os resultados mostrados na Tabela 1 desta parte da tese estão de acordo com estes dados, tendo em vista que as formas sanguíneas são menos dependentes do ETS sugerindo uma menor atividade respiratória, comprovada pelo menor consumo de oxigênio exibido pelos tripomastigotas (Tabela 2).

Os tripomastigotas sanguíneos são melhores dotados de defesas antioxidantes em relação às outras formas (Atwood, III e cols., 2005; Piacenza e cols., 2009). Esta capacidade pode explicar porque os tripomastigotas sanguíneos são mais resistentes a incubação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Tabela 1) apesar da maior capacidade de geração de ROS (Tabela 3). Estes dados fortalecem o conceito de que as formas tripomastigotas são pré-adaptadas a um desafio oxidativo como, por exemplo, o que ocorre dentro de células fagocíticas do sistema imune de mamíferos (*burst* respiratório) (Atwood, III e cols., 2005).

O conjunto de dados apresentados neste capítulo ressaltam as diferenças marcantes entre as formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas. Estas alterações na função mitocondrial podem representar as importantes adaptações que os parasitos precisam sofrer para sobreviver a ambientes tão distintos quanto a circulação sanguínea e o trato digestório dos insetos. Existem diferenças marcantes entre o metabolismo energético deste parasito e o

do hospedeiro vertebrado. Desta forma, o entendimento do metabolismo energético do *T. cruzi* pode trazer novas perspectivas para o tratamento da doença de Chagas.

---

## Conclusão e Perspectivas

- ✓ Observamos que o consumo de oxigênio e o  $\Delta\Psi_m$  das formas tripomastigotas sanguíneas são mais baixos quando comparadas ao epimastigotas. Os tripomastigotas são mais sensíveis ao inibidor de oxidase alternativa (SHAM) e parecem depender menos da mitocôndria que os epimastigotas uma vez que são mais resistentes à incubação com antimicina a. Além disso, a geração de  $H_2O_2$  e a resistência à  $H_2O_2$  são maiores nas formas sanguíneas.
- ✓ Estamos dando continuidade a estes estudos buscando identificar diferenças do ponto de vista funcional das mitocôndrias das outras formas evolutivas do parasito como por exemplo as formas amastigotas e as formas tripomastigotas metacíclicas. A nossa hipótese é que as alterações na função mitocondrial são importantes para que estes parasitos se adaptem às diferentes condições físico-químicas dos ambientes onde esses protozoários transitam.



---

## Conclusão geral

### *Aedes aegypti*

- A alimentação com sangue promove um remodelamento mitocondrial que envolve uma redução no consumo de oxigênio e na geração de ROS. Estes eventos são paralelos a digestão do sangue e os mecanismos envolvidos neste remodelamento parecem envolver a redução na atividade do complexo IV e o aumento da dinâmica mitocondrial.

### *Anopheles gambiae*

- Descrevemos o carreador mitocondrial, AgMC1, uma proteína importante para a manutenção do acoplamento mitocondrial. O silenciamento de AgMC1 resulta num fenótipo de redução do potencial de membrana mitocondrial e da geração de ROS pelo epitélio intestinal culminando numa menor resistência do mosquito à infecção por *Plasmodium*.

### *Trypanosoma cruzi*

- As formas epimastigotas e tripomastigotas do *T. cruzi* apresentam diferenças marcantes no metabolismo mitocondrial. As formas epimastigotas, que habitam o hospedeiro invertebrado apresentam um elevado consumo de oxigênio e são mais dependentes do metabolismo mitocondrial quando comparadas as formas tripomastigotas. Estas formas sanguíneas, por sua vez, são menos dependentes do metabolismo mitocondrial e são mais resistentes ao desafio redox. Além disso, sua mitocôndria apresenta uma maior capacidade de gerar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> quando comparadas as formas epimastigotas.

---

## Participação nos manuscritos

**Goncalves R.L., Machado A.C., Paiva-Silva G.O., Sorgine M.H., Momoli M.M., Oliveira J.H., Vannier-Santos M.A., Galina A., Oliveira P.L. e Oliveira M.F. (2009) Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *Aedes aegypti* mosquito. PLoS One. 4:11, e7854.**

A minha participação neste trabalho consistiu em sugerir e realizar os experimentos assim como redigir o manuscrito.

**Gonçalves R.L., Oliveira J.H., Andersen J.F., Oliveira M.F., Oliveira P.L., Barillas-Mury C. Mitochondrial uncoupling in the mosquito *Anopheles gambiae* enhances plasmodium infection. Manuscrito submetido ao periódico Journal of Biological Chemistry.**

A minha participação neste trabalho consistiu em sugerir e realizar os experimentos assim como redigir o manuscrito.

**Gonçalves R.L., Menna-Barreto R.F., Machado A. C., DeCastro S.L., Oliveira M.F., Mitochondrial remodeling in the bloodstream trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* comprises reduced oxygen consumption and increased reactive oxygen species generation. Manuscrito submetido a publicação no periódico Acta Tropica.**

A minha participação neste trabalho consistiu em desenvolver as tabelas 2, 3 e 4. Além disso, ajudei a sugerir os experimentos e a escrever o manuscrito.

---

## Anexo I

## **Mitochondrial remodeling in the bloodstream trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* comprises reduced oxygen consumption and increased reactive oxygen species generation**

Renata L. S. Gonçalves<sup>a,b,†</sup>, Rubem F. S. Menna-Barreto<sup>a,b,ct</sup>,  
Ana Carolina L. Machado<sup>a,b</sup>, Solange L. De Castro<sup>c</sup>, Marcus F. Oliveira<sup>a,b\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Bioquímica Redox, Programa de Biologia Molecular e Biotecnologia, Instituto de Bioquímica Médica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratório de Inflamação e Metabolismo, Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB), Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brazil.

<sup>c</sup> Laboratório de Biologia Celular, Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

\* Corresponding author: Laboratório de Bioquímica Redox, IBqM, PBmB, UFRJ, Rio de Janeiro, RJ, 21941-590, Brazil. Tel.: (+55-21) 25626755; fax: (+55-21) 22708647.

E-mail address: maroli@bioqmed.ufrj.br (MFO).

† These authors equally contributed to this work.

**Abstract**

The evolutive forms of the causative agent of Chagas' disease, *Trypanosoma cruzi*, must alter its metabolism in response to the nutrient supply in its environment. Mitochondria undergo significant functional changes during the trypanosomatid life cycle. The functional characterization of *T. cruzi* mitochondria revealed that bloodstream trypomastigotes exhibited lower oxygen consumption rates and mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) compared to epimastigotes. Mitochondrial hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) formation was higher in trypomastigotes and these parasite forms were more resistant to  $H_2O_2$  challenge than epimastigotes. Thus, mitochondrial remodeling during the *T. cruzi* life cycle may represent a key metabolic adaptation for parasite survival in different environments.

*Keywords:* Energy metabolism, free radical, oxygen, oxidative stress, differentiation.

## 1. Introduction

Chagas' disease is an endemic illness in Latin America affecting about 12-14 million people (Dias, 2007). The life cycle of *Trypanosoma cruzi*, its etiological agent, involves a hematophagous triatomine insect vector, a mammalian host and four different evolutive forms. Thus, adaptation to different environmental and physico-chemical conditions is crucial for all parasite stages. A large body of evidence on energy metabolism in trypanosomatids has been obtained for different evolutive forms of *Trypanosoma brucei*. The majority of ATP synthesis in bloodstream form occurs through the glycolytic pathway, which takes place in a specialized organelle called the glycosome (Clayton & Michels, 1996). In the bloodstream form, iron sulfur proteins, cytochromes and several enzymes of the tricarboxylic acid (TCA) cycle (Clayton & Michels, 1996; Priest & Hajduk, 1994; Opperdoes, 1987) are absent, which would compromise ATP synthesis by decreasing oxidative phosphorylation. Surprisingly,  $F_0-F_1$  ATP synthase activity in *T. brucei* bloodstream forms is still preserved (Opperdoes et al., 1977); this activity is essential for maintaining  $\Delta\Psi_m$  (Nolan & Voorheis, 1992). Also, *T. brucei* bloodstream forms have a branched electron transport chain (ETC) (Njogu et al., 1980; Chaudhuri et al., 2006) where electrons may flow through the mitochondrial complexes to an alternative oxidase (AO), a terminal oxidase that reduces oxygen to water and is insensitive to cyanide. Curiously, as *T. brucei* differentiates into the procyclic form; its mitochondria become capable of oxidizing substrates through enzymes of the TCA cycle and delivering electrons to the ETC (Opperdoes et al., 1977; Tielens & Van Hellemond, 1998; Van Hellemond et al., 2005).

Mitochondria are organelles that are implicated not only in aerobic ATP synthesis via oxidative phosphorylation, but also in redox balance, and they represent one of the major sources of cellular reactive oxygen species (ROS). During mitochondrial respiration, a small portion of oxygen is partially reduced to superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) radicals, which are then dismutated to hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) by superoxide dismutases (Boveris & Chance, 1973; Brookes et al., 2002). ROS diffusion through the cell is important for signaling, but it also causes harm (Boveris & Stoppani, 1977). Mitochondrial, microsomal and cytosolic enzymes from epimastigote forms of *T. cruzi* generate  $H_2O_2$  at fairly high rates, comprising at least 4% of the oxygen uptake in these parasite forms (Boveris & Stoppani, 1977). Although NADH-linked substrates cannot stimulate respiration in *T. cruzi* epimastigotes, succinate has been shown to stimulate oxygen consumption

(Denicola-Seoane et al., 1992). In addition, recent evidence demonstrated that strains of *T. cruzi* carrying different mutations in the subunits of complex I showed no differences in respiratory rates or H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formation (Carranza et al., 2009). Despite the efforts to characterize *T. cruzi* mitochondrial physiology, a functional assessment of this organelle during the parasite life cycle remains to be elucidated. The data presented here indicate that mitochondria from trypomastigotes of *T. cruzi* exhibit lower oxygen consumption and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation compared to epimastigote forms. These data suggest that changes in mitochondrial function during *T. cruzi* differentiation may represent an important adaptive role that facilitates parasite survival in distinct environments.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Parasites

All experiments were performed with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Epimastigote forms were maintained axenically at 28°C in liver infusion and tryptosis (LIT) medium supplemented with 10% fetal bovine serum, with medium changed weekly. Epimastigote parasites were harvested during the exponential growth phase (5-day-old culture forms). Bloodstream trypomastigotes were obtained as previously reported in the literature (Decastro & Meirelles, 1987). For a detailed description, see the supplementary data.

### 2.2. Flow cytometry analysis

In order to establish the best digitonin concentration to permeabilize epimastigotes and trypomastigotes, the parasites, treated with different concentrations of digitonin, were incubated with 30 µg/mL propidium iodide (PI) for 15 min. The concentration of digitonin that led to an increase of about 90% in the number of PI-positive (+) epimastigotes and trypomastigotes indicated the permeabilized condition for each parasite form (Fig. S1). Alternatively, to analyze mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ), the cells were incubated with 50 nM TMRE for 20 min. Specificity of TMRE staining was evaluated by inducing mitochondrial uncoupling after the addition of 1 µM FCCP. All samples were kept on ice until analysis. Data acquisition and analysis were performed using a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA)

equipped with Cell Quest software (Joseph Trotter, Scripps Research Institute, La Jolla, USA). A total of 10,000 events were acquired in the region previously established to correspond to the parasites.

### 2.3. ETC complex activities

Mitochondrial ETC complex activities were measured in triplicate at room temperature in a total reaction volume of 1 mL using a GBC spectrophotometer UV/VIS 920 (GBC Scientific Equipment, Victoria, Australia) as described previously (Cassina & Radi, 1996; Navarro & Boveris, 2004). The rotenone-sensitive NADH-cytochrome *c* oxidoreductase activity (complex I-III) was measured as the increase in absorbance due to the reduction of ferricytochrome *c* at 550 nm ( $\epsilon=18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The reaction mixture consisted of 100 mM potassium phosphate buffer (pH 7.4), 50  $\mu\text{M}$  horse heart cytochrome *c*, 200  $\mu\text{M}$  NADH and 1 mM KCN. KCN-sensitive cytochrome *c* oxidase (complex IV) activity was measured by the decrease in absorbance due to the oxidation of ferrocytochrome *c* at 550 nm, ( $\epsilon=18.5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). The reaction mixture consisted of 100 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4, and 50  $\mu\text{M}$  sodium dithionite-reduced cytochrome *c*. Decreases in absorbance were monitored after the addition of parasite homogenate (70  $\mu\text{g}$  protein).

### 2.4. Oxygen consumption

Epimastigote (2 mg protein) or trypomastigote (0.5 mg protein) respiration was evaluated by high-resolution oxygraph (Oroboros Co., model 2k, Innsbruck, Austria). Digitonin (64  $\mu\text{M}$ ) was added to permeabilize parasites, and 5 mM succinate and 1 mM ADP were added to stimulate mitochondrial oxygen consumption in state 3. State 4-like respiration was induced after the addition of 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  oligomycin as previously described (Vercesi et al., 1991). Uncoupled respiration was induced after the addition of 0.5  $\mu\text{M}$  FCCP, resulting in increased oxygen consumption. Alternatively, 10 mM pyruvate, 10 mM proline and 5 mM succinate were simultaneously added as substrates to evaluate both state 3 and 4 respirations in both parasite forms. Mitochondrial respiration was inhibited by the addition of 1 mM KCN. Temperature was maintained at 28°C for experiments with epimastigotes and 37°C for experiments with



trypomastigotes, and, for both forms, reactions were performed in 2 mL of respiration buffer [125 mM sucrose, 65 mM KCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.2), 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM potassium phosphate].

### 2.5. Mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production was measured using the Amplex Red probe (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) and horseradish peroxidase (HRP; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (Votyakova & Reynolds, 2004). Epimastigotes (2 mg protein) or trypomastigotes (0.5 mg protein) were incubated in the respiration buffer described above containing 5 μM amplex red reagent and 3 U/mL HRP. Fluorescence was monitored at the excitation and emission wavelengths of 563 nm (slit 5 nm) and 587 nm (slit 5 nm), respectively, in a Varian spectrofluorometer (Cary Eclipse Model, Oberkochen, Germany). Calibration was performed using H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> as a standard.

### 2.6. Statistical analysis

Comparisons between groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) and a “*pos hoc*” Tukey’s test for pair-wise comparison. When appropriate, unpaired Student’s *t*-tests were employed. Statistical analysis was performed using GraphPad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, San Diego, USA). Statistical significance was indicated by  $p \leq 0.05$ .

## 3. Results

### 3.1. Bloodstream trypomastigotes exhibit reduced mitochondrial oxygen consumption and membrane potential

It was previously demonstrated that mitochondrial ultrastructure, morphology and size were quite similar in both *T. cruzi* epimastigotes and bloodstream trypomastigotes (Menna-Barreto et al., 2009; De Souza et al., 2009). To compare mitochondrial function between these two parasite forms, we first assessed their susceptibility to antimycin A (AA), a classical ETC inhibitor of complex III activity. The IC<sub>50</sub>/2 h of AA was significantly higher in trypomastigotes than in epimastigotes (193.4 vs. 40.6 μM, respectively;  $p < 0.02$ ), indicating that bloodstream forms rely less on mitochondrial electron flux than insect forms (Table 1). Using previously established procedures to assess mitochondrial respiration in *T. cruzi* (Vercesi et al., 1991), both forms of the

parasite were incubated with 64  $\mu\text{M}$  digitonin. This concentration was sufficient to permeabilize 90% of both parasite forms, as observed by flow cytometry analyses after propidium iodide (PI) staining (Fig. S1). After permeabilization, the rates of oxygen consumption and  $\text{H}_2\text{O}_2$  formation were assessed in different mitochondrial metabolic states. We evaluated bloodstream trypomastigote oxygen consumption using epimastigotes as a reference. As previously reported [19], we show in Table 2 that the addition of 5 mM succinate to the permeabilized epimastigotes greatly stimulated oxygen consumption rates ( $12.2 \pm 2.4 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ) and that these rates were slightly increased after the addition of 1 mM ADP (state 3 respiration) ( $13.7 \pm 2.1 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ). In epimastigotes,  $\Delta\Psi_m$  regulates oxygen consumption because the inhibition of  $\text{F}_1\text{F}_o$ -ATP synthase by oligomycin (state 4) significantly reduced respiratory rates ( $8.6 \pm 2.0 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ,  $p < 0.05$ ), which were subsequently stimulated by addition of the proton ionophore FCCP (uncoupled state) ( $12.0 \pm 2.3 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ). On the other hand, in permeabilized trypomastigotes, the addition of succinate slightly increased oxygen consumption ( $5.4 \pm 2.3 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ). Curiously, the addition of ADP caused a small decrease in respiratory rate ( $2.7 \pm 0.4 \text{ nmol O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ), whereas oligomycin and FCCP had no significant effect on mitochondrial respiration (Table 2). Addition of the complex IV inhibitor cyanide caused a stronger inhibition of oxygen consumption in both epimastigotes (99.8%) and trypomastigotes (85.9%), suggesting that the differences observed in the respiratory rates between epimastigotes and trypomastigotes were not related to a cyanide-insensitive AO. As expected, bloodstream trypomastigotes were more sensitive than epimastigotes to the AO inhibitor SHAM (Fig. 1). The absolute rates of oxygen consumption in all mitochondrial metabolic states analyzed were significantly higher ( $p < 0.05$ ) in epimastigotes than in trypomastigotes (Table 2). In fact, oxygen consumption in epimastigotes was revealed to be 2.3- to 5-fold higher than that in trypomastigotes. The respiratory rates were also evaluated by the simultaneous addition of both  $\text{NAD}^+$ - (10 mM pyruvate + 10 mM proline) and  $\text{FAD}^+$ -linked substrates (5 mM succinate). Table S1 shows that the multiple substrates did not enhance respiration for either epimastigotes or trypomastigotes, indicating that maximum oxidative phosphorylation capacity was already achieved with succinate, corroborating the recent findings of Carranza et al. (2009). Finally, the  $\Delta\Psi_m$  of non-permeabilized parasites was determined by

flow cytometry after labeling the parasites with the fluorescent probe TMRE, which accumulates within polarized mitochondria. Figures 2A and 2B show typical flow cytometry histograms of epimastigotes and trypomastigotes, respectively. The  $\Delta\Psi_m$  was significantly higher in epimastigotes than in bloodstream forms (2.7-fold higher in epimastigotes,  $p<0.05$ ; Fig. 2C). As a control, the addition of the proton ionophore FCCP significantly reduced TMRE fluorescence (Fig. 2D). The reduced  $\Delta\Psi_m$  observed in the bloodstream forms reinforces the idea that reduction in mitochondrial function is a feature of *T. cruzi* differentiation into trypomastigotes. Also, the activities of complexes I-III and IV in epimastigotes and trypomastigotes were not statistically different (Table 3), suggesting that reduced oxygen consumption and  $\Delta\Psi_m$  in trypomastigotes does not involve restrictions of electron flow at the inner mitochondrial membrane.

### 3.2. Increased $H_2O_2$ formation in bloodstream trypomastigotes

We have fluorometrically measured mitochondrial  $H_2O_2$  generation in permeabilized *T. cruzi* using the amplex red/HRP method (Table 4). Regardless of the mitochondrial metabolic state,  $H_2O_2$  formation rates were higher ( $p<0.05$ ) in bloodstream trypomastigotes than in epimastigotes (Table 4). This result indicates that decreased respiratory activity and  $\Delta\Psi_m$  in trypomastigotes somehow stimulate mitochondria to produce more  $H_2O_2$ . The assessment of mitochondrial  $H_2O_2$  formation was also performed using pyruvate, proline and succinate. Again, regardless of the mitochondrial metabolic state,  $H_2O_2$  formation was significantly higher in trypomastigotes, albeit using the three substrates simultaneously (Table S2). This result reinforces the concept that electron transport through complex I does not contribute to either oxygen consumption or  $H_2O_2$  formation (Carranza et al., 2009). Interestingly, bloodstream trypomastigotes were two-fold more resistant to exogenous  $H_2O_2$  than epimastigotes (Table 1).

## 4. Discussion

Mitochondria are central organelles for both cellular energy and redox metabolism and are present in all life forms of *T. cruzi*. Previous reports have characterized the respiratory properties of *T. cruzi* epimastigotes (Affranchino et al., 1985; Vercesi et al., 1991) and the activities of some enzymes of the TCA cycle in the insect forms (Adroher et al., 1988). However, a comparative functional analysis of mitochondria in both epimastigotes and bloodstream trypomastigotes forms

was lacking. Here, we performed a functional assessment of mitochondria in bloodstream trypomastigotes in comparison to the epimastigote insect form. The data presented here indicate that mitochondria from *T. cruzi* trypomastigotes exhibit lower oxygen consumption and increased H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation compared to epimastigote forms. These data suggest that changes in mitochondrial function during *T. cruzi* differentiation may represent an important adaptive role to enhance parasite survival in distinct environments.

The bloodstream and the intracellular environment in the vertebrate host and the digestive tract of the triatomine bug impose great differences in substrate availability. In the vertebrate bloodstream, trypomastigotes face a carbohydrate-rich environment and previous reports demonstrate that bloodstream forms of *Trypanosoma brucei congolense* rely more on glycolysis to obtain energy than does the insect form (Bienen et al., 1991). As soon as the parasites reach the insect digestive tract, which is poor in carbohydrates but rich in amino acids due to the intense digestive process of blood proteins, these parasites alter their metabolism to adapt to this new environmental condition. Several reports indicate that *T. cruzi* trypomastigotes prefer to oxidize glucose rather than other carbon sources such as free amino acids (Bringaud et al., 2006). In this regard, the triatomine midgut is a glucose-poor but amino acid-rich environment (Atwood et al., 2005; Bringaud et al., 2006; Silber et al., 2009), and high levels of histidine were detected even in feces and the hemolymph (Harrington, 1956, 1961). Epimastigote forms of *T. cruzi* are uniquely adapted to take advantage of this copious energy source by expressing enzymes that convert histidine to glutamate (Atwood et al., 2005) that will be ultimately converted to succinate, providing substrates for oxidative phosphorylation. An additional feature is the capacity of *T. cruzi* to express a proline racemase enzyme, enabling these parasites to use both L-proline and D-proline (Chamond et al., 2003). Similarly, other trypanosomatids such as *T. brucei* take advantage of the higher levels of proline in the blowfly to use it as an energy source (Evans & Brown, 1972). On the other hand, mammals maintain fairly constant concentrations of blood glucose (5 mM), benefiting bloodstream trypomastigotes that display high glucose and low amino acid transport activities in comparison to the other mammalian forms (Silber et al., 2009). Since trypomastigotes preferentially use glucose as the primary carbon source, all these findings are in agreement with our data as we show that trypomastigotes are less dependent on the mitochondrial ETC (Table 1) and exhibit reduced mitochondrial respiration (Table 2) and

mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) (Fig. 2) compared to epimastigote forms. In addition, the proteomic analysis of *T. cruzi* evolutive forms revealed that during the transition from trypomastigote to the intracellular amastigote forms, there is a dramatic down-regulation of glucose transporters and a simultaneous increase in the expression of enzymes involved in fatty acid oxidation, suggesting that a metabolic shift occurs in response to the new environment (Atwood et al., 2005).

Extracellular glucose concentrations regulate energy metabolism in different cells and organisms (Coustou et al., 2003; Lamour et al., 2005). Recently, Coustou and co-workers demonstrated that the intracellular ATP levels of procyclic forms of *T. brucei* grown in a glucose-rich medium are not altered when parasites were incubated with oligomycin, a potent inhibitor of  $F_1F_0$ -ATP synthase, suggesting that oxidative phosphorylation is not fundamental for the survival of these parasite forms. In contrast, down-regulation of pyruvate kinase, an enzyme directly involved in glycolytic ATP synthesis, reduced ATP levels and increased the parasite doubling time (Coustou et al., 2003). Interestingly, data based on experiments that limit glucose availability, mimic the insect digestive tract and increases the proline uptake and oligomycin sensitivity in *T. brucei* procyclic forms suggesting that during scarce glucose supply, oxidative phosphorylation is the main source of ATP rather than glycolysis (Lamour et al., 2005). Accordingly, bloodstream *T. cruzi* forms were less sensitive to antimycin a (Table 1), indicative of reduced oxidative phosphorylation activity that was further supported by the reduced mitochondrial  $O_2$  consumption of trypomastigotes (Table 2).

Compared with epimastigotes, trypomastigotes are better equipped with scavenger antioxidant defenses (Atwood et al., 2005; Piacenza et al., 2008), which could explain why they are more resistant to  $H_2O_2$  despite their higher rates of mitochondrial  $H_2O_2$  formation (Tables 1 and 4). Proteomic analyses have demonstrated an up-regulation of several enzymes involved in antioxidant defenses in metacyclic trypomastigotes in comparison to epimastigotes, such as trypanothione synthetase, ascorbate peroxidase, mitochondrial tryparedoxin peroxidase, iron superoxide dismutase, peroxiredoxins and tryparedoxin (Atwood et al., 2005; Piacenza et al., 2008). Differentiation from epimastigote to metacyclic trypomastigote also correlated with increased resistance to peroxynitrite challenge (Piacenza et al., 2008). It is important to note that susceptibility of *T. cruzi* to  $H_2O_2$  varies not only for a given parasite form in the same strain but

also between different strains of a same parasite form (Boveris & Stoppani, 1977). Our findings are consistent with the concept that trypomastigotes are pre-adapted to oxidative challenge triggered by host immune responses such as the respiratory burst of phagocytic cells in the mammalian host (Atwood et al., 2005). Nevertheless, further research is required to determine which factors are involved in the mitochondrial functional differences observed between epimastigotes and bloodstream trypomastigotes.

Despite the reduced mitochondrial respiration, a partial electron flow persists in trypomastigotes, as demonstrated by persistent oxygen consumption and  $H_2O_2$  formation (Tables 4 and S2). Furthermore, inhibition of cytochrome c oxidase activity by cyanide affected respiration in both epimastigotes and trypomastigotes. We may not credit the impaired ETC to the functional differences between trypomastigotes and epimastigotes (Table 3) because the activities of complexes I-III and IV were similar in these parasite forms. Thus, it appears that mechanisms involved in substrate transport and/or oxidation would be down-regulated in trypomastigotes. Also, the higher oxygen consumption observed in epimastigotes is consistent with lower  $H_2O_2$  formation in this form compared to bloodstream trypomastigotes, in agreement with the statement that increased mitochondrial electron flow reduces electron leakage and superoxide formation (Korshunov et al., 1997).

## 5. Conclusions

The present work identifies remarkable differences in mitochondrial function during *T. cruzi* differentiation, in such a way that in epimastigotes, this organelle is highly active. These functional changes may represent important adaptations required by the parasite to survive in different environments, such as the triatomine digestive tract and the bloodstream of the mammalian host. In this context, alterations in the energetic metabolism can lead to redox imbalance, and the understanding of mitochondrial function in these infective forms can open new perspectives for the treatment of Chagas' disease.

## Acknowledgments

We are grateful to Mr. Marcos Meuser and to Mr. João Oliveira Neto for their technical assistance. This work was supported by: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (through Institutos Nacionais de Ciência e Tecnologia 2008), Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo a Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), and International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB). MFO is a research scholar from CNPq.

## References

- Adroher, F.J., Osuna, A., Lupiañez, J.A. 1988. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 267, 252-261.
- Affranchino, J.L., Tarlovsky, M.N.S., Stoppani, A.O.M., 1985. Respiratory control in mitochondria from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16, 289-298.
- Atwood, J.A., Weatherly, D.B., Minning, T.A., et al. 2005. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309, 473-476.
- Bienen, E.J., Webster, P., Fish, W.R. 1991. *Trypanosoma* (Nannomonas) *congolense*: Changes in respiratory metabolism during the life cycle. *Exp. Parasitol.* 73, 403-412.
- Boveris, A., Chance, B. 1973. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem. J.* 134, 707–716.
- Boveris, A., Stoppani, A.O. 1977. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. *Experientia* 33, 1306-1308.
- Bringaud, F., Riviere, L., Coustou, V., 2006. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol. Biochem. Parasitol.* 149, 1–9.
- Brookes, P.S., Levonen, A.L., Shiva, S., et al., 2002. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic. Biol. Med.* 33, 755–764.
- Carranza, J.C., Kowaltowski, A.J., Mendonça, M.A. et al. 2009. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *J. Bioenerg. Biomembr.* 41, 299-308.

- Cassina, A., Radi, R. 1996. Differential inhibitory action of nitric oxide and peroxyntirite on mitochondrial electron transport. *Arch. Biochem. Biophys.* 328, 309-316.
- Chamond, N., Grégoire, C., Coatnoan, N., et al. 2003. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* and definition of putative protein signatures. *J. Biol. Chem.* 278, 15484–15494.
- Chaudhuri, M., Ott, R.D., Hill, G.C., 2006. Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends Parasitol.* 22, 484-491.
- Clayton, C.E., Michels, P., 1996. Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitol. Today* 12, 465-471.
- Coustou, V., Besteiro, S., Biran, M., et al. 2003. ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level phosphorylation is essential, but not oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278, 49625–49635.
- De Souza, W., Attias, M., Rodrigues, J.C. 2009. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 2069-2080.
- Decastro, S.L., Meirelles, M.N. 1987. Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell in vitro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 82, 209-218.
- Denicola-Seoane, A., Rubbo, H., Prodanov, E., et al. 1992. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 54, 43-50.
- Dias, J.C. 2007. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad. Saúde Pública* 23 (Suppl.) S13-22.
- Evans, D.A., Brown, R.C. 1972. The utilization of glucose and proline by culture forms of *Trypanosoma brucei*. *J. Protozool.* 19, 686-690.
- Harington, J.S., 1956. Histamine and histidine in excreta of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Nature* 178, 268.
- Harington, J.S., 1961. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* I. Analysis of the haemolymph. *Parasitology* 51, 309-318.
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416, 15-18.
- Lamour, N., Riviere, L., Coustou, V., et al. 2005. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J. Biol. Chem.* 280, 11902–11910.



- Menna-Barreto, R.F.S., Gonçalves, R.L., Costa, E.M., et al. 2009. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 47, 644-653.
- Navarro, A., Boveris, A. 2004. Rat brain and liver mitochondria develop oxidative stress and lose enzymatic activities on aging. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 287, R1244-12490.
- Njogu, R.M., Whittaker, C.J., Hill, G.C. 1980. Evidence for a branched electron transport chain in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1, 13-29.
- Nolan, D.P., Voorheis, H.P., 1992. The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the F1F0-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 209, 207-216.
- Opperdoes, F.R. 1987. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes *Ann. Rev. Microbiol.* 41, 127-151.
- Opperdoes, F.R., Borst, P., Bakker, S., et al. 1977. Particle-bound enzymes in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 76, 29-39.
- Piacenza, L., Peluffo, G., Alvarez, M.N., et al. 2008. Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite. *Biochem. J.* 410, 359-368.
- Priest, J.W., Hajduk, S.L., 1994. Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 26, 179-191.
- Silber, A.M., Tonelli, R.R., Lopes, C.G., et al. 2009. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 168, 102–108.
- Tielens, A.G.M., Van Hellemond, J.J. 1998. Differences in energy metabolism between Trypanosomatidae. *Parasitol. Today* 14, 265-271.
- Van Hellemond, J.J., Opperdoes, F.R., Tielens, A.G. 2005. The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in *Trypanosoma brucei*. *Biochem. Soc. Trans.* 33, 967-971.
- Vercesi, A.E., Bernardes, C.F., Hoffmann, M.E., et al. 1991. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. *J. Biol. Chem.* 266, 14431-14434.

Votyakova, T.V., Reynolds, I.J., 2004. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. *Arch. Biochem. Biophys.* 431, 138-144.

**Table 1**

The effect of antimycin a and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on *T. cruzi* epimastigotes and trypomastigotes<sup>a</sup> viability.

	<b>epimastigotes</b>	<b>trypomastigotes</b>
<b>antimycin a</b>	40.6 ± 5.9	193.4* ± 13.3
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	694.2 ± 33.1	1430.5* ± 140.6

<sup>a</sup> Values are expressed as means ± SD of the IC<sub>50</sub> of each compound (μM) after 2 h incubation. Data were from at least three independent experiments. \* Student's *t*-test statistical analyses ( $p < 0.02$ ) for comparisons between trypomastigotes and epimastigotes.

**Table 2**

Oxygen consumption rates of digitonin-permeabilized *T. cruzi* in the presence of a FAD-linked substrate<sup>a</sup>.

	<b>epimastigotes</b>	<b>trypomastigotes</b>
<b>succinate</b>	12.2 ± 2.4	5.4* ± 2.3
<b>ADP</b>	13.7 ± 2.1	2.7* ± 0.4
<b>oligomycin</b>	8.6 ± 2.0	1.7* ± 0.5
<b>FCCP</b>	12.0 ± 2.3	3.2* ± 1.2
<b>KCN</b>	0.03 ± 0.03	0.45 ± 0.48

<sup>a</sup> Values are expressed as means ± SD of oxygen consumption (nmol O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>mg<sup>-1</sup> protein). Data were from at least four independent experiments. \*, Student's *t*-test statistical analyses (*p*<0.05) for comparisons between trypomastigotes and epimastigotes.

**Table 3**

Activities of mitochondrial electron transport chain complexes in *T. cruzi*<sup>a</sup>.

	<b>epimastigotes</b>	<b>trypomastigotes</b>
<b>NADH-cytochrome c oxidoreductase<sup>b</sup></b>	24.1 ± 15.2	23.5 ± 20.2
<b>Cytochrome c oxidase<sup>c</sup></b>	20.0 ± 0.9	36.8 ± 30.2

<sup>a</sup> Values are expressed as means ± SD of at least three independent experiments.

<sup>b</sup> Rotenone-sensitive rate of NADH-stimulated ferricytochrome c reduction at 550 nm expressed as nmol of reduced cyt c.min<sup>-1</sup>.mg protein<sup>-1</sup>.

<sup>c</sup> KCN-sensitive rate of ferrocytochrome c oxidation at 550 nm, expressed as nmol oxidized cyt c/min/mg protein.

**Table 4**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production of digitonin-permeabilized *T. cruzi* in the presence of FAD-linked substrate<sup>a</sup>.

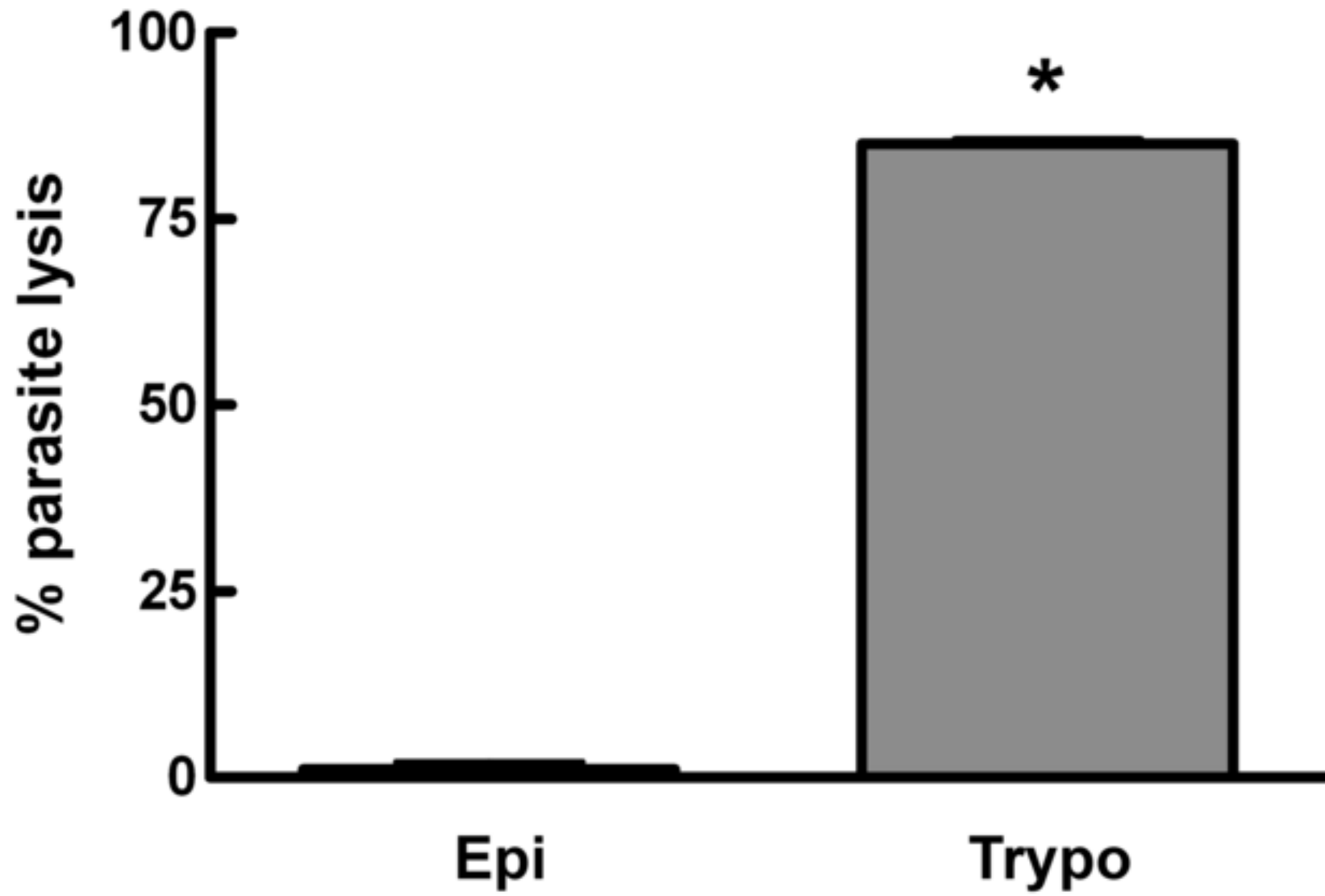
	<b>epimastigotes</b>	<b>trypomastigotes</b>
<b>Succinate</b>	3.6 ± 2.2	16.9* ± 3.7
<b>ADP</b>	6.3 ± 3.7	13.5* ± 2.1
<b>Oligomycin</b>	9.4 ± 5.8	18.0* ± 7.7
<b>FCCP</b>	7.2 ± 3.2	12.5* ± 3.2
<b>KCN</b>	16.6 ± 9.3	15.0 ± 2.5

<sup>a</sup> Values are expressed as means ± SD of hydrogen peroxide generation (pmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>mg protein<sup>-1</sup>). Data were from at least four independent experiments. \* Student's *t*-test statistical analyses (*p*< 0.05) for comparisons between trypomastigotes and epimastigotes.

## Figures legend

**Fig. 1.** Epimastigotes are more resistant to alternative oxidase inhibition than trypomastigotes. Lysis of epimastigotes (Epi) and trypomastigotes (Trypo) upon exposure to 3 mM of the alternative oxidase inhibitor salicylhydroxamic acid (SHAM). Bars represent means  $\pm$  SEM and similar results were obtained with preparations from different experiments. \*  $p < 0.05$  for the comparison of trypomastigotes with epimastigotes.

**Fig. 2.** Epimastigotes exhibit higher mitochondrial membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) than trypomastigotes. Typical flow cytometry histograms of TMRE fluorescence of epimastigotes (A) and trypomastigotes (B) are shown in black and gray, respectively. The effect of the proton ionophore FCCP on the collapse of  $\Delta\Psi_m$  in both parasite forms is shown in white. (C) TMRE fluorescence intensity was quantified in epimastigotes (black bar) and in trypomastigotes (gray bar). (D) Percentage of TMRE-labeled epimastigotes (Epi, black bars) and trypomastigotes (Trypo, gray bars) and the effect of FCCP on the collapse of  $\Delta\Psi_m$ . Data are expressed as means  $\pm$  SEM. \*  $p < 0.05$  for the comparison of epimastigotes with trypomastigotes. \*\*\*  $p < 0.001$  for the comparison of control parasites with FCCP.



**Figure 1**



5. Figure(s)

[Click here to download high resolution image](#)

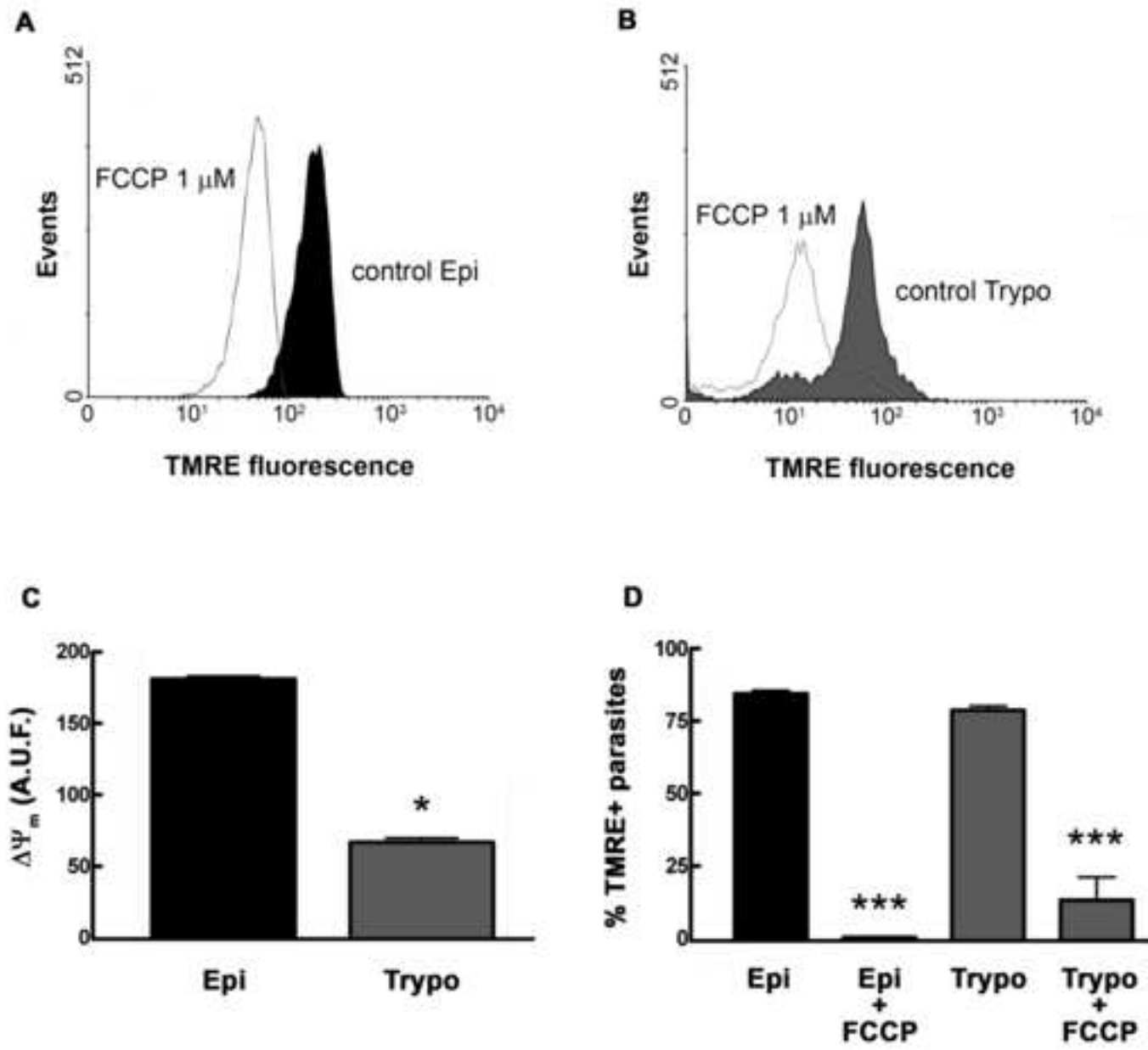


Figure 2

## Supplementary Information

### Supplementary Material and Methods

*Bloodstream trypomastigotes.* Albino Swiss mice were infected with bloodstream trypomastigotes ( $5 \times 10^5$  parasites/mice) by intraperitoneal injection and euthanized seven days later. An aliquot of about 1 mL of citrated blood was collected by heart puncture; red and white blood cells were removed by differential centrifugation ( $500 \times g$ , 30 min) and the supernatant was collected to obtain purified parasites. To improve parasite yield, the red and white cell pellet was re-suspended in the same volume of Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) and re-centrifuged ( $500 \times g$ , 30 min). This step was repeated twice, the supernatants were centrifuged ( $1500 \times g$ , 15 min), and the bloodstream trypomastigote pellets were re-suspended in 3-5 mL of DMEM+10% FBS. Finally, the parasites were washed with phosphate buffered saline (PBS) and kept on ice until the experimental analyses. The yield of this procedure was about  $2.5 \times 10^7$  parasites/mice.

**Table S1**

Oxygen consumption rates (nmol O<sub>2</sub>/min/mg protein) of digitonin-permeabilized *T. cruzi* in the presence of NADH- and FAD-linked substrates<sup>a</sup>.

	<b>epimastigotes</b>	<b>trypomastigotes</b>
<b>succinate/pyruvate/proline</b>	6.4 ± 2.5	2.3* ± 0.4
<b>ADP</b>	7.7 ± 3.0	2.5* ± 0.3
<b>Oligomycin</b>	6.2 ± 3.5	2.4* ± 0.3
<b>FCCP</b>	10.0 ± 3.9	2.1* ± 0.9
<b>KCN</b>	0.4 ± 0.5	0.4 ± 0.4

<sup>a</sup> The data represent the average and standard deviation (SD) of at least four independent experiments.

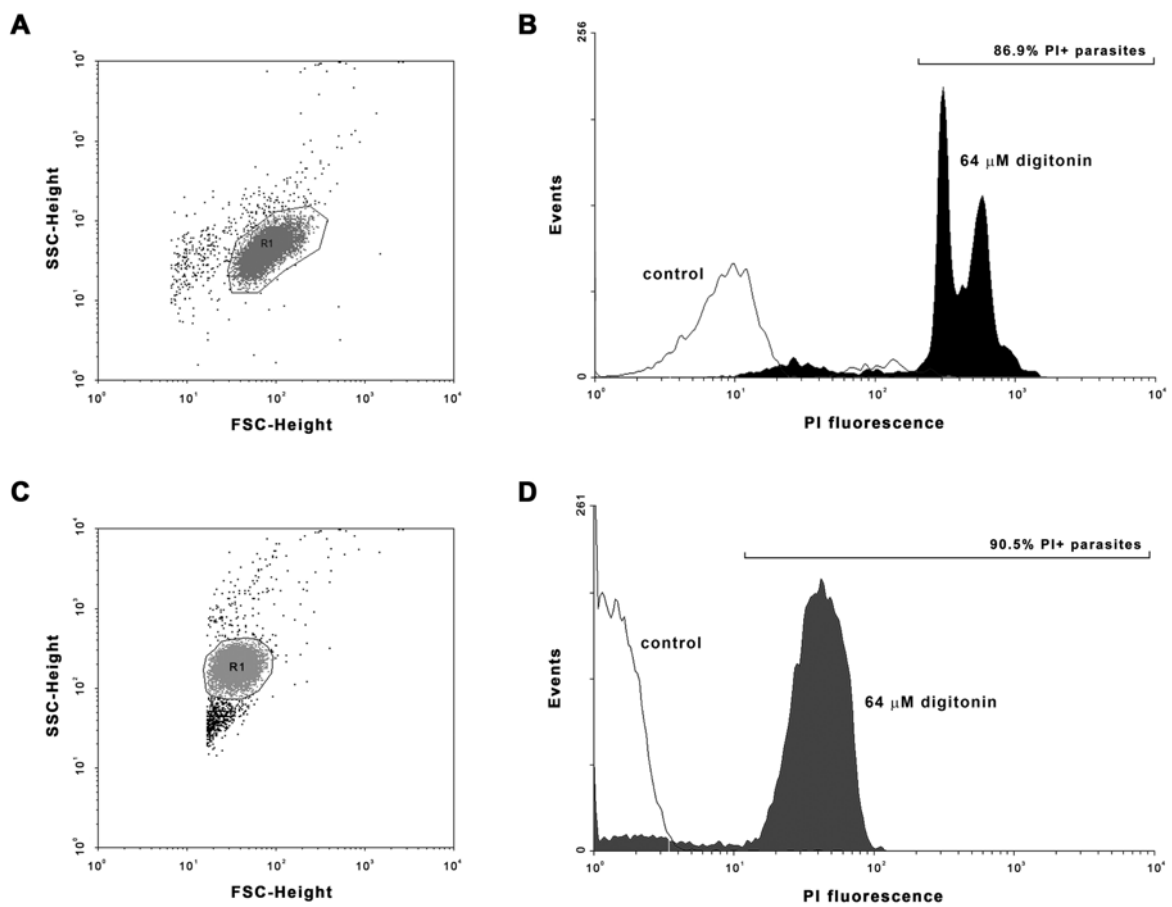
\*  $p < 0.021$  for the comparison of trypomastigotes and epimastigotes.

**Table S2**

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production (pmol O<sub>2</sub>/min/mg protein) of digitonin-permeabilized *T. cruzi* in the presence of NAD- and FAD-linked substrates<sup>a</sup>.

	<b>epimastigotes</b>	<b>trypomastigotes</b>
<b>succinate/pyruvate/proline</b>	0.2 ± 0.2	4.2 ± 1.1
<b>ADP</b>	0.1 ± 0.1	2.0 ± 1.3
<b>Oligomycin</b>	0.1 ± 0.1	1.1 ± 0.3
<b>FCCP</b>	0.1 ± 0.1	1.0 ± 0.4
<b>KCN</b>	0.0 ± 0.1	0.7 ± 0.2

<sup>a</sup> The data represent the average and standard deviation (SD) of at least three independent experiments.



**Figure S1**

**Fig. S1.** Effects of digitonin (64  $\mu$ M) on the permeabilization of *T. cruzi* as measured by PI fluorescence in flow cytometry for (a, b) epimastigotes and (c, d) trypomastigotes. (a, c) Dot plots showing the typical morphology of each form of the parasite after treatment with digitonin. (b, d) Histograms presenting the PI labeling of parasites.

---

## Referências

- Abrahams J. P., Leslie A. G., Lutter R. e Walker J. E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370:6491, 621-628.
- Adroher F. J., Osuna A. e Lupianez J. A. (1988) Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 267:1, 252-261.
- Affranchino J. L., De Tarlovsky M. N. e Stoppani A. O. (1985) Respiratory control in mitochondria from *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 16:3, 289-298.
- Almeida A., Almeida J., Bolanos J. P. e Moncada S. (2001) Different responses of astrocytes and neurons to nitric oxide: the role of glycolytically generated ATP in astrocyte protection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98:26, 15294-15299
- Arsenijevic D., Onuma H., Pecqueur C., Raimbault S., Manning B. S., Miroux B., Couplan E., Alves-Guerra M. C., Gubern M., Surwit R., Bouillaud F., Richard D., Collins S. e Ricquier D. (2000) Disruption of the uncoupling protein-2 gene in mice reveals a role in immunity and reactive oxygen species production. *Nat. Genet.* 26:4, 435-439.
- Atella G. C., Bittencourt-Cunha P. R., Nunes R. D., Shahabuddin M. e Silva-Neto M. A. (2009) The major insect lipoprotein is a lipid source to mosquito stages of malaria parasite. *Acta Trop.* 109:2, 159-162.
- Atwood J. A., III, Weatherly D. B., Minning T. A., Bundy B., Cavola C., Opperdoes F. R., Orlando R. e Tarleton R. L. (2005) The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science* 309:5733, 473-476.
- Auerswald L. e Gade G. (1995) Energy substrates for flight in the blister beetle *Decapotoma lunata* (Meloidae). *J. Exp. Biol.* 198:Pt 6, 1423-1431.
- Barillas-Mury C. V., Noriega F. G. e Wells M. A. (1995) Early trypsin activity is part of the signal transduction system that activates transcription of the late trypsin gene in the midgut of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 25:2, 241-246.
- Bates M. (1970) *The Natural History of Mosquitoes*. Capítulos XVI e XV, pp 201-238. Harper & Row, New York, USA.

**Bienen E. J., Webster P. e Fish W. R. (1991) Trypanosoma (Nannomonas) congolense: changes in respiratory metabolism during the life cycle. Exp. Parasitol. 73:4, 403-412.**

**Boekema E. J. e Braun H. P. (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. J. Biol. Chem. 282:1, 1-4.**

**Boveris A. e Chance B. (1973) The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. Biochem. J. 134:3, 707-716.**

**Boveris A. e Stoppani A. O. (1977) Hydrogen peroxide generation in Trypanosoma cruzi. Experientia 33:10, 1306-1308.**

**Boveris A., Cadenas E. e Stoppani A. O. (1976) Role of ubiquinone in the mitochondrial generation of hydrogen peroxide. Biochem. J. 156:2, 435-444.**

**Boveris A., Docampo R., Turrens J. F. e Stoppani A. O. (1978) Effect of beta-lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in Trypanosoma cruzi. Biochem. J. 175:2, 431-439.**

**Boveris A., Hertig C. M. e Turrens J. F. (1986) Fumarate reductase and other mitochondrial activities in Trypanosoma cruzi. Mol. Biochem. Parasitol. 19:2, 163-169.**

**Boyer P. D. (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine. Annu. Rev. Biochem. 66: 717-749.**

**Boyer P. D. (2002) Catalytic site occupancy during ATP synthase catalysis. FEBS Lett. 512:1-3, 29-32.**

**Brand M. D. (2000) Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. Exp. Gerontol. 35:6-7, 811-820.**

**Brand M. D. (2005) The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. Biochem Soc. Trans. 33:Pt 5, 897-904.**

**Briegel H. (1990) Fecundity, metabolism, and body size in Anopheles (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. J. Med. Entomol. 27:5, 839-850.**

**Briegel, H. (1990) Metabolic relationship between female body size, reserves, and fecundity of *Aedes aegypti*. J. Insect Physiol. 37: 165-172.**

**Bringaud F., Riviere L. e Coustou V. (2006) Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. Mol. Biochem. Parasitol. 149:1, 1-9.**

**Brosemer R. W., Vogell W. e Buecher T. (1963) [morphological and enzymatic patterns in the development of the indirect flight muscle of the Locust]. Biochem. Z. 338: 854-910.**

**Brownlee M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. Nature 414:6865, 813-820.**

**Brusca R.C., & Brusca G.J. (1990). Em: Invertebrates.1º Edição. Sinauer Associates. Sunderland, Massachusetts.**

**Bursell E. (1975) Substrates of oxidative metabolism in dipteran flight muscle. Comp. Biochem. Physiol. B. 52:2, 235-238.**

**Bursell E. e Taylor P. (1980) An energy budget for *Glossina* (Diptera: Glossinidae). Bulletin of Entomological Research 70: 187-196.**

**Cadenas E., Boveris A., Ragan C. I. e Stoppani A. O. (1977) Production of superoxide radicals and hydrogen peroxide by NADH-ubiquinone reductase and ubiquinol-cytochrome c reductase from beef-heart mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 180:2, 248-257.**

**Carranza J. C., Kowaltowski A. J., Mendonca M. A., de Oliveira T. C., Gadelha F. R. e Zingales B. (2009) Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. J. Bioenerg. Biomembr. 41:3, 299-308.**

**Carroll J., Fearnley I. M., Skehel J. M., Shannon R. J., Hirst J. e Walker J. E. (2006) Bovine complex I is a complex of 45 different subunits. J. Biol. Chem. 281:43, 32724-32727.**

**Chance B. e Williams G. R. (1955) Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. J. Biol. Chem. 217:1, 409-427.**

**Chaudhuri M., Ajayi W. e Hill G. C. (1998) Biochemical and molecular properties of the *Trypanosoma brucei* alternative oxidase. Mol. Biochem. Parasitol. 95:1, 53-68.**

**Chaudhuri M., Ott R. D. e Hill G. C. (2006) Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. Trends Parasitol. 22:10, 484-491.**



**Chowdhury S. K., Gemin A. e Singh G. (2005) High activity of mitochondrial glycerophosphate dehydrogenase and glycerophosphate-dependent ROS production in prostate cancer cell lines. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333:4, 1139-1145.**

**Chown S. L., Gibbs A. G., Hetz S. K., Klok C. J., Lighton J. R. e Marais E. (2006) Discontinuous gas exchange in insects: a clarification of hypotheses and approaches. *Physiol. Biochem. Zool.* 79:2, 333-343.**

**Clayton C. E. e Michels P. (1996) Metabolic compartmentation in African trypanosomes. *Parasitol. Today* 12:12, 465-471.**

**Cleeter M. W., Cooper J. M., Darley-Usmar V. M., Moncada S. e Schapira A. H. (1994) Reversible inhibition of cytochrome c oxidase, the terminal enzyme of the mitochondrial respiratory chain, by nitric oxide. Implications for neurodegenerative diseases. *FEBS Lett.* 345:1, 50-54.**

**Clements A.N. (1992). The biology of mosquitoes, vol.1 Em: Adult energy metabolism, pp 292-303. Chapman and Hall. London, UK.**

**Collins F. H., Sakai R. K., Vernick K. D., Paskewitz S., Seeley D. C., Miller L. H., Collins W. E., Campbell C. C. e Gwadz R. W. (1986) Genetic selection of a Plasmodium-refractory strain of the malaria vector *Anopheles gambiae*. *Science* 234:4776, 607-610.**

**Consoli R. A. G. B. e Lourenço-de-Oliveira R. (1994) Principais Mosquitos de Importância Sanitária no Brasil. Fiocruz, Rio de Janeiro .**

**Coustou V., Besteiro S., Biran M., Diolez P., Bouchaud V., Voisin P., Michels P. A., Canioni P., Baltz T. e Bringaud F. (2003) ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 278:49, 49625-49635.**

**Cruz F. S., Docampo R. e Boveris A. (1978) Generation of superoxide anions and hydrogen peroxide from beta-lapachone in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 14:4, 630-633.**

**de Souza W., Attias M. e Rodrigues J. C. (2009) Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:10, 2069-2080.**

**DeJong R. J., Miller L. M., Molina-Cruz A., Gupta L., Kumar S. e Barillas-Mury C. (2007) Reactive oxygen species detoxification by catalase is a major determinant of fecundity in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci.U.S.A* 104:7, 2121-2126.**

**Denicola-Seoane A., Rubbo H., Prodanov E. e Turrens J. F. (1992) Succinate-dependent metabolism in Trypanosoma cruzi epimastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 54:1, 43-50.**

**Diangelo J. R., Bland M. L., Bambina S., Cherry S. e Birnbaum M. J. (2009) The immune response attenuates growth and nutrient storage in Drosophila by reducing insulin signaling. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 106:49, 20853–20858**

**Dias J. C. (2007) [Globalização, iniquidade e doença de Chagas]. Cad. Saude Publica 23 Suppl 1, S13-S22.**

**Dingle H. (1972) Migration strategies of insects. Science 175:4028, 1327-1335.**

**Dionne M. S. e Schneider D. S. (2008) Models of infectious diseases in the fruit fly Drosophila melanogaster. Dis. Model. Mech. 1:1, 43-49.**

**Dionne M. S., Pham L. N., Shirasu-Hiza M. e Schneider D. S. (2006) Akt and FOXO dysregulation contribute to infection-induced wasting in Drosophila. Curr.Biol. 16:20, 1977-1985.**

**Docampo R., de Souza W., Miranda K., Rohloff P. e Moreno S. N. (2005) Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. Nat. Rev. Microbiol. 3:3, 251-261.**

**Drahota Z., Chowdhury S. K., Floryk D., Mracek T., Wilhelm J., Rauchova H., Lenaz G. e Houstek J. (2002) Glycerophosphate-dependent hydrogen peroxide production by brown adipose tissue mitochondria and its activation by ferricyanide. J. Bioenerg. Biomembr. 34:2, 105-113.**

**Efremov R. G., Baradaran R. e Sazanov L. A. (2010) The architecture of respiratory complex I. Nature 465:7297, 441-445.**

**Eldridge B.F. (2005). Mosquitoes, the Culicidae. Em: Biology of Disease Vector. Capítulo 9, pp 95-112. 2º Edição. Editado por Marquardt, W.C.; Elsevier Academic Press. London, UK.**

**Estabrook R. W. e Sacktor B. (1958) alpha-Glycerophosphate oxidase of flight muscle mitochondria. J. Biol.Chem. 233:4, 1014-1019.**

**Eubel H., Heinemeyer J. e Braun H. P. (2004) Identification and characterization of respirasomes in potato mitochondria. Plant Physiol. 134:4, 1450-1459.**

**Evans D. A. e Brown R. C. (1972) The utilization of glucose and proline by culture forms of Trypanosoma brucei. J. Protozool. 19:4, 686-690.**

**Friedrich T. e Bottcher B. (2004) The gross structure of the respiratory complex I: a Lego system. *Biochim. Biophys. Acta* 1608:1, 1-9.**

**Garcia E. S., Ratcliffe N. A., Whitten M. M., Gonzalez M. S. e Azambuja P. (2007) Exploring the role of insect host factors in the dynamics of *Trypanosoma cruzi*-*Rhodnius prolixus* interactions. *J. Insect Physiol.* 53:1, 11-21.**

**Gnaiger E. (2009) Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41:10, 1837-1845.**

**Gonçalves R. L., Machado A. C., Paiva-Silva G. O., Sorgine M. H., Momoli M. M., Oliveira J. H., Vannier-Santos M. A., Galina A., Oliveira P. L. e Oliveira M. F. (2009) Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *Aedes aegypti* mosquito. *PLoS One.* 4:11, e7854.**

**Graça-Souza A. V., Maya-Monteiro C., Paiva-Silva G. O., Braz G. R., Paes M. C., Sorgine M. H., Oliveira M. F. e Oliveira P. L. (2006) Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 36:4, 322-335.**

**Graf R., Boehlen P. e Briegel H. (1991) Structural diversity of trypsin from different mosquito species feeding on vertebrate blood. *Experientia* 47:6, 603-609.**

**Gray M. W., Burger G. e Lang B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283:5407, 1476-1481.**

**Gredilla R., Barja G. e Lopez-Torres M. (2001) Effect of short-term caloric restriction on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> production and oxidative DNA damage in rat liver mitochondria and location of the free radical source. *J. Bioenerg. Biomembr.* 33:4, 279-287.**

**Gupta L., Molina-Cruz A., Kumar S., Rodrigues J., Dixit R., Zamora R. E. e Barillas-Mury C. (2009) The STAT pathway mediates late-phase immunity against *Plasmodium* in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Host Microbe* 5:5, 498-507.**

**Gusmao D. S., Santos A. V., Marini D. C., Russo E. S., Peixoto A. M., Bacci J. M., Berbert-Molina M. A. e Lemos F. J. (2007) First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102:8, 919-924.**

**Gutteridge J. M. e Smith A. (1988) Antioxidant protection by haemopexin of haem-stimulated lipid peroxidation. *Biochem. J.* 256:3, 861-865.**

Haitina T., Lindblom J., Renstrom T. e Fredriksson R. (2006) Fourteen novel human members of mitochondrial solute carrier family 25 (SLC25) widely expressed in the central nervous system. *Genomics* 88:6, 779-790.

Halliwell B e Gutteridge J.M.C. (1999) Em: *Free Radicals in Biology and Medicine*. Capítulo 1, pp 1-35. 3ª Edição, Oxford University Press, Inc., New York.

Harington J. S. (1961a) Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* I. Analysis of the haemolymph. *Parasitology* 51, 309-318.

Harington J. S. (1961b) Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* II. Analysis of the excretory material. *Parasitology* 51, 319-326.

Hederstedt L. (2003) Structural biology. Complex II is complex too. *Science* 299:5607, 671-672.

Hetz S. K. e Bradley T. J. (2005) Insects breathe discontinuously to avoid oxygen toxicity. *Nature* 433:7025, 516-519.

Heusner A. A., Lavoipierre M. M. e Bond D. C. (1973) [Etude cinétique de l'effet métabolique d'un repas sanguin chez *Aedes aegypti*]. *C. R. Acad. Sci. Paris* 277:19, 2017-2020.

Holt R. A., Subramanian G. M., Halpern A., Sutton G. G., Charlab R., Nusskern D. R., Wincker P., Clark A. G., Ribeiro J. M., Wides R., Salzberg S. L., Loftus B., Yandell M., Majoros W. H., Rusch D. B., Lai Z., Kraft C. L., Abril J. F., Anthouard V., Arensburger P., Atkinson P. W., Baden H., de B., V, Baldwin D., Benes V., Biedler J., Blass C., Bolanos R., Boscus D., Barnstead M., Cai S., Center A., Chaturverdi K., Christophides G. K., Chrystal M. A., Clamp M., Cravchik A., Curwen V., Dana A., Delcher A., Dew I., Evans C. A., Flanigan M., Grundschober-Freimoser A., Friedli L., Gu Z., Guan P., Guigo R., Hillenmeyer M. E., Hladun S. L., Hogan J. R., Hong Y. S., Hoover J., Jaillon O., Ke Z., Kodira C., Kokoza E., Koutsos A., Letunic I., Levitsky A., Liang Y., Lin J. J., Lobo N. F., Lopez J. R., Malek J. A., McIntosh T. C., Meister S., Miller J., Mobarry C., Mongin E., Murphy S. D., O'Brochta D. A., Pfannkoch C., Qi R., Regier M. A., Remington K., Shao H., Sharakhova M. V., Sitter C. D., Shetty J., Smith T. J., Strong R., Sun J., Thomasova D., Ton L. Q., Topalis P., Tu Z., Unger M. F., Walenz B., Wang A., Wang J., Wang M., Wang X., Woodford K. J., Wortman J. R., Wu M., Yao A., Zdobnov E. M., Zhang H., Zhao Q., Zhao S., Zhu S. C., Zhimulev I., Coluzzi M., della T. A., Roth C. W., Louis C., Kalush F., Mural R. J., Myers E. W., Adams M. D., Smith H. O., Broder S., Gardner M. J., Fraser C. M., Birney E., Bork P., Brey P. T., Venter J. C., Weissenbach J., Kafatos F. C., Collins F. H. e Hoffman S. L. (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* 298:5591, 129-149.

Honorio N. A., Silva W. C., Leite P. J., Goncalves J. M., Lounibos L. P. e Lourenco-de-Oliveira R. (2003) Dispersal of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)

in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 98:2, 191-198.

Hunte C., Palsdottir H. e Trumpower B. L. (2003) Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome bc1 complex. *FEBS Lett.* 545:1, 39-46.

Ito J., Ghosh A., Moreira L. A., Wimmer E. A. e Jacobs-Lorena M. (2002) Transgenic anopheline mosquitoes impaired in transmission of a malaria parasite. *Nature* 417:6887, 452-455.

Jacobasch G., Buckwitz D., Gerth C. e Thamm R. (1990) Regulation of the energy metabolism of *Plasmodium berghei*. *Biomed. Biochim. Acta* 49:2-3, S289-S294.

Kagawa Y., Cha S. H., Hasegawa K., Hamamoto T. e Endo H. (1999) Regulation of energy metabolism in human cells in aging and diabetes: FoF(1), mtDNA, UCP, and ROS. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266:3, 662-676.

Keilin, D. (1925). On cytochrome, a Respiring Pigment, Common to Animals, Yeast, and Higher Plants. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B*, vol. 98, pp 312-329. Artigo retirado do livro: *Great Experiments in Biology*. Editado por Steinbach, H.B. (1955). Prentice-Hall, Inc.

Klingenberg M. (1970) Localization of the glycerol-phosphate dehydrogenase in the outer phase of the mitochondrial inner membrane. *Eur. J. Biochem.* 13:2, 247-252.

Korshunov S. S., Skulachev V. P. e Starkov A. A. (1997) High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Lett.* 416:1, 15-18.

Krafsur E. S. e Graham C. L. (1970) Spiracular responses of *Aedes* mosquitoes to carbon dioxide and oxygen. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63:3, 691-696.

Krafsur E. S., Willman J. R., Graham C. L. e Williams R. E. (1970) Observations on spiracular behavior in *Aedes* mosquitoes. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 63:3, 684-691.

Krauss S., Zhang C. Y. e Lowell B. B. (2005) The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6:3, 248-261.

Kumar S., Christophides G. K., Cantera R., Charles B., Han Y. S., Meister S., Dimopoulos G., Kafatos F. C. e Barillas-Mury C. (2003) The role of reactive oxygen species on *Plasmodium melanotic* encapsulation in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100:24, 14139-14144.

Lambeth J. D. (2004) NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nat. Rev. Immunol.* 4:3, 181-189.

Lamour N., Riviere L., Coustou V., Coombs G. H., Barrett M. P. e Bringaud F. (2005) Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J. Biol. Chem.* 280:12, 11902-11910.

Lara F. A., Lins U., Paiva-Silva G., Almeida I. C., Braga C. M., Miguens F. C., Oliveira P. L. e Dansa-Petretski M. (2003) A new intracellular pathway of haem detoxification in the midgut of the cattle tick *Boophilus microplus*: aggregation inside a specialized organelle, the hemosome. *J. Exp. Biol.* 206:Pt 10, 1707-1715.

Lara F. A., Sant'anna C., Lemos D., Laranja G. A., Coelho M. G., Reis S., I, Michel A., Oliveira P. L., Cunha-E-Silva, Salmon D. e Paes M. C. (2007) Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 355:1, 16-22.

Lehane M.J. (1991) *Em: Biology of blood-Sucking Insect*. Capítulo 6, pp 79-110. Harper Collins. Academic, United Kingdom.

Lehmann F. O., Dickinson M. H. e Staunton J. (2000) The scaling of carbon dioxide release and respiratory water loss in flying fruit flies (*Drosophila* spp.). *J. Exp. Biol.* 203:Pt 10, 1613-1624.

Lemaitre B. e Hoffmann J. (2007) The host defense of *Drosophila melanogaster*. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 697-743.

Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J. M. e Hoffmann J. A. (1996) The dorsoventral regulatory gene cassette *spatzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults. *Cell* 86:6, 973-983.

Lorenz M. W. (2007) Oogenesis-flight syndrome in crickets: age-dependent egg production, flight performance, and biochemical composition of the flight muscles in adult female *Gryllus bimaculatus*. *J. Insect Physiol.* 53:8, 819-832.

Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with folin phenol reagent. *The J. Biol. Chem.* 193: 525-275.

Luk E., Carroll M., Baker M. e Culotta V. C. (2003) Manganese activation of superoxide dismutase 2 in *Saccharomyces cerevisiae* requires MTM1, a member of the mitochondrial carrier family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 100:18, 10353-10357.

Magalhaes T., Leandro D. C. e Ayres C. F. (2010) Knock-down of REL2, but not defensin A, augments *Aedes aegypti* susceptibility to *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Acta Trop.* 113:2, 167-173.

Magwere T., Pamplona R., Miwa S., Martinez-Diaz P., Portero-Otin M., Brand M. D. e Partridge L. (2006) Flight activity, mortality rates, and lipoxidative damage in *Drosophila*. *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* 61:2, 136-145.

Manoukis N. C., Diabate A., Abdoulaye A., Diallo M., Dao A., Yaro A. S., Ribeiro J. M. e Lehmann T. (2009) Structure and dynamics of male swarms of *Anopheles gambiae*. *J. Med. Entomol.* 46:2, 227-235.

Margulis, L. (1970). *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale University Press, USA.

Martins R. M., Covarrubias C., Rojas R. G., Silber A. M. e Yoshida N. (2009) Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect. Immun.* 77:7, 3023-3032.

Maya-Monteiro C. M., Alves L. R., Pinhal N., Abdalla D. S. e Oliveira P. L. (2004a) HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:1, 81-88.

Maya-Monteiro C. M., Alves L. R., Pinhal N., Abdalla D. S. e Oliveira P. L. (2004b) HeLp, a heme-transporting lipoprotein with an antioxidant role. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34:1, 81-88.

Maya-Monteiro C. M., Daffre S., Logullo C., Lara F. A., Alves E. W., Capurro M. L., Zingali R., Almeida I. C. e Oliveira P. L. (2000) HeLp, a heme lipoprotein from the hemolymph of the cattle tick, *Boophilus microplus*. *J. Biol. Chem.* 275:47, 36584-36589.

McCord J. M. e Fridovich I. (1969) Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.* 244:22, 6049-6055.

Menna-Barreto R. F., Gonçalves R. L., Costa E. M., Silva R. S., Pinto A. V., Oliveira M. F. e de Castro S. L. (2009) The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* 47:5, 644-653.

Michels P. A., Bringaud F., Herman M. e Hannaert V. (2006) Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim. Biophys. Acta* 1763:12, 1463-1477.

Mitchell P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

Mitchell P. e Moyle J. (1967) Chemiosmotic hypothesis of oxidative phosphorylation. *Nature* 213:5072, 137-139.

Mitchell. P. (1978). David Keilin's Respiratory Chain Concept and It's Chemiosmotic Consequences. Nobel Prize Lecture. Glynn Research Institute, Bodmin, Cornwall, U. K.

Miwa S., St-Pierre J., Partridge L. e Brand M. D. (2003) Superoxide and hydrogen peroxide production by *Drosophila* mitochondria. *Free Radic. Biol. Med.* 35:8, 938-948.

Molina-Cruz A., DeJong R. J., Charles B., Gupta L., Kumar S., Jaramillo-Gutierrez G. e Barillas-Mury C. (2008) Reactive oxygen species modulate *Anopheles gambiae* immunity against bacteria and *Plasmodium*. *J. Biol. Chem.* 283:6, 3217-3223.

Murphy M. P. (2009) How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* 417:1, 1-13.

Nayar J. K. e Van Handel E. (1970) The fuel for sustained mosquito flight. *J. Insect Physiol.* 17:3, 471-481.

Nene V., Wortman J. R., Lawson D., Haas B., Kodira C., Tu Z. J., Loftus B., Xi Z., Megy K., Grabherr M., Ren Q., Zdobnov E. M., Lobo N. F., Campbell K. S., Brown S. E., Bonaldo M. F., Zhu J., Sinkins S. P., Hogenkamp D. G., Amedeo P., Arensburger P., Atkinson P. W., Bidwell S., Biedler J., Birney E., Bruggner R. V., Costas J., Coy M. R., Crabtree J., Crawford M., Debruyne B., Decaprio D., Eiglmeier K., Eisenstadt E., El-Dorri H., Gelbart W. M., Gomes S. L., Hammond M., Hannick L. I., Hogan J. R., Holmes M. H., Jaffe D., Johnston J. S., Kennedy R. C., Koo H., Kravitz S., Kriventseva E. V., Kulp D., Labutti K., Lee E., Li S., Lovin D. D., Mao C., Mauceli E., Menck C. F., Miller J. R., Montgomery P., Mori A., Nascimento A. L., Naveira H. F., Nusbaum C., O'leary S., Orvis J., Pertea M., Quesneville H., Reidenbach K. R., Rogers Y. H., Roth C. W., Schneider J. R., Schatz M., Shumway M., Stanke M., Stinson E. O., Tubio J. M., Vanzee J. P., Verjovski-Almeida S., Werner D., White O., Wyder S., Zeng Q., Zhao Q., Zhao Y., Hill C. A., Raikhel A. S., Soares M. B., Knudson D. L., Lee N. H., Galagan J., Salzberg S. L., Paulsen I. T., Dimopoulos G., Collins F. H., Birren B., Fraser-Liggett C. M. e Severson D. W. (2007) Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* 316:5832, 1718-1723.

Nichols D.G. e Ferguson S.J. (2002). *Bioenergetics 3. Capítulo 5*, pp 89-154. Academic Press. London, UK.

Njogu R. M., Whittaker C. J. e Hill G. C. (1980) Evidence for a branched electron transport chain in *Trypanosoma brucei*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1:1, 13-29.

Noji H., Yasuda R., Yoshida M. e Kinosita K., Jr. (1997) Direct observation of the rotation of F1-ATPase. *Nature* 386:6622, 299-302.



Nolan D. P. e Voorheis H. P. (1992) The mitochondrion in bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* is energized by the electrogenic pumping of protons catalysed by the F1F0-ATPase. *Eur. J. Biochem.* 209:1, 207-216.

Oliveira Gisele Almeida, (2007) Metabolismo de lipídeos em insetos machos: incorporação pelos testículos e transferências de lipídeos durante a cópula. Volume I, 210 folhas. Doutorado em Ciências área de concentração Química Biológica. Instituto de Bioquímica Médica. Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Oliveira G. A., Baptista D. L., Guimaraes-Motta H., Almeida I. C., Masuda H. e Atella G. C. (2006) Flight-oogenesis syndrome in a blood-sucking bug: biochemical aspects of lipid metabolism. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* 62:4, 164-175.

Oliveira M. F., Silva J. R., Dansa-Petretski M., de Souza W., Lins U., Braga C. M., Masuda H. e Oliveira P. L. (1999) Haem detoxification by an insect. *Nature* 400:6744, 517-518.

Oliveira P. L. e Oliveira M. F. (2002) Vampires, Pasteur and reactive oxygen species. Is the switch from aerobic to anaerobic metabolism a preventive antioxidant defence in blood-feeding parasites? *FEBS Lett.* 525:1-3, 3-6.

Oliveira P. L., Kawooya J. K., Ribeiro J. M., Meyer T., Poorman R., Alves E. W., Walker F. A., Machado E. A., Nussenzveig R. H., Padovan G. J. e . (1995) A heme-binding protein from hemolymph and oocytes of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Isolation and characterization. *J. Biol. Chem.* 270:18, 10897-10901.

Opperdoes F. R. (1987) Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. *Annu. Rev. Microbiol.* 41, 127-151.

Opperdoes F. R., Borst P. e Spits H. (1977b) Particle-bound enzymes in the bloodstream form of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 76:1, 21-28.

Opperdoes F. R., Borst P., Bakker S. e Leene W. (1977a) Localization of glycerol-3-phosphate oxidase in the mitochondrion and particulate NAD<sup>+</sup>-linked glycerol-3-phosphate dehydrogenase in the microbodies of the bloodstream form to *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.* 76:1, 29-39.

Orrenius S. (2004) Mitochondrial regulation of apoptotic cell death. *Toxicol. Lett.* 149:1-3, 19-23.

Owen O. E., Kalhan S. C. e Hanson R. W. (2002) The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* 277:34, 30409-30412.

**Paes M. C. e Oliveira P. L. (1999) Extracellular glutathione peroxidase from the blood-sucking bug, *Rhodnius prolixus*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 41:4, 171-177.**

**Paes M. C., Oliveira M. B. e Oliveira P. L. (2001) Hydrogen peroxide detoxification in the midgut of the blood-sucking insect, *Rhodnius prolixus*. Arch. Insect Biochem. Physiol. 48:2, 63-71.**

**Paiva-Silva G. O., Cruz-Oliveira C., Nakayasu E. S., Maya-Monteiro C. M., Dunkov B. C., Masuda H., Almeida I. C. e Oliveira P. L. (2006) A heme-degradation pathway in a blood-sucking insect. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 103:21, 8030-8035.**

**Palmieri F. (2004) The mitochondrial transporter family (SLC25): physiological and pathological implications. Pflugers Arch. 447:5, 689-709.**

**Papa S., Capitanio N., Capitanio G. e Palese L. L. (2004) Protonmotive cooperativity in cytochrome c oxidase. Biochim. Biophys. Acta 1658:1-2, 95-105.**

**Peterson T. M., Gow A. J. e Luckhart S. (2007) Nitric oxide metabolites induced in *Anopheles stephensi* control malaria parasite infection. Free Radic. Biol. Med. 42:1, 132-142.**

**Pfaffl M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. Nucleic Acids Res. 29:9, e45.**

**Piacenza L., Alvarez M. N., Peluffo G. e Radi R. (2009) Fighting the oxidative assault: the *Trypanosoma cruzi* journey to infection. Curr. Opin. Microbiol. 12:4, 415-421.**

**Reina-San-Martin B., Degraeve W., Rougeot C., Cosson A., Chamond N., Cordeiro-Da-Silva A., Arala-Chaves M., Coutinho A. e Minoprio P. (2000) A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. Nat. Med. 6:8, 890-897.**

**Ribeiro J. M. (2003) A catalogue of *Anopheles gambiae* transcripts significantly more or less expressed following a blood meal. Insect Biochem. Mol. Biol. 33:9, 865-882.**

**Romoser W.S. (1996). The Vector Alimentary System. Em: Biology of Disease Vector. Capítulo 18, pp 298- 317. 1º Edição. Editado por Beaty, B.J. e Marquardt, W.C.; Colorado. University press. London, UK.**

**Ryter S. W. e Tyrrell R. M. (2000) The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. Free Radic. Biol. Med. 28:2, 289-309.**

Sacktor B. e Childress C. C. (1967) Metabolism of proline in insect flight muscle and its significance in stimulating the oxidation of pyruvate. *Arch. Biochem. Biophys.* 120, 583-588.

Sacktor B. e Wormser-Shavit E. (1966) Regulation of metabolism in working muscle in vivo. I. Concentrations of some glycolytic, tricarboxylic acid cycle, and amino acid intermediates in insect flight muscle during flight. *J. Biol.Chem.* 241:3, 624-631.

Sacktor B. (1965). *Energetics and Respiratory Metabolism of Muscular Contraction. Em: The Physiology of Insecta. Volume II. Capítulo 10, pp 483-665. Editado por Rockstein, M. University of Miami School of Medicine, Florida. Academic Press, New York and Lodon.*

Saraste M. (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:5407, 1488-1493.

Scaraffia P. Y. e Wells M. A. (2003) Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. *J. Insect Physiol.* 49:6, 591-601.

Schagger H. (2002) Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1555:1-3, 154-159.

Schagger H. e Pfeiffer K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* 19:8, 1777-1783.

Scheffler I. (2008) *Mitochondria. 2<sup>nd</sup> edition, John Wiley & Sons, Inc. Capítulo 5.*

Schmitt T. H., Frezzatti W. A., Jr. e Schreier S. (1993) Hemin-induced lipid membrane disorder and increased permeability: a molecular model for the mechanism of cell lysis. *Arch. Biochem. Biophys.* 307:1, 96-103.

Shannon R. C. e Davis N. C. (1930) The flight of *Stegomyia aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 10, 151-156.

Silber A. M., Tonelli R. R., Lopes C. G., Cunha-E-Silva, Torrecilhas A. C., Schumacher R. I., Colli W. e Alves M. J. (2009) Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 168:1, 102-108.

Singer M., De S., V, Vitale D. e Jeffcoate W. (2004) Multiorgan failure is an adaptive, endocrine-mediated, metabolic response to overwhelming systemic inflammation. *Lancet* 364:9433, 545-548.

**Singer M. (2008) Cellular dysfunction in sepsis. Clin.Chest Med. 29:4, 655-6ix.**

**Small G.J. (2005). Environmental Management for Vector Control. Em: Biology of Disease Vector. Capítulo 42, pp 639- 648. 2º Edição. Editado por Marquardt, W.C.; Elsevier Academic Press. London, UK.**

**Sogl B., Gellissen G. e Wiesner R. J. (2000) Biogenesis of giant mitochondria during insect flight muscle development in the locust, *Locusta migratoria* (L.). Transcription, translation and copy number of mitochondrial DNA. Eur. J. Biochem 267:1, 11-17.**

**St-Pierre J., Buckingham J. A., Roebuck S. J. e Brand M. D. (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. J. Biol. Chem. 277:47, 44784-44790.**

**Stock D., Leslie A. G. e Walker J. E. (1999) Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. Science 286:5445, 1700-1705.**

**Tielens A. G. e van Hellemond J. J. (1998) Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. Parasitol. Today 14:7, 265-272.**

**Turrens J. F. (1989) The role of succinate in the respiratory chain of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. Biochem. J. 259:2, 363-368.**

**Turrens J. F. (2003) Mitochondrial formation of reactive oxygen species. J. Physiol. 552:Pt 2, 335-344.**

**Turrens J. F. e Boveris A. (1980) Generation of superoxide anion by the NADH dehydrogenase of bovine heart mitochondria. Biochem. J. 191:2, 421-427.**

**Van den Berghe G., Schetz M., Vlasselaers D., Hermans G., Wilmer A., Bouillon R. e Mesotten D. (2009) Clinical review: Intensive insulin therapy in critically ill patients: NICE-SUGAR or Leuven blood glucose target? J. Clin. Endocrinol. Metab. 94:9, 3163-3170.**

**Van den Bergh, S.G.(1967). Preparation of insect mitochondria. Meth. Enzymol. 10: 117-122.**

**Van der Zee J., Barr D. P. e Mason R. P. (1996) ESR spin trapping investigation of radical formation from the reaction between hematin and tert-Butyl hydroperoxide. Free Radic. Biol. Med. 20:2, 199-206.**

**Van Hellemond J. J., Opperdoes F. R. e Tielens A. G. (2005) The extraordinary mitochondrion and unusual citric acid cycle in Trypanosoma brucei. Biochem. Soc. Trans. 33:Pt 5, 967-971.**

**Vercesi A. E., Bernardes C. F., Hoffmann M. E., Gadelha F. R. e Docampo R. (1991) Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of Trypanosoma cruzi in situ. J. Biol. Chem. 266:22, 14431-14434.**

**Vonck J. e Schafer E. (2009) Supramolecular organization of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. Biochim. Biophys. Acta 1793:1, 117-124.**

**Votyakova T. V. e Reynolds I. J. (2004) Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. Arch. Biochem. Biophys. 431:1, 138-144.**

**Wallace D. C. (1994) Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 91:19, 8739-8746.**

**Warburg A. (2002) Estivation of Anopheles gambiae: Potential habitats and physiology. Report number C 17-002, Submitted to the Office of the Science Advisor, U.S. Agency for International Development.**

**Waterhouse R. M., Kriventseva E. V., Meister S., Xi Z., Alvarez K. S., Bartholomay L. C., Barillas-Mury C., Bian G., Blandin S., Christensen B. M., Dong Y., Jiang H., Kanost M. R., Koutsos A. C., Levashina E. A., Li J., Ligoxygakis P., Maccallum R. M., Mayhew G. F., Mendes A., Michel K., Osta M. A., Paskewitz S., Shin S. W., Vlachou D., Wang L., Wei W., Zheng L., Zou Z., Severson D. W., Raikhel A. S., Kafatos F. C., Dimopoulos G., Zdobnov E. M. e Christophides G. K. (2007) Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes. Science 316:5832, 1738-1743.**

**Wittig I., Braun H. P. e Schagger H. (2006) Blue native PAGE. Nat. Protoc. 1:1, 418-428.**

**Wu D. D., Wang G. D., Irwin D. M. e Zhang Y. P. (2009) A profound role for the expansion of trypsin-like serine protease family in the evolution of hematophagy in mosquito. Mol. Biol. Evol. 26:10, 2333-2341.**

**Yanagisawa T. (1965) The respiratory metabolism of ascaris eggs with special reference to the effect of cyanide and temperatures on the oxygen uptake of late developmental stages. Jpn. J. Med. Sci. Biol. 18, 33-44.**

**Yankovskaya V., Horsefield R., Tornroth S., Luna-Chavez C., Miyoshi H., Leger C., Byrne B., Cecchini G. e Iwata S. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science* 299:5607, 700-704.**

**Ye Y. H., Chenoweth S. F. e McGraw E. A. (2009) Effective but costly, evolved mechanisms of defense against a virulent opportunistic pathogen in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Pathog.* 5:4, e1000385.**

**Yoneda M., Katsumata K., Hayakawa M., Tanaka M. e Ozawa T. (1995) Oxygen stress induces an apoptotic cell death associated with fragmentation of mitochondrial genome. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 209:2, 723-729.**

**Zhang Z., Huang L., Shulmeister V. M., Chi Y. I., Kim K. K., Hung L. W., Crofts A. R., Berry E. A. e Kim S. H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature* 392:6677, 677-684.**

**Zheng L., Cornel A. J., Wang R., Erfle H., Voss H., Ansorge W., Kafatos F. C. e Collins F. H. (1997) Quantitative trait loci for refractoriness of *Anopheles gambiae* to *Plasmodium cynomolgi* B. *Science* 276:5311, 425-428.**

**Zhou G., Kohlhepp P., Geiser D., Frasquillo M. C., Vazquez-Moreno L. e Winzerling J. J. (2007) Fate of blood meal iron in mosquitoes. *J. Insect Physiol.* 53:11, 1169-1178.**

**Zhou G.; Scaraffia, P.Y. and Wells, M.A. (2005). Vector Nutrition and Energy Metabolism. Em: *Biology of Disease Vector*. Capítulo 23, pp 311- 316. 2º Edição. Editado por Marquardt, W.C.; Elsevier Academic Press. London, UK.**

**Ziegler R. (1996). The Vector Alimentary System. Em: *Biology of Disease Vector*. Capítulo 22, 356-370. 1º Edição. Editado por Beaty, B.J. e Marquardt, W.C.; Colorado. University press Colorado.**

# Renata de Lima Sales Gonçalves

## Curriculum Vitae

---

### Dados Pessoais

**Nome** Renata de Lima Sales Gonçalves  
**Nascimento** 30/03/1983 - Rio de Janeiro/RJ - Brasil

---

### Formação Acadêmica/Titulação

- 2007-2010** Doutorado Ciências (área de concentração: Química Biológica).  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.  
Título: Metabolismo mitocondrial na relação insetos vetores-parasitos.  
Orientador: Marcus Fernandes de Oliveira.  
Bolsista do: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- 2005 - 2006** Mestrado Ciências (área de concentração: Química Biológica).  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil.  
Título: Alterações na função mitocondrial promovidas pela alimentação com sangue no mosquito *Aedes aegypti*.  
Orientador: Marcus Fernandes de Oliveira.  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- 2001 - 2004** Graduação em Ciências biológicas, modalidade genética.  
Universidade Federal do Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brasil  
Título: Existe glutathione peroxidase no inseto hematofago *Rhodnius prolixus*?  
Orientador: Pedro Lagerblad de Oliveira.  
Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
- 

### Formação complementar

- 2009** Estágio de sanduíche durante o doutorado.  
National Institute of Health, NIH, Bethesda, Estados Unidos  
Bolsista do(a): Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- 

### Prêmios e títulos

- 2009** Travel Award, Gordon Research Conferences - USA
- 2007** Melhor pôster, V Meeting of the SFRBM-South American Group - Uruguai.
- 2007** Melhor pôster na área de Bioenergética - Mestrado, XXXVI Reunião Anual da SBBq.

**2005** Prêmio de melhor trabalho de iniciação científica (3ª colocação) – XXXIV reunião anual da SBBq 2005.

---

### **Artigos completos publicados em periódicos**

Gonçalves R. L., Machado A. C., Paiva-Silva G. O., Sorgine M. H., Momoli M. M., Oliveira J. H., Vannier-Santos M. A., Galina A., Oliveira P. L. e Oliveira M. F. (2009) Blood-feeding induces reversible functional changes in flight muscle mitochondria of *Aedes aegypti* mosquito. PLoS One. 4:11, e7854.

Menna-Barreto R. F., Gonçalves R. L., Costa E. M., Silva R. S., Pinto A. V., Oliveira M. F. e de Castro S. L. (2009) The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. Free Radic. Biol. Med. 47:5, 644-653.

---

### **Artigos em revistas (Magazine)**

1. Gonçalves, R.L.S., Oliveira, JHMC  
HIF: uma proteína envolvida na adaptação à hipóxia. Ciência Hoje. , p.67 - 69, 2007.

---

### **Orientações e Supervisões concluídas**

#### **Iniciação científica**

João Paulo Pinho. **Alterações na função mitocondrial no barbeiro *Rhodnius prolixus***. 2007- 2010. Iniciação científica (Biomedicina) - Universidade Federal do Rio de Janeiro. (Atualmente aluno de mestrado pelo Instituto de Bioquímica Médica)

#### **Orientações e Supervisões em andamento**

#### **Iniciação científica**

Ana Carolina Loyola Machado. **Alterações na Função mitocondrial do mosquito *Aedes aegypti***. 2007. Iniciação científica (Ciências biológicas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro.

#### **Comunicações em Congresso**

12 comunicações em congressos nacionais.  
4 comunicações em congressos internacionais.



# 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](#)