

RAÍSSA DE FÁTIMA PIMENTEL MELO

Caracterização molecular e funcional da imidazolona propionase de *Trypanosoma cruzi*: uma enzima do metabolismo de histidina.

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

RAÍSSA DE FÁTIMA PIMENTEL MELO

Caracterização molecular e funcional da imidazolona propionase de *Trypanosoma cruzi*: uma enzima do metabolismo de histidina.

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)

Melo, Raíssa de Fátima Pimentel
Caracterização molecular e funcional da
imidazolona propionase de *Trypanosoma cruzi*: uma
enzima do metabolismo de histidina. / Raíssa de
Fátima Pimentel Melo; orientador Ariel Mariano
Silber. -- São Paulo, 2017.
158 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Metabolismo de
aminoácidos. 3. Histidina. 4. Interação de proteínas
. 5. Reações metabólicas não enzimáticas. I. Silber,
Ariel Mariano , orientador. II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Raíssa de Fátima Pimentel Melo

Título da Tese: Caracterização molecular e funcional da imidazolona propionase de *Trypanosoma cruzi*: uma enzima do metabolismo de histidina

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:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:



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 **002** nas fls. **124** 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 bioquímica e molecular da imidazolona propionase de Trypanosoma cruzi e verificação da sua viabilidade como alvo terapêutico para Doença e Chagas*" do qual participam o(s) **Raíssa de Fátima Pimentel Melo**, 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 **08.05.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 09 de maio de 2012.

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

Prof. Dr. ARIEL MARIANO SILBER
Secretário
CEUA - ICB/USP

| | |
|---|--|
|  | <p>UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS</p> <p>Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira" Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil Telefone : (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br</p> <p>COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS</p> |
|---|--|

Decl. CEUA.006/2014.

DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 002/12/CEUA, datado de 08.05.12, e por solicitação do seu responsável, Prof. Dr. **Ariel Mariano Silber**, e considerando a justificativa apresentada, a CEUA/ICB acata a solicitação de alteração do título da linha de pesquisa: "*Caracterização bioquímica e molecular da imidazolona propionase de Trypanosoma cruzi e verificação da sua viabilidade como alvo terapêutico para Doença e Chagas*" para "***Caracterização molecular e funcional da imidazolona propionase de Trypanosoma cruzi: uma enzima do metabolismo de histidina***".

São Paulo, 24 de janeiro de 2014.



Prof. Dr. Wothan Tavares de Lima
Coordenador da CEUA
ICB/USP

Aos meus pais Fátima e João Carlos, ao meu irmão Juan e aos meus avós Graciete e Félix,
pelo amor e suporte psicológico a mim contemplados durante toda vida.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, por me orientar e compartilhar de todo seu conhecimento durante a realização desse trabalho e contribuir amplamente para minha formação científica. Agradeço a paciência e amizade, a confiança e todo o carinho ao longo desses anos. Agradeço ainda por fazer de seu laboratório um ambiente rico e aberto para discussões científicas e colaborações e super agradável em termos de convivência. Por fim, agradeço imensamente por ter acreditado em mim desde o começo e por ter me ajudado a passar por um momento muito difícil, oferecendo conforto e sendo extremamente solidário.

À Maria Julia Barison, minha querida amiga/irmã Juli, por cada segundo de dedicação e paciência ao compartilhar todo seu amplo conhecimento científico e experiência na bancada. Por sua didática incomparável e pelo seu carinho e afeto que jamais me esquecerei. Esse trabalho se tornou real graças a sua imensa colaboração e paciência. Muito obrigado por ter feito de minha jornada uma experiência de sucesso e por ter me oferecido sua amizade em momentos muito delicados e importantes dessa caminhada. Esse trabalho também é seu.

Ao Marcell, por se mostrar extremamente amigo e companheiro desde meu primeiro dia no laboratório. Por me ensinar e explicar todos os protocolos iniciais e por me esclarecer e tornar muito mais leve todo o conhecimento adquirido. Agradeço imensamente todos os momentos em que deixou seu próprio trabalho para me ajudar com o meu e também pelas parcerias científicas que fizemos e ainda fazemos até hoje. Por fim, obrigado pelas risadas e piadas internas que somente nós achamos graça e por sempre oferecer um olhar ou um abraço amigo.

A grandes mulheres exemplares que tive a honra de conhecer nesse período. Agradeço à querida Beth Pral, profissional incomparável, exemplo de hombridade e dedicação, que compartilhou comigo todo seu conhecimento técnico durante uma boa parte dessa jornada; levarei seus ensinamentos para sempre e claro, sempre será minha eterna referência de moda. À Flá Dama, uma mulher extremamente guerreira e corajosa que, desde o início me ofereceu sua amizade, quando tudo ainda era muito difícil para mim. Por ter me estendido a mão em um momento muito delicado e com sua sabedoria e fortaleza, ter me ajudado a superar e seguir em frente. Agradeço por toda a sua amizade, sua humildade em compartilhar seus conhecimentos e por ser referência na minha vida. À Lud, que com todo seu senso de humor e carinho, mostrou como lidar com situações difíceis e sair delas com sucesso. Agradeço por

sempre estar ao meu lado, oferecendo carinho, oportunidades de reflexão e auto-conhecimento e pelo exemplo de profissional excepcional.

À Sandrinha e à Let's, duas queridas amigas que me fortaleceram com sua amizade e apoio, as quais compartilharam comigo muitos momentos inesquecíveis ao longo dessa jornada. Lets, obrigado por me ensinar a perseverar, orar e me acolher sempre nos momentos mais difíceis e também por toda ajuda na parte final desse trabalho. Sandrinha, obrigado pelas palavras e conselhos, pelas muitas risadas e festas. Obrigado pelo companheirismo e amizade de sempre, sempre levarei vocês comigo.

Ao Brian, por estimular e enriquecer as discussões científicas no laboratório, pela ajuda com toda a parte de transfecção dos parasitas e pelos muitos momentos de alegria compartilhados durante esse longo caminho. À Carol, por me ajudar nas mais diversas situações, sejam científicas ou nem tanto. Por sempre estar ao meu lado dizendo que eu conseguiria e que daria tudo certo e claro pelos bordões inigualáveis.

Aos meus queridos amigos que a ciência me deu de presente: Gustavo e Rodolpho. Obrigado pela disponibilidade em ajudar com os experimentos e principalmente por compartilhar comigo muitos momentos de alegria, risadas, conselhos. Vocês podem não saber, mas por muitas vezes, vocês conseguiram transformar meus dias tristes em felizes, sendo razões frequentes para seguir em frente. Levarei os dois para sempre em meu coração.

Ao colegas Richard, Mayke, Leydi e Carla, pelo companheirismo e ajuda em experimentos e discussões. Obrigado ao Alê, nosso atual técnico, pelo suporte técnico no laboratório e coleguismo.

Aos colegas que passaram pelo laboratório, pela contribuição científica e amizade: Lis, Roxy, Luci, Nachos.

Ao amigos queridos que já não estão mais no laboratório mas que levarei para sempre comigo: Higuxo e Flá Zimbres. Obrigado por todo carinho e pelos momentos super alegres que vivemos. Vocês tem espaço cativo em meu coração.

Ao Ismael e a Sory, dois amigos super queridos que a ciência me apresentou. Obrigado por trazerem muita alegria e esperança nos dias difíceis e pelos abraços mais reconfortantes.

Ao Prof. Dr. Agustín Hernández Lopes, pela colaboração e por sempre estar disposto a ensinar e ajudar com os experimentos. Muito obrigado por toda ajuda e empenho na obtenção e manipulação das cepas de leveduras transformantes e por contribuir para o enriquecimento desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro Cortez Xavier e todo seu grupo, por sempre deixar as portas de seu laboratório abertas para realização de experimentos e por compartilhar com nosso grupo discussões científicas de excelência, bem como momentos de convivência muito agradáveis.

Ao Prof. Dr. Erick Bastos e ao Prof. Dr. Thiago Carita Correra, do Instituto de Química (USP - SP), pelos esforços depositados em nos ajudar a melhor compreender a funcionalidade da via de degradação de histidina, incluindo as estruturas químicas dos intermediários, os cálculos teóricos para melhor entendimento dos mecanismos das reações e pelos experimentos de espectrometria de massas que estamos desenvolvendo.

Ao Dr. Leo K. Iwai e ao Ismael Feitosa Lima, do Instituto Butantan Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada - LETA, pela disponibilidade e pela colaboração com as análises por espectrometria de massas.

Agradeço especialmente a duas pessoas queridas do Departamento de Parasitologia que compartilharam de sua amizade comigo. Ao Manoel Aparecido, pela ajuda na manipulação de camundongos e obtenção dos anticorpos, mas especialmente pela sua simpatia, carinho e ternura. À Sílvia Camargo, minha conterrânea que, desde o primeiro dia desenvolvi grande empatia e que também se transformou em uma pessoa muito especial, amiga e confidente.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e todo Departamento de Parasitologia. Agradeço pela oportunidade e por todo o apoio ao longo desse tempo.

Às agências de fomento: CAPES, CNPQ e FAPESP, pelo apoio financeiro fornecido para desenvolver o projeto.

À minha família que amo profundamente, sem a qual certamente não teria chegado até aqui. Obrigado mãe por ser a mulher mais guerreira, maravilhosa e amável que eu conheço, por sempre ter sido meu anjo da guarda, secando minhas lágrimas e me colocando sempre de pé para seguir em frente. Obrigado pelo amor incondicional e por ter dedicado sua vida a mim. Pai, obrigado por ser exemplo de fortaleza e por sempre demonstrar em gestos e palavras que é preciso seguir em frente, mesmo quando tudo parece escuridão. Meu querido irmão Juan, obrigado por todo o companheirismo e amizade ao longo desses anos, por me apoiar sempre e ter orgulhos das minhas conquistas; agradeço também pelo apoio financeiro, porque sem sua ajuda nos momentos de aperto, dificilmente eu teria conseguido. Aos meus vizinhos, Félix e Graciete, pelos quais tenho profundo amor e imensa gratidão; obrigado por sempre estarem presentes em minha vida, não me deixando sozinha nunca.

Ao maior presente que Deus poderia ter me dado: meu sobrinho e afilhado Guilhermino, um pequeno anjinho que veio para alegrar imensamente meus dias. Agradeço às pequenas e ao mesmo tempo gigantes palavrinhas de consolo e por ser motivo constante de felicidade e muitas risadas. Não poderia deixar de agradecer também à minha grande amiga, Camila, mãe do meu precioso. Obrigado por sempre se preocupar comigo, por oferecer sua amizade sempre e principalmente, pelo seu exemplo de determinação, mostrando que podemos ser tudo aquilo que desejamos desde que haja esforço para alcançar.

Ao meu companheiro Bruno pela paciência sem medidas, por ter me apoiado desde que entrou em minha vida. Pela ajuda, consolo e compreensão nos momentos mais difíceis. Obrigado por ser calma em meio à tempestade. Muito obrigado também por compartilhar comigo a alegria de ter dois lindos filhinhos de patas. Amo muito vocês.

Aos amigos de uma vida, que mesmo longe, sempre me apoiaram ao longo do caminho: Mari, Amanda, Pablo, João Léo e Pam, obrigado pelo carinho e pela torcida!

A duas grande profissionais que foram meu alicerce psíquico ao longo desse período: Dra Ana Maria Cortez Vannuchi e Maria Leni Benfica. Obrigado pelos cuidados e por sempre se preocuparem comigo, aliviando as tristezas e amenizando os dias difíceis.

Este trabalho foi desenvolvido graças ao apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Programa de Incentivo Acadêmico (PROEX) e pela Fundação de Apoio à Pesquisa de São Paulo (FAPESP), número de processo: 2011/22697-8.

“Matar o sonho é matarmo-nos. É mutilar a nossa alma. O sonho é o que temos de realmente nosso, de impenetravelmente e inexpugnavelmente nosso.”

Fernando Pessoa

RESUMO

MELO RFP. Caracterização molecular e funcional da imidazolona propionase de *Trypanosoma cruzi*: uma enzima do metabolismo de histidina. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

O *Trypanosoma cruzi* é capaz de metabolizar aminoácidos como fontes de carbono e energia, dentre eles, o aminoácido histidina (His). Canonicamente, a via de degradação de His compreende quatro passos enzimáticos que catalisam a oxidação de His a glutamato (Glu). O Glu gerado é convertido em alfa-cetoglutarato (α -KG), que é incorporado ao ciclo de Krebs (TCA), gerando coenzimas reduzidas que irão fornecer elétrons para a cadeia transportadora de elétrons (CTE), produzindo ATP. Neste trabalho foi possível demonstrar que o substrato da terceira enzima envolvida na degradação de His (imidazolona propionase - *TcIP*), chamado 4-imidazolona-5-propionato (IPA) é oxidado não enzimaticamente a α -KG, e este é capaz de ser metabolizado diretamente via TCA. Ainda foi possível demonstrar que a *TcIP* se encontra formando um complexo macromolecular com a segunda enzima da via (urocanato hidratase). Finalmente, observou-se que o controle da expressão da *TcIP* é importante no processo de metacicloênese de *T. cruzi*, sugerindo uma atividade *moonlighting* para essa proteína.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Metabolismo de aminoácidos. Histidina. Interação de proteínas. Reações metabólicas não enzimáticas.

ABSTRACT

MELO RFP. Molecular and functional characterization of imidazolonepropionase from *Trypanosoma cruzi*: an enzyme of histidine metabolism. [Ph. D. thesis Parasitology]. São Paulo, Universidade de São Paulo; 2017.

Trypanosoma cruzi is able to catabolize amino acids as carbon and energy sources, including histidine (His) among them. Canonically, the His degradation pathway comprises four enzymatic steps catalyzing the oxidation of His to glutamate (Glu). The Glu is converted to alpha ketoglutarate (α -KG), which is incorporated into the Krebs cycle (TCA), generating reduced coenzymes that will supply electrons to the electron transport chain (ETC), producing ATP. In this work it was possible to demonstrate that the substrate of the third enzyme involved in the His degradation (imidazolonepropionase - *TcIP*), the 4-imidazolone-5-propionate (IPA), can be non-enzymatically oxidized to α -KG, and can be metabolized directly through TCA. Herein we showed that *TcIP* is forming a macromolecular complex with the second enzyme of the pathway (urocanate hydratase). Finally, it was established that the control of *TcIP* expression is important in the metacyclogenesis process in *T. cruzi*, suggesting a moonlighting activity for this protein.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Amino acids metabolism. Histidine. Proteins interaction. Non-enzymatic metabolic pathways.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|-----|
| Figura 1 - Distribuição global da doença de Chagas | 25 |
| Figura 2 - Ultraestrutura da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> | 28 |
| Figura 3 - Representação esquemática do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> | 30 |
| Figura 4 - Visão geral da via de degradação de His | 38 |
| Figura 5 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da IP em tripanossomatídeos...80 | |
| Figura 6 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da <i>TcIP</i> e seus homólogos | 81 |
| Figura 7 - Representação esquemática dos domínios encontrados para <i>TcIP</i> | 82 |
| Figura 8 - Amplificação e clonagem da <i>TcIP</i> | 83 |
| Figura 9 - Expressão e purificação heteróloga da <i>TcIP</i> | 85 |
| Figura 10 - Titulação do soro policlonal anti- <i>TcIP</i> | 85 |
| Figura 11 - Perfil da expressão da <i>TcIP</i> ao longo do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> | 87 |
| Figura 12 - Localização subcelular da <i>TcIP</i> ao longo do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> | 89 |
| Figura 13 - Fracionamento seletivo de formas epimastigotas com digitonina..... | 90 |
| Figura 14 - Representação esquemática das reações enzimáticas acopladas usadas para determinação da atividade da <i>TcIP</i> | 92 |
| Figura 15 - Oxidação não enzimática do IPA | 94 |
| Figura 16 - Representação esquemática da via de His e sua possível ramificação | 95 |
| Figura 17 - Avaliação da interação entre as proteínas <i>TcUH</i> e <i>TcIP</i> por <i>Pull-down</i> | 97 |
| Figura 18 - Análise da interação protéica <i>TcUH-TcIP</i> utilizando a técnica de Cromatografia de Exclusão Molecular | 98 |
| Figura 19 - Interação entre as proteínas <i>TcUH-TcIP</i> mediante expressão e purificação recombinante, usando <i>TcUH</i> como isca | 100 |
| Figura 20 - Interação entre as proteínas <i>TcUH-TcIP</i> mediante expressão e purificação recombinante, usando <i>TcIP</i> como isca | 101 |
| Figura 21 - Amplificação da <i>TcUH</i> e <i>TcIP</i> do genoma de <i>T. cruzi</i> e clonagem em vetor pTEX-TAP- <i>Tagging</i> | 103 |
| Figura 22 - Ensaios de <i>western blotting</i> e imunofluorescência indireta para identificar a presença dos epissomos UH e IP nas linhagens celulares transfectadas | 104 |
| Figura 23 - Purificação do complexo <i>TcUH-TcIP</i> por TAP- <i>Tagging</i> | 106 |
| Figura 24 - Ensaios de atividade enzimática e <i>western blotting</i> para detecção das enzimas <i>TcHAL</i> e <i>TcUH</i> em em extratos de leveduras mutantes | 110 |

| | |
|--|-----|
| Figura 25 - Produção de $^{14}\text{CO}_2$ de leveduras HU na presença de $[^{14}\text{C}]\text{-His}$ | 112 |
| Figura 26 - Análise de expressão protéica e perfil de crescimento da linhagem superexpressora para a <i>TcIP</i> | 115 |
| Figura 27 - Perfil do superexpressor <i>TcIP</i> frente ao estresse nutricional sob distintas abordagens | 117 |
| Figura 28 - Taxas de respiração em epimastigotas <i>wt</i> | 119 |
| Figura 29 - Taxas de respiração em epimastigotas da linhagem pTEX \emptyset | 120 |
| Figura 30 - Taxas de respiração em epimastigotas da linhagem <i>TcIP</i> | 121 |
| Figura 31 – Análise comparativa das taxas de respiração entre as linhagens <i>wt</i> , pTEX \emptyset e pTEX- <i>TcIP</i> , quando recuperados com His..... | 121 |
| Figura 32 - Análise da metaciclogênese em parasitas da linhagem pTEX- <i>TcIP</i> | 123 |
| Figura 33 - Morfologia dos parasitas pTEX- <i>TcIP</i> durante a metaciclogênese..... | 125 |
| Figura 34 - Viabilidade celular de parasitas da linhagem pTEX- <i>TcIP</i> ao longo da metaciclogênese..... | 126 |
| Figura 35 - Representação da via de degradação de His sob uma nova perspectiva | 148 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|-----|
| Tabela 1 - Relação dos oligonucleotídeos usados nesse trabalho..... | 49 |
| Tabela 2 - Análise por espectrometria de massas das bandas 1 e 2 provenientes da interação <i>TcUH-TcIP</i> recombinates..... | 100 |
| Tabela 3 - Análise por espectrometria de massas das bandas 1 e 2 advindas da purificação do complexo <i>TcUH-TcIP</i> por TAP- <i>Tagging</i> , usando <i>TcUH</i> como isca..... | 107 |
| Tabela 4 - Análise por espectrometria de massas da banda 3 advinda da purificação do complexo <i>TcUH-TcIP</i> por TAP- <i>Tagging</i> , usando <i>TcIP</i> | 108 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------|---|
| BLAST | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> |
| BSA | Albumina Sérica Bovina |
| CBP | <i>Calmodulin Binding Protein</i> |
| DCPIP | 2,6-diclorofenolindofenol |
| E-64 | N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida |
| FCCP | Trifluorocarbonilcianeto de fenilhidrazona |
| FITC | Isotiocianato de fluoresceína |
| FiGlu | N-Formimino- L-Glutamato |
| GDH | Glutamato desidrogenase |
| GSH | Glutationa reduzida |
| IPA | 4-imidazolona-5-propionato |
| IPTG | Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo |
| kDNA | DNA do cinetoplasto |
| K_m | Constante de Michaelis – Menten |
| MRC | Meio de Respiração Celular |
| MS | Espectrometria de Massas |
| NAD⁺ | Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada |
| NADH | Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida |
| Ni-NTA | Níquel-Nitrilotriacetato |
| Olig | Oligomicina |
| PBS-BSA | Tampão fosfato salino + albumina sérica bovina |
| PBS-T | Tampão fosfato salino + Tween 20 |
| PMSF | <i>Phenylmethylsulfonyl fluoride</i> |
| Prt A | Proteína A de <i>Staphylococcus aureus</i> |
| PSG | Tampão fosfato salino + glicose 5,4% |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| TAE | Tampão Tris-Acetato-EDTA |
| TAU | <i>Triatomine Artificial Urine</i> |
| TAP | <i>Tanfem Affinity Purification</i> |
| TEV | <i>Tobacco Etch Virus</i> |
| TcALAT | Alanina aminotransferase |

| | |
|-------------------------------|--|
| TcASATm | Aspartato aminotransferase, isoforma mitocôndrial de <i>T. cruzi</i> |
| TcGAPDH | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i> |
| TcGS | Glutamina sintetase |
| TcHAL | Histidina Amônio Liase de <i>T. cruzi</i> |
| TcPRODH | Prolina desidrogenase de <i>T. cruzi</i> |
| TcP5CS | Δ 1-pirrolina-5carboxilato sintetase de <i>T. cruzi</i> |
| TcP5CR | Δ 1-pirrolina-5carboxilato redutase de <i>T. cruzi</i> |
| TcPRODH | Prolina desidrogenase de <i>T. cruzi</i> |
| TcP5CDH | Δ 1-pirrolina-5carboxilato desidrogenase de <i>T. cruzi</i> |
| TcTAT | Tirosina aminotransferase de <i>T. cruzi</i> |
| TcUH | Urocanato hidratase de <i>T. cruzi</i> |
| TEMED | Tetra Metil Etileno Diamina |
| TLCK | Tosillisina clorometil cetona hidrocloreto |
| V_{max} | Velocidade máxima |
| YPD | <i>Yeast Peptone Dextrose medium</i> |
| X-gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosídeo |
| α-KG | alfa-cetoglutarato |

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO | 23 |
| 1.1 Doença de Chagas: aspectos gerais | 24 |
| 1.2 Biologia do <i>T. cruzi</i>: uma breve revisão | 27 |
| 1.2.1 Ultraestrutura | 27 |
| 1.2.2 Morfologia e ciclo de vida | 28 |
| 1.3 Metabolismo energético de <i>T. cruzi</i>: uma visão geral | 30 |
| 1.3.1 Metabolismo intermediário | 30 |
| 1.3.2 <i>T. cruzi</i> e o metabolismo de aminoácidos | 32 |
| 1.4 O aminoácido Histidina (His) e o <i>T. cruzi</i> | 34 |
| 1.4.1 A via de degradação de His | 35 |
| CAPÍTULO 2: OBJETIVOS | 39 |
| 2.1 Objetivos gerais | 40 |
| 2.2 Objetivos Específicos | 40 |
| CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS | 41 |
| 3.1 Identificação do gene putativo para IP no genoma de <i>T. cruzi</i> | 42 |
| 3.1.1 Análises <i>in silico</i> para <i>TcIP</i> | 42 |
| 3.1.2 Obtenção das sequências <i>TcHAL</i> e <i>TcUH</i> | 43 |
| 3.2 Microorganismos utilizados e condições de crescimento | 43 |
| 3.2.1 <i>Escherichia coli</i> | 43 |
| 3.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 44 |
| 3.2.3 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 45 |
| 3.2.3.1 Formas epimastigotas | 45 |
| 3.2.3.2 Metaciclo gênese <i>in vitro</i> | 45 |
| 3.2.3.3 Purificação de tripomastigotas metacíclicos por cromatografia de troca iônica .. | 45 |
| 3.2.3.4 Obtenção de formas intracelulares e tripomastigotas derivados de células | 46 |
| 3.3 Manipulação de DNA | 47 |
| 3.3.1 Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> | 47 |
| 3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) | 47 |
| 3.3.3 Eletroforese em gel de agarose | 48 |
| 3.3.4 Clonagem em vetor tipo <i>T</i> : construção em <i>pGEM T-Easy</i> | 49 |
| 3.3.5 Clonagem em vetor <i>pET</i> : construções <i>pET28a-TcIP</i> , <i>pET24a-TcIP</i> e <i>pET24a-TcUH</i> | 50 |
| 3.3.6 Clonagem em vetor <i>pTEX</i> e <i>pTEX-TAP-Tagging</i> | 51 |
| 3.3.7 Clonagem dos genes <i>TcHAL</i> e <i>TcUH</i> em vetores de expressão para leveduras | 51 |
| 3.3.8 Extração de DNA plasmidial | 52 |
| 3.3.9 Preparação de bactérias quimiocompetentes | 53 |
| 3.3.10 Transformação de bactérias competentes | 53 |
| 3.3.11 Transformação de leveduras | 54 |
| 3.3.12 Sequenciamento de DNA | 55 |
| 3.4 Manipulação de proteínas | 55 |
| 3.4.1 Preparo de extratos proteicos de <i>T. cruzi</i> | 55 |
| 3.4.2 Expressão e purificação da <i>TcIP</i> recombinante em <i>E. coli</i> | 56 |
| 3.4.3 Eletroforese de proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE) | 57 |
| 3.4.4 Obtenção do soro policlonal contra <i>TcIP</i> | 58 |
| 3.4.5 Western blotting | 59 |
| 3.4.6 Ensaio de permeabilização com digitonina | 59 |
| 3.4.7 Imunofluorescência indireta | 60 |

| | |
|--|-----------|
| 3.4.8 Abordagem experimental para detecção da atividade enzimática da TcIP..... | 60 |
| 3.4.9 Decomposição espontânea do IPA..... | 62 |
| 3.4.10 Ensaio de Pull-down..... | 63 |
| 3.4.11 Cromatografia de exclusão por massa molecular..... | 64 |
| 3.4.12 Imunoensaio enzimático (ELISA)..... | 64 |
| 3.5 Avaliação da interação UH-IP a partir da expressão de proteínas recombinantes | 65 |
| 3.5.1 Identificação de proteínas por espectrometria de massas (MS)..... | 66 |
| 3.5.1.1 Digestão <i>in gel</i> com tripsina..... | 66 |
| 3.5.1.2 Análise Proteômica por Espectrometria de Massas (MS)..... | 68 |
| 3.6 Purificação do complexo pela técnica de Tandem Affinity Purification (TAP)-Tagging | 68 |
| 3.6.1 Obtenção e caracterização de parasitas pTEX-TAP-Tagging (pTTG)-TcUH e pTTG-TcIP..... | 68 |
| 3.6.2 Preparação de extratos de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> das linhagens mutantes pTTG-TcUH e pTTG-TcIP..... | 70 |
| 3.6.3 Condições de Purificação do complexo UH-IP..... | 70 |
| 3.6.4 Identificação das proteínas purificadas pela técnica de TAP-Tagging por Espectrometria de massas (MS)..... | 71 |
| 3.7 Demonstração do “curto-circuito” na via de degradação de His | 71 |
| 3.7.1 Obtenção e caracterização de leveduras da linhagem HU..... | 71 |
| 3.7.2 Atividade HAL e UH..... | 72 |
| 3.7.3 Captura de CO ₂ emitido pela oxidação de His em leveduras da linhagem HU..... | 73 |
| 3.8 Superexpressão da TcIP | 73 |
| 3.8.1 Obtenção e caracterização do superexpressor TcIP..... | 73 |
| 3.8.2 Curvas de crescimento de epimastigotas..... | 74 |
| 3.8.3 Ensaio de viabilidade celular com AlamarBlue® (Resazurina)..... | 74 |
| 3.8.4 Síntese de ATP utilizando His como substrato..... | 75 |
| 3.8.5 Consumo de oxigênio utilizando His como substrato..... | 76 |
| 3.8.6 Análise de diferenças na metaciclo gênese em parasitas pTEX-TcIP..... | 76 |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS | 77 |
| 4.1 Identificação do gene putativo para IP no genoma de <i>T. cruzi</i> | 78 |
| 4.1.1 Análises <i>in silico</i> | 78 |
| 4.2 Amplificação e clonagem | 82 |
| 4.3 Expressão e purificação heteróloga | 83 |
| 4.4 Obtenção de soro anti-TcIP | 84 |
| 4.5 Aspectos bioquímicos e funcionais da TcIP | 86 |
| 4.5.1 Expressão da TcIP ao longo do ciclo de vida do parasita..... | 86 |
| 4.5.2 Localização subcelular da TcIP: uma proteína citoplasmática..... | 87 |
| 4.5.3 A atividade da TcIP não foi passível de detecção..... | 90 |
| 4.5.4 O IPA é espontaneamente oxidado em reação..... | 92 |
| 4.6 A via de degradação de His apresenta características bioquímicas não canônicas | 94 |
| 4.7 Avaliação da interação entre as enzimas TcUH e TcIP mediante a formação de um complexo macromolecular | 95 |
| 4.7.1 Abordagens para detecção do complexo <i>in vitro</i> | 95 |
| 4.7.1.1 Ensaio de Pull-down..... | 95 |
| 4.7.1.2 Cromatografia de Exclusão Molecular..... | 96 |
| 4.7.1.3 Avaliação da interação UH-IP a partir da expressão de proteínas recombinantes..... | 98 |

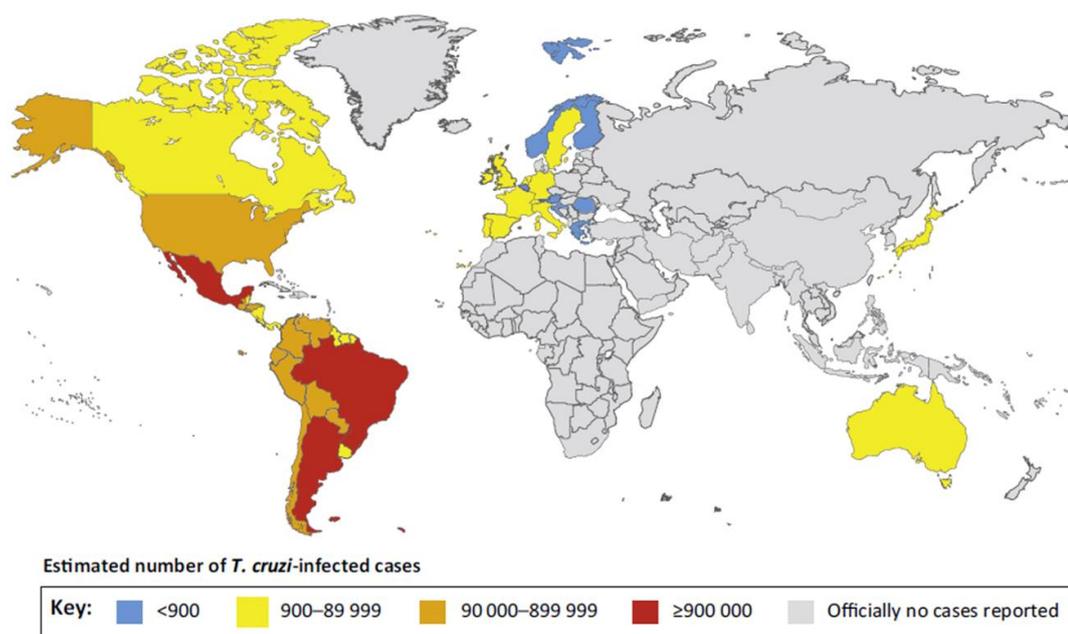
| | |
|---|-----|
| 4.7.2 A interação <i>TcUH-TcIP</i> ocorre em condições fisiológicas: <u>Purificação por Afinidade em Tandem - TAP-Tagging</u> | 101 |
| 4.7.2.1 Amplificação e clonagem das sequências <i>TcUH</i> e <i>TcIP</i> em vetor pTEX-TAP-Tagging | 101 |
| 4.7.2.2 Confirmação dos epissomos por <i>western blotting</i> e imunofluorescência | 102 |
| 4.7.2.3 Demonstração da formação do complexo <i>TcUH-TcIP</i> a partir de extratos de epimastigotas de <i>T.cruzi</i> | 104 |
| 4.8 Demonstração da ramificação na via: o metabolismo de degradação de His é operativo em apenas dois passos enzimáticos | 108 |
| 4.8.1 Obtenção de leveduras mutantes capazes de expressar as enzimas <i>TcHAL</i> e <i>TcUH</i> | 108 |
| 4.8.2 Oxidação de <i>His</i> pela linhagem <i>HU</i> | 111 |
| 4.9 Avaliação do papel fisiológico da enzima IP para o <i>T. cruzi</i> | 112 |
| 4.9.1 Construção e validação do superexpressor pTEX- <i>TcIP</i> | 113 |
| 4.9.2 Caracterização fenotípica dos parasitas superexpressores para <i>TcIP</i> frente ao estresse metabólico | 114 |
| 4.9.3 Consumo de O_2 a partir da respiração mitocondrial em células íntegras | 117 |
| 4.9.4 Análise da metaciclogênese em parasitas pTEX- <i>TcIP</i> | 122 |
| CAPÍTULO 5: DISCUSSÃO | 127 |
| 5.1 Perspectivas no estudo de His e sua via de degradação | 128 |
| 5.2 <i>TcIP</i> e seus homólogos | 129 |
| 5.2.1 <i>Trypanosoma grayi</i> | 130 |
| 5.2.2 <i>Trypanosoma theileri</i> | 130 |
| 5.2.3 <i>Trypanosoma rangeli</i> | 131 |
| 5.3 <i>TcIP</i> e seu substrato IPA | 132 |
| 5.4 <i>TcIP</i>: uma enzima citoplasmática expressa majoritariamente em epimastigotas | 135 |
| 5.5 O complexo <i>TcUH-TcIP</i> | 135 |
| 5.6 Demonstração da ramificação na via de degradação de His | 138 |
| 5.7 O papel fisiológico da <i>TcIP</i> | 140 |
| 5.7.1 <i>TcIP</i> e a bioenergética do <i>T. cruzi</i> | 141 |
| 5.7.2 Parasitas que superexpressam <i>TcIP</i> não sofrem metaciclogênese | 142 |
| CAPÍTULO 6: CONCLUSÕES | 146 |
| REFERÊNCIAS | 149 |

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO

1.1 Doença de Chagas: aspectos gerais

Reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das treze doenças tropicais mais negligenciadas do mundo (Hotez et al., 2007), a doença de Chagas tem sido uma moléstia para a humanidade desde a antiguidade e continua a ser um problema social e econômico relevante em muitos países da América Latina (Mathers et al., 2007, Moncayo, Silveira, 2009). Também conhecida como Tripanossomíase americana, é tida como potencialmente fatal, é causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi* e leva o nome de Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, médico e pesquisador brasileiro que a descreveu no início do século XX (Chagas, 1909). De acordo com o novo esquema de classificação, com ênfase na taxonomia dos protistas, *T. cruzi* pode ser incluso no super grupo Excavata, onde ainda recebe a subclassificação em: Euglenozoa, Kinetoplastea, Metakinetoplastina e Trypanosomatidae (Adl et al., 2005).

De acordo com a OMS, estima-se que cerca de 6 a 7 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas com a doença, que é encontrada predominantemente nas áreas endêmicas de 21 países latino-americanos, onde é transmitida principalmente para seres humanos por contato com fezes ou urina de insetos triatomíneos, conhecidos popularmente como barbeiros (World Health Organization (WHO), 2017). Historicamente, a transmissão e morbidade foram concentradas nessas regiões, contudo nas últimas décadas têm sido cada vez mais detectados casos nos Estados Unidos da América, no Canadá, em muitos países europeus e em alguns países do Pacífico Ocidental (**Figura 1**). Isso se deve principalmente à mobilidade populacional entre a América Latina e o restante do mundo (Rassi et al., 2012). No tocante aos Estados Unidos, ressalta-se ainda que infecções humanas autóctones foram relatadas e um número considerável de doadores de sangue soropositivos foram identificados (Buhaya et al., 2015).



TRENDS in Parasitology

Figura 1 - Distribuição global da doença de Chagas. A migração global levou a um aumento da incidência da doença em regiões consideradas não endêmicas para infecção. A disseminação da doença de Chagas pode ser problemática devido à presença de vetores nativos que podem vir a sustentar a transmissão da infecção. Dados de WHO, 2013. Figura original: Perez et al., 2005.

A transmissão da infecção pelo *T. cruzi* para os seres humanos e mais de 150 espécies de animais domésticos (cachorros, gatos e porquinhos-da-índia, etc), bem como animais silvestres (roedores, marsupiais e tatus) se dá via insetos triatomíneos (vetores) pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae e subfamília Triatominae (Deane, 1964). Embora mais de 130 espécies de insetos triatomíneos tenham sido identificadas, somente algumas são vetores competentes do *T. cruzi* (Lent, 1979; Galvao, 2003). Nesse sentido, *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* são as três espécies de vetores mais importantes na transmissão humana (Zeledon, Rabinovich, 1981). A transmissão para seres humanos, quando vetorial, ocorre através da deposição do conteúdo excretado por insetos triatomíneos contaminados durante o repasto sanguíneo, mas também se dá por outros mecanismos: transfusão sanguínea e transplante de órgãos advindos de indivíduos infectados, verticalmente da mãe para o feto e ainda por acidentes de laboratório, onde se manipulam formas infectivas do parasita (Schmunis, 1999; Bern et al., 2008). Destaca-se ainda a transmissão via ingestão de alimentos ou líquidos contaminados com triatomíneos infectados e/ou fezes (formas infectivas de *T. cruzi*) (Pereira et al., 2009). Curiosamente, a transmissão oral da doença de Chagas é atualmente a via de transmissão mais importante na Amazônia

brasileira, após a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) ter declarado a interrupção da transmissão vetorial nesta área (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015).

Em seres humanos, a doença de Chagas se apresenta principalmente sob duas formas clínicas: aguda e crônica. A fase aguda se inicia logo após a infecção, tendo início quando o parasita adentra o hospedeiro mamífero. É geralmente assintomática ou acompanhada por sintomas inespecíficos, tais como febre e dor de cabeça, embora sinais clássicos da doença possam se manifestar, como o chagoma de inoculação e o sinal de Romana. É caracterizada pela ausência de anticorpos e, em muitos pacientes, uma parasitemia notável é observada cerca de uma ou duas semanas após a entrada do parasita (Punukollu et al., 2007). A fase crônica pode perdurar por todo o resto da vida do paciente, tendo início com o declínio da parasitemia e, em pacientes imunocompetentes, observa-se a aparição de uma robusta resposta IgG. Definida por uma ausência inicial de sintomas, as principais formas crônicas são a *indeterminada* e a *determinada*, sendo que a última pode apresentar como principais formas sintomáticas, as formas cardíaca, digestiva ou uma combinação de ambas. A forma *indeterminada* é caracterizada pela ausência de danos teciduais evidentes ou disfunção dos órgãos, podendo perdurar de vários meses à vida toda do paciente, que é o caso de 70% das pessoas cronicamente infectadas. Os remanescentes 30% desenvolvem uma das formas sintomáticas, sendo a mais frequentemente diagnosticada, a cardiopatia chagásica crônica ou CCC, cuja principal manifestação clínica é a cardiomegalia, causada por infiltrados inflamatórios, arritmias e tromboembolismo (Moncayo, Yanine, 2006). Quanto à forma digestiva, esta consiste em duas síndromes: megaesôfago, levando a disfagia e regurgitação e o megacólon, levando à constipação severa e retenção fecal (Gattuso, Kamm, 1993).

No que diz respeito à quimioterapia, existem duas drogas disponíveis que são limitadas em relação à eficácia e tolerância. São elas o Nifurtimox [3-metil-4(5'-nitrofurfurilideneamina) tetraidro-4H-tiazina-1,1-dioxida], um nitrofurano, e o Benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida), um derivado do nitroimidazol. Esses compostos são efetivos somente para infecções recentes (aguda ou congênita) e sua eficácia durante a fase crônica, onde a maioria dos pacientes é diagnosticada, é controversa. Além disso, ambas as drogas apresentam sérios efeitos colaterais, incluindo anorexia, vômitos, dermatia alérgica e polineuropatia periférica (Duschak, Couto, 2007).

Existe, portanto, a necessidade urgente de identificar alvos adequados para o desenvolvimento de novas drogas terapêuticas. Para isso, é importante conhecer e entender como funciona a biologia do parasita em questão.

1.2 Biologia do *T. cruzi*: uma breve revisão

1.2.1 Ultraestrutura

Os tripanossomatídeos apresentam uma série de peculiaridades nas suas principais estruturas e organelas. O *T. cruzi* apresenta várias dessas organelas e estruturas especiais (**Figura 2**), como por exemplo, a mitocôndria tubular única, que ocupa aproximadamente 30% do volume celular total, delimitada pelas membranas interna e externa e o espaço intermembrana; a membrana interna apresenta cristas irregulares e tem uma relação íntima com uma estrutura característica das mitocôndrias destes organismos, o cinetoplasto, uma estrutura característica da ordem Kinetoplastida (possui valor taxonômico) que contém o DNA constituinte do genoma mitocondrial (o kDNA) (De Souza, 2002; Dantas et al., 2003). Também podemos citar os glicossomos, organelas derivadas de peroxissomos nas quais se encontram compartimentalizadas as primeiras enzimas glicolíticas, da via das pentoses fosfato, juntamente com algumas enzimas de outras vias auxiliares envolvidas na reoxidação do NADH produzido pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e na regeneração do ATP consumido na ativação da molécula de glicose (Opperdoes, 1987; Bakker et al., 2000). Além disso, enzimas relacionadas a outras vias, como β -oxidação de ácidos graxos, recrutamento de purinas e vias biossintéticas para pirimidinas podem estar presentes nos glicossomos (Michels et al., 2006). Outras organelas encontradas no citoplasma de *T. cruzi* são os reservossomos e os acidocalcisomas. Os reservossomos localizam-se na parte posterior das formas epimastigotas e possuem um elevado conteúdo de macromoléculas, inclusive proteases (principalmente cruzipáina) (Figueiredo et al., 1994). Os acidocalcisomas são organelas ácidas que se assemelham àquelas relacionadas aos lisossomos de células de mamíferos e armazenam polifosfatos e pirofosfatos complexados com Ca^{2+} ; foi ainda proposto que estes estão envolvidos no armazenamento de cátions e fósforo, no metabolismo de fósforo, manutenção da homeostase intracelular (pH e Ca^{2+}) e osmoregulação (Docampo et al., 2010).

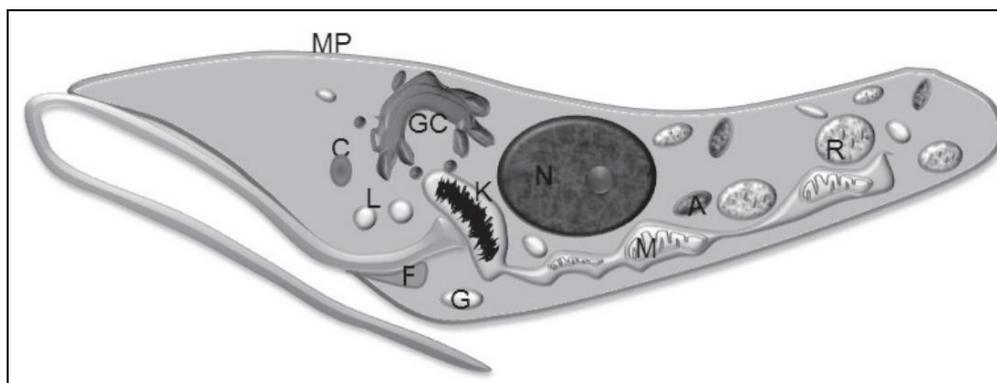


Figura 2 - Ultraestrutura da forma epimastigota de *T. cruzi*. De acordo com o relatado no texto acima e respeitando as iniciais derivadas da nomenclatura de tais termos em inglês, temos A (acidocalcissoma), C (citóstoma), F (bolsa flagelar), GC (Complexo de Golgi), G (glicossomo), K (cinetoplasto), L (inclusões lipídicas), M (mitocôndria), MP (membrana plasmática), N (núcleo), R (reservossomo). Adaptado de Martins et al., 2012. Figura original de J. L. R. Fietto.

1.2.2 Morfologia e ciclo de vida

Durante seu ciclo de vida, o *T. cruzi* alterna entre micro ambientes diversos, que vão desde as porções médias e final do intestino do inseto vetor passando pelo interior da célula mamífera e finalizando com sua eclosão na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado (Silber et al., 2005). Essa diversidade intrínseca aos ambientes pelos quais transita se dá em relação ao conteúdo metabólico, temperatura e exposição a estresses, como o osmótico e oxidativo. Visando à adaptação e estabelecimento da infecção, o parasita deve passar por transformações biológicas, que incluem alterações estruturais e metabólicas.

O protozoário tem três formas evolutivas e a identificação de tais formas se dá por critérios de ordem morfológica valendo-se da técnica de microscopia óptica, onde se leva em conta a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo da célula e a região de emergência do flagelo; as formas relatadas são as seguintes: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas (Hoare, 1971; Brener, 1973). A forma amastigota é intracelular, encontrada nos tecidos do hospedeiro vertebrado. Caracteriza-se pela falta de flagelo emergente e membrana ondulante, por isso seu movimento é apenas por rotação. Esta forma evolutiva se multiplica por divisão binária a cada 12 h, diferenciando-se em tripomastigotas sanguíneos aproximadamente 11 a 13 h antes da ruptura celular (Ley, 1988). A forma epimastigota, por sua vez, é encontrada no trato digestivo do triatomíneo e apresenta um flagelo livre, cinetoplasto anterior ao núcleo e membrana ondulante pouco desenvolvida. É bastante móvel, apresentando atividade replicativa intensa - também por divisão binária- e muitas vezes se agrupa em rosetas características. Em relação ao tripomastigota, este não possui capacidade replicativa e

corresponde à forma infectiva, localizada tanto nos hospedeiros invertebrados como vertebrados, sendo então denominados tripomastigota metacíclico e sanguíneo, respectivamente. O tripomastigota metacíclico é encontrado nas porções finais do intestino ou nos túbulos de Malpighi de insetos vetores; apresenta um núcleo grande e central e um cinetoplasto com alta densidade de DNA, em posição posterior terminal. Finalmente, o tripomastigota sanguíneo pode ser observado no sangue e em outros fluídos corporais - como o líquido cefalorraquidiano e linfa - dos hospedeiros vertebrados. O flagelo emerge do corpúsculo basal, próximo ao cinetoplasto (Alvarenga, 1997; Siqueira-Batista, 2007). Além das três formas de desenvolvimento citadas anteriormente, foi caracterizada um estágio intracelular, transiente entre o estágio amastigota e tripomastigota. Devido às suas semelhanças morfológicas e bioquímicas com o epimastigota, foi assim denominada epimastigota intracelular, podendo também ser encontrado com a denominação de epimastigota-like (Almeida-de-Faria et al., 1999; Tyler, Engman, 2001; Alves, Colli, 2007).

O ciclo de vida do *T. cruzi* (**Figura 3**) é complexo e marcado por uma série de diferenciações. Durante o repasto sanguíneo, um triatomíneo infectado recebe uma quantidade significativa de sangue no seu sistema digestivo, que força a eliminação de H₂O e, junto com ela, a massa de excrementos acumulados em forma de fezes e urina. Essa massa excretada é depositada na superfície da pele do hospedeiro e contém formas tripomastigotas metacíclicas que penetram na pele quando a mesma se encontra lesionada ou através das mucosas. O prurido local provocado pela inserção da probóscide do barbeiro facilita a penetração do protozoário. Uma vez que os tripomastigotas metacíclicos atingem os tecidos de seu hospedeiro, podem ser internalizados, processo que envolve a formação do vacúolo parasitóforo. O pH ácido do vacúolo inicia o processo de diferenciação em amastigotas, que são capazes de evadir do vacúolo para o citoplasma da célula. Uma vez no citoplasma, os parasitas se multiplicam por fissão binária e quando decorridas sucessivas divisões, diferenciam-se em tripomastigotas sanguícolas. Assim, após um ciclo de infecção celular, os tripomastigotas liberados para o meio extracelular podem invadir células vizinhas ou atingir a corrente sanguínea, através da qual podem espalhar a infecção a outros tecidos e órgãos. Em última instância, se o hospedeiro vertebrado for picado por outro triatomíneo, este pode vir a ingerir tripomastigotas sanguíneos, que irão chegar ao estômago e, no intestino médio diferenciam-se em epimastigotas; os parasitas seguem se multiplicando e sequencialmente se diferenciam para tripomastigotas metacíclicos, na porção final do intestino (processo esse chamado metaciclogênese). Estes poderão ser transportados pela excreta para o exterior,

permitindo o depósito na superfície da pele e, assim, reiniciando o ciclo de infecção de um novo hospedeiro mamífero (WHO,2002; Martins et al., 2012).

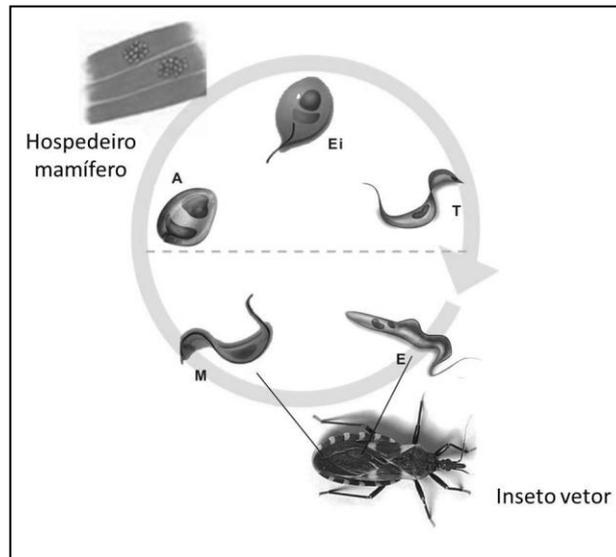


Figura 3 – Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*. Formas encontradas no hospedeiro mamífero: A, amastigota; Ei, epimastigota intracelular; T, tripomastigota sanguíneo. Formas presentes no hospedeiro invertebrado: E, epimastigotas; M, tripomastigota metacíclico. Figura original de Silva e colaboradores, 2011.

1.3 Metabolismo energético de *T.cruzi*: uma visão geral

1.3.1 Metabolismo intermediário

Em busca de tornar bem sucedida sua sobrevivência nos diferentes ambientes pelos quais transita durante o seu ciclo de vida (trato intestinal do inseto, sangue do hospedeiro vertebrado e o citoplasma das diferentes células do hospedeiro mamífero que é capaz de invadir), o parasita precisa manter a homeostase intracelular de íons e nutrientes, bem como ser capaz de catabolizar diferentes substratos para obtenção de energia (Silber et al., 2005). Nesse sentido, os tripanossomatídeos são capazes de metabolizar glicose e aminoácidos como fontes de carbono e energia (Oppenheimer, Borst, 1977; Cazzulo, 1992; Silber et al., 2005).

Os cinetoplastídeos apresentam como característica única o fato da glicólise ser compartimentalizada entre glicossomos e o citoplasma (Oppenheimer, Borst, 1977). Uma vez no citoplasma, a glicose é internalizada para os glicossomos para ser oxidada. Em relação à via glicolítica, chama à atenção o fato de que, nos cinetoplastídeos, as enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase não são reguladas de forma alostérica, em oposição aos mamíferos; isso

significa que a atividade dessas enzimas não é controlada pela ligação de moléculas específicas em seus sítios regulatórios (Racagni, Machado de Domenech, 1983; Urbina, Crespo, 1984; Aguilar, Urbina, 1986; Taylor, Gutteridge, 1987). Classicamente, a transição da anaerobiose para a aerobiose, em muitos organismos, é acompanhada por uma rápida diminuição na taxa de utilização de glicose; esta inibição do fluxo glicolítico pela presença do oxigênio é conhecida como “Efeito *Pasteur*” e *T.cruzi* não apresenta este fenômeno (von Brand, 1979; Cannata, Cazzulo, 1984). Alguns autores propuseram que a compartimentação da glicólise e a sua falta de regulação nos pontos clássicos da via são fenômenos relacionados, uma vez que o fluxo glicolítico nesses organismos poderia ser controlado pelo saldo intraglicossomal de ADP/ATP (Bakker et al., 2000).

Uma vez dentro do glicossomo, cada molécula de glicose é rapidamente convertida em duas moléculas de 1, 3 bifosfoglicerato (1,3 BPG) pelas enzimas glicolíticas presentes nessa organela. O 1,3 BPG formado é transportado para o citoplasma e convertido em fosfoenolpiruvato (PEP), que pode seguir por duas diferentes vias: (a) conversão a piruvato (via piruvato quinase - PK), parte do qual pode ser translocado para o interior da mitocôndria e adentrar o ciclo de Krebs e/ou pode ser convertido em alanina por transaminação no citoplasma, via alanina amino transferase (ALT) (Cazzulo, 1992; Cannata, Cazzulo, 1984) (b) transportado de volta para o glicossomo, seguido pela carboxilação do PEP em oxaloacetato, via ação da enzima PEP carboxiquinase (PEPCK). O oxaloacetato resultante é convertido em malato por uma enzima malato desidrogenase glicossomal (MDHg), o qual deixa o glicossomo e é convertido novamente para piruvato por uma enzima málica citoplasmática. O malato pode ainda ser transportado para a mitocôndria, onde pode ser convertido em piruvato pela enzima málica mitocondrial e oxidado via ciclo de Krebs. Ambos *polls* de piruvato, citoplasmático e mitocondrial, podem ser aminados por transaminases produzindo alanina, provavelmente responsáveis pela existência de dois *polls* independentes de alanina [revisado por (Silber et al., 2005)].

Quando uma alta concentração de malato atinge a matriz mitocondrial, o destino do mesmo depende do estado de funcionamento do ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA). Se a operação do TCA for baixa, parte do oxaloacetato produzido pela malato desidrogenase mitocondrial (MDHm), irá se acumular e inibir a enzima málica mitocondrial, fazendo com que a maioria do malato seja convertido a fumarato e posteriormente a succinato via fumarato redutase (o que funcionaria como sistema de reoxidação de NADH). Se o ciclo estiver trabalhando ativamente, os níveis de oxaloacetato serão mantidos baixos e a enzima málica

mitocondrial estará ativa. Assim, parte do malato será convertido a piruvato, que pode ser descarboxilado e ligado à coenzima A (CoA) para formar acetil-CoA, liberando CO₂, reação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase. De fato, há evidências que corroboraram que essas duas ramificações estão presentes no TCA tanto em *T. cruzi*, como em *T. brucei* (Cannata et al., 1979; Cannata, Cazzulo, 1984; Silva et al., 2011).

1.3.2 *T. cruzi* e o metabolismo de aminoácidos

Está bem estabelecido que os aminoácidos desempenham papéis relevantes na biologia dos tripanossomatídeos, além da sua óbvia função como componentes das proteínas. Tais nutrientes são essenciais durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, visto que podem ser utilizados como fontes de carbono e energia e podem ainda participar em vários processos biológicos que auxiliam o parasita a se adaptar as diferentes mudanças de ambiente (Silber et al., 2005). Os primeiros trabalhos de Zeledón, bem como de Sylvester e Krassner, mostraram a capacidade das formas epimastigotas de oxidar certos aminoácidos, como prolina (Pro), Glutamato (Glu) e em menor eficiência aspartato (Asp) (Zeledon, 1960; Sylvester, Krassner, 1976). Além disso, sabe-se que além da glicose (Glc), a adição de Asp, Glu e Pro a um meio definido, promove a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (metacicogênese), em uma variedade de cepas de *T. cruzi* (Contreras et al., 1985; Homsy et al., 1989). Formas epimastigotas catabolizam Glc e, após sua exaustão, ocorre uma mudança para o catabolismo de aminoácidos, com amônia sendo excretada para o meio (Cazzulo, 1994; Barison, Rappado et al., 2017); epimastigotas são capazes de metabolizar asparagina (Asn), glutamina (Gln), Asp e Glu (Zeledon, 1960), leucina (Leu) (Mancilla, Naquira, 1967), Pro e isoleucina (Ile) (Sylvester, Krassner, 1976).

Sabe-se, por exemplo, que Glu e alanina (Ala) estão diretamente envolvidos no fornecimento de intermediários oxidáveis para o TCA. O grupo -NH₂ do glutamato pode ser transferido para piruvato via alanina aminotransferase (ALAT) ou pela tirosina aminotransferase (TAT) formando alfa-cetoglutarato (α -KG) e Ala. Alternativamente, o Glu pode ser convertido a α -KG, pela transferência do grupo -NH₂ para H₂O pela glutamato desidrogenase (GDH), enzima essa que apresenta duas isoformas: uma mitocondrial e outra citoplasmática (Cazzulo et al., 1977; Juan el al., 1978; Cazzulo et al., 1979). Este sistema robusto de transaminação contribui de forma a evitar o acúmulo de NH₃ e, de maneira contrária, resulta no acúmulo de Ala, que é menos tóxica, uma vez que nesse organismo o

ciclo da uréia não é funcional (Cazzulo, 1994). Finalmente, o Asp também contribui de forma a prover metabólitos para o TCA, via transferência de seu grupo $-NH_2$ para α -KG, formando Glu e oxaloacetato, através da aspartato amino transferase (ASAT) (Cazzulo, 1977) [revisado por (Silber et al., 2005)].

Em relação a Pro, foi demonstrada a sua importância no processo de diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos no inseto vetor (Homsy et al., 1989; Contreras et al., 1985), assim como na diferenciação de formas epimastigotas intracelulares para tripomastigotas, um processo que ocorre no citoplasma das células hospedeiras infectadas (Tonelli et al., 2004), além de estar envolvido nos processos de osmorregulação e resistência do parasita ao estresse oxidativo e nutricional (Magdaleno et al., 2009). Mais que isso, epimastigotas intracelulares atendem sua demanda energética através de outros metabólitos, especialmente Pro. Ademais, está bem estabelecido que a adesão à superfície da célula hospedeira antes da invasão exige que o parasita dispenda energia e foi demonstrado que tal necessidade (no caso de tripomastigotas metacíclicos) é atendida principalmente pela Pro, capaz de restaurar os níveis de ATP após o período de estresse nutricional (Martins et al., 2009). No que diz respeito ao metabolismo da Pro, este vem sendo amplamente estudado pelo nosso grupo. Sabe-se que a Pro é degradada em dois passos enzimáticos a Glu: primeiro, é oxidada em $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C), reação catalisada pela prolina desidrogenase (*Tc*PROD_H) e posteriormente o mesmo é convertido em Glu pela $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (*Tc*P5CD_H) na presença de NAD(P)⁺. Foi descrito que a oxidação de Pro acontece na mitocôndria, estimulando a respiração celular e sustentando a síntese de ATP através do processo de fosforilação oxidativa (Paes et al., 2013; Mantilla et al., 2015).

Em contraste com a Pro, Asp e Glu, serina (Ser) e metionina (Met) não são capazes de estimular o consumo de oxigênio nas formas epimastigotas de *T. cruzi* (Sylvester, Krassner, 1976). De fato, não há estudos na literatura que apontem para um papel desses aminoácidos no metabolismo energético, muito embora dados recentes de nosso laboratório sugeriram que Ser possa recuperar as taxas de consumo de O₂ em parasitas submetidos a estresse nutricional (dados não publicados). No tocante à Met, a mesma pode estar envolvida no metabolismo de poliaminas (Sylvester, Krassner 1976).

Com relação à arginina (Arg), esta atua na administração dos recursos energéticos da célula através da enzima arginina quinase, de forma análoga à participação da creatina através da creatina quinase em mamíferos (Pereira, et al., 2000, Pereira, et al., 2002, Pereira, et al., 2003). Outros exemplos incluem Ala, Gln, glicina (Gly) e Pro, que estão envolvidos na

osmorregulação e controle do volume celular, durante todos os estágios do parasita (Rohloff, Docampo, 2008).

1.4. O aminoácido Histidina (His) e o *T. cruzi*

His é um dos aminoácidos mais abundantes em ambos os excrementos (fluídos e a hemolinfa) do inseto vetor (*Rhodnius prolixus*) (Harington, 1961a, b), o que parece ser uma consequência de sua elevada concentração na hemoglobina, o principal alimento do vetor triatomíneo (Vickery, 1942; Atwood et al, 2005). Concomitantemente, as enzimas envolvidas na degradação de His têm sua expressão aumentada e se encontram mais abundantes nos estágios de *T. cruzi* envolvendo o hospedeiro invertebrado (Atwood et al., 2005; Minning et al., 2009). Portanto, o parasita poderia estar adaptado para obtenção e consumo His como fonte de carbono e energia durante as fases de infecção, proliferação e diferenciação, que ocorrem no inseto vetor.

Quando realizado um estudo detalhado da importância do aminoácido His para o *T. cruzi*, bem como em quais processos biológicos está intimamente envolvido, constatou-se que His pode ser incorporada pelas formas epimastigotas em um sistema de transporte único e dependente de ATP, cujos parâmetros cinéticos foram determinados. A K_m (constante de Michaelis-Menten), bem como a atividade específica desse transportador se mostraram semelhantes àquelas descritas para alguns dos outros transportadores de aminoácidos do parasita, tais como o transportador de Pro de alta afinidade (sistema A) (Silber et al., 2002), o transportador único de Glu (Silber et al., 2006) e o transportador de baixa afinidade para Arg (Canepa et al., 2009). A forma tripomastigota metacíclica também pode incorporar His, porém, quando comparada às taxas de incorporação da forma epimastigota, a última incorpora cerca de 60% a mais com respeito ao metacíclico, sugerindo uma maior dependência deste aminoácido para o estágio epimastigota, provavelmente associado à proliferação celular (Barison et al., 2016).

Ainda nesse sentido, a fim de avaliar se His é capaz de sustentar a viabilidade de epimastigotas, parasitas em fase exponencial cultivados em meio rico (LIT) foram transferidos para PBS suplementado ou não com diferentes metabólitos. Foi observado que além de incorporada pelo parasita, His está sendo usada como fonte de energia para manter a viabilidade celular (Barison et al., 2016), em níveis similares aos demonstrados para Pro, anteriormente descrita como um aminoácido protetor ao estresse metabólico e relevante em

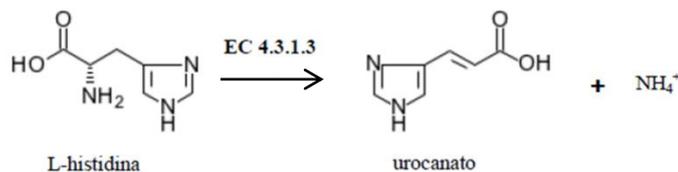
termos de bioenergética para o parasita (Magdaleno et al., 2009; Martins et al., 2009; Paes et al., 2013; Mantilla et al., 2015).

Ademais, a oxidação de His a Glu, bem como a conversão desse a α -KG (através de diferentes transaminases ou por desaminação oxidativa via glutamato desidrogenase) e sua entrada ao ciclo de Krebs foi demonstrada quando $^{14}\text{CO}_2$ foi recuperado depois que parasitas foram incubados com ^{14}C -His uniformemente marcada. Assim, a degradação deste aminoácido foi capaz de produzir ^{14}C -Glu e posteriormente ^{14}C - α -KG, o qual seria oxidado via Krebs produzindo $^{14}\text{CO}_2$ nas reações de decarboxilação oxidativa. Além disso, os parâmetros bioenergéticos foram analisados e a recuperação com His após estresse nutricional restaurou a viabilidade celular e o potencial de membrana interno mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) tão eficientemente quanto ao meio rico. Finalmente, a produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa e o consumo de oxigênio nas mitocôndrias foram detectados, em magnitudes comparáveis ao obtido quando os parasitas foram recuperados com Pro, ambos após estresse nutricional (Barison et al., 2016).

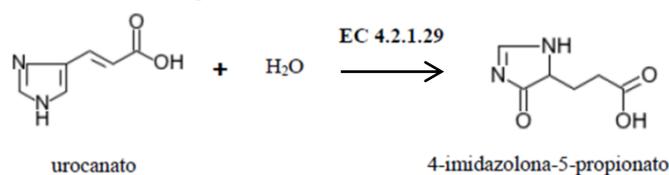
Assim, fica claro que His é um aminoácido essencial, intimamente envolvido na bioenergética, bem como na permanência do *T. cruzi* no hospedeiro invertebrado.

1.4.1 A via de degradação de His

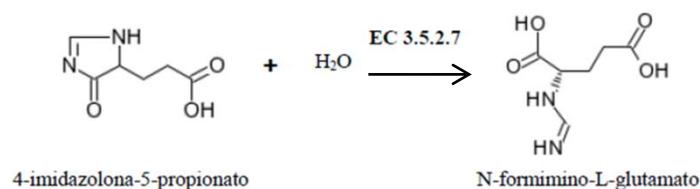
O processo de degradação do aminoácido His até então descrito, compreende em conjunto quatro reações enzimáticas, que levam à formação de Glu como produto final da via. As três primeiras reações são notavelmente semelhantes na maioria das espécies estudadas. Primeiramente, His é convertida em urocanato (**URO**) e amônio pela Histidina Amônia Liase (**HAL**), por um processo de desaminação.



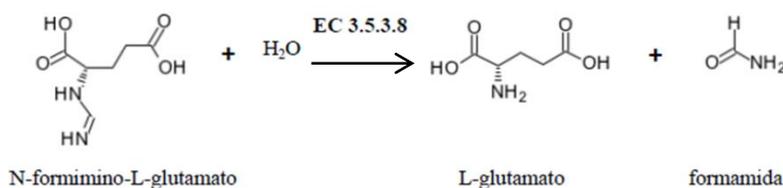
Em uma segunda reação, o urocanato é convertido a 4-imidazolona-5-propionato (**IPA**) pela Urocanato Hidratase (**UH**):



Posteriormente, o 4-imidazolona-5-propionato (**IPA**) é hidrolisado a N-formimino-L-glutamato (**FiGlu**) pela ação da enzima Imidazolona Propionase (**IP**):



Nesse ponto, o grupo formimino pode tanto ser transferido ao tetraidrofolato para formar L-glutamato e N⁵-formimino-THF através da glutamato-formimidoil transferase (EC 2.1.2.5), quanto ser hidrolisado diretamente para gerar formamida e Glu pela enzima formimidoil-glutamase (**FG**) (Magasanik e Bowser, 1955):



Fonte: www.genome.jp/kegg/; www.brenda-enzymes.org/

Além do proposto acima, foram descritas ramificações na via de degradação de His. Sabe-se, por exemplo, que a partir do intermediário 4-imidazolona-5-propionato (**IPA**), outro intermediário adicional pode ser gerado através de uma atividade oxidase, sendo esse o L-hidantoin-5-propionato, que não é metabolizado *in vivo* (Brown, Kies, 1959). Ainda nesse sentido, outro possível produto da oxidação do IPA, o 4-oxoglutamato, foi identificado e inicialmente descrito como um intermediário enzimático resultante da oxidação do urocanato pela bactéria *Pseudomonas aeruginosa* (Ichihara et al., 1957). Simultaneamente foi demonstrado que extratos contendo a enzima urocanato hidratase em sua composição poderiam levar à redução de aceptores de elétrons, tais como o 2,6-dichlorophenolindophenol (DCPIP) e ferricianeto, e esse fenômeno foi descrito como consequência do metabolismo do

urocanato. Tendo por base essa observação, Miller e Waelsch sugeriram que a formação do urocanto oxidado, bem como a enzima reduzida, poderia ser um passo intermediário na reação da UH (Miller, Waelsch, 1959). No entanto, Feinberg e Greenberg, demonstraram que, na realidade, a redução do DCPIP não estava, de fato, diretamente acoplada ao metabolismo intermediário do urocanto, uma vez que essa reação prosseguiu muito depois da utilização desse substrato. Mais que isso, eles mostraram que a reação é não-enzimática e ocorre, efetivamente, devido à oxidação do IPA, produto primário da reação da UH (Feinberg, Greenberg, 1959). Mais tarde, dando continuidade aos estudos, foi provado que o IPA poder ser não enzimaticamente oxidado a 4-oxoglutarato (e posteriormente a α -KG), ácido fórmico e amônia, sendo esta reação favorecida na presença de aceptores de hidrogênio, assim concluindo que o 4-oxoglutarato é um intermediário resultante da decomposição do IPA e não do urocanto (Hassal, Greenberg, 1962). Ademais, grupos de pesquisadores demonstraram independentemente que o IPA pode também ser hidrolisado não enzimaticamente a N-formilisoglutamina e posteriormente a isoglutamina. Foi reportado que o oxigênio é requerido para que essa hidrólise ocorra em pH neutro, processo esse dependente principalmente da instabilidade aeróbica do intermediário IPA, sob essas condições (Brown, Kies, 1959; Feinberg, Greenberg, 1959; Hassal, Greenberg, 1962).

Finalmente, observou-se que o N-formimino-L-glutamato pode ser degradado através de uma via alternativa à descrita: o grupo formimino pode ser deaminado para formar amônio e N-formil-L-glutamato através de uma reação catalisada pela enzima formimidoil-glutamato deaminase (EC 3.5.3.13) e este é posteriormente hidrolisado pela N-formilglutamato deformilase (EC 3.5.1.68), formando como produto final formato e Glu (Magasanik, Bowser, 1955). Uma visão geral do metabolismo de His até então detalhado, pode ser demonstrado graficamente na **Figura 4**.

No que diz respeito ao *T. cruzi*, quando realizada uma busca *in silico* por sequências codificantes para enzimas envolvidas no catabolismo de His em bases de dados genômicas foram identificadas fases abertas de leitura para as seguintes enzimas da via central de degradação desse aminoácido (www.genedb.org): uma fase de leitura aberta codificante para a HAL [nome sistemático: Tc00.1047053506247.220], uma fase de leitura aberta para a UH [Tc00.1047053504045.110], outras duas fases de leitura abertas codificantes para a IP [Tc00.1047053509137.30 e Tc00.1047053508741.140] e duas fases abertas de leitura correspondentes à FG [Tc00.1047053507963.20 e Tc00.1047053507031.90].

As duas primeiras enzimas envolvidas na via de degradação de His em *T. cruzi* foram previamente estudadas e uma caracterização bioquímica e molecular foi realizada, abordando aspectos bioquímicos e funcionais (tese de Doutorado María Julia Barisón, 2015). Esse fato, juntamente aos dados recentemente publicados (Barison et al., 2016) demonstram que His é incorporada e metabolizada como fonte de energia para o *T. cruzi* e apontam para novas perspectivas de estudo para as demais enzimas da via, seu funcionamento e regulação.

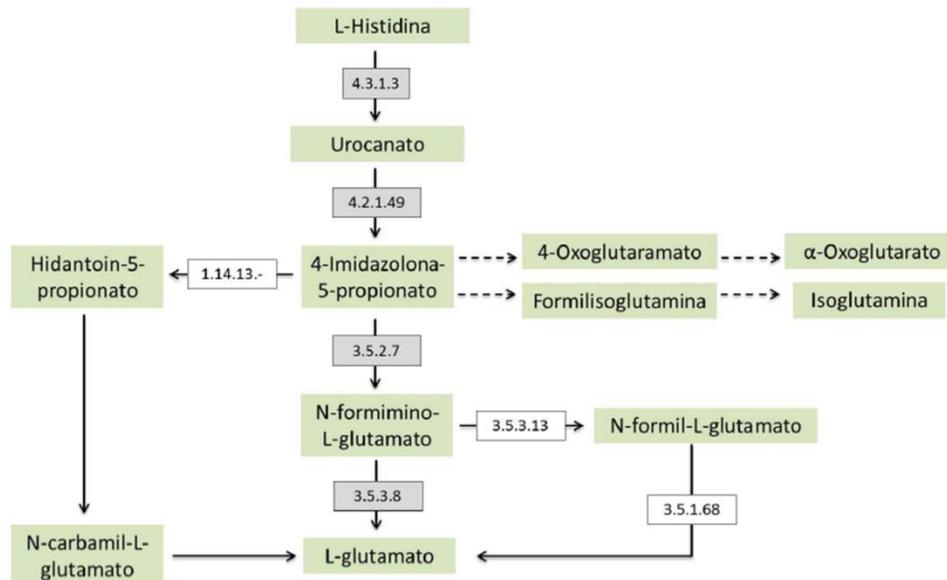


Figura 4 - Visão geral da via de degradação de His. As enzimas indicadas nos quadrados em cinza correspondem às identificadas no genoma de *T. cruzi*. EC 4.3.1.3: histidina amônia-liase, EC 4.2.1.49: urocanato hidratase, EC 3.5.2.7 imidazolona propionase, EC 3.5.3.8: formimino-glutamase, EC 3.5.3.13: formimidoilglutamato deiminase, EC 3.5.1.68: N-formilglutamato deformilase. As setas pontilhadas indicam reações não enzimáticas. Figura original: tese de doutorado María Julia Barison, 2015.

CAPÍTULO 2: OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

Avaliar o papel da enzima imidazolona propionase –**TcIP** (EC 3.5.2.7) no metabolismo de His, assim como a sua relevância na biologia de *T. cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar bioquimicamente a *TcIP*, determinar sua localização subcelular e seu padrão de expressão ao longo do ciclo de vida do parasita.
- Avaliar a participação dessa enzima no metabolismo de His.
- Avaliar a participação da *TcIP* em processos biológicos do parasita, tais como: proliferação, diferenciação, produção de ATP e consumo de oxigênio, infectividade e resistência a estresses.

CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação do gene putativo para IP no genoma de *T. cruzi*

Conforme apresentado na introdução deste trabalho, as duas primeiras enzimas da via de degradação de His (**TcHAL** e **TcUH**) foram anteriormente caracterizadas. Sendo assim, com o objetivo de dar continuidade aos estudos das enzimas envolvidas nessa via metabólica, foi do nosso interesse identificar e caracterizar a terceira enzima da via, **TcIP**. Iniciamos uma busca sistemática nos bancos de dados do genoma de *T. cruzi* para genes putativos codificantes para **TcIP**.

3.1.1 Análises *in silico* para TcIP

A busca por seqüências dos genes putativos da IP foi realizada no banco de dados específico para tripanossomatídeos, **TriTrypDB** (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>), onde encontramos seqüências da cepa CL Brener [*Esmeraldo-like* (Tc00.1047053509137.30) e *Não-Esmeraldo-like* (Tc00.1047053508741.140)]; bem como da cepa *T. cruzi marinkellei strain B7* (Tc_MARK_10040); os números sistemáticos se encontram em parênteses. Em relação a outros tripanossomatídeos, identificamos *Trypanosoma rangeli* (TRSC58_05082), *Trypanosoma grayi* (DQ04_14001000) e *Trypanosoma theileri* (*gene bank*: ORC77178.1); estas seqüências foram tomadas como base para realização de um alinhamento múltiplo fazendo uso da plataforma **EMBL-EBI** (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e a ferramenta Clustal Omega. Uma vez que os trabalhos experimentais foram realizados com a cepa CL clone 14, adotamos a seqüência de TcIP proveniente da cepa CL como referência. O alinhamento obtido foi editado usando o software **ESPrIPT3.0** (<http://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/cgi-bin/ESPrIPT.cgi>).

A seqüência de aminoácidos da IP de *T. cruzi* foi ainda comparada com as seqüências homólogas presentes em diferentes organismos modelos: *Homo sapiens* [(Q96NU7 (HUTI_HUMAN)], *Mus musculus* [Q9DBA8 (HUTI_MOUSE)], *Danio rerio* [Q7SXX5 (HUTI_DANRE)], *Xenopus laevis* [Q561L6 (HUTI_XENLA)], e *Pseudomonas putida* [Q88CZ9 (HUTI_PSEPK)]; as seqüências encontradas nas buscas foram identificadas como imidazolona propionase ou amido hidrolase e o código informado entre colchetes corresponde ao código de acesso dessas seqüências no **UniProt** (<http://www.uniprot.org/>).

Algumas outras análises bioinformáticas foram realizadas, usando as plataformas e/ou softwares listados a seguir: **Pfam** (<http://pfam.xfam.org/>), para predição dos domínios de

ligação da enzima; **Phobios** (<http://phobius.sbc.su.se/>), a fim de identificar a presença de peptídeo sinal na sequência e o servidor **TMHMM** versão 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), para detecção de domínios transmembrana. Ademais, a plataforma **Primer-BLAST** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>), foi usado a fim de confirmar e/ou verificar a especificidade dos iniciadores desenhados ao longo do trabalho e, finalmente, para informações detalhadas das vias metabólicas, foi usado o banco de dados **KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes** (<http://www.genome.jp/kegg/>); para explorar as características das enzimas, incluindo parâmetros cinéticos, classificação, estrutura, ligantes, inibidores, dentre outros, usamos o banco de dados **BRENDA** (<http://www.brenda-enzymes.org/>).

3.1.2 Obtenção das sequências *TcHAL* e *TcUH*

Em relação às sequências da histidina amônio liase (*TcHAL*) e urocanato hidratase (*TcUH*) de *T. cruzi* usadas nesse trabalho, seguiu-se conforme descrito (tese de Doutorado María Julia Baríson); as sequências usadas no decorrer desse trabalho são as seguintes: Tc00.1047053506247.220 e TcCLB.504045.110, para *TcHAL* e *TcUH*, respectivamente, de acordo com o banco de dados para tripanossomatídeos (**TriTrypDB**).

3.2 Microorganismos utilizados e condições de crescimento

3.2.1 *Escherichia coli*

As cepas bacterianas utilizadas são descritas a seguir, sendo as duas primeiras usadas para clonagem do DNA exógeno de interesse e a terceira para expressão da proteína recombinante referente, respectivamente: cepa **DH5 α** , a qual apresenta o genótipo: F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169 recA1 endA1 hsdR17(r_K⁻, m_K⁺) phoA supE44 λ - thi⁻¹ gyrA96 relA1, cepa **XL1-Blue**: recA1 endA1 gyrA96 thi⁻¹ hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)] e, finalmente, a cepa **BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL**, cujo genótipo segue: F⁻ ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r]. Os genes listados significam alelos mutantes. Os genes no episoma F', no entanto, são de tipo selvagem, a menos que indicado de outra forma.

Para a cultura de cepas bacterianas foi utilizado o meio Lysogeny broth (LB), cuja composição é a seguinte: 10 g de peptona de carne, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl, por litro de meio preparado. De acordo com a cepa e/ou do plasmídeo usado na transformação bacteriana, o meio foi suplementado com antibióticos específicos: ampicilina (100 µg/mL), tetraciclina (5 µg/mL) e canamicina (30 µg/mL). Para a preparação de meios sólidos, foi adicionado ágar bacteriológico na concentração final de 1,5%. Uma vez selecionados, os clones positivos foram conservados em uma solução de LB suplementada com 15% de glicerol (v/v) para serem armazenados a - 80°C.

3.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Estudos envolvendo regulação gênica em fungos têm contribuído amplamente para melhor compreensão dos mecanismos de expressão gênica em eucariotos. Uma vez que a levedura *S. cerevisiae* tem sido há muito tempo um organismo de escolha para a análise genética, os circuitos reguladores de uma série de genes de levedura foram bem caracterizados (Mortimer, Johnston, 1986).

Dessa maneira, o modelo de levedura foi utilizado nesse trabalho para estudar a funcionalidade de dois genes codificantes para as duas primeiras enzimas da via de degradação de His - *TcHAL* e *TcUH* - respectivamente, bem como a fim de demonstrar a hipótese de que essa via poderia ser operativa valendo-se apenas da funcionalidade de tais enzimas e da propriedade intrínseca de oxidação espontânea do produto da *TcUH* - o IPA- em α -KG e sua capacidade de adentrar o ciclo de Krebs, mantendo-o operativo.

A cepa W303-1A, gentilmente cedida pelo Dr. Agustín Hernandez Lopes, foi usada como cepa tipo selvagem e crescida em meio sintético para levedura. O crescimento das leveduras em meio sintético permite a seleção dos transformantes positivos sob a ausência do aminoácido de interesse. O meio está composto de: sulfato de adenina 0,04 g/L, L-arginida 0,02 g/L, L-aspartato 0,1 g/L, L-glutamato 0,1 g/L, L-lisina 0,03 g/L, L-metionina 0,02 g/L, L-fenilalanina 0,05 g/L, L-serina 0,37 g/L, L-treonina 0,2 g/L, L-tirosina 0,03 g/L e L-valina 0,15 g/L, glicose 2% (p/v), bases nitrogenadas 0,17%, sulfato de amônio (p/v) e ágar 2% ou água, de acordo com a aplicabilidade do meio. Os aminoácidos auxotróficos foram preparados separadamente na forma de um estoque concentrado 100 x, sendo as concentrações finais de uso: uracila 3 g/L, L-leucina 10 g/L, L-histidina 3 g/L e L-triptofano 10 g/L, adicionados quando necessário e excluindo do meio aqueles cujos plasmídeos e/ ou mutações genéticas

foram capazes de complementar. Fonte exclusiva de respiração, o glicerol, foi usado na concentração final de 3% (Lundblad, Struhl, 2003).

3.2.3 *Trypanosoma cruzi*

3.2.3.1 Formas epimastigotas

As formas epimastigotas do clone 14, da cepa CL de *T. cruzi*, foram mantidas em fase exponencial de crescimento por passagens sucessivas (cada 48 h) a 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e Glc na concentração final de 0,2% (Camargo, 1964), exceto quando condições específicas sejam detalhadas.

3.2.3.2 Metaciclogênese *in vitro*

Foi realizada de acordo com (Contreras et al., 1985). Formas epimastigotas em fase exponencial de proliferação foram contadas e uma nova cultura foi feita com 5×10^6 parasitas/mL em 10 mL de meio LIT suplementado com 10% de soro fetal bovino [SFB (v/v)]. Esta cultura foi incubada a 28 °C por quatro dias até atingir a fase estacionária de crescimento (aproximadamente 1×10^8 parasitas/mL), quando os parasitas foram centrifugados a 7000 x g por cinco min a 4 °C para remover o meio LIT. Em seguida o sedimento de parasitas foi lavado uma vez com PBS. Em um tubo falcon foram adicionados 5×10^7 parasitas/mL em 15 mL de meio TAU (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM tampão fosfato pH 6) e incubados por 2 h a 28 °C. Após esse período de estresse nutricional em meio TAU, os parasitas foram centrifugados, o sobrenadante descartado e os parasitas ressuspensos em 15 mL de meio TAU-3AAG (TAU suplementado com 10 mM glicose, 2 mM ácido aspártico, 50 mM ácido glutâmico, 10 mM prolina) ou TAU-His (TAU suplementado com 10 mM histidina) e incubados a 28 °C. Nesta etapa os parasitas aderem à superfície das garrafas de cultivo e diferenciam-se nas formas tripomastigotas metacíclicas. Entre os dias 5 e 6 após início da metaciclogênese, os tripomastigotas metacíclicos começam a se liberar do substrato.

3.2.3.3 Purificação de tripomastigotas metacíclicos por cromatografia de troca iônica

Para purificar e coletar as formas tripomastigotas metacíclicas obtidas, foi realizada cromatografia de troca iônica com resina de DEAE celulose (DEAE-52 Whatman) (Teixeira, Yoshida, 1986). Ao sétimo dia de incubação em meio TAU-3AAG o sobrenadante da cultura foi coletado (sem homogenização) e transferido para tubo falcon de 50 mL e em seguida centrifugado a 7000 x g por cinco min a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o sedimento de parasitas foi lavado com 10 mL de PBS suplementado com 2% de D-glicose em pH8 (PSG). Após a lavagem os parasitas foram ressuspensos em 1 mL de PSG e aplicados em coluna de resina DEAE celulose (Sigma®, EUA). Em uma coluna ou seringa estéril foi adicionada resina DEAE celulose equilibrada com PBS pH 8 (ao usar seringa, forrar a saída com lã de vidro autoclavada) até atingir um volume de 5 mL. A resina foi então lavada três vezes com 5 mL de PSG e o pH do filtrado foi verificado a cada lavagem. Neste momento os parasitas em 1 mL de PSG foram depositados sobre a coluna e eluídos com PSG. As frações coletadas da coluna foram centrifugadas a 7.000 x g por cinco min a temperatura ambiente e ressuspensos em 1 mL de PBS. O número de tripomastigotas metacíclicas e a pureza de cada fração (Nº de tripomastigotas em %) foi obtido por contagem em câmara de Neubauer. As frações com mais de 98% de tripomastigotas foram usadas em experimentos posteriores.

3.2.3.4 Obtenção de formas intracelulares e tripomastigotas derivados de células

Para obtenção de formas intracelulares e tripomastigotas de *T. cruzi*, células CHO-K₁ (*Chinese Hamster Ovary*) foram mantidas em meio RPMI-1640 (Vitrocell™) suplementado com 10% de SFB (v/v), 0,15% NaHCO₃, 100 µg/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e incubadas a 37 °C sob atmosfera úmida e 5% CO₂. Assim, 5 x 10⁵ células/mL de CHO-K₁ foram incubadas até se aderirem em garrafa de 75 cm². Posteriormente estas células foram infectadas com formas tripomastigotas na proporção de 50:1 (tripomastigotas por célula CHO-K₁). Os tripomastigotas foram obtidos a partir de estoques armazenados a -80 °C em solução de congelamento (7% DMSO v/v, 40% SFB v/v em meio RPMI). As células e os parasitas foram incubados a 37 °C por 3 h sob atmosfera úmida e 5% CO₂, lavados 2 x com PBS estéril, seguido da adição de meio RPMI novo suplementado com 10% SFB (v/v). Após 24 h de incubação a 37 °C, as células foram lavadas 2 x com PBS, seguido da adição de meio RPMI novo suplementado com 2% SFB (v/v) e as garrafas foram transferidas para estufa a 33 °C sob atmosfera úmida e 5% de CO₂. As células foram mantidas nessas condições até a

coleta das formas do parasita. Após o segundo e quarto dia de infecção sincrônica em CHO-K₁ foram obtidas, respectivamente, as formas amastigotas e epimastigotas intracelulares (Tonelli et al., 2004). Para a liberação das formas intracelulares, o meio das garrafas de cultura foi descartado e as células CHO-K₁ foram lavas 1 x com PBS, em seguida a ruptura das células CHO-K₁ foi feita pela adição de 2,5 mL de PBS suplementado com 0,05% de dodecil sulfato de sódio (SDS p/v). Ao observar, em microscópio óptico invertido, a liberação das formas intracelulares no sobrenadante, a ação do SDS foi neutralizada pela adição de 2,0 mL de PBS suplementado com 10% SFB (v/v). As células ainda aderidas à garrafa foram removidas com a ajuda de um raspador estéril, e a suspensão celular foi centrifugada (5 min a 50 x g) para a separação das formas intracelulares do parasita do debris celular. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente (10 min a 4.300 x g). O sedimento foi armazenado para posterior uso. Ao quinto, sexto e sétimo dia pós-infecção de células CHO-K₁, formas tripomastigotas de cultura foram coletadas do sobrenadante de garrafas infectadas. Os tripomastigotas foram centrifugados (10 min a 4.300 x g) e o sedimento foi armazenado para uso posterior. Em todos os casos desse item, a densidade celular foi determinada através da contagem em câmara de Neubauer.

3.3 Manipulação de DNA

3.3.1 Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

A obtenção de DNA genômico de *T. cruzi* foi feita a partir de formas epimastigotas e a extração do mesmo foi feita com o uso de um Kit comercial (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada mediante utilização do NanoDrop 2000Spectrophotometer (*Thermo Scientific*).

3.3.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Com base na seqüência gênica da *TcIP* (Tc00.1047053509137.30), foram desenhados e sintetizados oligonucleotídeos com sítios de clivagem para as endonucleases de restrição específicos, possibilitando o desenvolvimento das metodologias detalhadas nesse trabalho. Do dito, todos os iniciadores empregados, bem como detalhes de sua aplicação se encontram discriminadas na **Tabela 1**; nessa podemos também encontrar os oligonucleotídeos usados

para clonagem das sequências relativas à *TcHAL* (Tc00.1047053506247.22) e *TcUH* (TcCLB.504045.110).

A amplificação do fragmento de DNA de interesse foi realizada mediante a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, foram preparadas reações contendo: 100 ng de DNA genômico extraído de formas epimastigotas da cepa CL, clone 14 de *T. cruzi*, 1 x de tampão para Taq DNA Polimerase (+KCl, -MgCl₂) (Fermentas®), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA®) e H₂O mili-Q para 25 µL. Como controle negativo foi usado água ao invés de DNA na amostra. As condições de amplificação, em linhas gerais, foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento dos oligos ao DNA molde a 62 °C (podendo variar de acordo com o par de iniciadores utilizados) por 1 min e 30 s e extensão da cadeia nucleotídica a 72 °C por 1 min e 30 s (podendo variar para 2 min nos casos em que amplificamos a *TcUH*), além de uma extensão final adicional a 72 °C durante 10 min. Os produtos de PCR obtidos foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit GeneJET® (Thermo®) segundo as indicações do fabricante.

Para as PCRs a partir de colônias, foram coletadas células das placas utilizando palitos de madeira estéreis e ressuspendidas em 25 µL de água estéril. A lise foi realizada incubando durante 10 min a 100 °C. Foram utilizados 2 µL desse lisado como molde para cada reação de PCR.

3.3.3 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses dos fragmentos de DNA foram conduzidas em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1 x (0,04 M Tris base, 1 mM EDTA, pH 8 ajustado com ácido acético) e brometo de etídio na concentração final de 0,5 µg/mL. Antes da aplicação adicionou-se ao DNA o tampão de amostras (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol e 20% de glicerol). O padrão de peso molecular utilizado foi 1 kb DNA Ladder (Thermo®). As corridas electroforéticas foram conduzidas a 100 mA. Os géis foram visualizados no transiluminador sob fonte de luz UV e fotografados em sistema ImageQuant® 300 (GE Healthcare®, Pittsburg, PA, EUA).

| Iniciador | Sequencia 5' - 3' | Descrição |
|----------------|-------------------------------|--|
| TcIP-Fw_ex/ir | AAGGATCCATGCTGAGGGGCATGTTACTT | Clonagem da <i>TcIP</i> em vetor pGEM-T, pET-28 e pET-24 |
| TcIP-Rv_ex/ir | AAGAATTCTCAAGGCAGCTCCTTGCTGTA | Clonagem da <i>TcIP</i> em vetor pGEM-T, pET-28 e pET-24 |
| TcIP-Fw_tap/se | AATCTAGAATGCTGAGGGGCATGTTA | Clonagem da <i>TcIP</i> em vetor pTEX-TAP- <i>Tag</i> e pTEX |
| TcIP-Rv_tap/se | AAAAGCTTAGGCAGCTCCTTGCTGTA | Clonagem da <i>TcIP</i> em vetor pTEX-TAP- <i>Tag</i> e pTEX |
| TcUH-Fw_tap | AACTCGAGATGACTTCCATGAAGAAG | Clonagem da <i>TcUH</i> em vetor pTEX-TAP- <i>Tag</i> |
| TcUH-Rv_tap | AAAAGCTTATACTTCTTAAGCACATC | Clonagem da <i>TcUH</i> em vetor pTEX-TAP- <i>Tag</i> |
| TcUH-Fw_ir | AAGAATTCATGACTTCCATGAAGAAGGTC | Clonagem da <i>TcUH</i> em vetor pET-24 |
| TcUH-Rv_ir | AACTCGAGATACTTCTTAAGCACATCGG | Clonagem da <i>TcUH</i> em vetor pET-24 |
| TcHAL-Rv_sc | AAGGATCCATGAGGGTTATCCTTGACG | Clonagem da <i>TcHAL</i> em vetor p426GPD |
| TcHAL-Rv_sc | AACTCGAGCTCACATCTTGATTTCAGC | Clonagem da <i>TcHAL</i> em vetor p426GPD |
| TcUH-Fw_sc | AACCCGGGATGACTTCCATGAAGAAGGTC | Clonagem da <i>TcUH</i> em vetor pYEP351 |
| TcUH-Rv_sc | AAAAGCTTCTAATACTTCAGCACATC | Clonagem da <i>TcUH</i> em vetor pYEP351 |
| TcIP-int | GTCGCGTCGGGTGAGCTT | Sequenciamento de DNA |
| TcUH-int | GCTTATGCCGACTGTGAAGGA | Sequenciamento de DNA |
| M13 Fw | GTA AACGACGGCCAG | Sequenciamento de DNA |
| M13 Rv | CGGATAACGCTTGC GACCTATG | Sequenciamento de DNA |
| T7 sense | TAATACGACTCACTATAGG | Sequenciamento de DNA |
| T7 anti-sense | GCTAGTTATTGCTCAGCGG | Sequenciamento de DNA |
| Prt A | CTTCGGCGCTTGAGCACC | Sequenciamento de DNA |

Tabela 1 - Relação dos oligonucleotídeos usados nesse trabalho. Fw: forward (sense) ou direto, Rv: reverse (anti-sense) ou reverso. As demais abreviações indicam em que abordagens tais oligos foram utilizados: *ex* – expressão em bactérias, *ir* - interação entre proteínas recombinantes, *se*: superexpressão em parasitas, *tap* – purificação por afinidade em tandem, *sc*: clonagem em *S. cerevisiae* para demonstração do atalho na via de His, *int*: oligos internos de cada sequência, *Prt A*: oligo contra proteína A de *S. aureus*.

3.3.4 Clonagem em vetor tipo *T*: construção em pGEM T-Easy

O produto de amplificação por PCR da *TcIP* foi purificado a partir do gel de agarose utilizando o kit comercial GeneJET (Thermo®) segundo as indicações do fabricante e posteriormente quantificado como descrito anteriormente. Os produtos foram ligados em 50 ng de vetor pGEM T-Easy empregando-se a razão molar inserto:vetor equivalente a 3:1 ou, eventualmente, 5:1, utilizando 1U de T4 DNA ligase (Promega®, Madison, WI, EUA) e 1x do tampão ligase, incubando 16 h a 4 °C. A reação foi utilizada para transformar as células de *E. coli* (DH5α ou XL1-Blue) como será descrito abaixo. Os clones obtidos contendo o

fragmento de DNA de tamanho correspondente ao inserto de interesse foram submetidos a sequenciamento como será descrito.

De uma forma geral, as clonagens dos genes de interesse foram realizadas conforme detalhado acima, com algumas modificações de acordo com o vetor utilizado, que serão posteriormente detalhadas nas seções subsequentes.

3.3.5 Clonagem em vetor pET: construções pET28a-TcIP, pET24a-TcIP e pET24a-TcUH

A sequência da TcIP clonada no vetor pGEM T-Easy foi subclonada por corte com enzimas de restrição e posterior ligação nos vetores de expressão pET. Em um primeiro momento, cerca de 2 µg da construção pGEM-TcIP e 2 µg do plasmídeo pET28a foram digeridos com 2 U das enzimas EcoRI e BamHI (Thermo®) seguindo as instruções do fabricante. As digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, a partir do qual purificaram-se tanto os insertos a serem clonados quanto o vetor digerido. Por fim, foram realizadas as reações de ligação utilizando uma relação vetor:inserto de 1:3 (ou alternativamente 1:4 e 1:6), T4 DNA ligase 1 U/µL (Thermo®) em tampão e condições recomendados pelo fabricante. As reações foram incubadas a 4 °C até o dia seguinte.

Em outro evento de clonagem, as sequências da TcUH e TcIP foram diretamente clonadas em vetor pET24a, de forma que não pudessem expressar a cauda de 6 x His, uma vez que o códon de parada do iniciador reverso foi preservado no momento do desenho experimental. Assim, os fragmentos oriundos diretamente da reação de PCR, foram purificados com acetato de sódio 3 M e seguiu-se com a digestão dos fragmentos e do vetor, na proporção de 1 U de enzima para cada µg de DNA. Cerca de 1 µg do fragmento de interesse e 2 µg do plasmídeo pET24a foram digeridos com os pares de enzimas de restrição EcoRI e XhoI ou EcoRI e BamHI (Thermo®), para TcUH e TcIP, respectivamente, segundo as especificações e tampões recomendados pelos fabricantes (Fermentas®), e reação incubada por 2 h a 37 °C ou 30 min a temperatura ambiente quando a enzima utilizada foi a *fast digest*. As digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, a partir da qual purificaram-se tanto os insertos a serem clonados quanto o vetor digerido. Por fim, foram realizadas as reações de ligação utilizando uma relação vetor:inserto de 1:3 (ou alternativamente 1:4 e 1:6), T4 DNA ligase 1 U/µL (Thermo®) em tampão e condições recomendados pelo fabricante. As reações foram incubadas a 4 °C por 16 h e posteriormente utilizadas para transformar as células de *E. coli* (BL21 Códon Plus DE3) como será descrito abaixo.

3.3.6 Clonagem em vetor pTEX e pTEX-TAP-Tagging

A fim de superexpressar a sequência da *TcIP*, foi empregado o vetor pTEX (Kelly et al., 2000). A sequência correspondente à *TcIP* foi obtida através da digestão da construção pTEX-TAP-Tagging (pTTG)-*TcIP*, cuja obtenção se encontra descrita logo abaixo. Assim, o vetor pTEX ($\approx 2 \mu\text{g}$) e a construção pTTG-*TcIP* ($\approx 2 \mu\text{g}$) foram submetidos à digestão com as endonucleases XbaI e HindIII (Thermo®), seguindo as instruções do fabricante. As digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose, a partir da qual purificaram-se tanto o insertos a ser clonado quanto o vetor digerido. Por fim, foram realizadas as reações de ligação utilizando uma relação vetor:inserto de 1:3 (ou alternativamente 1:4 e 1:6), T4 DNA ligase 1 U/ μL (Thermo®) em tampão e condições recomendados pelo fabricante. As reações foram incubadas a 4 °C por até 16 h e posteriormente utilizadas para transformar as células de *E. coli* XL1-Blue.

Para obtenção de construções usando o vetor pTEX-TAP-Tagging (pTTG), os produtos correspondentes à *TcUH* e *TcIP*, resultantes de reações de PCR foram precipitados com acetato de sódio 3 M e usados para clonagem em vetor pTEX-TAP-Tagging; esse vetor foi construído a partir do vetor de expressão pTEX, de forma que se introduziu uma *tag* constituída de uma proteína A de *Staphylococcus aureus* e um peptídeo de ligação à calmodulina -CPB (*Calmodulin Binding Protein*), separados por um sítio de clivagem TEV (*Tobacco Etch Virus*) para caracterização de complexos proteicos, gentilmente cedido pelo Dr. Esteban Serra (Faculdade de Ciências Bioquímicas e Farmacêuticas, Instituto de Biologia Celular e Molecular, Departamento de Microbiologia, Universidade Nacional de Rosário, Argentina). As sequências da *TcUH* e *TcIP* foram amplificadas do genoma e precipitadas com acetato de sódio 3 M. Ambos, o vetor pTTG ($\approx 2 \mu\text{g}$) e as sequência de interesse ($\approx 1 \mu\text{g}$) foram submetidos à digestão com as endonucleases XbaI e HindIII (Thermo®), seguindo as instruções do fabricante. As digestões foram submetidas a eletroforese em gel de agarose 1%, a partir do qual purificaram-se tanto o insertos a serem clonados quanto o vetor digerido. Por fim, foram realizadas as reações de ligação utilizando uma relação vetor:inserto de 1:3 (ou alternativamente 1:4 e 1:6), T4 DNA ligase 1 U/ μL (Thermo®) em tampão e condições recomendados pelo fabricante. As reações foram incubadas a 4 °C por até 16 h e posteriormente utilizadas para transformar as células de *E. coli* XL1-Blue.

3.3.7 Clonagem dos genes *TcHAL* e *TcUH* em vetores de expressão para leveduras

O gene codificante para a enzima *TcHAL* foi clonado no vetor de expressão p426GPD, o qual possui o marcador de seleção URA3, através de digestão com as enzimas de restrição BamHI e XhoI e posterior ligação (conforme já descrito em itens anteriores). Para a clonagem do gene correspondente à *TcUH*, um novo vetor de expressão foi construído: foi utilizado o plasmídeo pYEP351, o qual apresenta o gene LEU2 como marcador de seleção. Neste plasmídeo foi inserido por digestão e ligação o cassete de expressão GPD proveniente do vetor p426GPD. Uma vez obtido o novo vetor de expressão (pYEP351GPD), o gene correspondente à *TcUH* foi clonado por digestão e ligação utilizando as enzimas SmaI e HindIII. A partir das duas construções obtidas (p426GPD-*TcHAL* e pYEP351GPD-*TcUH*) foi possível a clonagem e expressão de ambas as enzimas sob o controle do promotor GPD e a seleção de clones positivos pelo crescimento das leveduras em meios sem uracila nem leucina.

3.3.8 Extração de DNA plasmidial

Os DNAs plasmidiais dos clones obtidos nas transformações de células de *E. coli* competentes (DH5 α , XL1-Blue ou BL21 Códon Plus DE3), foram extraídos e purificados utilizando kit comercial para *Miniprep* (PureLink™ Quick Plasmid Miniprep; Invitrogen), mediante recomendações do fabricante.

Alternativamente, foi utilizado o método de lise alcalina (Birnboim, Doly, 1979) com algumas modificações. Sendo assim, as colônias selecionadas foram inoculadas em 5 mL de meio de cultura LB suplementado com o antibiótico apropriado e posteriormente incubadas a 37 °C por 16 h sob agitação constante. Em seguida, as células foram centrifugadas a 10.000 x g durante 2 min. O sedimento foi suspenso em 300 μ L de solução I (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM e 200 μ g/mL de RNase A). Em seguida, foram adicionados 300 μ L de solução II (NaOH mM, SDS 1%) e o material homogeneizado por inversão e incubado a temperatura ambiente por 5 min. Posteriormente, foram adicionados 300 μ L de solução III (acetato de potássio 3 M pH 4,8) e também feita a homogeneização por inversão. A seguir, a mistura foi centrifugada por 15 min a 12.000 x g a 4 °C e o DNA plasmidial contido no sobrenadante foi transferido para novo tubo e precipitado com 2 volumes de etanol 100%. O material foi centrifugado 10 min a 12.000 x g e submetido à lavagem com 1,0 mL de etanol 70% gelado. Após novamente centrifugado a 12.000 x g por 10 min, o sedimento foi seco e suspenso em

50 µL de água deionizada estéril ou tampão TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM pH 8,0).

Quando necessário, para obtenção de preparações plasmídicas em larga escala, foi utilizado kit comercial para *Maxiprep*, de acordo com as recomendações do fabricante (GenElute™ HP Plasmid Maxiprep Kit; Sigma -Aldrich).

A integridade do DNA obtido foi confirmada após eletroforese em gel de agarose 1% e coloração com brometo de etídio.

3.3.9 Preparação de bactérias quimiocompetentes

Para as clonagem das construções mencionadas foi utilizada a cepa de *E. coli* DH5α ou XL1-Blue. Para tornar as células competentes, foi utilizado o método que utiliza CaCl₂ (Sambrook, 1989). Inicialmente, a partir de uma colônia isolada foi preparada uma cultura em meio LB (5 mL) e crescida durante 16 h a 37 °C com agitação constante. Posteriormente, a cultura foi diluída (1:100) e crescida nas mesmas condições até atingir uma densidade ótica (DO)_{600 nm} entre 0,4 e 0,6. Nesse ponto, as células foram incubadas em gelo por 15 min e posteriormente coletadas por centrifugação a 3000 x g, por 5 min a 4 °C. O precipitado celular foi ressuscitado em uma solução de CaCl₂ 100 mM gelada e incubada por 30 min em gelo. Após esse tempo, as células foram centrifugadas e esse passo repetido mais uma vez. O precipitado obtido foi ressuscitado em 3 mL de CaCl₂ 100 mM acrescentando 140 µL de DMSO e incubado em gelo por 15 min. As células foram distribuídas em alíquotas de 100 µL em tubos de 1,5 mL estéreis, congeladas em etanol-gelo seco e armazenadas a -80 °C.

3.3.10 Transformação de bactérias competentes

As alíquotas de células competentes (100 µL), preparadas como descrito acima, foram incubadas com o DNA plasmidial ou produtos de ligações por 30 min. Em seguida as células foram submetidas a choque térmico (42 °C por 1 min e 15 s) e imediatamente incubadas em gelo por mais 2 min. Após a recuperação das células em meio LB por 1 h a 37 °C com agitação (200 rpm), as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o respectivo antibiótico e/ou IPTG (0,5 mM) e X-Gal (80 µg/mL) para seleção das colônias recombinantes.

3.3.11 Transformação de leveduras

A inserção do DNA plasmidial, utilizado na transformação de leveduras, foi realizada seguindo o descrito previamente (Gietz; Schiestl, 2007). A partir de uma colônia de levedura isolada em meio YPD-G418 sólido, esta foi transferida a 3 mL de meio líquido e incubada durante 16 h a 30 °C sob constante agitação (200 rpm). A densidade celular foi determinada pela $DO_{600\text{ nm}}$, onde 0,1 UA correspondem a 1×10^6 células/mL, sendo então transferidas $2,5 \times 10^8$ células a 50 mL de meio líquido 2X-YPD-G418 e incubadas a 30 °C até atingirem uma densidade celular de 2×10^7 células/mL (aprox. 4 h). Em paralelo, um estoque 2 mg/mL de esperma de salmão desnaturada (5 min a 95 °C) foi descongelada para ser usada como carregador do DNA (SScDNA). As células foram coletadas por centrifugação (5 min, $3.000 \times g$ a 4 °C), o precipitado foi lavado com 25 mL de H₂O mili-Q estéril e centrifugado novamente. Este passo foi repetido mais uma vez, sendo o precipitado ressuspense em 1 mL de H₂O mili-Q e transferido a um tubo de 1,5 mL estéril. As células foram distribuídas em alíquotas de 100 µL dependendo do número de transformações. As células foram centrifugadas (30 s, $13.000 \times g$) e a água foi removida com a micropipeta. Após esse período, as células foram ressuspensas em mix de transformação (240 µL 50% PEG 3500 v/v, 36 µL acetato de lítio 1 M, 50 µL SScDNA, 34 µL do DNA plasmidial dissolvido em H₂O mili-Q estéril), misturadas vigorosamente e incubadas por 40 min a 42 °C. Após esse tempo, as células foram centrifugadas (30 s, $13.000 \times g$) e o precipitado foi ressuspense em 100 µL de H₂O mili-Q estéril para serem plaqueadas nos correspondentes meios sólidos. Primeiramente, a cepa W303-1a foi transformada com o plasmídeo p426GPD, que restaura a auxotrofia para URA. A levedura resultante foi então transformada com a construção pYEP351GPD que restaura a auxotrofia para LEU. A cepa resultante W303-1a URA⁺ LEU⁺ foi aqui denominada controle ou linhagem ØØ. De forma análoga, paralelamente a cepa W303-1a (que não possui em seu genoma as enzimas envolvidas na via de degradação de His) foi usada na transformação das construções de interesse, contendo as enzimas TcHAL e TcUH. Primeiro foi usada a construção p426GPD-TcHAL para o primeiro evento de transformação, na qual foi restaurada a auxotrofia para URA e, posteriormente, após seleção, seguiu-se transformação dessa linhagem com a construção pYEP351GPD-TcUH, restaurando auxotrofia para LEU. A cepa resultante foi denominada HU, de acordo com as primeiras iniciais de cada enzima. Em todos os casos foi seguido o mesmo protocolo de transformação. As placas foram incubadas a 30 °C até a aparição dos transformantes.

3.3.12 Sequenciamento de DNA

As construções obtidas foram confirmadas por sequenciamento, onde as reações foram resolvidas num sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Brevemente, 100 ng de DNA plasmidial foram misturados com 0,75 µL do reagente BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems®), 1,25 µL do tampão Save Money (Tris-HCl 200 mM pH 9,0, MgCl₂ 5 mM), 5 pmols dos oligonucleotídeos universais (M13f/M13r/T7f/T7r), ou oligonucleotídeos específicos e H₂O mili-Q qsp 10 µL. As condições de amplificação foram: 1) desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguida de 30 ciclos de 2) desnaturação a 96 °C por 15 s, 3) anelamento a 50 °C por 15 s e 4) amplificação a 60 °C por 4 min. As amostras de DNA foram precipitadas pela adição de 90 µL de 66% isopropanol (v/v), homogeneizadas cuidadosamente, incubadas a temperatura ambiente por 15 min e centrifugadas (20 min, 15.300 x g). O sobrenadante foi descartado e 150 µL de 75% isopropanol (v/v) foram adicionados em cada amostra. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (10 min a 15.300 x g). O sobrenadante foi descartado, e o DNA precipitado foi seco a temperatura ambiente protegido da luz. O DNA foi armazenado a -20 °C para posterior uso. Após isso, as amostras foram levadas ao sequenciador automático ABI PRISM® 3100 Gene analyzer (Applied Biosystems, Inc. USA) operado através do programa ABI Prism 3100 Data collection v1.1. As sequências obtidas foram comparadas contra as bases de dados disponíveis para DNA de tripanossomatídeos mediante a busca por similaridade (BLASTn) (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O alinhamento e edição das sequências foi realizado mediante as ferramentas disponíveis do pacote DNASTar™ v4.0 para Windows.

3.4 Manipulação de proteínas

3.4.1 Preparo de extrato proteico de *T. cruzi*

A detecção da proteína TcIP, bem como, outros marcadores utilizados foi realizada em lisados celulares do parasita. Cada lisado foi preparado a partir de 2×10^7 parasitas (48 h), das diferentes formas de desenvolvimento, cultivadas como descrito acima. No caso das células CHO-K1, foram usadas 1×10^6 células. As células foram coletadas por centrifugação (10 min a 1.500 x g a 4 °C) e lavadas duas vezes com PBS. O precipitado foi ressuscitado em 1 volume de tampão de extração [20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM NaCl, 0,25 M sacarose, 1

mM EDTA, 0,1% Triton X-100 (v/v), 1 mM de Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), dissolvido em Etanol puro, 1 mM de Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride (TLCK) e 10 μ M de N-trans-epoxysuccinyl-L-leucine-4-guanidinobutylamide (E64)] . As células foram lisadas por sonicação através de quatro ciclos de 20% de potência e 30 s de duração com intervalos de 1 min em gelo entre cada um dos ciclos. O lisado foi clarificado por centrifugação (15 min, 16.000 x g a 4 °C). Uma alíquota do sobrenadante foi usado para a determinação da concentração proteica (Bradford, 1976).

3.4.2 Expressão e purificação da TcIP recombinante em *E. coli*

Para expressão heteróloga da TcIP, colônias de bactérias BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo pET28-TcIP foram inoculadas em 5 mL de meio LB contendo 5 μ g/mL de tetraciclina e 30 μ g/mL de canamicina e então crescidas por 16 h a 37 °C, sob agitação constante (200 rpm). A cultura foi diluída 1:100 e incubada a 37 °C, sob agitação (150 rpm) até atingir uma DO_{600 nm} entre 0,4-0,6. Em testes preliminares (volume de 25 mL), a expressão da proteína recombinante foi induzida com IPTG na concentração de 0,5 mM e as culturas foram incubadas a 20 °C ou 25 °C por 16 h, a 30 °C por 5 h e a 37 °C por 3 h. Culturas sem adição de IPTG também foram realizadas (controles não induzidos). As culturas induzidas e os controles foram sedimentados a 4000 x g por 15 min a 4 °C e o sedimento foi suspenso em tampão de ligação ou *binding buffer* (Tris-HCl 20 mM; 500 mM NaCl e 5 mM de imidazol pH 7,9), seguido da adição de tampão de amostra para proteínas (40 mM Tris-HCl pH 6.8, 1% SDS, 2,5% β -mercaptoetanol, 6% glicerol e 0,005% azul de bromofenol). Os extratos proteicos foram desnaturados por aquecimento a 95 °C por 5 min e submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) 10%. Com base nos resultados dos testes preliminares e com o objetivo de otimizar a expressão da proteína solúvel, padronizou-se a expressão da seguinte maneira: 1 L de cultura, induzida com 0,5 mM de IPTG, a 25 °C por 16 h sob agitação constante (150 rpm).

Uma vez determinada a condição ótima de expressão da TcIP solúvel, partimos para padronizar as condições de purificação da enzima recombinante utilizando o sistema de cromatografia de afinidade em resina de agarose Ni⁺²-NTA (QUIAGEN®, Alemanha). Assim, os procedimentos de purificação foram realizados a partir de extratos provenientes de culturas de bactérias crescidas em 1 L de LB a 25 °C por 16 h, induzidas com 0,5 mM de IPTG. A cultura pós-indução foi centrifugada (4000 rpm, 15 min, 4 °C) e o sedimento

homogeneizado em tampão de ligação ou *binding buffer*, suplementado com 1 mM de PMSF, 1 mM de TLCK, 10 μ M de E64 e lisozima 1 mg/mL. O resultante foi submetido a oito ciclos de sonicação a 20-30% de potência e 30 s de duração com intervalos de 30 s em gelo entre cada um dos ciclos. Após a sonicação, foi realizada a centrifugação a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C, separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel (precipitado). A fração solúvel foi utilizada para dar seguimento à purificação em coluna de resina de níquel (Ni²⁺-NTA agarose Qiagen®). Essa coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (sendo 1V = volume de resina empacotada na coluna) com tampão de ligação ou *binding buffer*. O sobrenadante foi então aplicado à coluna (por 3 vezes consecutivas), seguido de lavagem com 10 V de tampão de ligação e 6V de tampão de lavagem ou *wash buffer* (Tris-HCl 20 mM; 500 mM NaCl e 10 mM de imidazol pH 7,9) para a retirada de proteínas não ligantes à coluna. A proteína recombinante foi eluída com 6 V de tampão de eluição ou *elute buffer* (Tris-HCl 20 mM; 500 mM NaCl e 30 mM de imidazol pH 7,9). Durante o processo de purificação foram coletadas alíquotas para serem analisadas por SDS-PAGE 10%. A proteína recombinante presente nos eluatos foi quantificada pelo método de Bradford e utilizada nos ensaios de cinética enzimática e obtenção de soro policlonal em camundongos.

3.4.3 Eletroforese de proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE)

A separação de proteínas foi realizada mediante eletroforese em géis de poli(acrilamida (10%) em condições desnaturantes e redutoras (Sambrook, 1989). O gel de separação é composto de 375 mM de Tampão Tris-HCl pH 8,8, 0,1% de SDS v/v, 10% de solução acrilamida/bis-acrilamida (29:1) e água destilada qsp 10 mL, 5 μ L de TEMED (Tetra Metil Etileno Diamina, Sigma®) e 0,05% de persulfato de amônio (v/v). Após a polimerização, foi adicionado o gel de empilhamento (125 mM de tampão Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS v/v, 5% de solução acrilamida/bis-acrilamida p/v (29:1), água destilada qsp 5 mL, 5 μ L de TEMED e 0,05% de persulfato de amônio (v/v).

As amostras foram misturadas com tampão de amostra em relação 5:1, aquecidas a 95 °C por 5 min e aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida (25 mM de Tris base, 192 mM glicina 0,1% SDS p/v), aplicando uma voltagem constante de 120 V.

a. Coloração de géis de SDS-PAGE com coomassie: Os géis foram corados com solução de 0,1% coomassie blue R-250 p/v, 50% MetOH v/v e 10% de ácido acético v/v, por 10 min. A descoloração foi feita com água destilada ou solução de ácido acético 10%.

b. Coloração de géis de SDS-PAGE com prata: Em alguns casos os géis foram corados com prata. Para isso, as proteínas foram fixadas no gel com uma solução de 40% etanol, 10% ácido acético e 50% água Milli-Q durante 16 h a 4 °C. Após esse período, foram feitas 3 lavagens com água durante 7 min cada. As proteínas presentes no gel foram sensibilizadas com uma solução de 0,02% tiosulfato de sódio por 1 min, o gel foi lavado três vezes com água e incubado durante 20 min em uma solução de 0,1% nitrato de prata e 0,02% de formaldeído. O excesso de prata foi removido e a revelação das bandas foi feita com uma solução de 3% carbonato de sódio e 0,05% de formaldeído, até a coloração desejada.

3.4.4 *Obtenção do soro policlonal contra TcIP*

A proteína recombinante, obtida pelo procedimento de purificação descrito anteriormente, foi concentrada por ultrafiltração usando filtros Amicon-ultra/30.000 MWCO (Millipore), fazendo a troca de tampão de eluição para tampão fosfato de potássio, pH 7,0 de forma a se aproximar ao máximo das condições fisiológicas.

A produção de anticorpos policlonais, foi realizada mediante a imunização de quatro camundongos BALB/c machos, de aproximadamente cinco semanas de idade. A primeira imunização foi realizada com 100 µg de proteína emulsificada em adjuvante de Freund completo (Sigma®), sendo esta emulsificada através de dois ciclos de sonicação (30 s a 25% de potência, 30 s no gelo). Um animal adicional não foi inoculado e este foi utilizado como controle. Nos inóculos subsequentes manteve-se 100 µg de proteína, emulsificada em adjuvante de Freund Incompleto. As aplicações foram feitas com intervalos de 15-21 dias, via intraperitoneal. Após 2 imunizações, os animais foram anestesiados e o sangue coletado por sangria submandibular para a titulação do anticorpo. Uma vez não obtido o título desejado de anticorpos, foi feita uma terceira imunização, com 100 µg de proteína, emulsificada em adjuvante de Freund incompleto. Quatro dias, depois da última dose, os animais foram anestesiados pela administração de uma mistura de quetamina e xilazina (100 mg/kg e 10 mg/kg respectivamente), por via intraperitoneal, e uma amostra de sangue (0,1 mL) foi retirada mediante punção, para a titulação do antissoro. Uma vez determinado que o anti-soro

reagia positivamente contra a proteína de interesse, procedeu-se com a coleta total do sangue nos animais positivos (1 mL). O sangue foi coletado mediante punção no plexo radial e incubado durante 30 min a 37 °C, seguido de uma incubação adicional por 30 min a 4 °C. O soro total foi coletado por centrifugação (15 min, 1.000 x g a 4 °C) e armazenado a -20 °C com 25% glicerol (v/v) estéril e distribuído em alíquotas de 50 µL para posterior uso.

3.4.5 Western blotting

Extratos proteicos em gel SDS-PAGE foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Extra, GE Healthcare®) por uma diferença de potencial elétrico de 200 mA por 3 h, em tampão de transferência (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% Metanol). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por 5 min e, posteriormente, descorada em água bidestilada para a verificação da eficiência da transferência. A membrana foi incubada em solução de bloqueio (Tampão PBS, 0,01% Tween 20 e 5% leite em pó desnatado) por uma 1 h sob agitação suave a temperatura ambiente ou durante 16 h a 4°C. Em seguida, a membrana foi incubada com os seguintes anticorpos primários, de acordo com a abordagem de cada experimento: anti-*Tc*HAL (1:1.000), anti-*Tc*UH (1:1.000), anti-*Tc*IP (1:1.000), anti-*Tc*GAPDH (1:1.000), anti-*CBP_calmodulin binding protein* (1:10.000), durante 2 h a TA ou, eventualmente por 16 h a 4 °C sob agitação em solução de PBS, 0,1% Tween 20 e 3% leite em pó desnatado e, em seguida, a membrana foi lavada 3 x com PBS, 0,1% Tween 20 e incubada com anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado a HRP (*horseradish peroxidase*) (GE Healthcare®, UK) na diluição de 1:2.000 durante 1 h, seguido de nova lavagem como acima descrito. Para o anti-*CBP*, usamos o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado a HRP (ThermoFisher Scientific®), na diluição de 1:10.000 por 2 h. Após as lavagens, os ensaios foram revelados por quimioluminescência usando o reagente ECL (ECLTM Western blot Analysis System, GE Healthcare®) de acordo com o manual do fabricante. A exposição foi feita em filme Kodak e a revelação foi obtida na ausência de luz, em solução de revelação seguido de lavagem por 2 min em água e 2 min em solução de fixação. Os tempos de revelação foram padronizados para cada experimento.

3.4.6 Ensaios de permeabilização com digitonina

A permeabilização de formas epimastigotas de *T. cruzi* com digitonina foi realizada como descrito previamente (Marciano et al., 2008). Brevemente, formas epimastigotas foram centrifugadas (10 min a 1.500 x g a 4 °C), lavadas com PBS e resuspendidas em 1 mL de tampão TSB (25 mM Tris-HCl, pH 7,6, 0,25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF e 50 µL de mix de inibidores de protease da Sigma®) na presença de concentrações crescentes de digitonina. As células foram incubadas a 25 °C e centrifugadas por 2 min a 18.000 x g a 25 °C. O sobrenadante de cada amostra foi separada do *pellet*. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de tampão TSB e submetido a sonicação. Cada amostra foi analisada por *western blotting* com anti-soro anti-*TcIP* e com anti-soros para os marcadores citosólico (TAT), glicosomal (GAPDH) e mitocondrial (mASAT).

3.4.7 Imunofluorescência indireta

Parasitas (5×10^6 células/mL) das formas principais de *T. cruzi* foram lavadas por centrifugação 2 x com PBS e posteriormente fixadas às lâminas com paraformaldeído 2% a TA por 20 min. Após três lavagens com PBS os parasitas foram permeabilizados com Triton X-100 (0,1%) e as lâminas foram bloqueadas com PBS-BSA (0,1% de BSA) durante 30 min, e novamente lavadas como descrito acima. Posteriormente foram incubadas durante uma 1 h com o soro anti-*TcIP* (1:25) ou anti-*CBP* (1:100). Para o soro anti-*TcIP*, foi adicionado o soro anti-*TcMDHc* (malato desidrogenase, 1:20) como marcador para localização citosólica (gentilmente cedido pela Prof. Dra. Cristina Nowicki, UBA). Posteriormente, as lâminas foram incubadas por 30 min a TA com anticorpo secundário anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado a Alexa Fluor® 488 ou anti-imunoglobulina G de coelho conjugado à Alexa Fluor® 546 na diluição de 1:400. Depois de realizada mais duas lavagens rápidas foi adicionado às lâminas o corante de DNA total Hoechst 33258 (1:2.000), durante 1 min e as lâminas foram montadas com Fluomount G. As preparações foram analisadas em microscópio de fluorescência Axio Imager motorized M.2 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA). O software ImageJ para Windows foi utilizado para análises das imagens.

3.4.8 Abordagem experimental para detecção da atividade enzimática da *TcIP*

Considerando que o IPA é um composto que apresenta instabilidade química considerável e, conseqüentemente sua síntese química não é possível, bem como não se

encontra disponível comercialmente, as tentativas de determinação da atividade enzimática para IP foram feitas através de ensaios espectrofotométricos previamente descritos na literatura, nos quais o substrato IPA foi produzido *in vitro* e modificados de acordo com o descrito, tendo em conta dois principais métodos, detalhados a seguir.

1. Método descrito por Rao e Greenberg, 1961: esse método compreendeu dois ensaios enzimáticos em conjunto: **a)** para UH foi monitorada a diminuição na absorbância a 277 nm, correspondente ao consumo enzimático do urocanato (Mehler et al., 1953). A padronização da atividade da UH para *T. cruzi* foi feita conforme descrita (tese de Doutorado María Júlia Baríson) e a reação para TcUH é realizada por adição de 35 µM de urocanato, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7; enzima recombinante (10-50 µg) e água para completar um volume final de 1,5 mL. O branco de cada reação foi a mesma combinação de reagentes sem a adição da enzima. A absorbância foi monitorada durante 5-15 min a 28 °C, com agitação contínua; **b)** para imidazolona propionase foi medida a taxa de desaparecimento do IPA, absorção máxima a 264 nm, pH 7,2. O substrato foi gerado enzimaticamente a partir do urocanato e TcUH purificada, nas mesmas condições anteriormente descritas. A reação foi iniciada com urocanato e a diminuição na absorção a 264 nm seria registrada espectrofotometricamente. De acordo com o relatado na literatura, a reação da UH seria completa em cerca de 8 min e então nesse momento se adicionaria a IP, pressupondo que na reação teria sido formado IPA.
2. De acordo com a segunda abordagem, a atividade da IP seria determinada espectrofotometricamente a ponto final, mediante três reações acopladas. De forma análoga ao descrito no item acima, a reação para TcUH (reação A) foi empregada com o objetivo de se obter enzimaticamente o substrato IPA e, por ação da TcIP, formar o produto N-formimino-L-glutamato (FiGlu). A princípio, a reação da UH foi acompanhada no espectrofotômetro em tempo real para verificar sua atividade e, depois, foi processada em tubos *ependorf*, em diferentes tempos, incubados a 28° C. **A reação B (reação A + NaOH 2,5 M), teria por objetivo a hidrólise alcalina do produto FiGlu, formando L-glutamato e formamida, realizada a TA (Arakawa et al., 1964).** Foi acrescido HCl 2,5 M para equilibrar o pH e a reação foi interrompida pela adição de TCA 20%, seguida por centrifugação 5 min, 16.000 x g a 4 °C, para separação das proteínas e dos metabólitos solúveis oriundos das reações descritas; o conteúdo solúvel foi separado para outro tubo e teve seu pH equilibrado para não

afetar a reação subsequente da enzima GDH. Finalmente, a reação **C** consistiria então na detecção final do glutamato pela glutamato desidrogenase-GDH (*L-Glutamic Dehydrogenase from bovine liver, Sigma-Aldrich®*), monitorando-se espectrofotometricamente o aparecimento de NADH à 340 nm conforme indicações do fabricante e modificações detalhadas a seguir: 7 μM NAD^+ , 0,05 mM tampão Tris-HCl pH 8,6, 1U GDH; reação esta realizada a temperatura de 37°C, sob agitação. Através dessa reação, onde o Glu pode ser convertido a α -KG, pela transferência do grupo $-\text{NH}_2$ para H_2O pela GDH, seria possível detectar o Glu formado anteriormente e fazer uma estimativa quantitativa do mesmo, através de uma curva de calibração prévia, empregando concentrações conhecidas de Glu.

3.4.9 Decomposição espontânea do IPA

No decorrer da execução do projeto, notamos que a medição da atividade da *TcIP* não seria trivial. Tendo em vista a complexidade do problema, partimos para uma outra estratégia, onde objetivamos demonstrar se de fato o IPA formado pela reação da *TcUH* estava sendo convertido imediatamente pela *IP* no produto seguinte, *FiGlu* ou, ao invés disso, oxidado espontaneamente a outros intermediários.

Em um dos trabalhos intitulados como “Estudos na Decomposição do Ácido Urocânico”, Rao e Greenberg (Rao, Greenberg, 1961) mostraram que a redução do 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) é devido à oxidação não-enzimática simultânea do IPA. Para de fato demonstrar se o IPA estava passando por esse processo de decomposição espontânea, não enzimática, usamos o corante DCPIP comoceptor de elétrons, conforme descrito por Lamour e colaboradores (Lamour et al., 2005). O método foi baseado na reação enzimática estabelecida para *TcUH*: 35 μM de urocanato, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7; *UH* recombinante (os testes iniciais foram feitos com 5 e 10 μg), 0,26 mM de fenazina metossulfato (PMS), 56 μM de DCICP, pH 7,5 e água para completar um volume final de 1,5 mL; sob agitação constante, a 28 °C. A atividade foi monitorada em espectrofotômetro a 600 nm. Controles de reação sem urocanato ou sem *UH* foram realizados para aumentar a confiabilidade dos resultados.

Em um segundo momento, a fim de averiguar o efeito da *TcIP* na reação, elaboramos um experimento no qual nos valemos do método anteriormente descrito, modificado como segue: foi utilizada 50 ou 100 μg de *TcUH* (respeitando as condições ótimas para sua

atividade) e, simultaneamente, diferentes quantidades de *TcIP* recombinante (100 e 200 µg, respectivamente), na tentativa de impedir ou diminuir o consumo espontâneo do IPA e favorecer a reação enzimática da IP. A reação de redução do DCPIP foi acompanhada espectrofotometricamente, em tempo real.

3.4.10 Ensaios de Pull-down

A enzima *TcUH* recombinante foi expressa (500 mL de cultura, induzida com 0,5 mM de IPTG, durante 16 h a 25 °C), e então foi realizado o extrato celular, no qual o *pellet* foi obtido por centrifugação a 4.000 rpm por 15 min em TA. O *pellet* foi ressuscitado em 10 mL de tampão de ligação (Tris-HCl 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl e 5 mM de imidazol), suplementado com 1 mM de PMSF, 1 mM de TLCK, 10 µM de E-64 e lisozima 1 mg/mL, seguido de sonicação (8 ciclos de 30 s com intervalos de 30 s em gelo, 30-40%) e centrifugação a 12.000 rpm por 30 min a 4 °C. A fração solúvel foi separada e colocada em gelo. A matriz de Ni-NTA foi preparada com 2 mL de resina de níquel (Ni²⁺-NTA) (Quiagen®, Germantown, MD, EUA), seguida de 5 V (1 V= 2mL de resina) de tampão de ligação e então o lisado proteico foi passado 3 x pela coluna e descartado. Após essa etapa, a fração solúvel dos parasitas foi adicionada à matriz de Ni-NTA e seguiu-se incubação de 2-3 h a 4 °C, sob agitação suave (a matriz de Ni²⁺ imobilizada com a *TcUH* recombinante com o extrato – fonte de *TcIP*). Decorrido esse tempo, o extrato foi passado pela matriz e descartado. Foi realizada uma lavagem de 10 V com PBS e para eluir foi usado tampão de eluição (mesma composição do tampão de ligação, porém com 500 mM imidazol). As alíquotas resultantes da eluição foram coletadas e usadas para análise em gel de SDS seguidas de ensaios de *western blotting*, onde foram usados os anti-soros anti-*TcUH* e anti-*TcIP*.

Para obtenção do extrato (fração solúvel) dos parasitas: 50 mL de parasitas (formas epimastigota de *T. cruzi*) foram previamente crescido a 28 °C por 24 h até atingir fase exponencial de crescimento ($4-6 \times 10^7$ p/mL). Após contagem, os parasitas foram centrifugados por 10 min, 2.800 rpm, 4 °C e foram lavados 2 x com PBS (volume = 50 mL). O *pellet* foi ressuscitado em tampão de extrato proteico (Tris 50 mM; sacarose 0,25 M; NaCl 100 mM) na presença de 1% de coquetel contendo inibidores de proteases (AEBSF, E-64, aprotinina, pepstatina A, leupeptina e bestatina, Sigma®). As células foram submetidas à lise por sonicação através de quatro ciclos de 20 s com intervalos de descanso em gelo de 1

min entre cada um dos ciclos e depois centrifugadas a 12.000 rpm, por 30 min, a 4 °C. Foi separada a fração solúvel e esta foi armazenada em gelo até o momento de uso.

3.4.11 *Cromatografia de exclusão por massa molecular*

A fim de determinar o tamanho da proteína em seu estado nativo, assim como um método complementar para avaliar a presença do complexo UH-IP, foi usado o método de Cromatografia de Exclusão Molecular em uma coluna de Sephadex 200 (16 por 60 cm). Foram utilizadas nesse ensaio esferas de polissacarídeos ligados (dextran com epíclorohidrina) semipermeáveis, o que confere a separação da proteína, relacionada ao tempo em um fluxo de tampão, sendo que frações de 2 mL do tampão são coletadas. O princípio é que moléculas menores terão sua difusão dificultada pela passagem pelas esferas, enquanto que as maiores serão excluídas da coluna e eluídas no início do fluxo de tampão, separando-as, portanto, segundo seu tamanho. Para calibração, foi corrido um conjunto de proteínas com massa molecular conhecida e detectado em qual fração cada proteína era eluída. Foi utilizado o tampão KH_2PO_4 com 200 mM de KCl. Este sal reduz a possibilidade de formação de interações inespecíficas e a formação de aglomerados proteicos que incrementam erro ao resultado. Logo após, as frações coletadas foram avaliadas quanto a presença de proteínas pelo método de Bradford. As frações coletadas foram utilizadas em um ensaio de ELISA imobilizando as proteínas em placas de poliestireno como descrito com mais detalhes abaixo.

3.4.12 *Imunoensaio enzimático (ELISA)*

Foram utilizadas nesse ensaio as frações obtidas do ensaio anterior. Foi adicionado 100 μL de cada fração em uma placa de 96 poços de poliestireno e esta foi incubada por 24 h a 4 °C a fim de imobilizar a proteína *TcIP* e/ou *TcUH* na placa. Após esse período adicionou-se 100 μL da solução de bloqueio (PBS suplementado com leite desnatado 5%) por 1 h a 4 °C. Posteriormente foram incubados 100 μL por poço de anticorpo primário α -*TcUH* ou α -*TcIP*, sendo o primeiro obtido no trabalho de Doutorado da aluna Maria Julia Barison e o segundo obtido nesse trabalho, como já descrito, na diluição 1:1.000 para ambos, em solução de PBS suplementado com leite desnatado 1%; essa incubação ocorreu em 1 h a 4 °C sem agitação. Para revelar, foi usado TMB Chromogen Solution Invitrogen®, 100 μL por poço e

incubando-se por 30 min. A reação foi interrompida com H_2SO_4 0,16 M (50 μL por poço) e foram realizadas leituras a 450 nm e 595 nm.

3.5 Avaliação da interação UH-IP a partir da expressão de proteínas recombinantes

Foi usada cromatografia de afinidade com matriz de Ni^{2+} -NTA, utilizando as construções pET28-*TcIP* (obtida nessa trabalho) e pET24-*TcUH* (tese de Doutorado Maria Julia Barison), ambas clonadas com uma etiqueta de seis resíduos de His nos extremos N e C terminal, respectivamente. Em paralelo, ambas as sequências codificantes para *TcUH* e *TcIP* foram novamente clonadas em vetor de expressão pET-24a(+), de modo que desenhamos iniciadores específicos onde preservamos o códon de parada de cada sequência e, por consequência, geramos construções pET24-*TcUH* e pET24-*TcIP* sem a cauda de 6 x His. Assim, cerca de 250 mL de cultura bacteriana contendo a construção pET24-*TcUH* (expressando a cauda de 6 x His), bem como 500 mL de cultura contendo a construção pET24-*TcIP* (sem a cauda de 6 x His) foram recombinantemente expressas (usamos IPTG 0,5 mM como indutor da expressão protéica, durante 16 h a 25 °C) e, preparações de extratos foram obtidas para cada condição, conforme relatado no item 3.4.10. As frações solúveis desses extratos foram separadas e posteriormente, colocadas em contato e incubadas a 4 °C sob agitação por cerca de 2-3 h, tempo esse acertado para possibilitar a interação *TcUH-TcIP*. Após esse tempo o resultante da interação foi separado via cromatografia de afinidade, usando resina de Ni^{2+} -NTA. O processo deu-se, inicialmente, com adição do tampão de ligação ou *binding buffer* (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl e 5 mM de imidazol) à coluna, seguida da aplicação de tampões com concentrações crescentes de imidazol, de forma a estabelecer um gradiente de eluição dependente da concentração de imidazol utilizado. A escolha de empregar um gradiente de imidazol se baseou no fato de que não sabíamos ao certo quão forte seria essa interação entre as proteínas em estudo e, por isso, quisemos analisar o conteúdo resultante de cada passo da eluição. Para tanto, empregamos um intervalo entre 30 e 500 mM, baseado no critério de que a *TcUH* originalmente é eluída majoritariamente com 500 mM de imidazol; mais especificamente escolhemos 30, 150, 300 e 500 mM de imidazol, acrescidos de 20 mM Tris-HCl pH 7,9 e 500 mM NaCl para completar a composição do tampão. As frações eluídas foram resolvidas em gel de SDS 10% e coradas com AgNO_3 . As bandas foram cortadas e submetidas à análise por espectrometria de massas e posteriormente analisadas pelo programa *Mascot Search Results*.

O experimento recíproco foi realizado: cerca de 500 mL de cultura bacteriana contendo a construção pET28-*TcIP* (expressando a cauda de 6 x His), bem como 250 mL de cultura contendo a construção pET24-*TcUH* (sem a cauda de 6 x His) foram recombinantemente expressas, nas mesmas condições citadas. A fração solúvel desses extratos foram separadas e posteriormente colocadas em contato e incubadas a 4 °C sob agitação por cerca de 2-3 h. Após esse tempo o resultante da interação foi separado via cromatografia de afinidade (Ni^{2+} -NTA). Como já relatado, o processo deu-se, inicialmente, com adição do tampão de ligação ou *binding buffer* à coluna, seguida da aplicação de tampões com concentrações crescentes de imidazol, de forma a estabelecer um gradiente de eluição dependente da concentração de imidazol utilizado, sendo nesse caso um intervalo entre 15 e 150 mM, baseado no critério de que a *TcIP* originalmente é eluída com 30 mM de imidazol; mais especificamente foram escolhidas as seguintes concentrações: 15, 30, 90, 150 e 300 mM de imidazol, acrescidos de 20 mM Tris-HCl pH 7,9 e 500 mM NaCl para completar a composição do tampão. Igualmente, as eluições foram resolvidas em gel de SDS 10%, porém, nesse caso, usamos a técnica de *western blotting* para detecção das proteínas de interesse, usando para tanto, os antisoros anti-*TcUH* e anti-*TcIP*, cujas condições de utilização já foram descritas nesse trabalho.

3.5.1 Identificação de proteínas por Espectrometria de massas (MS)

Do gel de SDS citado anteriormente, cortamos bandas de interesse, cujos tamanhos corresponderiam às proteínas que buscávamos (*TcUH* ou *TcIP*) e armazenamos em 1% ácido acético a 4 °C até o momento da análise. A execução da técnica, bem como o processamento dos dados brutos foi realizada pelo pesquisador Leo Kei Iwai, tecnologista em Laboratório e Desenvolvimento III, do Laboratório Especial de Toxinologia Aplicada (LETA), Centro de Toxinas, Resposta-imune e Sinalização Celular (CeTICS), Instituto Butantan, São Paulo.

3.5.1.1 Digestão *in gel* com tripsina

As etapas de digestão *in gel* com tripsina foram realizadas segundo (Hanna et al., 2000), onde as bandas protéicas foram recortadas dos géis de SDS-poliacrilamida e colocadas em tubos de centrífuga de 1,5 mL, previamente lavados com etanol absoluto e secos em estufa.

Cada fragmento de gel foi incubado em solução de metanol 50% e ácido acético 5% durante 3 h para remoção do SDS. Após este período a solução foi removida e o gel foi desidratado com acetonitrila 100% durante 5 min por duas vezes; o gel então foi seco por centrifugação à vácuo (*Speed Vac* – RVC-218, Christ) por 3 min e após secagem foi adicionada uma solução de DTT (Ditiotreitol) 10 mM em bicarbonato de amônio 100 mM (30 μ L), para redução de pontes dissulfeto, por um período de 30 min. Após uma rápida centrifugação, a solução de DTT foi removida e foram adicionados 30 μ L de iodoacetamida 50 mM em bicarbonato de amônio 100 mM por 30 min para alquilação dos grupos SH das cadeias laterais de cisteína. Após uma rápida centrifugação, o sobrenadante foi removido e o gel foi lavado com solução de bicarbonato de amônio 100 mM e novamente desidratado com acetonitrila 100% por 5 min, reidratado com bicarbonato de amônio 100 mM por 10 min e desidratado com acetonitrila 100% por 5 min por duas vezes.

Após secagem do gel por centrifugação à vácuo por 3 min, foram adicionados 30 μ L de solução de tripsina 50 μ g/mL (*Sigma*) preparada em bicarbonato de amônio 50 mM gelado. A incubação foi realizada durante 30 min em banho de gelo. Depois desta etapa a solução de tripsina foi removida (sobrenadante) e, ao fragmento de gel, foram adicionados 20 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM e a incubação foi prolongada por 16 h a 37 °C.

Para extração de peptídeos foram adicionados 10 μ L de ácido fórmico 5% ao gel por 10 min a temperatura ambiente; após rápida centrifugação o sobrenadante foi transferido para outro tubo de 500 μ L, e ao fragmento de gel foram adicionados 12 μ L de ácido fórmico 5% em acetonitrila 50%. Após incubação por 10 min a TA, seguida de rápida centrifugação, o sobrenadante foi coletado e transferido para o mesmo tubo de 500 μ L no qual já fora coletado o sobrenadante anterior. As etapas de extração foram repetidas mais duas vezes e os sobrenadantes reunidos foram concentrados por centrifugação à vácuo. A extração de peptídeos foi feita utilizando-se ponteiros Zip Tip™ C-18 (*Millipore*). Para tanto, à amostra concentrada foram adicionados 5 μ L de TFA 0,1% e a ponteira foi lavada lentamente com acetonitrila 100% por 2 vezes. A seguir, a resina contida na ponteira foi equilibrada lentamente com TFA 0,1% por sucessivas lavagens. Para adsorver os peptídeos à resina, a amostra foi introduzida por cuidadosas etapas de aspiração e descarte com a pipeta (7 a 10 vezes). Para eluição dos peptídeos da resina, esta foi lavada lentamente com TFA 0,1% e acetonitrila 50% e o eluato foi coletado em outro tubo.

3.5.1.2 Análise Proteômica por Espectrometria de Massas (MS)

Cinco microlitros da amostra obtida pela digestão *in gel* foram analisadas no espectrômetro de massas **LTQ Orbitrap Velos** (*Thermo Scientific*, Estados Unidos) acoplado ao cromatógrafo líquido de nano-fluxo **EASY-nLC** (*Thermo Scientific*, Estados Unidos). Os peptídeos provenientes do gel foram separados por um programa de gradiente total de 35 min onde a separação foi feita no gradiente de 5 a 95% do solvente B (90% acetonitrila em 0,1% de ácido fórmico) em 15 min a um fluxo de 200 nL/min usando uma pré coluna empacotada com 5 cm de polímeros de C18 de 10 µm (*Jupiter*, Phenomenex) em um capilar de dimensões ID 100 µm x OD 360 µm e uma coluna analítica de ponta com frit empacotada com 15 cm de polímeros C18 de 5 µm (*Aqua*, Phenomenex) em um capilar de dimensões ID 75 µm x OD 360 µm.

O espectrômetro de massas foi operado em modo de aquisição dependente de dados (DDA, do inglês: *Data Dependent Acquisition*), onde os 5 íons mais intensos de cada amostra foram selecionados para a fragmentação no *ion-trap* linear utilizando a dissociação por fragmentação por colisão induzida por dissociação (CID) em MS/MS. A aquisição dos dados foi controlada pelo programa de computador **Xcalibur** 1.4 (*Thermo Scientific*). De modo geral, as condições de análise foram: voltagem no capilar do nano-electrospray de 2,3 kV, temperatura da fonte a 250 °C, tempo de injeção no *ion-trap* ajustado a 100 ms e no FT-MS em 1000 ms com uma resolução de 60.000 em m/z 300-1800. O tempo de exclusão dinâmica foi ajustado para 70 s. Os arquivos de dados do espectrômetro de massas (.raw) foram convertidos para .mgf usando o software **MS Convert** (v.3.0.4445, *ProteoWizard*, *SourceForge*) e analisados no software **Mascot** (v.2.4, *Matrix Science Ltda.*, Boston, MA, USA). As proteínas foram identificadas através da pesquisa de dados MS e MS/MS contra o banco de dados *T. cruzi* baixados do Uniprot.

3.6 Purificação do complexo pela técnica de *Tandem Affinity Purification* (TAP)-Tagging

3.6.1 Obtenção e caracterização de parasitas pTEX-TAP-Tagging (pTTG)-TcUH e pTTG-TcIP

A transfecção em *T. cruzi* foi realizada com parasitas em fase exponencial de crescimento. As células (4×10^7 parasitas por transformação) foram coletadas por centrifugação (10 min, 1.350 x g) e lavadas duas vezes com PBS estéril, seguindo as mesmas

condições de centrifugação. O sedimento resultante foi ressuspensão em 400 µL de solução de eletroporação (140 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 6,5, 0,74 mM Na₂HPO₄) e transferido para uma cubeta de eletroporação Gene Pulser® Cuvette de 0,2 cm (BioRad Systems®, USA), previamente incubada em gelo. O DNA foi preparado a partir da construção pTTG-*TcUH* e pTTG-*TcIP*, cujas condições de clonagem foram previamente detalhadas. Para a incubação das células com o DNA de cada construção, primeiramente foram separados 100 µg de DNA para serem precipitados com 3 M acetato de sódio pH 5,2 (1/10 do vol de DNA) e EtOH absoluto (2,5 vol de DNA) e o reultante foi centrifugado (10 min, 16.000 x g a 4 °C) e o precipitado lavado com EtOH puro até completar o volume total do tubo (1,5 mL). O DNA foi centrifugado novamente (10 min, 16.000 x g a 4 °C), o precipitado foi seco (em esterilidade) e ressuspensão em 15 µL de H₂O mili-Q estéril. Após esse procedimento, o DNA foi adicionado à suspensão celular e a mistura foi incubada no gelo (10 min). A inserção do DNA no parasita foi realizada mediante dois pulsos de eletroporação (450 V e 500 µF), e as amostras incubadaspor mais 10 min no gelo. As células foram transferidas a garrafas de 25 cm² contendo 5 mL de meio LIT 20% SFB e incubadas a 28 °C para a recuperação dos transformantes. A seleção dos transformantes foi iniciada após 48 h da eletroporação, pela adição de 250 µg/mL G418. Após 24 h, a concentração de G418 foi aumentada a 500 µg/mL. Como grupo controle da transformação foi utilizado uma cultura transformada com água, ao invés de DNA. A progressão da cultura foi acompanhada por contagens sucessivas ao microscópio utilizando câmara de Neubauer. Transcorridos aproximadamente 15 dias após a transformação, as culturas foram diluídas (1:1) em meio LIT fresco, mantendo a concentração de G418 em 500 µg/mL e quando completo cerca de 30 dias após a eletroporação, foi feito um repique adicional em meio LIT + 500 µg/mL G418, para completar a seleção dos transformantes. A seleção foi finalizada dias depois, quando as células do controle estavam todas mortas, enquanto que os transformantes apresentavam células viáveis e a densidade celular aumentou. A partir de então, as células transformadas foram mantidas em meio LIT + 200 µg/mL G418. A presença do epissomo foi verificada mediante a técnica de *western blotting*, onde foram usados os anti-soros contra *TcUH* e *TcIP*, bem como o anticorpo anti-*CBP*. Adicionalmente, foi realizado um ensaio de imunofluorescência indireta, onde empregamos o anticorpo anti-*CBP*, a fim de verificar quão homogênea estava a população transformada, sendo esse também um dado importante para finalizar o processo de seleção dos parasitas.

3.6.2 Preparação de extratos de epimastigotas de *T. cruzi* das linhagens mutantes pTTG-TcUH e pTTG-TcIP.

A preparação dos extratos proteicos para purificação das proteínas contendo TAP-Tagging foi realizada conforme os protocolos descritos por (Schimanski et al., 2005 e Dallagiovanna et al., 2008), seguidas de modificações. Segue a descrição do método empregado nesse trabalho: parasitas cultivados em 600 mL de cultura (fase exponencial de crescimento- $4-6 \times 10^7$ parasitas/mL) foram centrifugados por 10 min a $850 \times g$, 4°C . O sobrenadante foi descartado e os parasitas lavados 2 x com 40 mL de tampão de lavagem gelado (20 mM Tris-HCl [pH 7,4], 100 mM NaCl, 3 mM MgCl_2 , 1 mM EDTA), ressuspendendo o sedimento no vórtex e centrifugando por 10 min a $850 \times g$, 4°C . De acordo com o número de células e obedecendo a relação de 1 mL de tampão de lise para 1×10^9 parasitas, o sedimento foi ressuspendido e incubado com tampão de lise gelado (150 mM sacarose; 20 mM ácido glutâmico; 20 mM HEPES-KOH [pH 7,7]; 3 mM MgCl_2 , 150 mM KCl, 1 mM DTT, 100 mM PMSF, *Pierce Protease Inhibitor Mini Tablets ThermoScientific*, segundo as recomendações do fabricante e 0,2% NP-40), e incubado no gelo por 60 min, para completa ruptura das células.

3.6.3 Condições de Purificação do complexo UH-IP

Os parasitas foram centrifugados por 30 min, $16.000 \times g$, 4°C e o sobrenadante transferido para outro tubo previamente colocado em gelo. Foram separados 160 μL amostra + 40 μL tampão de amostra para SDS 5 x (*input*). Paralelamente, a matriz de IgG (*IgG Sepharose 6 Fast Flow*, GE Healthcare Life Sciences) foi preparada, usando 100 μL de suspensão das *beads*. A matriz foi equilibrada com 50 mL de tampão PA-150 (150 mM KCl; 20 mM Tris-HCl [pH 7,7]; 3 mM MgCl_2 ; 1 mM DTT; 0,1% Tween 20), sendo realizadas 4 lavagens de 12,5 mL cada, usando o tampão citado. O preparo da matriz e a incubação do extrato foram realizados em agitação-*in bath* e à matriz de IgG, foi adicionado o extrato e este conteúdo deixado sob rotação, a baixa velocidade, 4°C , durante 16 h. O *flow-through* (FT) ou fração solúvel do extrato resultante da interação com a matriz de IgG durante o período citado, não associado à matriz de IgG, foi coletado e separado uma amostra para WB – 160 μL amostra + 40 μL tampão de amostra para SDS 5 x. Adicionou-se aproximadamente 10 mL de PA-150 à matriz, deixando sob baixa rotação por 10 min/ 4°C para lavá-la e, em seguida, a solução foi descartada, porém nesse ponto mais uma alíquota foi coletada para WB.

Ainda nesse sentido, 15 mL de PA-150 foram passados pela matriz para completar a lavagem. Seguimos adicionando 2 mL de tampão TEV (150 mM KCl; 20 mM Tris-HCl [pH 7,7]; 3 mM MgCl₂; 0,5 mM EDTA [pH 8,0]; 1 mM DTT; 0,1% Tween 20) e, nesse ponto, duas diferentes abordagens foram adotadas: 1. coletamos uma fração de cerca de 200 µL correspondente à proteína isca fusionada à *tag* de proteína A e calmodulina juntamente com as proteínas associadas; essa fração seria posteriormente desnaturada e resolvida em gel de SDS 10% seguida por coloração com prata, 2. o volume resultante dessa fração foi tratado com 100 U TEV protease (AcTev, Invitrogen®), deixando sob baixa rotação 16 h/ 4 °C, para liberação do possível complexo. O eluato foi diluído com 6,5 mL de uma lavagem das esferas de IgG Sepharose com tampão TEV; tal eluato foi enviado para análise por espectrometria de massas.

3.6.4 Identificação das proteínas purificadas pela técnica de TAP-Tagging por Espectrometria de massas (MS)

Conforme descrito no item anterior parte da fração advinda da primeira etapa de purificação, correspondente à proteína isca fusionada à *tag* de proteína A e calmodulina juntamente com as proteínas associadas foi coletada e posteriormente desnaturada e resolvida em gel de SDS 10% seguida por coloração com prata. Desse gel, cortamos bandas de interesse, cujos tamanhos corresponderiam às proteínas que buscávamos (*TcUH* quando utilizamos pTTG-*TcIP* como isca ou *TcIP* quando usamos pTTG-*TcUH* como isca) e armazenamos em 1% ácido acético à 4 °C até o momento da análise. Da fração restante, tratada com a protease TEV, também a coletamos em separado. Ambas as abordagens, seja a análise das bandas cortadas pós tinção com AgNO₃ ou o eluato proveniente da incubação com TEV foram enviados para análise por espectrometria de massas. A execução da técnica, bem como o processamento dos dados brutos foi realizada conforme relatado no item 3.5.1.

3.7 Demonstração do “curto-circuito” na via de degradação de His

3.7.1 Obtenção e caracterização de leveduras da linhagem HU

A cepa W303-1A tem como características: (a) auxotrofia para uracila, leucina, triptofano e histidina, bem como (b) ausência, em seu genoma, de sequências codificantes para as enzimas da via de degradação de His. Assim, valendo-se dessas propriedades,

leveduras da cepa W303-1A, transformadas com as construções p426GPD-*Tc*HAL e pYEP351GPD-*Tc*UH foram geradas de acordo com o descrito, resultando na linhagem HU. Igualmente foi gerada a cepa controle, transformada com os dois plasmídeos vazios. Após seleção dos transformantes, partimos para etapa de validação da presença dessas proteínas nas linhagens obtidas (usando a técnica de *western-blotting* já descrita), bem como a comprovação da atividade enzimática das mesmas.

Para ambas as abordagens foram necessárias o preparo de extratos proteicos. Dessa forma, culturas de leveduras da linhagem controle e HU (volume inicial de 25 – 50 mL) foram crescidas em meio sintético (URA⁻ LEU⁻) até que se atingisse uma DO_{600nm} de aproximadamente 1,0. Feito isso, as mesmas foram centrifugadas em tubos falcon durante 5 min a 3.000 x g e o sobrenadante foi descartado, seguindo-se duas lavagens do precipitado com dH₂O (v/v de cultura inicial), respeitando as mesmas condições de centrifugação. O sedimento foi ressuspensão em tampão de ruptura [50 mM Tris/HCl pH 8, 0,3 M Sorbitol, 0,1 mM MgCl₂, inibidores de proteases (segundo indicações do fabricante), 1 mM PMSF (preparado fresco), 1 mM DTT] seguindo uma relação de cerca de 2 x o volume do precipitado. A partir do passo seguinte, as amostras foram mantidas a 4° C. Foi acrescentado o correspondente a 1 volume de pérolas de vidro 0,5 mm e então a amostra foi agitada em vórtex durante 1 min, seguido de descanso em gelo por 1 min, de forma que esse ciclo foi repetido no mínimo 5 x para ruptura das células. Finalmente o conteúdo foi centrifugado por 20.000 x g durante 15 min e o sobrenadante foi removido com cuidado e separado em outro tubo previamente colocado em gelo. O conteúdo proteico foi quantificado pelo método de Bradford e usado para realização de ensaios de *western-blotting* e determinação da atividade enzimática, como segue.

3.7.2 Atividade HAL e UH

As medições de atividade foram feitas através de ensaios espectrofotométricos em tempo real, monitorando o aumento (para *Tc*HAL) ou a diminuição (para *Tc*UH) na absorvância a 277 nm, correspondentes à formação ou consumo do urocanato, respectivamente (Mehler et al., 1953). A reação para *Tc*HAL contém: His, na concentração indicada em cada caso, 100 mM de tampão Tris-HCl pH 9; 0,1 mM de MnCl₂; 1,7 mM de GSH reduzido; e água para completar um volume final de 1,5 mL. A reação foi iniciada pela adição de extratos de leveduras contendo a *Tc*HAL (50-100 µg). A reação para *Tc*UH contém: urocanato, na

concentração indicada em cada caso, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7; extratos de leveduras contendo a TcUH (50-100 µg) e água para completar um volume final de 1,5 mL. O branco de cada reação foi a mesma combinação de reagentes sem a adição da enzima. A absorbância foi monitorada durante 5-10 min a 28 °C, com agitação contínua. A velocidade inicial da reação (V_0) foi calculada na região de linearidade, utilizando o coeficiente de extinção molar para o urocanato ($CEM_{277nm} = 1,88 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Os valores obtidos a partir das velocidades iniciais (V_0) medidas foram transformados em unidades de produto formado ou substrato consumido por unidade de tempo ($\mu\text{mol}/\text{min}$) e graficados em função da concentração de substrato, His (0-5 mM) ou urocanato (0-50 μM). As constantes cinéticas K_m e V_{max} específica foram determinadas a partir do gráfico resultante, ajustado à função hiperbólica que descreve o modelo de Michaelis-Menten, no programa de análise de dados GraphPad Prism 5.

3.7.3 Captura de CO_2 emitido pela oxidação de His em leveduras da linhagem HU

Culturas de leveduras em fase exponencial de crescimento foram lavadas duas vezes com H_2O , ressuspensos em H_2O , contadas e incubadas com His 10 mM marcada com 0,1 μCi de L- ^{14}C (U)-His durante diferentes tempos: tempo zero, uma e quatro horas a 28 °C. Para “capturar” o CO_2 liberado, foi utilizado papel Whatman (tamanho aproximado: 2 cm x 2 cm) umedecido com KOH 2M como “trap” de CO_2 , e colocado na parte superior de um tubo *ependorf* de 1,5 mL onde foram incubadas as leveduras (25×10^6 células). A formação de $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$ no papel foi medida no contador de cintilação.

3.8 Superexpressão da TcIP

3.8.1 Obtenção e caracterização do superexpressor TcIP

Com o intuito de avaliar se a inserção de uma cópia ectópica da ORF TcIP, no parasita, resultaria em um fenótipo que estivesse correlacionado à bioenergética, infectividade, resistência à estresses, dentre outros, partimos para a geração de mutantes superexpressores para esta enzima. Para tornar possível a construção do superexpressor para TcIP, fizemos uso do plasmídeo pTEX, conforme descrito por Kelly (Kelly, 1992). Uma vez obtida a construção, formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas (ver 3.6.1) e a

população mutante foi submetida à seleção utilizando geneticina (G418); a pressão seletiva inicial se deu com 500 µg/mL e, após seleção, os parasitas foram mantidos em LIT 10% SFB G418 + 200 µg/mL. Como mencionado, o G418 pode ser empregado como marcador de seleção uma vez que o vetor pTEX reverte o fenômeno de sensibilidade do parasita selvagem (*wild type* ou *wt*) ao antibiótico.

Partimos então para validação da superexpressão da *TcIP*. As comparações foram realizadas entre parasitas do tipo selvagem, parasitas controle transfectados com o vetor vazio (denominados pTEX_v ou pTEX_∅) e aqueles que apresentavam uma cópia ectópica da ORF *TcIP* (pTEX-*TcIP*). Para constatar se a presença do epissomo era capaz de alterar os níveis de expressão proteica da *TcIP*, em detrimento aos parasitas selvagens e a linhagem pTEX_∅, foram realizados ensaios de *western blotting*, bem como ensaios de ELISA (item 3.4.12), ambos usando o soro anti-*TcIP* e o normalizador anti-*TcGAPDH* a partir de extratos de formas epimastigotas das três linhagens mencionadas. Além disso, a para confirmação do fenótipo, foi mensurada a intensidade de fluorescência, através da técnica de imunofluorescência indireta, em parasitas imunomarcados com o soro anti-*TcIP*, seguido de incubação com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à sonda Alexa Fluor-488, no qual o DNA foi marcado com a sonda *Hoechst* 33258.

3.8.2 Curvas de crescimento de epimastigotas

Para descartar um possível efeito da superexpressão no crescimento das formas epimastigotas, uma curva de proliferação foi realizada. Foram utilizadas formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento ($4-6 \times 10^7$ células/mL). As células ($2,5 \times 10^6$ células) foram transferidas para placas de cultura de 96 poços (200 µL/poço) e mantidas na estufa a 28 °C. A proliferação celular foi estimada por leitura da absorbância da densidade ótica (DO) em λ 620 nm durante 8-10 dias. A absorbância foi convertida em valores de densidade celular (células/mL) usando uma equação de regressão linear obtida previamente a partir de uma curva de calibração na qual se empregou concentrações conhecidas de parasitas, realizadas sob as mesmas condições. Alternativamente, a evolução do crescimento foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer. Os experimentos se deram em quadruplicata técnica, sendo os resultados apresentados correspondentes a três experimentos independentes.

3.8.3 Ensaio de viabilidade celular com AlamarBlue® (Resazurina)

A fim de avaliar o perfil dos parasitas superexpressores para *TcIP* frente ao estresse nutricional, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento, crescidas em meio LIT, foram lavadas 2 x com PBS (2.800 rpm, 10 min, a 4 °C) e transferidas para meio PBS e incubadas por diferentes tempos (2 h, 24 h e 48 h), a 28 °C, onde tiveram a viabilidade avaliada pelo método de redução irreversível da resazurina à resorufina (*Alamar Blue Assay*, Alamar Biosciences, Sacramento, CA, USA). A resazurina é um corante azul efetivamente reduzido na mitocôndria, o que o torna útil para estudar a atividade metabólica mitocondrial. Assim, parasitas advindos das culturas *wt*, pTEX \emptyset e pTEX-*TcIP* foram distribuídos em placas (100 μ L por poço), em triplicata e acrescidos 10 μ L do corante resazurina (1,25 μ g/ μ L). Para cada condição, os parasitas foram contados e, após decorridas 2 h de reação (protegida da luz) foi mensurada a emissão de fluorescência (excitação: λ 530 nm e emissão: λ 590 nm), de modo que pudéssemos estimar a viabilidade de acordo com a fluorescência emitida (mensurada em Leitor de Microplacas Spectra Max[®]i3, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA), normalizando pelo número de células. As primeiras “2 h de incubação” são uma referência ao que chamaríamos de tempo zero, porém, como é necessária uma incubação de 2 h com o corante resazurina, aqui denominados esse ponto inicial, quando os parasitas são retirados do meio LIT, como o tempo de 2 h.

3.8.4 Síntese de ATP utilizando His como substrato

A fim de realizar uma análise comparativa entre as linhagens *wt*, pTEX \emptyset e pTEX-*TcIP* no que diz respeito a sua capacidade de produzir ATP utilizando His como única fonte energética, parasitas (aproximadamente 5×10^7 células/mL) foram estressados nutricionalmente em PBS durante 30 h a 28 °C e recuperados durante 1 h a 28 °C na presença de: PBS (controle negativo) ou 5 mM His. Após esse tempo, as células foram lisadas e incubadas com o kit comercial adenosine 5'-triphosphate (ATP) assay mix (Sigma[®]). A enzima luciferase tem como substrato a luciferina e a sua atividade enzimática está acoplada à emissão de fótons de luz. Essa reação é, necessariamente, acoplada à hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e, portanto, pode-se utilizar como um método indireto de medição de ATP no meio. A detecção da emissão de luz (λ 570 nm) foi realizada em luminômetro de placa (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os valores de ATP nas amostras foram extrapolados a partir de uma curva de calibração com quantidades conhecidas de ATP (Sigma[®]).

3.8.5 Consumo de oxigênio utilizando His como substrato

Para avaliar as taxas de respiração a partir da degradação de His, epimastigotas (aproximadamente 5×10^7 células/mL) foram estressados nutricionalmente por 16 h em PBS a 28 °C e recuperados durante 30 min a 28 °C na presença de 5 mM His. Os parasitas foram adicionados ao tampão de respiração (MRC: 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM MgCl₂, 2 mM K₂HPO₄). Posteriormente foram adicionados de forma sequencial, oligomicina A (5 µg/mL) e FCCP (0,5 µM). As taxas de consumo de oxigênio foram medidas utilizando células íntegras no oxígrafo de alta resolução (OROBOROS, Oxygraph-2k, Innsbruck, AU).

3.8.6 Análise de diferenças na metacicloênese em parasitas pTEX-TcIP

Os ensaios de metacicloênese foram realizados conforme descrito no item 3.2.3.1. As formas tripomastigotas metacíclicas no sobrenadante das culturas foram contadas diariamente em câmara de Neubauer e a porcentagem de parasitas no estágio metacíclico em relação ao número total de parasitas (epimastigotas + formas metacíclicas) foi avaliado. De forma a complementar a caracterização do fenótipo de tais parasitas ao longo do processo de diferenciação, foram realizados ensaios de imunofluorescência indireta (item 3.4.7) e de viabilidade celular pelo método da resazurina (item 3.8.3) ao longo dos dias 4, 5 e 6 após o início do processo de metacicloênese.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS

4.1 Identificação do gene putativo para IP no genoma de *T. cruzi*

Conforme apresentado na introdução deste trabalho, His pode ser incorporada e metabolizada pelo parasita e as duas primeiras enzimas da via de degradação desse aminoácido (**TcHAL** e **TcUH**) foram anteriormente caracterizadas, no que diz respeito a suas características moleculares e bioquímicas. Sendo assim, com o objetivo de dar continuidade aos estudos das enzimas envolvidas nessa via metabólica, foi do nosso interesse identificar e caracterizar a terceira enzima da via, a imidazolona propionase ou **TcIP**. Assim, iniciamos uma busca sistemática nos bancos de dados do genoma de *T. cruzi* para genes putativos codificantes para **TcIP**.

4.1.1 Análises *in silico*

A sequência do gene putativo da *TcIP* foi identificada no banco de dados específico para tripanossomatídeos, **TriTrypDB**, onde obtivemos duas sequências com os seguintes nomes sistemáticos: Tc00.1047053509137.30 (CL Brener Esmeraldo-like) e Tc00.1047053508741.140 (CL Brener Não-Esmeraldo-like), sendo a cepa CL Brener, clone 14, o modelo de estudo adotado pelo nosso laboratório. As sequências reportadas diferem em alguns pares de bases, porém, no que diz respeito ao conteúdo de aminoácidos para *TcIP* (430 aa), a identidade predita entre as cepas CL Esmeraldo-like e Não-Esmeraldo-like é de 100%. Ainda nesse sentido, foi encontrada uma sequência relacionada à *TcIP* em uma única cepa de *T. cruzi* diferente de CL Brener: *T. cruzi marinkellei strain B7* (Tc_MARK_10040), mostrando identidade de 97% em relação à sequência de CL. Em relação às sequências homólogas em outros tripanossomatídeos, apenas três espécies apresentaram sequências relacionadas à *TcIP*: *Trypanosoma Rangeli* (TRSC58_05082), *Trypanosoma grayi* (DQ04_14001000) e *Trypanosoma theileri* (gene bank: ORC77178.1). Quando comparada à cepa CL de *T. cruzi*, as porcentagens de identidade são as seguintes, respeitando a ordem acima relatada, 89%, 85% e 77%, respectivamente. Um alinhamento comparando as sequências entre as diferentes cepas de *T. cruzi* (incluindo uma comparação entre CL Brener Esmeraldo-like x CL Brener Não-Esmeraldo-like), bem como as demais espécies de tripanossomatídeos nas quais foi identificada é mostrado na **Figura 5**.

A sequência para **TcIP** foi ainda comparada com as sequências homólogas presentes em diferentes organismos modelos: *Homo sapiens* [(Q96NU7 (HUTI_HUMAN)], *Mus*

musculus [Q9DBA8 (HUTI_MOUSE)], *Danio rerio* [Q7SXX5 (HUTI_DANRE)], *Xenopus laevis* [Q561L6 (HUTI_XENLA)], e *Pseudomonas putida* [Q88CZ9 (HUTI_PSEPK)], através do programa Clustal Omega. As sequências encontradas nas buscas foram identificadas como imidazolona propionase ou amido hidrolase e o código informado entre colchetes corresponde ao código de acesso dessas sequências no **UniProt**. Como parte da análise dessa busca, constatou-se que a sequência de *T. cruzi* possui uma porcentagem de identidade de 51% com a correspondente em *Homo sapiens* (**Figura 6**).

Ademais, para predição de domínios ou motivos de ligação da enzima foi usado o banco de dados **Pfam**, resultando na detecção do domínio amido-hidrolase, que faz parte de uma grande superfamília de enzimas hidrolases metal dependente [Família: *Amidohydro_1* (**PF01979**)]; o domínio tem extensão de 344 aminoácidos e está localizado entre os resíduos 81 e 324 da sequência (**Figura 7**). A predição para a presença de um peptídeo sinal foi feita usando **Phobios** e nenhuma evidência do mesmo foi encontrada; além disso uma predição de localização “não citoplasmática” foi gerada pelo preditor. Finalmente, a predição de domínios transmembrana, utilizando o servidor **TMHMM** versão 2.0, foi realizada. O resultado dessa análise mostrou a ausência desse tipo de estrutura segundo os algoritmos utilizados por esse programa.

A composição de aminoácidos da *TcIP* foi analisada pela ferramenta **ProtParam** (ExPASy). Do total de 430 aa, valina, alanina e leucina são os mais abundantes (30,3%). A soma total de resíduos carregados negativamente (glutamato e aspartato) e positivamente (arginina e lisina) foi de 53% e 41%, respectivamente. O ponto isoelétrico predito foi de 5,75 com uma massa molecular predita de 46.733,47 Da.

Em relação às análises feitas para sequência da *TcUH*, seguiu-se conforme já descrito (tese de Doutorado María Júlia Baríson); a sequência usada como objeto de estudo desse trabalho é a TcCLB.504045.110, de acordo com o **NCBI**.

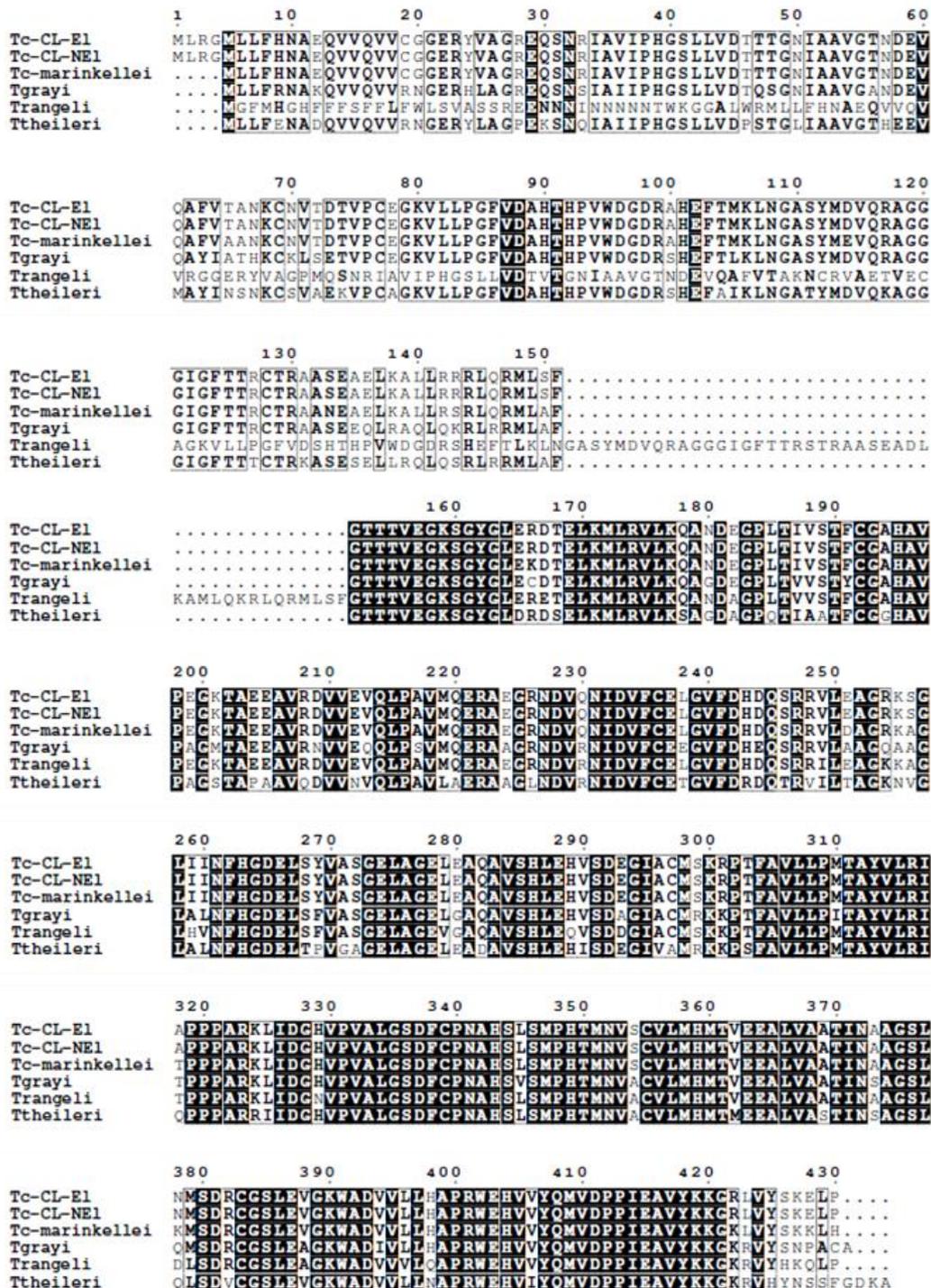


Figura 5 - Alinhamento das seqüências de aminoácidos da IP em tripanossomatídeos. Em preto denotam-se os resíduos que são idênticos e os resíduos conservados estão em caixa aberta. No alinhamento estão presentes IPs de *T. cruzi* CL Brener Esmeraldo-like (Tc-CL-EI), *T. cruzi* CL Brener Não-Esmeraldo-like (Tc-CL-NEI), *T. cruzi* marinkellei (Tc-marinkellei), *Trypanosoma grayi* (Tgrayi), *Trypanosoma rangeli* (Trangeli) e *Trypanosoma theileri* (Ttheileri). As seqüências foram alinhadas com a ferramenta Clustal Omega e a imagem foi construída com a ferramenta ESPrpt 3.0.

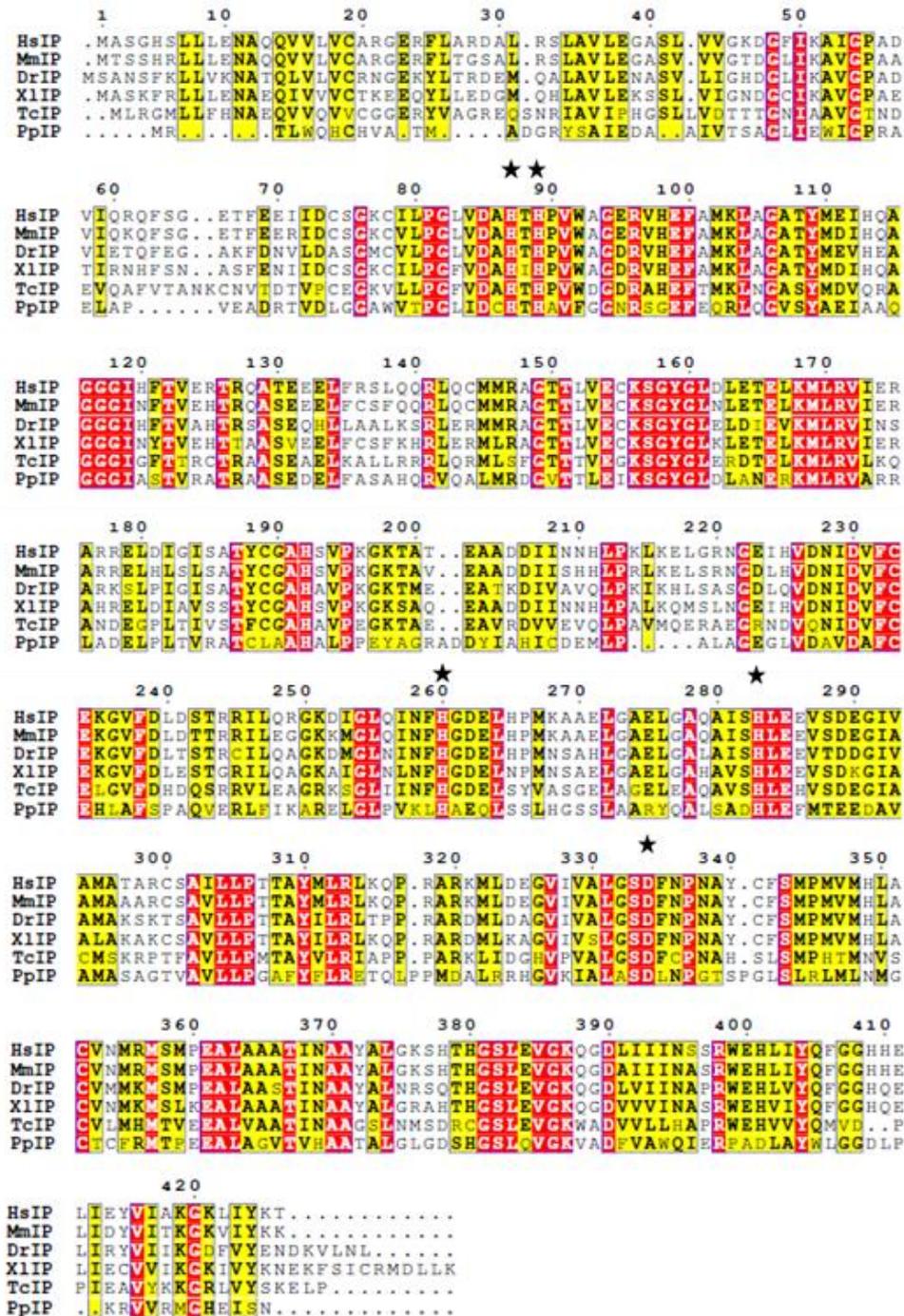


Figura 6 - Alinhamento das sequências de aminoácidos da TcIP e seus homólogos. Em vermelho se indicam os aminoácidos idênticos entre as sequências, enquanto que em amarelo os aminoácidos conservados. A organização do sítio ativo exibe características dos membros da superfamília de amido hidrolases e as estrelas indicam os resíduos putativos do sítio ativo: quatro resíduos de histidina (86, 88, 260 e 283), e um ácido aspártico (334). **HsIP**, imidazolona propionase de *Homo sapiens* [Q96NU7 (HUTI_HUMAN)]; **MmIP**, imidazolona propionase de *Mus musculus* [Q9DBA8 (HUTI_MOUSE)]; **XlIP**, imidazolona propionase de *Xenopus laevis* [Q561L6 (HUTI_XENLA)]; **DrIP**, imidazolona propionase de *Danio rerio* [Q7SXX5 (HUTI_DANRE)]; **TcIP**, imidazolona propionase de *Trypanosoma cruzi* [Q4CVT7 (Q4CVT7_TRYCC)]; **PpIP**, imidazolona propionase de *Pseudomonas putida* [Q88CZ9 (HUTI_PSEPK)].

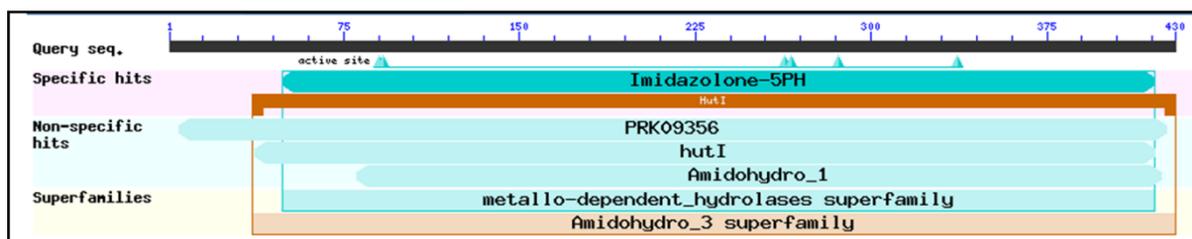


Figura 7 - Representação esquemática dos domínios encontrados para TcIP. A proteína apresenta um domínio amido hidrolase e faz parte de uma superfamília de enzimas hidrolases metal dependente (*metallo-dependent-hydrolases superfamily*); pertence ainda à família de enzimas que utilizam histidina (*hut_histidine utilization*). Os resíduos putativos responsáveis pela composição do sítio ativo estão indicados por pequenas flechas azuis. Fonte: Pfam.

4.2 Amplificação e clonagem

Dada a identidade das seqüências de aminoácidos codificadas pelos dois genes [Tc00.1047053509137.30](#) (CL Brener Esmeraldo-like) e [Tc00.1047053508741.140](#) (CL Brener Não-Esmeraldo-like) optou-se, aleatoriamente, por trabalhar com o gene [Tc00.1047053509137.30](#). A seqüência nucleotídica do gene putativo da TcIP possui uma fase de leitura aberta de 1.293 nucleotídeos que codificam para uma seqüência de aminoácidos de 430 resíduos, com massa molecular estimada de aproximadamente 47 kDa. A partir da seqüência desse gene, foram desenhados oligonucleotídeos (iniciadores) específicos e, utilizando-se DNA genômico de *T. cruzi* (cepa CL, clone 14) como molde, esse gene foi amplificado pela técnica de PCR.

Inicialmente foi realizada uma PCR na qual se utilizaram diferentes temperaturas de anelamento dos iniciadores (modo gradiente), a fim de determinar a condição de especificidade e eficiência ótima para esse parâmetro. Após corrida eletroforética, foi possível observar uma banda de aproximadamente 1.300 pb correspondente ao tamanho esperado (**Figura 8 A**). Mais que isso, constatou-se um padrão de amplificação com bandas inespecíficas menos evidentes quando a reação foi realizada utilizando-se uma temperatura de anelamento de 62 °C; portanto, essa condição foi escolhida como ideal. A banda foi então purificada e clonada no vetor pGEM-T® (**Figura 8 B**). A construção resultante foi utilizada para transformar bactérias competentes. A partir de colônias bacterianas transformantes fizemos culturas das quais se obtiveram preparações plasmídicas que foram utilizadas para confirmar a identidade do fragmento de DNA clonado por sequenciamento.

Posteriormente, esse DNA recombinante foi utilizado nos demais procedimentos de subclonagem em pET28a(+). Assim, ambos o vetor de escolha para subclonagem e a construção pGEM-TcIP foram digeridos com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI, para

posterior reação de ligação e conseqüente subclonagem, resultando na construção pET28-*TcIP* (**Figura 8 C e D**). Esse vetor permite a expressão da proteína de interesse fusionada a seis resíduos de His no extremo N-terminal. Após a transformação de células competentes *E. coli* DH5 α com essa construção, vários clones foram analisados por PCR de colônia, por digestão com enzimas de restrição, PCR da construção pET28-*TcIP* e sequenciamento.

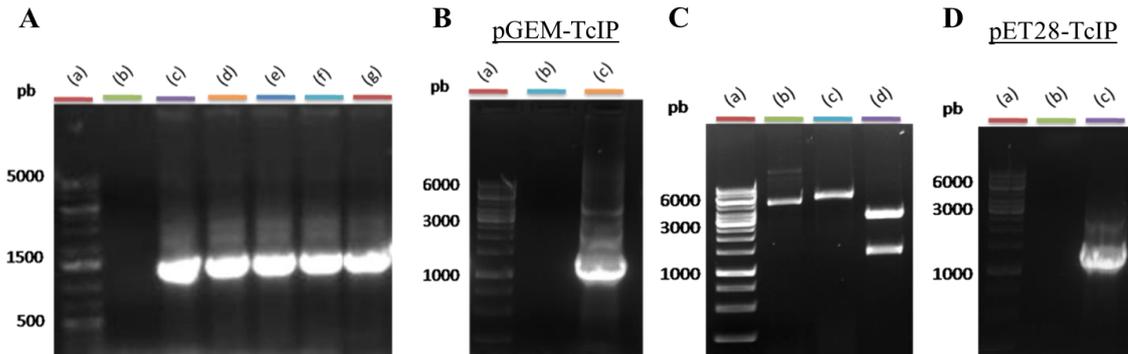


Figura 8 - Amplificação e clonagem da *TcIP*. A. Produto de amplificação do gene *TcIP* obtido por PCR gradiente a partir do DNA genômico de *T. cruzi*, cepa CL14, com tamanho esperado de 1.300 pb, disposto nas canaletas na seguinte ordem, de acordo com a temperatura de anelamento dos primers: 54 °C (c), 56 °C (d), 58 °C (e), 60 °C (f), 62 °C (g); marcador (a), controle negativo (b). B. Perfil eletroforético de um clone positivo para a construção pGEM-*TcIP* após ser purificado por mini preparação de plasmídeo, evidenciando em (c) uma banda na altura do produto esperado para *TcIP*; marcador (a), controle negativo (b). C. Vetor pET28a(+) fechado (b) e cortado com as enzimas de restrição BamHI e EcoRI, resultando em um fragmento de aproximadamente 5.400 pb, resultante do vetor linearizado (c); digestão da construção pGEM-*TcIP* com as mesmas enzimas e conseqüente liberação do inserto, gerando bandas de tamanhos esperados, 3.000 pb (vetor) e 1.300 pb (inserto) (d); marcador (a). D. PCR usando a construção resultante da subclonagem pET28-*TcIP* como molde (c); controle negativo da reação (b) e marcador (a). Todas as eletroforese foram realizadas em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 μ g/mL.

4.3 Expressão e purificação heteróloga

Para a expressão da *TcIP* recombinante, foi feita a transformação de células quimiocompetentes de *E. coli* da cepa BL21 códon plus com a construção pET28-*TcIP*. Os ensaios iniciais de expressão foram realizados a diferentes temperaturas de indução, partindo de uma cultura inicial de 25 mL, a fim de se identificar a condição ótima de expressão para essa proteína. As temperaturas testadas inicialmente foram 20 °C e 25 °C durante 16 h, 30 °C durante 5 h e 37 °C durante 3 h e a concentração de IPTG utilizada para indução foi 0,5 mM (**Figura 9 A**). A expressão da proteína recombinante foi analisada mediante eletroforese em gel de poliácridamida 10% (SDS-PAGE), comparando os extratos proteicos totais dos clones transformantes sem induzir e após indução. Nas condições apresentadas, houve superexpressão da proteína em ambas as frações, solúvel e insolúvel. Escolhemos a condição

de 25 °C durante 16 h como a condição padrão para a expressão da proteína recombinante, na qual houve uma expressão mais significativa da proteína, e foi possível a visualização de uma banda na altura esperada para *TcIP*. Uma estimativa de tamanho esperado pode ser feita levando em conta a massa molecular predita para a *TcIP*, bem como a massa molecular adicional da etiqueta de 6 x His, assim *TcIP* recombinante (r) = 51 kDa (~47 kDa da *TcIP* + ~4 kDa da 6 x His). Baseado em uma aproximação numérica, daqui para frente estabelecemos como 50 kDa a massa molecular aproximada para *TcIP*.

A fim de obter a *TcIP* em maior escala e de forma solúvel e pura, fez-se uso de um volume de cultura de 1 L, e a proteína foi purificada através da técnica de cromatografia de afinidade, usando resina de Ni²⁺-NTA (**Figura 9 B**). Vale ressaltar que, nos testes iniciais de purificação, observou-se que, quando o lisado foi passado através da resina de Ni²⁺-NTA, uma pequena quantidade de proteína não ligada à resina saiu na fração FT (*flow-through*). Por essa razão, as concentrações de imidazol utilizadas nos passos de lavagem e eluição foram padronizadas para 15 mM e 30 mM, respectivamente, e não 60 mM e 500 mM, como usualmente se procede.

4.4 Obtenção de soro anti-*TcIP*

Para a obtenção do soro policlonal contra *TcIP*, procedeu-se com a inoculação da proteína recombinante em camundongos BALB/c, conforme descrito no 3.4.4. A especificidade do soro obtido foi testada através de ensaios de *western blotting* utilizando extratos de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Como observado na **Figura 10**, a incubação com o soro anti-*TcIP* mostrou reação contra a proteína de interesse, resultando em uma única banda, de aproximadamente 50 kDa, tamanho compatível com o esperado. Por outro lado, não se observou marcação quando se procedeu a incubação com soro pré-imune, na menor diluição. Dessa forma, seguimos fazendo uso desse soro (não purificado) para os demais experimentos.

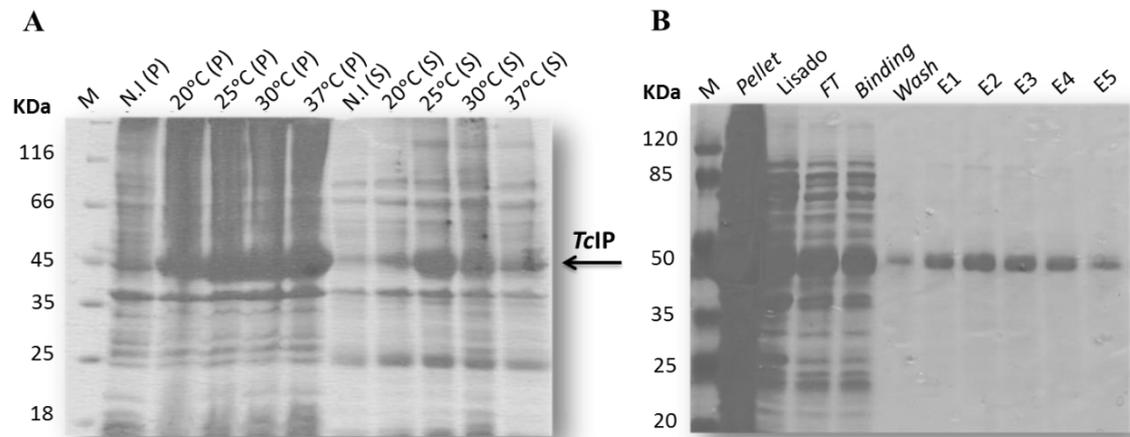


Figura 9 - Expressão e purificação heteróloga da TcIP. **A.** Eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 10%) a partir de extratos proteicos obtidos a partir da expressão da proteína recombinante **TcIP** em diferentes temperaturas e tempos de indução, com 0,5 mM de IPTG, assim como o controle sem induzir (N.I.). A seta indica a posição da proteína expressa com a massa molecular esperada, aproximadamente 50 kDa para **TcIP**. M: marcador de massa molecular, S: sobrenadante ou fração solúvel, P: *pellet* ou fração insolúvel. **B.** Purificação da proteína **TcIP** por cromatografia de afinidade em resina de Ni²⁺-NTA agarose e respectiva eletroforese em gel de poliácridamida (SDS-PAGE 10%) das diferentes frações obtidas na purificação da enzima. M: marcador de massa molecular, *Pellet*: fração insolúvel, L: lisado clarificado após centrifugação do extrato proteico induzido com IPTG, FT (*flow-through*): fração coletada após a passagem do lisado clarificado pela coluna de Ni²⁺-agarose, *Binding*: fração coletada após a primeira lavagem com tampão de ligação, *Wash*: fração coletada após a segunda lavagem com tampão de lavagem, E1-5: frações obtidas após o processo de eluição.

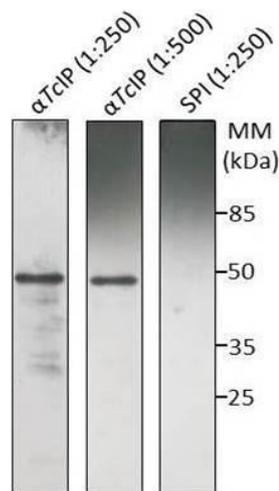


Figura 10 - Titulação do soro policlonal anti-TcIP. *Western blotting* contra extratos de epimastigotas de *T. cruzi* utilizando soro anti-TcIP ou soro pré-imune (SPI); as membranas foram incubadas com SPI em uma diluição 1:250, bem como com diferentes diluições do soro anti-TcIP. Como observado, incluindo a maior diluição avaliada (1:500) observou-se uma banda imunoreativa do tamanho esperado (aproximadamente 50 kDa).

4.5 Aspectos bioquímicos e funcionais da *TcIP*

4.5.1 Expressão da *TcIP* ao longo do ciclo de vida do parasita

O primeiro passo na caracterização da enzima *TcIP* foi determinar o padrão de expressão ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*. Para isso, a expressão protéica da *TcIP* foi avaliada por *western blotting* utilizando extratos proteicos obtidos a partir de todas as formas de desenvolvimento do parasita e nosso anticorpo policlonal anti-*TcIP*. A banda correspondente à massa molecular esperada para *TcIP* (aproximadamente 50 kDa) foi detectada com maior intensidade na forma epimastigota, seguida pela forma tripomastigota derivado de cultura e com intensidade similar nas demais formas: tripomastigota metacíclico, amastigota e epimastigota intracelular (**Figura 11 A**). No controle negativo (extratos de células CHO-K₁), a banda foi indetectável. Como sistema de normalização, foi utilizado um anticorpo contra a proteína *TcGAPDH*, obtido previamente no nosso laboratório a partir da proteína recombinante gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Otavio Henrique Thiemann (Instituto de Física de São Carlos, USP). Ambos soros anti-*TcIP* e anti-*TcGAPDH* foram utilizados na diluição de 1:1000, juntamente com o anticorpo secundário, anti-mouse conjugado à peroxidase (1:2.000). De forma complementar, foi realizada uma análise de densitometria de bandas, de modo a estabelecer a razão da expressão protéica entre a *TcIP* e a o gene normalizador *TcGAPDH* (**Figura 11 B**). Embora esse experimento tenha sido realizado em mais de uma réplica biológica, a figura demonstrada abaixo é representativa de uma delas.

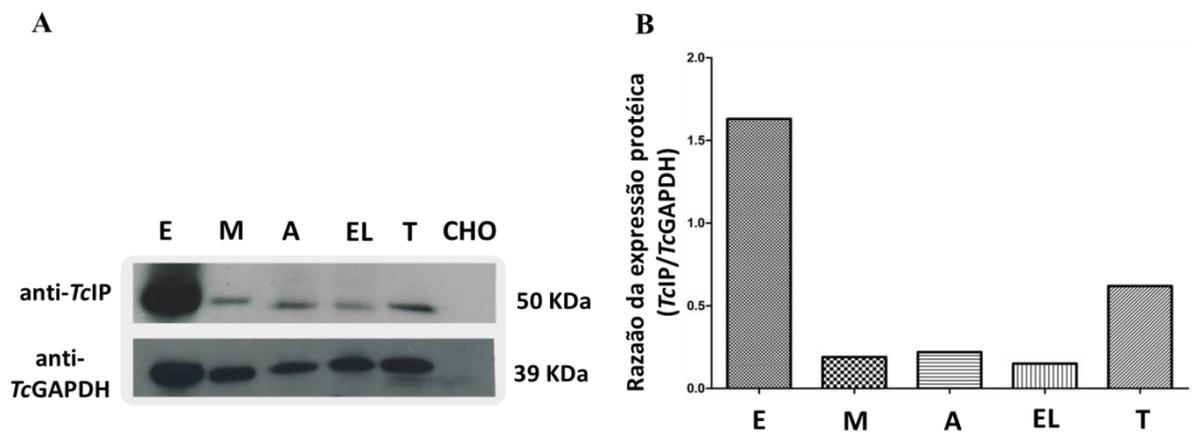


Figura 11 - Perfil da expressão de TcIP ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*. **A.** Ensaio de *western blotting*, cujas amostras correspondem a extratos proteicos de todos os estágios presentes ao longo do ciclo de vida do parasita, sendo esses: E: epimastigotas, M: tripomastigotas metacíclicos, A: amastigota, EL: epimastigota-like ou epimastigota intracelular, T: tripomastigotas derivados de células. As células hospedeiras CHO-K₁ (CHO) foram utilizadas como controle negativo nos experimentos acima. O anticorpo contra TcGAPDH foi utilizado como normalizador. **B.** Representação gráfica da razão da expressão protéica (TcIP/TcGAPDH) obtida por densitometria de bandas.

4.5.2 Localização subcelular da TcIP: uma proteína citoplasmática.

Diante do fato de que o metabolismo de His é relevante na bioenergética de epimastigotas de *T. cruzi*, o conhecimento do compartimento celular onde a via se encontra operativa é uma informação relevante. Nesse sentido, como citado anteriormente neste trabalho, as enzimas TcHAL e TcUH foram estudadas e, dentre outros aspectos, avaliou-se a localização subcelular das enzimas, que mostraram um padrão de localização citoplasmática. Diante do relatado, também nos interessou determinar a localização subcelular da TcIP.

Através de ensaios de microscopia de imunofluorescência indireta (IFI), utilizamos o soro anti-TcIP (1:25), juntamente com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado à FITC (1:400) e o marcador de DNA do cinetoplasto e núcleo, *Hoechst* 33258 (1:2.000) e analisamos o perfil de localização da TcIP nas formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas, epimastigotas intracelulares e tripomastigotas derivados de células. Dessa forma foi possível observar durante todos os estágios do ciclo de vida de *T. cruzi* que a TcIP apresentou um perfil de localização citoplasmática, com marcação não homogênea, mas pontual, o qual foi evidenciado pela fluorescência correspondente ao anticorpo específico (**Figura 12 A**). TcIP apresenta-se amplamente distribuída pela célula em todas as formas do parasita e o perfil observado corrobora com aquele visualizado para as duas primeiras enzimas

da via, contribuindo para nossa hipótese de que todas as enzimas da via estariam localizadas no citoplasma.

A fim de confirmar o dado obtido, foi feita uma co-localização usando o anticorpo contra a enzima alfa-hidroxiácido desidrogenase (malato desidrogenase-*like*, citosólica), gentilmente cedido pela Dra. Cristina Nowicki (Universidade de Buenos Aires), nas seguintes condições: anticorpo primário anti-*TcMDH* (1:20) e anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor® 546 na diluição de 1:400 (**Figura 12 B**). A sobreposição, em amarelo, confirma que a *TcIP* também é uma enzima citoplasmática. O soro pré-imune, usado como controle negativo, não apresentou reação de fluorescência. Em todas as IFIs foi utilizado o intercalante de DNA *Hoechst* 33258 (1:2.000) como marcador do DNA do cinetoplasto e do núcleo.

De forma a complementar os resultados obtidos, foram utilizados extratos de formas epimastigotas permeabilizadas com concentrações crescentes de digitonina. Esta técnica permite permeabilizar gradualmente as células, liberando o conteúdo de cada fração celular em função da concentração de detergente. As frações solúveis e insolúveis de cada extrato permeabilizado a uma dada concentração de digitonina foram separadas e analisadas por *western blotting* utilizando os soros anti-*TcIP*, anti-*TcGAPDH*, bem como contra **A**spartato **A**minotransferase de *T. cruzi* (ASAT, marcador mitocondrial) e **T**irosina **A**minotransferase de *T. cruzi* (TAT) utilizada como marcador citosólico (esses últimos generosamente cedidos pela Profa Dra. Cristina Nowicki. Nas condições desse experimento, proteínas citosólicas são liberadas nas primeiras frações solúveis. Em seguida proteínas glicossomais são encontradas nas frações solúveis e por último, as proteínas mitocondriais. A **Figura 13** mostra que a *TcIP* foi detectada majoritariamente nas frações permeabilizadas com baixas concentrações de digitonina (0,1 - 1 mg/mL), mas também foi possível detectar a enzima em frações permeabilizadas com maior concentração de digitonina (1,25 - 2,5 mg/mL). Ademais, a *TcIP* apresenta uma localização abrangente pelo citoplasma de *T. cruzi*, corroborando com o anteriormente demonstrado em outros ensaios.

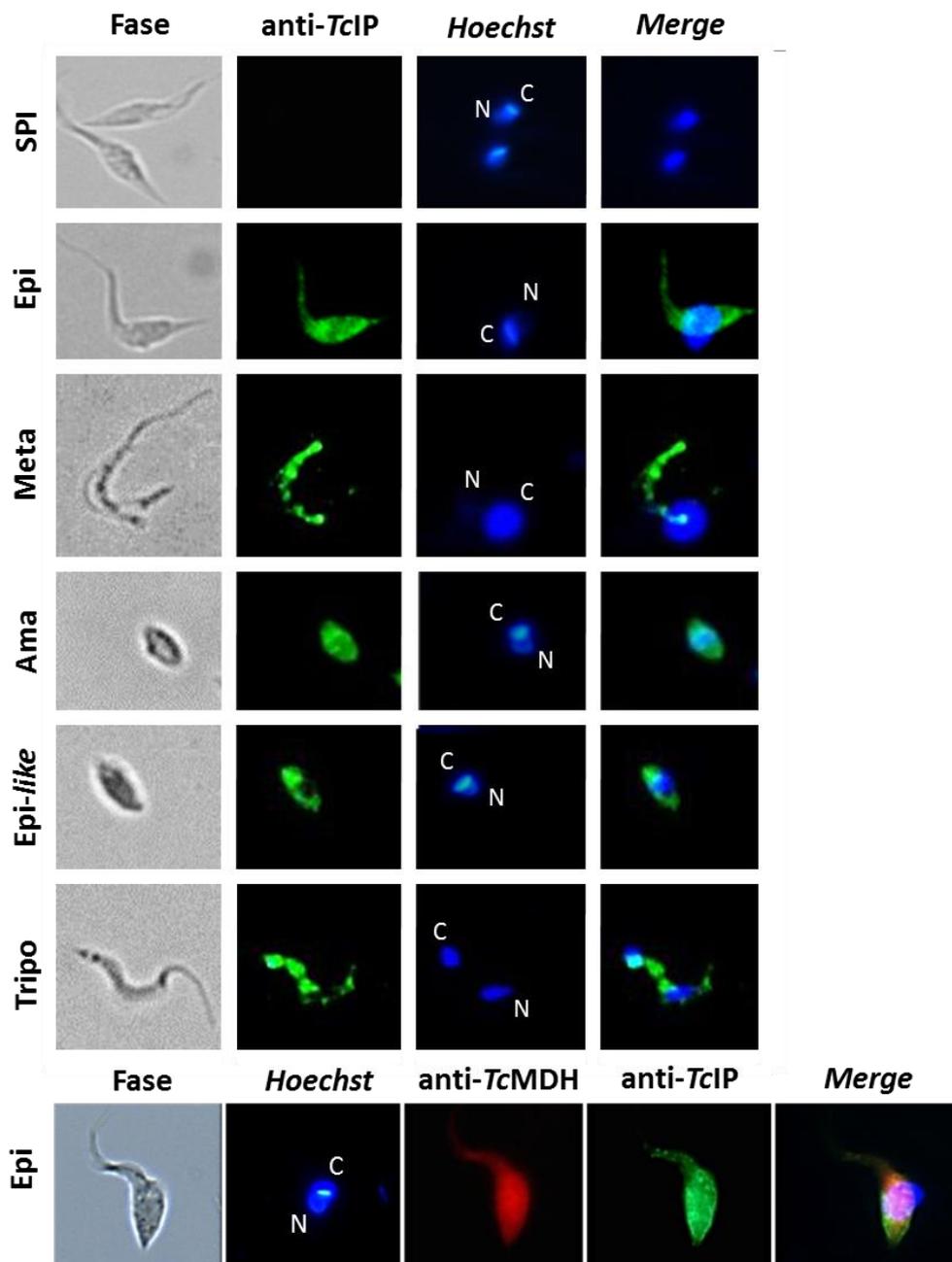


Figura 12 - Localização subcelular da TcIP ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*. Na parte superior da figura, diferentes formas do parasita foram incubadas com o anti-soro policlonal contra TcIP (diluição 1:25) e com o anticorpo secundário anti-IgG conjugado à FITC (diluição 1:400), bem como com o marcador do cinetoplasto e núcleo, *Hoechst* 33258. Na parte inferior, temos a co-localização da TcIP com isoforma citoplasmática da enzima malato desidrogenase-like (MDH) (1:20); para tanto foram igualmente utilizados o anti-TcIP juntamente do anti-IgG de camundongo conjugado à FITC, a sonda *Hoechst* 33258 e, finalmente, o anticorpo primário contra TcMDH em vermelho, bem com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado à Alexa Fluor® 546 na diluição de 1:400. SPI: soro pré-imune; Epi: formas epimastigotas; Meta: tripomastigotas metacíclicos; Ama: formas amastigotas; Epi-like: epimastigotas intracelulares; Tripo: tripomastigotas derivados de cultura. N: núcleo; C: cinetoplasto. A colocação de imagens foi feita utilizando o software ImageJ (NIH).

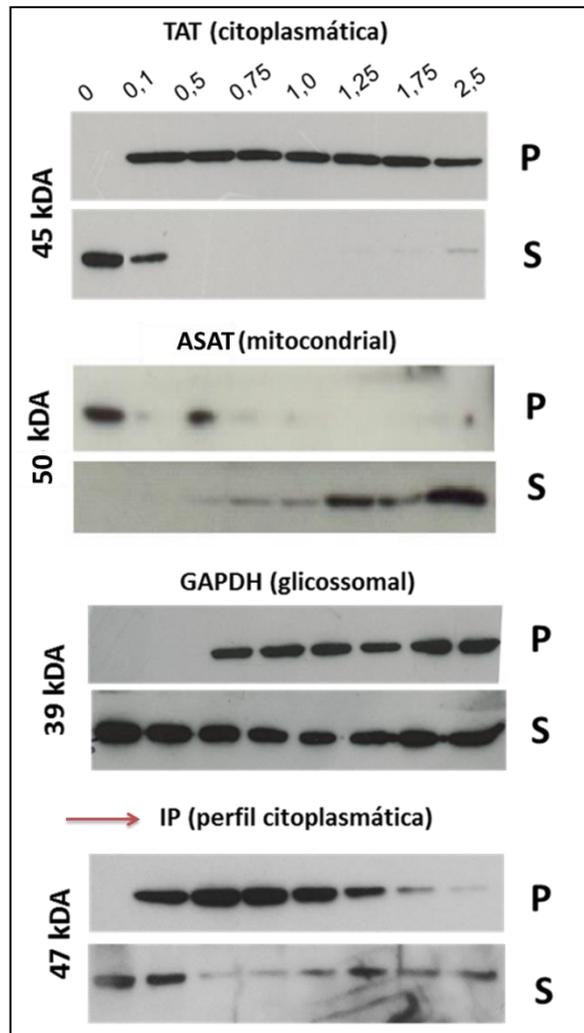


Figura 13 - Fracionamento seletivo de formas epimastigotas com digitonina. Epimastigotas foram permeabilizados com concentrações crescentes de digitonina (0 – 2,5 mg/mL). O sobrenadante (S) e a fração insolúvel ou *pellet* (P) de cada extrato foram analisados por *western blotting*. As membranas contendo as amostras foram incubadas contra o soro anti-*TcIP* (1:1000), anti-Tirosina Aminotransferase de *T. cruzi* (TAT) utilizada como marcador citosólico, anti-*TcGAPDH* como marcador glicossomal e anti-Aspartato Aminotransferase, ASAT, um marcador mitocondrial. A massa molecular de cada proteína encontra-se discriminada ao lado (à esquerda) de cada *blotting*, sendo: TAT, 45 kDa; mASAT, 50 kDa; GAPDH, 39 kDa e IP 47 kDa.

4.5.3 A atividade da *TcIP* não foi passível de detecção

Como parte da caracterização da enzima *TcIP*, partimos para a padronização do ensaio de medição da atividade enzimática, utilizando a proteína recombinante obtida. Foram realizadas tentativas de determinação da atividade enzimática da *TcIP*, cuja reação consiste em uma hidrólise do substrato imidazolona-propionato (IPA), resultando na formação do produto formimino-glutamato (FiGlu). Nesse momento, nos deparamos com algumas dificuldades no que diz respeito ao substrato da enzima. O IPA é um composto que apresenta instabilidade química considerável, o que resulta em sua decomposição espontânea quando na

presença de oxigênio, em intermediários relatados na literatura. Diante do exposto e, lançando mão das metodologias detalhadas anteriormente, duas abordagens foram usadas na tentativa de medição da atividade enzimática da *TcIP*. Como o IPA não está disponível comercialmente e sua síntese química é infactível, ambas as abordagens foram realizadas utilizando a proteína recombinante *TcUH*, com o intuito de proceder a síntese enzimática *in vitro* do IPA, a partir do urocanato.

Em ambas as abordagens, não foi possível demonstrar a atividade enzimática da *TcIP*. No primeiro caso, usando as duas recombinantes descritas, iniciamos a reação com a *TcUH* acompanhando em tempo real no espectrofotômetro o consumo de urocanato mediante leituras de absorvância ótica a 277 nm, em distintas reações, onde testamos difentes intervalos de tempo. Posteriormente, fizemos a troca do comprimento de onda para 264 nm (absorção máxima do IPA) e então adicionamos a *TcIP*, em diferentes quantidades (50 – 400 µg). Não se observou queda ou aumento na absorvância, um comportamento muito parecido com a mistura de reação sem a enzima *TcIP*. Mais que isso, é importante ressaltar que os comprimentos de onda de absorção do urocanato e do IPA são próximos e constatamos a posteriori que o urocanato também absorvia no λ de 264 nm (para verificar essa possível interferência não colocamos *TcIP*). Assim concluímos que esse método não seria o ideal, uma vez que essa possível sobreposição nos comprimentos de ondas utilizados, acarretaria controvérsias na interpretação dos resultados.

Em relação à segunda abordagem, foi realizada a tentativa de medição da atividade enzimática da *TcIP* espectrofotometricamente em reações de ponto final, mediante três reações acopladas. De forma análoga ao descrito acima, a reação para *TcUH* foi empregada com o objetivo de se obter enzimaticamente o substrato IPA e, por ação da *TcIP*, formar o produto (FiGLu). Brevemente: a reação da *TcUH* foi processada em tubos *ependorf*, em diferentes tempos, incubados a 28 °C (reação **A**). A reação **B** (reação **A** + NaOH 2,5 M), teria por objetivo a hidrólise alcalina do produto FiGLu, formando Glu e formamida, realizada a temperatura ambiente. Após esse período, foi acrescido HCl 2,5 M para equilibrar o pH e a reação foi interrompida pela adição de TCA 20% e, finalmente, a reação **C** consistiria então na detecção final do Glu pela glutamato desidrogenase (GDH), monitorando-se espectrofotometricamente o aparecimento de NADH à 340 nm (**Figura 14**). Através dessa reação, seria possível detectar o Glu formado anteriormente e fazer uma estimativa quantitativa do mesmo, através de uma curva de calibração prévia. Algumas tentativas de

medição da atividade enzimática foram realizadas, no entanto não foi possível a detecção da atividade da GDH e, conseqüentemente, da *TcIP*, nesse contexto.

Sendo assim, muito embora o raciocínio tenha sido coerente na elaboração do método, nos deparamos com a falta de padrões dos compostos que deveríamos detectar (IPA, FiGlu), de forma que pudéssemos de fato validar a técnica. Isso quer dizer que, apesar de sabermos que o único produto da *TcUH* é o IPA, não se pode afirmar rigorosamente se esse é capaz de se manter estável em solução e por quanto tempo. Mais que isso, não podemos assegurar, por exemplo, que a hidrólise alcalina do FiGlu funcionou bem, uma vez que não tínhamos o reagente comercial para fazer esse teste.

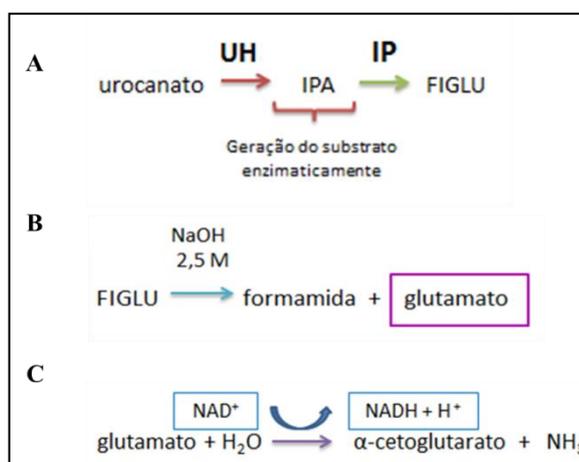


Figura 14 - Representação esquemática das reações enzimáticas acopladas usadas para determinação da atividade da *TcIP*. **A.** Reação da *TcUH* para geração *in vitro* do substrato imidazolona propionato (IPA) da enzima *TcIP*, e subsequente demonstração da reação dessa enzima formando formimino-glutamato (FiGlu). **B.** Hidrólise alcalina do FiGlu, usando 2,5 M de NaOH, resultando na formação de formamida e glutamato como produtos dessa reação. **C.** Detecção final de glutamato por ação da GDH comercial de *Bos taurus*, via redução de NAD.

4.5.4 O IPA é espontaneamente oxidado em reação

Prosseguindo nesse sentido, fomos verificar se de fato o IPA formado pela reação da *TcUH* estava sendo convertido imediatamente pela *TcIP* no produto seguinte, formimino-glutamato ou, ao invés disso, oxidado espontaneamente a outros intermediários. Nesse ponto vale ressaltar que um processo não exclui o outro, uma vez que podem estar ocorrendo simultaneamente.

Para de fato demonstrar se o IPA estava passando por esse processo de decomposição espontânea, não enzimática, usamos o corante DCPIP comoceptor de elétrons. O raciocínio desse experimento encontra-se esquematicamente demonstrado na figura abaixo (**Figura 15 A**): ou seja, por ação da *TcUH*, o IPA é formado em reação, a partir do urocanato; o IPA,

como descrito na literatura, pode ser oxidado espontaneamente na presença de oxigênio, processo que pode ser evidenciado quando adiciona-se DCPIP, um aceptor de elétrons; em um segundo momento, ao acrescentar *TcIP* concomitantemente à *TcUH*, em teoria o processo de decomposição espontânea do IPA seria minimizado, forçando que esse fosse consumido enzimaticamente, gerando formimino-glutamato. Os primeiros testes foram feitos somente com a *TcUH*, onde demonstramos que o IPA está sendo oxidado espontaneamente e, conseqüentemente o DCPIP reduzido. Controles sem enzima e sem urocanato foram realizados (**Figura 15 B**); a **Figura 15 C** sugere uma resposta linear no número de mols de DCPIP reduzido por min, frente ao aumento de enzima - *TcUH*. Em um segundo momento, a *TcIP* recombinante foi adicionada na reação e observamos que, independente da quantidade de *TcIP* adicionada (100 e 200 µg, respectivamente), em diferentes combinações com a *TcUH*, não se observaram diferenças na resposta, em termos de redução do DCPIP, em relação à reação onde tínhamos somente a primeira enzima (**Figura 15 D**). Isso pode indicar que a enzima *TcIP* não está ativa ou que o processo de oxidação espontânea do substrato é muito mais eficiente que o consumo enzimático do mesmo.

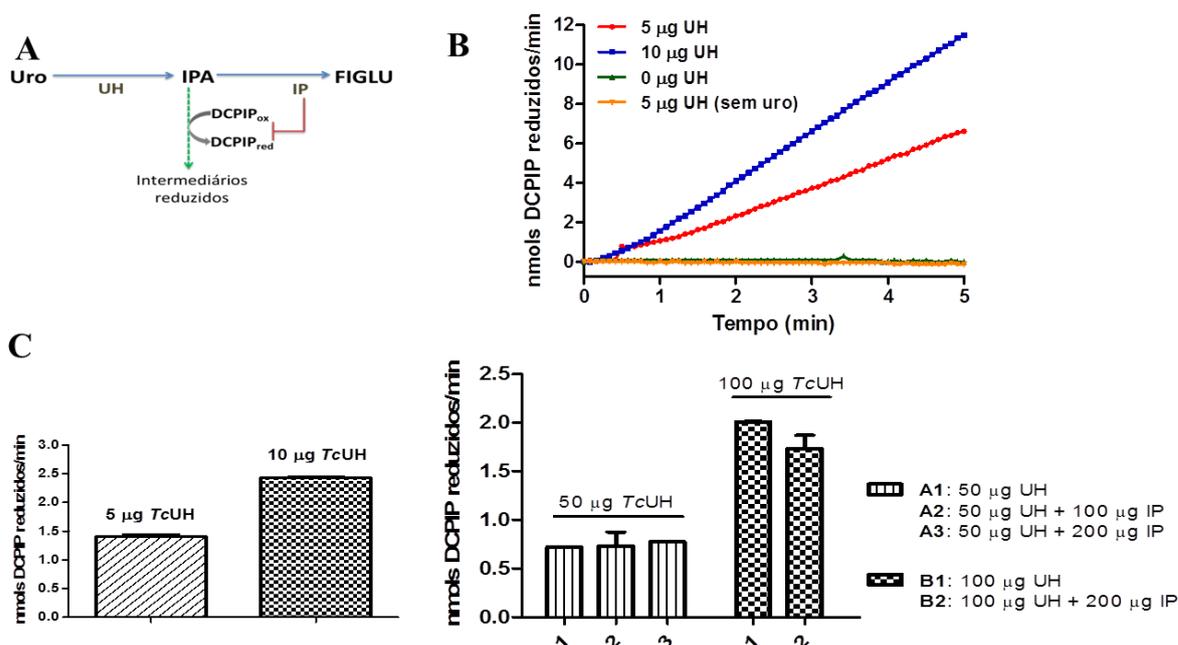


Figura 15 - Oxidação não enzimática do IPA. A. Demonstração esquemática da abordagem teórica usada para o desenho experimental; uro (urocanato), UH (urocanato hidratase), IPA (imidazolona-propionato), IP (imidazolona propionase), FiGlu (formimino-glutamato), DCPIP (2,6-diclorofenolindofenol), ox (oxidado) ou red (reduzido). B. Redução do DCPIP resultante da oxidação do IPA via reação da *TcUH*, a partir do substrato urocanato. Não se observa redução do corante quando a reação se dá sem a enzima ou sem substrato. C. Gráfico mostrando tendência linear em relação ao número de mols de DCPIP reduzidos por min, frente ao aumento de *TcUH* adicionada. D. Diferentes combinações de *TcUH* e *TcIP* em reação: à esquerda temos 50 μg de *TcUH* (A1), acrescidos de 100 μg (A2) ou 200 μg de *TcIP* (A3), por outro lado à direita temos 100 μg de *TcUH* (B1), acrescidos de 200 μg de *TcIP* (B2).

4.6 A via de degradação de His apresenta características bioquímicas não canônicas

Como descrito na literatura, o intermediário IPA apresenta instabilidade química considerável, motivo que dificulta tanto a comercialização quanto a síntese química do substrato. Além disso, a decomposição não enzimática do substrato a α -KG na presença de oxigênio foi descrita. Esse fato levou-nos a considerar a possibilidade da formação do que chamamos de um “atalho” ou “curto circuito” na via, que conduziria em apenas dois passos enzimáticos ao intermediário do ciclo de Krebs, α -KG. Por outro lado, a via poderia também operar em quatro reações gerando glutamato (como convencionalmente descrito), disponível para outras reações relevantes, tais como biossíntese de metabólitos importantes para a biologia do parasita, como glutamina, prolina, entre outros (**Figura 16**).

Nesse sentido, a hipótese que desenvolvemos é que a via completa (4 passos enzimáticos) só seria ativa quando a *TcIP* se apresente formando um complexo com a *TcUH* (segunda enzima da via) capaz de “proteger” o substrato no seu trânsito entre os sítios ativos das duas enzimas. Se o complexo não se formar, o substrato tenderia a se decompor

espontaneamente formando α -KG. Sendo assim, acredita-se que a expressão da *TcIP* e a formação do complexo determinaria se His gera α -KG, alimentando diretamente o ciclo de Krebs, ou formaria glutamato, outro metabólito chave para o parasita.

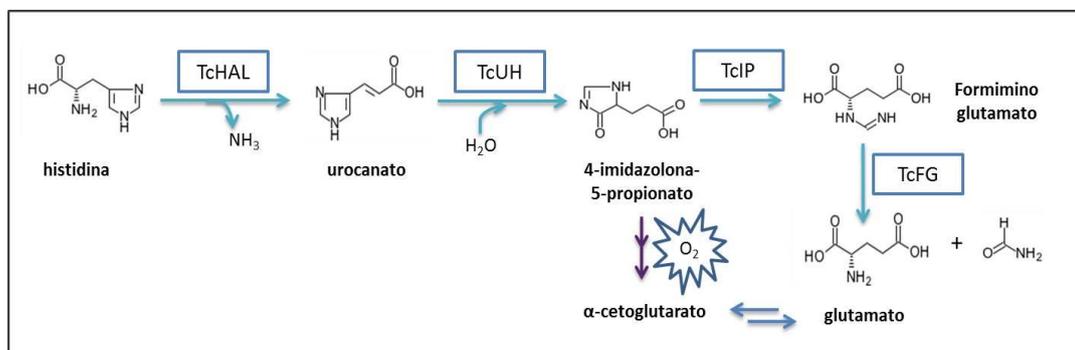


Figura 16 - Representação esquemática da via de His e sua possível ramificação. O intermediário 4-imidazolona-5-propionato (IPA) pode ser convertido espontaneamente a α -KG, conduzindo este metabólito a entrar diretamente no ciclo de Krebs. Por outro lado, a via pode também operar em quatro reações gerando glutamato, disponível para outras reações relevantes, tais como biossíntese de metabólitos importantes para a biologia do parasita, como glutamina, prolina, entre outros.

Dito isso, neste momento o trabalho se subdivide em duas grandes frentes:

- A. Avaliação da interação entre as enzimas *TcUH* e *TcIP* mediante a formação de um complexo macromolecular;
- B. Demonstração da ramificação na via: o metabolismo de degradação de His é operativo em apenas dois passos enzimáticos.

4.7 Avaliação da possível interação entre as enzimas *TcUH* e *TcIP* mediante a formação de um complexo macromolecular

4.7.1 Abordagens para detecção do complexo *in vitro*

4.7.1.1 Ensaio de *Pull-down*

A enzima *TcUH* foi recombinantemente expressa e purificada por cromatografia de afinidade, até a etapa que precede a eluição (condições essas estabelecidas no trabalho de doutorado da Dra Maria Julia Barison). Nesse momento foi adicionado extrato de formas epimastigotas de *T. cruzi*, em fase exponencial de crescimento e deixou-se incubar (a matriz de Ni^{2+} imobilizada com a *TcUH* recombinante e o extrato – fonte de *TcIP*) sob agitação por 2

h a 4 °C. Depois disso, seguiu-se a purificação do possível complexo, respeitando as condições de purificação para *TcUH* recombinante, eluindo com 500 mM de imidazol. As frações coletadas foram analisadas em um SDS-PAGE 10% (**Figura 17 A**) e depois transferidas para uma membrana e submetidas à análise por *western-blotting* (**Figura 17 B**), utilizando para tanto soro contra *TcUH* (controle positivo) e contra *TcIP* (para então demonstrar se a *TcUH* recombinante é capaz de “capturar” a *TcIP* presente no extrato total de parasitas). Através desse experimento foi possível demonstrar que a *TcUH* recombinante é capaz de “capturar” a *TcIP* presente no extrato total de parasitas, sendo esse o primeiro indício de que ambas proteínas estão associadas.

O experimento recíproco foi realizado com a *TcIP* recombinante. As frações coletadas após a purificação foram igualmente analisadas em um SDS-PAGE 10% (não mostrado) e depois transferidas para uma membrana e submetidas à análise por *western-blotting* (**Figura 17 C**), utilizando para tanto soro contra *TcIP* (controle positivo), quanto contra *TcUH*. Foi possível demonstrar que a *TcIP* recombinante é capaz de “capturar” a *TcUH* presente no extrato total de parasitas, seguindo confirmando nossa hipótese de interação entre tais proteínas.

4.7.1.2 Cromatografia de Exclusão Molecular

Seguiu-se com o intuito de melhor conhecer a possível interação *TcUH-TcIP*, dispondo-se da técnica de Cromatografia de Exclusão Molecular. De forma preliminar e introdutiva, primeiramente foi estudado o perfil de cada uma das proteínas em separado, utilizando para tal, as duas enzimas recombinantes. A fim de avaliar a interação entre as proteínas, seguimos como relatado no item anterior (*TcUH* recombinante e *TcIP* capturada à partir do extrato total de epimastigotas). A detecção das proteínas nas frações obtidas foi feita pelos métodos de Bradford e ELISA. Para a técnica de ELISA foram utilizados os soros específicos contra as duas proteínas recombinantes em questão (*TcUH* e *TcIP*), na diluição de 1:1000.

Como podemos observar na **Figura 18 A**, correspondente a *TcUH* recombinante, essa proteína está presente predominantemente na fração 38 e, quando fazemos os cálculos com base na curva de calibração mostrada na **Figura 18 D**, podemos estimar que a massa molecular dessa enzima está em torno de 113 kDa, sugerindo que se organiza como um dímero, levando em consideração que a massa molecular predita para *TcUH* é de 75,61 kDa

(incluindo a cauda de 6 x His). Por outro lado, quando analisamos a **Figura 18 B**, correspondente a *TcIP* recombinante, essa proteína está presente predominantemente na fração 41 e, de forma análoga ao relatado para *TcUH*, podemos estimar que a massa molecular dessa enzima está em torno de 67 kDa, sugerindo que se organiza como um monômero, levando em consideração que a massa molecular predita para *TcIP* é de 51 kDa (incluindo a cauda de 6 x His). Finalmente, a **Figura 18 D** aponta para uma possível organização do complexo *TcUH-TcIP*, uma vez que a fração reconhecida com o soro anti-*TcIP* (fração 35) corresponde a uma massa molecular aproximada de 187 kDa, o que sugere uma relação de um dímero de *TcUH* (≈ 113 kDa) + um monômero de *TcIP* (≈ 67 kDa), somando aproximadamente 180 kDa, próximo ao encontrado (≈ 187 kDa).

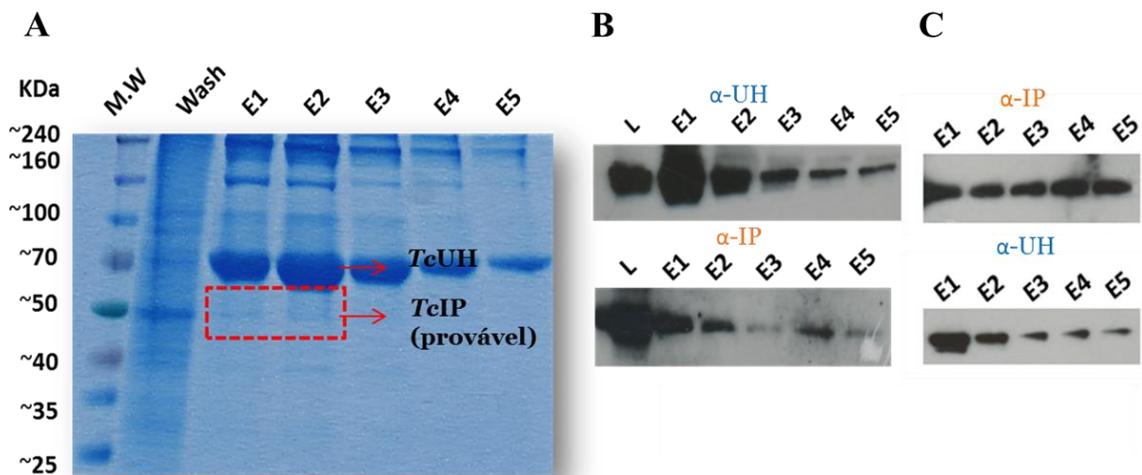


Figura 17 - Avaliação da interação entre as proteínas *TcUH* e *TcIP* por *Pull-down*. A. SDS-PAGE 10% mostrando as diferentes frações de eluição provenientes da purificação *TcUH* recombinante/extrato solúvel de epimastigotas de *T.cruzi*; evidenciando na altura aproximada de 70 kDa, a *TcUH* super-expressa e na altura aproximada de 50 kDa, a provável *TcIP*; B. Ensaio de *western blotting*, usando em cima, soro anti-*TcUH* e, embaixo soro anti-*TcIP*. C. Ensaio recíproco: *western-blotting*, utilizando, como mostrado em cima, soro anti-*TcIP* e embaixo, soro anti-*TcUH*. SDS-PAGE referente a esse *western-blotting* não mostrado.

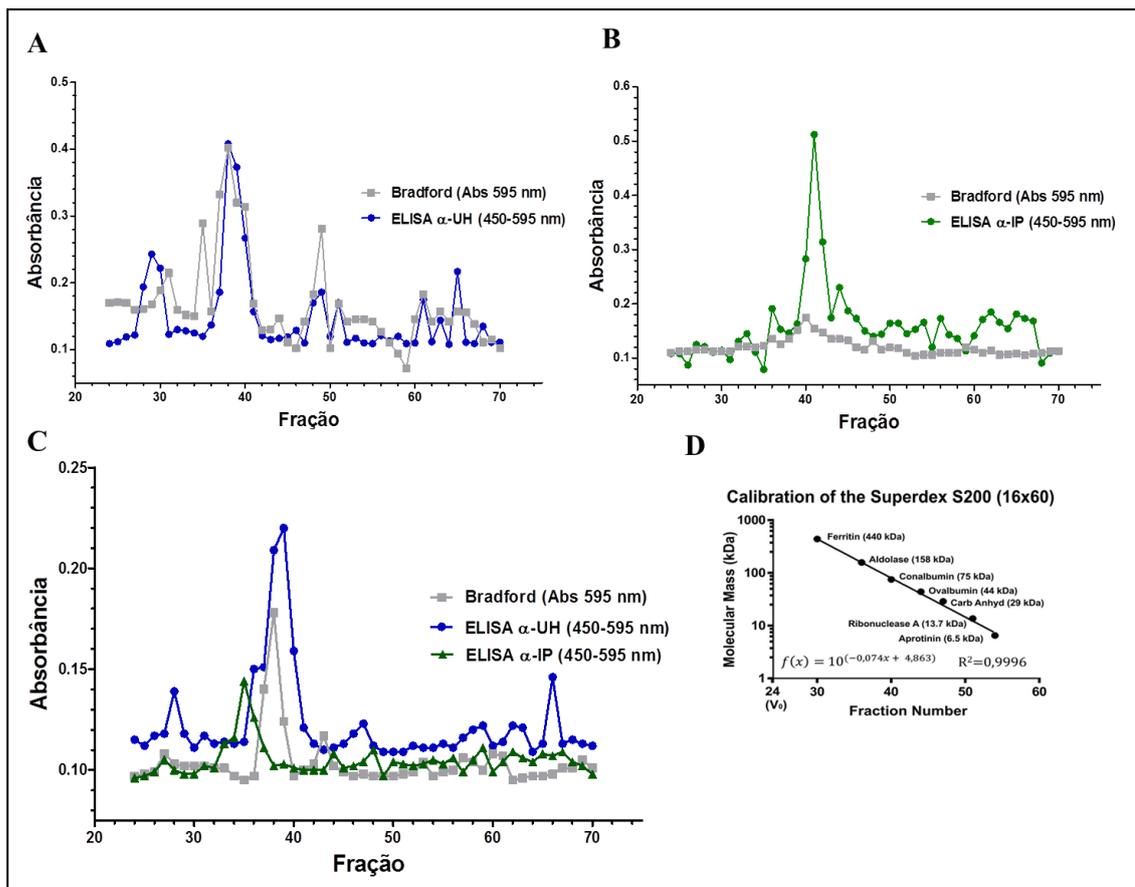


Figura 18 - Análise da interação protéica *TcUH-TcIP* utilizando a técnica de Cromatografia de Exclusão Molecular. **A.** Análise da conformação oligomérica da *TcUH* recombinante, cuja identificação se deu pelo método de Bradford e pela técnica de ELISA usando o soro anti-*TcUH*. **B.** Análise da conformação oligomérica da *TcIP* recombinante, de forma semelhante ao relatado para *TcUH*, porém, nesse caso, usamos o soro anti-*TcIP*. **C.** Análise da fração recuperada após a incubação da *TcUH* recombinante com extrato total de epimastigotas de *T. cruzi*, valendo-se da técnica de Bradford e ELISA, onde ambos soros descritos foram utilizados. **D.** Proteínas padrão usadas para calibração da coluna e para estabelecer a conformação oligomérica das amostras; ferritina (440 kDa), aldolase (158 kDa), conalbumina (75 kDa), ovalbumina (44 kDa), D+ glicoseanidra, glicoproteína (29 kDa), ribonuclease A (13,7 kDa) e aprotinina (6,5 kDa).

4.7.1.3 Avaliação da interação UH-IP a partir da expressão de proteínas recombinantes

Continuando com nossa abordagem, fizemos uso de cromatografia de afinidade com matriz de Ni^{2+} -NTA, utilizando as construções pET28-*TcIP* (obtida nesse trabalho) e pET24-*TcUH* (oriunda do trabalho de Doutorado da Dra. Maria Julia Barison), ambas clonadas com uma etiqueta de seis resíduos de His nos extremos N e C terminal, respectivamente. Em paralelo, ambas as sequências codificantes para *TcUH* e *TcIP* foram novamente clonadas em vetor de expressão pET-24a(+), de modo que desenhamos iniciadores específicos onde preservamos o códon de parada de cada sequência e, por consequência, geramos construções pET24-*TcUH* e pET24-*TcIP* sem a cauda de 6 x His. De acordo com o raciocínio dessa abordagem, a proteína que estivesse fusionada à cauda 6 x His (seja a *TcUH* ou a *TcIP*) se

ligaria à coluna através da formação de complexos de coordenação estabelecidos entre o Ni^{2+} (da matriz Ni^{2+} -NTA) e o anel imidazólico da histidina; a ligação da outra proteína em questão (*TcUH* ou a *TcIP* sem a cauda 6 x His) à matriz, no entanto, estaria totalmente depende da sua capacidade de se associar à primeira fusionada à cauda de 6 x His.

A **Figura 19** mostra uma representação gráfica do racional desse experimento, bem como as eluições resolvidas em um gel de SDS 10%, posteriormente corado com AgNO_3 . A análise de identidade das bandas foi realizada para a fração 300 mM de imidazol (última fração detectável mais pura; a fração de 500 mM não resultou bandas), cujas bandas foram enumeradas como 1 e 2, correspondentes à *TcUH* (≈ 75 kDa) e à *TcIP* (≈ 50 kDa), respectivamente. As bandas foram cortadas e submetidas à análise por espectrometria de massas e posteriormente analisadas pelo programa *Mascot Search Results*. A **Tabela 2** traz uma análise detalhada desse resultado. Foi possível detectar tanto a proteína isca *TcUH* (Tc00.1047053504045.110, urocanato hidratase, cepa CL Brener, cuja massa estimada é 75.406 Da), quanto a proteína de interesse *TcIP* (Tc00.1047053508741.140, imidazolona propionase, cepa CL Brener, cuja massa estimada é 47.274 Da). Para a primeira foi estabelecido um *score* de 50, pois se tratando da proteína isca, os peptídeos correspondentes a essa proteína mostraram-se muito mais abundantes. Para a segunda estabelecemos um *score* de 30 como limite. Para esse tipo de análise, o parâmetro *score*, fornecido pelo programa *Mascot* corresponde à uma espécie de “pontuação” estatística para o quão bem os dados experimentais coincidem com a base de dados do NCBI.

Na **Figura 20** temos um gel de SDS 10%, onde as eluições provenientes da interação *TcUH-TcIP* recombinates foram resolvidas, posteriormente corado com AgNO_3 . A análise de identidade das bandas foi realizada mediante a técnica de *western blotting*, usando os soros anti-*TcUH* (1:1.000) e anti-*TcIP* (1:1.000), para todas as frações eluídas, no qual se detectou bandas na altura de ≈ 75 kDa, correspondente à *TcUH*, bem como à *TcIP*, na altura aproximada de 50 kDa. No entanto, somente na fração “150 mM imidazol” conseguimos obter um sinal mais limpo. A análise por espectrometria de massas também será realizada para confirmar a identidade dessas proteínas. Diante do obtido, esses resultados vêm a corroborar com àqueles obtidos até o momento no que diz respeito à identificação do complexo *TcUH-TcIP*.

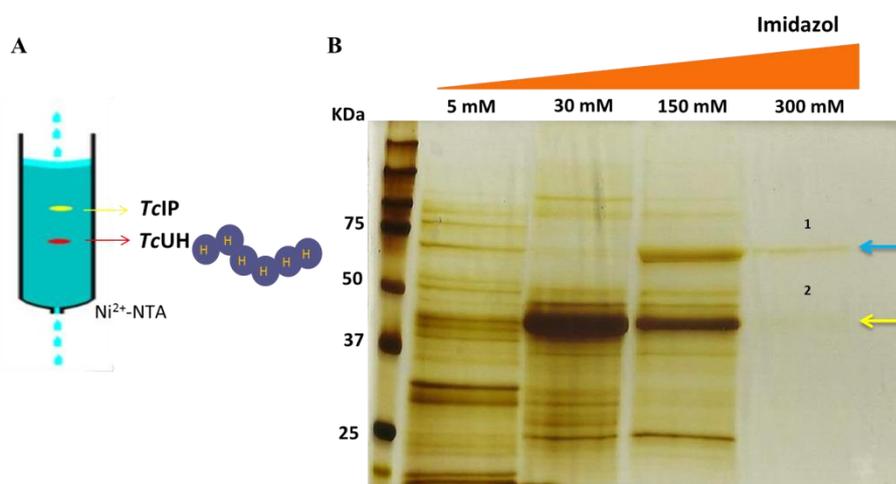


Figura 19 - Interação entre as proteínas *TcUH-TcIP* mediante expressão e purificação recombinante, usando *TcUH* como isca. A. Representação esquemática da estratégia usada nesse experimento, onde demonstramos ambas proteínas ligadas à matriz de Ni^{2+} -NTA, sendo que, para *TcUH*, essa ligação é possível em função da etiqueta de 6 x His e, para *TcIP*, essa ligação é exclusivamente dependente de sua capacidade de se associar à *TcUH*. **B.** Gel de SDS 10%, corado com AgNO_3 . As frações demonstradas correspondem à lavagem (5 mM imidazol) e eluições em função do aumento da concentração de imidazol, variando de 30 a 500 mM e passível de detecção até 300 mM. As bandas anotadas com números 1 e 2 foram analisadas por espectrometria de massas, correspondentes à fração “300 mM”, uma vez que se trata da fração mais pura. Foram aplicados 100 μL de amostra por canaleta e cerca de 8 μL do marcador de massa molecular. A seta azul corresponde à *TcUH* (≈ 75 kDa) e a amarela à *TcIP* (≈ 50 kDa).

| Nome da proteína | Identificação | Peptídeo | Score | Peptídeo | Score |
|--|---|-------------------------------|-------|------------------------|-------|
| Urocanato hidratase (<i>T. cruzi</i>) Banda 1 | Cepa CL Brener Tc00.1047053504045.110 Massa: 75406 Da | R.ETSDLYDGSSLTADMVQNVIGDAFR.G | 108 | K.MMVEDPAMFK.E | 61 |
| | | R.FWDYGNFLLLEASR.A | 100 | R.IATETLEK.L | 59 |
| | | R.AVITNGMMVVPNYSTR.E | 80 | K.ELDESVPHPAK.R | 57 |
| | | K.VVLTSLGLGGMSGAGK.A | 78 | K.LVVGSQLR.I | 55 |
| | | R.QVAAINEMSAR.G | 74 | K.YLGVEDLAGK.V | 55 |
| | | R.YFNTADHEVLAEEFSR.E | 72 | R.AGAEVWTPDDTVR.S | 53 |
| | | K.VVLTSLGLGGMSGAGK.A | 71 | R.IATETLEKLMK.D | 52 |
| | | R.ELDEYGHYMYR.L | 71 | K.QAGENKLVVGSQAR.I | 52 |
| | | R.VVCTSCLPEDLELTD.R | 63 | R.DHHDVSGTDSPPFR.E | 51 |
| | | R.QAIANALR.Y | 63 | R.AYPITDYPK.S | 50 |
| | | R.MLSFGTTTVEGK.S | 80 | R.GMLLFHNAEQVQVCGGER.Y | 47 |
| | | R.AGGGIGFTTR.C | 79 | R.AASEAELK.A | 41 |
| Imidazolona propionase (<i>T. cruzi</i>) Banda 2 | Cepa CL Brener Tc00.1047053508741.140 Massa: 47274 Da | K.CNVTDTPCEGK.V | 77 | K.SGYGLERDELK.M | 35 |
| | | R.MLSFGTTTVEGK.S | 67 | R.IAPPPARK.L | 31 |
| | | K.LNGASYMDVQR.A | 62 | R.AHEFTMK.L | 31 |
| | | R.CGSLEVGK.W | 48 | R.RVLEAGR.K | 31 |

Tabela 2 - Análise por espectrometria de massas das bandas 1 e 2 provenientes da interação *TcUH-TcIP* recombinantes. Identificação da proteína isca *TcUH* e seus respectivos peptídeos através do programa *Mascot Search Results*. Para essa proteína, foram detalhados peptídeos cujos *scores* foram iguais ou superiores a 50, pois se tratando da proteína “isca”, mostrou-se muito mais abundantes. A proteína de interesse, *TcIP* também foi detectada e, como resultado da análise foram expostos os peptídeos cujos *scores* foram superiores a 30. Os peptídeos encontrados nessa análise foram identificados mediante confronto desses dados contra a base de dados do NCBI.

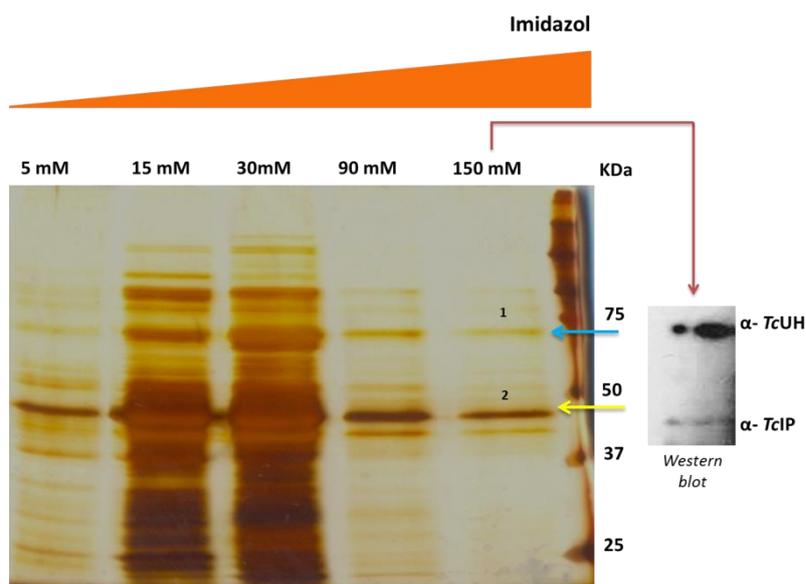


Figura 20 -Interação entre as proteínas *TcUH-TcIP* mediante expressão e purificação recombinante, usando *TcIP* como isca. Gel de SDS-PAGE 10%, corado com AgNO_3 . As frações demonstradas correspondem à lavagem (5 mM imidazol) e eluições obtidas em função do aumento da concentração de imidazol, variando de 15 a 150 mM. À direita temos um *western blotting* representativo da fração “150 mM imidazol”, usando os soros anti-*TcUH* e anti-*TcIP* (1:1000). Ambas as proteínas foram detectadas, nos tamanhos esperados; *TcUH* (≈ 75 kDa) e *TcIP* (≈ 50 kDa). As setas azuis correspondem à *TcUH* e as amarelas à *TcIP*, ambas encontradas na altura esperada.

Os resultados obtidos até o momento mostraram que, ao menos nas condições testadas, *TcUH* e *TcIP* estariam interagindo *in vitro*. Para confirmar estes resultados, consideramos necessária a utilização de uma metodologia que permitisse a purificação do complexo em condições mais próximas às fisiológicas, eliminando assim a possibilidade de um falso positivo na interação de ambas as proteínas. Elegemos a técnica de purificação por afinidade em tandem ou *TAP-Tagging*, como próxima abordagem.

4.7.2 A interação *TcUH-TcIP* ocorre em condições fisiológicas: Purificação por Afinidade em Tandem - *TAP-Tagging*.

4.7.2.1 Amplificação e clonagem das sequências *TcUH* e *TcIP* em vetor pTEX-*TAP-Tagging*

Como exposto anteriormente, buscamos a padronização de uma metodologia que permitisse a purificação do complexo em condições mais próximas ao fisiológico. Elegemos a técnica de *Purificação por Afinidade em Tandem* ou *TAP-Tagging* em combinação com a análise final das proteínas por espectrometria de massas. Basicamente, o sistema de *TAP-Tagging* consiste em utilizar uma etiqueta constituída de três grandes domínios no extremo C-terminal: uma proteína A de *Staphylococcus aureus*, com seus dois domínios de ligação à IgG

e um peptídeo de ligação à calmodulina (*Calmodulin Binding Protein* - CBP), separado por um sítio de clivagem (TEV protease). O plasmídeo pTEX-TAP-Tagging (pTTG) foi gentilmente cedido pelo Dr. Esteban Serra, da Universidade de Rosário, Argentina, e se encontra originalmente clonado com outro inserto, sendo importante, assim, uma etapa prévia de retirada desse inserto para que os atuais genes de interesse pudessem ser clonados.

As construções pTTG-*TcUH* e pTTG-*TcIP* foram obtidas mediante a amplificação inicial de tais sequências (cujos números sistemáticos já foram anteriormente relatados) do genoma total de formas epimastigotas de *T. cruzi*, usando iniciadores específicos com sítios de clivagem para XbaI e HindIII, previamente inseridos (**Figura 21 A**). Em um segundo momento, ambos o vetor e as sequências de interesse foram digeridos com as enzimas de restrição citadas, para posterior reação de ligação e consequente clonagem, resultando nas construções pTTG-*TcUH* e pTTG-*TcIP* (**Figura 21 B**). Após a transformação de *E. coli* XL1Blue com essas construções, clones foram analisados por PCR de colônia, por digestão com enzimas de restrição, onde se observou a liberação dos fragmentos específicos, no tamanho esperado, aproximadamente 2.000 pb para *TcUH* e 1.300 pb para *TcIP* (**Figura 21 C**), bem como PCR das construções e sequenciamento automático a fim de confirmar se as sequências se encontravam efetivamente em fase de leitura (**Figura 21 D**).

4.7.2.2 Confirmação dos epissomos por *western blotting* e imunofluorescência

Logo após o sequenciamento das construções, formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas (ver 3.6.1) e as populações provenientes das duas linhagens mutantes (*TcUH* e *TcIP*) foram selecionadas utilizando geneticina (G418). O *T. cruzi* é sensível a G418 e isso pôde ser revertido pela inserção do vetor pTEX-TAP-Tagging, que confere resistência a G418, permitindo o uso deste como marcador de seleção no ensaio de transfecção. A verificação da presença do epissomo, bem como a expressão da proteína de fusão foi realizada por ensaios de *western blotting* com anticorpo contra calmodulina – CBP (**Figura 22 A**) e também contra as respectivas proteínas de interesse, *TcUH* e *TcIP* (**Figura 22 B**). Ambos os ensaios, onde fizemos uso dos anticorpos citados, provaram a presença dos epissomos nas linhagens pTTG-*TcUH* e pTTG-*TcIP*, passíveis de detecção nos *blottings* demonstrados.

Também nos interessou verificar o quão homogênea estava a população de parasitas em relação à presença do epissomo e, por isso, fizemos um ensaio de imunofluorescência indireta usando como anticorpo primário anti-CBP e o anticorpo secundário, anti-IgG de

camundongo conjugado à sonda Alexafluor488 (1:400), para ambas linhagens; finalmente como marcador de DNA total usamos a sonda *Hoechst* 33258. Como demonstrado na **Figura 22 C**, há indícios de uma distribuição homogênea da fluorescência, mostrando que a seleção foi eficiente. Como podemos observar, há uma expressão protéica levemente mais acentuada nas frações onde colocamos as concentrações mais altas de G418 (tendo em mente que carregamos a mesma quantidade de amostra), sendo assim, ambas as linhagens foram mantidas em cultivo sob pressão seletiva contínua com LIT 10% SFB + G418 200 µg/mL.

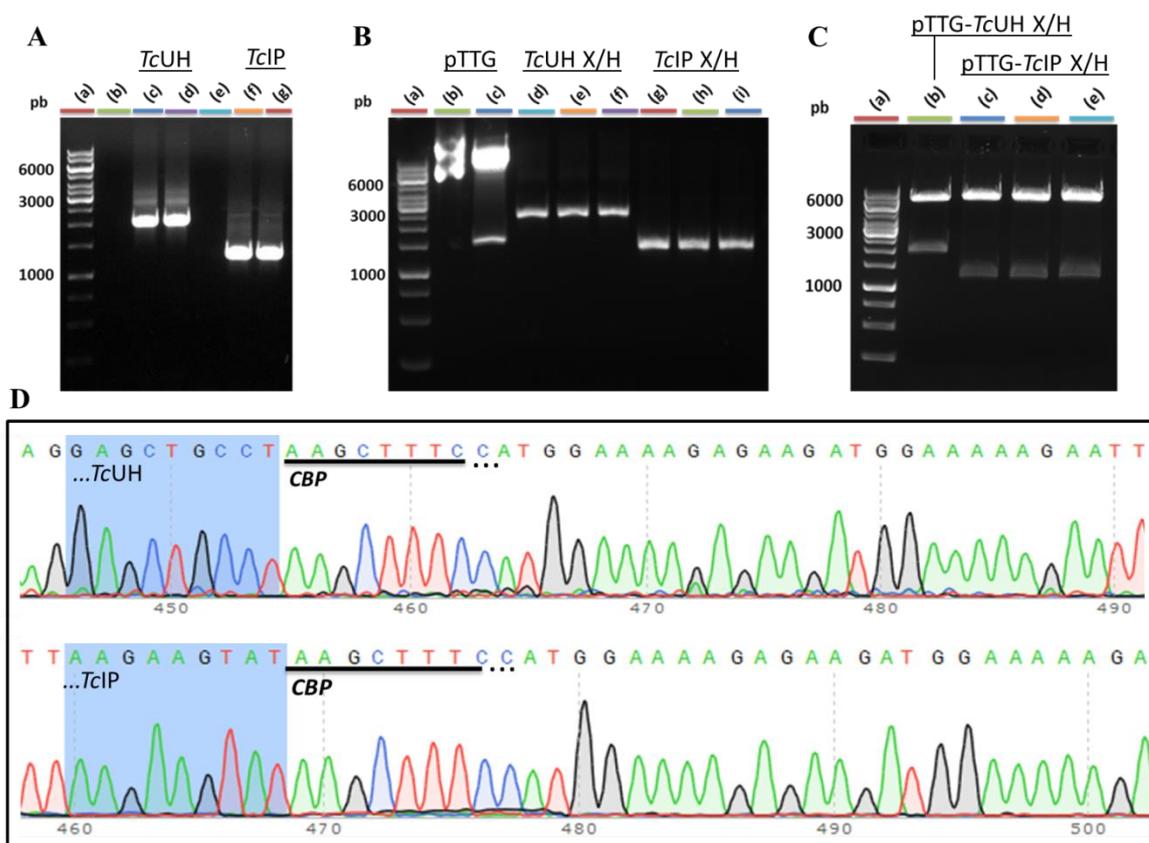


Figura 21 - Amplificação da TcUH e TcIP do genoma de *T. cruzi* e clonagem em vetor pTEX-TAP-Tagging. **A.** Amplificação dos genes TcUH (c e d), na altura aproximada de 2.000 pb e TcIP (f e g), na altura aproximada de 1.300 pb, a partir do genoma total de *T. cruzi*, obtido pela reação de PCR. Em (b) e (e) temos o controle negativo de ambas as reações de PCR correspondentes a cada gene. **B.** Digestão do vetor pTEX-TAP-Tagging (c) e TcUH (d, e, f) e TcIP (g, h i) com as endonucleases previamente inseridas nos primers, XbaI e HindIII. Em (b) temos o plasmídeo fechado. **C.** Verificação das construções usando as endonucleases de restrição XbaI e HindIII, liberando as seqüências de interesse, TcUH em (b) e TcIP (c, d e). Em (a) temos o marcador de massa molecular. **D.** Demonstração das seqüências clonadas em fase de leitura com o peptídeo de ligação à calmodulina (CBP), confirmadas por sequenciamento automático. Em azul, destaca-se o final da seqüência codificante para TcUH (parte superior da figura) e TcIP (parte inferior da figura).

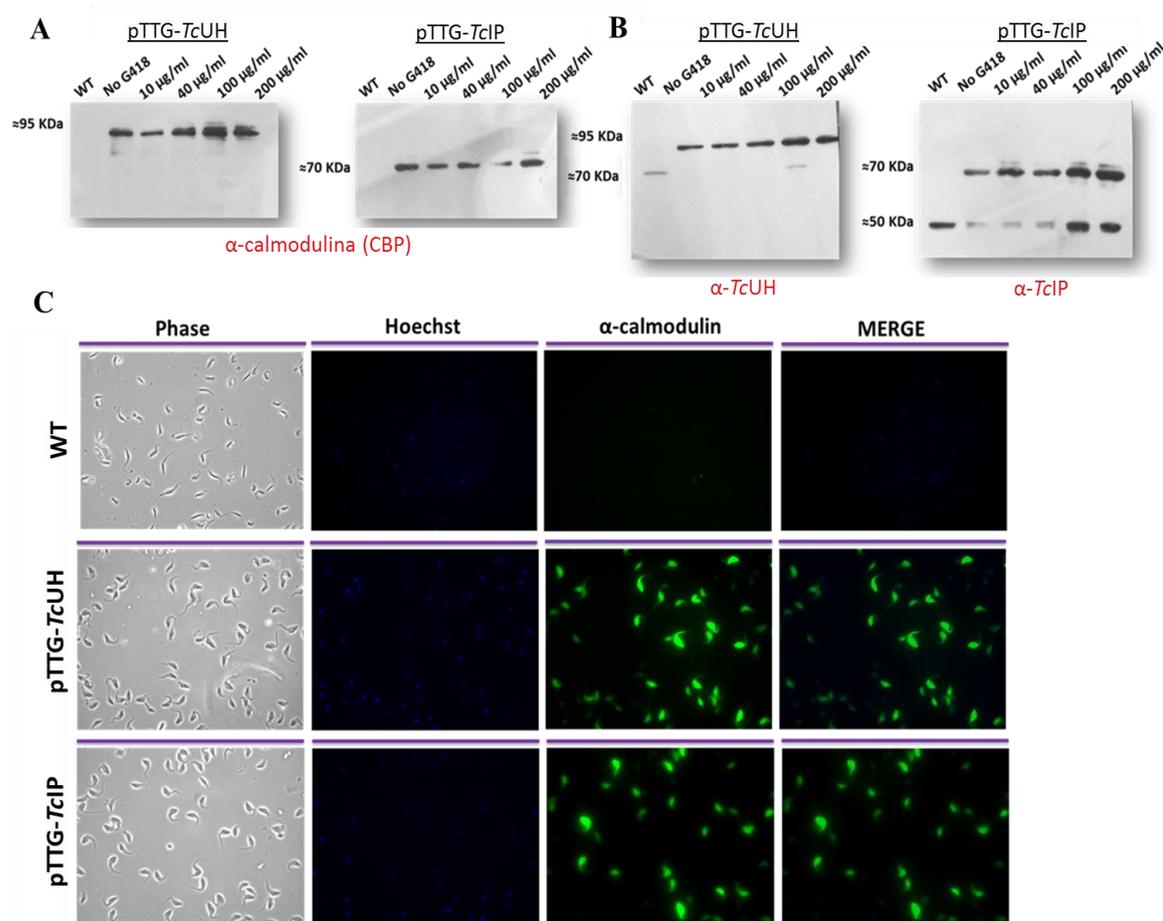


Figura 22 - Ensaio de western blotting e imunofluorescência indireta para identificar a presença dos episossomos UH e IP nas linhagens celulares transfectadas. Western blotting usando diferentes anticorpos, com o objetivo de identificar os episossomos, bem como verificar se a concentração de geneticina (G418) teve algum efeito sobre a expressão gênica das enzimas clonadas relacionadas. As concentrações testadas foram 10, 40, 100 e 200 µg/mL. Além disso, foi feito um controle sem G418 para cada condição e os parasitas tipo selvagem. **A.** Em primeiro lugar, utilizou-se o anticorpo contra a calmodulina 1:10.000 (*Calmodulin Binding Protein*), como vemos à esquerda para pTTG-TcUH e à direita para pTTG-TcIP. **B.** Também neste sentido, os anticorpos contra TcUH à esquerda e contra TcIP, à direita foram empregados nas mesmas condições da amostra. O tamanho dessas proteínas é consequência de seu massa original mais a etiqueta (21 kDa) codificada pelo plasmídeo, sendo aproximadamente 95 e 70 kDa, para UH e IP, respectivamente; **C.** Ensaio de imunofluorescência com anticorpo anti-calmodulina (CBP) para avaliar a homogeneidade das populações transfectadas de ambas as linhagens quanto à marcação com anti-calmodulina (1:100); comparação entre as populações de parasitas mutantes pTTG-TcUH e pTTG-TcIP, com o tipo selvagem (*wt*), não marcado, usado como controle desse experimento. Para marcação de núcleo e cinetoplasto usamos *Hoechst* (1:2.000).

4.7.2.3 Demonstração da formação do complexo TcUH-TcIP a partir de extratos de epimastigotas de *T. cruzi*

O método de purificação de proteínas por afinidade em tandem ou *Tandem Affinity Purification* consiste em dois passos de purificação por afinidade sequenciais, tendo por objetivo diminuir a presença de contaminantes nas amostras a serem analisadas. É importante ressaltar que, neste trabalho, investimos um período considerável na padronização desse

método, que não fazia parte das rotinas do nosso laboratório, e não tinha sido testado até o momento para a cepa CL 14.

A princípio, na primeira etapa de purificação, extratos de formas epimastigotas transfectados com pTTG-*TcUH* ou pTTG-*TcIP* foram crescidos em larga escala e processadas conforme detalhado (3.6). Frações solúveis advindas de tais extratos, contendo o provável complexo proteico fusionado à etiqueta de proteína A e calmodulina (seja da linhagem mutante pTTG-*TcUH* ou pTTG-*TcIP* usadas como “isca”), foram incubados com a resina de IgG-Sepharose durante 16 h, visto que a proteína A tem dois domínios de ligação à IgG. Passado esse período, seguiram-se sucessivas lavagens e uma fração dessa amostra inicial, correspondente à matriz de IgG ligada ao provável complexo *TcUH-TcIP* (denominada eluato 1), foi coletada, separada e desnaturada para posteriormente ser aplicada e resolvida em gel de SDS 10%. O restante da amostra inicial foi tratada com a protease TEV, a fim de romper a ligação do provável complexo *TcUH-TcIP* da matriz de IgG, preparando essa fração para incubação com a matriz de calmodulina (segundo passo dessa purificação). No entanto, após repetir tal experimento algumas vezes, notamos que não obtivemos sucesso na etapa de clivagem com TEV, para ambas as linhagens mutantes. Sendo assim, não tínhamos quantidades significativas de proteínas para seguir com a segunda etapa de purificação e, por isso, somente a primeira purificação foi feita. Do dito, o eluato 1 de cada uma das purificações, onde alternamos a proteína isca entre *TcUH* e *TcIP*, foi resolvido em um gel SDS 10% e posteriormente seguiu-se coloração com AgNO₃. O gel resultante encontrase demonstrado na **Figura 23**, onde a seta amarela corresponde à proteína *TcUH* fusionada à etiqueta de proteína A e calmodulina, as setas pretas e os correspondentes números indicam as bandas de interesse que foram cortadas do gel e analisadas por espectrometria de massas. A identificação se deu com o programa *Mascot Search Results*. As estrelas correspondem às cadeias pesada (em vermelho) e leve (em azul) da imunoglobulina G. O parâmetro *score*, fornecido pelo programa *Mascot* corresponde à uma “pontuação” estatística para o quão bem os dados experimentais coincidem com a base de dados do NCBI; o *score* dado para uma proteína trata-se da soma de cada peptídeo individualmente detectado, levando em consideração parâmetros específicos, como por exemplo a massa de cada peptídeo e a razão massa/carga individual dos mesmos, para todos os peptídeos que correspondam à proteína.

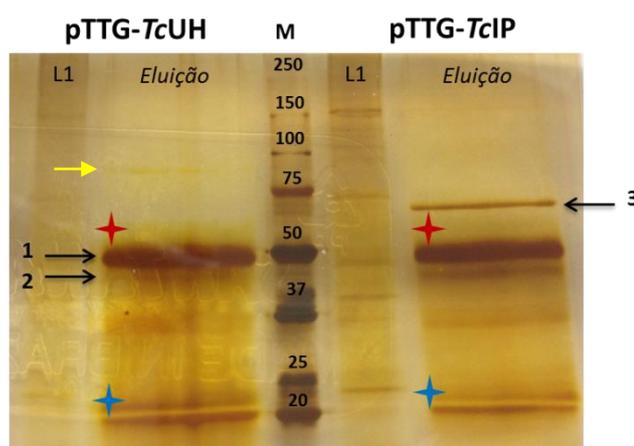


Figura 23 - Purificação do complexo *TcUH-TcIP* por TAP-Tagging. Gel de SDS 10% corado com AgNO_3 . Para ambas as linhagens, L1 (50 μL de amostra aplicada) representa uma fração de lavagem após a incubação do extrato solúvel com a matriz de IgG Sepharose *overnight* e a Eluição (100 μL de amostra aplicada) corresponde à fração de proteínas que se ligaram à matriz de IgG atreladas a proteína isca (UH ou IP). À esquerda, linhagem pTTG-*TcUH*, onde indica-se em amarelo a *TcUH* fusionada à proteína A + CBP (72 kDa + 21 kDa *tag* \approx 90 kDa); as setas pretas indicam as bandas 1 e 2, que em função de seu massa molecular aparente (aproximadamente 50 kDa), se mostraram sugestivas como possível *TcIP* e foram cortadas e analisadas por MS. À direita, linhagem pTTG-*TcIP*, onde a seta preta indicando a banda 3, que, de acordo com seu massa molecular estimado (65-75 kDa), se encontra numa altura compatível com a *TcIP* fusionada à proteína A + CBP (47 kDa + 21 kDa *tag* \approx 68 kDa), bem como a proteína de interesse *TcUH* (\approx 72 kDa). Essa banda, por resultar mais promissora, foi cortada e analisada por MS. As estrelas correspondem às cadeias pesada (em vermelho) e leve (em azul) da imunoglobulina G.

A interpretação dos dados brutos provenientes da análise por espectrometria de massas das bandas 1 e 2, fração denominada Eluição - pTTG-*TcUH*, não resultaram na proteína de interesse *TcIP*, onde nesse caso, usamos a proteína *TcUH* fusionada à cauda de proteína A + calmodulina como isca. Como resultado conjunto dessa análise, foi identificada, majoritariamente a proteína isca *TcUH*, sequência Tc00.1047053504045.110, urocanato hidratase, cepa CL Brener, cuja massa estimada é 75.406 Da, como demonstrado na **Tabela 3**.

Mais especificamente, estabelecendo como limite um *score* de 30, foram encontrados cerca de 24 peptídeos comuns para ambas as bandas, e algumas sequências peptídicas únicas para cada banda, sendo 5 delas, exclusivas para banda de número 1 e as 16 restantes, para banda identificada com número 2. Ainda nesse sentido, a análise da banda 1 ainda resultou na proteína β -tubulina (Tc00.1047053506563, massa estimada de 50.352 Da), compreendendo cinco peptídeos, cujos *scores* variaram de 45-69 e, para a banda 2, encontramos ainda uma Glutamil carboxipeptidase (Tc00.1047053507657.20, massa estimada de 44.212 Da), com um *score* de 47. Na **tabela 3**, foram identificados os peptídeos para *TcUH* cujo *score* foi igual ou superior à 50, para ambas as bandas (como apenas a proteína isca foi identificada e, por consequência sempre aparece mais abundante, identificamos nesse trabalho somente os peptídeos cujos *scores* dados foram mais altos, a título de simplificação). Em relação ao fato

de não identificarmos a proteína de interesse *TcIP*, acreditamos que isso se deu ao fato de que, nessa altura (em torno de 50 kDa) também se encontra a banda referente à cadeia pesada da IgG e, como essa se encontra em quantidade abundante, poderia estar gerando um sinal de intensidade elevado, mascarando um sinal de menor intensidade.

| Nome da proteína | Identificação | Peptídeo | Score b1/b2 | Peptídeo | Score |
|--|---|--------------------------------|----------------|---------------------------------------|-------|
| Urocanato hidratase (<i>T. cruzi</i>) | Cepa CL Brener Tc00.1047053504045.110 Massa: 75406 Da | K.GPVVLSR.D | 55/50 | R.AWSGNACGHEAMLR.A* | 70 |
| | | K.LMLLWDVNLGVTR.R | 91/62 | R.FWDYGNISFLLASR.A* | 71 |
| | | R.ELDEYGHYMYR.L | 68/59 | K.VVLTSGLGGMSGAGK.A* | 81 |
| | | K.EAVSIGFLGNVTVWER.L | 69/67 | K.ELDESVPHAPK.R** | 54 |
| | | R.WVCTSCLPELLELTD.R | 87/77 | R.RAWSGNACGHEAMLR.A** | 68 |
| | | R.AGAEVWTPDDTVR.S | 53/42 | R.QVAAINEMSAR.G + Oxidation (M)** | 69 |
| | | K.VVLTSGLGGMSGAGK.A | 82/71 | K.VVLTSGLGGMSGAGK.A + Oxidation (M)** | 92 |
| | | K.YLGVEDLAGK.V | 61/63 | K.MMVEDPAMFK.E + Oxidation** | 62 |
| | | R.ILYADCEGR.Q | 59/60 | R.ELDEYGHYMYR.L + Oxidation (M)** | 50 |
| | | R.KYLGVEDLAGK.V | 68/81 | R.FWDYGNISFLLASR.A** | 67 |
| | | R.VEGLHVTVPQHVHPDVLK.K | 56/61 | — | — |
| | | R.ETSPLYDGSSLTADMAVQNVIGDAFR.G | 129/56 | — | — |

Tabela 3 - Análise por espectrometria de massas das bandas 1 e 2 advindas da purificação do complexo *TcUH-TcIP* por TAP-Tagging, usando *TcUH* como isca. Identificação da proteína isca *TcUH* e seus respectivos peptídeos através do programa *Mascot Search Results*. Nessa tabela, apenas foram detalhados peptídeos cujos scores foram superiores a 50. Na terceira coluna dessa tabela, temos os peptídeos comuns para ambas as bandas e os scores para as bandas 1 e 2, respectivamente (b1/b2). Já na quinta coluna, temos alguns peptídeos correspondentes à *TcUH*, que foram detectados exclusivamente para banda 1 (representado por um asterisco *) ou para banda 2 (representado por dois asteriscos **). Os peptídeos encontrados nessa análise foram identificados mediante confronto desses dados contra a base de dados do NCBI.

Com relação à banda 3, fração denominada Eluição - pTTG-*TcIP*, tivemos como resultado, tanto a proteína *TcIP* fusionada à cauda de proteína A + calmodulina, usada como isca, como a proteína de interesse *TcUH*, sendo portanto possível demonstrar a formação do complexo *TcUH-TcIP* em formas epimastigotas. A **Tabela 4** traz uma análise detalhada desse resultado. Estabelecendo como limite um *score* de 30, foram encontrados 15 peptídeos diferentes referentes à sequência Tc00.1047053508741.140, imidazolona propionase, cepa CL Brener, cuja massa estimada é 47.274 Da (na **tabela 4**, foram identificados os peptídeos cujo *score* foi igual ou superior à 50). Em relação à proteína de interesse *TcUH*, foram identificados 3 peptídeos diferentes referentes à sequência Tc00.1047053504045.110, urocanato hidratase, cepa CL Brener, cuja massa estimada é 75.406 Da. Outras proteínas como *Heat shock protein (T. cruzi, HSP70, massa estimada de 71.478 Da)*, compreendendo 12 peptídeos, cujos *scores* variaram de 30-69 e uma Piruvato fosfato diquinase, (Tc00.1047053506297.190, cepa CL Brener, massa estimada de 101.623 Da), compreendendo 3 peptídeos, cujos *scores* variaram de 25-36.

| Nome da proteína | Identificação | Peptídeo | Score |
|---|---|---|-------|
| Imidazolona propionase (<i>T. cruzi</i>) | Cepa CL Brener Tc00.1047053508741.140 Massa: 47274 Da | R.DVVEVQLPAVMQER.A | 86 |
| | | K.WADVLLHAPR.W | 85 |
| | | R.AGGGIGFTTR.C | 84 |
| | | R.MLSFGTTTVEGK.S + Oxidation (M) | 81 |
| | | K.LNGASYMDVQR.A | 77 |
| | | R.AASEAELK.A | 65 |
| | | R.MLSFGTTTVEGK.S | 63 |
| | | K.CNVTDTPCEGK.V | 60 |
| | | R.GMLLFHNAEQVVQVCGGER.Y + Oxidation (M) | 57 |
| Urocanato hidratase (<i>T. cruzi</i>) | Cepa CL Brener Tc00.1047053504045.110 Massa: 75406 Da | K.VVLTSLGGMMSGAGK.A + Oxidation (M) | 71 |
| | | K.VVLTSLGGMMSGAGK.A | 55 |
| | | R.IATETLEK.L | 32 |
| | | — | — |

Tabela 4 - Análise por espectrometria de massas da banda 3 advinda da purificação do complexo TcUH-TcIP por TAP-Tagging, usando TcIP como isca. Identificação da proteína isca TcIP, bem como da proteína à ela associada (TcUH), e seus respectivos peptídeos através do programa *Mascot Search Results*. Nessa tabela, para a proteína isca TcIP, apenas foram detalhados peptídeos cujos *scores* foram superiores a 50, por razões já explicadas no texto acima. Para a nossa proteína de interesse, TcUH, foram expostos os peptídeos cujos *scores* foram superiores a 30. Os peptídeos encontrados nessa análise foram identificados mediante confronto desses dados contra a base de dados do NCBI.

4.8 Demonstração da ramificação na via: o metabolismo de degradação de His é operativo em apenas dois passos enzimáticos.

Conforme relatado anteriormente, a decomposição não enzimática do intermediário IPA a α -KG, na presença de oxigênio, foi descrita na literatura em um sistema químico. Esse fato levou-nos a considerar a possibilidade de que houvesse uma ramificação não enzimática (curto-circuito) na via de degradação de His. De fato, um trabalho anterior nos alertou sobre a possível existência desse passo não enzimático, que foi estudado *in vitro*. No entanto, estudos de uma possível ocorrência desta ramificação em organismos vivos não têm sido reportados na literatura até o momento. Neste trabalho, nos dispusemos a demonstrar essa nova configuração do catabolismo de His, sugerindo que poderia ser operacional se valendo apenas de duas etapas enzimáticas. Para tanto, usamos leveduras *S. cerevisiae*, da cepa W303-1A, que não possuem nenhuma das enzimas que intervêm na oxidação de His.

4.8.1 Obtenção de leveduras mutantes capazes de expressar as enzimas TcHAL e TcUH

Inicialmente, as duas primeiras enzimas da via de degradação de His de *T. cruzi* foram clonadas e transformadas em leveduras da cepa W303-1A. Nesse sentido, a enzima TcHAL foi clonada em vetor p426GPD, gerando a construção p426GPD-TcHAL, e a TcUH em vetor pYEP351, resultando na construção pYEP351-TcUH. As leveduras foram primeiramente transformadas com a construção p426GPD-TcHAL e, após seleção feita a partir de sua propriedade auxotrófica para uracila, foram usadas para um segundo evento de transformação

com a construção pYEP351-*TcUH*, nesse caso se valendo de sua auxotrofia para leucina. Tendo em mente que a cepa utilizada nesse trabalho é igualmente auxotrófica para triptofano e histidina, tais aminoácidos foram adicionados ao meio de cultura para a realização dos experimentos. Uma linhagem de leveduras mutantes foi gerada e denominada **HU** (*TcHAL* + *TcUH*). Em paralelo, o mesmo processo de transformação e seleção foi realizado com leveduras transformadas com os dois vetores vazios, resultando na linhagem controle ($\emptyset\emptyset$).

Uma vez obtida a linhagem **HU**, foram realizados ensaios de atividade enzimática e *western blotting*, a partir de extratos obtidos de culturas de leveduras transformadas com as enzimas de interesse, a fim confirmar a presença e a atividade enzimática das mesmas. Dessa maneira, para obtenção dos extratos proteicos, procedeu-se conforme relatado no item 3.7.1. Brevemente, cerca de 25 mL de cultura foi crescida em meio mínimo definido, suplementado com os devidos aminoácidos auxotróficos, até que se atingisse uma DO_{600nm} entre 1 e 2 e então processadas utilizando pérolas de vidro para lise celular, visando a obtenção da fração solúvel; a concentração de proteínas totais foi determinada pelo método de Bradford, usando BSA como padrão.

A partir de extratos proteicos obtidos foi medida a atividade da *TcHAL* e *TcUH* como descrito em materiais e métodos. Os resultados obtidos para as enzimas *TcHAL* (**Figura 24 A e B**) e *TcUH* (**C e D**) mostram que ambas apresentam uma cinética ajustável à uma curva hiperbólica segundo o modelo proposto por Michaelis-Menten. Os valores de K_m e V_{max} aparentes foram calculados e obtivemos para *TcHAL*, K_m aparente de $0,452 \pm 0,127$ mM e V_{max} aparente de $0,078 \pm 0,06$ mmols. $\text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ e, para *TcUH*, K_m aparente de $8,604 \pm 5,45$ μM e V_{max} aparente de $0,026 \pm 0,006$ $\mu\text{mols} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Em relação aos ensaios de *western blotting* (**Figura 24 E e F**), foi utilizado cerca de 30 μg de extrato proteico tanto da linhagem **HU**, quanto da linhagem controle ($\emptyset\emptyset$); as proteínas foram resolvidas em gel de SDS 10% e transferidas para membrana de nitrocelulose, seguindo de bloqueio e incubação da membrana com os soros anti-*TcHAL* e anti-*TcUH*, na diluição de 1:1.000. Através desse ensaio pudemos detectar a presença de ambas as proteínas, cujos tamanhos se apresentaram conforme o esperado, ≈ 50 kDa para *TcHAL* e ≈ 70 kDa para *TcUH*. A fração proteica advinda da linhagem controle não apresentou bandas quando incubada com esses soros.

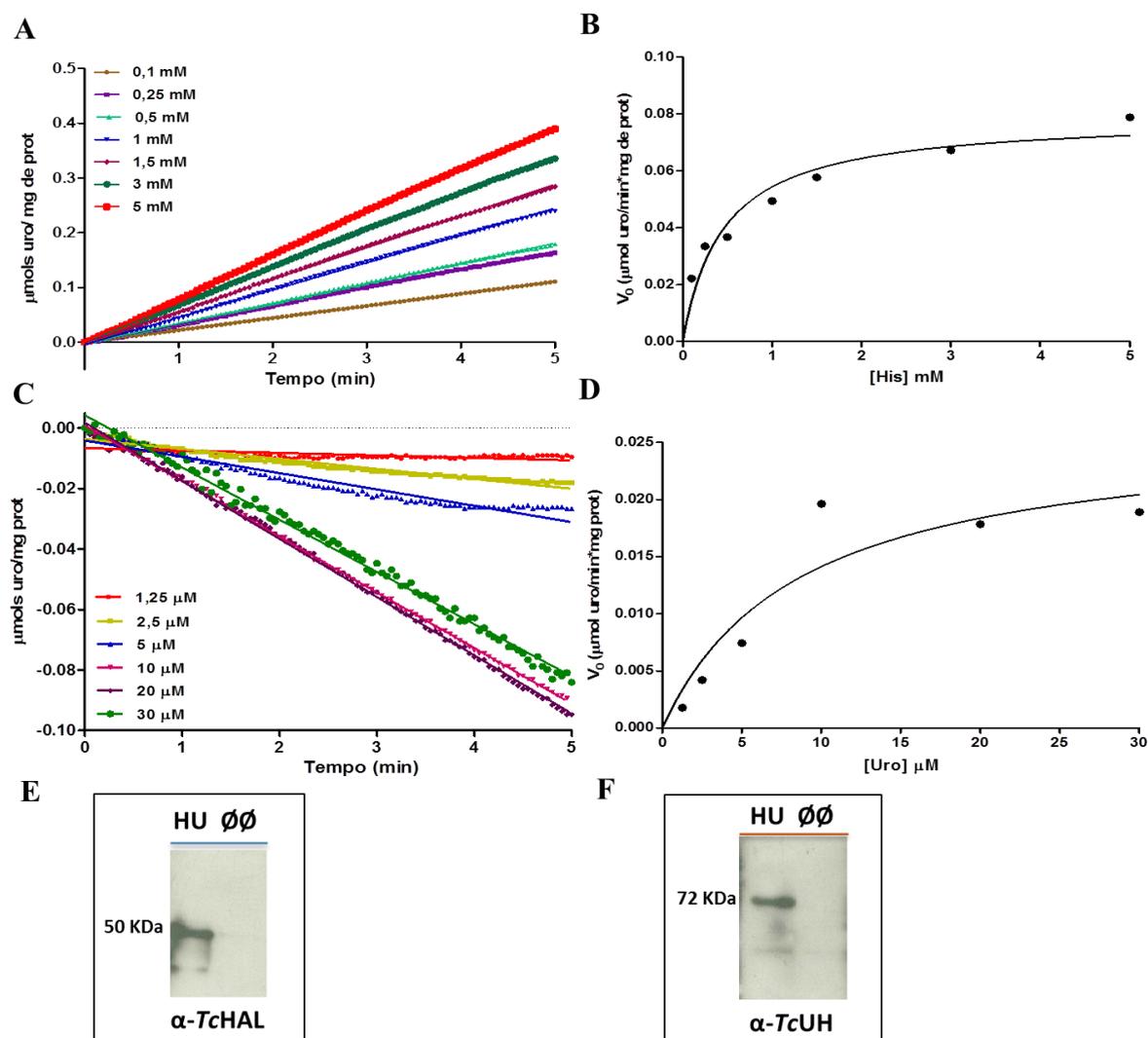


Figura 24 – Ensaio de atividade enzimática e *western blotting* para detecção das enzimas *TcHAL* e *TcUH* em extratos de leveduras mutantes. **A.** Atividade da *TcHAL* em função do tempo. As medições de atividade foram realizadas a partir de ensaios espectrofotométricos em tempo real, monitorando o aumento na absorbância a 277 nm, correspondentes à formação de urocanato (Mehler, 1953). A reação consiste em: 100 mM de tampão Tris-HCl pH=9; 0,1 mM de MnCl_2 ; 1,7 mM de GSH reduzido e as concentrações de His indicadas; água qsp volume final de 1,5 mL. A reação foi iniciada pela adição do extrato proteico obtido a partir de culturas de leveduras da linhagem HU (50-100 μg). A velocidade inicial da reação (V_0) foi calculada na região linear, utilizando o coeficiente de extinção molar para o urocanato ($\text{CEM}_{277\text{nm}} = 1,88 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). **B.** Curva de Michaelis-Menten para *TcHAL*. **C.** Atividade da *TcUH* em função do tempo. As medições de atividade foram realizadas conforme descrito, porém nesse caso, foi monitorado a diminuição na absorbância a 277 nm, correspondente ao desaparecimento do substrato urocanato. A reação para *TcUH* contém: 100 mM de tampão fosfato de potássio pH=7; urocanato, na concentração indicada em cada caso, e água para completar um volume final de 1,5 mL. A reação foi iniciada pela adição de extrato proteico (100 μg). A velocidade inicial da reação (V_0) foi calculada da mesma maneira. **D.** Curva de Michaelis-Menten para *TcUH*. A temperatura de reação para ambas as enzimas foi 28 °C, com agitação contínua. **E e F.** Ensaio de *western blotting* para detecção da proteína de interesse em extratos proteicos HU, utilizando controle proveniente da linhagem transformada com os dois plasmídeos vazios ($\emptyset\emptyset$); em **E** foi usado soro anti-*TcHAL* (1:1.000), resultando na detecção de uma banda na altura aproximada de 50 kDa, correspondente ao esperado para *TcHAL*; em **F**, foi utilizado soro anti-*TcUH* (1:1.000), resultando na detecção de uma banda na altura aproximada de 70 kDa, correspondente a *TcUH*. A incubação da fração proteica advinda da linhagem controle com esses soros não resultou na detecção de bandas

4.8.2 Oxidação de His pela linhagem HU

Se (como proposto) o IPA, produto enzimático da TcUH, fosse espontaneamente oxidado a α -KG, este poderia ser incorporado diretamente ao ciclo de Krebs, onde reações de decarboxilação oxidativa produziriam CO₂. Portanto, a medição de CO₂ proveniente de His seria uma confirmação direta de que os dois primeiros passos enzimáticos da via que interconecta His e Glu seriam suficientes para a completa oxidação de His. Para traçar os átomos de C provenientes da His até CO₂ utilizamos então [¹⁴C]-U-His. Leveduras em fase exponencial de crescimento foram contadas e incubadas com [¹⁴C]-U-His 10 mM e o ¹⁴CO₂ resultante da oxidação foi “capturado” usando uma “armadilha” de CO₂ consistente em papel filtro embebido em 2 M KOH (a abordagem desse experimento encontra-se esquematicamente detalhada na **Figura 25 A**). A quantidade de ¹⁴C recuperada como ¹⁴CO₂, foi medida após 1 h e 4 h de incubação a 30 °C sob agitação constante. Após 4 h de incubação (tempo máximo), foi possível recuperar $0,915 \pm 0,059$ nmols ¹⁴CO₂/min* 25×10^6 células (**Figura 25 B**). Esses resultados demonstram que a via de degradação de His é operativa em apenas dois passos enzimáticos, de forma que o α -KG, resultante da oxidação não enzimática do IPA na presença de O₂, é capaz de alimentar diretamente o ciclo de Krebs.

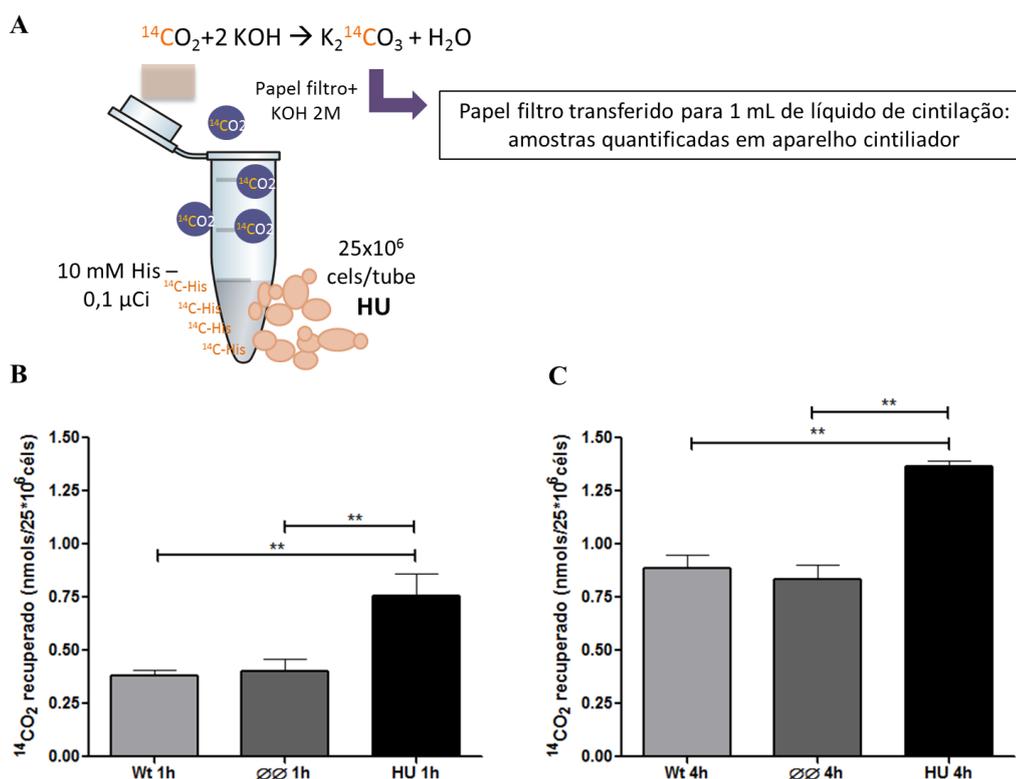


Figura 25 - Produção de $^{14}\text{CO}_2$ de leveduras HU na presença de $[^{14}\text{C}]\text{-His}$. **A.** Representação esquemática da abordagem utilizada para realização desse experimento. Em um tubo *ependorf*, foram incubadas 25×10^6 células juntamente com 10 mM de $[^{14}\text{C}]\text{-His}$ (0,1 μCi) durante 1 e 4 h sob agitação constante, a 30°C ; uma vez que o IPA foi oxidado espontaneamente à $\alpha\text{-KG}$ e esse fez operar o TCA, o $^{14}\text{CO}_2$ liberado dessa reação foi capturado em papel filtro embebido com 2 M KOH, disposto na tampa do tubo, de modo que a reação entre o $^{14}\text{CO}_2$ e KOH formasse $\text{K}_2^{14}\text{CO}_3$ e o papel transferido para 1 mL de líquido de cintilação, seguida de leitura da radioatividade obtida em aparelho cintilador. **B.** $^{14}\text{CO}_2$ foi capturado durante 1 h e, **C.** 4 h, seja para a linhagem **HU**, como paras as linhagens controles: leveduras selvagens da cepa W303-1A (*Wt*) e leveduras transformadas com ambos os vetores vazios ($\emptyset\emptyset$), cujas condições experimentais foram detalhas anteriormente. Conforme se aumenta o tempo de incubação, se observa um aumento na produção de $^{14}\text{CO}_2$ liberado. Como análises estatísticas, foram realizadas comparações independentes entre o grupo *wt* em relação à linhagem HU e do grupo $\emptyset\emptyset$ em relação à linhagem HU, em ambos intervalos de incubação; por isso foi aplicado teste *t*; ** valor de $p < 0,01$.

4.9 Avaliação do papel fisiológico da enzima IP para o *T. cruzi*

Apesar de não ter sido possível atribuir uma atividade para *TcIP* e, mais que isso, termos demonstrado que a via de degradação de His pode ser operativa contando somente com as duas primeiras enzimas -*TcHAL* e *TcUH*-, ainda permaneceu a questão sobre a funcionalidade da enzima *TcIP*, uma vez que, para as demais enzimas da via foi possível demonstrar uma atividade – a *TcHAL* e *TcUH* foram descritas pela Dra. Maria Julia Barison em sua tese de doutorado, enquanto que a *TcFG* foi descrita por Hai e colaboradores. Sabemos que, além da atividade enzimática, outras abordagens permitem realizar estudos de funções das enzimas, dentre elas o nocaute gênico e a superexpressão. Nesse trabalho,

geramos linhagens mutantes que superexpressam a *TcIP* e fizemos uma ampla caracterização fenotípica desses parasitas.

4.9.1 Construção e validação do superexpressor pTEX-*TcIP*

Com o intuito de avaliar se a inserção de uma cópia ectópica da ORF *TcIP*, no parasita, resultaria num fenótipo que estivesse correlacionado à bioenergética, infectividade, resistência à estresses, dentre outros, partimos para a geração de mutantes superexpressores para esta enzima. Para tornar possível a construção do superexpressor para *TcIP*, fizemos uso do plasmídeo pTEX, conforme descrito por Kelly (Kelly, 1992). A construção pTEX-*TcIP* foi obtida mediante digestão da construção pTTG-*TcIP* (enzimas de restrição XbaI e HindIII) para obtenção da sequência; posteriormente para o vetor pTEX, foi realizada reação de digestão com as mesmas endonucleases relatadas. Após purificação dos produtos, seguiu-se reação de ligação e, após a transformação de *E. coli* XL1Blue, clones foram analisados por PCR de colônia; seguida de PCR das construções positivas e reação de digestão, onde se observou a liberação dos fragmentos específicos, no tamanho esperado, aproximadamente 5.600 pb para o vetor e 1.300 pb para *TcIP* (**Figura 26 A**). Foram ainda realizadas reações de sequenciamento para confirmação final. Uma vez obtida a construção, formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas (ver 3.6.1) e a população mutante foi submetida à seleção utilizando geneticina (G418); a pressão seletiva inicial foi realizada mediante a utilização de 500 µg/ml e, após seleção, os parasitas foram mantidos em LIT 10% SFB G418+ 200µg/ml. Como mencionado, o G418 pode ser empregado como marcador de seleção uma vez que o vetor pTEX reverte o fenômeno de sensibilidade do parasita selvagem (*wild type* ou *wt*) ao antibiótico.

Partimos então para validação da superexpressão da *TcIP*. As comparações foram realizadas entre parasitas do tipo selvagem, parasitas controle transfectados com o vetor vazio (denominados pTEX_v ou pTEX_∅) e aqueles que apresentavam uma cópia ectópica da ORF *TcIP* (pTEX-*TcIP*). Para constatar se a presença do epissomo era capaz de alterar os níveis de expressão proteica da *TcIP*, em detrimento aos parasitas selvagens e a linhagem pTEX_∅, foram realizados ensaios de *western blotting* usando o soro anti-*TcIP* e o normalizador anti-*TcGAPDH*. Como observado na **Figura 26 B**, parte superior, observamos um leve aumento na expressão da *TcIP* na linhagem superexpressora pTEX-*TcIP*, com respeito aos controles. Porém, os níveis proteicos para a *TcGAPDH* não se mostraram perfeitamente constantes nas

três linhagens, apesar de termos carregado a mesma quantidade de amostra inicial no gel de poliacrilamida (equivalente à 100 µg por condição). Embora a densitometria de bandas (parte inferior da **Figura 26 B**) seja capaz de mostrar diferenças observadas na expressão da *TcIP* na linhagem pTEX-*TcIP*, essas são discretas e não julgamos como conclusivas. Nesse sentido, partimos para realização da técnica de ELISA, um ensaio imunoenzimático quantitativo, usando extratos de formas epimastigotas das três linhagens mencionadas e empregando os mesmos soros anteriormente citados para detecção da proteína e normalização. Os resultados obtidos estão demonstrados na **Figura 26 D** e sugerem que a cópia adicional inserida (*TcIP*) confere um aumento na expressão proteica. Os valores foram normalizados em relação à expressão proteica da *TcGAPDH* e, posteriormente contra o grupo *wt*. Além disso, esse perfil observado também foi corroborado pela intensidade de fluorescência observada nos parasitas imunomarcados com o soro anti-*TcIP*, seguido de incubação com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à sonda Alexa Fluor-488 e o DNA foi marcado com a sonda *Hoechst* 33258 (**Figura 26 C**). Para descartar um possível efeito da superexpressão no crescimento das formas epimastigotas, uma curva de proliferação foi realizada, onde parasitas foram contados diariamente em câmara de Neubauer, durante nove dias. Não se observam diferenças de crescimento dos parasitas da linhagem pTEX-*TcIP*, em relação às linhagens controles (**Figura 26 E**).

4.9.2 Caracterização fenotípica dos parasitas superexpressores para *TcIP* frente ao estresse metabólico

Durante seu ciclo de vida natural, *T. cruzi* enfrenta diferentes condições de estresse, às quais, muitas vezes o parasita responde através de mecanismos que envolvem metabólitos importantes, como os aminoácidos. Assim, resolvemos avaliar o comportamento fenotípico de parasitas superexpressores para a enzima *TcIP*, em relação aos controles advindos das linhagens selvagem (*wt*) e pTEX \emptyset , quando submetidos às condições de estresse nutricional. A fim de avaliar o perfil dos parasitas superexpressores para *TcIP* frente ao estresse nutricional, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento, crescidas em meio LIT, foram lavadas, transferidas para meio PBS e incubadas por diferentes tempos, a 28°C. Como primeira abordagem, utilizamos o método de detecção de viabilidade com resazurina.

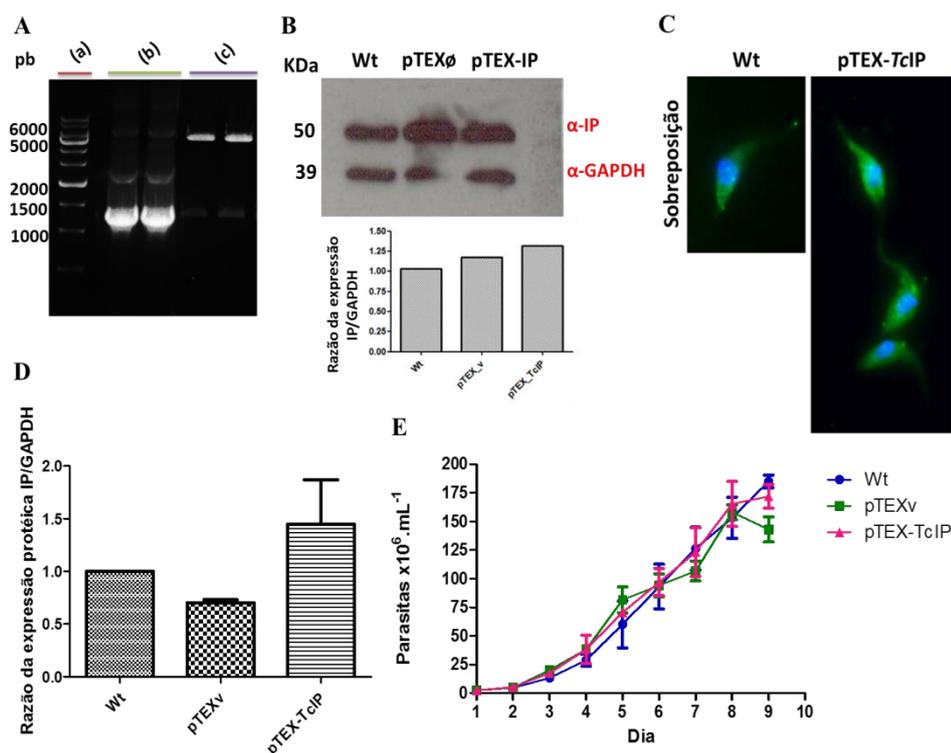


Figura 26 – Análise de expressão protéica e perfil de crescimento da linhagem superexpressora para a TcIP. **A.** Verificação das construções pTEX-TcIP mediante PCR (b) e por digestão usando as endonucleases de restrição XbaI e HindIII (c), liberando os fragmentos correspondentes ao vetor pTEX (5.600 pb) e à TcIP (1.300 pb). Em (a) temos o marcador de massa molecular. **B.** Na parte superior temos *western blotting* partindo de extratos de formas epimastigotas da linhagem pTEX-TcIP, bem como das linhagens controles *wt* e pTEX \emptyset , usando os soros anti-TcIP e anti-TcGAPDH, esse último como normalizador; na parte inferior temos a representação gráfica da razão da expressão TcIP/TcGAPDH obtida por densitometria de bandas. **C.** Análise por IFI em formas epimastigotas obtidas a partir das linhagens *wt* e pTEX-TcIP, usando soro anti-IP (1:100) e a sonda *Hoechst* (1:2.000) como marcador de DNA total. **D.** Análise da expressão protéica das três linhagens pela técnica de ELISA; foram utilizados 100 μL por poço de extratos de formas epimastigotas de cada linhagem; o experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica e os valores no gráfico (eixo-y) representam as médias ($n=3$) do experimento. **E.** Curva de crescimento de epimastigotas (*wt*, pTEX \emptyset e pTEX-TcIP) cultivadas em meio LIT. As curvas foram iniciadas com de $2,5 \times 10^6$ células/mL e contadas diariamente em câmara de Neubauer por 9 dias.

A resazurina é um corante azul que é efetivamente reduzido na mitocôndria, o que o torna útil para estudar a atividade metabólica mitocondrial. Assim, parasitas advindos das culturas *wt*, pTEX \emptyset e pTEX-TcIP foram distribuídos em placas (100 μL por poço), em triplicata e acrescidos 10 μL do corante resazurina (12,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Para cada condição, os parasitas foram contados e, após decorridas 2 h de reação (protegida da luz) foi mensurada a emissão de fluorescência (excitação: λ 530 nm e emissão: λ 590 nm), de modo que pudéssemos estimar a viabilidade de acordo com a fluorescência emitida, normalizando pelo número de células (**Figura 27 A**). As primeiras “2 h de incubação” são uma referência ao que chamaríamos de tempo zero, porém, como é necessária uma incubação de 2 h com o corante resazurina, aqui denominados esse ponto inicial, quando os parasitas são retirados do meio LIT, como o tempo de 2h. Observa-se que entre as linhagens celulares analisadas, não há diferenças de

viabilidade após 2, 24 ou 48 h de estresse. Mais que isso, apontamos para o fato de que os parasitas mutantes para *TcIP* apresentam um comportamento de resposta ao estresse nutricional semelhante ao tipo selvagem, não caracterizando portanto, um fenótipo de maior ou menor sensibilidade à carência de metabólitos.

Sabe-se que o IPA pode ser convertido espontaneamente a α -KG, conduzindo este metabólito diretamente ao ciclo de Krebs. Por outro lado, a via pode também operar através de quatro reações enzimáticas, gerando Glu, que pode tanto ser convertido a α -KG quanto ser utilizado na biossíntese de moléculas importantes para o parasita, como Pro e Gln. Os equivalentes de redução gerados via TCA são capazes de alimentar a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, gerando ATP como produto final através da fosforilação oxidativa. Assim, nos interessou saber qual seria o comportamento dos parasitas da linhagem pTEX-*TcIP*, bem como os respectivos controles (*wt* e pTEX \emptyset) quando submetidos a carência metabólica em PBS por 30 h, seguida de recuperação com His. Esse período de estresse teve por objetivo promover a redução dos metabólitos intracelulares, de forma que o parasita ainda se mantivesse viável e capaz de responder a um novo estímulo metabólico. Nesse sentido, após esse intervalo de tempo, os parasitas foram então recuperados (ou não, no caso do controle com PBS) com 1 mL de His 5 mM, durante 1 h a 28 °C. Posteriormente, os parasitas foram centrifugados e ressuspensos em 200 μ L de PBS + 200 μ L de tampão de lise e imediatamente congelados em N₂ para posterior quantificação de ATP. O conteúdo de ATP intracelular foi determinado mediante a reação entre a luminescência obtida via reação da luciferase e o ATP liberado após a lise celular (**Figura 27 B**). Como podemos observar, a linhagem pTEX-*TcIP*, é capaz de recuperar os níveis de ATP intracelulares, quando His é utilizada como substrato oxidável, quando comparada ao controle somente com PBS. Mais que isso, podemos ainda observar uma tendência de resposta ao estresse e posterior recuperação semelhante ao observado para parasitas *wt* (Barison et al., 2016). No tocante aos parasitas da linhagem pTEX \emptyset , embora sejam capazes de recuperar os níveis de ATP, não se observam diferenças significativas quando usamos His como substrato.

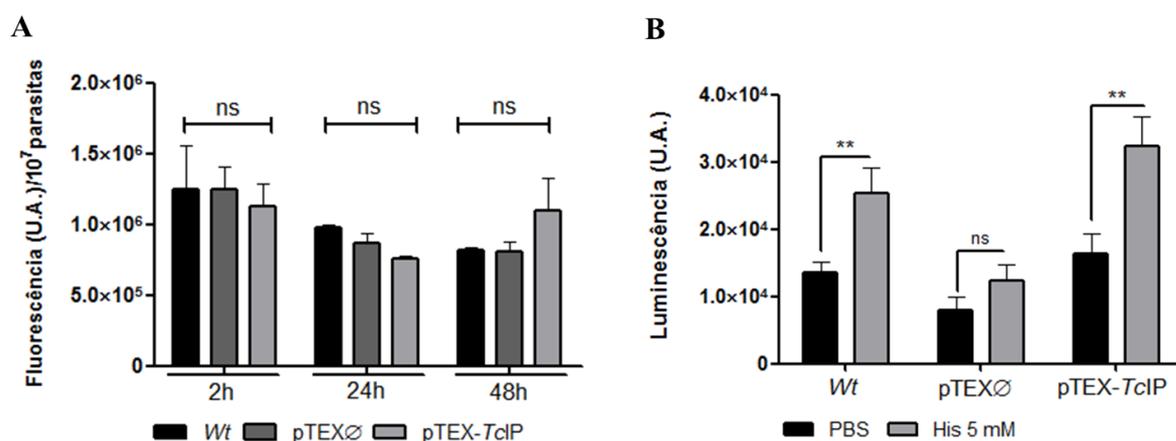


Figura 27 - Perfil do superexpressor *TcIP* frente ao estresse nutricional sob distintas abordagens. A. Ensaio de viabilidade utilizando o corante resazurina, no qual os parasitas das linhagens apresentadas foram inicialmente cultivados em meio LIT e então transferidos para PBS e incubados por 24 e 48 h. Após cada período foi adicionado o corante resazurina e decorridas 2 h de incubação foram realizadas leituras de fluorescência, ajustando os valores obtidos por 1×10^7 parasitas. As primeiras 2 h são uma referência ao que chamaríamos de tempo zero, porém, como é necessária uma incubação de 2 h com o corante, aqui denominamos esse ponto inicial, quando os parasitas são retirados do meio LIT, como o tempo de 2 h. (*post-test*: Tukey. ns: valor de $p > 0,05$, em relação à *wt* ou pTEX∅). **B.** Produção de ATP em parasitas submetidos a estresse nutricional de 30 h e recuperados (ou não, no caso do controle com PBS) com His 5 mM. Após recuperação metabólica com His, observou-se um incremento na concentração de ATP intracelular, chamando atenção especialmente para a capacidade da linhagem pTEX-*TcIP* em recuperar a viabilidade dos parasitas após adição de His, de forma semelhante ao controle *wt*. A medição do conteúdo intracelular de ATP foi realizada pelo método da luciferase. *teste t*; ** valor de $p < 0,01$; ns; valor de $p > 0,05$.

4.9.3 Consumo de O_2 a partir da respiração mitocondrial em células íntegras

Uma vez que a linhagem pTEX-*TcIP* não se mostrou sensível ao estresse metabólico ao qual foi submetida e foi ainda capaz de restaurar os níveis de ATP intracelulares de forma semelhante ao controle correspondente aos parasitas selvagens (*wt*), nos interessou avaliar as taxas de respiração dependentes do metabolismo de His tanto nos parasitas superexpressores para *TcIP*, bem como dos respectivos controles (*wt* e pTEX∅).

Sabendo que a degradação de His consegue reestabelecer o potencial de membrana interna mitocondrial, assim como estimular a síntese de ATP através da forforilação oxidativa e o consumo de oxigênio na mitocôndria em parasitas selvagens (Barison et al., 2016), partimos para o experimento seguinte. Para isso, parasitas estressados durante 16 h foram recuperados durante 30 min com His, a 28 °C. Assim, os parasitas recuperados foram adicionados no oxígrafo, contendo tampão de respiração (MRC) e foram medidas as taxas de respiração após a adição das células intactas, seguiu-se a adição de oligomicina A (inibição da fração F_0 da ATP sintase) e finalmente foi acrescido o agente desacoplador FCCP (estímulo máximo da taxa de respiração). Foi observado o consumo de O_2 (respiração celular

dependente de His) em relação ao controle negativo (parasitas em MRC, não recuperados com nenhum substrato oxidável) e a respiração foi inibida na presença de oligomicina, bem como restaurada mediante a adição de FCCP, nas três linhagens descritas acima.

Na **Figura 28**, temos representado as taxas de respiração dos parasitas *wt*, enquanto que na **Figura 29** observamos as referidas taxas para a linhagem de parasitas transfectada somente com o plasmídeo vazio (pTEX \emptyset). Finalmente, na **Figura 30**, estão representadas as taxas de respiração correspondentes aos parasitas que estão superexpressando a *TcIP* (linhagem pTEX-*TcIP*). Como podemos observar, os parasitas superexpressores para *TcIP* apresentam taxas de respiração semelhantes ao controle de parasitas selvagens, embora um pequeno incremento nas taxas de respiração dos parasitas pTEX-*TcIP*, quando recuperados com His possa ser observado, no que diz respeito à respiração de rotina, bem como na respostas à oligomicina A e ao FCCP. A linhagem pTEX \emptyset , no entanto, apresenta taxas de respiração ligeiramente inferiores quando comparadas à linhagem *wt* e pTEX-*TcIP*. A análise estatística resultante de tais comparações encontra-se graficamente demonstrada na **Figura 31**, onde observamos que não existe diferença estatística entre as linhagens, tanto no que diz respeito às taxas basais de respiração, quanto à resposta aos estímulos adicionados, FCCP e oligomicina A.

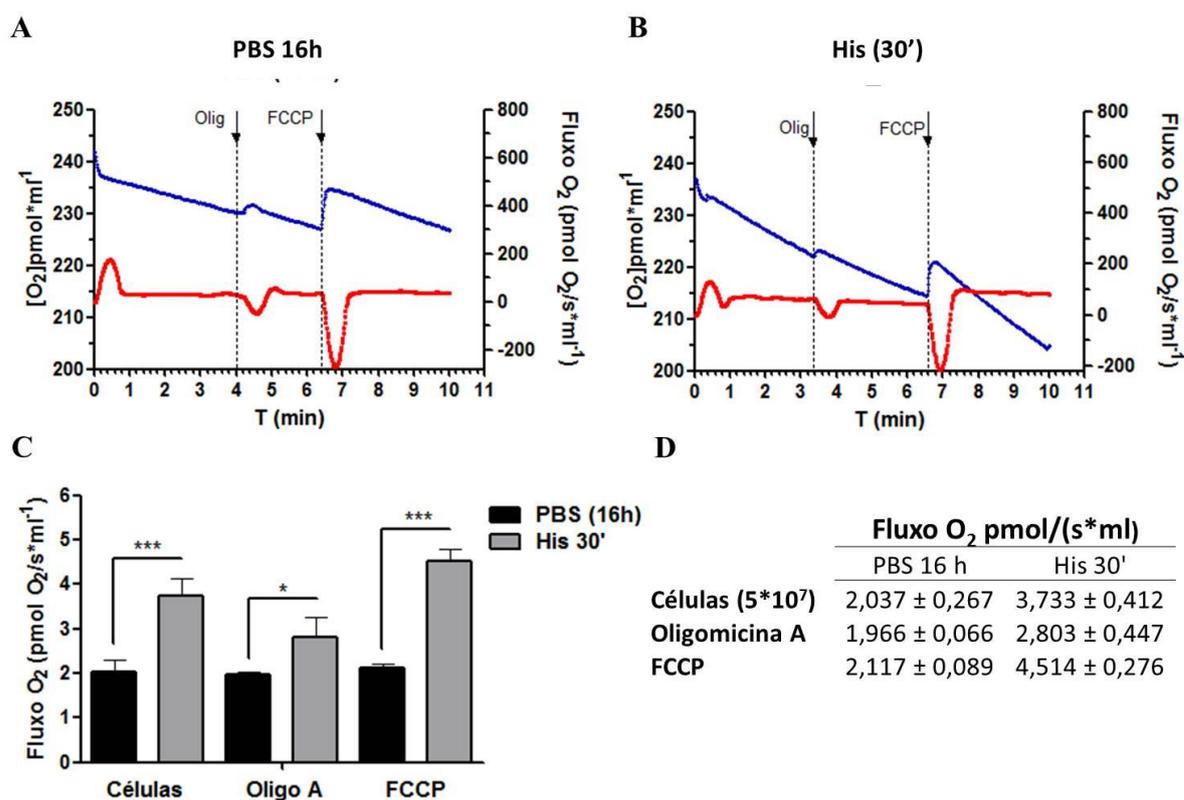


Figura 28 - Taxas de respiração em epimastigotas wt. **A.** Consumo de oxigênio em células estressadas por 16 h e não recuperadas (PBS 16 h) e, em **B.** células que foram recuperadas com His 5 mM durante 30 min. As linhas azuis correspondem à variação na concentração de oxigênio em função do tempo (eixo esquerdo), enquanto que as linhas vermelhas indicam o fluxo de O₂ (eixo direito). **C.** Taxas de respiração medidas após cada agregado no oxígrafo: células estressadas (PBS 16 h) e células recuperadas (His 30'), oligomicina A (5 µg/mL) e FCCP (0,5 µM), bem como a representação gráfica desses valores e a respectiva análise estatística (*teste t*. *** valor de $p < 0,001$; ** valor de $p < 0,01$; * valor de $p < 0,05$). As barras pretas correspondem às taxas de respiração de parasitas não recuperados (PBS 16 h), enquanto que as cinzas correspondem às taxas de respiração de parasitas recuperados com His 5 mM por 30 min. **D.** Representação numérica dos dados apresentados em forma de tabela.

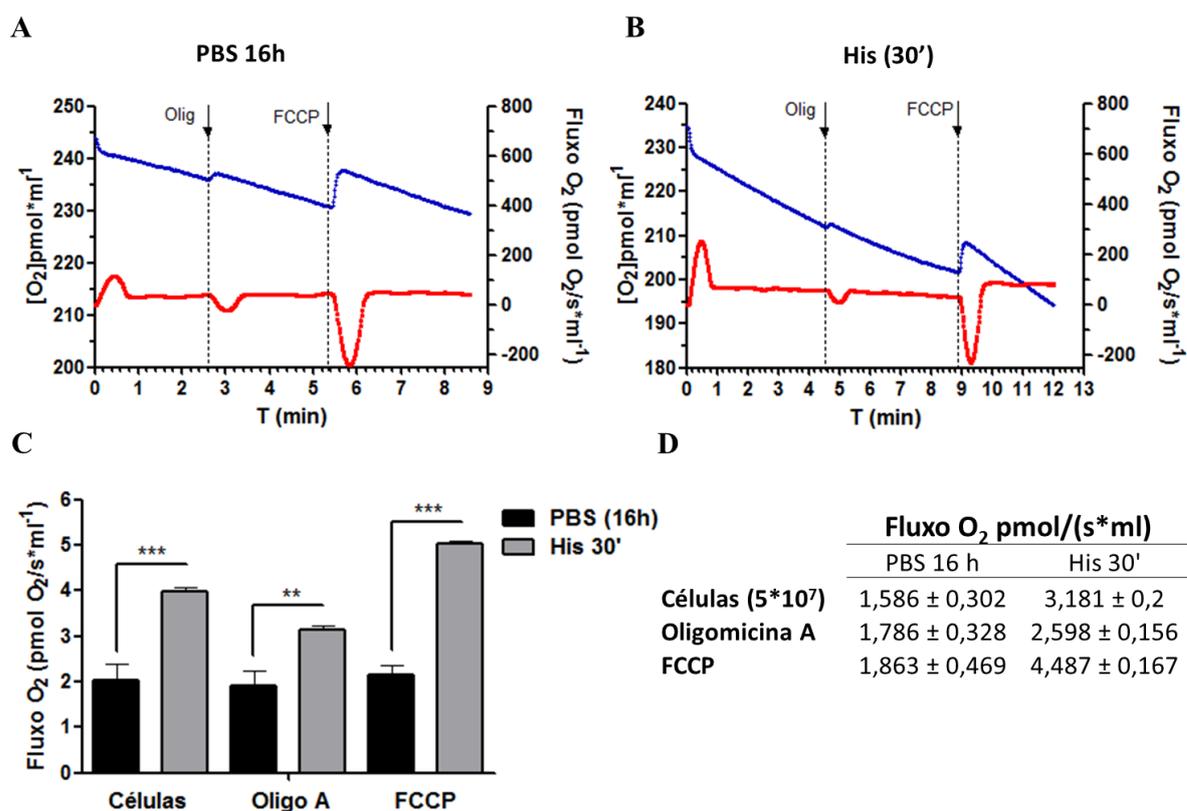


Figura 29 - Taxas de respiração em epimastigotas da linhagem pTEX \emptyset . **A.** Consumo de oxigênio em células estressadas por 16 h e não recuperadas (PBS 16 h) e, em **B**, células que foram recuperadas com His 5 mM durante 30 min. As linhas azuis correspondem à variação na concentração de oxigênio em função do tempo (eixo esquerdo), enquanto que as linhas vermelhas indicam o fluxo de O₂ (eixo direito). **C.** Taxas de respiração medidas após cada agregado no oxígrafo: células estressadas (PBS 16 h) e células recuperadas (His 30'), oligomicina A (5 μ g/mL) e FCCP (0,5 μ M), bem como a representação gráfica desses valores e a respectiva análise estatística (*teste t*. *** valor de $p < 0,001$; ** valor de $p < 0,01$; * valor de $p < 0,05$). As barras pretas correspondem às taxas de respiração de parasitas não recuperados (PBS 16 h), enquanto que as cinzas correspondem às taxas de respiração de parasitas recuperados com His 5 mM por 30 min. **D.** Representação numérica dos dados apresentados em forma de tabela.

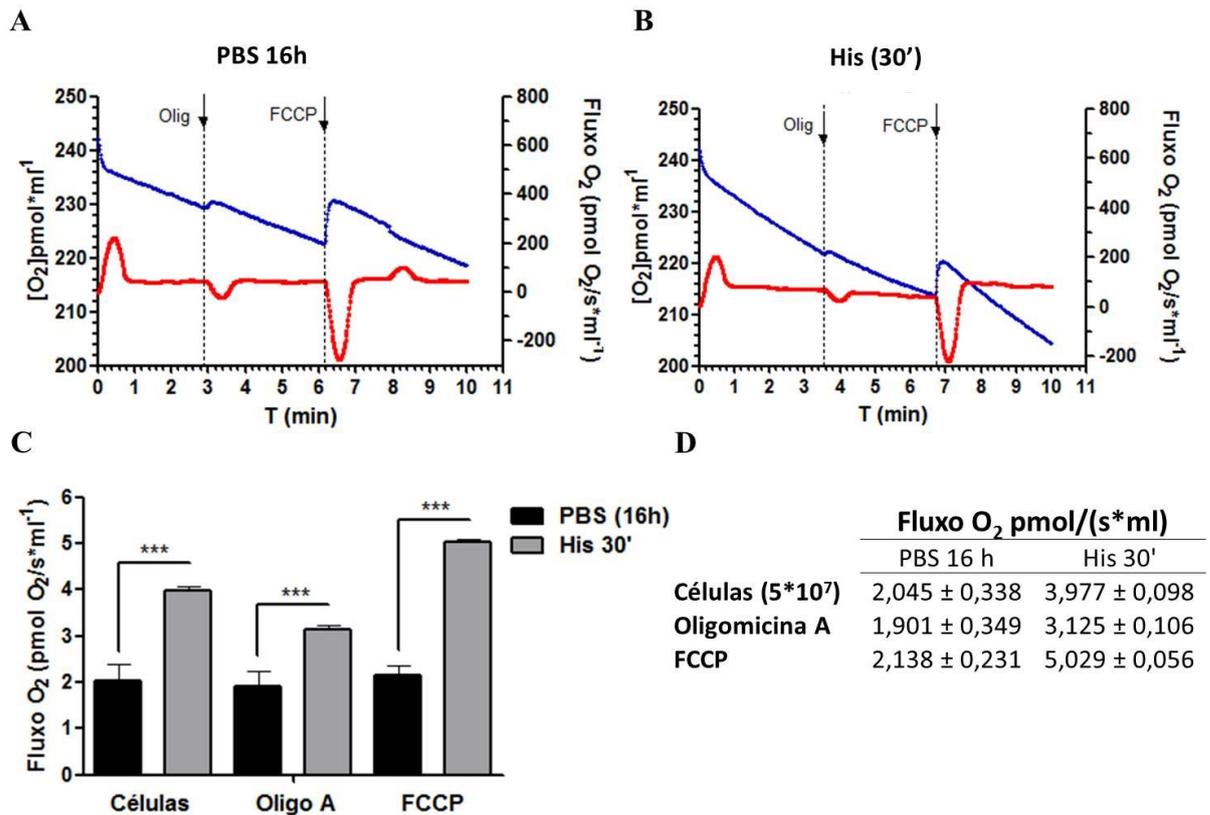


Figura 30 - Taxas de respiração em epimastigotas da linhagem pTEX-TcIP. **A.** Consumo de oxigênio em células estressadas por 16 h e não recuperadas (PBS 16 h) e, em **B**, células que foram recuperadas com His 5 mM durante 30 min. As linhas azuis correspondem à variação na concentração de oxigênio em função do tempo (eixo esquerdo), enquanto que as linhas vermelhas indicam o fluxo de O₂ (eixo direito). **C.** Taxas de respiração medidas após cada agregado no oxígrafo: células estressadas (PBS 16 h) e células recuperadas (His 30'), oligomicina A (5 μg/mL) e FCCP (0,5 μM), bem como a representação gráfica desses valores e a respectiva análise estatística (*teste t*. *** valor de $p < 0,001$; ** valor de $p < 0,01$; * valor de $p < 0,05$). As barras pretas correspondem às taxas de respiração de parasitas não recuperados (PBS 16 h), enquanto que as cinzas correspondem às taxas de respiração de parasitas recuperados com His 5 mM por 30 min. **D.** Representação numérica dos dados apresentados em forma de tabela.

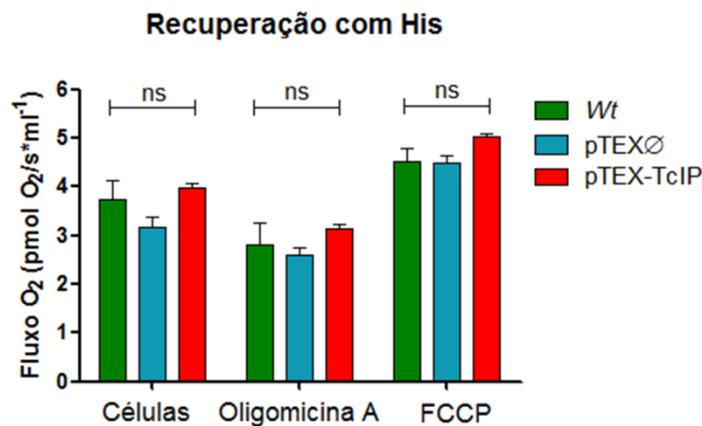


Figura 31 - Análise comparativa das taxas de respiração entre as linhagens wt, pTEXØ e pTEX-TcIP, quando recuperados com His. As linhagens wt, pTEXØ e pTEX-TcIP foram analisadas, quando recuperadas com His durante 30 min, frente às taxas de respiração basais, bem como às respostas ao incremento dos estímulos oligomicina A e FCCP. (*post-test: Tukey*. ns: valor de $p > 0,05$, em relação à wt ou pTEXØ)

4.9.4 Análise da metaciclogênese em parasitas pTEX-TcIP

Em um trabalho anterior do nosso grupo foi demonstrado que His (TAU-His) é capaz de tornar viável o processo de metaciclogênese uma vez que é utilizada como fonte de energia, resultando em taxas de diferenciação similares ao controle (diferenciação em meio TAU-3AAG, tese de Doutorado Maria Julia Barison, dados não publicados. Assim nos pareceu interessante analisar o perfil de diferenciação de parasitas que apresentam a terceira enzima da via de degradação de His superexpressa (linhagem pTEX-TcIP) e, para tanto, realizamos ensaios de metaciclogênese *in vitro*. Nesse contexto, parasitas da linhagem *wt*, pTEX \emptyset e pTEX-TcIP foram diferenciados em meio TAU-3AAG e TAU-His conforme descrito no item 3.2.3.1. Vale ressaltar que, para a cepa CL14, quando a metaciclogênese é realizada em meio TAU-3AAG, o pico de diferenciação das formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas se dá por volta do quinto ou sexto dia, atingindo uma porcentagem média de até 30%. Seguindo o racional desse experimento, os parasitas provenientes do sobrenadante das culturas, sejam esses epimastigotas ou formas tripomastigotas metacíclicas, foram contados diariamente por oito dias e o número de parasitas totais, bem como as porcentagens de diferenciação dos tripomastigotas metacíclicos correspondentes ao quinto dia, se encontram demonstrados na **Figura 32**. Conforme podemos observar, surpreendentemente, parasitas da linhagem pTEX-TcIP, não são capazes de se diferenciar, seja em meio TAU-3AAG ou TAU-His, ao passo que os controles das linhagens *wt* e pTEX \emptyset se diferenciam normalmente. A identificação das formas metacíclicas foi baseada principalmente na morfologia do parasita e, quando passível de visualização, na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo. Quando diferenciados em meio TAU-3AAG, as taxas de metaciclogênese atingem cerca de 25% e 23%, para as linhagens *wt* e pTEX \emptyset , respectivamente (**Figura 32 A**); quando a diferenciação se dá em meio TAU-His (**Figura 32 B**), essas taxas estão na média de 23% e 27%, para as linhagens *wt* e pTEX \emptyset , respectivamente. Conforme já afirmado anteriormente, a linhagem de parasitas transfectados com o plasmídeo pTEX vazio se encontra denominada nesse trabalho como pTEX \emptyset ou pTEXv, sendo essa última denominação usada nessa figura.

O resultado obtido para a linhagem superexpressora TcIP, nos instigou a algumas questões que poderiam estar envolvidas em respostas que justificassem a observação de tal fenômeno. Nesse sentido nos perguntamos se esses parasitas, não capazes de sofrer metaciclogênese, de fato não estavam passando pela transição da posição do núcleo em

relação ao cinetoplasto. Classicamente, durante a metaciclo gênese, formas epimastigotas que se caracterizam pela presença de cinetoplasto anterior ao núcleo, sofrem uma mudança em relação ao posicionamento dessas organelas, de forma que os tripomastigotas resultantes da diferenciação possuem cinetoplasto posterior ao núcleo. Em outras palavras, nos interessou observar com mais detalhes a morfologia desses parasitas, bem como daqueles usados como controle, *wt* e pTEX \emptyset , seja a incubação realizada em TAU-3AAG, como em TAU-His. Assim, durante o transcorrer do processo de metaciclo gênese, coletamos diariamente alíquotas de parasitas provenientes dos sobrenadantes das culturas e fixamos em lâminas, usando PBS-3% paraformaldeído. Às lâminas foi posteriormente adicionado o corante de DNA total *Hoechst* 33258 (1:2.000), durante vinte min e as lâminas foram montadas com Fluoromount G. A fluorescência advinda da marcação do núcleo e do cinetoplasto pode ser observada na **Figura 33**, na qual demonstramos a morfologia dos parasitas durante a metaciclo gênese nos dias 4, 5 e 6 após o início do processo de diferenciação. Para aquisição das imagens, foram tomados três campos aleatórios, de cada uma das linhagens citadas, em ambos meios de diferenciação, sendo aqui demonstrado um desses campos.

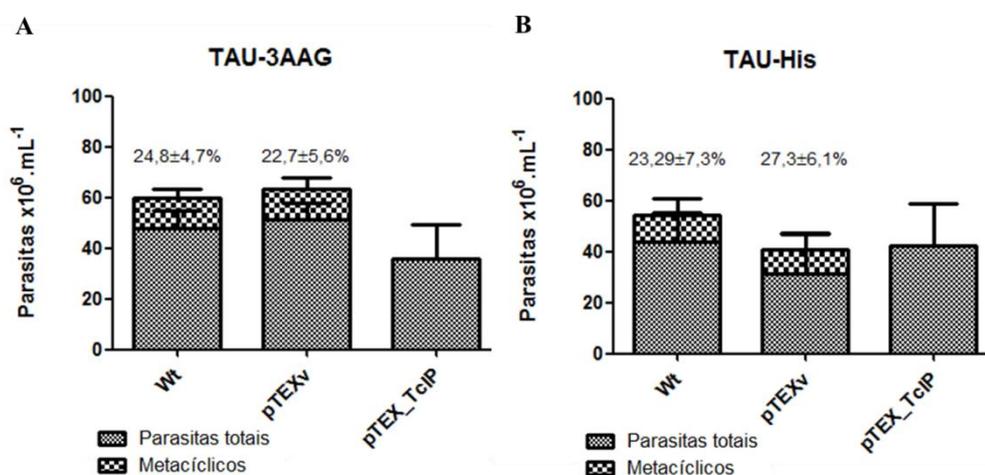


Figura 32 - Análise da metaciclo gênese em parasitas da linhagem pTEX-*TcIP*. A diferenciação das formas epimastigotas foi acompanhada durante oito dias mediante contagem dos parasitas provenientes do sobrenadante das culturas em câmara de Neubauer, sendo aqui representado o quinto dia dessa contagem. A identificação das formas metacíclicas foi baseada principalmente na morfologia do parasita e, quando passível de visualização, na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo, incluindo para os controles *wt* e pTEX \emptyset . **A.** Metaciclo gênese em TAU-3AAG para as linhagens *wt*, pTEX \emptyset (controles) e pTEX-*TcIP*. **B.** Metaciclo gênese em TAU-His para as linhagens *wt*, pTEX \emptyset (controles) e pTEX-*TcIP*. As barras representam os valores da média entre parasitas metacíclicos/totais, determinados a partir de pelo menos três experimentos feitos separadamente (n=3). A porcentagem de metaciclo gênese determinada se encontra na parte superior de cada barra. Na figura, *wt*: parasitas selvagens, pTEX \emptyset : parasitas transfectados com o vetor vazio e pTEX-*TcIP*: parasitas transfectados com o vetor pTEX-*TcIP*.

De forma a corroborar com o que já havia sido demonstrado, os parasitas da linhagem pTEX-*TcIP* de fato não se diferenciam para tripomastigotas metacíclicos, seja em meio TAU-3AAG ou em TAU-His, uma vez que não se observa a transição da posição do núcleo em respeito ao cinetoplasto; pelo contrário, permanecem como formas epimastigotas, com cinetoplasto anterior e próximo ao núcleo. Isso quer dizer que esses parasitas não apresentam a morfologia clássica daqueles provenientes do processo de diferenciação, denominados tripomastigotas metacíclicos, nos quais o cinetoplasto é posterior ao núcleo e a morfologia é alongada e afilada, como observado para os parasitas das linhagens controle *wt* e pTEX \emptyset . Seguindo ainda nessa linha, nos interessou averiguar se os parasitas da linhagem pTEX-*TcIP*, se encontravam viáveis ao longo desse processo. Observações realizadas diariamente com uso de microscopia óptica, mostraram parasitas móveis, porém relatos baseados somente na motilidade não eram suficientes para afirmar se os mesmos estavam viáveis. Em outras palavras, se esses parasitas não eram capazes de passar pela diferenciação, nos perguntamos se os mesmos se mantinham viáveis ou, em função do estresse nutricional, não eram capazes de se sustentar metabolicamente e, por isso não chegavam à diferenciação. Finalmente, para melhor entender essa questão, fizemos uso de um método para detectar a viabilidade empregando o corante resazurina. Assim, ao longo do processo de diferenciação, foram coletados diariamente 300 μ L de parasitas advindos dos sobrenadantes das culturas *wt* e pTEX \emptyset e pTEX-*TcIP*; foram distribuídos 100 μ L por poço, em triplicata e acrescidos 10 μ L do corante resazurina. Para cada condição, os parasitas foram contados e, após decorridas 2 h de reação foi mensurada a emissão de fluorescência, de modo que pudéssemos estimar a viabilidade de acordo com a fluorescência emitida, normalizando pelo número de células, seja para parasitas incubados em meio TAU-3AAG (**Figura 34 A**), como para aqueles incubados com TAU-His (**Figura 34 B**), de forma que os dados encontram-se agrupados como uma média da viabilidade nos dias 4, 5 e 6 após o início do processo de diferenciação. Com base em tais resultados, podemos afirmar que os parasitas da linhagem pTEX-*TcIP*, apesar de não se diferenciarem para tripomastigotas metacíclicos, parecem não sofrer com o estresse nutricional, uma vez que apresentam um perfil de viabilidade semelhantes aos controles *wt* e pTEX \emptyset . De fato, se pensarmos em experimentos anteriores, onde tais parasitas foram submetidos à estresse nutricional em meio PBS e, posteriormente mensurados os níveis de ATP intracelular e as taxas de respiração, vemos que esses mesmos parasitas não parecem sofrer com o estresse metabólico. Embora sejam outras condições experimentais, esses

resultados quando analisados em um panorama geral, corroboram entre si e sustentam o fato de que esses parasitas parecem resistentes ao estresse nutricional.

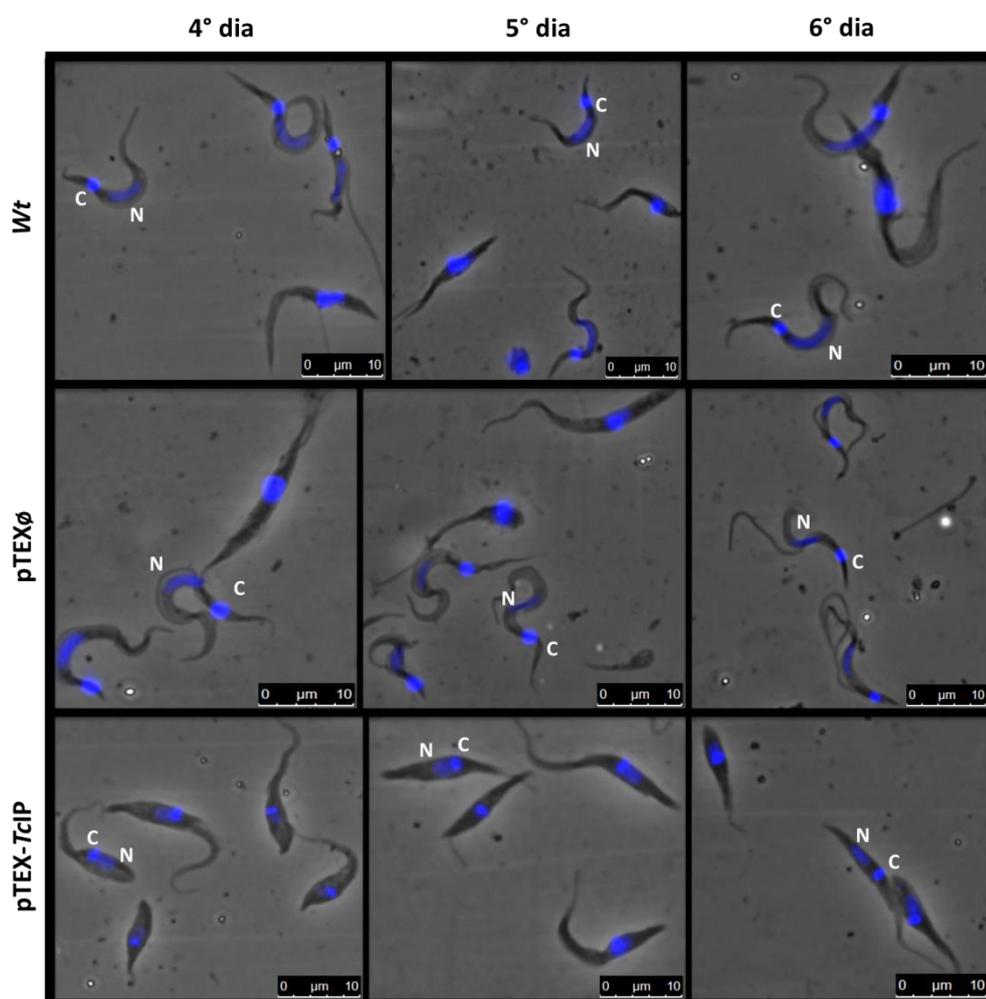


Figura 33 - Morfologia dos parasitas pTEX-TcIP durante a metaciclogênese. Durante os dias 4, 5 e 6 após o início do processo de diferenciação, cerca de 20-50 μ L de parasitas provenientes do sobrenadante das culturas das linhagens *wt*, pTEX \emptyset e pTEX-TcIP foram coletados e fixados com 3% paraformaldeído-PBS e distribuídos em lâminas para posterior incubação com a sonda *Hoechst 33258* (1:2.000), a fim de marcar o núcleo (N) e o cinetoplasto (C). Em cada dia demonstrado na figura e, para cada linhagem, demarcamos o núcleo e o cinetoplasto de um parasita a fim de ilustrar o que foi detalhado no texto acima. Parasitas com cinetoplasto anterior e próximo ao núcleo se caracterizam como formas epimastigotas, que não passaram pela diferenciação. Por outro lado, aqueles que possuem cinetoplasto posterior ao núcleo e morfologia alongada e afilada, são formas provenientes do processo de diferenciação, denominados tripomastigotas metacíclicos. Na figura, *wt*: parasitas selvagens, pTEX \emptyset : parasitas transfectados com o vetor vazio e pTEX-TcIP: parasitas transfectados com o vetor pTEX-TcIP.

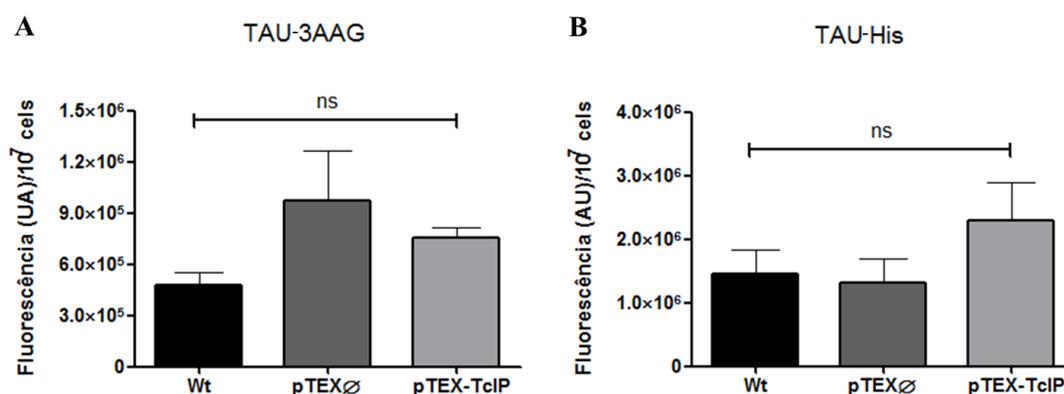


Figura 34 - Viabilidade celular de parasitas da linhagem pTEX-TcIP ao longo da metacicloênese. Ensaio realizado ao longo do processo de diferenciação, no qual os dados foram agrupados como uma média da viabilidade nos dias 4, 5 e 6. Foram coletados diariamente 300 μ L de parasitas advindos dos sobrenadantes das culturas *wt* e pTEX \emptyset (controles) e pTEX-TcIP e distribuídos em placas (100 μ L por poço), em triplicata e acrescidos 10 μ L do corante resazurina. Para cada condição, os parasitas foram contados e foi mensurada a emissão de fluorescência, de modo que pudéssemos estimar a viabilidade celular de acordo com a fluorescência emitida, em função do número de células (1×10^7 céls). **A.** Parasitas incubados em TAU-3AAG. **B.** Parasitas incubados em meio TAU-His. Em ambos os casos, *wt*: parasitas selvagens, pTEX \emptyset : parasitas transfectados com o vetor vazio e pTEX-TcIP: parasitas transfectados com o vetor pTEX-TcIP. *post-test: Tukey*. ns: valor de $p > 0,05$, quando comparada a linhagem pTEX-TcIP em relação à *wt* ou pTEX \emptyset .

5.1 Perspectivas no estudo de His e sua via de degradação

Estudos relacionados à via de degradação de His em *T. cruzi* começaram a ser desenvolvidos há cerca de sete anos pelo nosso grupo. Até então, não havia relatos na literatura sobre o papel desse aminoácido na biologia do parasita e como operava sua via de degradação. Os conhecimentos adquiridos a respeito desse aminoácido revelaram que His desempenha um papel abrangente para a biologia do *T. cruzi*, que vai muito além de sua utilização na síntese de proteínas. Sabe-se que esse aminoácido pode ser incorporado do meio extracelular pelas formas epimastigotas mediante um sistema de transporte único que foi caracterizado previamente pelo nosso laboratório como dependente de ATP. Nesse trabalho, mostrou-se ainda que a forma tripomastigota metacíclica também pode incorporar His, porém, com menor eficiência quando comparada à forma epimastigota (Barison et al., 2016). Do trabalho descrito, foi possível sugerir que His parece ser importante para os estágios do parasita presentes no hospedeiro invertebrado. De fato, foi relatado que His é o aminoácido livre majoritário, tanto na hemolinfa, como nos fluídos excretados do vetor *Rhodius prolixus* (Harington, 1956a, 1961b). A abundância de His nesse e outros insetos hematófagos é um reflexo de sua participação ativa como componente da hemoglobina (Vickery, 1942). Dessa maneira, formas epimastigotas de *T. cruzi*, em detrimento de outros cinetoplastídeos, parecem particularmente adaptadas para usufruir dessa fonte de energia no intestino do inseto vetor. Mais que isso, constatou-se que o *T. cruzi* é capaz de utilizar His como fonte de energia para manter sua viabilidade celular (Barison et al., 2016), em níveis similares aos demonstrados para Pro, anteriormente descrita como relevante em termos de bioenergética para o parasita (Martins et al., 2009; Paes et al. 2013; Mantilla et al. 2015).

A via clássica de degradação de His a Glu, seguida de sua conversão a α -KG e posterior oxidação completa desse intermediário no ciclo de Krebs, foi demonstrada quando $^{14}\text{CO}_2$ pode ser recuperado após incubação de parasitas com [^{14}C]-His, tornando evidente que este aminoácido é descarboxilado através da sua oxidação via TCA. Além disso, alguns dos parâmetros bioenergéticos foram analisados em relação à His: após carência metabólica severa, His restaurou a viabilidade celular e $\Delta\Psi_m$, em níveis comparáveis aos que resultam de uma recuperação realizada com um meio otimizado para a replicação dessas células, como o LIT. Ainda nesse sentido, a produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa e o consumo de oxigênio nas mitocôndrias foram demonstrados em parasitas tratados com His em magnitudes comparáveis às obtidas quando os parasitas foram recuperados com Pro, ambos

após estresse nutricional (Barison et al., 2016). Em contraste ao observado para *T. brucei* e *Leishmania major*, o genoma de *T. cruzi* codifica para enzimas capazes de catalisar a conversão de His em Glu. Classicamente, a via de degradação de His se dá em quatro passos enzimáticos que consistem na oxidação desse aminoácido a Glu e, posteriormente, a α -KG que irá alimentar o ciclo de Krebs. No tocante às enzimas envolvidas na via de degradação de His em *T. cruzi*, as duas primeiras enzimas envolvidas nessa via (*TcHAL* e *TcUH*) foram previamente estudadas e uma caracterização bioquímica e molecular foi realizada (tese de Doutorado María Júlia Baríson, 2015). Em relação à terceira e quarta enzimas (*TcIP* e *TcFG*, respectivamente), foram encontradas duas fases de leitura abertas codificantes para a *TcIP* (Tc00.1047053509137.30 e Tc00.1047053508741.140) e duas fases abertas de leitura correspondentes a *TcFG* (Tc00.1047053507963.20 e Tc00.1047053507031.90).

5.2 *TcIP* e seus homólogos

Em relação à terceira enzima da via de conversão de His em Glu, a IP, realizamos uma busca por sequências de proteínas correspondentes a essa proteína no banco de dados UniProt. Nesse banco foi possível ter acesso a uma ampla gama de informações, uma vez que reúne dados provenientes de projetos de sequenciamento de genoma de várias espécies. Nesse sentido, a enzima IP está amplamente distribuída no domínio **Bacteria** (cerca de 9.867 espécies), onde é encontrada especialmente no grupo filogenético Proteobacteria, que inclui as bactérias gram-negativas, Terrabacteria, um táxon que integra os filos de bactérias gram-positivas e o clado FCB (assim denominado pelas siglas dos grupos que o formam, Fibrobacteres, Chlorobi e Bacteroidetes). A IP também está presente nos domínios **Archaea** (abrangendo cerca de 250 espécies), e **Eukaryota** (compreendendo 216 espécies). Dentro deste último, evidentemente podemos encontrar os tripanossomatídeos, os fungos e os mamíferos, incluindo *Homo sapiens*.

Em relação aos tripanossomatídeos, a *TcIP* aparece anotada como duas sequências nos bancos de dados de genoma da cepa CL Brener, sendo uma delas identificada como *Esmeraldo-like* e a outra, como não-*Esmeraldo-like*; ainda foi possível identificá-la na cepa de *T. cruzi marinkellei*. Porém, quando procurados os homólogos da enzima de *T. cruzi* no TriTrypDB, não foram identificadas sequências para IP em nenhum dos grupos de *T. brucei* ou das espécies de *Leishmania*. Entretanto, foi possível verificar a presença de sequências ortólogas para IP em *T. grayi*, *T. rangeli* e *T. theileri*.

5.2.1 *Trypanosoma grayi*

T. grayi é conhecido como um tripanossomatídeo africano, um parasita extracelular que transita na corrente sanguínea de crocodilos e, embora seja transmitido por moscas tsé-tsé, como acontece com o *T. brucei*, está intimamente relacionado a outros parasitas de crocodilos na América do Sul (Fermino et al., 2013). Ainda nesse sentido, diferente do *T. brucei*, a transmissão do *T. grayi* se dá entre répteis pela contaminação oral com formas metacíclicas infectivas presentes nas fezes da mosca ou diretamente pela ingestão das mesmas (Hoare, 1929a, b). Esta estratégia de transmissão fecal é empregada por outros tripanossomas, incluindo *T. cruzi*. Apesar das semelhanças citadas, análises das sequências gênicas sugerem que *T. grayi* não possui antígenos de superfície do tipo VSG, como *T. brucei*, nem o revestimento de mucinas característico de *T. cruzi*. Assim, acredita-se que o *T. grayi* pode ter desenvolvido uma família alternativa de genes de antígenos de superfície primários, ou mesmo ter desenvolvido uma nova estratégia de evasão imunológica orientada para a sobrevivência na corrente sanguínea reptiliana (Manna et al., 2013).

Técnicas abordadas, como a reconstrução filogenética ou a análise por BLASTp, demonstram que *T. grayi* está mais relacionado com *T. cruzi* do que com *T. brucei*. Do dito, faz sentido que a enzima IP esteja presente no genoma de *T. grayi* e não seja encontrada uma sequência ortóloga em *T. brucei*, uma vez que, como ressaltado anteriormente, *T. cruzi* se encontra mais relacionado a *T. grayi*. De fato, esse achado corrobora o que foi descrito (dados não publicados) para *TcHAL* e *TcUH*. Se considerarmos ainda que *T. cruzi* e *T. grayi* possuem diferentes vetores, mas compartilham da mesma forma de transmissão, levanta-se como hipótese a possibilidade de que a aquisição da via de degradação de His esteja relacionada à essa circunstância.

5.2.2 *Trypanosoma theileri*

No que diz respeito ao *T. theileri*, esse é um hemoprotozoário parasita, transmitido por moscas da família Tabanidae (Böse et al., 1987) e carrapatos (Latif et al., 2004; Shastri, Deshpande, 1981). De acordo com Hoare (Hoare, 1964), as espécies de tripanossomas de mamíferos podem ser divididas em duas seções principais, Stercoraria e Salivaria. Os tripanossomas da seção Salivaria são transmitidos para o hospedeiro vertebrado através da saliva durante a picada do inseto vetor infectado com o parasita e incluem, *T. vivax*, *T.*

congelense, *T. brucei* e *T. evansi* (Haag et al., 1998; Vickerman et al., 1998; Van Den Abbeele et al., 2010). Por outro lado, a seção Stercoraria, que inclui *T. cruzi*, *T. melophagium* e *T. theileri*, a transmissão se dá através de excretas dos insetos vetores contendo formas infectivas dos parasitas em questão; tais tripanossomas compartilham ainda, o fato de que as etapas finais de seu desenvolvimento ocorrem no trato digestivo inferior dos vetores (Schuster, et al., 2000).

De fato, esses relatos oferecem respaldo ao exposto anteriormente, de forma que a aquisição da via de degradação de His poderia não estar tão somente relacionada à uma evolução simultânea entre parasita e hospedeiro invertebrado e sim mais intimamente correlacionada com a região do inseto que colonizam, assim como com sua forma de transmissão, ponderando o fato de *T. cruzi*, *T. grayi* e *T. theileri* possuírem diferentes insetos vetores.

5.2.3 *Trypanosoma rangeli*

O caso do *T. rangeli* difere um pouco do exposto anteriormente. O *T. rangeli* é um protozoário hemoflagelado que ocorre como a terceira espécie de tripanossomas que infectam humanos, em simpatria com o *T. cruzi*, nas Américas Central e do Sul, infectando uma gama de espécies de mamíferos, incluindo os seres humanos (D'Alejandro, 1976). Em contraste ao relatado para *T. brucei* e *T. cruzi*, o *T. rangeli* é considerado um parasita não patogênico para o hospedeiro mamífero, embora sua presença no inseto vetor seja considerada danosa, especialmente para o gênero *Rhodnius*, uma vez que são capazes de induzir alterações morfológicas, anormalidades e até mesmo à morte das ninfas de triatomíneos durante a muda (Hoare, 1972; Añez, 1984).

Ao contrário de *T. cruzi*, *T. rangeli* é transmitido entre mamíferos via inoculação durante o processo de hematofagia, por um inseto triatomíneo, no qual os parasitas se desenvolvem e se multiplicam na hemolinfa e, posteriormente invadem as glândulas salivares, onde se diferenciam para tripomastigotas metacíclicos [revisado por (Rondón-Mercado, 2017)]. Interessantemente, foram relatadas infecções naturais mistas envolvendo *T. rangeli* e *T. cruzi* em uma ampla área geográfica em ambos os vetores triatomíneos e hospedeiros mamíferos (Grisard et al., 1999; Guhl, Vallejo, 2003). Embora não compartilhem do mesmo vetor, achados clínicos revelando a coinfeção de *T. rangeli* e *T. cruzi* em seus hospedeiros, sugerem que possa existir algum tipo de interação entre o parasita e fatores presentes nos

microambientes dos quais compartilham; esse fato pode também ter sido importante evolutivamente na aquisição ou conservação dos genes relacionados à degradação de His.

5.3 *TcIP* e seu substrato IPA

Relatos sobre a enzima IP, bem como de seu substrato, o IPA, começaram a emergir na literatura em meados do século XX, quando Feinberg e Greenberg identificaram, a partir de extratos de fígado de porco contendo urocanase – ou urocanato hidratase (UH) - parcialmente purificada, um produto de sua reação, cujo espectro de absorção óptica mostrava um máximo na faixa do ultravioleta, em torno de 264 nm (Feinberg, Greenberg, 1958). A reação enzimática da UH foi realizada monitorando-se a diminuição na absorbância a 277 nm, correspondente ao consumo do urocanato (Mehler, Tabor, 1953) e ensaios enzimáticos foram realizados a fim de se identificar, da forma mais completa possível, o produto dessa reação, bem como um possível intermediário formado não enzimaticamente. Evidências experimentais demonstraram que o produto da reação da UH era o IPA e que o intermediário formado era formil-isoglutamina (Feinberg, Greenberg, 1958). Foi ainda demonstrado que o IPA pode ser convertido em L-hidantoin-5-propionato através de uma atividade oxidase, sendo esse intermediário não metabolizado *in vivo* (Brown e Kies, 1959). A enzima que catalisa a oxidação do IPA em L-hidantoin-5-propionato foi reportada com propriedades similares àquelas descritas para aldeído oxidase (ou também chamada de xantina oxidase) (Payes, Greenberg, 1968). Quando fizemos uma busca por essa enzima no genoma de *T. cruzi*, a qual aparece anotada com o EC: 1.14.13 no banco de dados KEGG *Pathway*, não foi possível identificá-la, sugerindo que o IPA, em *T. cruzi*, pode ser consumido via IP ou então sofrer oxidação espontânea.

Nesse contexto, relatos na literatura caracterizam o IPA como sendo um intermediário quimicamente instável. Através de extratos obtidos a partir do cultivo de bactérias *Aerobacter aerogenes* em um meio cuja principal fonte de carbono era His, foi possível observar a conversão do urocanato, via UH presente no extrato, em um composto instável, com um espectro de absorção mostrando um máximo a 261 nm, em pH 7,4, sendo atribuído a essa espécie química a identidade do IPA (Revel, Magasanik, 1958). Com relação às suas propriedades químicas, sabe-se que 4-imidazolonas, não passíveis de substituição na posição 2 do anel imidazólico, são notoriamente instáveis (Kjaer, 1953). Estudos envolvendo tentativas de preparo do composto 4-imidazolona em solução aquosa não obtiveram sucesso,

uma vez que esse resultou muito sensível à decomposição para ser isolado (Freter et al., 1957).

No tocante à enzima IP, apenas dois trabalhos na literatura discorrem sobre sua purificação e algumas de suas propriedades bioquímicas. Em um deles, foram utilizados extratos de bactérias *Pseudomonas fluorescens*, *Aerobacter aerogenes* e *Clostridium cylindrosporium*. Nesse trabalho, os extratos foram preparados a partir do cultivo dessas bactérias em condições específicas. A atividade da IP foi medida pela taxa de consumo do IPA, à 264 nm, pH 7,2. O substrato dessa enzima foi gerado enzimaticamente a partir de urocanato e por ação da UH (Mehler, Tabor, 1953). Basicamente, a reação foi iniciada pela adição de urocanato, onde foi possível observar a queda na absorbância à 277 nm. Foi relatado que essa reação foi essencialmente completa em 8 min, tempo no qual, a absorbância a 264 nm foi reportada como sendo próxima a 0,42 e extratos crus de bactérias (onde acreditava-se conter IP em sua composição) foram adicionados. Dessa forma, foi relatado ser possível acompanhar a queda na absorbância a 264 nm, correspondente ao λ de absorção máxima do que se achava que era o IPA. Reportou-se ainda que o agente químico ao qual foi atribuída a identidade do IPA tem uma meia-vida de 20 min a 30 °C e pH 7,2 (Rao, Greenberg, 1960).

Fazendo um paralelo, em nosso trabalho foi possível obter a *TcIP* recombinante de forma solúvel após sua expressão e purificação em sistema heterólogo, e tentativas de medição da atividade enzimática foram realizadas. Porém, nos deparamos com algumas dificuldades no que diz respeito ao substrato IPA e o fato de não estar disponível comercialmente. Sendo assim, em um dos testes de medição da atividade enzimática para *TcIP* procedemos como no trabalho citado anteriormente e fizemos tentativas de síntese do substrato IPA *in vitro*, a partir da *TcUH* purificada. Porém, ao contrário do reportado, não foi possível atribuir uma atividade para *TcIP*. Acreditamos que, pelo fato de que os λ de absorção do urocanato e do IPA estarem próximos e o urocanato também absorva à 264 nm, com essa possível sobreposição nos comprimentos de ondas não seria possível discriminar a atividade de uma enzima em detrimento da outra.

Em um segundo intento, trabalhamos na possibilidade de detectar o produto enzimático da reação da *TcIP*, o formimino-glutamato (FiGlu), através de uma reação envolvendo sua hidrólise alcalina (Arakawa et al., 1964). De acordo com as limitações relatadas em torno do substrato dessa enzima, tivemos que, novamente, optar pela síntese do IPA *in vitro*, a partir da *TcUH* purificada. Nesse sentido, a primeira etapa desse método

consistiu na produção do IPA, via *TcUH*, a partir de urocanato; seguiu-se com adição da *TcIP* purificada (Reação 1) e partimos para detecção do produto FiGlu, via hidrólise alcalina. Para tanto, ao produto da Reação 1 foi adicionado NaOH 2,5 M e o conteúdo foi bem misturado e mantido em TA por 2 h, após esse tempo foi acrescido HCl 2,5 M para equilibrar o pH (Reação 2). Como resultado dessa reação, teríamos como produto Glu e formamida e então, seguimos para o último passo, que consistiu na detecção do Glu via GDH comercial (Reação 3). A reação da GDH consiste na detecção do Glu via redução do NAD^+ à NADH, monitorando-se a formação de NADH a 340 nm. No trabalho original, o Glu foi detectado por ação de uma glutamato descarboxilase, através da liberação de CO_2 (Arakawa et al., 1964). Apesar dos esforços dedicados para detecção da atividade da *TcIP*, não foi possível atribuir uma atividade enzimática para essa proteína em nosso trabalho. Acreditamos que a falta de reagentes padrões comerciais podem ser fatores importantes que impossibilitaram a validação dessa técnica, de forma que não podemos assegurar, por exemplo, que a hidrólise alcalina do FiGlu funcionou bem, uma vez que não tínhamos o reagente comercial para fazer esse teste.

Ainda colocamos em questão, a instabilidade química do substrato e sua oxidação não enzimática na presença de oxigênio. De fato, em um outro trabalho, onde a IP foi extraída da fração solúvel de extratos provenientes de fígado de rato, toda a medição da atividade foi conduzida anaerobicamente em atmosfera de nitrogênio. Foi reportado uma série de etapas que permitissem a purificação da enzima IP e foi relatado que um ensaio de atividade para UH foi realizado nesse extrato e essa se mostrou inativa, de forma que se pudesse trabalhar com extratos livres de atividade UH. O IPA foi sintetizado, estabilizado e purificado de acordo com o método de Brown e Kies; foi relatado que aerobicamente o IPA é estável em pH ácido (o que tornou possível sua purificação parcial) mas sofre decomposição em pHs neutro ou alcalino, por outro lado, em anaerobiose é estável a pH neutro (Brown, Kies, 1961). A atividade máxima da IP foi obtida em pH 7,4, sendo essa atividade inferior a 50% quando em pH ácido (\approx pH 6,0). A K_m foi calculada como sendo em torno de $0,7 \times 10^{-5}$ M (Snyder et al., 1961).

Fazendo uma análise crítica dos trabalhos publicados até o momento, não há evidências concretas que nos permitam assegurar que o substrato descrito para a IP seja o IPA, já que mesmo sendo este produzido pela UH, em condições fisiológicas o IPA não estaria disponível por tempo suficiente para transitar do sítio ativo da UH para o sítio ativo da IP. Efetivamente, não há demonstração da produção de IPA *in vivo* e, mesmo quando mensurada *in vitro*, essa foi realizada em atmosfera de N_2 , fato esse incompatível com o

microambiente citoplasmático, onde a via opera no parasita e outros organismos aeróbios. Do descrito, propomos a necessidade de uma revisão crítica de como a via de degradação de His de fato acontece.

5.4 *TcIP*: uma enzima citoplasmática expressa majoritariamente em epimastigotas

Os dados obtidos em nosso trabalho para *TcIP*, demonstram que essa proteína se encontra claramente mais expressa na forma epimastigota, corroborando com os resultados obtidos para as duas primeiras enzimas - *TcHAL* e *TcUH* - que resultaram mais expressas em formas epimastigotas quando comparado com as demais formas ao longo do ciclo de vida do parasita (dados não publicados). De fato, dados de proteômica apontam que *TcHAL* e *TcUH* são abundantes nos estágios do parasita encontrados no inseto vetor, mas são quase indetectáveis nas formas presentes no hospederio mamífero (Atwood et al., 2005). Esses achados nos levam a crer que a via de degradação de His parece ser importante especialmente para os estágios presentes no hospedeiro invertebrado.

Em relação à localização subcelular da *TcIP*, quando analisada nas diferentes formas do *T. cruzi*, observamos que apresenta um padrão de localização citoplasmática, o que refuta as previsões *in silico*, que apontam para uma localização não citoplasmática. A localização subcelular da *TcIP* foi confirmada pela co-localização com a enzima malato desidrogenase-*like* (marcador de localização subcelular citoplasmática) e através do ensaio complementar de fracionamento seletivo com digitonina, na qual a *TcIP* foi detectada majoritariamente nas frações permeabilizadas com baixas concentrações de digitonina (0,1-1 mg/mL), padrão semelhante à *TcTAT*, uma enzima citosólica. O perfil de localização citoplasmático também corrobora com o encontrado para as enzimas *TcHAL* e *TcUH*, mostrando que muito provavelmente, a degradação de His aconteça de forma completa neste compartimento celular.

5.5 O complexo *TcUH-TcIP*

Embora relatos na literatura tenham demonstrado uma possível atividade para IP, nós nos questionamos sobre a forma que essa enzima estaria operando no interior da célula, visto que o microambiente intracelular não é livre de oxigênio. Em um trabalho onde foi demonstrada a estrutura cristalográfica da IP de *Agrobacterium tumefaciens*, reportou-se que

a enzima consiste em um monômero, e que cada monômero é composto por dois domínios, sendo um deles um pequeno domínio (resíduos 17-80 e 380-420) e o outro um grande domínio *TIM barrel* (resíduos 81-380) (Tyagi et al., 2007). De fato, esses domínios, que podem ser didaticamente pensados como túneis, sugerem que a estrutura dessa enzima se organiza de maneira que o substrato IPA se encontre protegido da exposição ao O₂. Nesse contexto pensamos ainda na possibilidade de que as enzimas *TcUH* e *TcIP* pudessem estar associadas formando um complexo macromolecular, que contribuindo de forma a diminuir ao máximo qualquer possível exposição do substrato ao oxigênio.

Na literatura, não há nenhum relato que sugira que essas proteínas possam estar associadas em outros organismos. De fato, os estudos envolvendo a resolução da estrutura terciária dessas proteínas, são reportados independentemente e não propõem qualquer tipo de associação entre elas. Apesar desse fato, resolvemos fazer um experimento preliminar para averiguar essa hipótese. Como resultado dos experimentos de *Pull-down*, onde empregamos as enzimas recombinantes *TcUH* e *TcIP*, juntamente com extratos de formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi possível apontar para um primeiro indício de interação entre essas proteínas *in vitro*. A partir desse resultado, o trabalho se encaminhou para uma nova perspectiva envolvendo a identificação do complexo *TcUH-TcIP*.

Nesse sentido, nós empregamos a técnica de Cromatografia de Exclusão Molecular para que pudéssemos ter uma ideia de como essas proteínas estavam associadas, nas condições testadas. Essa técnica permite a separação de componentes de uma amostra complexa com base em sua massa molecular. Inicialmente, trabalhamos no sentido de entender melhor o perfil de cada uma das proteínas em separado, utilizando as proteínas *TcUH* e *TcIP* recombinantes. Nossos achados sugerem que a *TcUH* se organiza como um dímero, resultado esse que encontra respaldo na literatura. Em um trabalho realizado com *P. putida*, por exemplo, a enzima é um homodímero simétrico de 2 x 557 resíduos de aminoácidos com ligação forte do cofator NAD⁺ (Kessler et al., 2004). No tocante à *TcIP*, nossos resultados apontam para um monômero. Em *A. tumefaciens*, através de cromatografia de exclusão molecular, a proteína foi eluída como um monômero (Tyagi et al., 2007). Em contrapartida, a IP de *Bacillus subtilis* consiste em um homodímero. Finalmente, quando avaliamos a fração resultante da interação *TcUH* + extratos de epimastigotas advinda dos experimentos de *Pull-down*, foi possível estimar uma possível organização do complexo *TcUH-TcIP*, sendo esse correspondente à uma massa molecular aproximada de 187 kDa, o

que sugere uma relação de uma unidade de *TcUH* (≈ 113 kDa) + uma unidade de *TcIP* (≈ 67 kDa), somando ≈ 180 kDa.

Em nosso trabalho, também foi possível identificar o complexo *TcUH-TcIP*, quando uma dessas proteínas foi expressa com a cauda de 6 x His, enquanto a outra foi expressa sem a cauda de 6 x His, de forma que a primeira foi imobilizada na matriz de Ni^{2+} -NTA devido sua afinidade pelo metal e a outra teve sua ligação à matriz dependente de sua capacidade de se associar à primeira. O experimento recíproco foi realizado e foi possível, em ambos os casos, demonstrar a interação das proteínas em questão. Assim, os resultados se encaminhavam para o fato de que, ao menos nas condições testadas, *TcUH* e *TcIP* estariam interagindo *in vitro*.

Nesse contexto, nós passamos a considerar necessária a utilização de uma metodologia que permitisse a purificação do complexo em condições mais próximas das fisiológicas, eliminando assim a possibilidade de um falso positivo na interação entre ambas as proteínas. Elegemos a técnica de purificação por afinidade em tandem ou *TAP-Tagging* a fim de validar essa interação no parasita. Conforme descrito na literatura, o método de *TAP-Tagging* foi inicialmente desenvolvido em leveduras e seu uso tem sido bem-sucedido neste organismo (Puig et al., 2001).

O método de Purificação por Afinidade em Tandem apresenta duas vantagens em relação aos métodos cromatográficos convencionais, sendo a primeira, o fato de que é extremamente confiável em termos de pureza, produzindo proteína pura em quantidade suficiente para identificação por espectrometria de massas a partir de alguns litros de cultura celular. Em segundo lugar, de uma forma geral, todo o procedimento pode ser realizado em condições não desnaturantes, sob as quais o complexo proteico purificado geralmente mantém a funcionalidade. O método TAP foi adaptado com sucesso para outros organismos, incluindo mamíferos, insetos, bactérias como *E. coli*, plantas e tripanossomatídeos [revisado por (Schimanski et al., 2005).

Em nosso trabalho, para a realização dos ensaios de *TAP-Tagging*, as sequências codificadoras para *TcUH* e *TcIP* foram inseridas no vetor pTEX-*TAP-Tagging* que codifica para uma proteína A de *S. aureus*, e seus dois domínios de ligação à IgG, mais o peptídeo de ligação à calmodulina (CBP), separados por um sítio de clivagem TEV. Conforme relatado, não obtivemos sucesso na etapa de clivagem com TEV, para ambas as linhagens mutantes geradas, de forma que não foi possível seguir com a segunda etapa e, por isso, somente a primeira etapa de purificação foi realizada. Apesar desse inconveniente, foi possível identificar, por espectrometria de massas, que tais proteínas estavam associadas, uma vez que

ambas *TcUH* e *TcIP* foram encontradas na eluição resultante da primeira etapa da purificação, correspondente à interação do extrato proteico da linhagem pTTG-*TcIP* com a matriz de IgG, através do domínio Proteína A.

Apesar das dificuldades que encontramos em nosso trabalho, o método TAP já foi empregado para *T. cruzi* com sucesso. Foi reportado na literatura a utilização da técnica com o objetivo de identificar os mRNAs associados à proteína PUF6, membro da família de proteínas PUF (Pumilio/FBF1) de *T. cruzi*. A superexpressão da proteína *TcPUF6*, fusionada à TAP-*Tagging* permitiu a identificação dos mRNAs associados por purificação de afinidade e hibridização por *microarray*, resultando em nove possíveis alvos. Interessantemente, nesse trabalho, é descrita apenas a primeira etapa do processo, onde o sobrenadante proveniente de extratos proteicos foi usado para ensaios de purificação por afinidade e as proteínas associadas foram purificadas em coluna de IgG-Sepharose, sendo posteriormente clivados com TEV. Os RNAs eluídos foram purificados e amplificados (Dallagiovanna et al., 2008). A etapa de cromatografia com calmodulina não é reportada, provavelmente porque nesse momento já se sabia que essa etapa da purificação não era eficiente o suficiente, pelo menos para tripanossomatídeos.

De fato, Schimanski e colaboradores relataram problemas associados à ineficiência no passo de purificação envolvendo a afinidade pela matriz de calmodulina, em estudos com *T. brucei*. Resultados similares associados à falta de sucesso com a técnica foram comunicados por outros pesquisadores da área, de forma que tais inconvenientes se estendem ainda para outros organismos que não tripanossomatídeos, como para células de mamíferos, onde o método original não é capaz de render quantidade suficiente de proteína para posterior identificação. A fim de contornar essa limitação reportada em relação à cromatografia com calmodulina, Schimanski e colaboradores fizeram uma substituição do CBP por uma sequência curta de 12 aminoácidos correspondentes ao epítipo de proteína C (Prt C). Essa nova estratégia foi denominada PTG (para ProtC-TEV-ProtA) *tag*. A Prt C é derivada da proteína C humana, um zimogênio plasmático dependente de vitamina K especificamente expresso em hepatócitos. De fato, os resultados obtidos demonstraram que essa nova combinação é consideravelmente mais eficiente do que a purificação com a técnica original (Schimanski et al., 2005).

5.6 Demonstração do “curto-circuito” na via de degradação de His

Como discorrido no decorrer desse trabalho, o IPA pode ser convertido a outros intermediários, de forma não enzimática, em virtude de sua instabilidade química considerável. Outros grupos de pesquisa demonstraram independentemente que o IPA pode ser hidrolisado não enzimaticamente a N-formilisoglutamina e posteriormente à isoglutamina. Foi reportado que o oxigênio é requerido para que essa hidrólise ocorra em pH neutro, processo esse dependente principalmente da instabilidade aeróbica do intermediário IPA, sob essas condições (Brown, Kies, 1959; Feinberg, Greenberg, 1959; Hassal, Greenberg, 1962).

A conversão não enzimática do IPA a α -KG, na presença de oxigênio, foi descrita em um sistema químico. Feinberg e Greenberg validaram primeiramente que a oxidação não enzimática do IPA poderia levar à redução do DCPIP, um acceptor de elétrons (Feinberg, Greenberg, 1959). Mais tarde, dando continuidade aos estudos, foi provado que o IPA poderia ser oxidado espontaneamente a 4-oxoglutamato (e posteriormente a α -KG), ácido fórmico e amônia, sendo esta reação favorecida na presença de aceptores de hidrogênio. Foi demonstrado que a formação do 4-oxoglutamato se dá sob condições aeróbicas e pH neutro. Por outro lado, foi postulado que a decomposição espontânea do IPA a formil-isoglutamina seria uma hidrólise simples, favorecida em pH alcalino e não dependente de uma atmosfera de oxigênio (Hassal, Greenberg, 1962). Diante dessas observações, nós trabalhamos no sentido de demonstrar uma nova configuração no catabolismo de His, de forma que esse poderia ser operacional valendo-se apenas dos dois primeiros passos enzimáticos, em outras palavras, a conversão direta de His a α -KG e posterior incorporação pelo TCA seria exclusivamente dependente da atividade enzimática da *TcHAL* e *TcUH*. Nesse contexto, usamos leveduras *S. cerevisiae*, da cepa W303-1A, cuja via descrita está ausente.

Assim, como resultado da incorporação e consumo de L-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]-His através da atividade enzimática das proteínas *TcHAL* e *TcUH* ativamente expressas em sistema heterólogo, foi possível detectar $^{14}\text{CO}_2$, sendo esse uma provável evidência da oxidação não enzimática do IPA a α -KG. O α -KG resultante, como um intermediário importante do TCA, contribui para que o mesmo se mantenha operativo e, através da ação da enzima α -KG desidrogenase, libera uma molécula de CO_2 . Nesse sentido, foi possível demonstrar pela primeira vez na literatura, a existência de uma ramificação no metabolismo de His, que veio a contribuir para uma nova configuração bioquímica dessa via.

Vale ressaltar que uma pequena quantidade de $^{14}\text{CO}_2$ foi detectada quando incubamos L-[$^{14}\text{C}(\text{U})$]-His com as linhagens de leveduras controles (selvagem e transformada com os dois plasmídeos vazios). A fim de comprovar que esse $^{14}\text{CO}_2$ era proveniente exclusivamente

do TCA, pelo menos para nossa linhagem de leveduras mutantes HU, fizemos um intento preliminar de inibir a enzima aconitase do TCA, através do incremento de 2 mM fluoroacetato de sódio – NaFAC (MacRae et al., 2012) no momento em incubamos as leveduras com L-[¹⁴C(U)]-His. Se essa enzima, responsável pela conversão do citrato em D-isocitrato, fosse efetivamente inibida, provavelmente haveria um acúmulo de citrato e, com o decorrer do tempo o TCA deixaria de operar. Nesse sentido, se ¹⁴CO₂ detectado em nosso trabalho fosse exclusivamente proveniente do TCA, observaríamos uma redução do mesmo, em função do tempo, quando na presença de NaFAC. Em nosso experimento, as leveduras não suportaram a ação do composto, que levou a morte das células. Assim não foi possível atribuir conclusões a esse teste preliminar. Acreditamos que é necessário repetir esse experimento a fim de padronizar uma concentração de NaFAC que tenha potencial em induzir os efeitos esperados sem levar à morte celular.

Por outro lado, trabalhamos na hipótese de que parte desse ¹⁴CO₂ liberado pudesse ser consequência da ação de uma descarboxilase comum a vários substratos, dentre eles His. Não encontramos uma His descarboxilase (EC: 4.1.1.22) específica no genoma de *S. cerevisiae*, porém encontramos uma Glu descarboxilase (EC: 4.1.1.15), por exemplo. Ensaios foram realizados a fim de detectar uma possível atividade His descarboxilase, porém não foi possível demonstrar essa atividade nas condições testadas. A fim de melhor compreender essa questão, outros ensaios devem ser realizados.

5.7 O papel fisiológico da *TcIP*

Conforme relatado, não foi possível atribuir uma atividade para *TcIP* nesse trabalho. Assim, permaneceu a questão sobre sua funcionalidade, uma vez que para as demais enzimas da via foi possível demonstrar uma atividade – a *TcHAL* e *TcUH* foram descritas pelo nosso grupo (tese de Doutorado María Júlia Baríson, 2015), enquanto que para *TcFG* foi demonstrado a existência de uma enzima capaz de converter o FiGlu em Glu e formamida (Hai et al., 2013).

Como não é possível realizar um *knock down* (por exemplo por RNA de interferência) em *T. cruzi* (da Rocha et al., 2004) e apenas poucos casos de *knock down* de genes mediante estratégia de *knockouts* parciais por interrupção gênica foram relatados, a superexpressão resultou em uma abordagem alternativa para avaliação do papel biológico de proteínas no parasita, tendo em vista que o advento da técnica de CRISPR/Cas9 para *T. cruzi* se deu apenas

na etapa final desse projeto. Por essas razões, escolhemos a técnica de superexpressão e assim geramos parasitas mutantes da linhagem pTEX-*TcIP*.

A confirmação da presença de uma cópia ectópica do gene da *TcIP* nos parasitas mutantes foi inicialmente realizada pela técnica de *western blotting*, mas essas diferenças não resultaram tão evidentes. Nós então empregamos a técnica de ELISA que, por se tratar de uma abordagem quantitativa foi capaz de demonstrar aumento na expressão da *TcIP* na linhagem pTEX-*TcIP*, em detrimento aos controles das linhagens *wt* e pTEX \emptyset . Embora se trate de uma técnica complementar nesse contexto, a IFI também corroborou com o resultando observado, já que a intensidade de fluorescência dos parasitas superexpressores para *TcIP*, quando imunomarcados com anti-*TcIP*, foi relativamente mais intensa quando comparada ao controle. Uma vez constatado esse aumento, partimos para caracterização do fenótipo dos parasitas mutantes a fim de verificar se o aumento dos níveis de *TcIP* teria algum efeito na biologia do parasita. Como primeira análise, não observamos nenhum efeito na capacidade proliferativa nem na morfologia das formas epimastigotas pTEX-*TcIP*, em detrimento aos controles.

5.7.1 *TcIP* e a bioenergética do *T. cruzi*

Como discorrido anteriormente, o IPA pode ser convertido espontaneamente a α -KG, conduzindo esse metabólito diretamente ao TCA. Por outro lado, a via pode também operar através de quatro reações enzimáticas, gerando Glu, que pode ser tanto convertido a α -KG quanto ser utilizado na biossíntese de moléculas importantes para o parasita, como Pro (através da atividade das enzimas de biossíntese de Pro, *TcP5CS* e *TcP5CR* – dados não publicados do nosso grupo) e Gln (através da reação da *TcGS* – dados não publicados do nosso grupo). De fato, essa última condição é a situação mais esperada quando temos a superexpressão da *TcIP*, de forma que dando um aporte maior dessa enzima ao parasita, estaríamos estimulando a atividade da *TcIP* (quando formando o complexo *TcUH-TcIP*), resultando na conversão do IPA em FiGlu, prevenindo ou reduzindo sua oxidação não enzimática. Vale lembrar que os processos biológicos relatados não se excluem, podendo ocorrer em eventos simultâneos.

Se pensarmos nesse contexto, os parasitas da linhagem pTEX-*TcIP* que apresentaram taxas de respiração ligeiramente maiores (referentes à respiração de rotina e em resposta aos estímulos adicionados, oligomicina A e FCCP) em relação à linhagem pTEX \emptyset , poderiam estar acumulando Pro, uma fonte eficiente de carbono e energia para formas epimastigotas, embora

deva atravessar as membranas mitocondriais para ser oxidada. Sendo assim, ainda que consideremos relevante essa hipótese no contexto da discussão dos dados obtidos nesse trabalho, é pouco provável que a Pro sintetizada via Glu seja mais eficiente em estimular a respiração do que o α -KG gerado via transaminação, já que esse é diretamente incorporado ao TCA.

Ademais, embora os parasitas da linhagem pTEX-*TcIP* possam restaurar os níveis de ATP após submetidos a estresse em PBS, o perfil de resposta é muito semelhante aos parasitas *wt*, de forma que não resultam mais ou menos susceptíveis à carência de metabólitos. O mesmo podemos afirmar em relação à viabilidade desses parasitas acompanhada em diferentes tempos, já que os dados de viabilidade obtidos não são estatisticamente significantes em relação à linhagem *wt* ou mesmo em detrimento da linhagem pTEX \emptyset .

Diante do exposto, a enzima *TcIP* parece não ter uma participação marcante no metabolismo energético na fase epimastigota de *T. cruzi*, pelo menos de acordo com os experimentos realizados, nas condições analisadas.

5.7.2 Parasitas que superexpressam a *TcIP* não sofrem metaciclogênese

A superexpressão afetou drasticamente a taxa de metaciclogênese dos parasitas da linhagem pTEX-*TcIP*, visto que esses parasitas não são capazes de se diferenciar, seja em TAU-3AAG ou mesmo com TAU-His, ao passo que os controles das linhagens *wt* e pTEX \emptyset se diferenciam normalmente. Assim, quando a diferenciação se dá em meio TAU-3AAG, as taxas de metaciclogênese atingem cerca de 30% e 23%, para as linhagens *wt* e pTEX \emptyset , respectivamente; enquanto que quando se dá em meio TAU-His, essas taxas estão na média de 23% e 27%, para as linhagens *wt* e pTEX \emptyset , respectivamente.

Em um estudo reportado na literatura, onde foi avaliado o efeito da superexpressão da proteína de ligação ao RNA, *TcRBP19*, constatou-se que a superexpressão ectópica do gene *TcRBP19* levou a uma redução no processo de metaciclogênese. De fato, células transfectadas com o vetor pTEX \emptyset (controle) apresentaram uma taxa de diferenciação de cerca de 40%, em contraste com apenas 26-28% advindas dos transfectantes pTEX-*TcRBP19*. Os autores sugerem que a capacidade de responder aos mecanismos desencadeados pelo estresse nutricional ou o próprio processo de diferenciação pode estar afetado pela presença de uma cópia ectópica do gene *TcRBP19* e ainda concluem que o controle da expressão da *TcRBP19*

é necessário para que a metaciclologênese prossiga de forma completamente eficiente (Pérez-Díaz et al., 2012).

Em nosso trabalho, os parasitas da linhagem pTEX-*TcIP* apresentam níveis de viabilidade iguais aos controles quando submetidos a estresse nutricional. Ensaios de viabilidade celular foram realizados durante os dias 4, 5 e 6 após o início da metaciclologênese e concluímos que tais parasitas apresentam um perfil de viabilidade semelhante aos controles *wt* e pTEX \emptyset , sugerindo que não seria o estresse metabólico ou a capacidade desses parasitas de responder aos mecanismos desencadeados pelo mesmo, os responsáveis pela interrupção da metaciclologênese.

Foi ainda constatado que parasitas mutantes da linhagem pTEX-*TcIP* resultaram menos aderentes às garrafas de cultivo em relação aos parasitas *wt* e pTEX \emptyset . Acreditamos que a ausência de metaciclologênese nessa linhagem possa estar relacionada à baixa adesão dos parasitas. De fato, sabe-se que os epimastigotas aderem às membranas intestinais dos insetos triatomíneos antes de sua diferenciação em tripomastigotas metacíclicos (Zeledon et al., 1984). Nesse contexto, Bonaldo e colaboradores fizeram um estudo detalhado dos mecanismos envolvidos no processo de adesão, no qual esse foi reproduzido *in vitro* sob condições definidas. Os autores mencionam que um baixo rendimento de tripomastigotas metacíclicos foi obtido quando a metaciclologênese (de cultura axênica) foi realizada sob agitação constante ou em frascos siliconizados, sugerindo que a adesão de epimastigotas nos frascos de cultivo é um passo importante na habilitação prévia dos parasitas para o processo de diferenciação. Mais que isso, foi reportado uma drástica redução no número de parasitas no sobrenadante das culturas, após 6 h de diferenciação em meio TAU-3AAG, sendo essa redução devido à adesão dos epimastigotas ao frasco de cultivo, visualizado por microscopia óptica (Bonaldo et al., 1998). No tocante à morfologia, foram relatadas alterações no decorrer do processo de metaciclologênese, na qual os parasitas tornam-se progressivamente mais delgados. Análises de microscopia eletrônica mostraram que os parasitas aderidos tem o cinetoplasto em forma de “haste”, típico da forma epimastigota, enquanto que a maioria dos parasitas encontrados no sobrenadante após 96 h de incubação exibiram um cinetoplasto mais arredondado e uma alteração de proximidade com o núcleo foi observada (tornando-se mais distante), características essas condizentes com as formas tripomastigotas metacíclicas (Bonaldo et al., 1998). Em contrapartida, em nosso trabalho, imagens obtidas ao longo da diferenciação, mostraram que os parasitas superexpressores para *TcIP* mantiveram uma morfologia semelhante à forma epimastigota, no sentido em que não foram detectadas formas

mais afiladas nos sobrenadantes das culturas. Mais que isso, não se observou a transição da posição do núcleo em relação ao cinetoplasto; pelo contrário, permanecem como formas epimastigotas, com cinetoplasto anterior e próximo ao núcleo. Isso quer dizer que esses parasitas não apresentam a morfologia clássica daqueles provenientes do processo de diferenciação, nos quais o cinetoplasto é posterior ao núcleo e a morfologia é alongada e afilada, como observado para os parasitas das linhagens controle *wt* e pTEX \emptyset .

Embora esses parasitas aparentemente mantenham sua capacidade de responder ao estresse nutricional durante a metaciclologênese, não apresentando um padrão atípico de viabilidade em relação aos controles, a presença de uma cópia ectópica da *TcIP* pode estar afetando o próprio processo de diferenciação, de forma que o controle da expressão da *TcIP* possa ser necessário para que a metaciclologênese prossiga normalmente.

A ideia de que algumas enzimas possam estar envolvidas em outras funções, além de sua participação central no metabolismo, vem tomando força nos últimos anos. Esse tipo de dupla funcionalidade é comumente conhecido como proteína *moonlighting* e exemplos têm sido descritos para procariotos e eucariotos (Jeffery, 1999; Gancedo, Flores, 2008; Commichau et al., 2009). Com relação aos parasitas, pode-se afirmar que esse tipo de proteína (ou mais especificamente, enzima) multifuncional está presente em muitas espécies. Além disso, com o advento da metabolômica e outras tecnologias do tipo *high-throughput*, foi possível demonstrar que, em alguns casos, os fenótipos mutantes decorrentes do desvio da função enzimática original de uma dada proteína, se dá, muito provavelmente, como uma consequência direta da perturbação do processo celular em si, além do metabolismo (Collingridge et al., 2010). As enzimas da via glicolítica, geralmente abundantes em muitos organismos e tipos celulares são, até o presente momento, os exemplos de proteínas *moonlighters* mais comumente encontradas, já que podem ser submetidas à uma relocalização subcelular dinâmica. Nesse sentido é razoável questionar se a compartimentalização única da glicólise em glicossomos e a regulação da glicólise, no caso dos tripanossomatídeos, possa limitar as possibilidades das enzimas da via glicolítica atuarem como proteínas *moonlighting*. No entanto, a localização parcial fora do glicossomo de uma das isoformas da hexoquinase é sugestiva de que essa enzima tenha uma função celular adicional, além da glicólise (Collingridge et al., 2010). Diante do exposto, não seria curioso que mais proteínas, além das envolvidas na via glicolítica, possam estar exercendo atividades *moonlighting*. Por isso, propomos que o fenótipo relatado para a linhagem pTEX-*TcIP* (ausência de metaciclologênese)

associada à superexpressão da enzima, canonicamente descrita como enzima integrante da via de degradação de His, possa sugerir uma proteína com atividade *moonlighting*.

1. A *TcIP* é majoritariamente expressa na forma epimastigota, assim como as duas primeiras enzimas envolvidas na via de degradação de His em *T. cruzi*, *TcHAL* e *TcUH*.
2. A *TcIP* é uma proteína citoplasmática, assim como a *TcHAL* e *TcUH*, sugerindo que a via de degradação de His é citoplasmática.
3. O substrato da *TcIP*, o IPA, é oxidado não enzimaticamente a α -KG, e este é capaz de ser metabolizado diretamente via TCA.
4. A *TcIP* pode formar um complexo macromolecular com a *TcUH* *in vitro*, bem como em epimastigotas de *T. cruzi*.
5. A superexpressão da *TcIP* não afetou a capacidade dos parasitas de se proliferarem em meio LIT.
6. Após estresse nutricional, a viabilidade celular, o conteúdo de ATP e as taxas de respiração não se mostraram diferentes em relação aos controles, sugerindo que essa enzima não tenha participação fundamental no metabolismo energético.
7. A capacidade de diferenciação dos parasitas superexpressores da linhagem *TcIP* em tripomastigotas metacíclicas foi drasticamente diminuída, e esse fenótipo pode sugerir uma proteína com atividade *moonlighting*, relacionada com a regulação da diferenciação celular.

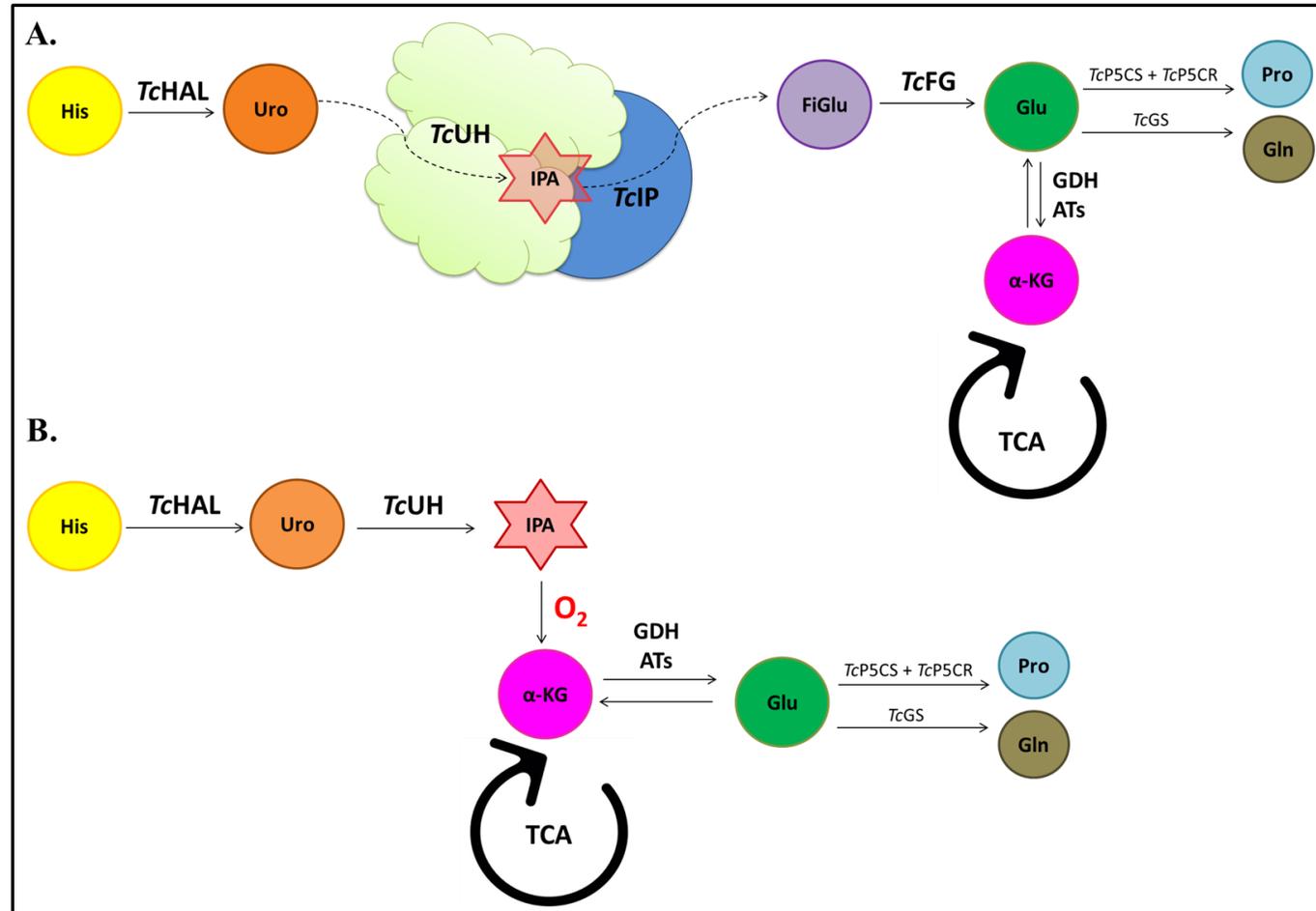


Figura 35: Representação esquemática da via de degradação de His sob uma nova perspectiva. A. Quando as enzimas *TcUH* e *TcIP* se encontram formando um complexo macromolecular tal como é demonstrado na figura, o intermediário IPA se encontra protegido da exposição ao O_2 e por isso é possível que a via opere em quatro passos enzimáticos, levando a formação final de Glu, que pode ser convertido em α -KG e alimentar o ciclo de Krebs ou mesmo ser utilizado para biossíntese de moléculas importantes para o parasita, tais como Pro (através das enzimas de biossíntese de Pro, *TcP5CS* – Δ 1-pirrolina-5-carboxilato sintetase e *TcP5CR* – Δ 1-pirrolina-5-carboxilato redutase) e Gln (através da enzima *TcGS* – glutamina sintetase); enzimas cujas atividades foram demonstradas pelo nosso grupo; dados não publicados. **B.** Quando não há formação do complexo *TcUH-TcIP*, o intermediário IPA, substrato da enzima *TcIP*, como até então vem sendo descrito, é oxidado não enzimaticamente a α -KG na presença de O_2 , sendo esse capaz de ser metabolizado diretamente via TCA, demonstrando que a via de degradação de His pode ser operativa em apenas dois passos enzimáticos.

REFERÊNCIAS*

Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52(5):399-451.

Aguilar Z, Urbina J. The phosphofructokinase of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: purification and kinetic mechanism. *Mol Biochem Parasitol.* 1986;21:103-11.

Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosomacruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol.* 1999;92(4):263-74.

Alvarenga NJ, Bronfen E. Metaciclo gênese do *Trypanosoma cruzi* como parâmetro de interação do parasita com o triatomíneo vetor. *Rev Bras Med Trop.* 1997;30:247-50.

Alves, M. J. and W. Colli. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. *IUBMB Life.* 2007;59(4-5):274-9.

Añez, N. Studies on *Trypanosoma rangeli* Tejera, 1920. VII—Its effect on the survival of infected triatomine bugs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 1984;79:249-55.

Arakawa, T., Ohara, K., Fujii, M., Hirono, H. A simple method for detection of formimino glutamic acid in urine. *Tohoku J. exp. Med.* 1964;85:178-80.

Atwood JA, Weatherly DB, Minning TA, Bundy B, Cavola C, et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. *Science.* 2005;309:473–6.

Bakker BM, Mensonides FI, Teusink B, van Hoek P, Michels PA, Westerhoff HV. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(5):2087-92.

Barison, M. J. et al. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. *JBioenergBiomembr.* 2016;48(4):437-49.

Barison, M. J., Rapado, L. et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *JBiol Chem.* 2017;292(21):8964-77.

*De acordo com:

International Committee of Medical Journal Editors.[Internet]. Uniform requirements for manuscripts submitted to Biomedical Journal: sample references. [updated 2011 Jul 15]. Available from: <http://www.icmje.org>

Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Perez AR, Berbert LR, de Santana-van-Vliet E, Farias-de-Oliveira DA, Moreira OC, Roggero E, de Carvalho-Pinto CE, Jurberg J, Cotta-de-Almeida V, Bottasso O, Savino W, de Meis J. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: new disease form from an old Infection? PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(6):e0003849.

Bern, C., S. P. Montgomery, L. Katz, S. Caglioti and S. L. Stramer. Chagas disease and the US blood supply. *Curr Opin Infect Dis*. 2008;21(5):476-82.

Birnboim, H. C.; Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*. 1979;71:513-23.

Bonaldo, MC., Souto-Padron, T., de Souza, W., Goldenberg, S. Cell-Substrate Adhesion during *Trypanosoma cruzi* Differentiation. *The Journal of Cell Biology*. 1988;106:1349-58.

Böse, R, Friedhoff, KT, Olbrich, S., Büscher, G., Domeyer, I. Transmission of *Trypanosoma theileri* to cattle by Tabanidae. *Parasitol.Res*. 1987;73:421-4.

Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72:248-54.

Brand V. *Biochemistry and Physiology of Endoparasites*. Elsevier/North Holland, Amsterdam. 1979.

Brener, Z. and E. Chiari. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. *J Parasitol*. 1965;51(6):922-6.

Brener, Z. *Biology of Trypanosoma cruzi*. *Ann Rev Of Microb*. 1973;27:347-82. ISSN 0066-4227.

Brown DD, Kies MW. The mammalian metabolism of L-histidine. II. The enzymatic formation, stabilization, purification, and properties of 4(5)-imidazolone-5(4)-propionic acid, the product of urocanase activity. *J Biol Chem*. 1959;234(3):188-91.

Buhaya MH, Galvan S, Maldonado RA. Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines collected at Indio Mountains Research Station. *Acta Trop*. 2015;150:97-9.

Camargo, E. P. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. 1964;12: 93-100.

Canepa GE, Bouvier LA, Miranda MR, Uttaro AD, Pereira CA. Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS MicrobiolLett*. 2009;292(1):27-32.

Cannata JJ, Frasch AC, Cataldi de Flombaum MA, Segura EL, Cazzulo JJ. Two forms of 'malic' enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1979;184(2):409-19.

Cannata, J. J.; Cazzulo, J. J. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp. Biochem. Physiol. B*. 1984;79:297-308.

- Cazzulo JJ, Juan SM, Segura EL. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. *Comp BiochemPhysiol B*. 1977;56(3):301-3.
- Cazzulo J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB journal*. 1992.
- Chagas, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp, agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem.Inst.OswaldoCruz*. 1909;(1)159-218.
- Collingridge, P. W., Brown, R. W. B., Michael L.G. Moonlighting enzymes in parasitic protozoa. *Parasitology*. 2010;137:1467–75.
- Commichau, F. M., Rothe, F. M., Herzberg, C., Wagner, E., Hellwig, D., Lehnik-Habrink, M., Hammer, E., Volker, U. and Stulke, J. Novel activities of glycolytic enzymes in *Bacillus subtilis*: interactions with essential proteins involved in mRNA processing. *Molecular and Cellular Proteomics*. 2009;8:1350–60.
- Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *MolBiochemParasitol*. 1985a;14(1):83-96.
- Contreras, V. T.; Salles, J. M.; Thomas, N.; Morel, C. M.; Goldenberg, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol*. 1985;16:315-27.
- Dallagiovanna B, Correa A, Probst CM, Holetz F, Smircich P, de Aguiar AM, Mansur F, da Silva CV, Mortara RA., Garat B, Buck GA, Goldenberg S, Krieger MA. Functional Genomic Characterization of mRNAs Associated with TcPUF6, a Pumilio-like Protein from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2008;283(13):8266–73.
- D'Alessandro A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, in: W.H.R. Lumsden, D.A. Evans (Eds.), *Biology of the Kinetoplastida*, London Academic, London. 1976;327–403.
- Dantas AP, Barbosa HS, de Castro SL. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 2003;35:287-94.
- da Rocha WD, Otsu K, Teixeira SM, Donelson JE. Tests of cytoplasmic RNA interference (RNAi) and construction of a tetracycline-inducible T7 promoter system in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2004;133:175-86.
- Deane, L. M. Trypanosomidae in Mammals of the Amazon Region. 3. Hematoscopy and Xenodiagnosis of Wild Animals of the Environs of Belém, Pará. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1964;(6):225-32.
- De Souza W. Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitol Res*. 2002;88:1013-25.

Docampo R, Ulrich P, Moreno SN. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.*2010;365(1541):775-84.

Duschak, V. G. and A. S. Couto. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.*2007;2(1):19-51.

Feinberg RH, Greenberg DM. Studies on the enzymic decomposition of urocanic acid. *JBiol Chem.*1959;234:2670-6.

Fermino, B. R. et al. The phylogeography of trypanosomes from South American alligatorids and African crocodilids is consistent with the geological history of South American river basins and the transoceanic dispersal of *Crocodylus* at the Miocene. *Parasites Vectors.*2013;6:313.

Figueiredo, R. C.; Steindel, M.; Soares, M. J. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during in vitro cultivation. *Parasitol. Res.*1994;80:517-22.

Freter, K., Rabinowitz, J. C., and Withop, B. Liebigs, *Ann. Chem.* 1957;607:174.

Galvao C, C. R., Rocha DS, Jurberg J. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. *Zootaxa.*2003;202:1–36.

Gancedo, C. and Flores, C. L. Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 2008;72:197–210.

Gattuso, J. M. and M. A. Kamm. Review article: the management of constipation in adults. *Aliment Pharmacol Ther.*1993;7(5):487-500.

Gietz, R. D.; Schiestl, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat. Protoc.* 2007;2(1):31-4.

Grisard EC, Steindel M, Guarneri AA, Eger-Mangrich I, Campbell DA, et al. Characterization of *Trypanosoma rangeli* strains isolated in Central and South America: an overview. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*1999;94:203-9.

Guhl F, Vallejo GA *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920:an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*2003;98: 435-42.

Haag, J., O'hUigin, C., Overath, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. *Mol.Biochem. Parasitol.*1998; 91: 37–49.

Hai Y, Dugery RJ, Healy D, Christianson DW. Formiminoglutamase from *Trypanosoma cruzi* Is An Arginase-Like Manganese Metalloenzyme. *Biochemistry.* 2013,52(51):9294–309.

Hanna ASL. et al. Comparison of proteins expressed by *Pseudomonas aeruginosa* strains representing initial and chronic isolates from a cystic fibrosis patient: an analysis by 2-D gel

electrophoresis and capillary column liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Microbiol.*2000;146(10):2495-508. ISSN 1350-0872.

Harington JS. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* I. Analysis of the haemolymph. *Parasitology.*1961a;51:309-18.

Harington JS. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* II. Analysis of the excretory material. *Parasitology.* 1961b;51:319-26.

Hassal, H. and Greenberg, D. M. Studies on the Enzymic Decomposition of Urocanic Acid: V. The formation of 4-oxoglutaramic acid, a nonenzymic oxidation product of 4(5)-imidazolone-5(4)-propionic acid. *J. Biol. Chem.*1962;238:1423-31.

Hoare, CA. Morphological and taxonomic studies on mammalian trypanosomes. X. Revision of the systematics. *J. Protozool.*1964;11:200-7.

Hoare, CA. Rationalization of the terminology for the developmental stages of trypanosomatid flagellates. *Med. Parazitol. (Mosk).*1971;40:307-9.

Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosomacruzi*. *J Protozool.*1989;36(2):150-3.

Hotez, P. J., D. H. Molyneux, A. Fenwick, J. Kumaresan, S. E. Sachs, J. D. Sachs and L. Savioli. Control of neglected tropical diseases. *N Engl J Med.*2007;357(10):1018-27.

Ichihara, K., Sakamoto, A, Iniiiori, K., and Snkamoto, Y. *J. Biochem. (Tokyo)* 1957;44:649-59.

Jeffery, C. J. Moonlighting proteins – an update. *Molecular Biosystems.* 2009;5:345-50

Juan SM, Segura EL, Cazzulo JJ. Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem.*1978;9(6):395-400.

Juan SM, Segura EL, Cazzulo JJ. Inhibition of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by silver nitrate. *Experientia.*1979;35(9):1139-40.

Kelly, J. M. et al. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. *Nucleic Acids Res.*1992;20(15):3963-9.

Kjaer, A., Rorte F., and K.H. Buchell. *Acta Chem. Scand.* 1953;7:1017.

Kessler D., Rétey J., Schulz G.E. Structure and Action of Urocanase. *Journal of Molecular Biology.* 2004;342(1):183-94.

Lamour N, Riviere L, Coustou V, Coombs GH, Barrett MP, et al. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J Biol Chem.* 2005;280:11902-10.

Latif, A.A., Bakheit, M.A., Mohamed, A.E., Zwegarth, E. Highinfection rates of the tick *Hyalomma anatolicum anatolicum* with *Trypanosoma theileri*. Onderstepoort J. Vet. Res.2004;71:251–6.

Lent H, W. P. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vector of Chagas disease. Bull Am Mus Nat History.1979;163:123–520.

Ley V, Andrews NW, Robbins ES, Nussenzweig V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. J Exp Med.1988;168:649-9.

Lundblad, V.; Struhl, K. Yeast manipulations. In: Ausubel, F. M.; Brent, R., et al (Ed.). Current protocols in Molecular Biology. Cambridge: Jhon Wiley & Sons. 2003;1(13): 13.10.11-13.

Magasanik B, Bowser HR. The degradation of histidine by *Aerobacter aerogenes*.JBiol Chem. 1955;213(2):571-80.

Magdaleno A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM.Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*.PLoS One.2009;4(2):e4534.

Mancilla R, Naquira C, Lanas C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol.1967;21(2):154-9.

Manna, P. T., Kelly, S. & Field, M. C. Adaptin evolution in kinetoplastids and emergence of the variant surface glycoprotein coat in African trypanosomatids. Mol.Phylogen.Evol. 2013;67:123–8.

Mantilla BS, Paes LS, Pral EM, Martil DE, Thiemann OH, Fernandez-Silva P, Bastos EL, Silber AM. Role of Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2015;290(12):7767-90.

Marciano, D.; Llorente, C.; Maugeri, D. A.; De LaFuente, C.; Opperdoes, F.; CazzuloA, J. J.; Nowicki, C. Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol.2008;161:12-20.

MacRae JJ., Sheiner L., Nahid A., Tonkin, C., Striepen B., McConville MJ. Mitochondrial metabolism of glucose and glutamine is required for intracellular growth of *Toxoplasma gondii*. Cell Host Microbe. 2012;12(5):682–92.

Martins AV., Gomes AP., de Mendonça EG., Fietto, JLR., Santana LA, Oliveira, MGA., Geller M., Santos RF., Vitorino, RR, Siqueira-Batista, R, Biology of *Trypanosoma cruzi*: An update. Infectio. 2012;16(1):45-58.

Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. Infect Immun.2009;77(7):3023-32.

Mathers, C. D., M. Ezzati and A. D. Lopez. Measuring the burden of neglected tropical diseases: the global burden of disease framework. *PLoS Negl Trop Dis.*2007;1(2):e114.

Mehler AH, Tabor H. Deamination of histidine to form urocanic acid in liver. *JBiol Chem.* 1953;201(2):775-84.

Michels PA, Bringaud F, Herman M, Hannaert V, Metabolic functions of glycosomes in trypanosomatids. *Biochim. Biophys.* 2006;1763:1463–77.

Miller A, Waelsch H. Formimino transfer from formamidinoglutamic acid to tetrahydrofolic acid. *J Biol Chem.* 1957;228(1):397–417.

Minning TA, Weatherly DB, Atwood J, 3rd, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics.*2009;10:370.

Moncayo, A. and M. I. O. Yanine. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology.*2006;100:663-77.

Moncayo, A. and A. C. Silveira. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2009;104(1):17-30.

Mortimer, R. K.; Johnston, J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics.* 1986;113(1):35-43.

Opperdoes FR, Borst P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbodylike organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Lett.*1977;80:360–4.

Opperdoes FR. Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. *BiochemSocSymp.*1987;53:123-9.

Paes LS, Suarez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EM, Diogo de Melo P, Tahara EB, Kowaltowski AJ, Elias MC, Silber AM. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One.*2013;8(7):e69419.

Payes B., Greenberg DM. Studies on the enzymic decomposition of urocanic acid: VII. Identification of the enzyme catalyzing the oxidation of 4(5)-imidazolone-5(4)-propionic acid as an aldehyde oxidase. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 1968;125(3):911-7.

Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Flawia MM, Torres HN. L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. *JEukaryotMicrobiol.*1999;46(6):566-70.

Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN, Flawia MM. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. *JBiol Chem.*2000;275(2):1495-501.

Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber A, Alves MJ, Bouvier LA, Flawia MM, Torres HN. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. *FEBS Lett.*2002;526(1-3):111-4.

- Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. FEBS Lett.2003;554(1-2):201-5.
- Pereira, K. S., F. L. Schmidt, A. M. Guaraldo, R. M. Franco, V. L. Dias and L. A. Passos. Chagas disease as a foodborne illness. J Food Prot.2009;72(2):441-6.
- Perez CJ, Lymbery AJ, Thompson RCA. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. Trends in Parasitology. 2015;31(11):595-603.
- Pérez-Díaz L., Correa A., Moretão MP, Goldenberg S., Dallagiovanna B., Garat B. The overexpression of the trypanosomatid-exclusive TcRBP19 RNA-binding protein affects cellular infection by *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2012;107(8):1076-9.
- Puig, O. et al. The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. Methods.2001;24(3):218-29. ISSN 1046-2023.
- Punukollu, G., R. M. Gowda, I. A. Khan, V. S. Navarro and B. C. Vasavada. Clinical aspects of the Chagas heart disease. Int J Cardiol.2007;115(3):279-83.
- Racagni GE, Machado de Domenech EE. Characterization of *Trypanosoma cruzi* hexokinase. Mol Biochem Parasitol.1983;9(2):181-8.
- Rao DR, Greenberg DM. Studies on the enzymic decomposition of urocanic acid. IV. Purification and properties of 4(5)-imidazolone-5(4)-propionic acid hydrolase. J Biol Chem. 1961;236:1758-63.
- Revel, H. R. B. and Magasanik, B., J. Biol. Chem. 1958;233:950.
- Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. ExpParasitol.2008;118(1):17-24.
- Sambrook JF, Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd edition ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.1989.
- Schimanski B, Nguyen TN, Günzl A. Highly Efficient Tandem Affinity Purification of Trypanosome Protein Complexes Based on a Novel Epitope Combination. Eukaryot Cell. 2005;4(11):1942–50.
- Schmunis, G. A.Prevention of transfusional *Trypanosoma cruzi* infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94(1):93-101.
- Shastri, U.V., Deshpande, P.D., *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Koch 1844) as a possible vector for transmission of *Trypanosoma theileri*, Laveran, 1902 in cattle. Vet. Parasitol.1981;9:151–5.
- Silber AM, Tonelli RR, Martinelli M, Colli W, Alves MJ. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. JEukaryotMicrobiol.2002;49(6):441-6.

Silber A, Colli W, Ulrich H, Alves M, Pereira C. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Current drug targets Infectious disorders*.2005;5(1):53-64.

Silber AM, Rojas RL, Urias U, Colli W, Alves MJ. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*.2006;36(2):157-63.

Silva Paes L, Suarez Mantilla B, Julia Barison M, Wrenger C, Mariano Silber A. The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas Disease. *Current Pharmaceutical Design*.2011;17(20):2074-99.

Siqueira-Batista R, Geller M, Martins AV, Bastos OMP. *Trypanosoma cruzi*. In: Siqueira-Batista R, Gomes AP, Corrêa AD, Geller M (editores). *Moléstia de Chagas*. 2007. Rio de Janeiro: Rúbio; 2ª edição.

Snyder, S. H., Silva, O. L. & Kies, M. W. J. *Biol. Chem*. 1961;236:2996-8.

Sylvester D, Krassner SM. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp BiochemPhysiol B*.1976;55(3B):443-7.

Taylor, M. B.; Gutteridge, W. E. *Trypanosoma cruzi*: subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. *Exp. Parasitol*.1987;63:84-97.

Sylvester D, Krassner SM. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp BiochemPhysiol B*. 1976;55(3B):443-7.

Teixeira MM, Yoshida N. Stage-specific surface antigens of metacyclictrypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol*. 1986;18(3):271-82.

Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJ. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Microbiol*.2004a;6(8):733-41.

Tyagi H., Rajasubramaniam S., Dasgupta I. Regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of popular indica rice variety ADT39. *Current Science*. 2007;93(5):678-83.

Tyler KM, Engman DM.The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.*Int J Parasitol*. 2001;31(5-6):472-81.

Urbina JA, Crespo A. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. I. Hexokinase and phosphofructokinase. *Mol Biochem Parasitol*.1984;11:225-39.

Van den Abbeele P, Grootaert C, Marzorati M, Possemiers S, Verstraete W, Gérard P, Rabot S, Bruneau A, El Aidy S, Derrien M, Zoetendal E, Kleerebezem M, Smidt H, Van de Wiele T. Microbial community development in a dynamic gut model is reproducible, colon region specific, and selective for Bacteroidetes and Clostridium cluster IX. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(15):5237-46.

Vickerman, K., Tetley, L., Hendry, K.A., Turner, C.M. Biology of African trypanosomes in the tsetse fly. *Biol. Cell.*1998;64:109–19.

Vickery HB, *J. Biol. Chem.* 1942;144:719.

World Health Organization. Control of Chagas Disease. Second Report of the WHO Expert Committee: Technical Report Series. Geneva: World Health Organization; 2002.

WHO. Second WHO Report on Neglected Tropical Diseases, WHO (2013).

WHO, W. W. H. O. Chagas Disease (American trypanosomiasis). 2017.

Yamei Yu, Yu-He Liang, Erik Brostromer, Jun-Min Quan, Santosh Panjikar, Yu-Hui Dong and Xiao-Dong Su. A Catalytic Mechanism Revealed by the Crystal Structures of the Imidazolonepropionase from *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem.* 2006;281(48):36929-36.

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.*1960;46:541-51.

Zeledon, R. and J. E. Rabinovich. Chagas disease: an ecological appraisal with special emphasis on its insect vectors. *Annu Rev Entomol.*1981;26:101-33.

Zeledon R, Bolanos R, Rojas M. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop.*1984;41(1):39-43.