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

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 metaciclogênese 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.

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 (Oppenheimer, 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 cruzipaina) (Figueiredo et al., 1994). Os acidocalcisomas são organelas ácidas que se assemelham às 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 decarboxilado 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 Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C), reação catalisada pela prolina desidrogenase (*TcPROD*H) e posteriormente o mesmo é convertido em Glu pela Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (*TcP5CD*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 sugiram que Ser possa recuperar as taxas de consumo de O_2 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 (flúidos 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 às aquelas 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-oxoglutaramato, 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

urocanato 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 urocanato, 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 urocanato (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 Barison, 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.

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 uma 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* – $\Delta 1$ -pirrolina-5-carboxilato sintetase e *TcP5CR* - $\Delta 1$ -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 Microbiol Lett. 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 tripanozomiaze 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 *Trypanosoma cruzi*. *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., Inanishi, K., and Sakamoto, 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., Zweggarth, E. High infection 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 JI., 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*. *Biochem Soc Symp.* 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*. *J Eukaryot Microbiol.* 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. *J Biol 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.