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

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 *Trypanosoma 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 negligenciadas, como o *Trypanosoma 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 carbono 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-5-carboxilato (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 co substrato, através da inibição incompetitiva pelo substrato ($K_i^{\text{NADPH}} = 50,5 \pm 5 \mu\text{M}$), apontando, então, essa enzima a candidata 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 FADH_2 e NADH. Por fim, mostrou que a existência desse mecanismo confere a resistência ao estresse nutricional de *T. cruzi*.

Palavras-chave: *Trypanosoma 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 ($K_i^{\text{NADPH}} = 50,5 \pm 5 \mu\text{M}$). 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 distinct 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 FADH_2 and NADH. Finally, we showed that existence of this mechanism allows nutritional stress resistance in *T. cruzi*.

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

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*, distribuídas 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 transmissão 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 “megs”, 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. Tripanosomíase 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 (tripanosomíase 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 *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, intracelular), e os tripomastigotas 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 constitui 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; LINSTED, 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, podendo-se 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 L-arginina (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 atribuída 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., 2009; PAES, L. S. et al., 2013). Em concordância, a superexpressão de um 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 ($K = 2,2 \times 10^7$) (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 γ -glutamil fosfato pela γ -glutamil quinase (GK, EC 2.7.2.11), transferindo grupo fosforil do ATP para o L-Glu. Em seguida, o γ -glutamil fosfato é reduzido a GSA pela γ -glutamil fosfato redutase (GPR, EC 1.2.1.41), com a simultânea oxidação de

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 -glutamyl quinase e 1.2.1.41 da γ -glutamyl fosfato redutase), Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase (P5CR, EC 1.5.1.2), prolina desidrogenase (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.

CONCLUSÕES

- Dentre os tripanossomatídeos, a presença de uma via de biossíntese de L-Pro operativa apresenta divergências: 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 interessante, 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*, permitindo a transferência de poder redutor desde os *pools* citoplasmáticos 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, starvation-induced 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 *Trypanosoma 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 tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp., agente etiológico 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 *Colletotrichum 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.; LINSTED, 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-5-carboxylate 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 Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* 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 trypanosomiasis 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 leishmaniasis 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-5-carboxylate 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-5-carboxylate 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-5-carboxylate 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 chain-terminating 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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Chagas disease (American trypanosomiasis). 2017. Disponível em: < <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.