LETÍCIA MARCHESE

Caracterização molecular e bioquímica das enzimas envolvidas na biossíntese de prolina em *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo 2017

LETÍCIA MARCHESE

Caracterização molecular e bioquímica das enzimas envolvidas na biossíntese de prolina em *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Versão corrigida. A versão original eletrônica encontra-se disponível tanto na Biblioteca do ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo 2017 CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP) Serviço de Biblioteca e informação Biomédica do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Marchese, Letícia / Letícia Marchese; orientador Ariel Mariano Silber. -- São Paulo, 2017. 144 p. Tese (Doutorado)) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas. 1. Trypanossoma cruzi. 2. Biossíntese de Lprolina. 3. Tritryps. 4. Metabolismo. 5. Transidrogenase. I. Silber, Ariel Mariano, orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Letícia Marchese

Título da Tese: Caracterização molecular e bioquímica das enzimas envolvidas na biossíntese de prolina em *Trypanosoma cruzi*

Orientador(a): Ariel Mariano Silber

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão

pública realizada a, considerou

() Aprovado(a) () Reprovado(a)

Examinador(a):	Assinatura Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Examinador(a):	Assinatura: Nome: Instituição:
Presidente:	Assinatura: Nome: Instituição:

Dedicado a

Miryam do Carmo Sobottka e José Francisco Marchese

Meus alicerces na vida



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 - CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil Telefone :(55) (011) 3091.7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº 129 nas fls. 134 do livro 02 para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a)) Ariel Mariano Silber, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "Caracterização molecular e bioquímica das enzimas envolvidas na biossíntese de prolina em Trypanosoma cruzi" do qual participam o(s) aluno(s) Letícia Marchese, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) em 18.09.2012, com validade de 4 anos.

São Paulo, 19 de setembro de 2012.

Prof. Dr. WOTHAN TAVARES DE LIMA Coordenador-CEUA - ICB/USP

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE

Prota. Dra. ANA PAULA LEPIQU Secretária- CEUA - ICB/USP



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP · Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000 Comissão de Ética no Uso de Animais - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Of.CEUA.079.16

São Paulo, 22 de agosto de 2016.

Prezado(a) Professor(a),

Informo que o projeto intitulado "*Caracterização molecular e bioquímica das enzimas envolvidas na biossíntese de prolina em Trypanosoma cruzi*", registrado sob o protocolo nº **129/2012** e aprovado em 18/09/2012 que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, foi **prorrogado até 18/09/2020**.

Diante desta prorrogação e da declaração de que não houve alteração da metodologia e das técnicas descritas na licença inicial para o uso de animais, autorizo a inclusão das espécies e quantidades descritas abaixo para continuidade ao referido projeto:

Espécie	Linhagem	Sexo	Idade/Peso	Quantidade por ano
Camundongo	Balb/C	Macho	45 dias	1º:20
				2º:
				3º:
				4º:

Reitero que havendo alteração de metodologia e inserção de novos alunos ao projeto de pesquisa vinculado à referida licença a CEUA-ICB deverá ser informada.

Cordialmente,

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes** Coordenador - CEUA-ICB/USP

Prof.(a) Dr.(a) **Ariel Mariano Silber** Departamento de **Parasitologia** Instituto de Ciências Biomédicas - USP

"Não importam os desvios durante parte da jornada, importa a segurança em refazer os caminhos mal percorridos."

Chico Xavier – André Luiz

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus pela vida, na qual tive a possibilidade de escolher meus passos e construir meu caminho, a meus pais, Miryam e José Francisco, que nele desde meu nascimento sempre me guiaram e apoiaram; e ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber por sua amizade, por toda sua orientação e pela a oportunidade de participar e trabalhar em seu grupo de pesquisa, oferecendo um excelente ambiente de trabalho.

Agradeço imensamente ao meu amor e amigo Douglas por seu companheirismo, carinho e por toda sua ajuda nessa fase da minha vida. Assim também, agradeço enormemente aos meus irmãos Marcela e Guilherme que sempre me apoiaram e me presentearam com duas riquezas na nossa família: a Elisa e o Giovanni, que assim como a Nick proporcionam felicidades e aprendizados oriundos da alegria e inocência das crianças. Também, sou muito grata a toda minha família Sobottka, principalmente, ao meu exemplo de honestidade meu vó Orlando.

Sou extremamente grata ao Dr. Brian S. Mantilla, a quem devo muito do que aprendi nesses anos de trabalho por sua orientação na bancada, nos experimentos e nos textos científicos, assim como por sua grande amizade e alegre companhia. Ao Dr. Karel Olavarría, quem me auxiliou na caracterização da inibição de TcP5CR exercido por seu cofator. Ao Marcel (Marcelzito), a primeira pessoa quem me auxiliou e familiarizou à bancada no laboratório. Ao Ismael, Lina, Thais, Prof. Dr. Mauro J. Cortez, Raphael, Loyze e a Profa. Dra. Maria Carolina Q. Elias, pelas contribuições com as imunoflurescências. Ao Manoel, pela paciência e disponibilidade em me ajudar com a manipulação dos camundongos. A profa. Dr. Maria Júlia Manso Alves e a todo seu laboratório, em especial, a Celinha, por me orientarem e auxiliarem no difícil e trabalhoso experimento na tentativa de obter anticorpos monoclonais, assim como, na disponibilidade em correr géis SDS lindos. A profa. Dra. Alicia Kowaltowski, Camille, todo seu grupo e ao Dr. Luis A. L. Martínez, pelas discussões sobre os experimentos de potencial de membrana e consumo de oxigênio e disponibilidade e auxílio no uso do fluorímetro. A todos integrantes do laboratório aos antigos e atuais que fizeram meu caminho mais feliz e ameno:

Aos meus grandes amigos Higo e Flá Z. (Cumadi), pela amizade, risadas e consolos.

A três incríveis mulheres de grande competência cujas passagens no laboratório, além de saudades, deixaram diferentes protocolos padronizados: a Beth, Lud e Juli, pela amizade e grande vontade em ajudar a mim e a todos.

Ao demais que passaram pelo laboratório que contribuíram enormente com todo grupo: Lis, Rosana, Brian e Gustavo.

À Flá Dama e Rá, pela amizade carinhosa, os desabafos e a disponibilidade contínua em colaborar comigo.

Ao Rodolfo, Mancho, Carla, Marcelzito, pelas inúmeras colaborações; e ao Richard, Alexandre, Mayke, Sandra, Prof. Dr. Agustín H. Lopez e a Leydi por completarem a harmoniosa e divertida convivência no laboratório de ajuda mútua.

Ao Prof. Dr. Carsten e seu grupo, pelo tempo de convivência compartilhada no nosso laboratório.

Meu obrigado a todos os colegas do Instituto de Ciências Biomédicas, em especial, do Departamento de Parasitologia e à Universidade de São Paulo.

Agradeço também ao CNPq, pelo apoio finaneiro e a todos os meus amigos que ainda não citei:

À minha família de coração: Lininha, Lourdes e Roberto que sempre torceram por mim e me receberam de braços abertos.

Às minhas amigas Nat, Lu,Ursa e Aninha que sempre me apoiaram e vibraram por mim.

Às amizades que São Paulo me deu: Eliza, Frank, Martha e Marina, meu muito obrigado pela companhia e risadas.

E a todos os colaborados da Casa Espírita Aurora dos Aprendizes, em especial, a todos da 8° turma da Escola de Aprendizes do Evangelho.

Este trabalho foi desenvolvido graças ao apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número de processo: 141680/2012-1 e pela FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), número de processo: 2011/22697-8.

RESUMO

MARCHESE, L. Caracterização molecular e bioquímica das enzimas envolvidas na biossíntese de prolina em *Trypanosoma cruzi*. 2017. 144 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

O Trypanossoma cruzi é o agente etiológico da Doença de Chagas e apresenta um ciclo de vida complexo que envolve diferentes estágios celulares presentes no hospedeiro mamífero e no inseto vetor. Ao colonizar o trato digestivo desse invertebrado, o T. cruzi defronta uma situação de escassez de nutrientes. Existem também outros tripanossomatídeos que também são importantes modelos de estudo e agentes etiológicos de outras doenças neglicenciadas, como o Trypanossoma brucei e as diferentes espécies de Leishmania spp. Nas formas desses parasitas presentes no inseto vetor a L-prolina (L-Pro) e outros aminoácidos são importantes fontes de caborno e energia. Para obter L-Pro, além de transportá-la, alguns organismos podem biossintetizar L-Pro principalmente via L-glutamato (L-Glu). A Δ^1 -pirrolina-5carboxilato (P5C) sintase (P5CS) converte o L-Glu ao intermediário da via, o P5C que uma vez formado é reduzido a L-Pro via P5C redutase (P5CR). Nesse trabalho, verificou-se a possível ocorrência dessa via nesses três tripanossomatídeos. Em T. cruzi toda a via é funcional, em T. brucei está ausente, enquanto que em L. amazonensis está presente parcialmente. A biossíntese de L-Pro em T. cruzi é abordada com mais detalhes. Ambas as enzimas da via foram expressas e tiveram sua localização determinada no citoplasma, compartimento distinto das enzimas do catabolismo de L-Pro (no interior da mitocôndria). A caracterização bioquímica da TcP5CR mostrou uma atividade dependente de NADPH e controlada pela concentração desse coosubstrato, através da inibição incompetitiva pelo substrato ($K_i^{NADPH} = 50.5 \pm 5 \mu M$), apontando, então, essa enzima a canditada a regular esse metabolismo. Também, observamos que ambas as enzimas estão superexpressas nos estágios presentes nos triatomíneos. Ademais, evidenciou-se a saída do P5C da mitocôndria, que junto à entrada de L-Pro nessa organela e as vias interconversão de L-Pro e P5C presentes em distintos compartimentos possibilitam a existência de um mecanismo de transidrogenase e um shuttle de elétrons. Dessa maneira, o poder redutor dos pools citoplasmáticos de NADPH é transferido aos *pools* mitocondriais de FADH₂ e NADH. Por fim, mostrou que a existência desse mecanismo confere a resistência ao estresse nutricional de T. cruzi.

Palavras-chave: *Trypanossoma cruzi*. Biossíntese de L-prolina. Tritryps. Metabolismo. Transidrogenase.

ABSTRACT

MARCHESE, L. Molecular and biochemical characterization of the enzymes involved in proline biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. 2017. 144 p. Ph.D. Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2017.

Trypanosoma cruzi is the etiologic agent of Chagas Disease. This parasite has a complex cycle of life, involving different cell stages in the mammalian hosts and insect vector. When T. cruzi infects the digestive tract of these invertebrates, it faces a nutrient starvation. There are other trypanosomatids which are also important study models and they are etiologic agent of other neglected diseases as well, such as Trypanosoma brucei and different species of Leishmania spp. In the insect forms, the L-proline (L-Pro) and others amino acids are important carbon and energy sources. In order to obtain L-Pro, some organisms are able to biosynthesize L-proline (L-Pro) mainly from L-glutamate (L-Glu), besides they transport this amino acid. In the biosynthesis pathway, the Δ^{1} pyrroline-5-carboxylate (P5C) synthase (P5CS) converts L-Glu into the intermediate P5C, which in turn, is reduced to L-Pro by a P5C reductase (P5CR). In this study, we verified the possible occurrence of this pathway in these three trypanosomatids. In T. cruzi the entire route is operative. In T. brucei, is absent, while L. amazonensis this pathway is partially operative. In T. cruzi, both enzymes were expressed and had their location determined in the cytosol, differently from those of the catabolism of L-Pro (that happens inside mitochondria). The biochemical characterization of TcP5CR showed a NADPH-dependent activity that is regulated by co-substrate concentration via a substrate uncompetitive inhibition ($K_i^{NADPH} = 50.5 \pm 5 \mu M$). Therefore TcP5CR is a candidate to be a regulation point of the pathway. In addition, we note which both enzymes are super expressed in insect forms. Furthermore, it was observed the exit of P5C from the mitochondria, that together with the entry of L-Pro inside mitochondria and the interconversion reactions between Pro and P5C inside distinc compartments create the condition for the existence of a transhydrogenation and electron shuttle mechanisms. Thus the reductor power of NADPH cytoplasmic pools is transferred to mitochondrial pools of FADH₂ and NADH. Finally, we showed that existence of this mechanism allows nutricional stress resistance in T. cruzi.

Keywords: *Trypanossoma cruzi*. L-Proline biosynthesis. Tritryps. Metabolism. Transhydrogenase.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição global do número de casos da infecção pelo <i>T. cruzi</i> e de ocorrência da transmissão vetorial
Figura 2 - Alinhamento múltiplo das sequências P5CS de <i>T. cruzi</i>
Figura 3 - Domínios proteicos encontrados para as sequências TcP5CS
Figura 4 - Alinhamento das sequências de TcP5CS com alguns de seus ortólogos78
Figura 5 - Domínios proteicos encontrados para a sequência TcP5CR80
Figura 6 - Alinhamento das sequências de TcP5CR presentes em tripanossomatídeos81
Figura 7 - Alinhamento das sequências de TcP5CR com alguns de seus ortólogos82
Figura 8 - Avaliação da biossíntese de L-Pro in vivo
Figura 9 - Avaliação da atividade de P5CS in vivo
Figura 10 - Atividade P5CR em extratos totais de Tritryps
Figura 11 - Caracterização das P5CRs em extratos totais de T. cruzi e L. amazonensis88
Figura 12 - Amplificações e clonagens da <i>TcP5CS</i> 90
Figura 13 - Amplificações e clonagens da <i>TcP5CR</i> 90
Figura 14 - Expressão das enzimas recombinantes TcP5CS e TcP5CR92
Figura 15 - Purificação das enzimas recombinantes TcP5CS e TcP5CR93
Figura 16 - Efeito das variações da concentração de P5C, do pH e da temperatura na atividade de TcP5CR-6xHis e parâmetros obtidos
Figura 17 - Caracterização da TcP5CR-6xHis em relação ao cofator NADPH96
Figura 18 - Análise dos soros policlonais obtidos por western blot
Figura 19 - Análise dos soros policionais anti-P5CS e anti-P5CR contra extratos proteicos totais de Tritryps
Figura 20 - Ensaio de permeabilização gradativa de epimastigotas com digitonina100
Figura 21 - Análise de imunofluorescência para TcP5CS em diferentes formas do <i>T. cruzi</i>
Figura 22 - Análise de imunofluorescência para TcP5CR em diferentes formas do <i>T. cruzi</i>
Figura 23 - Análise da expressão de TcP5CS e TcP5CR em diferentes formas do <i>T. cruzi</i>
Figura 24 - Verificação da saída de P5C mitocondrial

Figura 25 - Averiguação e caracterização inicial de <i>T. b. brucei</i> mutante de expressão heteróloga de TcP5CR
Figura 26 - Análise da capacidade de <i>T. b. brucei</i> transportar NAD(P)H108
Figura 27 – Resistência ao estresse nutricional de procíclicos Tb ^{P5CR+} na presença de NADPH
Figura 28 - Balanço do conteúdo de L-Pro em <i>T. cruzi</i> apenas entre os estágios encontrados no hospedeiro de mamífero117

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Representação do ciclo de vida do Trypanosoma cruzi	
Esquema 2 - Representação dos primeiros passos da via de biossíntese d de L-Glu	e L-Pro a partir 35
Esquema 3 - Representação da via de L-Pro em Trypanosoma cruzi	
Esquema 4 - Representação esquemática do metabolismo em <i>T. cruzi</i> qu principal fonte de carbono e energia em grande ou baixa disponibilidade	ando L-Pro é a 123

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Descrição das fontes de carbono e cofatores usados na recuper níveis intracelulares L-Pro	ação dos 43
Tabela 2 - Sequências de iniciadores utilizados neste trabalho	50
Tabela 3 - Caracterização da atividade P5CR em extartos proteicos de organismos	liferentes 113
Tabela 4 - Caracterização da atividade de P5CRs recombinantes de organismos	liferentes 114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

α-KG	α-Cetoglutarato
ASATm	Aspartato aminotransferase, isoforma mitocondrial
BAG	Tampão A com glicose
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
BrEt	Brometo de etídeo
BSA	Albumina de soro bovino
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DCPIP	Diclorofenolindofenol
DEPC	Dietilpirocarbonato
DL-P5C	Mistura racêmica do ácido Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato
DO	Densidade ótica
DTT	Ditiotreitol
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GK	γ-glutamil quinase
GPR	γ-glutamil fosfato redutase
GSA	Glutamato-y-semialdeído
Н	Higromicina
HQ	Hexoquinase
K _{cat} ^{app}	Constante catalítica aparente
K _M ^{app}	Constante de Michaelis-Menten aparente
LIT	Liver Infusion Tryptose
MES	2-N-morfolino ácido etano sulfônico
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
OAT	Ornitina aminotransferase
OCD	Ornitina ciclodeaminase
PBST	Solução salina tamponada + Tween-20

PEP	Fosfenolpiruvato
РК	Piruvato quinase
PMSF	Fluoreto de fenilmetilsulfonil
PRODH	Prolina desidrogenase
ProtParam	Protein Parameters
SFB	Soro fetal bovino
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
ТАТ	Tirosina aminotransferase
TCA	Ciclo dos ácidos tricarboxílicos
ТЕ	Tampão Tris-EDTA
TES	Tampão Tris-EDTA-SDS
TLCK	N-α-tosil-L-lisina clorometil cetona
V _{max} ^{app}	Velocidade máxima aparente

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	23
1.1 A doença de Chagas e outras doenças causadas por tripanossomatídeos2	24
1.2 Trypanosoma cruzi	27
1.3 Peculiaridades dos tripanossomatídeos	28
1.4 Metabolismo energético dos tripanossomatídeos2	29
1.4.1 Metabolismo aminoácidos	29
1.5 L-Pro: um aminoácido de múltiplas funções biológicas	31
1.5.1 Envolvimento da L-Pro em diversos processos biológicos e a participação de seu intermediário Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato	31
1.5.1 Transporte de L-Pro	34
1.5.2 Metabolismo de L-Pro	34
1.6 Objetivos	37
1.6.1 Objetivos gerais	37
1.6.2 Objetivos específicos	37
CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 Análise in silico das sequências putativas	39
2.2 Microorganismos utilizados e condições de crescimento	39
2.2.1 Célula hospedeira	39
2.2.2 Trypanosoma cruzi	39
2.2.2.1 Epimastigotas	39
2.2.2.2 Tripomastigotas metacíclicos	40
2.2.2.3 Formas intracelulares	40
2.2.2.4 Tripomastigotas	41
2.2.3 Trypanosoma brucei brucei	41
2.2.4 Leishmania amazonensis	41
2.2.5 Escherichia coli	42
2.3 Biossíntese de L-Pro in vivo	43
2.4 Manipulação de DNA	14

2.4.1 Extração de DNA genômico de T. cruzi	44
2.4.2 Dosagem de DNA	45
2.4.3 Verificação do tamanho e integridade de DNA	45
2.4.4 Reações de amplificações de fragmentos do DNA	45
2.4.5 Clonagem no vetor do tipo T: construção em pGEM T-Easy	46
2.4.6 Clonagem no vetor de extremidades cegas: construção em pJET1.2	47
2.4.7 Preparação de bactérias quimiocompetentes	47
2.4.8 Transformação de bactérias competentes	47
2.4.9 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-prep)	48
2.4.10 Construções pET28-TcP5CR e pET28-TcP5CS	48
2.4.11 Construção pLEW100-TcP5CR	49
2.4.12 Sequenciamento de DNA	49
2.5 Manipulação de RNA	51
2.5.1 Extração de RNA de tripanossomas	51
2.5.2 Síntese de cDNA	52
2.6 Manipulação de proteínas	52
2.6.1 Expressão e purificação da TcP5CR e TcP5CS produzidas em E. coli	52
2.6.2 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes (SDS-PAGE)	53
2.6.3 Obtenção de soros policlonais anti-TcP5CR e anti-TcP5CS	54
2.6.4 Preparação de extratos proteicos totais	55
2.6.4.1 A partir de tripanossomas	55
2.6.4.2 A partir de promastigotas	55
2.6.5 Western blot	56
2.7 Ensaios bioquímicos	57
2.7.1 Caracterização bioquímica da TcP5CR	57
2.7.1.1 Análise e caracterização da atividade P5CR em tripanossomatídeos	57
2.7.1.2 Determinação da K_M^{aap} e da eficiência catalítica para a TcP5CR recon em relação ao P5C.	<u>1binante</u> 58
2.7.1.3 Dependência do pH e especificidade de cofatores	58
2.7.1.4 Dependência da temperatura e energia de ativação	59
2.7.1.5 Efeito do cofator NADPH na catálise da TcP5CR	59
2.7.2 Outras atividades enzimáticas	64
2.7.2.1 Hexoquinase (HQ)	65
2.7.2.2 Piruvato guinase (PO)	65

<u>2.7.2.3 Δ¹-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH)</u>
2.7.2.4 Prolina desidrogenase (PRODH)
2.8 Determinação da localização sub-celular das enzimas TcP5CR e TcP5CS
2.8.1 Imunolocalização
2.8.2 Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina67
2.9 Avaliação funcional da TcP5CR na biologia de T. cruzi
2.9.1 Validação do papel de transidrogenase da via de biossíntese (a partir de P5C) e de degradação de L-Pro
2.9.1.1 Verificação da saída do intermediário da via, o P5C, a partir da mitocôndria em direção ao citosol celular
2.9.2 Obtenção e caracterização de procíclicos expressores da TcP5CR69
2.9.3 Caracterização da resistência ao estresse nutriconal de parasitas expressores da TcP5CR
2.9.3.1 Verificação do transporte de NAD(P)H ao interior de procíclicos de T. b. brucei.70
2.9.3.2 Ensaio de viabilidade celular

CAPÍTULO 3: RESULTADOS	72
3.1 Busca <i>in silico</i> dos genes putativos envolvidos na biossíntese de L-Pro em <i>T. cruzi</i>	73
3.1.1 Identificação das sequências codificantes para a TcP5CS	73
3.1.2 Identificação das sequências codificantes para a TcP5CR	79
3.2 Avaliação da via de biossíntese de L-Pro em Tritryps	83
3.2.1 Diferenças metabólicas na biossíntese de L-Pro em Tritryps	83
3.2.2 Busca da atividade P5CS em <u>T. cruzi</u>	85
3.2.3 Verificação e caracterização da atividade P5CR em Tritryps	86
3.3 Identificação e clonagem dos genes putativos envolvidos na biossíntese de Pro em Trypanosoma cruzi	L- 89
3.3.1 Obtenção da fase de leitura aberta para TcP5CS e sua clonagem	89
3.3.2 Obtenção da fase de leitura aberta para TcP5CR e sua clonagem	89
3.4 Expressão e purificação das TcP5CS e TcP5CR recombinantes	91
3.5 Caracterização bioquímica da TcP5CR recombinante	93
3.5.1 Determinação dos parâmetros cinéticos e bioquímicos em relação ao substr P5C para TcP5CR-6xHis	<i>ato</i> 93
3.5.2 Influência do cofator/co-substrato na atividade de TcP5CR-6xHis	94

3.6 Localização subcelular e expressão de TcP5CS e TcP5CR nas diferentes formas de <i>T. cruzi</i>
3.6.1 Especilidade de soros policlonais anti-TcP5CS e anti-TcP5CR97
3.6.2 As enzimas TcP5CS e TcP5CR estão no citoplasma de <u>T. cruzi</u>
3.6.3 As enzimas TcP5CS e TcP5CR são mais expressas nas formas presentes no hospedeiro invertebrado
3.7 Avaliação funcional da TcP5CR na biologia de <i>T. cruzi</i>
3.7.1 Capacidade de P5C atravessa a membrana mitocondrial em direção ao citoplasma
<i>3.7.2 Obtenção de linhagem celular de <u>T. b. brucei</u> capaz de produzir L-Pro105</i>
3.7.3 Avaliação da resistência ao estresse nutricional dos parasitas Tb^{P5CR+} 106
3.7.3.1 Verificação do transporte de NAD(P)H pelo T. b. brucei
3 <u>.7.3.2</u> Análise da resistência ao estresse nutricional na presença ou não de NAD(P)H de parasitas Tb ^{P5CR+}

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO	110
4.1 Diferenças na via de biossíntese de L-Pro dentre os Tritryps	111
4.2 Caracterização bioquímica da P5CR T. cruzi	113
4.3 Avaliação da localização celular e expressão de TcP5CS e T diferentes estágios do parasita	C cP5CR em 115
4.4 A via de biossíntese de L-Pro e a disponibilidade de nutrientes entre do inseto de Tritryps	e as formas 118
4.5 Existência de um ciclo L-Pro/P5C envolvendo o citoplasma e a mit T. cruzi	ocôndria de 120
CONCLUSÕES	125
REFERÊNCIAS	126

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 A doença de Chagas e outras doenças causadas por tripanossomatídeos

Uma das principais doenças negligenciadas na América Latina é a doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana. Esta doença é uma infecção crônica sistêmica parasitária, causada pelo *Trypanosoma cruzi*. Este microorganismo é um protozoário hemático pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, foi descoberto há mais de 100 anos pelo pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas na cidade de Lassance (MG) (CHAGAS, 1909). Estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi*, distribuidas em uma região endêmica que se estende desde o sul da Argentina e o Chile até o sul dos Estados Unidos (figura 1) (PEREZ-MOLINA; MOLINA, 2017; WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 2017). Nas últimas décadas, o número de casos em regiões não endêmicas, como Europa, Canadá, Japão e Austrália, aumentou devido ao fluxo de imigrantes infectados desde as regiões endêmicas (BERN; MONTGOMERY, 2009; GASCON; BERN; PINAZO, 2010; RASSI; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012).

Predominantemente, o T. cruzi é transmitido vetorialmente aos seres humanos e animais (domésticos e silvestres), através de dejetos infectados de insetos hematófagos pertencentes à família Reduviidae (subfamília Triatominae). As espécies de triatomíneos de importância na transmissão vetorial humana são Triatoma infestans, Rhodnius prolixus, T. dimidiata, Panstrongylus megistus e T. brasiliensis (WHO, 2002). Uma série de iniciativas multinacionais, tais como controle da transmissão vetorial e a otimização das rotinas de diagnóstico de doadores em bancos de sangue, apoiadas pela Organização Pan-Americana da Saúde reduziram substancialmente a transmição da Doença de Chagas. As infecções causadas por T. infestans (em Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai), e por R. prolixus (na América Central) foram reduzidas; assim como, o risco da transmissão por transfusão sanguínea através de triagem de doadores de sangue (DIAS; SILVEIRA; SCHOFIELD, 2002; MONCAYO, 2003). Outras formas de transmissão não vetoriais ocorrem por transplante de órgãos proveniente de pacientes infectados (KRANSDORF; ZAKOWSKI; KOBASHIGAWA, 2014), via placentária (de mãe a filho) (MARTINS-MELO et al., 2014; TORRICO et al., 2004) e via oral, através da ingestão de alimentos contaminados (ROBERTSON et al., 2016; RUEDA et al., 2014).



Figura 1 - Distribuição global do número de casos da infecção pelo *T. cruzi* e de ocorrência da transmissão vetorial.

Baseado em estimativas oficiais de infecção e transmissão vetorial entre 2006 a 2009 a *World Health Organization* (WHO) obteve um panorama global sobre o número de casos de infecção pelo *T. cruzi* por país e sobre a presença ou não da transmissão vetorial (WHO, 2010).

A doença de Chagas apresenta duas fases: a aguda de curta duração (de 4 a 8 semanas), e a crônica que perdura durante toda a vida do paciente. A fase aguda é caracterizada pela alta parasitemia e ausência de anticorpos específicos. Geralmente essa fase é assintomática. Eventualmente, alguns sintomas inespecíficos podem aparecer, tais como dores de cabeça, náuseas ou febre, dificultando o diagnóstico (RASSI et al., 2012; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010). Na maioria dos casos a doença progride para a fase crônica, na qual a parasitemia apresenta-se diminuída ou indetectável. Cerca de 70% dos pacientes chagásicos apresentam a forma indeterminada (assintomática e sem dano tissular evidente) (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006). Os pacientes remanescentes desenvolvem alguma das formas sintomáticas, apresentando manifestações clínicas de diferentes graus de severidade. As manifestações clínicas mais comuns são a cardiomiopatia chagásica crônica, que pode resultar no óbito, e as chamadas "megas", alterações gastrointestinais como megacólon e megaesôfago,

ocasionando respectivamente constipação e retenção fecal; e disfagia e regurgitação (BOSCARDIN et al., 2010; PUNUKOLLU et al., 2007).

Embora a doença tenha sido relatada pela primeira vez há mais de um século, a quimioterapia disponível para a Doença de Chagas baseia-se nos mesmos medicamentos registrados há cerca de 40 anos: o Nifurtimox e Benzonidazol. Ambos compostos mostram efeitos secundários devido à sua toxicidade nos pacientes, são ativos principalmente na fase aguda da doença e apresentam eficiência discutível na fase crônica (APT; ZULANTAY, 2011; CANCADO, 2002; URBINA, 2010). Consequentemente, torna-se indispensável aprofundar o conhecimento disponível sobre a biologia do parasita, a fim de identificar novos alvos terapêuticos para desenvolver fármacos que permitam um tratamento mais eficaz da doença.

Há outras duas doenças negligenciadas causadas por tripanossomatídeos e que também são carentes de tratamentos eficientes:

i. Leishmaniose: é um conjunto de doenças causada por parasitas do gênero *Leishmania* spp. Essas doenças desenvolvem diferentes manifestações clínicas de acordo com o local da infecção nos tecidos de mamíferos e com a espécie que a causa, podendo então, ser classificada como: leishmaniose visceral, cutânea, cutânea difusa ou mucocutânea (AKHOUNDI et al., 2016). Pode ser transmitida por 98 espécies do inseto flebotomíneo dos gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia*, através do repasto sanguíneo quando estes estão infectados (MAROLI et al., 2013). Vários continentes são afetados pela leishmaniose como o sudeste da Ásia, o leste e o norte da África a bacia do Mediterrâneo e o continente americano.

ii. Tripanosomiase africana humana: é uma doença endêmica na África Subsaariana causada por duas subespécies de *Trypanosoma brucei*: *T. b. gambiense* e *T. b. rhodesiense* (PEPIN; MEDA, 2001). Além das subespécies de tripanossoma mencionadas, o estudo de outras subespécies de *T. brucei* como *T. brucei brucei*, e do *T. congolense* e *T. vivax* é considerado relevante já que afetam negativamente a economia da África, em particular o desenvolvimento da agricultura, ao causar a doença do gado denominada Nagana (tripanossomíase animal africana) (STEVERDING, 2008). Dado que todas essas espécies de tripanossomas são transmitidas pelos mesmos vetores (a mosca tsé-tsé, do gênero *Glossina* spp.) e causam uma zoonose, a Nagana, (BARRETT et al., 2003; GIORDANI et al., 2016) estão sendo abordadas sob o conceito *One Health* que preconiza uma abordagem integrada das infecções que afetam a saúde humana e animal (WHO, 2017).

1.2 Trypanosoma cruzi

O ciclo de vida de *T. cruzi*, assim como os de a *Leishmania* spp. e de *T. b. brucei*, são digenéticos, alternando entre um hospedeiro vertebrado mamífero e um hospedeiro invertebrado. Além disso, são ciclos complexos, dado que se caracterizam por distintos estágios de desenvolvimento. No caso de *T. cruzi*, com base em critérios morfológicos e moleculares, são descritos no tubo digestivo do inseto vetor os epimastigota (forma não infectiva, flagelada e replicativa) e os tripomastigotas metacíclicos (forma infectiva e não replicativa). Já no hospedeiro vertebrado encontram-se as formas amastigota (forma replicativa e flagelada presente na circulação sanguíneos (forma infectiva, não replicativa e flagelada presente na circulação sanguínea de mamíferos) (BRENER, 1973; TYLER; ENGMAN, 2001). Outra forma intracelular transiente entre os estágios amastigota e tripomastigota também foi descrita, e por apresentar semelhanças morfológicas e bioquímicas com o epimastigota, foi denominada epimastigota intracelular (ALMEIDA-DE-FARIA et al., 1999; ELIAS et al., 2007; TYLER; ENGMAN, 2001).

Durante o repasto sanguíneo de um triatomíneo infectado, os tripomastigotas metacíclicos, que estão na porção final do intestino, são depositados na pele do hospedeiro vertebrado juntamente com as fezes e a urina do inseto. Essas formas infectivas internalizam no hospedeiro através das mucosas ou via descontinuidades da pele, e entram em contato com diferentes tipos de células hospedeiras. O processo de invasão então se inicia mediante a adesão do parasita à superfície celular. Posteriormente, ocorre a internalização do parasita, processo que envolve a formação de um vacúolo parasitóforo. O pH ácido do vacúolo parasitóforo inicia o processo de diferenciação dos tripomastigotas em amastigotas, que são capazes de evadir do vacúolo para o citoplasma da célula. No citoplasma os parasitas se multiplicam por fissão binária, se diferenciam para as formas infectivas tripomastigotas, passando pelo estágio transiente epimastigota intracelular. Uma vez liberados das células, os tripomastigotas alcançam a corrente sanguínea, podendo invadir novas células ou ser ingeridas por um

inseto através do repasto sanguíneo. Na região anterior do tubo digestivo do inseto, os tripomastigotas se diferenciam a epimastigotas, os quais quando chegam ao intestino médio se multiplicam. Na porção final do intestino, os epimastigotas aderem às células epiteliais e sofrem a metaciclogênese, o processo de diferenciação celular dos epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). O ciclo se encerra quando essas formas são depositas pelo inseto vetor durante outro repasto sanguíneo em um novo hospedeiro mamífero (esquema 1) (BRENER, 1971; SAMBROOK; RUSSELL, 2001. 3 v.; TYLER; ENGMAN, 2001).



Esquema 1- Representação do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.

As principais formas do parasita presentes no hospedeiro vertebrado mamífero: amastigota (A), epimastigota intracelular (Ei) e tripomastigota sanguíneo (T) e no inseto vetor: epimastigota (E) e tripomastigota metacíclico (M). Figura adaptada de (PAES, L. S. et al., 2011).

1.3 Peculiaridades dos tripanossomatídeos

A biologia celular dos tripanossomatídeos apresenta processos únicos como, por exemplo, a atípica expressão gênica caracterizada pela transcrição policistrônica, maturação do mRNA por *trans-splicing*, edição de RNA mitocondrial (STUART et al., 2005; VANHAMME; PAYS, 1995) e a compartimentalização das primeiras enzimas da via glicolítica em peroxissomos especializados e denominados de glicossomos (MICHELS et al., 2006; OPPERDOES, 1987; TAYLOR; GUTTERIDGE, 1987).

Também em relação a organelas peculiares, os tripanossomatídeos contêm um única mitocôndria por célula que, por si só, também apresenta várias peculiaridades. A mitocôndria pode ocupar aproximadamente até 12% do volume celular (FIDALGO; GILLE, 2011), e estende-se ao longo do parasita. Ainda possui uma estrutura peculiar denominada cinetoplasto, que contém o genoma mitocondrial, organizado em moléculas denominadas maxicírculos e minicírculos (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009; RIOU; DELAIN, 1969a;1969b). Diferente das mitocôndrias típicas dos eucariotas, que contém os quatro complexos clássicos que sustentam funcionalmente a cadeia transportadora de elétrons (CTE), as dos tripanossomatídeos, possuem os complexos C-II a C-IV plenamente funcionais, enquanto que o C-I parece ter uma funcionalidade limitada devido à ausência de algumas subunidades (CARRANZA et al., 2009; MARTINS et al., 2009; OPPERDOES; MICHELS, 2008).

1.4 Metabolismo energético dos tripanossomatídeos

Devido à variedade de ambientes que os tripanossomatídeos se encontram em seus complexos ciclo de vida, alternando entre o hospedeiro vertebrado e invertebrado, esses parasitas desenvolveram a capacidade de catabolizar carboidratos, aminoácidos e lipídeos como fontes de carbono e energia (BRINGAUD; RIVIERE; COUSTOU, 2006; CAZZULO, 1992; TIELENS; VAN HELLEMOND, 2009). Devido a que a glicose nem sempre está disponível nos ambientes pelos quais o parasita circula, o consumo de fontes alternativas de energia por estes organismos deve ser considerado. Nesse sentido, o metabolismo de L-prolina (L-Pro) tem mostrado ser extremamente relevante para a biologia destes parasitas, seja através de processos que demandam ATP (cuja síntese a prolina é capaz de sustentar) ou através de processos nos quais o aminoácido poderia ter uma intervenção direta na bioenergética (BRINGAUD; BARRETT; ZILBERSTEIN, 2012; PAES, L. S. et al., 2011; SILBER et al., 2005)

1.4.1 Metabolismo de aminoácidos

No intestino do hospedeiro invertebrado, os parasitas se defrontam com um ambiente pobre em glicose, porém, rico em aminoácidos originados da degradação de proteínas (STERKEL et al., 2017). Dentre esses aminoácidos, a L-Pro constitue em maior abundância (BALOGUN, 1974). Também no interior das células de mamíferos o *T. cruzi* e *Leishmania* spp. se deparam com um ambiente carente de glicose, onde aminoácidos estão disponíveis para serem utilizados, principalmente L-glutamina (L-Gln) e L-Pro (SILBER et al., 2009; TIELENS; VAN HELLEMOND, 1998;2009). As formas procíclicas do *T. b. brucei* além da L-Pro são capazes de catabolizar a L-treonina (L-Thr) (CROSS; KLEIN; LINSTEAD, 1975; VAN WEELDEN et al., 2003). Por sua vez, *T. cruzi* e *Leishmania* spp. apresentam maior flexibilidade, sendo capazes de catabolizar um leque maior de aminoácidos (BRINGAUD et al., 2012). A partir de L-Pro, L-Thr, L-glutamato (L-Glu), L-Gln, L-aspartato (L-Asp), L-asparagina (L-Asn), L-alanina (L-Ala), L-serina (L-Ser), L-glicina (L-Gly), aminoácidos ramificados e L-cisteína (L-Cys), as *Leishmania* spp. podem gerar intermediários do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) (OPPERDOES; COOMBS, 2007).

Em *T. cruzi*, principal foco de estudo deste trabalho, inicialmente foi demonstrado que L-Pro, L-Glu, L-Gln, L-Asp, L-Asn, L-Isoleucina (L-Ile) e L-leucina (L-Leu) são capazes de produzir um aumento significativo do consumo de O₂, podendose inferir seu metabolismo mitocondrial (MANCILLA; NAQUIRA; LANAS, 1967; SYLVESTER; KRASSNER, 1976; ZELEDON, 1960). Presume-se que alguns desses aminoácidos utilizados pelo *T. cruzi* sejam convertidos a L-Glu e/ou L-Asp, funcionando como precursores dos intermediários do TCA (SILBER et al., 2005). O L-Glu pode gerar α -cetoglutarato (α -KG) através de quatro enzimas: pode ser desaminado por umas das isoformas da glutamato desidrogenase, com formação de amônia (CAZZULO; JUAN; SEGURA, 1977; JUAN; SEGURA; CAZZULO, 1978), pode ser desaminado reversivelmente por transaminação via as enzimas alanina, tirosina ou aspartato transaminases, produzindo α -KG, e o aminoácido correspondente ao cetoácido aceptor (mais frequentemente piruvato ou oxalacetato, que rendem a formação de alanina e aspartato respectivamente) (NOWICKI; CAZZULO, 2008; ZELADA et al., 1996).

Recentemente, o nosso grupo demonstrou que os epimastigotas de *T. cruzi* transportam L-histidina (L-His) e a catabolizam a L-Glu produzindo energia via OxPHOS (BARISON et al., 2016). Também, a oxidação da L-Pro a L-Glu descrita inicialmente por Sylvester e colaboradores (SYLVESTER; KRASSNER, 1976) foi caracterizada com detalhe em nosso laboratório. Sabe-se que, além de render o α -KG via desaminação de L-Glu, gera equivalentes reduzidos que abastecem a CTE. O

primeiro passo da oxidação de L-Pro, rende FADH₂, que fornece elétrons para o *pool* de Ubiquinona (PAES, L. S. et al., 2013). NADH também é gerado no segundo passo enzimático da conversão de L-Pro a L-Glu e L-Glu a α -KG. Foi provado recentemente que o NADH produzido pode também alimentar a cadeia respiratória, apesar do CI não ser funcional, sustentando a produção de ATP via OxPHOS (MANTILLA et al., 2015).

Um aminoácido metabólicamente relacionado com a via L-Pro – L-Glu é a Larginina (L-Arg). Interessantemente, em *T. cruzi* e *T. b. brucei* a L-Arg funciona como um fosfagênio através da arginina quinase, de maneira análoga a creatina quinase presente em mamíferos (PEREIRA et al., 2000; PEREIRA et al., 2002). Desta forma, através da sua capacidade de armazenar fosfatos ligados por uniões de alta energia, esse aminoácido está envolvido na administração dos recursos energéticos da célula. A presença dessa regulação energética contribui com a plasticidade do metabolismo adquirida por esses parasitas, que é funcional devido aos diferentes ambientes nos quais acontecem seus ciclos de vida (PEREIRA et al., 2011). Foi observado que em tripanossomatídeos, a ausência da arginina quinase está correlacionada com a presença da arginase. Este é o caso para o gênero *Leishmania*. Sabe-se que essas enzimas não tem uma função compensatória uma da outra (PEREIRA, 2014).

Uma das funções que foi atribuida à arginase em *Leishmania* spp. está relacionada ao estabelecimento e continuidade da infecção exercida pelo parasita na célula hospedeira mediante o sequestro de arginina, substrato da NO sintase. Macrófagos infectados com *L. mexicana* noucautes para arginase produzem mais NO do que aqueles que estão infectados com linhagens selvagens (DA SILVA; FLOETER-WINTER, 2014; GAUR et al., 2007).

1.5 L-Pro: um aminoácido de múltiplas funções biológicas

1.5.1 Envolvimento da L-Pro em diversos processos biológicos e a participação de seu intermediário Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato

Vimos que a L-Pro é um substrato importante como fonte de energia e carbono nas formas do inseto de tripanossomatídeos, devido à capacidade dos parasitas em catabolizar L-Pro, podendo funcionar como combustível para a produção de ATP mediante OxPHOS. Interessantemente, esse aminoácido constitui a principal fonte de energia nas células do músculo das asas dos dípteros que se alimentam obrigatoriamente de sangue como, por exemplo, a tsetse (BURSELL, 1975). Também foi demonstrada a presença de L-Pro em grande quantidade na hemolinfa de insetos como a tsetse e o mosquito *Aedes aegypti* (BURSELL, 1981; SCARAFFIA; WELLS, 2003).

Em vários organismos, incluindo fungos, bactérias, plantas e células de mamíferos a L-Pro está envolvida na homeostase redox das células (CHEN; DICKMAN, 2005; KRISHNAN; BECKER, 2006; KRISHNAN; DICKMAN; BECKER, 2008; YANG; LAN; GONG, 2009). No nosso laboratório, também foi demonstrado que a diminuição do conteúdo de L-Pro em T. cruzi através da inibição de seu transporte pelo seu análogo, o ácido L-tiazolidina-4-carboxílico (T4C), aumenta a sensibilidade do parasita ao estresse oxidativo, mostrando que o acúmulo de L-Pro relaciona-se com a resistência do parasita a esse tipo de estresse (MAGDALENO et al., PAES, L. S. et al., 2013). Em concordância, a superexpressão de um 2009; transportador de L-Pro, conferiu seu acúmulo como esperado, assim como uma resistência maior a espécies reativas de oxigênio (SAYE et al., 2014). Ainda em distintos organismos, mas principalmente em plantas, a L-Pro exerce resistência em resposta a diferentes estresses bióticos e abióticos (SZABADOS; SAVOURE, 2010). Em T. cruzi, esse aminoácido também participa na regulação do volume celular juntamente com outros, como L-Glu, L-Gly e L-Ala, e constitui parte de um mecanismo de resistência ao estresse osmótico (ROHLOFF; DOCAMPO, 2008).

Conjuntamente, a importância da L-Pro durante o ciclo de vida do parasita é evidenciada em distintos processos de diferenciação e infecção. Esse aminoácido e/ou os intermediários envolvidos no seu metabolismo induzem a metaciclogênese (CONTRERAS et al., 1985). Ademais, mostrou-se que a L-Pro participa na diferenciação das formas epimastigotas intracelulares a tripomastigotas que ocorre no interior da célula de mamíferos (TONELLI et al., 2004), e é um metabólito altamente consumido pelos epimastigotas intracelulares (PAES, L. S. et al., 2013). Mais recentemente, foi demonstrado que tanto a L-Pro quanto o intermediário do seu metabolismo, a Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C), sustentam energeticamente a invasão celular do parasita nas células do hospedeiro vertebrado (MANTILLA et al., 2015; MARTINS et al., 2009), uma vez que esse processo é dependente de ATP

(SCHENKMAN; ROBBINS; NUSSENZWEIG, 1991). Em relação a outros tripanossomatídeos, sabe-se que a L-Pro juntamente com a L-Gln estão envolvidas na diferenciação dos tripomastigotas metacíclicos de *T. congolense* (ROSS, 1987).

Por último, nas células de músculo de voo de insetos foi proposto que a interconversão entre L-Pro e P5C atuaria como um mecanismo de transferência de poder redox entre o citoplasma e a mitocôndria, uma vez que, a redução de P5C no citoplasma com a concomitante oxidação do cofator/co-substrato NADH formaria L-Pro que, se internalizaria na mitocôndria, para ser reoxidada, rendendo novamente P5C (BALBONI, 1978). Posteriormente, Phang e colaboradores também propuseram o ciclo L-Pro/P5C entre o citoplasma e a mitocôndria, sobre a base de experimentos utilizando extrato de eritrócitos como fonte de P5CR, e mitocôndrias de fígado isoladas. Esses autores mostraram também que o ciclo poderia estar ligado à via das pentoses fosfato ao fornecer NADPH (HAGEDORN; PHANG, 1983). Em um trabalho posterior, propuseram que esse ciclo também poderia regular a concentração de NADP⁺ citosólico que, então em alta concentração, o NADP⁺ abasteceria a síntese de ribose-5-fosfato e consequentemente a síntese de nucleotídeos (HAGEDORN; PHANG, 1986). Mais recente, o ciclo L-Pro/P5C entre a mitocôndria e o citoplasma também foi proposto em plantas como uma forma de manter a L-Pro em níveis mais altos, e o P5C mais baixos (MILLER et al., 2009). Todos esses ciclos descritos na literatura supõem a saída do P5C mitocondrial, o que nunca foi mostrado. Portanto, apesar dessas propostas estarem embasadas em dados experimentais, permanecem ainda em um estado especulativo.

Em vários estágios do ciclo de vida do *T. cruzi* o catabolismo de L-Pro é relevante para produção de energia (MANTILLA et al., 2015; PAES, L. S. et al., 2013). Diante do exposto, a degradação desse aminoácido juntamente com sua biossíntese (ou seja, a existência de um ciclo L-Pro/P5C) também poderia atuar como um mecanismo de transferência de poder redox entre os compartimentos onde as duas enzimas se localizem (caso sejam diferentes) e entre os cofatores/co-substratos que participem de cada reação em *T. cruzi*. Neste último caso, um ciclo desse tipo poderia estar funcionando como uma transidrogenase, o que poderia ter grande relevância na bioenergética do parasita, uma vez que o mesmo parece não ter transidrogenases.

1.5.2 Transporte de L-Pro

O transporte de L-Pro foi caracterizado nos três tripanossomatídeos. Existe um único transportador ativo de L-Pro em *T. b. brucei*, relativamente específico, pois L-Ala e L-Cys podem também ser substrato (L'HOSTIS; GEINDRE; DESHUSSES, 1993). Em *L. donovani* o transporte é realizado por três sistemas, dos quais dois deles são promastigota-específico: o sistema A que apresenta baixa afinidade e especificidade e é cátion dependente e o sistema B que é mais seletivo e cátion independente. O terceiro o sistema C é amastigota-específico e cátion independente (MAZAREB; FU; ZILBERSTEIN, 1999). Similarmente, o *T. cruzi* possui dois sistemas de transporte ativo de L-pro: o sistema A de alta afinidade e de baixa capacidade e dependente do gradiente de H⁺ da membrana plasmática e o sistema B de baixa afinidade e alta capacidade e dependente da hidrólise direta de ATP como fonte de energia (SILBER et al., 2002). Em estudos recentes, foi super-expresso e caracterizado o transportador de L-Pro TcAAAP069, e sugere que os dois sistemas A e B são realizados por esse transportador de acordo com as condições extracelulares (SAYE et al., 2014).

1.5.3 Metabolismo de L-Pro

Detalhadamente, a já citada oxidação da L-Pro inicia-se via prolina desidrogenase (PRODH, EC: 1.5.99.8) também denominada de prolina oxidase (POX), que produz P5C ao utilizar FAD como aceptor de elétrons. Assim como em outros organismos a PRODH de *T. cruzi* (TcPRODH) se localiza na matriz mitocondrial. Sua atividade está ligada a síntese de ATP, através da transferência elétrons à cadeia respiratória ao nível do C-II (PAES, L. S. et al., 2013). O P5C produzido é espontaneamente convertido a sua forma aberta glutamato- γ -semialdeído (GSA), coexistindo as duas formas de acordo com a constante de equilíbrio em meio aquoso (K = 2,2 x 10⁷) (MANTILLA et al., 2015). Por sua vez, o GSA é substrato da segunda enzima do catabolismo de L-Pro, a P5C desidrogenase (P5CDH, EC: 1.5.1.12) que o oxida a L-Glu em uma reação dependente de NAD(P)⁺ na membrana interna da mitocôndria, com o sítio catalítico provavelmente voltado à matriz em *T. cruzi* (MANTILLA et al., 2015).

Além do transporte, a L-Pro pode ser obtida pela biossíntese na maioria dos organismos. A via de biossíntese mais comum ocorre a partir de L-Glu através de sua fosforilação a y-glutamil fosfato pela y-glutamil quinase (GK, EC 2.7.2.11), transferindo grupo fosforil do ATP para o L-Glu. Em seguida, o y-glutamil fosfato é reduzido a GSA pela y-glutamil fosfato redutase (GPR, EC 1.2.1.41), com a simultânea oxidação de NADPH (CSONKA; LEISINGER, 2007). Em plantas vasculares, animais e micróbios eucariontes as enzimas GK e GPR são fusionadas em um único polipeptídeo, formando a enzima bifuncional P5C sintase (P5CS, EC não atribuído) que catalisa então os dois passos a seguir (HU et al., 1999; TURCHETTO-ZOLET; MARGIS-PINHEIRO; MARGIS, 2009):

Esquema 2- Representação dos primeiros passos da via de biossíntese de L-Pro a partir de L-Glu.



A conversão de L-Glu ao intermediário GSA via as enzimas y-glutamil quinase (EC 2.7.2.11) e y-glutamil fosfato redutase (EC 1.2.1.41). Figura adaptada de (SCHEER et al., 2011).

Após a ciclização do GSA, o P5C formado serve de substrato a P5C redutase (P5CR, EC 1.5.1.2) que finalmente reduz o P5C à L-Pro, utilizando o NADPH como doador de elétrons (YURA; VOGEL, 1959).


Esquema 3- Representação da via de L-Pro em *Trypanosoma cruzi*.

Em *T. cruzi* o metabolismo de L-prolina não sofre ramificações, uma vez que não é identificada a ornitina aminotransferase (OAT, EC 2.6.1.13). Ocorre então a interconversão entre L-prolina e L-glutamato via as enzimas: Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintase (P5CS, EC não atribuído, mas aqui representado como 2.7.2.11 da γ -glutamil quinase e 1.2.1.41 da γ -glutamil fosfato redutase), Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR, EC 1.5.1.2), prolina desidroenase (PRODH, EC 1.5.99.8) e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH, EC 1.5.1.12). As setas pontilhadas indicam reações não enzimáticas.

A via de biossíntese pode estar conectada ao metabolismo de L-Arg, do qual L-Pro pode ser produzido também a partir de L-ornitina (L-Orn). A ornitina aminotransferase (OAT, EC 2.6.1.13) através de sua catálise reversível pode fornecer GSA e L-Glu ao transferir o grupo amino da L-Orn a 2-oxoglutarato na dependência de piridoxal-5-fosfato (DELAUNEY et al., 1993). Ao menos em plantas, por exemplo, a rota via OAT contribui menos à produção de GSA/P5C em condições normais, porém aumenta em condições de estresse (RHODES; HANDA; BRESSAN, 1986; ROOSENS et al., 1998).

Nos tripanossomatídeos o ciclo da ureia não parece ser funcional (YOSHIDA; CAMARGO, 1978). Em concordância, também não há nenhuma evidência bioquímica da enzima OAT, assim como não foram detectados os genes putativos de codificação para tal enzima. Ainda, Bringaud e colaboradores discutem que não há indicação que a L-Pro seja um precursor para a biossíntese de poliaminas em tripanossomídeos, (BRINGAUD et al., 2012). Diante de tudo isso, afirma-se que o metabolismo de L-Pro em *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos não está interligado ao metabolismo da arginina. No genoma de *T. cruzi* constam fases abertas de leitura putativas para as enzimas de biossíntese de L-Pro a partir de L-Glu: P5CS (código de acesso: Tc00.1047053509067.70, Tc00.1047053511023.10 e Tc00.1047053503749.5) e P5CR (nome sistemático: Tc00.1047053506857.20 e Tc00.1047053509207.90) na base de dados *TRITRYPDB*. Segundo todos os dados citados nesse estudo, incluindo a caracterização do catabolismo de L-Pro, seu metabolismo em *T. cruzi* é representado no esquema 3.

Portanto, diante da relevância da L-Pro no metabolismo e biologia do *T. cruzi*, e de outros tripanossomatídeos como já mencionado, somado ao fato de não haver nenhum trabalho que descreva essa biossíntese, torna-se interessante o seu estudo.

1.6 Objetivos

1.6.1 Objetivo gerais

Caracterizar a biossíntese de L-Pro nos tripanossomatídeos com foco nas enzimas Δ -pirrolina-5-carboxilato redutase e Δ -pirrolina-5-carboxilato sintase e seu papel biológico em *T. cruzi*.

1.6.2 Objetivo específicos

- a. Analisar a biossíntese de L-prolina *in vivo* nos tripanossomatídeos.
- b. Caracterizar os genes putativos das enzimas TcP5CR e TcP5CS de *T. cruzi*. e sua bioquímica.
- c. Avaliar o papel funcional da possível biossíntese de L-Pro no parasita.

CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análise in silico das sequências putativas

De acordo com relatos na literatura (BRINGAUD et al., 2012), buscaram-se sequências putativas para as enzimas P5CR e P5CS no genoma de *T. cruzi*, através da base de dados de tripanossomatídeos *TRITRYPDB* (ASLETT et al., 2010). A identidade das respectivas sequências de aminoácidos encontradas e homólogas presentes em outros organismos foram comparadas utilizando a ferramenta CLUSTAL Ômega (SIEVERS et al., 2011) e os resíduos conservados foram destacados com o uso da ferramenta ESPript 3.0 (ROBERT; GOUET, 2014). Nessas duas análises foram utilizadas as especificações padrões dos programas. Os domínios conservados foram buscados na base de dados INTERPROSCAN (JONES et al., 2014). Por último, parâmetros tais quais: ponto isoelétrico, peso molecular e composição de aminoácidos foram preditos via a ferramenta do *ProtParam* (GASTEIGER et al., 2005).

2.2 Microorganismos utilizados e condições de crescimento

2.2.1 Célula hospedeira

Células aderentes de uma linhagem celular de *Chinese hamster ovary* (CHO-K₁) foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Maria Julia Manso Alves (Universidade de São Paulo) e mantidas a 37 °C em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (SFB) (VitrocellTM) e acrescido de 0,15% NaCO₃, sob atmosfera úmida de 5% CO₂.

2.2.2 Trypanosoma cruzi

Neste trabalho foram utilizadas diferentes formas da cepa *T. cruzi* CL, clone 14 (BRENER; CHIARI, 1963).

2.2.2.1 Epimastigotas

As formas epimastigotas foram mantidas a 28 °C em fase exponencial de crescimento por sucessivas diluições a cada 48 h utilizando o meio LIT (*Liver Infusion*

Tryptose). Esse meio contém: 5 g/L de infusão de fígado, 4 g/L de cloreto de sódio, 0,4 g/L de cloreto de potássio, 8 g/L de NaH₂PO₄, 2 g/L de glicose e 10 g/L de hemina dissolvida em 100 mM de NaOH, pH ajustado a 7,2 e é suplementado com 10% de SFB (v/v) (VitrocellTM) (CAMARGO, 1964).

2.2.2.2 Tripomastigotas metacíclicos

Para a metaciclogênese, epimastigotas em fase estacionária de crescimento foram incubados em meio TAU puro (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM tampão fosfato pH 6,0) em uma densidade de 5 x 10⁷ parasitas/mL por 2 h a 28 °C. Após esse período os parasitas foram transferidos a TAU-3AAG, consistindo em TAU puro suplementado com 2 mM L-aspartato, 50 mM L-glutamato, 10 mM Lprolina e 10 mM de glicose, e incubados por sete dias a 28 °C (CONTRERAS et al., 1985). As formas metacíclicas foram purificadas via cromatografia de troca iônica através do uso da resina DEAE-celulose (Sigma[®]) (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986). A fim disso, os parasitas foram lavados duas vezes com tampão salino (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄), pH ajustado a 8,0 e suplementado com 2% de glicose (PSG) e adicionados à resina previamente equilibrada com PSG, 5x o volume de coluna. Então, os parasitas foram eluídos em frações de 2 mL e a pureza de metacíclicos foi verificada por contagem em câmara de Neubauer.

2.2.2.3 Formas intracelulares

Amastigotas e epimastigotas intracelulares foram obtidos após o segundo e quarto dia de infecção sincrônica em CHO-K₁, respectivamente (TONELLI et al., 2004). A fim de extrair os parasitas, as células foram lisadas com a adição 0,05% dodecil sulfato de sódio (SDS) (p/v) (2,5 mL). A ruptura das células foi acompanhada por microscopia de luz e assim que verificada a lise celular adicionou-se 10% de SFB (v/v) (3 mL). Então a suspensão celular foi diluída ao acrescentar mais 5 mL de 10% de SFB (v/v) e centrifugada a 115 g por 10 min para eliminar os resíduos das células. O sobrenadante foi transferido a um novo tubo e centrifugado novamente (2900 g durante 10 min). O sedimento foi ressuspenso em PBS com 10% de SFB (v/v) e contado em câmara de Neubauer para verificar a pureza dos parasitas obtidos.

Conforme descrito por Tonelli et al. (2004) os tripomastigotas foram coletados do sobrenadantes de garrafas após o quinto dia de infecção, tempo suficiente para o parasita completar seu ciclo intracelular e eclodir das células hospedeiras CHO-K₁. Os parasitas colhidos foram contados, assim como nos outros descritos, em câmara de Neubauer.

2.2.3 Trypanosoma brucei brucei

Foram utilizadas as formas procíclicas da cepa *T. b. brucei* 427, clone 29.13, as quais expressam a T7 RNA polimerase e a proteína repressora de tetraciclina (WIRTZ et al., 1999). Essas eram cultivadas a 25 °C em meio SDM-79 (Gibco[®]) suplementado com 10% de SFB (v/v), GlutaMAX (Gibco[®]), 2 g/L NaHCO₃, 7,5 mg/L de hemina, 25 μ g/mL de higromicina (H) e 15 μ g/mL de geneticina (G418), com pH ajustado a 7,3 (BRUN; SCHONENBERGER, 1979). Para experimentos de indução da TcP5CR, o parasita foi mantido em meio suplementado com 10% de SFB livre de tetraclicina (v/v), e com 2,5 μ g/mL de fleomecina cuja resistência é conferida na presença do vetor pLEW100 (gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Fréderic Bringaud, Université de Bordeaux, França). A cultura foi mantida por passagens sucessivas a cada 72 h com a densidade inicial de 1,3 x 10⁶ parasitas/mL.

Neste trabalho também foi o utilizado as formas procíclicas da mesma cepa com o gene TbP5CDH silenciado por RNA de interferência (RNAi) conforme descrito em (MANTILLA et al., 2017).

2.2.4 Leishmania amazonensis

Os promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1973/MM2269) foram mantidos a 25 °C em meio M-199 (Gibco[®]) suplementado com 40 mM Hepes (pH 7,4), 0,1 mM adenina, 3,8 mM de hemina, 4 mM NaHCO₃ e 10% de SFB (v/v). Os repiques

foram realizados semanalmente e as culturas foram mantidas por cerca de dez passagens.

Esses três tripanossomatídeos: *T. cruzi*, *T. b. brucei* e *L. amazonesis* aqui serão chamados de Tritryps, em representação aos protozoários patógenos que causam a doença de Chagas, a doença do sono e leishmaniose cutânea, pontuando que o termo Tritryps na comunidade científica se refere aos parasitas: *T. cruzi*, *T. b. brucei* e *L. major* (EL-SAYED et al., 2005).

2.2.5 Escherichia coli

Para realizar as clonagens do DNA dos genes de interesse foi utilizada a cepa *E.* coli DH5 α cujo genótipo é: F⁻ φ 80lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)*U169 recA1 endA1 hsdR17*(*rk*⁻, mk⁺) *phoA supE44 thi⁻¹ gyrA96 relA1* λ ⁻. Para os ensaios de expressão das proteínas recombinantes foi utilizada a cepa *E. coli* BL21-Codon Plus, conhecida como BL21(DE3)-RIL (Stratagene[®]) que apresenta o seguinte genótipo: F⁻ *ompT hsdS*(*r*_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tetr *gal endA* Hte [*argU ileY leuW* Cam'] para a expressão da TcP5CR. Também, para a expressão da TcP5CS, foi utilizado a cepa *E. coli* BL21(DE3)-RIL transformada com o plasmídeo pGro7 (Takara[®]) que codifica para as proteínas chaperonas *groES* e *groEL*, confere resistência a cloranfenicol e que contém o promotor *ara*B responsável pela regulação da expressão dessas chaperonas. Esta cepa *E. coli* BL21(DE3) pGro7 foi cedida gentilmente pela Profa. Dra. Cristina Nowicki (Universidad de Buenos Aires, Argentina).

Todas essas cepas bacterianas foram crescidas a 37 °C em meio *Lysogeny Broth* (LB) composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, e para meio sólido LB suplementado com 2% de ágar-base (p/v). De acordo com a necessidade, os seguintes antibióticos eram adicionados: 100 μ g/mL ampicilina, 30 μ g/mL canamicina (LB-K), 5 μ g/mL tetraciclina (LB-T) e 20 μ g/mL cloranfenicol (LB-C). Os clones positivos foram conservados em LB com 15% de glicerol (v/v) e armazenados a -80 °C.

2.3 Biossíntese de L-Pro in vivo

A fim de avaliar se os epimastigotas, os promastigotas e os procíclicos realizam a biossíntese de L-Pro, inicialmente tiveram seus níveis intracelulares de Pro depletados, ao incubá-los em PBS, durante respectivamente, 2 h, 1 h e 2 h e 30 min. Logo em seguida, esses parasitas foram incubados (por 1 h o *T. cruzi*, e *L. amazonensis*; e por 40 min o *T. b. brucei*) com diferentes fontes de carbono e cofatores como a seguir:

Tabela 1 - Descrição das fontes de carbono e cofatores usados na recuperação dos níveis intracelulares L-Pro.

L-glu	20 mM L-glutamato de sódio (L-glu), 10 mM MgCl ₂ , 0,5 mM NADPH e 5 mM	
	fosfoenolpiruvato (PEP) como sistema regenerador de ATP.	
L-gln	5 mM L-glutamina (L-gln), 10 mM MgCl ₂ , 0,5 mM NADPH e 5 mM fosfoenolpiruvato	
	(PEP) como sistema regenerador de ATP*.	
DL-P5C	1,5 mM mistura racêmica do ácido Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (DL-P5C) (recém	
	preparado) e 0,5 mM NADPH.	
L-arg	5 mM L-arginina (L-arg), 1 mM MnCl ₂ and 50 μ M piridoxal.	

Nomenclatura Composição da solução em PBS

*Foi adicionado um sistema de regeneração de ATP, pois o primeiro passo da biossíntese de L-Pro a apartir de L-Glu leva a hidrólise de ATP (esquema 2).

Também no tratamento dos parasitas foram utilizados 5 mM de L-Pro, como controle positivo, através da incorporação de L-Pro e PBS não suplementado, como controle negativo. Após o período de tratamento os parasitas foram centrifugados a 3000 g por 5 min a 4 °C e lavados uma vez com PBS. Os parasitas foram ressuspensos em 100 μ L de tampão de lise que continha: 100 mM Tris-HCl pH 8,1; 0,25 M sorbitol, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100 (v/v), 1 mM fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 4 μ g/mL aprotinina, 10 μ g/mL N- α -tosil-L-lisina clorometil cetona (TLCK) e 10 μ M N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida (E-64); e submetidos a dois ciclos de congelamento instantâneo em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C. Os extratos celulares foram clarificados por centrifugação a 15000 g por 15 min a 4 °C. Os sobrenadantes foram transferidos a um novo tubo, acrescidos de 1 volume de 20% ácido tricloroacético (p/v) e incubados 1 h no gelo para precipitar as proteínas presentes. A desproteinização dos sobrenadantes foi concluída após a centrifugação a 20000 g por 30 min a 4 °C. Então os 200 μ L de sobrenadante resultantes foram utilizados no ensaio de quantificação de Pro (LD-Pro) livre.

A quantificação de Pro foi realizada conforme previamente descrito (BATES; WALDRON; TEARE, 1973). Em detalhes, os 200 μ L de sobrenadantes resultantes foram fervidos durante 1 h a 95 °C, após serem misturados com 200 μ L de ácido acético glacial e 200 μ L de solução de ninidrina fresca (0,25 g de ninidrina em 6 mL de ácido acético e 4 mL de H₃PO₄ 6 M). A reação foi parada no gelo e por fim o complexo Pro – ninidrina foi separado através da extração com 1 volume de tolueno, depois de vigorosa agitação, 20 s em *vortex*. Para a quantificação, a fase aquosa foi transferida a placas de 96 poços para a leitura espectrofotométrica (λ 520nm), juntamente com o branco da reação (200 μ L de tampão de lise com 10% de ácido tricloroacético (p/v)) e com uma curva de calibração feita com concentrações pré-estabelecidas de L-Pro (25 – 100 μ M) dissolvida em tampão de lise. A quantificação determinada da Pro em cada amostra levou em consideração as diluições feitas no procedimento e foi normalizada pelo número de parasitas utilizados.

2.4 Manipulação de DNA

2.4.1 Extração de DNA genômico de T. cruzi

A partir de epimastigotas foi obtido o DNA genômico de *T. cruzi* para realizar as clonagens dos fragmentos de interesse. Com essa finalidade, 5 x 10⁷ parasitas/mL epimastigotas foram lavados duas vezes com PBS gelado via centrifugação a 3000 g por 5 min a 4 °C, ressuspensos em 200 μ L de tampão de lise TES (200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS (p/v), pH 8,0) suplementado com 50 μ g/mL de Proteinase K (QUIAGEN[®]) e incubados por 10 min a 56 °C. A seguir, a amostra foi tratada com 25 μ g/mL de RNAse A (Fermentas[®]) durante 1 h a 37 °C. Então, o DNA foi extraído via tratamento com 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 (v/v). A fase aquosa que continha o DNA foi separada por centrifugação a 6000 g durante 5 min a 4 °C, e após ser transferida a um novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de 1/10 volumes de 3 M acetato de sódio, pH 5,2, e 3 volumes de etanol absoluto. Separou-se o DNA por centrifugação a 12000 g por 15 min e o lavou com 70% etanol (v/v). A temperatura ambiente secou-se o DNA precipitado e após estar seco, o DNA foi ressuspenso em 100 μ L de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 1 mM EDTA).

2.4.2 Dosagem de DNA

O DNA foi quantificado mediante leitura de densidade ótica (DO) obtida a 260 e 280_{nm} com o espectrofotômetro *NanoDrop2000/2000c*, (*software versão* 1.4.2; Thermo Scientific), utilizando tampão TE como amostra de referência. De acordo com o descrito por (SAMBROOK; RUSSELL, 2001. 3 v.), uma unidade de absorbância a DO₂₆₀ representou 50 µg/mL de DNA e ainda o valor a DO₂₈₀ foi correspondente à absorbância de proteínas contaminantes na amostra. Portanto, a razão DO₂₆₀/ DO₂₈₀ foi calculada para verificar a pureza do DNA, e foi considerada pura a amostra quando o valor desta razão encontrava-se entre 1,8 - 2,0.

2.4.3 Verificação do tamanho e integridade de DNA

Através da eletroforese em gel de agarose foi analisado o tamanho e a integridade dos fragmentos de DNA obtidos nesse trabalho. A este fim, as corridas foram realizadas em tampão TAE 0,05X (40 μ M Tris, 1 mM EDTA, ajustando a pH final 8,0 com ácido acético) e as amostras foram resolvidas em gel de agarose que variam entre 0,8 – 2% (p/v) dissolvidas em tampão TAE 0,05X acrescentado com 0,5 μ g/mL brometo de etídeo (BrEt). Para amostras de tamanho \geq 5 Kpb foi realizada em géis de agarose a 0,8%, enquanto que moléculas entre 100 – 600 pb foram separadas em géis ao 2% (p/v). Antes da aplicação das amostras de DNA no gel, essas foram diluídas em tampão de amostra 6x [0,25% azul de bromofenol (p/v), 0,25% xileno cianol (p/v) e 20% glicerol (v/v)]. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 1Kb DNA Plus ladder (Fermentas[®]). As corridas eletroforéticas foram conduzidas a 115V e os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultravioleta utilizando um transiluminador *Benchtop UV transiluminator* (UVP).

2.4.4 Reações de amplificações de fragmentos do DNA

Baseada nas sequências preditas para a TcP5CR (n° sistemático: Tc00.1047053509207.90) e para a TcP5CS (n° sistemático: TcSYLVIO_005298) depositadas no banco de dados, desenhou-se e sintetizou os respectivos oligonucleotídeos dos genes (quadro 2), que então foram utilizados na amplificação das sequências por reação em cadeia da polimerase (PCR). As reações de PCR continham 100 ng de DNA genômico (molde), 0,2 pmol/mL de oligonucleotídeos, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1X de tampão para Taq Polimerase sem MgCl₂ (Fermentas[®]) e 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas[®]) e H₂O milli-Q qsp para atingir um volume final de 25 μ L. Como controle negativo foi usado água ao invés de DNA na amostra. As condições de amplificação para o gene *TcP5CR* compreenderam a desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos: de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 60 °C por 1 min, amplificação a 72 °C por 30 s e a extensão final a 72 °C por 10 min. E para a TcP5CS compreenderam praticamente as mesmas condições, diferindo no anelamento a 54 °C por 1 min e na amplificação a 72 °C por 4 min e 30 s.

Assim como acontece em outros organismos, a TcP5CS poderia ser uma enzima bifuncional ou sua função ser desempenhada por duas enzimas distintas. Frente a essa incerteza, e a possibilidade de haver erros na anotação dos genes correspondentes a TcP5CS, optou-se por amplificar o gene da mesma a partir de cDNA de *T. cruzi* (cepa CL, clone 14), utilizando os iniciadores reverso complementar desenhado para o TcP5CS e o direto desenhado para o gene *splicing leader* (SL) (quadro 2) (VANHAMME; PAYS, 1995).

Para a PCR de colônias, as mesmas foram coletadas das placas utilizando palitos estéreis e ressuspendidas em 20 μ L de água estéril. A lise foi realizada por fervura a 100 °C durante 10 min. 2 μ L desse lisado foram utilizados como molde para as reações de PCR.

Os produtos de PCR obtidos foram purificados do gel de agarose utilizando o kit comercial GeneJET[®] (Thermo[®]) segundo as indicações do fabricante.

2.4.5 Clonagem no vetor do tipo T: construção em pGEM T-Easy

O fragmento do gene *TcP5CR* purificado do gel de agarose foi quantificado. Após disso, 54 ng do produto foi ligado em 50 ng do vetor pGEM T-Easy (razão molar 4:1, de inserto: vetor) utilizando 1 U de T4 DNA ligase (Promega[®]) e 1X do tampão ligase, seguindo indicações do fabricante.

2.4.6 Clonagem no vetor de extremidades cegas: construção em pJET1.2

O fragmento do gene *TcP5CS* purificado do gel de agarose foi quantificado para a clonagem no vetor de extremidades cegas pJET1.2 (Thermo Scientific[®]). Para isso, 250 ng de *TcP5CS* foi ligado em 100 ng do vetor pJET1.2 (razão molar 3:1, de inserto: vetor) utilizando 1 U de T4 DNA ligase (Promega[®]) e 1X do tampão ligase, seguindo indicações do fabricante.

2.4.7 Preparação de bactérias quimiocompetentes

A cepa DH5 α de *E. coli* foi utilizada para a clonagem das construções acima mencionadas. Para torná-las células competentes foi aplicado o método de cloreto de cálcio (SAMBROOK; RUSSELL, 2001. 3 v.). A este fim, uma cultura em LB de 5 mL foi preparada a partir de uma colônia isolada e crescida por 16 h a 37 °C sob agitação constante a 180 rpm. Em seguida a cultura foi diluída (1:100) e crescida nas mesmas condições para chegar a uma DO_{600nm} entre 0,4 e 0,6. A essa densidade celular, as bactérias foram incubadas no gelo por 15 min, e posteriormente foram centrifugadas a 3000 g durante 5 min a 4 °C. O pellet foi ressuspendido em 3 ml de 100 mM CaCl₂ gelado acrescentado de 140 μ L de DMSO e incubado no gelo novamente por 15 min. Por fim, as células foram distribuídas em alíquotas de 200 μ L em tubos de 1,5 ml estéreis, congeladas em etanol-gelo seco e armazenadas a -80 °C.

2.4.8 Transformação de bactérias competentes

As alíquotas de células quimiocompetentes armazenadas a -80 °C foram descongeladas e incubadas com 5 μ L do produto de ligação ou 50 ng de DNA plasmidial no gelo por 30 min. Posteriormente, as células foram submetidas a choque térmico, a 42 °C durante 1 min e 30 s, para a inserção do DNA e logo em seguida foram armazenadas no gelo novamente por 5 min. Após o choque térmico, as células foram recuperadas pela adição de meio LB suplementado com 20 mM de glicose e incubadas durante 1 h a 37 °C sob agitação constante (180 rpm). Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000 g por 5 min, ressuspensas em 100 μ L de meio LB fresco e então plaqueadas no meio LB sólido com o respectivo antibiótico e/ ou isopropil β -D-1-

tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosídeo (X-Gal) durante 16 h a 37 °C para o isolamento dos transformantes.

2.4.9 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-prep)

Através da lise alcalina foi extraído o DNA plasmidial dos clones bacterianos obtidos de acordo com a literatura (SAMBROOK; RUSSELL, 2001. 3 v.). Uma única colônia foi crescida em 3 mL de LB com o antibiótico correspondente, centrifugada a 3000 g por 5 minutos, homogeneizada em 100 μ L de solução GTE (25 mM Tris-HCl, 50 mM glicose, 10 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase A 100 μ g/mL e incubada por 5 min a temperatura ambiente. Logo em seguida, foram acrescentados 200 μ L da solução NaOH/SDS (200 mM NaOH, 1% SDS p/v), misturada por inversão delicadamente e incubada durante 5 min no gelo. A reação foi equilibrada pela adição de 150 μ L de solução de acetato de potássio (5 M acetato de potássio, pH 4,8), misturada vigorosamente e incubada por 5 min no gelo. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 6000 g por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido a um novo tubo. O DNA foi precipitado com 400 μ L de isopropanol, novamente centrifugado a 6000 g por 20 minutos e lavado uma vez com etanol 70% (v/v) gelado. Então, o DNA precipitado foi secado a temperatura ambiente e dissolvido em 30 μ L de H₂O milli-Q estéril. Sua integridade foi analisada como descrito na seção 2.4.3.

2.4.10 Construções pET28-TcP5CR e pET28-TcP5CS

Para expressar as enzimas recombinantes de interesse em *E. coli*, foi realizada a subclonagem das sequências proteicas correspondentes em vetor de expressão pET28a. No caso da sequência da TcP5CR, 2 μ g da construção pGEM-TcP5CR e 2 μ g do plasmídeo pET28a foram digeridos com 2U das enzimas *Bam*HI e *Eco*RI (Thermo[®]) seguindo as instruções do fabricante. Enquanto que no caso da TcP5CS, primeiramente amplificou a sequência a partir da construção pJET-SL-TcP5CS como molde, utilizando seus iniciadores com os sítios de clivagem *Not*I e *Xho*I (quadro2). Após o produto ser extraído do gel de agarose, 0,4 μ g do mesmo e 1 μ g do plasmídeo pET28a foram digeridos com 1U das enzimas *Not*I e *Xho*I (Thermo[®]). Todas as digestões foram resolvidas em gel de agarose e deste purificadas. As reações de ligação foram feitas ao utilizar a relação vetor:inserto de 1:3, conforme descrito anteriormente.

2.4.11 Construção pLEW100-TcP5CR

Para a construção de uma linhagem mutante de T. b. brucei capaz de expressar TcP5CR, outros oligonucleotídeos foram desenhados com sítios de restrição para as enzimas HindIII e BamHI. Foi utilizado o vetor pLEW100, que possibilita a expressão via um sistema induzível na presença de tetraciclina (WIRTZ et al., 1999). O mesmo foi concedido gentilmente pelo Prof. Dr. Fréderic Bringaud (Université de Bordeaux, França). Com o uso desses iniciadores, novamente amplificou-se o fragmento de interesse a partir do DNA genômico de T. cruzi. Após a purificação do fragmento, 0,4 µg deste e 1 µg do vetor pLEW100 foram digeridos com 1U das enzimas HindIII e BamHI e então ligados como descrito anteriormente. Uma vez que a clonagem, a transformação e a seleção do clone foram bem sucedidas, o clone positivo crescido em 150 ml de meio LB suplementado com 100 µg/mL ampicilina foi utilizado para a extração do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina em maior escala, utilizando o GenEluteTM HP Plasmid Maxiprep Kit, seguindo indicações do fabricante Sigma[®]. Em seguida, 2000 ng de pLEW100-P5CR foram linearizados com 2U de NotI para serem utilizados no ensaio de transfecção. 100 µg de DNA linearizado foram precipitados com 3 M acetato de sódio pH 5,2 (1/10 do vol de DNA) e etanol absoluto (2,5 vol de DNA). A mistura foi centrifugada (10 min, 16000 x g a 4 °C) e o precipitado foi lavado com etanol puro até completar o volume total do tubo (1 ml). O DNA foi centrifugado novamente (10 min, 16000 x g a 4 °C), o precipitado foi secado (em esterilidade) e ressuspenso em 15 µL de H2O mili-Q estéril.

2.4.12 Sequenciamento de DNA

A identificação e confirmação de todos os fragmentos de DNA clonados foram realizadas por sequenciamento pelo Método de Sanger (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Para isso, as amostras de DNA foram precipitadas com 66% de isopropanol (v/v), homogeneizadas cuidadosamente, incubadas a temperatura ambiente por 15 min e centrifugadas a 15000 g durante 20 min. O DNA precipitado foi lavado com 75% de isopropanol (v/v), centrifugadas novamente na mesma condição e então foi secado a temperatura ambiente e protegido da luz. O DNA foi armazenado a -20°C para posterior uso. As reações de sequenciamento eram compostas de 100 ng de DNA

plasmidial, 0,75 µL do reagente Big Dye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems[®]), 1,25 µL do tampão Save Money (200 mM Tris-HCl, pH 9, 0,5 mM MgCl₂), 5 pmoles dos oligonucleotídeos universais T7 *sense* e *anti-sense*, ou oligonucleotídeos específicos (ver quadro 2), e H₂O milli-Q qsp para completar um volume final de 10 µL. As reações foram analisadas em um sequenciador automático *ABI PRISM[®] 3100 Gene analyzer* (Applied Biosystems). As sequências obtidas foram comparadas contra as bases de dados disponíveis para DNA de tripanossomatídeos mediante a busca por similaridade (BLASTN) (COORDINATORS, 2017).

Iniciador	Sequência 5' – 3'	Descrição
TcP5CR-S	<u>GGATC</u> CATGAAAATTGGAATTATTGGTTGTGG	Clonagem da TcP5CR
BamHI		(pGEM-T Easy)
TcP5CR-AS	GAATTCCTAGTTTAGATTGGCCTCCAGC	Clonagem da TcP5CR
EcoRI		(pGEM-T Easy)
TcP5CR-S	CCAC <u>AAGCTT</u> ATGAAAATTGGAATTATTGGTTGTGG	Clonagem da TcP5CR
HindIII		(pLEW100)
TcP5CR-AS	AA <u>GGATCC</u> CTAGTTTAGATTGGCCTCCAGC	Clonagem da TcP5CR
BamHI		(pLEW100)
TcP5CS-S	AA <u>GCGGCCGC</u> ATGGCCACCGTTCCGCTTC	Clonagem da TcP5CS
NotI		(pGEM-T Easy)
TcP5CS-AS	AA <u>CTCGAG</u> TTAATTTTCCTCCTGCAATATCATGGC	Clonagem da TcP5CS
XhoI		(pGEM-T Easy)
TcSL-S	GATACAGTTTCTGTACTATA	Amplificação da
		TcP5CS a partir de
		cDNA
TcP5CS318-	TCTTCCATCGGCAACAACACCT	Sequenciamento de
S		DNA
TcP5CS750-	CGTCAATGATGACTTTAGCGG	Sequenciamento de
S		DNA
TbGAPDH-S	CCGTGTTCCCACGGCTGATGT	Gene normalizador
TbGAPDH-	TTGGAGGCGCGCTTCAGGG	Gene normalizador
AS		

 Tabela 2 - Sequências de iniciadores utilizados neste trabalho.

Os sítios de restrição indicam-se sublinhados. S: iniciadores sense, AS: iniciadores antisense,

2.5 Manipulação de RNA

2.5.1 Extração de RNA de tripanossomas

A partir de formas epimastigotas de T. cruzi e procíclicas de T. b. brucei foram extraídas amostras de RNA total. Inicialmente, 5 x 10⁷ parasitas foram coletados por centrifugação a 1000 g por 10 min a 4 °C, e lavados duas vezes com PBS gelado preparado em H₂O milli-Q tratada com 0,1% dietilpirocarbonato (H₂O-DEPC) (v/v). Em seguida, o precipitado foi ressuspendido em 1 mL de TRIzol[®] (InvitrogenTM), homogeneizado vigorosamente e incubado por 5 min a temperatura ambiente. Após a dissociação dos complexos de nucleoproteínas, a solução foi centrifugada a 12000 g por 15 min a 4 °C, a fase aquosa foi transferida a um novo tubo. A seguir, realizou-se uma lavagem com 200 µL de clorofórmio (por ml de TRIzol usado) sob agitação vigorosa por 15 s e posterior incubação a temperatura ambiente durante 5 min. Dessa mistura formam-se três fases distintas: inferior orgânica (avermelhada contendo o fenol), interfase e superior aquosa (mais clara). Essa fase aquosa que contém o RNA foi, então, cuidadosamente separada e adicionado isopropanol gelado (500 µL por ml de TRIzol usado) para o precipitar. Depois da centrifugação a 12000 g por 10 min a 4 °C), o RNA precipitado foi lavado com 75% etanol em H2O-DEPC (v/v). E posteriormente, foi secado a 37 °C durante 10 min, e ressuspenso em 30 µL de H2O-DEPC suplementada com 5 U da enzima DNAse (Fermentas[®]) e 1 x de tampão para DNAse, para a lise de DNA durante a incubação por 40 min a 37 °C. A reação foi inativada por desnaturação térmica na presença de 1 mM EDTA a 65 °C por 10 min, a fim de eliminar restos de DNA contaminantes na amostra. Ainda para confirmar algum possível resquício de DNA, foi realizada com essas amostras um PCR convencional, e caso houvesse DNA contaminante na amostra, estas eram submetidas a um tratamento adicional com DNAse.

Por último, a integridade do RNA é avaliada mediante a eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) usando tampão TAE livre de RNAse e é quantificado mediante leitura espectrofotométrica a $DO_{260/230 \text{ nm}}$. Conforme a literatura (SAMBROOK; RUSSELL, 2001. 3 v.), 1 unidade de absorbância a DO_{260nm} corresponde a 40 µg/mL de RNA.

2.5.2 Síntese de cDNA

Com a finalidade de sintetizar cDNA, 3-5 μ g de RNA total obtido, 250 ng de oligo-dT (InvitrogenTM) e 2,5 mM de dNTP mix dissolvidos em H₂O estéril foram aquecidas a 65 °C durante 5 min e em seguida foram acrescentados 1 X *First-Strand Buffer*, 0,1 M Ditiotreitol (DTT) e 40 U de RNAseOUT e incubados a 25 °C por 2 min. Após a adição de 200 U da enzima *SuperScriptTM II-RT*, as amostras novamente foram incubadas a 25 °C durante 10 min. Ao término desse período, aumentou-se a temperatura a 42 °C, deixou-a por 50 min e por fim aumentou-se ainda mais a 70 °C na qual a reação foi inativada durante 15 min. Para o uso, o cDNA obtido foi diluído a 2 ng/µL em H₂O milli-Q.

2.6 Manipulação de proteínas

2.6.1 Expressão e purificação da TcP5CR e TcP5CS produzidas em E. coli

Ambas as enzimas recombinantes TcP5CR e TcP5CS foram expressas em E. coli, fusionadas a uma etiqueta de seis histidinas no extremo N-terminal. A construção pET28-TcP5CR foi utilizada para transformar a cepa E. coli BL21(DE3)-RIL e a pET28-TcP5CS, a cepa E. coli BL21(DE3)-pGro7, como descrito em 2.4.8. Os clones positivos selecionados para cada construção foram crescidos durante 16 h a 37 °C (sob agitação de 180 rpm) em: 20 mL de LB-K-T para os clones BL21(DE3)-RIL e em LB-K-C, os clones BL21(DE3)-pGro7. Então foram diluídos 1:100 nos respectivos meios e (2 L) novamente postos a crescer nas mesmas condições. Quando as células BL21(DE3)-RIL apresentaram uma DO_{600nm} próxima de 0,4, as células passaram a ser mantidas a 20 °C ainda sob agitação (180 rpm). Após cerca de 40 mins, a DO_{600nm} atingiu 0,6, e então foi acrescentado 0,5 mM de IPTG, mantendo a cultura nas mesmas condições descritas durante 16 h, a fim de induzir a TcP5CR. Para expressar a TcP5CS, esperou-se as células BL21(DE3)-pGro7 atingirem uma DO_{600nm} de 0,4, e adicionou-se 0,25 mg/mL de L-arabinose (Sigma®) estéril, para a indução da expressão das chaperonas groES e groEL. Ao atingir a DO_{600nm} de 0,6, também adicionou-se 0,5 mM de IPTG e as células foram incubadas durante 4 horas a 37 °C sob agitação constante (180 rpm). Ao final dos períodos de indução, as bactérias foram centrifugadas a 5000 rpm por 15 min e ressuspendidas em 40 mL de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 500 mM NaCl e 5 mM de imidazole), seguindo a proporção 10 mL de tampão por cada 500 mL de cultura. Adicionou-se 1 mM de PMSF, 10 μ g/mL de TLCK, 10 μ M E-64 e 1 mg/mL de lisozima (Sigma[®]) para iniciar a lise bacteriana durante 30 min a 4 °C. Para a completa lise celular, a suspensão foi submetida a oito ciclos de sonicação (35 s a 40% de potência e 1 min no gelo). Em seguida, o lisado foi clarificado através da centrifugação a 16000 g por 30 min a 4 °C.

Para purificar as enzimas recombinantes, os lisados foram passados 3 vezes em 3 mL de resina níquel (Ni²⁺-NTA agarose, QUIAGEN[®]), previamente carregada com Ni²⁺ e equilibrada com tampão de ligação. Posteriormente, a resina foi lavada com 20 mL de mesmo tampão, com 40 mL de tampão de lavagem (igual ao tampão de ligação exceto na concentração de imidazol: 60 mM) e com 20 mL de tampão de lavagem com 100 mM de imidazol. Para diminuir a presença das chaperonas groES e groEL nos eluatos da TcP5CS, em todos seus passos de lavagens acrescentou-se 3 mM de ATP nos tampões. Por fim, ambas as recombinantes foram eluídas em frações de 1,5 mL com tampão de eluição (tampão de lavagem com 500 mM de imidazol).

Após a purificação, a fração contendo a TcP5CR foi dialisada em membranas de diálise (com um diâmetro de poro 10 kDa), contra uma solução (1:1000) de tampão TcP5CR (100 mM Tris-HCl, 10 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 2 mM DTT e 10% glicerol (v/v), pH 7,0). O tampão foi trocado três vezes a cada 1 h, mantendo sempre a diálise em constante agitação a 4 °C. A concentração de proteína foi realizada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.6.2 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes (SDS-PAGE)

O método de separação por peso molecular de proteínas em géis de poliacrilamida (10%) em condições desnaturantes foi utilizado em grande parte das análises proteicas. O gel de separação era composto de 0,375 M de tampão Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS (v/v), 10% de solução acrilamida:bisacrilamida [29:1 (p/v)] (BioRad Systems[®]) (v/v), H₂O destilada, 5 μ L de Tetra Metil Etileno Diamina (TEMED) (Sigma[®]) e 0,05% persulfato de amônio (v/v). Após a polimerização (cerca de 30 min a temperatura ambiente), foi adicionado o gel de empilhamento (0,125 M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS (v/v), 5% de solução acrilamida:bis-acrilamida [29:1 (p/v)]

(BioRad Systems[®]) (v/v), H₂O destilada, 5 μ L de TEMED (Sigma[®]) e 0,05% persulfato de amônio (v/v).

As amostras foram diluídas na proporção 4:1 em tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2,3% SDS (v/v), 10% glicerol (v/v), 0,01% azul de bromofenol (p/v) e 20 mM mercaptoetanol), fervidas 5 min a 95 °C e então aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida [25 mM de Tris base, 192 mM glicina e 0,1% SDS (p/v)], aplicando uma voltagem constante de 120 V.

As proteínas no gel foram coradas com solução de azul Comassie [(0,1% *Coomassie blue G-250* (p/v), 50% metanol (v/v) e 10% ácido acético (v/v)] e descoradas com solução de descoloração [40% metanol (v/v) e 10% ácido acético (v/v)]. Os pesos moleculares das proteínas foram estimados de acordo com a separação dos marcadores *Precision Plus ProteinTM Unstained Stan*dards e *Precision Plus ProteinTM KaleidoscopeTM Prestained Protein Standards* (BioRad Systems[®]).

2.6.3 Obtenção de soros policlonais anti-TcP5CR e anti-TcP5CS

As proteínas recombinantes TcP5CR e TcP5CS obtidas como descrito em 2.6.1 foram dessalinizadas mediante a lavagens com PBS e concentradas por gravidade utilizando colunas Centricon 10 kDa (MWCO) (Centricon, Millipore). Em seguida, foram inoculados 25 µg de cada enzima recombinante junto ao adjuvante completo de Freund's (Sigma®) em camundongos machos (4) da linhagem BALB/c com 45 dias de nascimento. Após 15 dias das inoculações, foi aplicada uma dose adicional usando a mesma quantidade de proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund's (Sigma[®]). Após 30 dias, foi inoculada uma dose reforço adicional, nas mesmas condições da ultima dose. Posteriormente a quatro dias da última dose, amostras de sangue (200 µL) foram coletadas via sangria submandibular, para avaliar os títulos dos anticorpos. Duas doses a mais seguindo as mesmas condições da última tiveram que ser realizadas para obter reação positiva dos anticorpos contra as respectivas proteínas de interesse. Em seguida, os animais foram anestesiados pela administração de uma mistura de quetamina/xilazina (100 g/kg/10 mg/kg), por via intraperitoneal e sacrificados por punção cardíaca. O sangue total foi coletado e incubado a 37 °C durante 30 min e a 4 °C por mais 30 min. O soro total foi separado por centrifugação a 1000 g por 15 min a 4 °C, acrescentado com 1 volume de 50% glicerol (v/v) estéril, distribuído em alíquotas de 50 µL e armazenados a -20 °C, para posterior uso. Como grupo controle, esse mesmo protocolo de imunização foi realizado, utilizando PBS ao invés da proteína antigênica. Os títulos para cada anticorpo foram determinados pelo uso da técnica de *western blot*, descrita a seguir em 2.6.5, contra extratos proteicos totais de epimastigotas.

O uso de animais neste trabalho foi autorizado e seguiu as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA) sob registro 129/12 nº 129, folha 134, livro 02.

2.6.4 Preparação de extratos proteicos totais

2.6.4.1 A partir de tripanossomas

Lisados celulares dos parasitas *T. cruzi* e *T. b. brucei* foram utilizados a fim de detectar as proteínas TcP5CR e TcP5CS, bem como outros marcadores e medir atividades enzimáticas. Parasitas em fase exponencial crescidas em meio LIT ou SDM-79, durante 48 h a 28 °C foram coletados por centrifugação a 1000 g por 10 min a 4 °C e lavados duas vezes com tampão PBS gelado. Em seguida, foram homogeneizados em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,25 M sacarose, 1 mM EDTA, 0,1% triton-X 100 (v/v), 1 mM PMSF e cocktail de inibidor de proteases (Sigma[®]). As células foram lisadas por sonicação mediante cinco ciclos (5 s a 20% potência e 30 s no gelo) ou por dois ciclos de congelamento instantâneo em nitrogênio líquido e descongelamento a 37 °C. Após a centrifugação a 13000 g por 30 min a 4 °C, os sobrenadantes foram quantificados pelo método de Bradford e utilizados no respectivo ensaio.

2.6.4.2 A partir de promastigotas

Extratos totais de promastigotas de *L. amazonensis* foram utilizados para o mesmo fim que os extratos proteicos totais a partir de tripanossomas. Para isso, 1×10^7 parasitas/mL foram crescidos em meio M-199 durante 48 h, foram lavados duas vezes com tampão de PBS gelado a 1000 g por 10 min a 4 °C e ressuspendidos em tampão de extração (75 mM trietanolamina, pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 0,1% triton-X 100 (v/v), 5 µM leupeptina, 2 µM pepstatina e 1 mM PMSF), respeitando a relação 180 mg de peso úmido de parasitas para 1 mL de tampão. Em seguida, submeteu-se a suspensão celular a sonicação por três ciclos (de 30 s a 25% e 1 min no gelo), e a clarificou por

centrifugação a 27000 g por 45 min (LEROUX et al., 2006). A dosagem de proteínas do sobrenadante foi realizada pelo método de Bradford.

2.6.5 Western blot

As amostras de proteínas oriundas de diferentes fontes e resolvidas em géis SDS-PAGE também foram submetidas à técnica de western blot com a finalidade de detectar proteínas de interesse. Para isso, após a eletroforese, essas amostras foram eletro-transferidas a membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra (GE Healthcare[®]) através do sistema de transferência úmido (BioRad Systems[®]) de acordo a instruções do fabricante. Ao término da transferência as proteínas na membrana foram coradas com solução de vermelho Ponceau [0,5% vermelho Ponceau (p/v) dissolvido em 10% ácido acético (v/v)] e lavadas com água. Em seguida, a membrana foi bloqueada em solução de 0,05% PBS-Tween-20 (v/v) (PBST) acrescentada de 5% leite desnatado (Molico, Nestle[®]) (p/v), por 1 h ou mais, em constante agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada por 2 h a temperatura ambiente com o anticorpo primário, diluído em PBST com 3% de leite desnatado (p/v) nos correspondentes títulos (anti-TcP5CR 1:30000, anti-TcP5CS 1:2000, anti-TcGAPDH 1:2000, anti-TcASATm 1:3000, antiTcTAT 1:1000, anti-TcP5CDH 1:2000, anti-TbPRODH 1:1000, anti-TbEnolase 1: 2000). Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes por 5 min em PBST, e incubadas durante 40 min com anticorpo secundário, conjugado a horseradish peroxidase (HRP) (GE Healthcare®) diluído 1:5000 em PBST com 3% de leite desnatado (p/v). A seguir, duas lavagens sucessivas com PBST durante 5 min cada, e uma terceira com PBS por 15 min foram realizadas à membrana. Enfim, os sinais de reatividade foram revelados por quimiluminescência ao utilizar o kit SuperSignal® West Pico Chemiluminescent (Thermo Scientific®) de acordo as instruções do fabricante e através da exposição em filme de raio-X que foi revelado com soluções reveladora e fixadora, seguindo indicações do fabricante (Kodak[®]).

2.7 Ensaios bioquímicos

2.7.1 Caracterização bioquímica da TcP5CR

A atividade da P5CR foi avaliada em extratos celulares totais de *T. cruzi*, *T. b. brucei* e *L. amazonensis*, assim como através da enzima recombinante TcP5CR. A forma racêmica do substrato utilizado pela a enzima (DL-P5C) foi sintetizada a cada ensaio como descrito em (MANTILLA et al., 2015). Para o cálculo dos parâmetros a seguir, considerou que esta mistura apresenta proporções iguais das duas formas D-P5C e L-P5C e que somente a forma L-P5C estaria envolvida na catálise da P5CR. No mínimo três experimentos independentes foram realizados e desses calculados as médias e os respectivos desvios padrão.

2.7.1.1 Análise e caracterização da atividade P5CR em tripanossomatídeos

Além de análise por western blot em extratos totais de tripanossomatídeos, a busca por P5CR homólogas a T. cruzi também foi realizada através de ensaios de atividade da enzima em lisado total de T. b. brucei e L. amazonensis. Esse ensaio permite a redução de P5C via NADPH como doador de elétrons. Com esta finalidade, verificou a variação da absorbância λ_{340nm} durante o tempo, e utilizando o $\epsilon_{NAD(P)H}$ = 6,22 mM⁻¹ cm⁻¹, calculou as velocidades iniciais da catálise desempenhada pela P5CR na presença de 100, 200 ou 400 µg de cada um dos três extratos como de 35 µM NADPH, 0.5 DL-P5C e 100 mM mM tampão cloridrato de tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl), pH 7,0.

Em seguida, da mesma maneira, determinaram-se as velocidades iniciais (V₀) através do consumo de 35 μ M NADPH em relação a diferentes concentrações de DL-P5C (de 10 a 500 μ M), a partir da adição de 200 μ g de extrato total de *T. cruzi* ou *L. amazonensis*. Os valores de velocidades iniciais foram representados no eixo-y do gráfico e plotados versus as concentrações do substrato (μ M) no eixo-x. As curvas resultantes foram ajustadas a função hiperbólica que descreve o modelo de *Michaelis-Menten*, utilizando o programa *GraphPad Prism v5.01* (GraphPad SoftwareTM). Os parâmetros cinéticos constante de afinidade aparente (K_M^{app}) e velocidade máxima aparente (V_{max}^{app}) foram calculados a partir da equação de Michaelis-Menten a seguir:

$$V_0 = \frac{V_{max}^{app}[S]}{K_M^{app} + [S]}$$

Também nesses extratos, foi avaliada a dependência da enzima em relação aos cofatores NADPH e NADH, ao calcular a V₀ da mesma forma a anterior, entretanto na presença de 35 μ M de NADH e a comparar com a velocidade obtida com 35 μ M de NADPH nas mesmas condições.

$\frac{2.7.1.2 \text{ Determinação da } K_M{}^{app} \text{ e da eficiência catalítica para a TcP5CR recombinante}}{em relação ao P5C}$

O K_M^{app} calculado para a TcP5CR recombinante foi determinado da mesma maneira que foi determinado em extratos celulares, exceto ao início da reação, que neste caso foi dado pela adição de 1,5 µg de enzima recombinante.

Para a TcP5CR recombinante, também foi determinado a constante catalítica (k_{cat}^{app}) , dado a partir da V_{max}^{app} , como o número de moléculas de substrato que é convertido em produto por uma molécula de enzima, em cada segundo, quando a enzima está completamente saturada com substrato. Nessa condição foi de terminado a k_{cat} de acordo com a equação a seguir, na qual $[E]_{total}$ é dado pela quantidade total utilizada na reação.

$$k_{cat}^{app} = \frac{V_{max}^{app}}{[E]_{total}}$$

Em condições fisiológicas as enzimas não estão saturadas com o substrato. Para este caso, a eficiência catalítica de uma enzima é medida pela constante de velocidade $(\mu M/s)$ definida como a razão da k_{cat}^{app} (s⁻¹) sobre K_M^{app} (μM). A eficiência catalítica da TcP5CR também foi calculada.

2.7.1.3 Dependência do pH e especificidade de cofatores

O efeito do pH na atividade da TcP5CR recombinante foi avaliado. Para isto, a reação continha 35 μ M NADPH, 0,5 mM DL-P5C, 1,5 μ g de enzima e 100 mM de diferentes tampões: citrato-fosfato (pH 4,0; 5,0), 2-N-morfolino ácido etano sulfônico

(MES pH 5,0; 6,0), MOPS (pH 6,6; 7,0), Tris-HCl (pH 7,0; 7,5; 8,0; 9,0), 2-Nciclohexilamino ácido etano sulfônico (CHES pH 9,0; 10,0). As amostras foram préincubadas (3 min, 28 °C sob agitação constante) e a reação foi iniciada pela adição do DL-P5C.

Assim como em extratos celulares totais de *T. cruzi* e *L. amazonensis*, foi avaliada a especificidade da enzima recombinante ao medir sua atividade na presença de 35 μ M de NADH ou NADPH, 100mM Tris-HCl, pH 7,0 e 0,5 mM DL-P5C na reação iniciada com 1,5 μ g de TcP5CR.

2.7.1.4 Dependência da temperatura e energia de ativação

Também foi avaliada a atividade da TcP5CR recombinante em diferentes temperaturas (T) (20, 28, 33, 37, 45, 55, 60, 70 e 80 °C). O conteúdo da reação foi o mesmo utilizado na análise de variação do pH com tampão Tris-HCl, pH7,0. Os valores de V_{max}^{app} obtidos que apresentaram linearidade em relação à temperatura foram transformados em ln V_{max}^{app} e plotados versus 1/T (°C). A energia de ativação (E_a) foi calculada a partir da relação entre ln V_{max}^{app} e 1/T dada pela equação de Arrhenius a seguir:

$$E_a = -RT \ln \frac{V_{max}^{app}}{A}$$

Onde, R é a constante universal para os gases ideais 8,314 x 10^{-3} kJ/mol K e A é um valor constante.

2.7.1.5 Efeito do cofator NADPH na catálise da TcP5CR

As V₀ da TcP5CR recombinante também foram determinadas em relação a diferentes concentrações de NADPH (de 4 a 200 μ M). Diferentemente das V₀ obtidas em relação a diferentes concentrações de P5C, os dados V₀ versus [NADPH] não apresentavam comportamento correspondente à hipérbola Michaeliana. Por isso, optouse analisar o efeito do NADPH através de curvas de progresso (DUGGLEBY, 2001; PHILO; SELWYN, 1973). Nesta análise na qual não envolve somente o tempo inicial da reação, necessita-se garantir que durante as medições realizadas não há instabilidade

da enzima, para isso foi feito o teste de *Selwyn* (SELWYN, 1965). As reações utilizadas neste teste continham: 100 mM Tris-HCl pH 7,0; 50 μ M P5C; 250 μ M NADPH e diferentes quantidades de enzima recombinante (5, 10 ou 20 μ g). Em seguida mediu-se diferentes curvas de progresso obtidas de reações com as diferentes concentrações de NADPH e na presença de 100 mM Tris-HCl pH 7,0; 0,5 mM P5C e 1,5 μ g de TcP5CR. Por fim, essas curvas foram analisadas através do o uso do programa *DynaFit v4.06.027* (BioKin Ltd) (KUZMIC, 1996). Este programa comparou diferentes modelos cinéticos, principalmente de inibição, através da elaboração e execução do *script* a seguir:

[task]

```
data = progress
task = fit
model = MMsimple ?
[mechanism]
E + S \iff ES : k1 \text{ kmenos}1
ES \rightarrow E + P : kcat
[constants]
k1 = 100
kmenos1 = 270 ?
kcat = 0.58 ?
[responses]
P = 0.00622
[progress]
directory ./results/progresscurves/Marchese
extension txt
file S1 | conc. S = 4?, E = 0.0536
file S2 | conc. S = 7?, E = 0.0536
file S3 | conc. S = 10 ?, E = 0.0536
file S4 | conc. S = 20?, E = 0.0536
file S6 | conc. S = 50, E = 0.0536 ?
file S7 | conc. S = 70 ?, E = 0.0536
file S9 | conc. S = 150 ?, E = 0.0536
file S10 | conc. S = 200 ?, E = 0.0536
file S1B | conc. S = 4, E = 0.0536?
file S2B | conc. S = 7, E = 0.0536?
file S3B | conc. S = 10, E = 0.0536?
file S4B | conc. S = 20, E = 0.0536?
```

```
file S5B | conc. S = 35, E = 0.0536?
file S6B | conc. S = 50, E = 0.0536?
file S7B | conc. S = 70, E = 0.0536?
file S7B | conc. S = 100, E = 0.0536?
file S9B | conc. S = 150, E = 0.0536?
file S10B | conc. S = 200, E = 0.0536?
file S1C | conc. S = 4?, E = 0.0536
file S4C | conc. S = 10?, E = 0.0536?
file S5C | conc. S = 35, E = 0.0536?
file S6C | conc. S = 50, E = 0.0536?
file S7C | conc. S = 70, E = 0.0536?
file S7C | conc. S = 100, E = 0.0536?
file S8C | conc. S = 100, E = 0.0536?
file S8C | conc. S = 100, E = 0.0536?
```

[output]

directory ./results/progresscurves/Marchese/output

;-----

[task]

```
data = progress
task = fit
model = InbCompProd ?
```

[mechanism]

 $E + S \iff ES : k1 \text{ kmenos}1$ $ES \longrightarrow E + P : kcat$ $E + P \iff EP : k1 \text{ Koff}2$

[constants]

k1 = 100 kmenos1 = 272 ? kcat = 0.57 ? Koff2 = 3000000000 ?

[responses]

P = 0.00622

;------

[task]

data = progress task = fit model = InbInCompSubst ?

[mechanism]

```
E + S \iff ES : k1 \text{ kmenos1}
ES \rightarrow E + P : kcat
ES + S \iff ESS : k1 Koff3
[constants]
k1 = 100
kmenos1 = 4622 ?
kcat = 2.57 ?
Koff3 = 32592 ?
[responses]
P = 0.00622
;-----
[task]
data = progress
task = fit
model = inbInCompProd?
[mechanism]
E + S \iff ES : k1 kmenos1
ES \rightarrow E + P : kcat
ES + P <==> EPA \quad : k1 \ Koff
[constants]
k1 = 100
kmenos1 = 272 ?
kcat = 0.57 ?
Koff = 3000000 ?
[responses]
P = 0.00622
;-----
[task]
data = progress
task = fit
model = inbCompSubs?
[mechanism]
E + S \iff ES : k1 \text{ kmenos}1
ES \rightarrow E + P : kcat
```

```
[constants]
k1 = 100
kmenos1 = 272 ?
kcat = 0.57 ?
Koff = 300000 ?
[responses]
P = 0.00622
;-----
[task]
data = progress
task = fit
model = inbMixProd?
[mechanism]
E + S \iff ES : k1 kmenos1
ES \rightarrow E + P : kcat
E+P <==> EP \quad : k1 \ Koff1
ES + P \iff ESP : k1 Koff2
[constants]
k1 = 100
kmenos1 = 272 ?
kcat = 0.57 ?Koff1 = 300000 ?
Koff2 = 3000000 ?
[responses]
P = 0.00622
;-----
[task]
data = progress
task = fit
model = inbMixSubs?
[mechanism]
E + S \iff ES : k1 kmenos1
ES \rightarrow E + P : kcat
E + S \iff ESA : k1 Koff1
ES + S <==> ESSA \quad : k1 \ Koff2
[constants]
```

 $E + S \iff ESA : k1 Koff$

k1 = 100 kmenos1 = 272 ? kcat = 0.57 ? Koff1 = 30000 ? Koff2 = 30000 ?

[responses]

P = 0.00622

:-----

[task]

data = progress task = fit model = inbSubsANDProd?

[mechanism]

 $\begin{array}{l} E + S <===> ES & : \ k1 \ kmenos1 \\ ES --> E + P : kcat \\ E + S <===> ESA : k1 \ Koff1 \\ E + P <===> ESP & : k1 \ Koff2 \end{array}$

[constants]

k1 = 100 kmenos1 = 272 ? kcat = 0.57 ? Koff1 = 30000 ? Koff2 = 30000 ?

[responses]

P = 0.00622

[end]

Então o programa determinou os parâmetros cinéticos do modelo melhor ajustado, e a partir desses foi possível prever o comportamento das velocidades iniciais versus diferentes [NADPH] nas reações catalisadas pela TcP5CR.

2.7.2 Outras atividades enzimáticas

Além das atividades enzimáticas da biossíntese de L-Pro, outras atividades foram medidas para serem utilizadas como marcadores bioquímicos em frações celulares do parasita, nos ensaios de permeabilização seletiva com digitonina, descrito em 2.8.2 e 2.9.2. Na maioria delas foram medidos o consumo ou produção de NAD(P)H em tempo real por espectrofotômetro a λ_{340nm} , utilizando o $\epsilon_{NAD(P)H} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7.2.1 Hexoquinase (HQ)

A HQ foi utilizada como marcador glicossomal. Sua atividade foi determinada via à atividade acoplada da glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma[®]), a qual utiliza o 6-fosfo-D-gluconato produzido pela HQ para a redução de NADP⁺ que é detectada. Nesse ensaio a reação continha: 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,6, 8,0 mM de D-glicose, 9,6 mM de ATP sal sódica (Amresco[®]), 19 mM MgCl₂, 0,1 mM de NADP⁺ e 5 U/mL da enzima (CACERES, A. J. et al., 2003). A reação era iniciada pela adição de 100 µg de extrato celular total de parasitas e monitorada por 5 min a 28 °C. O branco da reação foi realizado com a mesma preparação sem a adição de glicose.

2.7.2.2 Piruvato quinase (PQ)

O ensaio de atividade para a enzima PQ, uma enzima de localização citoplasmática, também foi medido via a atividade acoplada. A PQ transfere um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato (PEP) para a adenosina difosfato (ADP), gerando ATP e piruvato, que por sua vez é convertido a lactato pela lactato desidrogenase via a oxidação de NADH, medido a λ_{340nm} . Neste caso, a reação era composta por: 39 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,6, 0,58 mM de PEP, 0,11 mM de NADH (Sigma[®]), 6,8 mM de MgSO₄ 7H₂O (Sigma[®]), 1,5 mM de ADP, 10 U de lactato desidrogenase (CAZZULO; CAZZULO FRANKE; FRANKE DE CAZZULO, 1989) e 100 µg de extrato celular total de parasitas que foi adicionado para iniciar a reação. O branco da reação era a mesma preparação sem a adição de PEP. As V₀ foram monitoradas por 3 min a 28 °C.

2.7.2.3 Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH)

O ensaio de atividade da P5CDH, uma enzima localizada na membrana interna mitocondrial, foi realizado mensurando a produção de NADH. A P5CDH oxida o P5C a L-glutamato comitantemente à transferência de elétrons ao NAD⁺. Por isso, nesse

ensaio, a reação continha: 80 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,2, 1,5 mM de NAD⁺ e 0,5 mM de DL-P5C (MANTILLA et al., 2015). A reação era iniciada pela adição de 100 μ g de extrato celular total de parasitas e monitorada por 5 min a 28 °C. O branco da reação foi realizado com a mesma preparação na ausência de DL-P5C.

2.7.2.4 Prolina desidrogenase (PRODH)

A atividade da PRODH foi medida via redução do corante diclorofenolindofenol (DCPIP) como aceptor de elétron. A reação continha: 25 mM MOPS pH 7,0, 11 mM MgCl₂, 0,26 mM de metossulfato de fenazina, 56 μ M de DCICP e 60 μ M de L-Pro (LAMOUR et al., 2005). Após a adição do extrato celular de parasitas, a redução do DCPIP era acompanhada a λ_{600nm} durante 5 min a 28 °C. As V₀ foram calculadas utilizando o utilizando o $\epsilon_{DCPIP} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.8 Determinação da localização sub-celular das enzimas TcP5CR e TcP5CS

Os anticorpos policionais produzidos contra a TcP5CR e a TcP5CS foram utilizados em ensaios de imunofluorescência, a fim de determinar a localização subcelular das enzimas em estudo, juntamente com alguns ensaios bioquímicos descrito anteriormente.

2.8.1 Imunolocalização

Parasitas (5 x 10^6 células/mL, formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, tripomastigotas e amastigotas) foram lavados duas vezes com PBS e fixados em tubos com 3% p-formaldeído (p/v) durante 20 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram novamente lavados por duas vezes, aderidos em lâmina de vidro e permeabilizados com 0,1% triton X-100 (v/v) durante 5 min a temperatura ambiente. Após a lavagem rigorosa até a completa retirada de resquício de detergente, procedeu-se o bloqueio dos parasitas com 1% BSA (p/v) por 30 min. Posteriormente, adicionou-se na lâmina o anticorpo primário anti-TcP5CR ou anti-TcP5CS [ambos diluídos 1:200 em PBS suplementado com 1% BSA (p/v)] e anti-malato desidrogenase citosólica (anti-MDH) [diluído 1:400 em PBS suplementado com 1% BSA (p/v)] e incubou-se por 1 h ou mais. O anticorpo anti-MDH foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. Cristina Nowicki (Universidad de Buenos Aires, Argentina). Ao fim do período de incubação, lavou-se a lâmina por cinco vezes com PBS e adicionou-se os anticorpos secundários, anti-IgG de camundongo conjugado à sonda Alexafluor488 (Invitrogen[®]) e anti-IgG de coelho conjugado à sonda Alexafluor546 (diluídos 1:400 em PBS, 1% BSA p/v). Após 10 min de incubação a temperatura ambiente e protegida da luz, adicionou-se a sonda *Hoechst 33258* (Invitrogen[®]) [diluído 1:2000 em PBS suplementado com 1% BSA (p/v)] e prolongou-se a incubação por mais 20 min. Por fim, concluíu-se a montagem da lâmina, pela adição de uma gota do reagente *Fluoromount-G* (Southern Biotech[®]), e a selou com esmalte de unhas. As lâminas foram visualizadas em microscópio de fluorescência *Leica Microsystems* DMI6000B/AF6000 acoplado com sistema de câmera digital DFC 365 FX em objetiva de 100X da qual as imagens obtidas foram editadas e sobrepostas através do programa *ImageJ* v1.4p (NIH). Ou ainda algumas lâminas foram visualizadas em microscópio confocal Olympus IX81 em objetiva de 100X 1.35NA da qual as imagens foram obtidas por séries z de 0.2 µm. Em seguidas estas imagens foram deconvoluídas usando Autoquant X2.1.

2.8.2 Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina

Ainda a fim de determinar a localização subcelular das enzimas TcP5CR e TcP5CS, epimastigotas foram permeabilizados com diferentes concentrações de digitonina, de forma que possibilita a liberação do conteúdo de distintas frações subcelulares gradualmente conforme o aumento da concentração de digitonina, como descrito por Marciano e colaboradores (MARCIANO et al., 2008). Brevemente, 2 x 10⁹ epimastigotas foram lavadas duas vezes com tampão PBS e ressuspensos em 1 mL de tampão TSEB [20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µL de cocktail de inibidores de protease (Sigma[®])] suplementado com concentrações crescentes de digitonina (entre 0 - 2.5 mg/mL) (Sigma[®]). Os parasitas foram incubados por 5 min a 25 °C e centrifugados durante 2 min a 18000 g. Os sobrenadantes foram separados e os precipitados foram ressuspensos em 0,5 mL de tampão TSEB e submetidos a sonicação (3 ciclos de 20 s a 40% de amplitude e 1 min incubado no gelo). Em cada fração foi determinada a atividade enzimática correspondente, como descrito em 2.7.3, à piruvato quinase (EC 2.7.1.40), hexoquinase (EC 2.7.1.1) e Δ^1 -pirrolina-5carboxilato desidrogenase (EC 1.5.1.12) para serem utilizadas como marcadores de enzimas citosólica, glicossomal e mitocôndrial, respectivamente. Essas atividades foram expressas em % de atividade comparadas com o obtido para o lisado total do parasita. As amostras também foram analisadas por *western blot*, utilizando os soros policionais anti-TcP5CR e anti-TcP5CS, e os anti-soros contra marcador citosólico, a tirosina aminotransferase de *T. cruzi* (TcTAT), glicossomal, a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (TcGAPDH) e mitocondrial, a isoforma de mitocôndria aspartato aminotransferase de *T. cruzi* (mASAT). Os anticorpos anti-TAT e anti-ASAT também foram gentilmente cedido pela Profa. Dra. Cristina Nowicki (Universidad de Buenos Aires, Argentina).

2.9 Avaliação funcional da TcP5CR na biologia de T. cruzi

2.9.1 Validação do papel de transidrogenase da via de biossíntese (a partir de P5C) e de degradação de L-Pro

2.9.1.1 Verificação da saída do intermediário da via, o P5C, a partir da mitocôndria em direção ao citoplasma

Nesse experimento foram utilizados T. b. brucei que acumulam P5C quando o gene TbP5CDH é silenciado por RNA de interferência (^{RNAi}TbP5CDH) através de um sistema induzível por tetraciclina (MANTILLA et al., 2017). Procíclicos de linhagem selvagem (Cepa 427, clone 29.13) (wt) e RNAiTbP5CDH foram cultivados em meio SDM79 (descrito em 2.2.3) por 72 h na na ausência (tet -) e na presença de 0,5 µg/mL tetraciclina (tet +). Após esse período foram lavados duas vezes com tampão BAG e ressuspendidos a uma concentração final de 2 x 10⁹ parasitas/mL no mesmo tampão suplementado com 1 mM de L-Pro, 0,1 mM flavina adenosina dinucleotídeo (FAD, Sigma[®]), 1 mM PMSF, 4 µg/mL aprotinina, 10 µg/mL TLCK e 10 µM E-64 e 1,2 mM de digitonina. Os parasitas foram incubados por 1 h a 28 °C e em seguida 20 µL da suspensão dos mesmos foram utilizadas para cada ensaio de atividade das enzimas PRODH e PK, como marcadores respectivamente mitocondrial e citosólico. Dada a confirmação da integridade mitocondrial e da lise do citoplasma, pelas atividades da PRODH e PK, outros 20 µL da suspensão dos parasitas foram utilizados no ensaio de atividade da TcP5CR. Nessa reação continha: 100 mM Tris-HCl pH 7,0, 35 µM NADPH, 1,5 µg de TcP5CR recombinante e 20 µL da suspensão dos parasitas como substrato. Então a concentração de P5C em cada suspensão foi determinada, através da atividade da TcP5CR obtida em cada amostra, utilizando o K_M previamente

determinado para o P5C e a velocidade máxima calculada no ensaio de atividade com 0,5 mM de DL-P5C como substrato.

2.9.2 Obtenção e caracterização de procíclicos expressores da TcP5CR

Com o intuito de avaliar se a capacidade de produzir L-Pro levaria à resistência ao estresse nutricional em *T. b. brucei*, construiu-se uma linhagem procíclica mutante de expressão heteróloga de TcP5CR.

Tripanossomas procíclicos em fase exponencial foram lavados duas vezes em tampão "Cytomix" (2 mM EGTA, 5 mM MgCl₂, 120 mM KCl, 0,5% de glicose (p/v), 0,15 mM CaCl₂, 0,1 mg/mL de BSA, 10 mM de tampão fosfato de potássio, 1 mM hipoxantina e 25 mM de Hepes, pH 7,6). Esses parasitas em uma densidade de 2 x 10^7 células/mL num volume final de 500 µL foram transfectados com 10 µg de construção pLEW100-TcP5CR (preparação descrita em 2.4.11) e ou com água estéril, como controle, através de dois pulsos de eletroporação (1500 V e 25 µF) realizados pelo eletroporador Gene Pulser[®] (BioRad Systems[®]). Logo em seguida, os parasitas eletroporados foram incubados por 10 min no gelo e então recuperados com 500 µL de SFB puro. As células foram diluídas em 10 ml de meio SDM79 H/G-418 suplementado com 15% de SFB (v/v) e 5 µg/mL de fleomicina. Metade, 5 mL, dessas suspensões celulares foram transferidas a garrafas de 25 cm² e incubadas a 28 °C para a recuperação dos transformantes. Os restantes foram semeados em placas de 96 poços em diluições seriadas (1:10) até diluição limitante de 1 célula/poço. Nessa diluição seriada as células foram semeadas em meio volume de SDM79 novo e meio volume de SDM79 condicionado, oriundo de uma suspensão celular em fase exponencial. As placas também foram mantidas a 28 °C até o aparecimento de clones. Estes foram ampliados, mantidos na ausência e presença de 0,5 µg/mL de tetraciclina por 72 h e então a expressão da TcP5CR foi avaliada por western blot. Após a seleção dos clones, as culturas foram mantidas a 25 °C e em meio SDM79 H/G-418 suplementado com 10% de SFB (v/v) e 2,5 µg/mL de fleomicina. Um clone foi escolhido para a análise detalhada de DNA, mRNA, de proteína para a TcP5CR e de crescimento celular.

2.9.3 Caracterização da resistência ao estresse nutricional de procíclicos expressores da TcP5CR

A fim de avaliar se a presença de uma P5CR em *T. b. brucei* confere resistência ao estresse nutricional avaliamos a viabilidade dos procíclicos expressores da TcP5CR privados de nutrientes. Entretanto, como vimos anteriormente, os pools de NADPH citoplasmáticos são fundamentais à atividade desta enzima. Por isso, decidimos primeiramente avaliar se os cofatores NAD(P)H são transportados do meio extracelular ao interior desses parasitas. E em seguida, uma vez demonstrado a existência deste transporte em procíclicos, determinamos se estes cofatores são essenciais na resistência ao estresse nutriconal, ao incubar estes parasitas com os cofatores NAD(P)H durante o perído de jejum.

2.9.3.1 Verificação do transporte de NAD(P)H ao interior de procíclicos de T. b. brucei

Formas procíclicas em fase exponencial foram lavadas duas vezes em PBS e 2 x 10^7 parasitas/mL foram incubados com 0,1 mM NADH ou com 0,1 mM NADPH em um volume final de 1,5 mL. Imediamente, 350 µL de cada suspensão foi centrifugado a 4 °C a 3000 g por 5 min, e lavado com PBS gelado, enquanto o restante da suspensão foi mantido a 25 °C. Após 30 min, 1 h e 2 h de incubação, 350 µL de cada suspensão foi tomado e lavado da mesma maneira. Após as lavagens, logo em seguida os parasitas de cada alíquota foram ressuspendidos em 350 µL de PBS, distribuídos em placa de 96 poços com 100 µL/poço. Então a emissão de fluorescência (λ_{exci} 340 nm, λ_{emi} 445 nm) de cada suspensão de parasitas foi mensurada em leitor de microplacas SpectraMax[®]i3 (Molecular Devices) e assim como a de 100 µL/poço de PBS utilizada como branco.

2.9.3.2 Ensaio de viabilidade celular

A viabilidade celular de procíclicos de linhagem selvagem (Cepa 427, clone 29.13) (wt) e expressores de TcP5CR (Tb^{TcP5CR+}) foi avaliada através da redução de resazurina (Alamar Blue[®]) (RISS et al., 2004). Estes parasitas foram cultivados por 48h na ausência (tet -) e na presença de 0,5 μ g/mL tetraciclina (tet +). Em seguida, foram lavados duas vezes com PBS gelado (1000 g por 10 min a 4 °C) e tiveram sua densidade ajustada para 2 x 10⁷ parasitas/mL em PBS, em PBS suplementado com 0,1 mM NADH

(PBS-NADH) ou em PBS suplementado com 0,1 mM NADPH (PBS-NADPH) em 1 mL de volume final. Imeditamente, 400 μ L de cada suspensão foi distribuído em placa de 96 poços com 100 μ L/poço e foi adiconado em cada poço aproximadamente 12,5 μ g/ μ L de resarzurina (10 μ L de solução estoque a 125 μ g/ μ L) para quantificar a viabilidade inicial das culturas. Como controle a resarzurina também foi adicionada em PBS, PBS-NADH e PBS-NADPH, como brancos de leituras em relação às obtidas com os parasitas incubados nas respectivas soluções de PBS. A placa então foi incubada por 2 h a 25 °C e protegida da luz. Em seguida foi mensurado a emissão de fluorescência (λ_{exci} 560 nm, λ_{emi} 590 nm) de cada suspensão de parasitas e de cada branco em leitor de microplacas SpectraMax[®]i3 (Molecular Devices). Após de 4 h de incubação em PBS, PBS-NADH e PBS-NADPH a 25 °C, os parasitas tiveram a viabilidade quantificada da mesma maneira descrita.
CAPÍTULO 3: RESULTADOS

3.1 Busca *in silico* dos genes putativos envolvidos na biossíntese de L-Pro em *T. cruzi*.

Um primeiro indício da presença funcional da via de biosíntese de L-Pro a partir de L-Glu é a presença de genes putativos para as enzimas participantes nessa via nas bases de dados dos genomas dos organismos sendo investigados. Portanto, o primeiro passo deste trabalho consistiu na busca dos genes putativos para as enzimas TcP5CS e TcP5CR nas bases de dados do genoma de *T. cruzi*.

3.1.1 Identificação das sequências codificantes para a TcP5CS

Três genes putativos foram encontrados ao buscar a sequência codificante para a TcP5CS no genoma de T. cruzi (cepa CL-Brener) na base de dados TrytripDB. Dois deles são haplótipos com códigos de acesso Tc00.1047053509067.70 (TcP5CS1) e Tc00.1047053511023.10 (TcP5CS2), e que não apresentam códon de iniciação da tradução ATG. O outro, de nome sistemático Tc00.1047053503749.5 (TcP5CS3), está predito como um possível fragmento do gene codificante da TcP5CS. Como já mencionado, em alguns organismos a reação de síntese de P5C apartir de L-Glu esta dividida em dois passos catalisados por duas enzimas distintas, a y-glutamil quinase (GK) e a y-glutamil fosfato redutase (GPR), enquanto que em outros, essas duas reações são catalisadas por uma enzima bifuncional. Portanto, também se buscaram genes preditos para a P5CS no banco de dados do Sanger Center nos genomas de T. cruzi de outras cepas, a fim de verificar se haveria sequências putativas maiores, cujo produto gênico fosse compatível com uma P5CS. Essa busca revelou a sequência TcSYLVIO_005298 (TcP5CS) de T. cruzi Sylvio X10/1. Um alinhamento comparando as sequências de aminoácidos para esses genes putativos mostrou que a TcP5CS possui regiões ausentes nas outras (resíduos desde Phe¹¹⁰ a Ile³⁰⁰), o que poderia significar que essa sequencia esta mais completa. Sob essa hipótese propomos que TcP5CS poderia servir como molde para as buscas e análise das outras sequencias preditas, como é demonstrado nas regiões do alinhamento (figura 2) destacadas em caixas. As porcentagens de identidade obtidas entre as sequências de CL-Brener: TcP5CS1 (452 aa), TcP5CS2 (398 aa) TcP5CS3 (109 aa) em relação a de Sylvio X10/1 TcSYLVIO_005298 (752 aa) foram de 98% e 99%.

	<u>i</u>	ιọ	2 <u>0</u>	зọ	4 <u></u>	5 <u>0</u>	еò	7 <u>0</u>	8 <u>0</u>	эò	100	110	120	130
TcP5CS TcP5CS1	MATVPLPVI	ERKRLDHI	T S R K D L K F #	AKRIVLKAGTS	TIVTESGFP	SVRRISNIAEE	EIFALRSEGK	EVVFVSSGAC	GIGRNVLRRQD	VMVCSAFDI	RLHRNCRPFSS	SIGNNTFAAAG	QANLMNLYQ:	IVFQQLD
TcP5CS2		ERKRIDHT	TSEKDLKER		TIVTESCEP			EVVEVSSGAC	GIGENVIEROF	VMVCSAFDE	RIHENCEPESS	TGNNT		
TUFBUBB	MAIVEVEVE	DRAADDAI	ISKKDBREF	INKIVDARGIS	<u>, , , , , , , , , , , , , , , , , , , </u>	JVKKI SNIKLI	LINDROLON	LIVEVSSGAC	GIGKNVERKUL	WINCOALDI	MINKNOKF 150	<u></u>		
	1.	٩ò	150	ıeö	17 <u>0</u>	180	190	200	210	220	230	240	250	260
TcP5CS TcP5CS1	ITLAELLL	THHDFLTD	DRRENLQDA	ALDNLLSLGIV	PVVNENDTV	TANRNNTSNDI	PFTDNDGLSS	LVARTINADL	LIILTDVDGLY	DLPPSDPKA	ARLITTFAPDN	NAVVFGAKSPI	GRGGMNAKI	AASLAAV
TcP5CS2														
1042023			• • • • • • • • •											
	2	7 <u>0</u>	280	290	3 0 Q	310	320	330	340	35 Q	360	37 <u>0</u>	380	390
TcP5CS	RGGVPAVC	ICSGHRMG	TIGELLQGH	K P N V G T L F V R D	PIDLIASEA	AAAEGRRTMEH	KSAREAREGS	RKLNTLSYLE	RKKILLEVANA	LDTNRDKII	DANAVDLRVA	AVESNLAPSLI	KRLELTHGK	DTVVSG
TcP5CS2										LDINKDKII	GRNAVDLRVA	AVESNLAPSLI AVESNLAPSLI	KRLELTHGK	LDTVVSG
TcP5CS3					· · · · · · <u>· · · · ·</u>						<u></u>	<u></u>		<u></u>
	4	o o	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520
TcP5CS	IKAIAEDKI	PLARVLS	ARMLDQNLV	LCKETASIGV	LLVIFESRPI	SMPQIAALAI	LSSGNGLLLK	GGREAEHSNA	AIHSVIVEAVI	KASEGKVP	GVISLVTSRA	ADVYELLKLEG	FIDLVIPRG	NEMVRN
TcP5CS2	IKAIAEDKI	DPLARVLS	ARMLDQNL\ ARMLDQNL\	/LCKETASIGV /LCKETASIGV	LLVIFESRPI	DSMPQIAALAI DSMPQIAALAI	LSSGNGLLLK LSSGNGLLLK	GGREAEHSNA	AIHSVIVGAVI AIHSVIVEAVI	KASEGKVP	GVISLVTSRA	ADVYELLKLEG ADVYELLKLEG	FIDLVIPRG	SNEMVRN SNEMVRN
TcP5CS3	<u></u>								<u></u>		· <u> </u>			
	5	3.0	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650
TcP5CS	IQRSTNIP	VLGHADGI	CHVYVHPDF	ADMNMAAKVII	DAKLNYPAA	CNAAETVLFHF	RATVENGDAK	ILVEKMKEAG	IKIYGGPKAI	ASLARAGA	/SMHTEYGDEÇ	QITVEVVEDMD	AAVDHINKY	SHHTEC
TcP5CS1 TcP5CS2	IQRSTNIP	VLGHADGI VLGHADGI	СНVҮVНРD/ СНVҮVНРD/	ADMNMAAKVII ADMNMAAKVII	DAKLNYPAA	CNAAE TVLFHF CNAAE TVLFHF	RATVENGNAK RATVENGDAK	I LVE KMKEAG I LVE KMKEAG	IKIYGGPKAI IKIYGGPKAIA	ASLARAGA	ASMHTEYGDEÇ /SMHTEYGDEC	QITVEVVEDMC DITVEVVEDMC	AAVDHINKY AAVDHINKY	SHHTEC SSHHTEC
TcP5CS3	<u></u>											•		<u></u>
			670	6 8 0	600	700	710	7.2.0	730	740	7 5 0			
TcP5CS	ILTSNVDT	s ç ASDFVRRV	DSACVFHNO	CSTRFADGYRF	GLGAEVGIS		JVEGLLTOKW	VLRPIDPELY	ATVAEFOSGEF	TFTHEDITN	NAMILOEEN			
TcP5CS1	ILTSNVDT	ASDEVRRV	DSACVFHNO	STRFADGYRF	GLGAEVGIS	GRIHARGPVO	SVEGLLTQKW	VLRPIDPELY	ATVAEFQSGEF	TETHEDIT	NAMILQEEN			
TcP5CS3					GLGAEVGIS.			• 5KF 10F 6 5 1			ANT DYDEN			

Figura 2 - Alinhamento múltiplo das sequências P5CS de T. cruzi.

Os resíduos conservados estão em caixa aberta e os pontos indicam os *gaps* do alinhamento. O alinhamento mostra similaridade das sequências preditas em CL-Brener em relação a sequência predita em Sylvio X10/1 que aparece como molde. O resíduo putativo do sítio ativo de TcP5CS está indicado por estrela. As sequências foram alinhadas com a ferramenta CLUSTAL Ω (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) e a imagem construída com a ferramenta ESPript 3.0 (http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php).

Ao buscar domínios funcionais para essas sequências, foi evidenciada a ausência de domínios críticos para a bifuncionalidade das sequências de CL-Brener (figura 3). Os genes haplótipos codificam sequências que apresentam domínios típicos da família aldeído desidrogenase (ALDH) (figura 3 A e B) na região C-terminal. A sequência codificada por Tc00.1047053503749.5 contém o domínio de aminoácido quinase (AA_kinase) na região N-terminal (figura 3 C). Em contraste, na sequencia de aminoácidos deduzida do gene encontrado na cepa Sylvio X10/1 estão presentes os dois domínios característicos de P5CSs (figura 3 D): o da família da AA_kinase na região N-terminal e o da ALDH na região C-terminal (HU et al., 1999). Essa análise, portanto, mostrou de forma consistente que o *T. cruzi* (cepa Sylvio) possui uma sequencia putativa para a atividade TcP5CS.



Figura 3 - Domínios proteicos encontrados para as sequências TcP5CS.

Através da base de dados *InterProscan* encontrou-se os domínios preditos para as sequências de TcP5CSs. Os códigos de acesso nas bases de dados Pfam (PF), *InterProscan superfamily* (SSF), CATH *superfamily* (G3DSA), *pantherdb* (PTHR), HAMAP *family profile* (MF), PROSITE (PS), Protein Information Resource (PIR) estão mostrados à esquerda. E na direita estão indicados os nomes dos domínios (minúscula) ou superfamílias proteicas (maiúscula).

Na busca de sequências de aminoácidos homólogas em outros tripanossomatídeos (TrytripDB), não se encontraram sequências putativas para P5CS no

genoma de T. b. brucei e nem de outro genoma do gênero Trypanosoma. Porém encontram-se sequencias putativas para essa enzima nos genomas de *Leishmania* spp., como L. infantum, L. braziliensis, L. major, L. dovani e L. mexicana. Dentre essas escolheu-se a sequência da L. mexicana para ser analisada, por pertencer ao mesmo complexo, complexo L. mexicana, que a L. amazonesis, espécie utilizada neste trabalho (ASATO et al., 2009). Além dessa sequência de L. mexicana, outras ortólogas presentes em diferentes organismos foram analisadas e comparadas com a TcSYLVIO_005298, denominada a partir daqui TcP5CS. Entre as ortólogas escolhidas estão a GK (ScPRO1) e GPR (ScPRO1) de Saccharomyces cerevisiae que em conjunto desempenham a função da P5CS. Essa análise revelou que a sequência de T. cruzi apresenta uma maior identidade à de L. mexicana (60%) em relação às outras (~40% de identidade). Previsívelmente, a ScPRO1 de S. cerevisiae resultou a mais distante, mostrando uma menor identidade 28%. Apesar da análise realizada apontar para uma semelhança consistente entre a P5CS usada como padrão, e a sequência de L. mexicana (479 aa), chama a tenção que nessa ultima estão ausentes os três principais resíduos (Lys¹⁵, Asp¹⁵⁶, Lys²²⁵) envolvidos na catálise (domínio de aminoácido quinase) (figura 4) (MARCO-MARIN et al., 2007; PEREZ-ARELLANO et al., 2010).

0		•		0		0						
6-5501					i	10	↓ 2 ọ	зọ	4 <u>0</u>	5 <u>0</u>	eó	70
SCPRO1 ScPRO2 HsP5CSlong AtP5CS2					MKDA		IKLGSSSLVDE.	CTREPRLAIM:	SLIVETVVKLI	REMGHEVIIV	SSGGIAVGLF	KIMRMNK
	MLSQVIRCGPOPPNQHLLPW	·····			MTEIDRSRA	FAKDVKRIV	VKVGTAVVTG.	KGGRLALGRL	GAICEQLAEL	NSDGFEVILV	SSGAVGLGR	QRLRYRQ
TcP5CS			м	LATVPLPVERK	RLDHITSRK	DLKFAKRIV	LKAGTSTIVT.	ESGFPSVRRIS	SNIAEEIFALH	RSEGKEVVFV	SSGACGIGRN	IVLRRQD
		вò	эò	100	110	120	130	140		150	160	170
ScPRO1 ScPRO2	R	PKHLAEVQAIAAIO	GQGRLIGRWDLLF	SQFDQRIAQI	LLTRNDILD	WIQYKNAQN	TINELLNMGVI	PIVNENDTLSV	VRE	IKFGDN	DTLSAITSAI	LIHADYL
HsP5CSlong AtP5CS2	LLSQSVRQALHSGQNQLKEM LVN.SSFADLOK.	AIPVLEARACAAAG	QSGLMALYEAMF OSSLMAYYETMF	TQYSICAAQI	LVTNLDFHD	EQKRRNLNG	TLHELLRMNIV TVKAMLRMRVI	PIVNTNDAVVE PVFNENDAIS1	PPAEPNSDLQC	SVNVISVKDN	DSLAARLAVE	EMKTDLL
LmP5CS TcP5CS	VMVCSAFDRLHRNCR	PFSSIGNNTFAAAG	GOANLMNLYOTVF	OQLDITLAEL	LLTHHDFLT	DDRRENLOD	ALDNLLSLGIV	VVNENDTVT#	ANRNNTSNI		DGLSSLVARI	
						-						
ScPR01	FLLTDVDCLYTDNPRTNPDA	.MPILVVPDLSKGLE	ZIQ GVNTAGGSGSDV	ZZQ GTGGMETKLV	Z30 AADLATNAG	VHTLIMKSD	TPANIGRIVE.	Z69 YMQTLELDDE1	NKVKQAYNGDI	LTDLQK		
ScPRO2 HsP5CSlong	IVLSDVEGLFDSPPGSDDAK	LIDIFYPGD	QQSVTFGTKSRV	GMGGMEAKVK	AALWALQGG	TSVVIANGT	HPKVSGHVITD	IVEGK	.KVGTFFSEVH		MSSSQQ PAGPTVEQ	QIAKN AR QQGEM AR
AtP5CS2 LmP5CS	ILLSDVEGLYTGPPSDSTSK	LIHTFIKEK	IQDEITFGEKSKL	GRGGMTAKVK	AAVNAAYGG	VPVII.TSG	YAAENISK	VLRGL	.RVGTLFHQD/	AHLWAP	VVDTTSRI AAADVSAMRF	DMAVA AR RYAEE AR
Tepses	IILTDVDGLYDLPPSDPKAR	LITTPAPD	.NAVVFGARSPT	GRGGMNAKIA	ASLAAVRGG	VPAVCICSG	HRMGTIGE	LLQGK	PNVGTLFVRD	PIDLIASEAA	AAEGRRIMEF	KSARE AR
ScPP01		300 נועשאע תואג ובאדעד	310 32	0, 33			350 GUTRACVIDVO	360 STEHELECYDD	JK VCK K JPDG1	380 דס ה פשמת לי	VG KARC	390 NYT
ScPRO2 HsP5CS1opg	KAGNIKTISNEGRSDILYK SGGRMUATLEPEOBAEITHH	IHDALKANAHAIEE	ANKID	. LAVAK.ET	GLADSLLKR	LDLFKGDKF	EVMLOGIKDVA	ELEI SSOI	PVGKVKMARI	ELDDGLTLYQ	VTAPVGVLLV	/IFESRP
AtP5CS2 LmP5CS	ESSRKIQALSSEDRKQILHD AGSSAISDLTYAEROTMLBA	IANALEVNEKTIKA VAKALOTNEABILE	AENDLD	VAAAQ.EA	GYEESLVAR AIADPLLKR	LVMKPG.KI	SSLAASVROLA ATLIEGISTLA	E	PIGRVLKKTO	VADDLILEK	TSSPIGVLLI OTAPIGVVLV	VFESRP
TcP5CS	EGSRK I NT LS YLE R KK IL LE	V AN AL D T N RDK I LI	ANAVD	LRVAV.ES	NLAPSLLKR	LELTHG.KI	DTVVSGIKAIA	EDK	PLARVLSARN	LDQNLVLCK	ETASIGVLLV	/IFESRP
		400								410	420	
ScPRO1 ScPRO2	SSELTKIK Evianitalsiksgnaailk	GLHSDQIE GGKESVNTFREMAR	IVNDTIAQFQSE	TGVPVGS V QL	ietrodvsd	i.c. i.d. deyid	LVVPRGSNALV	RKIKDT.TKII	PVLGHADGIC	GY S IYL DEDAD L	NDSEY VA HRE IK A KR I SL D A	ENLA FP P A K TN YPA
HsP5CSlong AtP5CS2	DCLPQVAALAIASGNGLLLK DALVQIASLAIRSGNGLLLK	GGKEAAHSNRILHI GGKEARRSNAILHF	U IT D A I P.ETVG	GKEA V QL	VNTREEVED VTSREEIPD	LCRLDKMID LLKLDDVID	LIIPRGSSQLV LVIPRGSNKLV	RDIQKAAKGII SQIKNS.TKII	PVMGHSEGIC PVLGHADGIC	H MYV DSEAS V H VYV DKSGK L	DKVTRLVRDS DMAKRIVSDA	SKCEYPA AKLDYPA
LmP5CS TcP5CS	ESLPQIASLALCSGNGLLLK DSMPQIAALALSSGNGLLLK	GGREGEHSNAVLHI GGREAEHSNA AI HS	VIVSAVE.SSTQ VIVEAVT.KASE	GRVPRGI I GL GKVPPGV I SL	VTNRADVYS VTSRADVYE	LLQLDEHID LLKLEGFID	LVVPRGSNAMV LVIPRGSNEMV	QNIQRF.TRII RNIQRS.TNII	PVLGHADGIC PVLGHADGIC	H VYV HKDAD V H VYV HPDAD M	da a la vaid # nm a ak vi i d #	AKLNYPA AKLNYPA
	Ŧ											
ScPRO1	R	WEVIENLTLE	GGNTIHATKDIK	TAYEDKINEL	GKLTEALOC		DEDKEPLSLDL					
HsP5CSlong AtP5CS2	ACNALETLLIHRDLLRTPL. ACNAMETLLVHKDLEON.	FDQIIDMLRV	KGVKIHAGPK		FASY	LTFSPSEVK	SLRTEYGDLEL SFHHEYSSKAC	IEVVDNVQD	AIDHIHKYGS: AIDHIHOHGS	HTDVIVTED	ENTAEFFLQE	VDSACV
LmP5CS TcP5CS	ACNASETLL LHRDLLHSPAH ACNAAETVL FHRATVEN	GTTAAQF L VNGMTE GDAKI L VEKMKE	AG V SFYAGPQ AG I KIYGGPK		AIA.	AGLASEPAA ASLARAGAV	SLHM EY GDAHM SMHT EY GDEQI	IVEVVDDLAA IVEVVEDMDA	AIAHVNRHGSI AVDHINKYGSI	HTDAILTVD	KAAAAEFQRF VDT A SDFVRF	RVESACV RVDSACV
ScPR01												
ScPRO2 HsP5CSlong	YWNASTRFADGFRYGFGAEV FWNASTRFSDGYRFGLGAEV	GISTSKIHARGPVG	LDGLVSYQYQIR LEGLLTIKWLLR	GDGQVASDYL GKDHVVSDFS	GA		.GGNKAFVHKD .HGSLKYLHEN	DIKTVTL. PIPQRNTN.				
AtP5CS2 LmP5CS	FHNASTRFSDGFRFGLGAEV FHNCSTRFADGFRFGLGAEV	GISTSRIHARGPVG	VEGLLTTRWIMR VEGLLTQKWVLK	GKGQVVDGDN PMASSPEATA	G DSVAAAAAN	VPYATVTEF	QKGQRVFTHKD	TRKLQDEAA	ENGI GWRLQA			
TOPSUS	EUMOSIKENDGIKEGTGAEV	GISTGRIHARGPVC	SVEGLIIQKWVLR	FIDE		LLIAIVAEP	OSCEVIE I HED	LINWHITOFFL	N			

Figura 4 - Alinhamento das sequências de TcP5CS com alguns de seus ortólogos

Em preto se indicam os aminoácidos idênticos às seis sequências, em negrito e em caixas os resíduos conservados e os pontos indicam os *gaps* do alinhamento. As flechas estão indicando os resíduos do sítio ativo de TcP5CS e os círculos indicam os dois aminoácidos presentes na forma longa da P5CS de *Homo sapiens* (HsP5CS1long) (P54886). ScPRO1, GK de *Saccharomyces cerevisiae* (S000002708); ScPRO2, GPR de *Saccharomyces cerevisiae* (S000005850); AtP5CS2, P5CS de *Arabidopsis thaiana* (P54888); LmP5CS, P5CS de *Leishmania mexicana* (E9B397), TcP5CS, P5CS de *Trypanosoma cruzi* (K4E0F1). As sequências também foram alinhadas com a ferramenta CLUSTALΩ (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/) e a imagem construída com a ferramenta ESPript 3.0 (http://espript.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php).

Para iniciar a caracterização fisicoquímica do produto proteico do gene *TcP5CS* estimamos alguns parâmetros via composição de aminoácidos de TcP5CS, como o ponto isoelétrico de 5,93; massa molecular de 81253,8 Da e o coeficiente de extinção molar foi de 21.890 M⁻¹ cm⁻¹ a 208 nm em água, assumindo que os resíduos de cisteína estão reduzidos, ao utilizar a ferramenta ProtParam (ExPASy).

3.1.2 Identificação das sequências codificantes para a TcP5CR

Na base de dados do TrytripDB, dois genes putativos codificantes para P5CR de Τ. cruzi foram encontrados seguintes números sistemáticos com os Tc00.1047053506857.20 e Tc00.1047053509207.90. Através do programa BLASTP (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast). Ao analisar as sequências de aminoácidos preditas a partir desses dois genes vimos que estas apresentam 99% de identidade. Por isso, foi aleatoriamente a sequência de codificada escolhida aminoácidos por Tc00.1047053509207.90 para adotarmos como a de referência (TcP5CR).

Assim como para a TcP5CS, buscou-se a presença de domínios funcionais para a TcP5CR. Nessa análise, observou-se que essa sequência possui os dois domínios característicos das P5CRs: domínio de ligação à dinucloetídeo [NAD(P)-binding] na região N-terminal (1-158 aa) e o domínio proC pertencente a superfamília 6-fosfogluconato desidrogenase (6pgd) na região do C-terminal (160-265 aa) (FORLANI et al., 2015; MENG et al., 2006) (figura 5). Ainda na região C-terminal foi predito um domínio de dimerização (p5cr_dimer) que baseado nas primeiras estruturas cristalográficas de P5CR em *Neisseria meningitides* e em *Streptococcus pyogene* forma um gancho que sustenta a formação do dímero e também contribui com a formação do sítio ativo (NOCEK et al., 2005).





Os domínios preditos para a TcP5CR foram encontrados através da base de dados *InterProscan*. Os códigos de acesso nas bases de dados Pfam (PF), *InterProscan superfamily* (SSF), CATH *superfamily* (G3DSA), *pantherdb* (PTHR), HAMAP *family profile* (MF), PROSITE (PS), Protein Information Resource (PIR) estão mostrados à esquerda. E na direita estão indicados os nomes dos domínios (minúscula) ou superfamílias proteicas (maiúscula).

Na busca de sequências de aminoácidos ortólogas, inicialmente a TcP5CR foi analisada em relação a outras sequências preditas de tripanossomatídeos (TriTrypDB) por alinhamento múltiplo. Foram encontrados ortólogos para várias espécies de *Leishmania* spp., pelo mesmo motivo já citado em 3.1.1.1. Novamente, escolheu-se a sequência putativa em *L. mexicana* como a representativa do gênero. Também, encontraram-se sequências ortólogas em *T. b. brucei*, *T. congolense*, *T. vivax* e *T. b. gambiense*. O alinhamento mostrou que em média, as sequências de organismos do gênero *Trypanosoma* apresentam cerca de 65% de identidade em relação a *T. cruzi*, enquanto que a sequência encontrada em *L. mexicana* apresenta 54% (figura 6).



Figura 6 - Alinhamento das sequências de TcP5CR presentes em tripanossomatídeos.

Os aminoácidos idênticos entre todas as sequências estão marcados em preto, e os conservados estão em negrito e em caixas, os pontos indicam os *gaps* do alinhamento. Em colorido estão os motivos conservados: o A (em rosa), o B (em azul), o C (em roxo), o D (em verde) e o E (em laranja), que serão descritos a seguir. O quadro em azul escuro representa o motivo dobra de Rossmann e o quadro em marrom os resíduos envolvidos na interface de dimerização. As sequências utilizadas no alinhamento foram: LmexP5CR, P5CR de *Leishmania mexicana* (E9APJ2); TcruziP5CR, P5CR de *Trypanosoma cruzi* (Q4DH60); TvivaxP5CR, P5CR de *Trypanosoma vivax* (TvY486_0702280), TcongP5CR, P5CR de *Trypanosoma congolense* (TcIL3000_7_1750), TbgambienseP5CR, P5CR de *Trypanosoma brucei gambiense* (Tbg972.7.2720) e TbbruceiP5CR, P5CR de *Trypanosoma brucei brucei brucei* (Q386J9).

A sequência para TcP5CR foi comparada com outras homólogas de diferentes organismos por alinhamento múltiplo, e observou-se que a sequência TcP5CR apresenta maior identidade com a de *Escherichia coli* (49%) e menor identidade com a de *Neisseria meningitides* (29%) e de *Homo sapiens* (32%) (figura 7). Pelos dois alinhamentos, também foram analisados os resíduos conservados entre as sequências para P5CRs, que apresentam importantes funções catalíticas e estruturais, e constituem diferentes motivos. Existem cinco motivos preditos para a família das enzimas P5CRs: A, B, C, D e E. O motivo B representa duas regiões distintas, a primeira apresenta uma sequência consenso (G-x-x-G-x-G-x-M/L) variante da sequência típica da dobra de Rossmann (G-x-G-x-x-G), característica de proteínas que ligam a cofatores como FAD, NAD⁺ e NADP⁺ (ROSSMANN; MORAS; OLSEN, 1974). A segunda região influencia a posição do pirofosfato do cofator NAD(P)⁺/NAD(P)H e apresenta três resíduos típicos (V-K-P). Além do motivo B, o A (H-R-R-x-x-R ou H-x-N-x-N-R) e o C (R-x-M-x-N) também estão envolvidos na ligação do cofator NAD(P)H. O motivo D (G-S-x-P-A)

participa da formação estrutural das P5CRs, formando uma região de dobradiça que conecta os dois domínios e ainda forma um laço característico do núcleo de dimerização que é essencial para a formação de uma enzima funcional, ou seja, o dímero é a unidade biológica básica das P5CRs. Por fim, o motivo E está envolvido na ligação do substrato, L-P5C, e produto, L-prolina. Em plantas apresenta uma sequência consenso (S-P-A/G-G-T-T) e em outros organismos apresentam resíduos similares conferindo a mesma característica funcional (FORLANI et al., 2015).

		1	10	20	зo	4 0
NmP5CR HsP5CR3 OsP5CR AtP5CR TcP5CR EcP5CR	MAAPPQPVP7	MAAAEPSPR RVG APAAASPEVF RLG EILPIPAESF KVG MKIG	FLGGGNMAAA FVGAGRMAGA FIGPGNLAES FIGAGKMAES IIGCGNMCEC FIGCGNMGKA	VAGGLVKQGGY IAQGLIRAGKVEA IARGVAASGVLPA IARGVVASGVLPP ILNGLVLSKEYPPH ILGGLIASGQVLPC	RIYIAN RGAEKF DHILASAPTDRNI TAIRTAPHRRPEF URICTAVHSNLNF EEICIFNRTAANI GQIWVYTPSPDKV	ERLEKEL GV ETS CHFQALCCRTT AEAFSSIGAHIL RDVFESFGVNVF KRLCEQYGVQAG AALHDQFGINAA
	50	60 70		80 90	100	110
NmP5CR HsP5CR3 OsP5CR AtP5CR TcP5CR EcP5CR	ATLPE.LHSI HSNQEVLQSC ETNAQVVDDS STSEEVVKES KDAVDVVRRS ESAQEVAQIA	D D V L I L A V K P Q D V C L L V I F A T K P H V L S D V I V I S V K P Q I V S D V V I F S V K P Q V V S N V V M L G V K P Y A V A D I I F A A V K P G I M	E A A C K N I F P A V L A E V A P V V R Q V L V E L K P L I K K A V T E L K S K I C S V V E K I R D A V I K V L S E I T S S	RTNGALVISVAAGI YTTEHILVSVAAGY LSEEKLLVSIAAG LSKNKILVSVAAG YTEDKIILSVAAGI LNKDSLVVSIAAGY	SVGTLSRYLGGT VSLSTLEELLPPN KMEDLQGWSGHF KLNDLQEWSGQE KKISSIEKALGHA YTLQQLARALGHE	RRIVRVMPNTPG TRVLRVLPNLPC R.FIRVMPNTPS R.FIRVMPNTPA RKVVRVMPNVPT RKIIRAMPNTPA
	120	130	140	150 160	170	180
NmP5CR HsP5CR3 OsP5CR AtP5CR TcP5CR EcP5CR	KTGLGVSGM VVQEGAIVMA AVGQAASVMC AVGCAASVMS RVGVGLTSVI LVNAGMTSVI	YAEAE VS ET D RRI ARGRH V GSS E TKL CLGEM AT EN D ENR SLGTG AT EE D GAI TPNAL MT RE D TAL TPNAL VT PE D TAD	ADRIMKSVGL LQHLLEACGR VRSLFSAIGK VAMLFGAVCK ILKMFSTLGK VLNLFRCFGE	IVWLDDEEKMHGI CEEVPEAYVDIH WTAEEKYFDAV ILKADEKMFDAV AVEVAESQIHAV AEVIAEPMIHPV	GISGSGPAVFY GLSGSGVAFVCA GLSGSGPAYIFI GLSGSGPAYIFI AVAGSAPAYVFM (GVSGSSPAYVFM	LLDALQNAATRQ FSEALAEGAVKM AIEALAEGAVKM AIEALADGGVAA FMEAMGDAAVHG FIEAMADAAVLG
	190	200	210 2	220 230	240	250
NmP5CR HsP5CR3 OsP5CR AtP5CR TcP5CR EcP5CR	GFDMAEARAI GMPSSLAHRI GLPRDLALGI GLPRELALSI GLPRDQAYEF GMPRAQA	LSLATEKGAVALA IAAQITLLGTAKML LASQIVLGAATMV LASQIVLGAATMV FAAQAVMGAAKML FAAQAVMGSAKMV	EQTGEDFEKLG LHEGQHPAQII NKTGKHPGQI SKTGKHPGVI QDSDMSPAQII LETGEHPGAL	DKNVTSKGGTTHEA SSDVCTPGGTTIYC CDMVTSPAGTTITC CDDVTSPGGTTIAC CDDVCSPGGTTIAC CDMVCSPGGTTIEA CDMVCSPGGTTIEA	VEAFRRHRVAEA LHALEQGGLRAA VELEKGAFRGT VHELEKGSFRAT VRSLEKGGLRST VRVLEEKGFRAA	TSEGVCACVRRS TMSAVEAATCRA LINAVVAATKRC LMNAVVAAKRS VIEAMIACADRS VIEAMTKCMEKS
NmP5CR HsP5CR3 OsP5CR AtP5CR TcP5CR EcP5CR	260 QEMERQYQ KELSRK RELSQ S RVLEANLN EKLSK S					

Figura 7 - Alinhamento das sequências de TcP5CR com alguns de seus ortólogos.

Os aminoácidos idênticos entre todas as sequências estão marcados em preto, e os conservados estão em negrito e em caixas, os pontos indicam os *gaps* do alinhamento. Em colorido estão os motivos conservados: o A (em rosa), o B (em azul), o C (em roxo), o D (em verde) e o E (em laranja). O quadro em azul escuro representa o motivo dobra de Rossmann e o quadro em marrom os resíduos envolvidos na interface de dimerização. As sequências utilizadas no alinhamento foram: NmP5CR, P5CR de *Neisseria meningitides* (Q9K1N1; 1YQG); HsP5CR, P5CR de *Homo sapiens* (Q53H96); OsP5CR, P5CR de *Oryza sativa ssp. japonica* (gi/215695199), AtP5CR, P5CR de *Arabidopsis thaliana* (P54904), TcP5CR, P5CR de *Trypanosoma cruzi* (Q4DH60) e EcP5CR, P5CR de *Escherichia coli* (P0A9L8).

Por último, para TcP5CR também se utilizou a ferramenta ProtParam (ExPASy), a fim de estimar alguns parâmetros através de sua composição de aminoácidos predita. Foram preditos o ponto isoelétrico de 7,53, a massa molecular de 28587,5 Da e um coeficiente de extinção molar de 7450 M⁻¹ cm⁻¹ a 208 nm em água, assumindo que os resíduos de cisteína estão reduzidos.

3.2 Avaliação da via de biossíntese de L-Pro em Tritryps

Uma vez identificados os genes em *T. cruzi* codificantes para as proteínas putativamente envolvidas na biossíntese de L-Pro, tivemos o interesse em avaliar esse metabolismo nas células *in vivo*, e em extratos proteicos totais. Essa avaliação também foi realizada em *L. amazonensis* e *T. b. brucei*.

3.2.1 Diferenças metabólicas na biossíntese de L-Pro em Tritryps.

Avaliou-se a capacidade de biossintetizar L-Pro em formas proliferativas mantidas em cultura axênica. Para isso, os níveis intracelulares de Pro foram quantificados nos três parasitas: em promastigotas (figura 8 A), em procíclicos (figura 8 B) e em epimastigotas (figura 8 C). Inicialmente, quantificaram-se os níveis basais de Pro, de parasitas oriundos dos respectivos meios de cultivo (Basal em figura 8). Em seguida os parasitas foram submetidos a um período de estresse nutricional, confirmando através da quantificação que os níveis basais foram drasticamente reduzidos (PBS em figura 8). A partir de então, quantificaram-se novamente os níveis intracelulares de Pro após incubá-los somente na presença dos substratos envolvidos diretamente nessa biossíntese: o glutamato e ou P5C, substratos da P5CS e P5CR, respectivamente. Outros possíveis precursores também foram avaliados, como a L-Gln (precursor de L-glu) e L-Arg (precursor do P5C). Como controle positivo, os parasitas foram incubados com L-Pro (figura 8).



Figura 8 - Avaliação da biossíntese de L-Pro in vivo.

O conteúdo intracelular de Pro foi mesurado nos Tritryps: promastigotas de *Leishmania amazonensis* (A), procíclicos de *Trypanosoma brucei brucei* (B), e epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (C) em distintas condições. Primeiramente, de células oriundas de seu respectivo meio de cultura (Basal), e de células nutricionalmente estressadas (PBS). Em seguida, o conteúdo foi determinado após a recuperação desses parasitas na presença de L-prolina (L-pro), DL- Δ^1 pirrolina-5-carboxilato (DL-P5C), L-glutamato (L-glu), L-glutamina (L-gln) ou L-arginina (L-arg) (*Unpaired t test* p < 0,05). As concentrações de cada substrato assim como dos cofatores utilizados em cada condição estão detalhados na seção 2.3.

Como esperado, os níveis intracelulares dos dois tripanossomas foram recuperados na presença de L-Pro, por apresentarem a capacidade de transportar esse aminoácido via mecanismos já descritos na literatura (L'HOSTIS et al., 1993; SILBER et al., 2002). Até o momento, em *L. amazonesis*, só foi caracterizado molecularmente o gene que codifica um transportador de aminoácido pertencente à família *Amino Acid/Auxin Permease* (AAAP, TC 2.A.18) (CASTILHO-MARTINS et al., 2011; GERALDO et al., 2005). Porém esse parasita demonstrou-se capaz de adquirir L-Pro do meio extracelular como outras *Leishmania* spp. (LAW; MUKKADA, 1979;

MAZAREB et al., 1999; TER KUILE; OPPERDOES, 1992), uma vez que também tiveram os seus níveis intracelulares recuperados na presença desse aminoácido.

Além da L-pro, os promastigotas de *L. amazonenses* também reestabeleceram seus níveis intracelulares de Pro quando foram incubados com P5C (figura 8 A). Diferentemente, os procíclicos de *T. b. brucei* não conseguiram recuperar seus níveis na presença de nenhum outro substrato (figura 8 B) (resultado desta Tese publicado em (MANTILLA et al., 2017)). Contrariamente, os epimastigotas de *T. cruzi* foram capazes de recuperar seus níveis intracelulares de L-Pro a partir de L-Glu, L-Gln e de P5C (figura 8 C). Coerentemente, com a ausência do ciclo da ureia em tripanossomatídeos (YOSHIDA; CAMARGO, 1978), a L-Arg não foi precursora de L-Pro em nenhum dos Tritryps avaliados.

3.2.2. Busca da atividade P5CS em <u>T. cruzi</u>

Não foi possível até agora detectar de forma direta a atividade P5CS em extrato proteico de *T. cruzi*, mesmo testando diferentes metodologias descritas na literatura. Como alternativa, para confirmar a funcionalidade da via em *T. cruzi*, e poder inferir a presença das atividades enzimáticas que a constituem, medimos o conteúdo de Pro intracelular de epimastigotas da mesma maneira que avaliamos sua biossíntese *in vivo*. Neste experimento, variamos as concentrações de L-Glu de forma de demonstrar que ao menos *in vivo* a redução de L-Glu a L-Pro ocorre. De fato, os dados mostram um incremento do conteúdo de Pro intracelular conforme aumenta a concentração de L-Glu (de 10 a 30 mM) em que os parasitas eram incubados (figura 9).

Figura 9 - Avaliação da atividade de P5CS in vivo.



Epimastigotas intactos tiveram o nível intracelular de L-prolina reduzido, e em seguida foram submetidos por 1 hora a diferentes concentrações de L-glutamato (10 a 30 mM) acrescidas de 10 mM MgCl₂, 0,5 mM NADPH e 5 mM fosfoenolpiruvato. Ao término desse período tiveram seu conteúdo de Pro determinado pelo método de Bates.

3.2.3. Verificação e caracterização da atividade P5CR em Tritryps

A capacidade dos Tritryps de produzirem L-Pro a partir do intermediário P5C, também foi avaliada através da medição da atividade da enzima P5CR em extratos proteicos totais. Previamente, as condições dessa atividade foram padronizadas em extrato celular total de epimastigotas de *T. cruzi* baseado nas condições utilizadas para caracterizar P5CRs em outros organismos (CHILSON; KELLY-CHILSON; SIEGEL, 1991; HAYZER; LEISINGER, 1980; ROSSI et al., 1977). Uma vez padronizada essa medição, determinaram-se as velocidades iniciais da atividade P5CR em diferentes concentrações de lisados totais de epimastigotas (*T. cruzi*), promastigotas (*L. amazonesis*) e procíclicos (*T. b. brucei*) (figura 10). A existência de uma P5CR funcional foi confirmada em *T. cruzi* e *L. amazonensis*, mas não em *T. b. brucei*, uma vez que as atividades específicas determinadas foram de 154,6 \pm 2,4; 20 \pm 1,5 e 7,8 \pm 1 nmol NADPH/min.mg de proteína, respectivamente.

Dado que o *T. b. brucei* não apresenta uma atividade de P5CR relevante e nem produz L-Pro a partir de P5C *in vivo* (dados desta Tese publicados em (MANTILLA et al., 2017)), partimos para a caracterização de sua atividade em extratos totais de *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Com este fim, foram avaliados os comportamentos dessas enzimas

frente a diferentes concentrações de P5C, e em relação à especificidade pelo cofator/cosubstrato NAD(P)H (figura 11).



Figura 10 - Atividade P5CR em extratos totais de Tritryps.

Ensaio enzimático para a enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR), no qual as velocidades iniciais são determinadas através da oxidação do NADPH espectrofotometricamente a λ_{340} . Essas atividades são determinadas para diferentes concentrações de lisados totais (100, 200 e 400 µg) de epimastigotas (*T. cruzi*), promastigotas (*L. amazonensis*) e procíclicos (*T. b. brucei*). Os dados foram obtidos de três experimentos independentes.

Os dados obtidos apontam para uma enzima com uma cinética que responde ao modelo cinético de Michaelis Mentem em relação ao P5C. Os parâmetros cinéticos obtidos (K_M^{app} e V_{max}^{app}) para ambos os extratos celulares totais de epimastigota (*T. cruzi*) e de promastigota (*L. amazonensis*) foram 24 µM e 0,16 µmol NADPH/min.mg de proteína; e 6,9 µM e 0,023 µmol NADPH/min.mg de proteína respectivamente. O valor da K_M^{app} determinado em epimastigotas (TcP5CR) (figura 11 A) foi maior em uma ordem de grandeza em relação ao valor obtido em promastigotas (LaP5CR) (figura 11 C). Ou seja, a enzima de *T. cruzi* parece ter menor afinidade pelo P5C.



Figura 11 - Caracterização das P5CRs em extratos totais de T. cruzi e L. amazonensis.

Os parâmetros cinéticos: constante de afinidade (K_M^{app}) e velocidade máxima (V_{max}^{app}) foram calculados por regressão não-linear entre as velocidades iniciais e diferentes concentrações do substrato, Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C), em extratos celulares totais de epimastigotas (*T. cruzi*) (A) e promastigotas (*L. amazonensis*) (C). A especificidade do cofator para a P5CR foi avaliada na presença de NADPH e NADH também em ambos os extratos (em B de epimastigotas e em D de promastigotas).

A especificidade pelo cofator da P5CR nesses lisados totais foi avaliada para NADPH e NADH. A TcP5CR demonstrou-se estritamente dependente de NADPH (figura 11 B). Diferentemente, a LaP5CR foi capaz de utilizar os dois cofatores, porém apresenta o dobro de atividade na presença de NADPH (figura11 D).

3.3 Identificação e clonagem dos genes putativos envolvidos na biossíntese de L-Pro em *Trypanosoma cruzi*

Diante dos resultados até aqui obtidos, nos sentimos encorajados a prosseguir com a obtenção e caracterização das TcP5CR e TcP5CS recombinantes. Para isso, desenhamos iniciadores baseados nas sequências putativas TcSYLVIO_005298 para TcP5CS e Tc00.1047053509207.90 para TcP5CR a fim de clonar as fases abertas de leitura de interesse.

3.3.1 Obtenção da fase de leitura aberta para TcP5CS e sua clonagem

Para avaliar melhor as discrepâncias observadas após a análise bioinformática do gene *TcP5CS*, optou-se por amplificar e sequenciar este fragmento utilizando a sequência do *splice leader* (SL, miniexón), uma vez que na maturação dos pré-mRNAs de tripanossomas, os transcritos recebem por *trans-splicing* a sequência SL no extremo 5'. Para isto se utilizaram o oligonucleotídeo 5'-SL e um oligonucleotídeo específico contra a *TcP5CS* que anela no extremo 3'. Utilizamos cDNA de *T. cruzi* como molde para a reação de PCR. Amplificou-se por PCR essa sequencia (tamanho predito de 2259 pb) junto a uma sequencia dupla fita correspondente a sequencia de RNA do SL, *m⁷G-capped RNA* (110 pb) (MCCARTHY-BURKE; TAYLOR; BUCK, 1989), fragmento único de aproximadamente 2400 nt, confirmando a existência de um produto gênico que resulta em uma TcP5CS bifuncional (figura 12 A). Após esse fragmento ser clonado em vetor pJET1.2 (figura 12 B), foi amplificada a fase de leitura aberta *TcP5CS* (figura 12 C). Finalmente, essa fase de leitura aberta foi clonada no vetor de expressão pET28a (figura 12 D).

3.3.2 Obtenção da fase de leitura aberta para TcP5CR e sua clonagem

Como esperado, a sequência putativa para a *TcP5CR* foi amplificada por PCR a partir de DNA genômico de *T. cruzi* (CL 14), apresentando o produto de amplificação um tamanho aproximado de 810 pb (figura 13 A). Em seguida, esse fragmento foi clonado no vetor pGEM T-Easy (figura 13 B), para posteriormente, ser subclonado no vetor de expressão pET28a (figura 13 C). Além dessas clonagens, para a superexpressão de TcP5CR em *T. b. brucei*, a fase de leitura aberta TcP5CR também foi clonada no vetor pLEW100 (figura 13 D).



Figura 12- Amplificações e clonagens da *TcP5CS*.

Produtos obtidos em géis de agarose, em A, de amplificação por PCR a partir de cDNA total de *T. cruzi* (cepa CL14) para a fase de leitura aberta *TcP5CS* com gene *splicing leader* (SL-TcP5CS) (~2,4 Kpb), controle negativo da PCR (C(-)) e para a fase de leitura aberta histidina amônia-liase de *T. cruzi* (~1,6 Kpb), como controle positivo (C(+)). Em B, a construção pJET1.2-TcP5CS (pJET-P5CS) foi digerida com a enzima *Bgl*II, para a qual existem dois sítios de restrição no vetor um no extremo 5' da região múltiplos sítios de clonagem (MSC) e outro no extremo 3' da MSC, liberando então dois fragmentos: um de ~3 Kpb referente ao vetor pJET1.2 e outro de ~2,4 Kpb referente ao inserto *SL-TcP5CS*. Em C, a fase de leitura aberta *TcP5CS* (~2,3 Kpb) foi amplificada por PCR a partir da construção pJET1.2-TcP5CS. Em D, a construção pET28a-TcP5CS (pET28-P5CS) foi digerida com as enzimas *Not*I e *Xho*I, liberando o fragmento de ~2,3 Kpb correspondente ao inserto de interesse *TcP5CS*. O marcador de peso molecular de DNA utilizado foi o 1 Kb DNA *plus ladder* (Fermentas[®]).



Figura 13 - Amplificações e clonagens da *TcP5CR*.

Produtos obtidos em géis de agarose, em A, de amplificação por PCR a partir de DNA genômico de *T. cruzi* (cepa CL14) para a fase de leitura aberta *TcP5CR* (~810 pb) e controle negativo da PCR (C(-)). Corte com enzimas de restrição para cada construção realizada, liberando o inserto de interesse (*TcP5CR* ~810 pb), em B, a construção pGEM-T Easy-TcP5CR (pGEM-P5CR) foi digerida com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. Em C, a construção pET28a-TcP5CR (pET28-P5CR) foi digerida com as enzimas *EcoRI* e *BamHI*. Por último, em D, a construção pLEW100-TcP5CR (pLEW-P5CR) foi digerida com as enzimas *Hind*III e *BamHI*. O marcador de peso molecular de DNA utilizado foi o 1 Kb DNA *ladder* (Fermentas[®]).

3.4 Expressão e purificação das TcP5CS e TcP5CR recombinantes

As duas construções em vetores de expressão pET28a foram transformadas em E. coli para obtermos as enzimas recombinantes. A construção pET28a-TcP5CR foi inserida na cepa E. coli BL21(DE3)-RIL. A expressão da TcP5CS recombinante (TcP5CS-6xHis) na fração solúvel só foi possível na bactéria da cepa E. coli BL21(DE3) pGro7. Diferentes condições foram testadas em relação à temperatura e tempo de indução na presença de 0,5 mM de IPTG: a 37 °C durante 3 horas, a 30 °C durante 5 horas, e 25 e 20 °C por 16 horas (figura 14). Observou-se que as proteínas recombinantes apresentaram as massas moleculares esperadas: ~81 KDa para TcP5CS-6xHis e ~28 KDa para TcP5CR-6xHis. Apessar do sucesso na expressão, foi obtida na fração solúvel uma quantidade visível relativamente baixa de TcP5CS-6xHis (figura 14 A). Em contrapartida, foi possível determinar a condição ótima de expressão da TcP5CR-6xHis, quando a expressão foi realizada a 20 °C (figura 14 B). Para determinar a melhor condição de expressão da TcP5CS-6xHis foi realizada uma análise por western blot (figura 14 C) com anticorpo anti-6xHistag (Invitrogen®). Nessa análise avaliaramse as frações solúveis obtidas de bactérias crescidas nas mesmas condições anteriores e ainda nestas com outra concentração do indutor, 0,3 mM de IPTG a 37 °C. Dessa forma, ficou evidente que a melhor condição de expressão da TcP5CS-6xHis foi a 37 °C na presença de 0,5 mM de IPTG (figura 14 C). Em seguida, as enzimas expressas foram purificadas mediante a cromatografia de afinidade, através de uma coluna de Ni²⁺agarose (figura 15). A purificação da TcP5CR obteve um rendimento de 35,3%.



Figura 14 - Expressão das enzimas recombinantes TcP5CS e TcP5CR.

Perfil eletroforético dos extratos protéicos obtidos na expressão das proteínas recombinantes (+): TcP5CS-6xHis (A) e TcP5CR-6xHis (B) em diferentes condições (de 20 a 37 °C), assim como sem induzir (-). S indica as frações solúveis e I as insolúveis. As setas apontam as proteínas expressas com a massa molecular esperada: de ~81 KDa a TcP5CS-6xHis e ~28 KDa a TcP5CR-6xHis. Frações solúveis obtidas na expressão de TcP5CS-6xHis a diferentes temperaturas (como em A) e concentrações do indutor (0,3 e 0,5 mM ITPG) foram analisadas por *western blot*, utilizando anticorpo anti-histidina (1:1000) camundongo (INVITROGEN[®]) (C). O marcador de massas moleculares de proteínas utilizado foi *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (ThermoFisher[®]).



Figura 15- Purificação das enzimas recombinantes TcP5CS e TcP5CR.

Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) com as frações obtidas na expressão e purificação de TcP5CS-6xHis (A) e TcP5CR-6xHis (B). I indica a fração insolúvel, L a fração do lisado clarificado, FT fração coletada após a passagem de L na coluna de Ni²⁺-agarose, L1 fração coletada após a primeira lavagem (com 8 mM de imidazol), L2 fração coletada após a segunda lavagem (com 60 mM de imidazol), L3 fração coletada após a terceira lavagem (com 100 mM de imidazol), F_{L3} a fração coletada do final da lavagem L3 e E1 a E5 indicam as frações coletadas no processo de eluição (com 500 mM de imidazol). O marcador de massas moleculares de proteínas utilizado foi *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (ThermoFisher[®]).

3.5 Caracterização bioquímica da TcP5CR recombinante

3.5.1 Determinação dos parâmetros cinéticos e bioquímicos em relação ao substrato P5C para TcP5CR-6xHis

Inicialmente, a atividade da TcP5CR-6xHis foi avaliada na presença de diferentes concentrações de seu substrato P5C. As velocidades iniciais obtidas mostraram que a enzima recombinante apresenta um comportamento michaeliano, uma vez que essas velocidades iniciais *versus* a concentração de P5C ajustaram-se a curva hiperbólica ($R^2 = 0.95$) segundo o modelo proposto por Michaelis-Menten (figura 16 A). De acordo com este modelo, estimaram-se os valores aparentes de K_M^{app} (27, 7 ± 3,2 µM) e V_{max}^{app} (2,15 ± 0,06 µmoles NADPH/min.mg de proteína), e derivado deste último, também se calculou a K_{cat}^{app} (1 ± 0,05 s) (figura 16 D). Quando a K_M^{app} e a V_{max}^{app} são comparadas às obtidas em extrato total de epimastigotas (respectivamente: 23,9 ± 4,3 µM e 0,16 ± 0,006 µmoles NADPH/min.mg de proteína) (secção 3.2.2), os valores de K_M^{app} foram semelhantes, enquanto que a V_{max}^{app} do extrato foi menor, em mais de dez vezes (figura 11 A). Obter um valor de V_{max}^{app} do extrato menor é esperado, uma vez que a concentração de extrato total utilizada, leva em conta outras proteínas

além da TcP5CR, o que não ocorre no ensaio com a enzima recombinante, no qual toda a concentração de proteína utilizada é referente a TcP5CR.

Também se avaliou o efeito do pH e da temperatura na reação catalisada pela TcP5CR-6xHis. A enzima mostrou ter um máximo de atividade a pH 7,0 (figura 16 B). A enzima também teve um comportamento termoestável. A sua atividade foi dependente linearmente com a temperatura entre 20 °C até 70 °C (figura 16 C). As medições de atividade nessa faixa foram utilizadas para calcular a energia de ativação (15,8 \pm 1,4 KJ/mol) através da equação de Arrhenius como descrito na seção 2.7.2.4 (figura 16 D).

3.5.2 Influência do cofator/co-substrato na atividade de TcP5CR-6xHis

Assim como observado para extrato total de epimastigota, ao avaliar a dependência pelos cofatores NAD(P)H na reação catalisada pela TcP5CR-6xHis, a enzima mostrou-se NADPH dependente (figura 17 A). Também se avaliou o efeito de diferentes concentrações do cofator/co-substrato na atividade da enzima. Nessa análise, as velocidades inicias obtidas claramente demonstram uma diminuição da atividade na presença de concentrações maiores que 70 µM de NADPH (os pontos da figura 17 B). Para entender melhor este comportamento, optou-se por uma análise mais refinada da atividade através de medições de atividade em função da concentração de NADPH por curvas de progresso, tratando o NADPH como um co-substrato (figura 17 D) (DUGGLEBY, 2001). Primeiramente, foi necessário determinar a estabilidade da atividade TcP5CR-6xHis através do teste de Selwyn (SELWYN, 1965), para demonstrar que a enzima é estável durante o tempo transcorrido da reação (figura 17 C). Diferentes curvas de progresso obtidas com distintas concentrações de NADPH (4 a 200 μ M) (exemplo de três dessas curvas na figura 17 D) foram analisadas mediante o uso do programa DynaFit v4.06.027 (BioKin Ltd) (KUZMIC, 1996). Esse programa analisou os dados ajustando-os a diferentes modelos cinéticos (script descrito na seção 2.7.2.5) e na comparação dos ajustes obtidos considerou o modelo de inibição incompetitiva pelo substrato como aquele que melhor explica o comportamento medido para a TcP5CR-6xHis em relação ao co-substrato (figura 17 E). O programa também estimou os parâmetros cinéticos (figura 17 F), com os quais foi possível predizer o comportamento das velocidades iniciais anteriormente obtidas (linha da figura 17 B).





A: A atividade TcP5CR foi iniciada com 1,5 µg de enzima medida utilizando tampão de reação contendo: 100 mM do tampão Tris-HCl (pH 7,0), 35 µM NADPH e concentrações variadas de P5C (de 10 µM a 1,5 mM de DL-P5C, considerando que haja 50% de cada forma na mistura racêmica e que somente a forma L-P5C é substrato da enzima). De modo comparativo é mostrado também o gráfico obtido nas mesmas condições com extrato total de epimastigota (figura 11 A, *inset*). **B:** Verificou a dependência do pH na atividade de TcP5CR-6xHis. Para isso a reação era composta de 0,5 mM de P5C, 1,5 µg de enzima, 35 µM NADPH e 100 mM de diferentes tampões: citrato-fosfato (pH 4,0 e 5,0), MES (pH 5,0 e 6,0), MOPS (pH 6,6 e 7,0), Tris-HCl (pH 7,0; 7,5; 8,0 e 9,0), e ou CHES (pH 9,0 e 10,0). **C:** Em diferentes temperaturas (de 20 a 80 °C), mediu a atividade P5CR como em A na presença de 0,5 mM de P5C. As velocidades de reação obtidas foram plotadas no gráfico *inset*. O valor da energia de ativação com calculado a partir da inclinação da reta no gráfico *inset* de acordo com a equação de Arrherinus. **D:** Parâmetros obtidos para lisado total de epimastigota (K_M^{app} e o V_{max}^{app} descritos na seção 3.2.2) e para TcP5CR-6xHis (K_M^{app}, V_{max}^{app}, K_{cat}^{app} e energia de ativação).



Figura 17 - Caracterização da TcP5CR-6xHis em relação ao cofator NADPH.

A especificidade do cofator para a TcP5CR-6xHis foi avaliada na presença de 100 mM do tampão Tris-HCl (pH 7,0), 0,5 mM P5C, 1,5 µg de enzima e 35 µM NADPH e ou NADH. Como o objetivo de comparação é mostrado também o gráfico obtido nas mesmas condições com extrato total de epimastigota (figura 11 B, *inset*). (A). As velocidades iniciais foram calculadas para a enzima em diferentes concentrações de NADPH (de 4 a 200 µM) e nas mesmas condições medidas em A (os pontos em B). Foi realizado o teste de *Selwyn* com três quantidades de enzima: 5, 10 e 20 µg para verificar a estabilidade da enzima na reação (C). Curvas de progresso de reações iguais as realizadas em B (três delas são mostradas em D) foram analisadas com o uso do programa *DynaFit v4.06.027* (BioKin Ltd). Entre os modelos comparados, o de inibição incompetitiva exercida pelo substrato demonstrou melhor estimar o comportamento de TcP5CR-6xHis em relação a diferentes concentrações de NADPH (E). Parâmetros obtidos por este modelo (K_M^{app} e o K_i^{app} e K_{cat}^{app}) (F) que foram utilizados para prever a relação entre as concentrações do cofator e as respectivas velocidades iniciais obtidas (linha em B).

3.6 Localização subcelular e expressão de TcP5CS e TcP5CR nas diferentes formas de *T. cruzi*.

3.6.1 Especificidade de soros policlonais anti-TcP5CS e anti-TcP5CR

Ambas as enzimas recombinantes foram utilizadas em imunizações de camundongos para produzir anticorpos específicos. Uma vez obtidos, a especificidade dos soros foi avaliada por *western blot* contra extrato proteico total de epimastigotas de *T. cruzi*. Ambos os soros reconheceram uma única banda de massas moleculares aproximada de 81 kDa para TcP5CS e 28 KDa para TcP5CR (figura 18).

Figura 18 - Análise dos soros policionais obtidos por western blot.



Concentrações iguais de extrato proteico total de epimastigotas (25 µg) foram aplicadas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Em seguida as proteínas foram transferidas a membrana de 0,45 µm de nitrocelulose (G.E, Life Sciences) e esta foi utilizada em ensaio de *western blot* para titular e verificar a especificidade dos anticorpos contra a TcP5CS e contra a TcP5CR. Com esta finalidade as membranas foram recortadas em tiras e incubadas com soro pré-imune (SPI) diluído 1:2000, e com soros anti-TcP5S (α -TcP5CS) nas diluições 1:2000 e 1:3000 (A). Ou ainda as membranas foram incubadas com soro pré-imune (SPI) diluído 1:15000, e com soros anti-TcP5CR (α -TcP5CR) nas diluições 1:15000 e 1:30000 (B). O marcador de proteínas utilizado foi *Color Prestained Protein Standard, Broad Range 10-20% Tris-glycine SDS-PAGE Gel* (BioLabs[®]).

Avaliamos também a especificidade desse soro frente a extratos proteicos totais das formas procíclicas de *T. b. brucei* e das formas promastigotas de *L. amazonensis* a fim de buscar possíveis proteínas homólogas que esses anticorpos poderiam reconhecer.

Nenhum dos soros produzidos reconheceu nenhuma proteína presentes nesses extratos (figura 19).

Figura 19 - Análise dos soros policionais anti-TcP5CS e anti-TcP5CR contra extratos proteicos totais de Tritryps.



Western blot contra extratos proteicos de formas epimastigotas de *T. cruzi*, de formas promastigotas de *L. amazonensis* e de formas procíclicas de *T. b. brucei*. Em A, foi utilizado o soro anti-TcP5CS (~81 KDa) e contra proteína do choque térmico (HSP)-60 KDa (anti-HSP60) usado como controle de aplicação de amostra. Em B, foi utilizado soro anti-TcP5CR (~25 KDa) e contra gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi* (anti-TcGADPH), como controle de aplicação de amostra. Nas figuras A à esquerda e B à direita, marcador *Precision Plus ProteinTM KaleidoscopeTM Prestained Protein Standards* (BioRad Systems[®]). Na figura A à direita, marcador: Pierce *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (ThermoFisher[®]). Na figura B à esquerda, marcador: *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (ThermoFisher[®]).

3.6.2 As enzimas TcP5CS e TcP5CR estão no citoplasma de <u>T. cruzi</u>

Uma vez que os soros se mostraram específicos, foram utilizados para determinar a localização subcelular das enzimas TcP5CS e TcP5CR em epimastigotas de *T. cruzi* através de duas metodologias complementares: ensaio de permeabilização de epimastigotas com digitonina e imunofluorescência.

No ensaio de permeabilização seletiva de epimastigotas, o tratamento dos parasitas com diferentes concentrações de digitonina permite a solubilização parcial e gradual de membranas lipídicas de três compartimentos diferentes, liberando em forma progressiva os seus conteúdos celulares (MANTILLA et al., 2015; MARCIANO et al., 2008; PAES, L. S. et al., 2013). Para estabelecer a solubilização do conteúdo dos diferentes compartimentos em função dos diferentes tratamentos, analisamos frações insolúveis e solúveis obtidas com epimastigotas não tratados e tratados com diferentes

concentrações de digitonina (0,1 a 2,5 mg/mL). Na análise dessas frações por western *blot* foram utilizados os seguintes anticorpos: anti-TcP5CS e anti-TcP5CR (marcadores das enzimas em estudo), anti-TcGAPDH (marcador glicossomal), anti-aspartato aminotransferase (isoforma mitocondrial) de T. cruzi (TcmASAT, marcador mitocondrial) e anti-tirosina aminotransferase de *T. cruzi* (TcTAT, marcador citosólico) (ambos soros anti-transaminases foram generosamente cedidos pela Dra. Cristina Nowicki da Universidade de Buenos Aires). Os perfis de imunomarcação das enzimas TcP5CS e TcP5CR foram similares ao da enzima citosólica TcTAT (figura 20 A) indicando essa localização. Além do western blot, essas frações foram analisadas por atividades enzimáticas. Foram determinada as atividades de TcP5CR, e como marcadores, a piruvato quinase (PK, como marcador citosólico), hexoquinase (HK, como marcador glicossomal) e Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH, como marcador mitocondrial). As atividades medidas foram expressas como porcentagem respeito da obtida para cada um delas no lisado total do parasita (a porção insolúvel sem tratamento com o detergente). Os resultados foram concordantes com os obtidos no experimento anterior, mostrando que a maior atividade TcP5CR ocorre às menores concentrações de digitonina (padrão semelhante ao observado para o marcador PK) (figura 20).

Outra abordagem para determinar a localização subcelular das enzimas é a imunofluorescência. Com esta finalidade, diferentes estágios de desenvolvimento do parasita tiveram o citoplasma marcado através da isoforma citosólica da malato desidrogenase (TcMDHc) imunomarcada com o soro anti-TcMDHc (vermelho). Com o mesmo padrão os parasitas foram marcados (em verde) quando utilizados os soros anti-TcP5CS (figura 21) ou anti-P5CR (figura 22). Como marcador de DNA (núcleo e cinetoplasto) utilizou-se Hoechst 33258 (Invitrogen[®]) (azul). Ambas as enzimas não colocalizaram com a marcação do DNA obtida com Hoechst (Figuras 21 e 22).



Figura 20 - Ensaio de permeabilização gradativa de epimastigotas com digitonina.

Epimastigotas de *T. cruzi* foram permeabilizados com concentrações crescentes de digitonina (de 0 a 2,5 mg/mL). As frações solúveis (S) de cada tratamento foram separadas das frações insolúveis (I). Em seguida ambas as frações foram analisadas por *western blot*, utilizando anticorpos anti-TcTAT (tirosina aminotransferase de *T. cruzi*) como marcador citosólico, anti-TcGADPH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de *T. cruzi*) como marcador glicossomal, anti-mASAT (isoforma mitocondrial da aspartato aminotransferase de *T. cruzi*) como marcador mitocondrial, anti-TcP5R e anti-TcP5CS (A). As frações obtidas também foram avaliadas através de ensaios de atividade para as enzimas: piruvato quinase (PK, marcador citosólico), hexoquinase (HK, marcador glicossomal), Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH, marcador mitocondrial) e P5CR. Os valores de porcentagem representados no gráfico foram obtidos considerando a razão: [atividade na (S)] / [atividade na (I) + atividade na (S)] * 100 (B).



cruzi.

Figura 21 - Análise de imunofluorescência para TcP5CS em diferentes formas do T.

Epimastigotas (Epi), tripomastigota metacíclico (Meta), amastigotas (Ama) e tripomastigotas (Tripo) de *T. cruzi* fixados em lâminas de imunofluorescência foram incubados com soros anti-P5CS (α -TcP5S) e anti-malato desidrogenase (α -TcMDH) como marcador citosólico. Em seguida, após lavagens, foram incubadas com anticorpos secundários anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado a Alexa Fluor[®] 488 (verde) e anti-imunoglobulina G de coelho conjugado a Alexa Fluor[®] 546 (vermelho). Os DNAs: cinetoplasto (k) e nuclear (N) foram marcados com a sonda Hoechst 3358 (Invitrogen[®]). As lâminas foram analisadas por fluorescência em microscópio confocal. DIC: contraste por interferência diferencial.



Figura 22 - Análise de imunofluorescência para TcP5CR em diferentes formas do *T. cruzi*.

Epimastigotas (Epi), tripomastigota metacíclico (Meta), amastigotas (Ama), epimastigota intracelular (Epi-like) e tripomastigotas (Tripo) de *T. cruzi* fixados em lâminas de imunofluorescência foram incubados com soros anti-P5CRS (α -TcP5R) e anti-malato desidrogenase (α -TcMDH) como marcador citosólico. Em seguida, após lavagens, foram incubadas com anticorpos secundários anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado a Alexa Fluor[®] 488 (verde) e anti-imunoglobulina G de coelho conjugado a Alexa Fluor[®] 546 (vermelho). Os DNAs: cinetoplasto e nuclear foram marcados com a sonda Hoechst 3358 (Invitrogen[®]). As lâminas foram analisadas em microscópio de fluorescência.

3.6.3 As enzimas TcP5CS e TcP5CR são mais expressas nas formas presentes no hospedeiro invertebrado

Nas imunoflurescências, a diferença de perfis de imunomarcações entre as distintas formas do parasita não ficou evidente para ambas as enzimas. Portanto, para verificar o padrão de expressão das enzimas, analisamos a expressão da TcP5CS e da

TcP5CR por *western blot* (figura 23 A) e determinamos a atividades enzimática para a TcP5CR (figura 23 B). Ambas as enzimas são reguladas positivamente nas formas do hospedeiro invertebrado.



Figura 23- Análise da expressão de TcP5CS e TcP5CR em diferentes formas do *T. cruzi*.

Extratos proteicos totais de epimastigota (E), tripomastigota metacíclico (M), amastigotas (A), epimastigota intracelular (EI) e tripomastigotas (T) de *T. cruzi* e de células CHO-K₁ (CHO) foram analisados por *western blot*, utilizando os anticorpos α -TcP5CS, α -TcP5CR e anti- β tubulina (Tc β -Tubulina) como normalizador. Também a normalização foi realizada pela quantidade total de proteína evidenciada pelo corante irreversível nigrosina (A). A atividade específica para a TcP5CR também foi determinada nesses extratos. A medição dessa atividade enzimática foi realizada na presença de 100 mM do tampão Tris-HCl (pH 7,0), 0,5 mM P5C, 35 μ M NADPH e quantidade de extrato pertinente e conhecida por Bradford.

3.7 Avaliação funcional da TcP5CR na biologia de T. cruzi.

3.7.1 Capacidade de P5C atravessar a membrana mitocondrial em direção ao citoplasma

Alguns trabalhos sugerem a existência de um ciclo L-Pro/P5C e o sugerem como mecanismo de transferência de poder redox entre o citoplasma e a mitocondria (BALBONI, 1978; HAGEDORN; PHANG, 1983;1986; MILLER et al., 2009). Para isso, além da entrada de L-Pro na mitocôndria, e a sua posterior oxidação a P5C, já demonstradas no nosso laboratório (PAES, L. S. et al., 2013) deve ocorrer à saída de P5C mitocondrial em direção ao citoplasma. Porém até o momento não foi demonstrado se essa saída acontece para nenhum organismo. Uma das formas de evidenciar esse processo consistiria em produzir um acúmulo intramitocondrial de P5C em parasitas

permeabilizados estimulados com L-Pro. Dessa forma, se existisse um mecanismo de saída de P5C da mitocôndria para o citoplasma, o acúmulo progressivo desse substrato poderia ser medido. Ressaltamos que já é sabido que a toxicidade do P5C, (DEUSCHLE et al., 2001; FARRANT et al., 2001; MANTILLA et al., 2017; NOMURA; TAKAGI, 2004) e sua instabilidade (MEZL; KNOX, 1976) são conhecidas, e por isso seu acúmulo no méio intracelular não ocorre. Portanto, o P5C deve ser constantemente consumido seja pela P5CDH ou pela P5CR. Para conseguir que a mitocôndria acumule P5C em condições suficientes para poder exportá-lo em quantidades mensuráveis, necessitaríamos de um parasita que não consuma P5C através da P5C desidrogenase (P5CDH), da via de degradação presente na mitocôndria. Uma das formas de se obter um parasita modificado geneticamente com essas características é utilizar os procíclicos de T. b. brucei como modelo, já que é possível nesses organismos fazer knock down gênico da P5CDH. Por isso, neste experimento utilizamos formas procíclicas de T. b. brucei que que apresentam o gene TbP5CDH silenciado por RNAi (^{RNAi}TbP5CDH) através de um sistema induzível por tetraciclina (tet) (MANTILLA et al., 2017). Inicialmente, procíclicos com a TbP5CDH regulada negativamente (^{RNAi}TbP5CDH) e nos parasitas selvagens (wt), permeabilizados com digitonina foram avaliados para a solubilização do conteúdo citosólico, e a integridade da membrana mitocondrial por atividades dos marcadores enzimáticos piruvato quinase (PK - marcador citosólico), e prolina desidrogenase (PRODH - marcador mitocondrial) (figura 24 A). A seguir, foi quantificadá a saída de P5C mitocondrial nos parasitas RNAiTbP5CDH induzidos (tet +) pela medição de P5C na fração solúvel. Como esperado, nos procíclicos selvagens (wt) e nos RNAiTbP5CDH não induzidos (tet -) não houve detecção de P5C, porém, nos parasitas induzidos, a saída de P5C da mitocôndria pode ser demonstrada (figura 24 B).

Para confirmar a ausência de TbP5CDH nos parasitas ^{RNAi}TbP5CDH induzidos assim como extravazamento citosólico e a integridade da mitocôndria, as frações solúveis (S) e insolúveis (I) desses parasitas permeabilizados também foram analisadas por *western blot*. Esses parâmetros foram analisados utilizando anticorpos contra TcP5CDH, contra a enolase (TbEnolase) e TbPRODH (os dois últimos gentilmente cedido pelo Prof. Dr. Fréderic Bringaud, Université de Bordeaux, França), que reconheceu a enzima apenas nas frações insolúveis (figura 24 C).



Figura 24- Verificação da saída de P5C mitocondrial.

Procíclicos com silenciamento induzível por tetraciclina (tet) do gene TbP5C desidrogenase por RNAi (^{RNAi}TbP5CDH) e procíclicos selvagens (wt) foram crescidos na ausência (tet -) e presença do indutor (tet +). Após a incubação com digitonina (600 μ M/ 10⁹ parasitas) e com 1mM de L-Pro verificou: a integridade da mitocôndria e o extravazamento do conteúdo citosólico, através de ensaio enzimático para piruvato quinase (PK, marcador citosólico) e para prolina desidrogenase (PRODH) (A); e o acúmulo e saída do P5C mitocondrial, quantificando-o mediante a atividade da TcP5R recombinante (*post-test Tukey* p < 0,05) (B). Análise de *western blot* contra as frações solúveis (S) e insolúveis (I) obtidas na permeabilização dos parasitas. Nessa análise utilizou os anticorpos contra a PRODH de *T. b. brucei* (TbPRODH) como marcador mitocondrial, contra a enolase de *T. b. brucei* (TbEnolase) como marcador citosólico e contra a P5CDH de *T. cruzi* que reconhece a P5CDH de *T. b. brucei* confirmando o silenciamento do gene TbP5CDH nos ^{RNAi}TbP5CDH induzidos (tet +). Como controle de amostra, as proteínas são evidenciadas pelo corante reversível Ponceau (C). Representação esquemática do acúmulo e saída do P5C mitocondrial nos parasitas ^{RNAi}TbP5CDH induzidos (D).

3.7.2 Obtenção de linhagem celular de <u>T. b. brucei</u> capaz de produzir L-Pro

Com o intuito de compreender melhor a função biológica do ciclo redox Pro-P5C – P5C-Pro, decidimos reconstitui-lo em procíclicos de *T. b. brucei*, que como foi visto, carecem da via de biosíntese de Pro. Para isso, transfectaram-se procíclicos de *T*. *b. brucei* com o gene codificante da TcP5CR clonada em plasmídeo pLEW100 (pLEW100-TcP5CR). Após seleção, a presença do gene e a sua transcrição foi confirmada por PCR a partir do DNA genômico da cepa transfectada ($Tb^{TcP5CR+}$) (figura 26 A.I) e por PCR a partir do cDNA total de $Tb^{TcP5CR+}$ induzido por tetraciclina (tet +) respectivamente (figura 26 A.II). Posteriormente, analisou-se o tempo de indução mais adequado para a expressão da proteína por *western blot* e por atividade enzimática. Em ambos os ensaios, 48 horas de indução demonstrou-se ser tempo suficiente para a expressão de TcP5CR (figura 26 B e C).

Numa análise preliminar de fenótipo, foi avaliada a replicação dos parasitas em função da expressão de TcP5CR. Quando as curvas de $Tb^{TcP5CR+}$ induzidos (tet +) foram comparadas com procíclicos $Tb^{TcP5CR+}$ não induzidos (tet -) e com as curvas da cepa parental (wt) na ausência (tet -) e presença de tetraciclina (tet +) não houve diferenças significativas (figura 26 D), mostrando que desde o ponto de vista da replicação a atividade P5CR não teve efeitos nessas células.

3.7.3 Avaliação da resistência ao estresse nutricional dos parasitas Tb^{TcP5CR+}

Como vimos que o ciclo L-Pro/P5C existe no *T. cruzi*, podendo alimentar a cadeia transportadora de elétrons, ao transferir poder redutor do pool NADPH citoplasmático ao pool FADH₂/NADH mitocondrial, investigamos se sua presença confereria alguma resistência ao estresse nutricional. Para isso, analisamos o comportamento de Tb^{TcP5CR+} frente à escasez de nutrientes. Porém, levamos em conta que a atividade da TcP5CR nesses parasitas não dependeria somente da expressão da enzima e sim também da disponibilidade de seu co-substrato NADPH no citosol, a qual em condições de estresse nutricional poderia ser insuficiente para sustentar a atvidade da TcP5CR. Por isso primeiramente, verificamos se o NADPH seria transportado do meio externo ao citoplasma pelo *T. b. brucei*, assim como seu análogo NADH.



Figura 25 - Averiguação e caracterização inicial de *T. b. brucei* mutante de expressão heteróloga de TcP5CR.

A.I: PCR convencional a partir de DNA genômico de procíclicos de *T. b. brucei* de linhagem parental (wt) e mutante com construção pLEW100 inserida (TcP5CR⁺). A.II: Após cultivar os parasitas na ausência (tet -) e presença (tet +) de 0,5 µg/mL de tetraciclina para a indução de TcP5CR, os RNAs das células foram extraídos e desses os cDNAs foram obtidos. Então se confirmou por PCR a presença do gene TcP5CR nos procíclicos induzíveis. Em ambas as PCRs o gene de TbGAPDH foi amplificado como normalizador. B: O tempo de indução foi analisado por *western blot*, utilizando os anticorpo α -TcP5CR e α -TcGAPDH. C: Também se analisou o tempo de indução por ensaio de atividade para TcP5CR, em tampão de reação contendo: 100 mM do tampão Tris-HCl (pH 7,0), 0,5 mM P5C, 35 µM NADPH e quantidade de extrato conhecida por Bradford. D: Curvas de crescimento de parasitas wt e TcP5CR⁺ induzidos (tet +) e não induzidos(tet-).

3.7.3.1 Verificação do transporte de NAD(P)H pelo T. b. brucei

O transporte de NAD(P)H do meio extracelular ao interior de procíclicos wt foi avaliado via a emissão de fluorescência desses parasitas incubados na presença de NADH ou NADPH, utilizando comprimentos de onda de excitação e emissão específicos para quantificar esses cofatores (secção 2.9.3.1). Foram analisados parasitas incubados em PBS suplementado com 0,1mM de NADH e em PBS suplementado com 0,1mM de NADPH durante 30 min, 1 e 2 h e em parasitas que foram imediantamente retirados dessas soluções, como o tempo zero do transporte (t₀). Vimos que nas duas
condições a emissão de fluorescência aumenta conforme o tempo de incubação, demonstrando então que há incorporação tanto de NADH quanto de NADPH realizada pelo *T. b. brucei* (figura 26).





A incorporação de NADH e NADPH por procíclicos de *T. b. brucei* foi avaliada, através da quantificação de emissão de fluorescência (λ_{exci} 340 nm, λ_{emi} 445 nm) desses parasitas previamente lavados, após serem submetidos a diferentes tempos de incubação (30 min, 1 e 2 h) em solução PBS suplementada com 0,1 mM de NADH (NADH) ou com 0,1 mm de NADPH (NADPH) e também em parasitas que foram retirados imediatamente das respectivas soluções, como o tempo zero do transporte (t₀).

3.7.3.2 Análise da resistência ao estresse nutricional na presença ou não de NADPH dos parasitas Tb^{TcP5CR+}

Como vimos que o *T. b. brucei* é capaz de incorporar NAD(P)H do meio extracelular, fomos verificar se na presença ou não desses cofatores os parasitas $Tb^{TcP5CR+}$ induzidos eram mais resistentes à escassez de nutrientes. Com essa finalidade, comparamos a viabilidade, por *Alamar Blue* (secção 2.9.3.2), de parasitas wt e $Tb^{TcP5CR+}$ (cultivados com ou sem tetraciclina) antes do estresse nutricional (t₀) com a viabilidade após esse estresse (4 h de incubação), realizado em PBS, em PBS suplementado com 0,1mM de NADH ou em PBS suplementado com 0,1mM de NADH.

Quando o estresse foi realizado em PBS apenas, os parasitas Tb^{TcP5CR+} não demonstraram resistência devido à falta do co-substrato NADPH, pois na presença deste

após o jejum esses parasitas não apresentam diferença de viabilidade em relação a t₀. A presença de NADH sustenta a viabilidade de procíclicos em até 4 horas de estresse nutricional, não havendo diferença entre os parasitas wt e $Tb^{TcP5CR+}$ (figura 27).



Figura 27 – Resistência ao estresse nutricional de procíclicos $Tb^{TcP5CR+}$ na presença de NADPH.

A viabilidade de procíclicos de *T. b. brucei* foi avaliada, através da redução de resarzurina (Almar Blue[®]), medida via emissão de fluorescência (λ_{exci} 560 nm, λ_{emi} 590 nm). Foram utilizados parasitas selvagens (wt) e expressores de TcP5CR (Tb^{TcP5CR+}) cultivados por 48 h na ausência (tet -) e presença (tet +) de 0,5 µg/mL de tetraciclina. Comparou a viabilidade desses parasitas antes do estresse nutricional (t₀) com a viabilidade após 4 h de estresse (4 h), ao incubar os procíclicos em solução PBS (PBS), PBS suplementado com 0,1 mM de NADH (NADH) ou em PBS com 0,1 mm de NADPH (NADPH) (*Unpaired t test* p < 0,05).

CAPÍTULO 4: DISCUSSÃO

4.1 Diferenças na via de biossíntese de L-Pro dentre os Tritryps.

Os dois passos do catabolismo de L-Pro em Tritryps já foram evidenciados ou caracterizados em *T. b. brucei* (LAMOUR et al., 2005; MANTILLA et al., 2017), *T. cruzi* (MANTILLA et al., 2015; PAES, L. S. et al., 2013) e *Leishmania* spp. (FERRAZ, 2011; KRASSNER; FLORY, 1972). Entretanto, em relação à biossíntese de L-Pro, nossos resultados demonstraram que a via diverge entre esses parasitas, sendo o *T. b. brucei* auxotrófico para L-Pro, em contraste, o *T. cruzi* apresenta a via completa operativa, enquanto que, *L. amazonensis* é capaz de produzir L-Pro somente a partir do intermediário do metabolismo, o P5C.

Na análise *in silico*, vimos que no genoma de *T. cruzi* CL-Brener há três sequências putativas para a P5CS. Suas respectivas sequências de aminoácidos codificadas por esses genes apresentam ambos os domínios característicos das P5CSs: família aldeído desidrogenase (na região C-terminal) e aminoácido quinase (na a região N-terminal) (HU; DELAUNEY; VERMA, 1992), mesmo que em sequências distintas. Em conformidade, na única sequência putativa para P5CS codificada pelo gene da cepa Sylvio apresenta esses dois domínios. Enquanto que, a sequência predita para essa enzima no genoma de *L. mexicana* codifica um produto proteico que não apresenta os sítios ativos do domínio aminoácido quinase. Como já citado na literatura, no genoma de *T. b. brucei* não existe sequência predita para P5CS (BRINGAUD et al., 2012; MANTILLA et al., 2017). Por isso, era esperado que dentre as formas replicativas do inseto vetor de Tritryps somente os epimastigotas de *T. cruzi* fossem capazes de produzir L-Pro a partir de L-Glu, como mostrado no ensaio *in vivo*.

Enquanto a sequência putativa para P5CR está presente nos três genomas, e as respectivas sequências de aminoácidos por elas codificadas apresentam quatro dos cinco motivos (motivos A, B, C, D e E) preditos para as P5CRs, visto que o motivo A é comumente encontrado em sequências para P5CR de plantas (FORLANI et al., 2015). A sequência de aminoácidos de *T. cruzi* apresenta uma maior semelhança global com a de *T. b. brucei* do que com a de *L. mexicana*. Porém, quando a comparação é restrita as regiões dos motivos C, D e E, que estão envolvidos na ligação do cofator NAD(P)H, à formação estrutural e à ligação do substrato L-P5C (FORLANI et al., 2015) a sequencia de *T. cruzi* apresenta maiores semelhanças com a de *L. mexicana* do que com as de *T. b.*

brucei. Tais diferenças não são encontradas em outras ortólogas como, por exemplo, de *A. thaliana, N. meningitides* e *H. sapiens*. Essa análise poderia explicar que, embora exista uma sequencia com características gerais de P5CR em *T. b. brucei*, o seu produto não é funcional. Ademais, nós confirmamos a auxotrofia desse parasita para L-pro, por também verificar que na ausência de glicose e desse aminoácido as formas procíclicas diminuem drasticamente a capacidade proliferativa, e ainda que a adição de P5C ao meio externo apresenta efeito tóxico nos parasitas interferidos para a TbP5CDH (*knock down*), demonstrando ser esta, a única enzima capaz de catabolizá-lo em *T. b. brucei* (MANTILLA et al., 2017).

O ensaio de biossíntese de L-Pro *in vivo*, além de demonstrar as divergências dessa via nos Tritryps, nos permitiu verificar que a partir do principal precursor de L-Orn, a L-Arg, não foi possível produzir L-Pro, ao contrário do que ocorre em outros organismos (BAUMGARTNER et al., 2000; DELAUNEY et al., 1993; KUO; STOCKER, 1969). Embora alguns tripanossomatídeos possuam a enzima arginase (EC 3.5.3.1) que converte L-Arg em L-Orn (BALANA-FOUCE et al., 2012; PEREIRA, 2014), em geral não foi evidenciada a presença da ornitina aminotransferase (EC 2.6.1.13) responsável pela interconversão entre L-Orn e GSA/P5C (YOSHIDA; CAMARGO, 1978). Estes fatos sustentam que evolutivamente aconteceu uma segregação dos metabolismos de L-Pro e L-Arg nos tripanossomatídeos.

De acordo com o fato de que o *T. b. brucei* não foi capaz de sintetizar prolina a partir de P5C, confirmamos que a atividade enzimática para P5CR em extrato proteico de *T. b. brucei* se existir é irrelevante quando comparadas as atividades encontradas em extratos de *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Entretanto, as atividades de *T. cruzi* e *L. amazonensis* apresentam diferenças relevantes tanto relacionadas a parâmetros cinéticos, quanto a dependência de cofator. Os valores obtidos de velocidade máxima e de K_M aparente são semelhantes a outros já descritos na literatura, também obtidos em extratos proteicos de diferentes organismos (tabela 3) (FORLANI et al., 2007; PEISACH; STRECKER, 1962; ROSSI et al., 1977). Diferentemente de TcP5CR que é exclusivamente dependente de NADPH, as outras P5CRs (como a LaP5CR) têm flexibilidade para oxidar NAD(P)H. A relação entre as diferentes velocidades obtidas na presença de NADPH e NADH ($V_{max}^{NADPH} / V_{max}^{NADH}$) em extrato proteico de *L. amazonensis* é igual a 2, similar à encontrada no extrato de *E. coli* (tabela 3) (ROSSI et al., 1977).

Organismo	KM ^{PSC} (mM)	V _{max} ^{app} (µmol /min mg)	V _{max} ^{NADPH} /V _{max} ^{NADH}	Referência
Escherichia coli	0,15	0,19	2	(ROSSI et al., 1977)
Bos tauros	0,069	0,04	4,7	(PEISACH; STRECKER, 1962)
Arabidopsis thaliana	0,39	0,048	0,17	(FORLANI et al., 2007)
Trypanosoma cruzi	0,024	0,16	-	Nesta Tese
Leishmania amazonesis	0,007	0,023	2	Nesta Tese

Tabela 3 – Caracterização da atividade P5CR em extratos proteicos de diferentes organismos.

4.2 Caracterização bioquímica da P5CR T. cruzi.

A atividade da TcP5CR foi analisada em mais detalhe a através de medições realizadas com a enzima recombinante (TcP5CR-6xHis). Como esperado, a K_M^{aap} para P5C obtida com TcP5CR-6xHis foi bem similar à obtida com extrato proteico total de epimastigotas e é também comparável com valores reportados para P5CRs recombinantes de outras espécies (tabela 4). Frisamos que, dentre essas constantes, o da TcP5CR-6xHis revela uma maior afinidade por P5C quando comparado com as de *Streptococcus pyogenes*, *Homo sapiens* (isoforma citosólica) e *Arabidopsis thaliana*. Em contrapartida, TcP5CR-6xHis produz L-Pro numa taxa menor do que essas outras enzimas (comparação entre figura 16 D e tabela 4) (DE INGENIIS et al., 2012; GIBERTI; FUNCK; FORLANI, 2014; PETROLLINO; FORLANI, 2012).

De acordo com sua localização subcelular, a TcP5CR-6xHis que é citosólica apresenta uma atividade maior em pH neutro, característica também descrita para P5CRs de outras espécies (MATSUZAWA, 1982; PETROLLINO; FORLANI, 2012; YURA; VOGEL, 1959). Nesse pH, o equilíbrio entre as espécies GSA/P5C é favorecido para formação de sua forma cíclica, o P5C (MANTILLA et al., 2015), o qual nos permite inferir que o substrato de TcP5CR seria P5C (FORLANI et al., 2015; NOCEK et al., 2005).

Organismo	KM ^{P5C} (mM)	V _{max} ^{app} (µmol /min mg)	Referência
Streptococcus pyogenes	0,184	696	(PETROLLINO; FORLANI, 2012)
<i>Homo sapiens</i> (isoforma citosólica)	0,38		(DE INGENIIS et al., 2012)
Arabidopsis thaliana	0,096	25	(GIBERTI et al., 2014)
Trypanosoma cruzi	0,028	2,15	Nesta Tese

Tabela 4 – Caracterização da atividade de P5CRs recombinantes de diferentes organismos.

Em relação à variação da atividade com a temperatura, TcP5CR-6xHis mostrou ser termoresistente, e sua atividade aumentou de forma linear até a 70 °C. Essa resistência térmica também foi evidenciada em P5CRs de outras espécies (GIBERTI et al., 2014; MENG et al., 2009; MENG et al., 2006). Coincidentemente, a energia de ativação determinada para TcP5CR-6xHis (15,8 KJ/mol) é comparável com a descrita na literatura para a P5CR de *Arabidopsis thaliana* (23,1 KJ/mol) (GIBERTI et al., 2014).

Interessantemente, TcP5CR-6xHis apresenta características particulares entres as P5CRs até agora descritas. Uma delas é a exclusiva utilização de NADPH como doador de elétrons, sendo que as caracterizações de outras P5CRs demonstram uma atividade NAD(P)H dependente, com preferência de acordo com a espécie e/ou a isoforma de um mesmo organismo (DE INGENIIS et al., 2012; FORLANI et al., 2015; MATSUZAWA; ISHIGURO, 1980; ROSSI et al., 1977). Esses dois cofatores são muitos similares, a única diferença entre estes é a presença de um grupo fosfato no nucleotídeo-2' da adenina do NADPH, que no NADH está substituído por um grupo hidroxila. Ambos servem de doadores de elétrons com mesma eficiência, ou seja, a reação redox das duplas (NADH/NAD⁺ e NADPH/NADP⁺) apresenta o mesmo potencial de redução padrão (-0,32 V). Entretanto, o grupo fosfato pode ser reconhecido em sítios específicos das enzimas, permitindo a distinção entre as duas espécies e a ação de catálise diferenciada. Como mencionado, nas P5CRs os motivos A, B e C estão envolvidos na ligação do cofator. Por exemplo, a conformação estrutural do motivo A permite que resíduos de cargas positivas interajam com a região da adenina juntamente

com o grupo fosfato, quando o cofator é NADPH. Tem sido descritas três tipos de interações entre o grupo fosfato e esses resíduos positivos do motivo A: interações envolvendo Ser³¹ e Arg³⁵, o modo 1; Lys⁴², o modo 2; e Asn³¹, o modo 3. A presença de resíduos de cargas positivas nessa região pode favorecer a seletividade da enzima para NADPH ao invés à forma não fosforilada (FORLANI et al., 2015).

O efeito inibitório (incompetitivo) exercido pelo substrato NADPH na atividade de TcP5CR é outra peculiaridade extremamente relevante, uma vez que esse comportamento aponta para a TcP5CR como um possível ponto de regulação no metabolismo de L-Pro em *T. cruzi*. Até o momento não há relatos de inibição de P5CRs exercida por substratos, e sim efeitos inibitórios exercidos por produtos como a L-pro, por exemplo, em *E. coli* (ROSSI et al., 1977), *H. sapiens* (DE INGENIIS et al., 2012) e *B. taurus* (PEISACH; STRECKER, 1962); e como por NADP⁺ em *A. thaliana* (GIBERTI et al., 2014), *R. norvegicus* (SHIONO; KADOR; KINOSHITA, 1986) e *Glycine max* (CHILSON et al., 1991). A inibição por substrato apresenta diversas funções biológicas, uma das mais conhecidas é o controle da glicólise através da inibição da fosfofrutoquinase exercida pelo cofator ATP, a fim de diminuir a oxidação da glicose que gera ATP quando este já é abundante na célula (REED; LIEB; NIJHOUT, 2010). Em conjunto, os dados cinéticos obtidos para a TcP5CR apontam para um mecanismo especial, descrito por uma série de equações diferenciais cujo processamento estamos realizando para obter a função cinética correspondente.

4.3 Avaliação da localização celular e expressão de TcP5CS e TcP5CR em diferentes estágios do parasita.

Em outros organismos as enzimas de biossíntese de L-Pro apresentam localizações subcelulares variadas. Geralmente, em mamíferos isoformas de P5CSs e P5CRs são encontradas no citoplasma e/ou na mitocôndria (ALNOUTI; KLAASSEN, 2008; BASCH; WICKHAM; FARRELL, 1996; DE INGENIIS et al., 2012; HU et al., 1999; KRAMER; GOODING; JONES, 1988; REVERSADE et al., 2009) e em plantas encontram-se no cloroplasto e/ou citoplasma (MURAHAMA et al., 2001; STEIN et al., 2011; SZEKELY et al., 2008; SZOKE et al., 1992), revisado em (FICHMAN et al., 2015). Entretanto em *T. cruzi*, claramente, determinamos a localização subcelular de

ambas as enzimas TcP5CS e TcP5CR no citoplasma. Tanto em ensaios de permeabilização por digitonina em epimastigotas, quanto em ensaios de imunoflurescência indireta com diferentes formas de *T. cruzi*, as enzimas sempre tiveram a mesma co-localização com os marcadores citosólicos.

Na análise de western blot, TcP5CS e TcP5CR mostraram uma maior expressão nas formas presentes no hospedeiro invertebrado e menor nas formas intracelulares. O ensaio de atividade de TcP5CR também confirmou essa relação. Porém, TcP5CR não foi reconhecida no western blot contra extratos proteicos totais de amastigota e epimastigota intracelular. Porém, a sua expressão foi evidenciada através da atividade enzimática. No hospedeiro invertebrado, como já citado, a principal fonte de carbono e energia são os aminoácidos, visto que a glicose é rapidamente consumida de maneira preferencial pelos epimastigotas em fase exponencial (BARISON et al., 2017; CACERES, O.; FERNANDES, 1976; CANNATA; CAZZULO, 1984). A catálise da P5CS envolve gasto de ATP (CSONKA; LEISINGER, 2007), o que justifica sua atividade aumentada nesse estágio, no qual o parasita ainda encontra nutrientes abundantes provenientes do repasto sanguíneo do inseto. Consequentemente, propomos que a TcP5CR acompanha esse aumento de atividade a fim de evitar um acúmulo de P5C citotóxico no citosol (DEUSCHLE et al., 2001; FARRANT et al., 2001; MANTILLA et al., 2017; NOMURA; TAKAGI, 2004). Entretanto, os tripomastigotas metacíclicos enfrentam escassez dos nutrientes, o que justifica a redução da expressão da TcP5CS e também da TcP5CR. Dessa forma, o papel de manter em baixos níveis o P5C produzido pela célula para a TcP5CDH, que apresenta uma atividade maior nessa fase (MANTILLA et al., 2015). Frisamos que a atividade da TcPRODH permanece constante entre as fases do parasita no inseto (PAES, L. S. et al., 2013). Embora em comparação ao epimastigota, a atividade da TcP5CR nos metacíclicos aparece diminuída, essa ainda é superior à de todos os estágios do ciclo celular do T. cruzi, apontando um papel relevante nessa fase. Uma característica do ambiente onde a metaciclogênese acontece é a baixa disponibilidade de nutrientes, sendo que estes são em sua maioria aminoácidos. Dentre estes, estão mais representados nos fluidos secretados aqueles que são mais abundantes na hemolinfa do inseto vetor: histidina, prolina, leucina, valina e lisina (HARINGTON, 1961a, 1961b). Os parasitas no inseto vetor, podem obter L-Pro via transporte, além da biossíntese, sugerindo para sua via uma função além de produzir L-Pro, como discutido posteriormente.

A atividade da via foi analisada separadamente em estágios presentes no hospedeiro mamífero, a fim de comparar com as relações já descritas na literatuta, sobre o transporte e o conteúdo de L-Pro (SILBER et al., 2009). Por isso, as atividades da TcP5CR foram analisadas em forma relativa, considerando-se 100% da atividade aquela presente no estágio do hospedeiro mamífero que a expressasse em maior nível (figura 26). Da mesma maneira, representaram-se as atividades de TcPRODH e TcP5CDH. Então, o balanço do conteúdo de L-Pro nesses estágios foi representado, considerando a obtenção desse aminoácido através das atividades de seu transporte e de sua biossíntese pela TcP5CR, e sua degradação pelas atividades TcPRODH e TcP5CDH (MANTILLA et al., 2015; PAES, L. S. et al., 2013) (figura 26).

Figura 28 - Balanço do conteúdo de L-Pro em *T. cruzi* apenas entre os estágios encontrados no hospedeiro de mamífero.



Variação relativa, em porcentagem, entre as atividades das enzimas de degradação de L-Pro (TcPRODH e TcP5CDH) e de biossíntese (TcP5CR), do transportador de L-Pro e seu acúmulo durante o ciclo celular do *T. cruzi* no hospedeiro mamífero. Dados obtidos em Mantilla et al., 2015, Paes et al., 2013, Silber et al., 2009.

Dentres os parasitas encontrados no hospedeiro vertebrado, os amastigotas (formas intracelulares) apresentam o transporte de L-Pro diminuído, com apenas aproximadamente 10% de sua máxima atividade, assim como as atividades da via degradativa da L-Pro, realizadas por ambas as enzimas TcPRODH e TcP5CDH. Enquanto que, a atividade de biossíntese pela TcP5CR atinge sua máxima neste estágio.

Portanto, concluímos que nos amastigotas, o conteúdo de L-Pro é alto devido à sua biossíntese, que por sua vez, deve ser alimentada por fontes de L-Glu não oriundas do próprio metabolismo de L-Pro. O *T. cruzi* é capaz de transportar L-Glu (SILBER et al., 2006), por isso, uma provável fonte de L-glu das formas intracelulares do parasita poderia ser seu transporte desde o citoplasma da célula hospedeira, uma vez que, o interior das células hospedeiras o apresenta em altas concentrações (HANSEN; EMBORG, 1994) (figura 26).

No estágio seguinte, nos epimastigotas intracelulares, o alto conteúdo de L-Pro dos amastigotas é amplamente utilizado pela via de degradação (MANTILLA et al., 2015; PAES, L. S. et al., 2013), coerentemente, com sua relevante participação na diferenciação dessas formas a tripomastigotas e com a elevada atividade do transporte de L-Pro (TONELLI et al., 2004). A L-Pro consumida é proveniente do meio externo (neste caso, também o citoplasma da célula hospedeira), como também da via de biossíntese, que então recicla esse aminoácido tão relevante nessa fase e impede um possível acúmulo de P5C gerado no catabolismo de L-Pro.

Nos tripomastigotas as duas vias de consumo do P5C aparecem elevadas (MANTILLA et al., 2015). Para isso ocorrer, a atividade da TcP5CS deve ser favorecida para sustentar o fornecimento de P5C, visto que a ativiadade da PRODH está drasticamente diminuída. Realmente, nesse estágio, a atividade da P5CS que é ATP dependente pode ser favorável devido à ampla disponibilidade de nutrientes encontradas pelo parasita. A entrada de P5C na célula e na mitocôndria foi demonstrada, ao determinar seu papel fisiológico na sustentação energética do processo de invasão celular realizado pelos tripomastigotas (MANTILLA et al., 2015).

4.4 A via de biossíntese de L-Pro e a disponibilidade de nutrientes entre as formas do inseto nos Tritryps.

Demonstramos que dentre os Tritryps, exclusivamente, o *T. b. brucei* é auxotrófico para L-Pro. Uma característica evidente e particular desse tripanossoma em relação ao *T. cruzi* e *L. amazonensis* é a ausência de formas intracelulares. Essa diferença poderia justificar ausência de biossíntese de L-Pro. Entretanto, ao analisar outros tripanossomas, encontramos que, por exemplo, no genoma de *T. rangeli* não há

sequências putativas para P5CS e nem para P5CR (base de dados TRITRYPDB), apesar de esse parasita apresentar formas intracelulares em seu hospedeiro vertebrado (D'ALESSANDRO; SARAIVA, 1992). Além disso, vimos que em T. cruzi as enzimas de biossíntese de L-Pro são principalmente relevantes nos estágios presentes no inseto vetor. Por isso, supomos que as diferenças encontradas na biossíntese de L-Pro entre os Tritryps provavelmente se relacionam com a disponibilidade desse aminoácido quando colonizam os seus respectivos insetos vetores. Deve ser levado em conta também, que durante a infecção do inseto vetor, a principal fonte de energia dos parasitas é o catabolismo de aminoácidos, dentre esses essencialmente de L-Pro (BRINGAUD et al., 2012; BRINGAUD et al., 2006). A partir desse raciocínio, inferimos que o T. b. brucei estaria em um ambiente continuamente rico de L-Pro quando estabelece a infecção em glândulas salivares de tsetse, enquanto que o T. cruzi e a Leishmania spp. estariam confinados em ambientes nos quais passariam por períodos de escassez em seus hospedeiros invertebrados. Alguns fatores poderiam levar a essas diferenças, como a frequência de repastos e a localização na qual o tripanossomatídeo coloniza seu hospedeiro invertebrado.

Tsetse apresenta um repasto sanguíneo a cada dois a três dias (HARGROVE; WILLIAMS, 1995; RANDOLPH; ROGERS; KIILU, 1991). Já os triatomíneos e flebotomíneos podem ser mais resistentes à falta de nutrientes. Dentre os triatomíneos, por exemplo, o Triatoma infestans podem apresentar um intervalo entre repastos sanguíneos de 4 a 7 dias, dependendo da estação do ano, e ainda entre 4,5 a 8 meses de acordo com o estágio da ninfa (CEBALLOS et al., 2005; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1969; RABINOVICH, 1972). De fato, o estresse nutricional é fundamental para o desenvolvimento do T. cruzi no triatomíneo, pois essa condição estimula a metaciclogênese e como também a aderência dos epimastigotas em fase estacionária ao epitélio do reto, processo importante nessa diferenciação (BONALDO et CONTRERAS et al., 1985; FIGUEIREDO; ROSA; SOARES, 2000; al., 1988; SULLIVAN, 1982). Além do mais, como dito anteriormente, nessa fase o metabolismo de L-Pro tem um papel importante ao induzir a diferenciação (CONTRERAS et al., 1985; HOMSY; GRANGER; KRASSNER, 1989). Em relação aos flebotomíneos, usualmente se alimentam de fontes naturais de acúcares como seiva de plantas (SCHLEIN; WARBURG, 1986) e somente as fêmeas podem se alimentar de sangue para sustentar a produção de ovos (KILLICK-KENDRICK, 1999; SCHLEIN, 1986).

Na literatura não se tem reportado a frequência de alimentação dos flebotomíneos, entretanto há relatos de que *Leishmania* spp. quando está colonizando o vetor passa por períodos ricos em nutrientes logo após os repastos, e por períodos de escassez quando colonizam o estomodeu (*mouthparts*) (SAUNDERS et al., 2010). Ainda, há variações devido ao intervalo entre repastos (CASTILHO-MARTINS et al., 2011). Assim como o *T. cruzi*, a metaciclogênese de *Leishmania* spp. ocorre após a fase estacionária de promastigotas (SACKS; PERKINS, 1985), provavelmente também estimulada pela depleção de nutrientes (CASTILHO-MARTINS et al., 2011).

Quando comparamos os Tritryps em relação a seus ciclos nos hospedeiros invertebrados, o *T. b. brucei* apresenta outra particularidade, este parasita não fica confinado à porção média do intestino, e sim também coloniza o proventrículo (DYER et al., 2013) e as glândulas salivares (SHARMA et al., 2009; TETLEY; VICKERMAN, 1985). Embora esse processo tenha mostrado uma menor taxa de sucesso (apenas uma pequena porcentagem das moscas que entram em contato com parasita estabelecem a infecção), essa localização proporcionaria um contato mais eficiente com nutrientes. Ademais, em concordância com esse raciocínio, agora comparando outros tripanossomatídeos, temos o *T. rangeli* que compartilha os mesmos vetores que o *T. cruzi*, gerando até infecções mistas (GRISARD et al., 1999; VALLEJO et al., 1988), e que não há genes preditos para P5CS e P5CR no seu genoma. Provavelmente, por o *T. rangeli* diferentemente do *T. cruzi* penetrar o epitélio do intestino do triatomíneo e chegar às glândulas salivares passando pela hemolinfa (DE STEFANI MARQUEZ et al., 2006).

4.5 Existência de um ciclo L-Pro/P5C envolvendo o citoplasma e a mitocôndria de *T. cruzi*.

Diferentes trabalhos propuseram a existência de um ciclo L-Pro/P5C relacionado à catálise de L-Pro no interior da mitocôndria e a sua biossíntese no citoplasma em diversos organismos (BALBONI, 1978; HAGEDORN; PHANG, 1983; MILLER et al., 2009). Para esse ciclo existir a L-Pro deve entrar na mitocôndria, enquanto que o P5C deve sair. De fato a passagem de L-Pro do citoplasma para a mitocôndria ocorre (ATLANTE et al., 1994; DI MARTINO et al., 2006), porém até o momento não foi demonstrado e nem caracterizado o transporte de P5C mitocondrial em direção ao

citoplasma, que é fundamental para sustentar a existência desse ciclo. Em T. cruzi, apesar de não ser descrito ainda um transportador mitocondrial de L-Pro, compreendese que esse aminoácido entra no espaço mitocondrial, no qual é catabolisado pela enzima TcPRODH. A TcPRODH é localizada na membrana mitocondrial, e sua atividade estimula o consumo de O_2 de maneira similar ao succinato, ao alimentar a CTE via a tranferência de elétrons ao pool de Ubiquinona (PAES, L. S. et al., 2011; PAES, L. V., 2010). Em T. b. brucei, a catálise completa de L-Pro também ocorre no interior da mitocôndria e alimenta a OxPHOS, promovendo a síntese de ATP (COUSTOU et al., 2008; LAMOUR et al., 2005; MANTILLA et al., 2017). Recentemente foi proposto que o transportador mitocondrial TbMCP14 desse organismo é encarregado da passagem de L-Pro ao interior da mitocôndria (DE MACEDO et al., 2015). No presente trabalho, medimos o deslocamento de P5C mitocondrial em direção ao citoplasma em tripanossomatídeos. Para isso, tivemos que quantificar esse metabólito no espaço extramitocondrial, após ser exclusivamente produzido no interior da mitocôndria a partir de L-Pro. A realização desse experimento só foi possível ao utilizarmos como modelo procíclicos de T. b. brucei com interferência para a TbP5CDH induzível, visto que em outros Tritryps, não existe uma técnica de silenciamento induzível de genes essenciais como provavelmente é o caso do gene para P5CDH, e ainda o P5C produzido pela PRODH poderia ser consumido pela P5CR. Assumindo que esse deslocamento também ocorre em T. cruzi, temos um forte indício da existência de um ciclo L-Pro/P5C em T. cruzi entre o citoplasma e espaço mitocondrial operativo na célula.

Demonstramos a função desse ciclo no *T. cruzi* utilizando procíclcos $Tb^{TcP5CR+}$. Em alguns organismos, esse ciclo foi proposto como um mecanismo de transferência de poder redutor (BALBONI, 1978; HAGEDORN; PHANG, 1986). No genoma de tripanossomatídeos, não há gene de transidrogenases (BERRIMAN et al., 2005). Por isso em *T. cruzi*, essa função se relacionada à condição de estresse nutricional. Na ausência de nutrientes, esse ciclo em *T. cruzi* permite a transferência de poder redutor armazenado em forma de NADPH citosólico a FADH₂ intramitocondrial, que por sua vez alimentaria a CTE. Assim como, a extensão desse ciclo, envolvendo a catálise completa de L-Pro até L-Glu e via interia de biossíntese (ciclo L-Pro/L-Glu), que também permite a transferência de poder redutor de NADPH citosólico abastecer a CTE via a produção de NADH intramitocondrial além de FADH₂. As formas epimastigotas

(em fase estacionária) e metacíclicas enfrentam uma condição de estresse nutricional no intestino do barbeiro, como já discutido, ambiente no qual sua principal fonte de carbono e energia, quando disponíveis, são os aminoácidos (CAZZULO et al., 1985) e nas quais a expressão de TcP5CS e TcP5CR e a atividade de TcP5CR são mais elevadas em relação a outros estágios do ciclo celular (figura 23). Em T. b. brucei, foi proposto que as diferentes isoformas (citosólica e mitocondrial) das enzimas málicas juntamente com a glicose-6-fofato desidrogenase citosólica (enzima que catalisa o primeiro passo da via das pentoses fosfato) desempenham o papel de transferência de hidrogênio via redução de NADP⁺ citosólico e mitocondrial em meios ricos e pobres de glicose (ALLMANN et al., 2013). Ainda nesse trabalho, os autores demonstraram que o catabolismo de L-Pro pode alimentar a via das pentoses fosfato, através da geração de glicose-6-fosfato, devido à direção dada a favor do fluxo gliconeogênico quando a L-Pro é fonte de carbono (ALLMANN et al., 2013). De maneira semelhante, em T. cruzi o catabolismo de L-Pro (captada do intestino do inseto vetor) pode alimentar ambas as isoformas málicas, direcionar o fluxo gliconeogênico, fornecendo glicose-6-fosfato a via das pentoses fosfato, e então, consequentemente alimentar o pool de NADPH citosólico e mitocondrial. A concentração do pool citosólico de NADPH regularia a atividade da TcP5CR. A redução do P5C pode estar inibida quando as concentrações de NADPH estiverem altas, tornando NADPH disponível a outras vias de biossíntese, inclusive à atividade da TcP5CS; e o P5C disponível à TcP5CDH, situação na qual teríamos um ciclo P5C/L-Glu mais operativo. Em contrapartida, em concentrações mais baixas de NADPH, devido a uma menor disponibilidade de L-Pro, nutricionalmente mais estressante, a atividade de TcP5CR seria favorecida, reciclando a L-Pro e competindo pelo P5C com a TcP5CDH. Ao comparar a afinidade de TcP5CDH e TcP5CR em relação ao P5C, a TcP5CR apresenta uma afinidade maior em relação à descrita para a TcP5CDH (indicado pelos vaores de K_M^{aap} de cada enzima: 28 µM para TcP5CR e 72 µM para TcP5CDH) (MANTILLA et al., 2015) conforme a nossa hipótese. Isto também sustenta que funcionalidade do ciclo L-Pro/P5C seja aumentar a sobrevivência do parasita em condições de estresse nutricional mais severas, ao colonizar o intestino de um inseto que pode demorar vários meses sem se alimentar (CEBALLOS et al., 2005; PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, 1969; RABINOVICH, 1972).



Esquema 4 – Representação esquemática do metabolismo em *T. cruzi* quando L-Pro é a principal fonte de carbono e energia em alta ou baixa disponibilidade.

As setas em preto indicam os passos enzimáticos do metabolismo que propomos ocorrer quando L-Pro é a principal fonte de carbono e energia, as setas em pontilhado os passos que ocorrem em baixo nível, as setas tracejadas a entrada e/ou a saída de substratos entre compartimentos subcelulares: citoplasma e glicossomo e mitocôndria, baseado em Allmann et al., 2013, Bringaud et al., 2012, Christmas et al., 2000, Mantilla et al. 2015, Paes et al., 2010, 2013, Saye et al., 2014. As setas em verdes representam as reações que propomos participar do fluxo metabólico em ambiente com alta disponibilidade de nutrientes inclusive L-Pro (A) e em escassez de nutrientes (B). Em ambas as condições o *pool* citosólico de NADPH modulam esse fluxo através da regulação da atividade de TcP5CR. Em A, a alta disponibilidade de nutrientes, aumenta a concentração desse pool, inibindo a catálise exercida pela TcP5CR e então

contribuindo à existência de um ciclo GSA/L-Glu mais funcional. Em B, a ausência de nutrientes resulta a uma menor concentração do pool citosólico de NADPH, favorecendo a atividade de TcP5CR e, consequentemente, permitindo a reciclagem de L-Pro via um ciclo P5C/L-Pro mais funcional. As abreviações são: Suc-CoA - succinil-CoA, Suc - succinato, Fum - fumarato, Mal - malato, Oxa oxalacetato, Cit - citrato, Isocit - isocitrato, U - ubiquinona, c - citocromo c, Pir - piruvato, PEP fosfoenolpiruvato, G6P - glicose-6-fosfato, 6PGL - 6-fosfogliconolactona, 6PG - 6-fosfogliconato, R5P – ribulose-5-fosfato. As enzimas enumeradas são: 1 – prolina desidrogenase, 2 – Δ^1 -pirrolina-5carboxilato desidrogenase, 3 - glutamato desidrogenase, 4 - complexo α-cetoglutarato desidrogenase, 5 succinil-CoA sintetase, 6 - fumarato reductase NADH-dependente mitocondrial, 7 - fumarase mitocondrial, 8 - malato desidrogenase mitocondrial, 9 - citrato sintase, 10 - aconitase, 11 - isocitrato desidrogenase, 12 – enzima málica mitocondrial, 13 – enzima málica citosólica, 14 - Δ^1 -pirrolina-5carboxilato sintase, $15 - \Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato redutase, 16 - piruvato fosfato diquinase, 17 - malatodesidrogenase glicossomal, 18 - fosfoenolpiruvato carboxiquinase, 19 - glucose-6-fosato desidrogenase, 20 - lactonase, 21 - 6-fosfogliconato desidrogenase, 22 - succinato desidrogenase, 23 - glicerol 3-fosfato desidrogenase, 24 - NADH desidrogenase (insensível a rotenona), 25 - F_oF₁-ATP sintase. S_{A,B} representa os dois sistemas de transporte de L-Pro.

CONCLUSÕES

- Dentre os tripanossomatídeos, a presença de uma via de biossíntese de L-Pro operativa apresenta divirgências: o *T. cruzi* é capaz de produzir L-Pro a partir de L-Glu, *L. amazonensis* produz L-Pro apenas a partir do intermediário P5C, e o *T. b. brucei* é auxotrófico para L-Pro.
- A LaP5CR mostrou-se mais flexível que a TcP5CR em relação ao cofator, podendo oxidar NADH e ou NADPH, ao passo que TcP5CR mostrou-se NADPH dependente.
- Os nossos dados mostram que em *T. cruzi* a enzima responsável pela síntese de P5C a partir de L-Glu (denominada neste trabalho TcP5CS) seria bifuncional, assim como predito no genoma da cepa Sylvio para a sequência TcSYLVIO_005298.
- A via completa de biossíntese de L-Pro ocorre no citoplasma de *T. cruzi*. Particularmente, a TcP5CR reduz o P5C somente via a oxidação de NADPH, e interessantemente, essa enzima aponta ser um ponto regulatório no metabolismo de L-Pro através do *pool* de NADPH citosólico.
- Ambas as enzimas da via de biossíntese de L-Pro são majoritariamente expressas nos estágios do *T. cruzi* presentes no inseto vetor, estágios nos quais TcP5CR também encontra-se mais ativa.
- O P5C é capaz de ser transportado desde a mitocôndria para o citoplasma, confirmando junto à via de biossíntese e de degradação a existência de um sistema de transidrogenase e um *shuttle*, permtindo a transferência de poder redutor desde os *pools* citoplásmáticos de NADPH aos *pools* intramitocondriais de FADH₂ e NADH.
- O sistema de transidrogenase/*shuttle* descrito permite aumentar a resistência ao estresse nutricional.

REFERÊNCIAS*

AKHOUNDI, M. et al. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 3, p. e0004349, Mar 2016.

ALLMANN, S. et al. Cytosolic NADPH homeostasis in glucose-starved procyclic *Trypanosoma brucei* relies on malic enzyme and the pentose phosphate pathway fed by gluconeogenic flux. **J Biol Chem.**, v. 288, n. 25, p. 18494-18505, Jun 21 2013.

ALMEIDA-DE-FARIA, M. et al. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. **Exp Parasitol.**, v. 92, n. 4, p. 263-274, Aug 1999.

ALNOUTI, Y.; KLAASSEN, C. D. Tissue distribution, ontogeny, and regulation of aldehyde dehydrogenase (Aldh) enzymes mRNA by prototypical microsomal enzyme inducers in mice. **Toxicol Sci.**, v. 101, n. 1, p. 51-64, Jan 2008.

APT, W.; ZULANTAY, I. [Update on the treatment of Chagas' disease]. **Rev Med** Chil., v. 139, n. 2, p. 247-257, Feb 2011.

ASATO, Y. et al. Phylogenic analysis of the genus *Leishmania* by cytochrome b gene sequencing. **Exp Parasitol.**, v. 121, n. 4, p. 352-361, Apr 2009.

ASLETT, M. et al. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, n. Database issue, p. D457-D462, Jan 2010.

ATLANTE, A. et al. Proline transport in rat kidney mitochondria. Arch Biochem Biophys., v. 309, n. 1, p. 139-148, Feb 15 1994.

BALANA-FOUCE, R. et al. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Mol Biochem Parasitol.,** v. 181, n. 2, p. 85-93, Feb 2012.

BALBONI, E. A proline shuttle in insect flight muscle. **Biochem Biophys Res Commun.**, v. 85, n. 3, p. 1090-1096, Dec 14 1978.

*De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002 BALOGUN, R. A. Studies on the amino acids of the tsetse fly, *Glossina morsitans*, maintained on in vitro and in vivo feeding systems. **Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.**, v. 49, n. 2A, p. 215-222, Oct 01 1974.

BARISON, M. J. et al. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr., v. 48, n. 4, p. 437-449, Aug 2016.

BARISON, M. J. et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvationinduced metabolic switch in Trypanosoma cruzi epimastigotes. **J Biol Chem.**, v. 292, n. 21, p. 8964-8977, May 26 2017.

BARRETT, M. P. et al. The trypanosomiases. Lancet, v. 362, n. 9394, p. 1469-1480, Nov 01 2003.

BASCH, J. J.; WICKHAM, E. D.; FARRELL, H. M., JR. Pyrroline-5-carboxylate reductase in lactating bovine mammary glands. **J Dairy Sci.**, v. 79, n. 8, p. 1361-1368, Aug 1996.

BATES, L. S.; WALDRON, R. P.; TEARE, I. D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant and Soil.**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BAUMGARTNER, M. R. et al. Hyperammonemia with reduced ornithine, citrulline, arginine and proline: a new inborn error caused by a mutation in the gene encoding delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthase. **Hum Mol Genet.**, v. 9, n. 19, p. 2853-2858, Nov 22 2000.

BERN, C.; MONTGOMERY, S. P. An estimate of the burden of Chagas disease in the United States. **Clin Infect Dis.**, v. 49, n. 5, p. e52-e54, Sep 01 2009.

BERRIMAN, M. et al. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 416-422, Jul 15 2005.

BONALDO, M. C. et al. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. **J Cell Biol.**, v. 106, n. 4, p. 1349-1358, Apr 1988.

BOSCARDIN, S. B. et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J Cell Mol Med.**, v. 14, n. 6B, p. 1373-1384, Jun 2010.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem.**, v. 72, p. 248-254, May 07 1976.

BRENER, Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 13, n. 3, p. 171-178, May-Jun 1971.

_____. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol., v. 27, p. 347-382, 1973.

BRENER, Z.; CHIARI, E. [Morphological Variations Observed in Different Strains of *Trypanosoma cruzi*]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 5, p. 220-224, Sep-Oct 1963.

BRINGAUD, F.; BARRETT, M. P.; ZILBERSTEIN, D. Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. **Front Biosci.**, v. 17, p. 349-374, Jan 01 2012.

BRINGAUD, F.; RIVIERE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 149, n. 1, p. 1-9, Sep 2006.

BRUN, R.; SCHONENBERGER. Cultivation and in vitro cloning or procyclic culture forms of *Trypanosoma brucei* in a semi-defined medium. Short communication. Acta **Trop.**, v. 36, n. 3, p. 289-292, Sep 1979.

BURSELL, E. Substrates of oxidative metabolism in dipteran flight muscle. **Comp Biochem Physiol B.**, v. 52, n. 2, p. 235-238, Oct 15 1975.

_____. The role of proline in energy metabolism. In Energy Metabolism of Insects. New York, London: Plenum Press, p. 135-159, 1981.

CACERES, A. J. et al. Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 126, n. 2, p. 251-262, Feb 2003.

CACERES, O.; FERNANDES, J. F. Glucose metabolism, growth and differentiation of *Trypanocoma cruzi*. **Rev Bras Biol.**, v. 36, n. 2, p. 397-410, Aug 1976.

CAMARGO, E. P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 6, p. 93-100, May-Jun 1964.

CANCADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo,** v. 44, n. 1, p. 29-37, Jan-Feb 2002.

CANNATA, J. J.; CAZZULO, J. J. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B., v. 79, n. 3, p. 297-308, 1984.

CARRANZA, J. C. et al. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. **J Bioenerg Biomembr.,** v. 41, n. 3, p. 299-308, Jun 2009.

CASTILHO-MARTINS, E. A. et al. Axenic *Leishmania amazonensis* promastigotes sense both the external and internal arginine pool distinctly regulating the two transporter-coding genes. **PLoS One,** v. 6, n. 11, p. e27818, 2011.

CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FASEB J.**, v. 6, n. 13, p. 3153-3161, Oct 1992.

CAZZULO, J. J.; CAZZULO FRANKE, M. C.; FRANKE DE CAZZULO, B. M. On the regulatory properties of the pyruvate kinase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 50, n. 3, p. 259-263, Jun 1989.

CAZZULO, J. J. et al. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 16, n. 3, p. 329-343, Sep 1985.

CAZZULO, J. J.; JUAN, S. M.; SEGURA, E. L. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. **Comp Biochem Physiol B.**, v. 56, n. 3, p. 301-303, 1977.

CEBALLOS, L. A. et al. Feeding rates, nutritional status and flight dispersal potential of peridomestic populations of *Triatoma infestans* in rural northwestern Argentina. Acta **Trop.**, v. 95, n. 2, p. 149-159, Aug 2005.

CHAGAS, C. R. J. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Mem do Inst Oswaldo Cruz.,** v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.

CHEN, C.; DICKMAN, M. B. Proline suppresses apoptosis in the fungal pathogen *Collectrichum trifolii*. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 102, n. 9, p. 3459-3464, Mar 01 2005.

CHILSON, O. P.; KELLY-CHILSON, A. E.; SIEGEL, N. R. Pyrroline-5-carboxylate reductase in soybean nodules: isolation/partial primary structure/evidence for isozymes. **Arch Biochem Biophys.**, v. 288, n. 2, p. 350-357, Aug 01 1991.

CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 16, n. 3, p. 315-327, Sep 1985.

COORDINATORS, N. R. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. Nucleic Acids Res., v. 45, n. D1, p. D12-D17, Jan 04 2017.

COUSTOU, V. et al. Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. **J Biol Chem.,** v. 283, n. 24, p. 16342-16354, Jun 13 2008.

CROSS, G. A.; KLEIN, R. A.; LINSTEAD, D. J. Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. **Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 311-326, Oct 1975.

CSONKA, L. N.; LEISINGER, T. Biosynthesis of Proline. EcoSal Plus, v. 2, n. 2, Apr 2007.

D'ALESSANDRO, A.; SARAIVA, N. *Trypanosoma rangeli*. In Parasitic Protozoa, 2nd ed., Vol. 2, Academic Press, San Diego, p. 1-54, 1992.

DA SILVA, M. F.; FLOETER-WINTER, L. M. Arginase in *Leishmania*. Subcell Biochem., v. 74, p. 103-117, 2014.

DE INGENIIS, J. et al. Functional specialization in proline biosynthesis of melanoma. **PLoS One,** v. 7, n. 9, p. e45190, 2012.

DE MACEDO, J. P. et al. An Atypical Mitochondrial Carrier That Mediates Drug Action in *Trypanosoma brucei*. **PLoS Pathog.**, v. 11, n. 5, p. e1004875, May 2015.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int J Biochem Cell Biol.**, v. 41, n. 10, p. 2069-2080, Oct 2009.

DE STEFANI MARQUEZ, D. et al. Susceptibility of different triatomine species to *Trypanosoma rangeli* experimental infection. **Vector Borne Zoonotic Dis.,** v. 6, n. 1, p. 50-56, Spring 2006.

DELAUNEY, A. J. et al. Cloning of ornithine delta-aminotransferase cDNA from *Vigna aconitifolia* by trans-complementation in *Escherichia coli* and regulation of proline biosynthesis. **J Biol Chem.**, v. 268, n. 25, p. 18673-18678, Sep 05 1993.

DEUSCHLE, K. et al. A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. **Plant J.**, v. 27, n. 4, p. 345-356, Aug 2001. DI MARTINO, C. et al. Mitochondrial transport in proline catabolism in plants: the existence of two separate translocators in mitochondria isolated from durum wheat seedlings. **Planta**, v. 223, n. 6, p. 1123-1133, May 2006.

DIAS, J. C.; SILVEIRA, A. C.; SCHOFIELD, C. J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz.,** v. 97, n. 5, p. 603-612, Jul 2002.

DUGGLEBY, R. G. Quantitative analysis of the time courses of enzyme-catalyzed reactions. **Methods,** v. 24, n. 2, p. 168-174, Jun 2001.

DYER, N. A. et al. Flying tryps: survival and maturation of trypanosomes in tsetse flies. **Trends Parasitol.**, v. 29, n. 4, p. 188-196, Apr 2013.

EL-SAYED, N. M. et al. Comparative genomics of trypanosomatid parasitic protozoa. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 404-409, Jul 15 2005.

ELIAS, M. C. et al. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. **Protist.**, v. 158, n. 2, p. 147-157, Apr 2007.

FARRANT, R. D. et al. Pyridoxal phosphate de-activation by pyrroline-5-carboxylic acid. Increased risk of vitamin B6 deficiency and seizures in hyperprolinemia type II. **J Biol Chem.**, v. 276, n. 18, p. 15107-15116, May 04 2001.

FERRAZ, J. D. Clonagem dos genes putativos para prolina desidrogenase e $\Delta 1$ pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de *Leishmania (Leishmania) amazonesis* e caracterização funcional de seus produtos. p. 92 (Dissertação de Mestrado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

FICHMAN, Y. et al. Evolution of proline biosynthesis: enzymology, bioinformatics, genetics, and transcriptional regulation. **Biol Rev Camb Philos Soc.**, v. 90, n. 4, p. 1065-1099, Nov 2015.

FIDALGO, L. M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharm Res.**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, Nov 2011.

FIGUEIREDO, R. C.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **J Parasitol.**, v. 86, n. 6, p. 1213-1218, Dec 2000.

FORLANI, G. et al. Plant P5C reductase as a new target for aminomethylenebisphosphonates. J Agric Food Chem., v. 55, n. 11, p. 4340-4347, May 30 2007.

FORLANI, G. et al. Evolution of plant delta(1)-pyrroline-5-carboxylate reductases from phylogenetic and structural perspectives. **Front Plant Sci.,** v. 6, p. 567, 2015.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. Acta Trop., v. 115, n. 1-2, p. 22-27, Jul-Aug 2010.

GASTEIGER, E. et al. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: (Ed.), 2005. p.pp. 571-607

GAUR, U. et al. An effect of parasite-encoded arginase on the outcome of murine cutaneous leishmaniasis. **J Immunol.**, v. 179, n. 12, p. 8446-8453, Dec 15 2007.

GERALDO, M. V. et al. Characterisation of a developmentally regulated amino acid transporter gene from *Leishmania amazonensis*. **FEMS Microbiol Lett.,** v. 242, n. 2, p. 275-280, Jan 15 2005.

GIBERTI, S.; FUNCK, D.; FORLANI, G. Delta1-Pyrroline-5-carboxylate reductase from *Arabidopsis thaliana*: stimulation or inhibition by chloride ions and feedback regulation by proline depend on whether NADPH or NADH acts as co-substrate. **New Phytol**, v. 202, n. 3, p. 911-919, May 2014.

GIORDANI, F. et al. The animal trypanosomiases and their chemotherapy: a review. **Parasitology**, v. 143, n. 14, p. 1862-1889, Dec 2016.

GRISARD, E. C. et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. **Mem Inst Oswaldo Cruz.,** v. 94, n. 2, p. 203-209, Mar-Apr 1999.

HAGEDORN, C. H.; PHANG, J. M. Transfer of reducing equivalents into mitochondria by the interconversions of proline and delta 1-pyrroline-5-carboxylate. Arch Biochem Biophys., v. 225, n. 1, p. 95-101, Aug 1983.

_____. Catalytic transfer of hydride ions from NADPH to oxygen by the interconversions of proline and delta 1-pyrroline-5-carboxylate. Arch Biochem Biophys., v. 248, n. 1, p. 166-174, Jul 1986.

HANSEN, H. A.; EMBORG, C. Extra- and intracellular amino acid concentrations in continuous Chinese hamster ovary cell culture. **Appl Microbiol Biotechnol.,** v. 41, n. 5, p. 560-564, Jul 1994.

HARGROVE, J. W.; WILLIAMS, B. G. A cost-benefit analysis of feeding in female tsetse. **Med Vet Entomol.**, v. 9, n. 2, p. 109-119, Apr 1995.

HARINGTON, J. S. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* I. Analysis of the haemolymph. **Parasitology**, v. 51, p. 309-318, Nov 1961a.

_____. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* II. Analysis of the excretory material. **Parasitology**, v. 51, p. 319-326, Nov 1961b.

HAYZER, D. J.; LEISINGER, T. The gene-enzyme relationships of proline biosynthesis in *Escherichia coli*. J Gen Microbiol., v. 118, n. 2, p. 287-293, Jun 1980.

HOMSY, J. J.; GRANGER, B.; KRASSNER, S. M. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. **J Protozool.**, v. 36, n. 2, p. 150-153, Mar-Apr 1989.

HU, C. A.; DELAUNEY, A. J.; VERMA, D. P. A bifunctional enzyme (delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase) catalyzes the first two steps in proline biosynthesis in plants. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 19, p. 9354-9358, Oct 01 1992.

HU, C. A. et al. Molecular enzymology of mammalian Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase. Alternative splice donor utilization generates isoforms with different sensitivity to ornithine inhibition. **J Biol Chem.**, v. 274, n. 10, p. 6754-6762, Mar 05 1999.

JONES, P. et al. InterProScan 5: genome-scale protein function classification. **Bioinformatics**, v. 30, n. 9, p. 1236-1240, May 01 2014.

JUAN, S. M.; SEGURA, E. L.; CAZZULO, J. J. Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Int J Biochem.,** v. 9, n. 6, p. 395-400, 1978.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. Clin **Dermatol.**, v. 17, n. 3, p. 279-289, May-Jun 1999.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol Today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, Sep 2000.

KRAMER, J. J.; GOODING, R. C.; JONES, M. E. A radiochemical assay for a NADP+-specific gamma-glutamate semialdehyde dehydrogenase extracted from mitochondrial membrane of rat intestinal epithelial cells. **Anal Biochem.**, v. 168, n. 2, p. 380-386, Feb 01 1988.

KRANSDORF, E. P.; ZAKOWSKI, P. C.; KOBASHIGAWA, J. A. Chagas disease in solid organ and heart transplantation. **Curr Opin Infect Dis.,** v. 27, n. 5, p. 418-424, Oct 2014.

KRASSNER, S. M.; FLORY, B. Proline metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **J Protozool.**, v. 19, n. 4, p. 682-685, Nov 1972.

KRISHNAN, N.; BECKER, D. F. Oxygen reactivity of PutA from *Helicobacter* species and proline-linked oxidative stress. **J Bacteriol.**, v. 188, n. 4, p. 1227-1235, Feb 2006.

KRISHNAN, N.; DICKMAN, M. B.; BECKER, D. F. Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. **Free Radic Biol Med.,** v. 44, n. 4, p. 671-681, Feb 15 2008.

KUO, T. T.; STOCKER, B. A. Suppression of proline requirement of proA and proAB deletion mutants in *Salmonella typhimurium* by mutation to arginine requirement. **J Bacteriol**, v. 98, n. 2, p. 593-598, May 1969.

KUZMIC, P. Program DYNAFIT for the analysis of enzyme kinetic data: application to HIV proteinase. **Anal Biochem.**, v. 237, n. 2, p. 260-273, Jun 01 1996.

L'HOSTIS, C.; GEINDRE, M.; DESHUSSES, J. Active transport of L-proline in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. **Biochem J.**, v. 291 (Pt 1), p. 297-301, Apr 01 1993.

LAMOUR, N. et al. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. **J Biol Chem.,** v. 280, n. 12, p. 11902-11910, Mar 25 2005.

LAW, S. S.; MUKKADA, A. J. Transport of L-proline and its regulation in *Leishmania tropica* promastigotes. **J Protozool.**, v. 26, n. 2, p. 295-301, May 1979.

LEROUX, A. et al. Functional characterization and subcellular localization of the three malate dehydrogenase isozymes in *Leishmania* spp. **Mol Biochem Parasitol.,** v. 149, n. 1, p. 74-85, Sep 2006.

MAGDALENO, A. et al. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4534, 2009.

MANCILLA, R.; NAQUIRA, C.; LANAS, C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol.**, v. 21, n. 2, p. 154-159, Oct 1967.

MANTILLA, B. S. et al. Proline Metabolism is Essential for *Trypanosoma brucei brucei* Survival in the Tsetse Vector. **PLoS Pathog.**, v. 13, n. 1, p. e1006158, Jan 2017.

MANTILLA, B. S. et al. Role of Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. **J Biol Chem.,** v. 290, n. 12, p. 7767-7790, Mar 20 2015.

MARCIANO, D. et al. Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol., v. 161, n. 1, p. 12-20, Sep 2008.

MARCO-MARIN, C. et al. A novel two-domain architecture within the amino acid kinase enzyme family revealed by the crystal structure of *Escherichia coli* glutamate 5-kinase. **J Mol Biol.**, v. 367, n. 5, p. 1431-1446, Apr 13 2007.

MAROLI, M. et al. Phlebotomine sandflies and the spreading of leishmaniases and other diseases of public health concern. **Med Vet Entomol.**, v. 27, n. 2, p. 123-147, Jun 2013.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Trop Med Int Health.**, v. 19, n. 8, p. 943-957, Aug 2014.

MARTINS, R. M. et al. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infect Immun.,** v. 77, n. 7, p. 3023-3032, Jul 2009.

MATSUZAWA, T. Purification and characterization of pyrroline-5-carboxylate reductase from bovine retina. **Biochim Biophys Acta**, v. 717, n. 2, p. 215-219, Aug 06 1982.

MATSUZAWA, T.; ISHIGURO, I. Delta 1-pyrroline-5-carboxylate reductase from baker's yeast: further purification by affinity chromatography with 5' AMP-Sepharose 4B. **Biochim Biophys Acta**, v. 616, n. 2, p. 381-383, Dec 04 1980.

MAZAREB, S.; FU, Z. Y.; ZILBERSTEIN, D. Developmental regulation of proline transport in *Leishmania donovani*. **Exp Parasitol.**, v. 91, n. 4, p. 341-348, Apr 1999.

MCCARTHY-BURKE, C.; TAYLOR, Z. A.; BUCK, G. A. Characterization of the spliced leader genes and transcripts in *Trypanosoma cruzi*. **Gene**, v. 82, n. 1, p. 177-189, Oct 15 1989.

MENG, Z. et al. Purification, characterization and crystallization of pyrroline-5carboxylate reductase from the hyperthermophilic archeon *Sulfolobus solfataricus*. **Protein Expr Purif.**, v. 64, n. 2, p. 125-130, Apr 2009.

MENG, Z. et al. Crystal structure of human pyrroline-5-carboxylate reductase. **J Mol Biol.**, v. 359, n. 5, p. 1364-1377, Jun 23 2006.

MEZL, V. A.; KNOX, W. E. Properties and analysis of a stable derivative of pyrroline-5-carboxylic acid for use in metabolic studies. **Anal Biochem.**, v. 74, n. 2, p. 430-440, Aug 1976.

MICHELS, P. A. et al. Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. **Biochim Biophys Acta**, v. 1763, n. 12, p. 1463-1477, Dec 2006.

MILLER, G. et al. Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. **J Biol Chem.**, v. 284, n. 39, p. 26482-26492, Sep 25 2009.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 98, n. 5, p. 577-591, Jul 2003.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann Trop Med Parasitol.,** v. 100, n. 8, p. 663-677, Dec 2006.

MURAHAMA, M. et al. Purification and characterization of Delta(1)-pyrroline-5carboxylate reductase isoenzymes, indicating differential distribution in spinach (*Spinacia oleracea L.*) leaves. **Plant Cell Physiol.**, v. 42, n. 7, p. 742-750, Jul 2001.

NOCEK, B. et al. Crystal structures of delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase from human pathogens *Neisseria meningitides* and *Streptococcus pyogenes*. J Mol Biol., v. 354, n. 1, p. 91-106, Nov 18 2005.

NOMURA, M.; TAKAGI, H. Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 34, p. 12616-12621, Aug 24 2004.

NOWICKI, C.; CAZZULO, J. J. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.**, v. 151, n. 3, p. 381-390, Nov 2008.

OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annu Rev Microbiol.**, v. 41, p. 127-151, 1987.

OPPERDOES, F. R.; COOMBS, G. H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends Parasitol.**, v. 23, n. 4, p. 149-158, Apr 2007.

OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 7, p. 310-317, Jul 2008.

PAES, L. S. et al. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. **Curr Pharm Des.**, v. 17, n. 20, p. 2074-2099, 2011.

PAES, L. S. et al. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 8, n. 7, p. e69419, 2013.

PAES, L. V. **Caracterização molecular e bioquímica da prolina desidrogenase de** *Trypanosoma cruzi*, um possível alvo terapêutico. (Dissertação de Doutorado). Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PEISACH, J.; STRECKER, H. J. The interconversion of glutamic acid and proline. V. The reduction of delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid to proline. **J Biol Chem.**, v. 237, p. 2255-2260, Jul 1962.

PEPIN, J.; MEDA, H. A. The epidemiology and control of human African trypanosomiasis. Adv Parasitol., v. 49, p. 71-132, 2001.

PEREIRA, C. A. Arginine kinase: a potential pharmacological target in trypanosomiasis. **Infect Disord Drug Targets**, v. 14, n. 1, p. 30-36, 2014.

PEREIRA, C. A. et al. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. **J Biol Chem.**, v. 275, n. 2, p. 1495-1501, Jan 14 2000.

PEREIRA, C. A. et al. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. **J Eukaryot Microbiol.**, v. 49, n. 1, p. 82-85, Jan-Feb 2002.

PEREIRA, C. A. et al. Singular features of trypanosomatids' phosphotransferases involved in cell energy management. **Enzyme Res.**, v. 2011, p. 576483, 2011.

PEREZ-ARELLANO, I. et al. Pyrroline-5-carboxylate synthase and proline biosynthesis: from osmotolerance to rare metabolic disease. **Protein Sci.,** v. 19, n. 3, p. 372-382, Mar 2010.

PEREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. Lancet, Jun 30 2017.

PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. [*T. infestans* biology, principal vector of Chagas' disease in Brazil (importance of various of its biological characteristics in planning the campaign against this vector)]. **Rev Bras Malariol Doencas Trop.**, v. 21, n. 1, p. 117-159, Jan-Mar 1969.

PETROLLINO, D.; FORLANI, G. Coenzyme preference of *Streptococcus pyogenes* delta1-pyrroline-5-carboxylate reductase: evidence supporting NADPH as the physiological electron donor. **Amino Acids.**, v. 43, n. 1, p. 493-497, Jul 2012.

PHILO, R. D.; SELWYN, M. J. Use of progress curves to investigate product inhibition in enzyme-catalysed reactions. Application to the soluble mitochondrial adenosine triphosphatase. **Biochem J.**, v. 135, n. 3, p. 525-530, Nov 1973.

PUNUKOLLU, G. et al. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **Int J Cardiol.**, v. 115, n. 3, p. 279-283, Feb 14 2007.

RABINOVICH, J. E. Vital statistics of *Triatominae* (Hemiptera: *Reduviidae*) under laboratory conditions. I. *Triatoma infestans* Klug. **J Med Entomol.**, v. 9, n. 4, p. 351-370, Aug 01 1972.

RANDOLPH, S. E.; ROGERS, D. J.; KIILU, J. The feeding behaviour, activity and trappability of wild female *Glossina pallidipes* in relation to their pregnancy cycle. **Med Vet Entomol.**, v. 5, n. 3, p. 335-350, Jul 1991.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am.,** v. 26, n. 2, p. 275-291, Jun 2012.

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. Lancet, v. 375, n. 9723, p. 1388-1402, Apr 17 2010.

REED, M. C.; LIEB, A.; NIJHOUT, H. F. The biological significance of substrate inhibition: a mechanism with diverse functions. **Bioessays**, v. 32, n. 5, p. 422-429, May 2010.

REVERSADE, B. et al. Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features. **Nat Genet.**, v. 41, n. 9, p. 1016-1021, Sep 2009.

RHODES, D.; HANDA, S.; BRESSAN, R. A. Metabolic changes associated with adaptation of plant cells to water stress. **Plant Physiol.**, v. 82, n. 4, p. 890-903, Dec 1986.

RIOU, G.; DELAIN, E. Abnormal circular DNA molecules induced by ethidium bromide in the kinetoplast of *Trypanosoma cruzi*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 64, n. 2, p. 618-625, Oct 1969a.

_____. Electron microscopy of the circular kinetoplastic DNA from *Trypanosoma cruzi*: occurrence of catenated forms. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 62, n. 1, p. 210-217, Jan 1969b.

RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM, G. S.;COUSSENS, N. P., *et al* (Ed.). Assay Guidance Manual. Bethesda (MD), p. 10-14, 2004.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Res.**, v. 42, n. Web Server issue, p. W320-W324, Jul 2014.

ROBERTSON, L. J. et al. *Trypanosoma cruzi*: Time for International Recognition as a Foodborne Parasite. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 10, n. 6, p. e0004656, Jun 2016.

ROHLOFF, P.; DOCAMPO, R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol.**, v. 118, n. 1, p. 17-24, Jan 2008.

ROOSENS, N. H. et al. Isolation of the ornithine-delta-aminotransferase cDNA and effect of salt stress on its expression in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Physiol.**, v. 117, n. 1, p. 263-271, May 1998.

ROSS, C. A. *Trypanosoma congolense*: differentiation to metacyclic trypanosomes in culture depends on the concentration of glutamine or proline. **Acta Trop.,** v. 44, n. 3, p. 293-301, Sep 1987.

ROSSI, J. J. et al. Partial purification and some properties of delta1-pyrroline-5carboxylate reductase from *Escherichia coli*. **J Bacteriol.**, v. 129, n. 1, p. 108-114, Jan 1977.

ROSSMANN, M. G.; MORAS, D.; OLSEN, K. W. Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. **Nature**, v. 250, n. 463, p. 194-199, Jul 19 1974.

RUEDA, K. et al. [Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* : a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries]. **Biomedica**, v. 34, n. 4, p. 631-641, Oct-Dec 2014.

SACKS, D. L.; PERKINS, P. V. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. **Am J Trop Med Hyg.,** v. 34, n. 3, p. 456-459, May 1985.

SAMBROOK, P. M.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: a laboratory manual.** 3. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001. 3 v.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chainterminating inhibitors. **Proc Natl Acad Sci U S A,** v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dec 1977.

SAUNDERS, E. C. et al. Central carbon metabolism of *Leishmania* parasites. **Parasitology**, v. 137, n. 9, p. 1303-1313, Aug 2010.

SAYE, M. et al. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. **PLoS One,** v. 9, n. 3, p. e92028, 2014.

SCARAFFIA, P. Y.; WELLS, M. A. Proline can be utilized as an energy substrate during flight of *Aedes aegypti* females. **J Insect Physiol.**, v. 49, n. 6, p. 591-601, Jun 2003.

SCHEER, M. et al. BRENDA, the enzyme information system in 2011. Nucleic Acids Res., v. 39, n. Database issue, p. D670-D676, Jan 2011.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infect Immun.**, v. 59, n. 2, p. 645-654, Feb 1991.

SCHLEIN, Y. Sandfly diet and *Leishmania*. Parasitol Today, v. 2, n. 6, p. 175-177, Jun 1986.

SCHLEIN, Y.; WARBURG, A. Phytophagy and the feeding cycle of *Phlebotomus papatasi* (Diptera: *Psychodidae*) under experimental conditions. **J Med Entomol.**, v. 23, n. 1, p. 11-15, Jan 24 1986.

SELWYN, M. J. A simple test for inactivation of an enzyme during assay. **Biochim Biophys Acta**, v. 105, n. 1, p. 193-195, Jul 29 1965.

SHARMA, R. et al. The heart of darkness: growth and form of *Trypanosoma brucei* in the tsetse fly. **Trends Parasitol.**, v. 25, n. 11, p. 517-524, Nov 2009.

SHIONO, T.; KADOR, P. F.; KINOSHITA, J. J. Purification and characterization of rat lens pyrroline-5-carboxylate reductase. **Biochim Biophys Acta**, v. 881, n. 1, p. 72-78, Mar 19 1986.

SIEVERS, F. et al. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Mol Syst Biol.**, v. 7, p. 539, Oct 11 2011.

SILBER, A. M. et al. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. **Curr Drug Targets Infect Disord.,** v. 5, n. 1, p. 53-64, Mar 2005.

SILBER, A. M. et al. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. Int J Parasitol., v. 36, n. 2, p. 157-163, Feb 2006.

SILBER, A. M. et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.,** v. 168, n. 1, p. 102-108, Nov 2009.

SILBER, A. M. et al. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. **J Eukaryot Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 441-446, Nov-Dec 2002.

STEIN, H. et al. Elevation of free proline and proline-rich protein levels by simultaneous manipulations of proline biosynthesis and degradation in plants. **Plant Sci.**, v. 181, n. 2, p. 140-150, Aug 2011.

STERKEL, M. et al. The Dose Makes the Poison: Nutritional Overload Determines the Life Traits of Blood-Feeding Arthropods. **Trends Parasitol.**, v. 33, n. 8, p. 633-644, Aug 2017.

STEVERDING, D. The history of African trypanosomiasis. **Parasit Vectors.,** v. 1, n. 1, p. 3, Feb 12 2008.

STUART, K. D. et al. Complex management: RNA editing in trypanosomes. **Trends Biochem Sci.**, v. 30, n. 2, p. 97-105, Feb 2005.

SULLIVAN, J. J. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro: a simplified procedure. **Trans R Soc Trop Med Hyg.,** v. 76, n. 3, p. 300-303, 1982.

SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp Biochem Physiol B.**, v. 55, n. 3B, p. 443-447, 1976.

SZABADOS, L.; SAVOURE, A. Proline: a multifunctional amino acid. **Trends Plant Sci.**, v. 15, n. 2, p. 89-97, Feb 2010.

SZEKELY, G. et al. Duplicated P5CS genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. **Plant J.**, v. 53, n. 1, p. 11-28, Jan 2008.

SZOKE, A. et al. Subcellular location of delta-pyrroline-5-carboxylate reductase in root/nodule and leaf of soybean. **Plant Physiol.**, v. 99, n. 4, p. 1642-1649, Aug 1992.

TAYLOR, M. B.; GUTTERIDGE, W. E. *Trypanosoma cruzi*: subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. **Exp Parasitol.**, v. 63, n. 1, p. 84-97, Feb 1987.

TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 18, n. 3, p. 271-282, Mar 1986.

TER KUILE, B. H.; OPPERDOES, F. R. A chemostat study on proline uptake and metabolism of *Leishmania donovani*. **J Protozool.**, v. 39, n. 5, p. 555-558, Sep-Oct 1992.

TETLEY, L.; VICKERMAN, K. Differentiation in *Trypanosoma brucei*: host-parasite cell junctions and their persistence during acquisition of the variable antigen coat. **J Cell Sci.**, v. 74, p. 1-19, Mar 1985.

TIELENS, A. G.; VAN HELLEMOND, J. J. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. **Parasitol Today**, v. 14, n. 7, p. 265-272, Jul 1998.

_____. Surprising variety in energy metabolism within Trypanosomatidae. **Trends Parasitol.**, v. 25, n. 10, p. 482-490, Oct 2009.

TONELLI, R. R. et al. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Microbiol., v. 6, n. 8, p. 733-741, Aug 2004.

TORRICO, F. et al. Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **Am J Trop Med Hyg.**, v. 70, n. 2, p. 201-209, Feb 2004.

TURCHETTO-ZOLET, A. C.; MARGIS-PINHEIRO, M.; MARGIS, R. The evolution of pyrroline-5-carboxylate synthase in plants: a key enzyme in proline synthesis. **Mol Genet Genomics,** v. 281, n. 1, p. 87-97, Jan 2009.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int J Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, May 01 2001.

URBINA, J. A. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop., v. 115, n. 1-2, p. 55-68, Jul-Aug 2010.

VALLEJO, G. A. et al. [Behavior of the infection and morphologic differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *T. rangeli* in the intestine of the vector *Rhodnius prolixus*]. **Rev Bras Biol.**, v. 48, n. 3, p. 577-587, Aug 1988.

VAN WEELDEN, S. W. et al. Procyclic *Trypanosoma brucei* do not use Krebs cycle activity for energy generation. **J Biol Chem.**, v. 278, n. 15, p. 12854-12863, Apr 11 2003.

VANHAMME, L.; PAYS, E. Control of gene expression in trypanosomes. **Microbiol Rev.**, v. 59, n. 2, p. 223-240, Jun 1995.

WHO. Control of Chagas disease. Second report of the WHO Expert Committee. World Health Organization. Geneva. 2002.

_____. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases: first WHO report on neglected tropical diseases., 2010.

_____. One Health. 2017. Disponível em: < http://www.who.int/features/qa/one-health/en/ >.
WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. Mol Biochem Parasitol., v. 99, n. 1, p. 89-101, Mar 15 1999.

WORLDHEALTHORGANIZATION(WHO).Chagasdisease(Americantrypanosomiasis).2017.Disponívelem:<</td>http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/ >.

YANG, S. L.; LAN, S. S.; GONG, M. Hydrogen peroxide-induced proline and metabolic pathway of its accumulation in maize seedlings. **J Plant Physiol.**, v. 166, n. 15, p. 1694-1699, Oct 15 2009.

YOSHIDA, N.; CAMARGO, E. P. Ureotelism and ammonotelism in trypanosomatids. **J Bacteriol.**, v. 136, n. 3, p. 1184-1186, Dec 1978.

YURA, T.; VOGEL, H. J. Pyrroline-5-carboxylate reductase of *Neurospora crassa*; partial purification and some properties. **J Biol Chem.**, v. 234, n. 2, p. 335-338, Feb 1959.

ZELADA, C. et al. Purification and partial structural and kinetic characterization of an alanine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.**, v. 79, n. 2, p. 225-228, Aug 1996.

ZELEDON, R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. **J Parasitol.**, v. 46, p. 541-551, Oct 1960.