Carlos Gustavo Baptista

**Metabolismo de serina: Caracterização de Serina Hidroximetiltransferase de
*Trypanosoma cruzi***

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

São Paulo
2017

Carlos Gustavo Baptista

**Metabolismo de serina: Caracterização de Serina Hidroximetiltransferase de
*Trypanosoma cruzi***

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

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

São Paulo
2017

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Baptista, Carlos Gustavo
Metabolismo de serina: Caracterização de Serina
Hidroximetiltransferase de Trypanosoma cruzi /
Carlos Gustavo Baptista; orientador Ariel Mariano
Silber. -- São Paulo, 2017.
114 p.

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

1. Parasitologia. 2. Trypanosoma cruzi. 3.
Metabolismo. 4. Aminoácidos. 5. Biologia molecular
e Bioquímica. I. Mariano Silber, Ariel, orientador.
II. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato: Baptista, Carlos Gustavo.

Titulo da Tese: Metabolismo de serina: Caracterização de Serina Hidroximetiltransferase de *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Silber , Ariel Mariano.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica realizada a...../...../....., considerou o candidato:

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

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 **57** nas fls. **06** do livro **03** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Ariel Mariano Silber** Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Perspectivas das enzimas de metabolismo de serina e cistationina de Trypanossoma cruzi como novos alvos terapêuticos*" do qual participam o(s) aluno(s) **Carlos Gustavo Baptista**, 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 **10.07.2013**, com validade de **4 anos**.

São Paulo, 31 de julho de 2013.

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

Profa. Dra. ANA PAULA LEPIQUE
Secretária- CEUA - ICB/USP

Dedicado ao Ronan pelo companheirismo e amor,
aos meus pais, Isabel e Luís pelo apoio
incondicional durante toda minha vida, à minha
irmã Giovana pela amizade que só irmãos
compartilham.

AGRADECIMENTOS

Tudo que eu consegui até o momento, tanto no âmbito profissional quanto pessoal, não seria possível sem a ajuda de pessoas extraordinárias que deixaram e que continuarão a deixar sua marca em minha vida. Por este motivo deixo aqui meus especiais agradecimentos as seguintes pessoas.

Agradeço imensamente ao Ronan Carbone Petean Junior pelo carinho, amor e por todos os momentos que passamos juntos desde que nos conhecemos. No que depender de mim, passaremos por muitos outros momentos nesta nova fase de nossa vida.

Aos meus pais Maria Isabel Moreira Baptista e Luís Carlos Baptista, pois sem eles eu literalmente não estaria aqui, mas também por toda a dedicação na minha criação e pelos valores que me ensinaram, valores estes que me permitiram alcançar meus objetivos.

A minha linda irmã Giovana Moreira Baptista Furlan pelo carinho e cumplicidade que só irmãos compartilham. A minha irmã também agradeço por me dar a alegria de ser tio. Esta tem sido uma experiência recente, mas muito transformadora e por isso também sou grato ao meu sobrinho Miguel, ser seu tio tem sido e continuará a ser muito gratificante. Desejo ao Miguel que ele cresça forte e feliz. Eu, como seu tio, espero também ser tão importante para você quanto você é para mim.

Ao Dr. Ariel Mariano Silber por me dar a oportunidade de trabalhar em seu laboratório e pela orientação profissional que tem me dado todos esses anos. Sua participação como orientador foi fundamental para meu crescimento profissional, ao abrir as portas de seu laboratório Ariel me proporcionou experiências profissionais únicas além das grandes amizades que pude fazer com os outros membros do laboratório. Apesar do fim do meu doutorado, quero muito que nossa amizade e parceria profissional se estendam por muitos e muitos anos. Desejo de coração que seu laboratório continue nessa trajetória de sucesso e que você possa continuar a formar profissionais de alta qualidade.

E é pela amizade e pelo profissionalismo que também agradeço aos amigos que fiz no laboratório do Ariel. Nesses quase quatro anos de doutorado conheci pessoas fantásticas de caráter e profissionalismo singulares. Muito obrigado por tudo que passamos juntos Maria Julia, Raíssa, Carolina, Flávia, Ludmila, Marcell, Rodolpho, Letícia, Sandra, Brian, Richard, Agustín, Carla, Leydi e Alexandre.

Quero agradecer a Elizabeth Furusho Pral, sou lhe muito grato por toda ajuda e pelos conhecimentos e técnicas que aprendi com você. Muito deste trabalho foi possível graças a sua ajuda.

Agradeço também ao Manuel pela ajuda na inoculação dos camundongos e coleta do soro. Ao Dr. Marcio V. Bertacine Dias e ao Dr. Jademilson Santos do departamento de microbiologia do ICB pela participação nos experimentos relativos à estrutura e modelagem da enzima alvo deste trabalho. Ao Dr. Karrel Olavarria por contribuir com ideias importantes em alguns experimentos. Aqui também deixo meu especial agradecimento a Dra. Maria Carolina Elias e Raphael Souza Pavani do instituto Butantan pela participação fundamental na aquisição das imagens de localização apresentada neste trabalho. Especial agradecimento ao Dr. Stênio P. Fragoso do ICC Curitiba-PR pelos plasmídeos utilizados nos ensaios de nocaute gênico. Ao Prof. Dr. Mauro Cortez e seu grupo pelo suporte técnico e por compartilhar nesse último tempo os seminários semanais.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao pessoal do departamento de parasitologia.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudo através do processo: 141935/2013-8. À FAPESP, pelo apoio financeiro otorgado ao laboratório para desenvolver o projeto.

Por último, mas não menos importante quero agradecer aos meus amigos de longa data. À Eliza Cristina Rodrigues pela amizade, pela disposição em ajudar a cada momento e por me fazer rir muito. À minha amiga Leo que sempre se mostrou uma grande companheira mesmo morando longe. Agradeço também a minha querida amiga Leni que me deu apoio e conforto emocional, permitindo que eu me desenvolvesse plenamente, jamais esquecerei toda ajuda que me deu. A todos os amigos do ICB e de fora do instituto que me apoiaram durante esses anos.

Este trabalho foi desenvolvido graças ao apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número de processo: 141935/2013-8.

RESUMO

BAPTISTA, C. G. **Metabolismo de serina: Caracterização de Serina Hidroximetiltransferase de *Trypanosoma cruzi***. 2017. 114 f. Tese (Doutorado em Parasitologia)-Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

A doença de Chagas é uma doença causada pelo protozoário parasita *Trypanosoma cruzi*, que afeta cerca de 10 milhões de pessoas, principalmente nas Américas. O *T. cruzi* utiliza aminoácidos como importante fonte de energia e em vários processos biológicos como diferenciação, resistência a condições de estresse e invasão de células hospedeiras. A serina está envolvida em muitas vias biosintéticas. Uma das funções relevantes da serina é a formação de compostos C1 para a biossíntese de nucleotídeos. O uso de serina para esse fim é iniciado pela Serina Hidroximetiltransferase, cuja atividade foi detectada em *T. cruzi*, mas seu papel na biologia do parasita permanece pouco explorado. Neste trabalho, identificamos um gene que codifica uma Serina Hidroximetiltransferase putativa com dupla localização (citoplasmática e mitocondrial). Por recombinação homóloga, obtivemos parasitas *knockouts* heterozigotos nos quais um alelo de SHMT foi substituído pelo gene da neomicina fosfotransferase. Os parasitas *knockouts* não mostraram diferenças na taxa de crescimento das formas epimastigotas ou na metaciclogênese *in vitro*. Porém, os parasitas *knockouts* mostraram uma diminuição significativa tanto no índice de infecção como no número de tripomastigotas liberados de células CHO-K1 infectadas com formas metacíclicas *knockout*.

Palavras-chave: *Knockout*. Índice de infecção. SHMT. Recombinação homóloga.

ABSTRACT

BAPTISTA, C. G. **Metabolism of serine: Characterization of Serine Hydroxymethyltransferase of *Trypanosoma cruzi***. 2017. 114 p. PhD. thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2017.

Chagas' disease is a disorder caused by the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*, which affects about 10 million people, mainly in the Americas. *T. cruzi* uses amino acids as an important energy source and in several biological processes such as differentiation, resistance to stress conditions and in the host-cell invasion. Serine is involved in many biosynthetic pathways. One of the relevant functions of serine is the formation of C1 compounds for the biosynthesis of nucleotides. The use of serine for that purpose is initiated by Serine Hydroxymethyltransferase, whose activity was detected in *T. cruzi* but its role in the biology of parasite remains poorly explored. In this work we identified a putative gene encoding a SHMT with dual localization, cytoplasmic and mitochondrial. We generated a single knockout cell line by homologous recombination in which one allele of SHMT was replaced by the neomycin phosphotransferase gene. Knockout parasites showed no difference in epimastigote growth rate or in *in vitro* metacyclogenesis. However, knockout parasites showed a significant decrease in both, infection index and in the number of trypomastigotes released from CHO-K1 cells infected with knockout metacyclic forms.

Keywords: Knockout. Infection index. SHMT. Homologous recombination.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1- PANORAMA DA DISTRIBUIÇÃO DA INFECÇÃO PELO <i>T. CRUZI</i>	19
FIGURA 2- CICLO DE VIDA DO <i>T. CRUZI</i>	22
FIGURA 3- DESENHO ESQUEMÁTICO DA FORMA EPIMASTIGOTA DE <i>T. CRUZI</i> . ..	24
FIGURA 4- PRINCIPAIS FONTES DE SERINA NA CÉLULA.	27
FIGURA 5- REAÇÃO CATALISADA POR SHMT 29	29
FIGURA 6- O PAPEL DE SHMT NA INTERCONVERSÃO SERINA\GLICINA E SUA CONECÇÃO COM SÍNTESE DE TIMIDILATO.	30
FIGURA 7- ESQUEMA DO CASSETE DE INTEGRAÇÃO PARA NOCAUTE DE <i>TCSHMT</i>	41
FIGURA 8- ALINHAMENTO MÚLTIPLO DAS SEQUÊNCIAS DE SHMT.	59
FIGURA 9- DOMÍNIOS PROTEICOS ENCONTRADOS PARA A SEQUÊNCIA <i>TCSHMT</i>	60
FIGURA 10- ANÁLISE DE SINTENIA DE <i>TCSHMT</i>	61
FIGURA 11- PREDIÇÃO ESTRUTURAL DE <i>TCSHMT</i>	63
FIGURA 12- CLONAGEM DE <i>TCSHMT</i> EM PET28A.	65
FIGURA 13- PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 10% DE INDUÇÃO DE <i>TCSHMT</i> RECOMBINANTE E TESTE DE SOLUBILIDADE.	67
FIGURA 14- PERFIL ELETROFORÉTICO EM GEL SDS-PAGE 10% DE PURIFICAÇÃO DE <i>TCSHMT</i> RECOMBINANTE POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDADE EM RESINA DE AGAROSE NTA-Ni ⁺²	68
FIGURA 15- CROMATOGRAFIA POR EXCLUSÃO MOLECULAR DE <i>TCSHMT</i> RECOMBINANTE.	69
FIGURA 16- <i>THERMAL SHIFT</i> DE <i>TCSHMT</i> RECOMBINANTE.	71
FIGURA 17- PERFIL DE EXPRESSÃO DE <i>TCSHMT</i> NOS DISTINTOS ESTÁGIOS DO <i>T.</i> <i>CRUZI</i>	72
FIGURA 18- ESPECIFICIDADE DO SORO POLICLONAL E DO ANTICORPO ANTI- <i>TCSHMT</i> PRODUZIDO EM CAMUNDONGO.	73
FIGURA 19- ANÁLISE DE EXPRESSÃO DE <i>TCSHMT</i> AO LONGO DO CICLO BIOLÓGICO DE <i>T. CRUZI</i> 74	74
FIGURA 20- LOCALIZAÇÃO CELULAR DE <i>TCSHMT</i> EM <i>T. CRUZI</i> CL14.	76

FIGURA 21- EXPERIMENTO DE PERMEABILIZAÇÃO DE PARASITAS COM DIGITONINA	77
FIGURA 22- PERFIL ELETROFORÉTICO DA CLONAGEM DAS REGIÕES INTERGÊNICAS DE <i>TCSHMT</i> EM VETOR PBS-NEO.....	80
FIGURA 23- VERIFICAÇÃO DE NOCAUTE DE UMA CÓPIA DO GENE <i>TCCLB.509937.150</i>	81
FIGURA 24- CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>T. CRUZI</i> WT, SKO E CLONES A9, F9 E G9 DURANTE A FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO	83
FIGURA 25- COMPARAÇÃO DA MORFOLOGIA DE <i>T. CRUZI</i> SELVAGEM E SKO ...	84
FIGURA 26- METACICLOGÊNESE DE <i>T. CRUZI</i> WT, SKO E CLONES A9, F9 E G9 ...	85
FIGURA 27- EFEITOS DO NOCAUTE SIMPLES DE <i>TCSHMT</i> NO NÚMERO DE CÉLULAS INFECTADAS POR <i>T. CRUZI</i>	86
FIGURA 28- EFEITOS DO NOCAUTE SIMPLES DE <i>TCSHMT</i> NO ÍNDICE DE INFECÇÃO DE <i>T. CRUZI</i>	87
FIGURA 29- NÚMERO DE TRIPOMASTIGOTAS WT, SKO E CLONES A9, F9 E G9 LIBERADOS NO SOBRENADANTE DE CULTURA DE CÉLULAS INFECTADAS	88
FIGURA 30- ANÁLISE FILOGENÉTICA DE <i>TCSHMT</i>	93

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- LISTA DE OLIGONUCLEOTÍDEOS INICIADORES (<i>PRIMERS</i>) UTILIZADOS.	40
TABELA 2- SOLUÇÕES DE PREPARO DE GEL SDS-PAGE.....	50
TABELA 3- PROTEÍNAS IDENTIFICADAS POR ALINHAMENTO BLASTP.	62

LISTA DE ABREVIATURAS

3-PGDH	3-fosfoglicerato desidrogenase
Apo	Apoenzima
BSA	Albumina de Soro Bovino
CI	Complexo I, ubiquinona oxidoreductase
CII	Complexo II, succinato ubiquinona oxidoreductase
CIII	Complexo III, ubiquinol citocromo C oxidoreductase
CIV	Complexo IV, citocromo C oxidase
Ct	<i>Cycle threshold</i>
D.O.	Densidade Ótica
DEAE	<i>Dietilaminoetil</i>
DHFR	Dihidrofolato Redutase
DMSO	<i>Dimetilsulfóxido</i>
dNTPs	desoxinucleotídeos trifosfato
dTMP	desoxitimidina monofosfato
dUMP	desoxiuridina monofosfato
E64	<i>trans-Epoxysuccinyl-L-leucylamido(4-guanidino)butane, L-trans-3-Carboxyoxiran-2-carbonyl-L-leucylagmatine, N-(trans-Epoxysuccinyl)-L-leucine 4-guanidinobutylamide</i>
EC	<i>Enzyme commission</i>
EDTA	<i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
IPTG	<i>Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside</i>
KAP3	Proteína Associada ao Cinetoplasto
MTH	Metileno Tetrahydrofolato
NTA-Ni⁺²	<i>Nitrilotriacetic acid Nickel</i>
PDB	<i>Protein Database Bank</i>
PLP	Pyridoxal 5 phosphate
PMSF	<i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i>
PSAT	Fosfoserina Aminotransferase
PSG	PBS suplementado com 8% de D-glicose
PSP	Fosfoserina Fosfatase
qPCR	PCR quantitativo
SDH	Serina Desidratase
SEC	<i>Size exclusion chromatography</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
SHMT	Serina Hidroximetiltransferase
sKO	Parasitas simples nocaute para SHMT
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TAU	<i>Triatomine Artificial Urine medium</i>
TAU3AAG	Meio TAU suplementado com 3 aminoácidos e glicose
TE	Tampão Tris-EDTA
THF	Tetrahydrofolato
TLCK	<i>Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride</i>
TS	Timidilato Sintase
U.A.	Unidades de Absorbância
Wt	Parasitas selvagens

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
1.1 Doença de Chagas.....	19
1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.2.1 Estruturas únicas de tripanossomatídeos presentes em <i>T. cruzi</i>	23
1.3 <i>T. cruzi</i> e o metabolismo de aminoácidos.....	25
1.4 <i>T. cruzi</i> e o metabolismo de serina.....	26
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral.....	32
2.2 Objetivos específicos.....	32
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	33
3.1 Identificação de genes putativos do metabolismo de serina no genoma de <i>T. cruzi</i> ...	34
3.2 Análise <i>in silico</i> de <i>TcSHMT</i>	34
3.2.1 Análise da sequência primária de <i>TcSHMT</i>	34
3.2.2 Análise comparativa de sintenia genômica utilizando dados presentes em TritrypDB ..	35
3.2.3 Modelagem molecular por homologia estrutural de <i>TcSHMT</i>	35
3.3 Organismos utilizados	35
3.3.1 <i>Escherichia coli</i>	35
3.3.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	36
3.3.2.1 <u>Metaciclo gênese <i>in vitro</i> em meio TAU3AAG (Contreras, Salles et al. 1985)</u>	36
3.3.2.2 <u>Purificação de tripomastigotas metacíclicos por cromatografia de troca iônica</u>	37
3.3.2.3 <u>Obtenção de formas intracelulares e tripomastigotas de <i>T. cruzi</i></u>	37
3.4 Clonagem da ORF de Serina Hidroximetiltransferase de <i>T. cruzi</i> (<i>TcSHMT</i>).....	38
3.4.1 Obtenção de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	38
3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).....	39
3.4.3 Manipulação e clonagem de sequências de DNA	40
3.4.3.1 <u>Clonagem de <i>TcSHMT</i> em vetor de expressão</u>	40
3.4.3.2 <u>Clonagem da região a montante de <i>TcSHMT</i> em vetor pBS-NEO</u>	41
3.4.3.3 <u>Clonagem da região a jusante de <i>TcSHMT</i> no plasmídeo UNEO</u>	42
3.4.4 Preparo de bactéria cálcio competente	42
3.4.5 Transformação de bactéria cálcio competente pelo método de choque térmico	43
3.4.6 Análise dos plasmídeos recombinantes por PCR de colônia.....	43
3.4.7 Extração de DNA plasmidial	44
3.4.8 Sequenciamento de DNA	44
3.5 Manipulação de RNA	45
3.5.1 Extração de RNA total por Trizol™.....	45

3.5.2 Síntese de cDNA	46
3.5.3 Análise da expressão de <i>TcSHMT</i> por PCR quantitativo (qPCR)	46
3.6 Manipulação de proteínas.....	47
3.6.1 Preparo de extrato proteico de <i>T. cruzi</i>	47
3.6.2 Expressão de <i>TcSHMT</i> recombinante em <i>E coli</i> competente	48
3.6.3 Purificação de <i>TcSHMT</i> recombinante	48
3.6.4 Eletroforese de proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE)	49
3.6.5 Protocolo de Thermal Shift (Huynh and Partch 2015)	50
3.7 Obtenção de soro policlonal contra <i>TcSHMT</i>.....	51
3.7.1 Purificação de anticorpo anti- <i>TcSHMT</i>	51
3.8 Ensaios de <i>Western blot</i>	52
3.8.1 Ensaios de permeabilização com digitonina.....	53
3.9 Imunolocalização por microscopia ótica confocal	53
3.10 Caracterização funcional de <i>TcSHMT</i> por nocaute gênico	54
3.10.1 Transfecção de <i>T. cruzi</i> e seleção dos parasitas transfectantes.....	54
3.10.2 Diluição limitante para seleção de clones de parasitas nocaute simples	55
3.10.3 Curvas de crescimento de epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	55
3.10.4 Análise de diferenças na metaciclogênese entre parasitas selvagens e sKO.....	55
3.10.5 Análise dos parasitas selvagens e sKO no ciclo intracelular.....	56
3.10.5.1 <u>Diferenças na infectividade de tripomastigotas metacíclicos selvagens e sKO.</u>	56
3.10.5.2 <u>Diferenças no ciclo intracelular de parasitas selvagens e sKO.</u>	56
4 RESULTADOS	57
4.1 Predições <i>in silico</i>.....	58
4.1.1 Identificação de genes putativos do metabolismo de serina no genoma de <i>T. cruzi</i>	58
4.1.2 O genoma do <i>T.cruzi</i> cepa CL contém duas sequências de DNA putativas para a enzima <i>TcSHMT</i>	58
4.1.3 Predição estrutural de <i>TcSHMT</i>	62
4.2 Clonagem, expressão e purificação de <i>TcSHMT</i>	64
4.2.1 Comportamento de <i>TcSHMT</i> recombinante em solução	68
4.3 Expressão e localização celular de <i>TcSHMT</i> ao longo do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i>	71
4.3.1 Análise da expressão de <i>TcSHMT</i> por qPCR.....	71
4.3.2 Obtenção de soro anti- <i>TcSHMT</i>	73
4.3.3 Análise da expressão de <i>TcSHMT</i> por Western blot.....	74
4.3.4 <i>TcSHMT</i> é uma proteína distribuída amplamente pelo citoplasma de <i>T. cruzi</i>	75
4.4 Análise do papel biológico de <i>TcSHMT</i> por meio de nocaute gênico	78
4.4.1 Deleção do gene <i>TcCLB.509937.150</i> por nocaute gênico	78
4.4.1.1 <u>Construção do cassete para nocaute do gene <i>TcCLB.509937.150</i></u>	78

4.4.1.2 <u>Verificação do nocaute de um alelo do gene <i>Tc</i>CLB.509937.150 através de substituição por gene de resistência à Neomicina</u>	80
4.4.2 Caracterização fenotípica de parasitas sKO para <i>Tc</i> SHMT.	82
4.4.2.1 <u>Curvas de crescimento e metaciclogênese em parasitas sKO</u>	82
4.4.2.2 <u>Efeitos do simples nocaute de <i>Tc</i>SHMT no ciclo intracelular</u>	85
5 DISCUSSÃO	90
6 CONCLUSÃO.....	99
REFERÊNCIAS	102

1.1 Doença de Chagas

A Doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana é uma infecção parasitária sistêmica, causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Essa antropozoonose foi reportada pela primeira vez há mais de cem anos pelo cientista mineiro Carlos Ribeiro Justiniano das Chagas (CHAGAS, 1909). Atualmente, tal parasitose ainda representa um problema de relevância para a saúde pública mundial (SCHMUNIS; YADON, 2010), afetando em torno de 6 a 7 milhões de pessoas (World Health Organization (WHO), 2015), principalmente nos países da América Latina (**Figura 1**). Anualmente ocorrem cerca de 10 mil mortes em 22 países do continente Americano (SCHMUNIS; YADON, 2010). Apesar desses dados, esta doença, assim como algumas outras parasitoses causadas por protozoários da família Trypanosomatidae, faz parte das 13 doenças tropicais mais negligenciadas do mundo, reconhecidas pela WHO (HOTEZ et al., 2007).

Figura 1- Panorama da distribuição da infecção pelo *T. cruzi*.

Distribuição global de indivíduos infectados por *T. cruzi*. (Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, 2010)

Aproximadamente 80% das transmissões, do parasita, acontecem por ação de insetos vetores hematófagos da subfamília Triatominae. Essa forma de transmissão está relacionada com características biológicas dos vetores e condições precárias de infraestrutura higiênico-sanitária do local de transmissão (MONCAYO, 2003). Em 2006, o Brasil recebeu a

Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde (DIAS, 2006; FERREIRA ; SILVA, 2006). Porém, há o risco de transmissão da doença por outras espécies de triatomíneos (RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, 2012) e pela persistência de focos residuais de *T. infestans*, em alguns estados (BELISARIO et al., 2017). O restante das formas de transmissão acontece por transfusão sanguínea (GOLDSMITH et al., 1978; PONCE, 1999), via placentária (MARTINS-MELO et al., 2014) e via oral (RUEDA et al., 2014), esta última via de transmissão é frequente na região amazônica (SOUZA-LIMA et al., 2013).

Segundo dados do Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan), em 2009 foram registrados no país 250 casos confirmados de doença de Chagas, sendo 236 (94,0%) no estado do Pará, onde o município de Altamira contribuiu com 10 (4,0%) das notificações feitas no estado (Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, boletim 02/2012) (BELTRÃO et al., 2009). Além disso, estima-se que de 2 a 3 milhões de pessoas estejam infectadas no país (MARTINS-MELO et al., 2014). Atualmente, a doença também se apresenta como uma ameaça a vários outros países, incluindo aqueles localizados na Europa, devido a transfusões de sangue e transplantes de órgãos (GASCON; BERN; PINAZO, 2010).

A doença apresenta duas fases clínicas em humanos: uma fase aguda e outra crônica. A fase aguda acontece no início da infecção e dura entre quatro a oito semanas, sendo geralmente assintomática, porém, febre e dores de cabeça podem ocorrer. Essa fase da doença se caracteriza também por uma intensa parasitemia, presente em praticamente todos os órgãos do organismo. A fase crônica se caracteriza por uma parasitemia reduzida que a faz ser indetectável pelos métodos de diagnóstico tradicionais (MEDECINS SANS FRONTIERES. CAMPAIGN FOR ACCESS TO ESSENTIAL, 2008). No entanto, é possível detectar a presença do parasita por PCR ou por testes indiretos (sorologia). As principais formas da fase crônica são: a indeterminada (sem a aparição de sintomas ou dano tissular) que acomete cerca de 70% dos chagásicos (MONCAYO; YANINE, 2006), e a forma cardíaca ou digestiva (PRATA, 2001). Na forma sintomática da doença os pacientes podem desenvolver manifestações clínicas como cardiomiopatia chagásica crônica o que pode resultar no óbito, ou problemas gastrointestinais como o megaesôfago levando a disfagia e regurgitação, e o megacólon que produz constipação e retenção fecal (BOSCARDIN et al., 2010; MARIN-NETO; RASSI, 2009; PUNUKOLLU et al., 2007). Ambas as formas sintomáticas podem apresentar diferentes graus de severidade.

A quimioterapia disponível para a doença de Chagas está baseada nas drogas Nifurtimox e Benzonidazol (DIAS, 2006). Atualmente, o uso desses medicamentos está sujeito a limitações e apesar de ambos serem efetivos na fase aguda, sua eficiência na fase crônica é discutível. Nas formas agudas relatou-se entre 70 e 75% de cura, valor que aumenta para 100% em casos congênitos. Porém, no período crônico os dados são mais controversos tendo-se relatado uma taxa de cura de 30% (APT; ZULANTAY, 2011).

1.2 *Trypanosoma cruzi*

O parasita *T. cruzi* é incluído no supergrupo Excavata e seguindo a ordem hierárquica, Euglenozoa, Kinetoplastea, Metakinetoplastina e Trypanosomatidae (ADL et al., 2005). É um protista flagelado que apresenta uma estrutura especial, denominada de cinetoplasto. Este se constitui em uma região de condensação do DNA mitocondrial, organizado em maxicírculos e minicírculos. A posição do cinetoplasto é um dos aspectos que diferenciam as distintas morfologias de *T. cruzi*. A mudança na morfologia do parasita é uma resposta de adaptação às diferentes situações biológicas que o parasita enfrenta ao longo do seu ciclo de vida. *T. cruzi* sobrevive em uma ampla faixa de condições ambientais, desenvolvendo complexas mudanças morfológicas durante seu ciclo de vida (**Figura 2**), no qual alterna entre um inseto vetor hematófago pertencente à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae, e um hospedeiro vertebrado (BRENER, 1973).

Tradicionalmente, quatro formas do parasita têm sido descritas na literatura. A classificação de suas formas baseia-se, entre outros critérios, na posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e ao local de onde emerge o flagelo (HOARE, 1971) . Por exemplo, o flagelo emergindo na extremidade posterior que percorre todo o corpo formando uma membrana ondulante é característica de formas tripomastigotas. Os tripomastigotas são alongados, possuem cinetoplasto posterior ao núcleo e são as formas infectivas, não replicativas, encontradas nos tecidos e sangue de hospedeiros vertebrados (tripomastigotas sanguíneas) ou então na porção distal do intestino do inseto vetor (tripomastigotas metacíclicas). As formas amastigotas são arredondadas ou ovóides e apresentam flagelo que não se exterioriza. No inseto vetor as formas epimastigotas são as formas replicativas extracelulares, com corpo alongado e cinetoplasto anterior bem próximo ao núcleo.

Figura 2- Ciclo de vida do *T. cruzi*.

As formas tradicionais descritas para o parasita são epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos, quando localizado no inseto vetor, e as formas amastigotas e tripomastigotas sanguíneas no hospedeiro mamífero. (Silva et al., 2011).

Essas mudanças que o parasita apresenta durante seu desenvolvimento são parte da resposta às diferentes condições ambientais que *T. cruzi* enfrenta. Esse complexo ciclo biológico (**Figura 2**) pode ser representado de forma didática, com as formas epimastigotas que colonizam o tubo digestório do inseto vetor e que se dividem por fissão binária. À medida que os epimastigotas migram para a porção distal do tubo digestório, estes sofrem estresse nutricional, aderem-se a parede do intestino do barbeiro e diferenciam-se em tripomastigotas metacíclicos em um processo denominado metaciclogênese. Uma vez finalizada a metaciclogênese, os tripomastigotas metacíclicos podem ser liberados junto às fezes durante o repasto sanguíneo do vetor. Por meio de descontinuidades da pele na região da picada, os tripomastigotas metacíclicos podem ser internalizados e invadir os tecidos subjacentes, infectando as células do hospedeiro mamífero. Uma vez que os tripomastigotas infectam uma célula, estes se diferenciam nas formas amastigotas que se multiplicam por fissão binária. Após sucessivas divisões, os parasitas diferenciam-se em tripomastigotas sanguíneas que ao eclodirem podem infectar células próximas à região de eclosão ou atingirem a corrente

sanguínea e infectarem tecidos distantes mantendo, assim, a infecção no hospedeiro. Estas formas tripomastigotas podem ser ingeridas por outro inseto vetor durante seu repasto sanguíneo e na porção média do tubo digestório se diferenciar novamente nas formas epimastigotas (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1999).

Mais recentemente, tem-se descrito uma forma intermediária que aparece de maneira transiente entre os estágios amastigota e tripomastigota, denominada epimastigota intracelular (ALMEIDA-DE-FARIA et al., 1999; ELIAS et al., 2007; TYLER; ENGMAN, 2001).

Além do evidente interesse de saúde pública, *T. cruzi* se tornou um importante modelo de estudo, principalmente por se diferenciar marcadamente de seus hospedeiros mamíferos em diversos processos biológicos, tais como a edição de RNA de genes do genoma mitocondrial (SIMPSON et al., 2000), a compartimentalização da glicólise (MICHELS; HANNAERT; BRINGAUD, 2000) e a transcrição policistrônica de genes codificantes de proteínas pelas RNA polimerases I e II (KELLY; WICKSTEAD; GULL, 2005).

1.2.1 Estruturas únicas de tripanossomatídeos presentes em *T. cruzi*

Os Tripanossomatídeos são parasitas que apresentam várias organelas e outras estruturas peculiares que os diferenciam de outros eucariotos. *T. cruzi* apresenta várias dessas organelas e estruturas especiais (**Figura 3**). Na parte inferior da membrana plasmática de *T. cruzi*, há uma camada de microtúbulos subpeliculares que conferem ao parasita certa rigidez.

A estrutura do flagelo do parasita não difere grandemente da estrutura comumente encontrada em outros organismos ou células flageladas, porém o flagelo de *T. cruzi* emerge de uma invaginação conhecida como bolsa flagelar (SOARES; DE SOUZA, 1991). O tamanho e a localização do flagelo, no corpo do parasita, variam de acordo com o estágio de desenvolvimento de *T. cruzi*. Nas formas epimastigotas o flagelo emerge na porção anterior, enquanto que nas formas tripomastigotas, a base do flagelo localiza-se na porção posterior de *T. cruzi*.

Outra característica importante de *T. cruzi* é a compartimentalização parcial da via glicolítica em estruturas membranosas semelhantes aos peroxissomos de outros eucariotos e que nos tripanossomatídeos são denominadas de glicossomos. Nestas estruturas, encontram-se as primeiras enzimas da glicólise (TAYLOR; GUTTERIDGE, 1987) dentre outras enzimas de várias vias metabólicas.

Outras organelas envolvidas por membranas e 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; STEINDEL; SOARES, 1994). Os acidocalcisomas apresentam um conteúdo eletro denso e são importantes para o armazenamento de metabólitos e eletrólitos em especial de ortofosfato (SCOTT; DOCAMPO, 2000).

Figura 3- Desenho esquemático da forma epimastigota de *T. cruzi*.

Na figura, está evidenciada a posição do cinetoplasto em relação ao núcleo e bolsa flagelar. Organelas como glicossomo, reservossomos e acidocalcisoma também podem ser observadas na porção posterior de *T. cruzi* (Souza, 2008).

Outra organela especial de *T. cruzi* é sua única mitocôndria que se estende por todo o interior do parasita em distintos ramos entre os microtúbulos subpeliculares. Em uma determinada região da mitocôndria há uma complexa rede de DNA mitocondrial, já mencionado no texto, conhecido como cinetoplasto. Esta rede de DNA concatenado é uma das características mais marcantes dos tripanossomatídeos e representa 25% do DNA total da célula. O cinetoplasto é composto por maxicírculos e minicírculos. Os minicírculos não codificam proteínas, enquanto que há evidências que os maxicírculos contenham material codificante.

A cadeia transportadora de elétrons é composta por quatro complexos macromoleculares localizados na membrana interna da mitocôndria. O complexo I: ubiquinona oxidoredutase (CI), complexo II: succinato ubiquinona redutase (CII), complexo

III: ubiquinol citocromo c3 oxidorreductase (CIII) e por último o complexo citocromo c2 oxidase (CIV). É importante mencionar que o CI em *T. cruzi* encontra-se de forma incompleta e que sua funcionalidade neste parasita é controversa (OPPERDOES; MICHELS, 2008). Além dos complexos citados, a Coenzima Q ou ubiquinonas e o citocromo c funcionam como transportadores de elétrons entre os complexos.

1.3 *T. cruzi* e o metabolismo de aminoácidos

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* confronta ambientes muito distintos entre si que o força a se adaptar aos diferentes recursos disponíveis para serem utilizados como fonte de energia e carbono. Sabe-se que os tripanossomatídeos são capazes de metabolizar tanto carboidratos quanto aminoácidos (CAZZULO, 1994). Sabemos que a via glicolítica em tripanossomatídeos se inicia nos glicossomos e termina no citoplasma (CAZZULO, 1992; TAYLOR; GUTTERIDGE, 1987) e que as formas tripomastigotas do parasita são capazes de metabolizar glicose, e que o fluxo desta via metabólica não depende da presença de oxigênio (CANNATA; CAZZULO, 1984). A glicose é preferencialmente metabolizada nas formas epimastigotas, quando estas são cultivadas em meio contendo glicose e aminoácidos (CAZZULO et al., 1985). É importante destacar que os aminoácidos em *T. cruzi*, não apenas participam em processos como síntese de proteínas, mas que além da glicose, os aminoácidos também atuam na geração de energia (BARISON et al., 2016; MANTILLA et al., 2015; PAES et al., 2013; SILBER et al., 2006). Além do catabolismo de glicose, com produção de succinato e alanina (CAZZULO, 1994), foi observada a oxidação de asparagina, glutamina, aspartato, glutamato, leucina, isoleucina e prolina, o que permitiu inferir nos estudos metabólicos a participação desses aminoácidos como fonte de energia. Também foi demonstrado que alguns desses metabólitos podem ser convertidos a aspartato ou glutamato e incorporados ao Ciclo de Krebs após sua deaminação na mitocôndria (SYLVESTER; KRASSNER, 1976; ZELEDON, 1960) com liberação de grande quantidade de amônio ao meio (CAZZULO, 1994) revisado por (SILBER et al., 2005). Sabe-se também que o transporte de histidina em *T. cruzi* é particularmente importante para a produção de ATP nas formas epimastigotas (BARISON et al., 2016) e que o consumo de prolina como fonte de energia é importante na invasão celular (MANTILLA et al., 2015; PAES et al., 2013).

Além da participação dos aminoácidos na obtenção de energia, tem sido demonstrado que esses metabólitos participam em processos biológicos fundamentais para os tripanossomatídeos (SILBER et al., 2006), tais como osmorregulação e o controle do volume

celular (ROHLOFF; MONTALVETTI; DOCAMPO, 2004; ROHLOFF; RODRIGUES; DOCAMPO, 2003). A prolina participa de vários desses processos, tais como a metaciclologênese (CONTRERAS et al., 1985), na invasão da célula hospedeira (MANTILLA et al., 2015; MARTINS et al., 2009), na diferenciação de formas intracelulares em tripomastigotas (TONELLI et al., 2004) e o acúmulo desse aminoácido está envolvido na defesa do parasita contra as espécies reativas de oxigênio (MAGDALENO et al., 2009; PAES et al., 2013; SAYE et al., 2014). De modo semelhante o glutamato está relacionado com a resistência ao estresse térmico, nutricional e oxidativo (MAGDALENO et al., 2011). Adiciona-se a isso, a importância da interconversão de arginina a fosfoarginina pela ação da enzima arginina quinase. Esse processo é fundamental na administração dos recursos energéticos de *T. cruzi* e, portanto, também é importante para a proliferação celular do parasita (PEREIRA et al., 2002) e a resistência ao estresse nutricional (PEREIRA et al., 2003). Finalmente, sabe-se que vários aminoácidos como glutamato, glicina e alanina participam na regulação do volume celular do parasita, atuando como parte de um mecanismo de resistência ao estresse osmótico (SCHOLJET et al., 2008).

1.4 *T. cruzi* e o metabolismo de serina

Serina é um aminoácido importante para a síntese de proteínas, lipídeos, nucleotídeos e outros aminoácidos como glicina, cistationina e metionina. De forma didática, há quatro fontes majoritárias de serina nas células em geral (DE KONING et al., 2003): transporte, síntese a partir de glicina, degradação de proteínas e lipídeos e a via de biossíntese *de novo* de serina a partir da glicólise (**Figura 4**).

Na maior parte dos organismos, a serina pode ser sintetizada *de novo* a partir de um intermediário da glicólise, 3-fosfoglicerato, que ao sofrer desidrogenação pela ação de 3-D-fosfoglicerato desidrogenase gera 3-fosfohidroxipiruvato. Em um segundo passo enzimático, a atividade de fosfoserina transaminase transfere o grupo $-NH_2$ do aminoácido glutamato para 3-fosfohidroxipiruvato produzindo α -cetoglutarato e fosfoserina respectivamente. A fosfoserina, por sua vez, é posteriormente convertida a serina pela fosfoserina fosfatase (LUND; MERRILL; GUYNN, 1985).

A serina está conectada à glicólise através da sua conversão a piruvato por meio de uma Serina/Treonina desidratase (S/TDH), uma proteína dependente de piridoxal fosfato (PLP) que também pode atuar sobre treonina. S/TDH catalisa uma reação reversível onde o

aminoácido forma uma base de SCHIFF com o PLP e consequentemente é deaminado formando piruvato, se o substrato for serina (XU; CHEN; GRANT, 2011).

Figura 4- Principais fontes de serina na célula.

Serina pode ser obtida a partir de transporte (*Dietary protein*), da síntese a partir de glicina, da degradação de proteínas e lipídeos (*protein and phospholipid degradation*) ou pela síntese *de novo* da glicólise. Os algarismos romanos indicam as seguintes enzimas: I: 3-D-fosfoglicerato desidrogenase; II, fosfofoserina transaminase; III, fosfofoserina fosfatase; IV, serina hidroximetiltransferase; V, complexo de clivagem da glicina. THF: tetrahidrofolato. 5,10-MTHF: 5,10 metileno-tetrahidrofolato (De Koning et al., 2003).

Outro aspecto importante do metabolismo de serina é a formação de cistationina, que é um importante intermediário do metabolismo de cisteína. Aminoácidos contendo enxofre como a cisteína desempenham funções importantes como a síntese de proteínas, metilação e síntese de poliaminas. A biossíntese de cisteína pode ocorrer a partir de serina pela via de trans-sulfuração da metionina (MARCIANO; SANTANA; NOWICKI, 2012). No início desse processo, a metionina reage com o ATP gerando S-adenosil-metionina. O carbono ligado ao enxofre da metionina é transferido para várias moléculasceptoras, formando S-adenosilhomocisteína. Esta via é estritamente dependente de metionina que é a doadora do átomo de enxofre necessário para formar homocisteína durante a síntese de cistationina. A serina atua nesta via por meio da ação da enzima cistationina β sintase. Posteriormente a cistationina amoniolíase converte cistationina em cisteína gerando NH_3 e α -cetobutirato. É importante ressaltar que até onde se sabe a metionina não é sintetizada em *T. cruzi*, devendo ser incorporada do meio extracelular. Outra possível via para a síntese de cisteína a partir de

serina utiliza SH₂ como fonte de enxofre. Sendo assim, serina é acetilada por uma Serina O-acetiltransferase em uma reação que depende de Acetil-CoA, formando O-Acetilserina (MARCIANO et al., 2010). O segundo passo, consiste na incorporação de SH₂ a serina gerando cisteína e acetato por meio da ação da cisteína sintase (MARCIANO; SANTANA; NOWICKI, 2012).

A serina é um aminoácido metabolicamente relacionado com a glicina, pois ambos estão envolvidos na formação de precursores para a síntese de nucleotídeos (ANDERSON; STOVER, 2009). A utilização de serina para esse fim é iniciada pela serina hidroximetiltransferase (SHMT, EC: 2.1.2.1) (NOSEI; AVILA, 1985), uma enzima chave para a interconversão de folato (CAPELLUTO et al., 2000). SHMT é uma enzima dependente de piridoxal 5-fosfato (PLP), ubiquamente expressa na natureza (SCHIRCH; SZEKENYI, 2005). Sabe-se que o PLP está envolvido em mecanismos que regulam o estado oligomérico de SHMT, além de ser essencial para a atividade da enzima (GIARDINA et al., 2015). Esta enzima catalisa a conversão reversível de serina e tetraidrofolato (THF) para produzir glicina e 5,10-metilenotetraidrofolato (MTHF) (BROSNAN et al., 2015). Nesta reação (**Figura 5**), o grupo hidroximetil é transferido de serina para THF fornecendo, assim, unidades de carbono na forma de MTHF que são subsequentemente utilizados para a biossíntese *de novo* de nucleotídeos (PANDEY et al., 2014). Esta reação representa a principal fonte de grupos metil para o metabolismo de um-carbono que é estocada na forma de MTHF necessário não só para a síntese *de novo* de nucleotídeos mas também para a metilação de DNA (KASTANOS; WOLDMAN; APPLING, 1997). Uma vez que *T. cruzi* é auxotrófico para purinas (GUTTERIDGE; GABORAK, 1979), esta unidade de carbono pode ser particularmente importante para a biossíntese de pirimidinas, especialmente nos estágios intracelulares de *T. cruzi* (HASHIMOTO et al., 2012). SHMT é a primeira enzima no ciclo de síntese de timidilato, onde o MTHF sintetizado por SHMT é utilizado como substrato pela enzima bifuncional dihidrofolato-redutase-timidilato sintase (DHFR-TS) para produzir dTMP a partir de dUMP (RECHE et al., 1994). Todas essas enzimas estão presentes em *T. cruzi* e o ciclo do timidilato (**Figura 6**) parece ser essencial para o parasita, uma vez que não foi possível gerar o mutante nulo para o gene DHFR-TS (CAPELLUTO et al., 2000; PEREZ BRANDAN et al., 2011).

A SHMT está em uma posição de convergência entre metabolismo da serina/glicina e biossíntese de nucleotídeos. Esta enzima é um alvo atraente para o desenvolvimento de fármacos antitumorais e antiparasitários devido ao seu papel na proliferação celular (MAENPUEN et al., 2009; PINTHONG et al., 2014; SOPITTHUMMAKHUN et al., 2009).

Além do mais, o papel biológico de SHMT em diversos tipos de tumores tem sido alvo de muitos estudos (PANDEY et al., 2014; PAONE et al., 2014). A reação catalisada por esta enzima também é a principal via de síntese de glicina em *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (KASTANOS; WOLDMAN; APPLING, 1997).

Figura 5- Reação catalisada por SHMT

A figura mostra a reação catalisada por SHMT, onde um átomo de carbono do aminoácido serina (indicado por um círculo descontinuo) é transferido ao tetrahydrofolato (THF), formando assim o produto 5,10-metileno-THF e o aminoácido glicina. Esta reação é dependente de piridoxal 5 fosfato (PLP). Fonte (Aksoy; Uzel; Bedir, 2016).

A atividade de SHMT está presente em diferentes cepas de *Leishmania spp* e de *T. cruzi* sendo que para este último, a atividade da enzima foi muito maior (NOSEI; AVILA, 1985). Em formas epimastigotas de *T. cruzi* a enzima SHMT foi purificada e parcialmente caracterizada. O tratamento de extratos de formas epimastigotas com digitonina sugeriu que esta enzima é citoplasmática e que apresenta uma estrutura monomérica. A SHMT de *T. cruzi* é inibida de forma competitiva por análogos de folato, como o tetrahydrofolato, e de forma não competitiva para serina (CAPELLUTO et al., 2000). Interessantemente, até o momento não há dados sobre a existência de isoformas mitocondriais ou glicossomais como já demonstrado em *Crithidia fasciculata* (CAPELLUTO et al., 1999).

Figura 6- O papel de SHMT na interconversão serina\glicina e sua conexão com síntese de timidilato.

Na figura é possível observar a estrutura do tetrahydrofolato, representado no lado direito. O círculo pontilhado destaca a região onde o átomo de carbono proveniente da serina é ligado. Em verde estão as três enzimas que compõem a via: SHMT= serina hidroximetiltransferase, TS= timidilato sintase e DHFR= dihidrofolato redutase. Em alguns protozoários TS e DHFR formam uma enzima bifuncional. THF= tetrahydrofolato e DHF= dihidrofolato (Pang et al., 2009).

Nosso grupo identificou duas sequências correspondentes aos genes putativos de SHMT em bancos de dados do genoma de *T. cruzi* (números sistemáticos TcCLB.509937.150 e TcCLB.510407.90). A partir dessas sequências fomos capazes de realizar vários experimentos na tentativa de caracterizar esta importante enzima do metabolismo de serina. Metabolismo este pouco explorado até o momento em *T. cruzi*. Nossa hipótese é que a enzima SHMT é particularmente importante para as formas replicativas de *T. cruzi* e que SHMT pode, portanto, utilizar serina como precursor para a síntese de unidades de carbono. O estudo dessa enzima poderá contribuir com um melhor entendimento do metabolismo desse parasita.

2.1 Objetivo geral

Analisar o papel da enzima serina hidroximetiltransferase de *T. cruzi* (*TcSHMT*, EC: 2.1.2.1) sobre o metabolismo de serina no parasita, e seu possível papel biológico ao longo de seu ciclo de vida.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar e caracterizar o gene putativo da enzima *TcSHMT*.
- Analisar a expressão de *TcSHMT* ao longo do ciclo de vida do parasita.
- Determinar a localização celular de *TcSHMT*.
- Gerar transfectantes em que o gene de *TcSHMT* tenha sido nocauteado para estudos de função, e assim avaliar o papel funcional desta enzima em diferentes aspectos da biologia do parasita, tais como: velocidade de proliferação, diferenciação, infectividade e estabelecimento do ciclo intracelular.
- Determinar o estado oligomérico de *TcSHMT*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Identificação de genes putativos do metabolismo de serina no genoma de *T. cruzi*

Com o intuito de obter uma visão panorâmica do metabolismo de serina em *T. cruzi*, utilizamos enzimas de diferentes organismos modelo como sementes de busca (*queries*) e através do programa BLASTP (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>), identificamos sequências, de enzimas envolvidas no metabolismo do aminoácido serina em *T. cruzi*, no banco de dados GeneDB. As supostas enzimas desse metabolismo de *T. cruzi* apresentaram valores de similaridade significativos (*e-value* < 1 e-10) com ao menos uma enzima de outro organismo. As enzimas dos organismos modelos aplicadas nas buscas foram 3-fosfoglicerato desidrogenase (3-PGDH, EC: 1.1.1.95), fosfoserina aminotransferase (PSAT, EC: 2.6.1.52), fosfoserina fosfatase (PSP, EC: 3.1.3.3), SHMT e serina desidrogenase (SDH, EC: 4.3.1.17) de *Leishmania major*, *Drosophila melanogaster*, *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thaliana*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Escherichia coli*.

3.2 Análise *in silico* de TcSHMT

3.2.1 Análise da sequência primária de TcSHMT

Após a identificação do gene putativo de TcSHMT no genoma de *T. cruzi* a identidade entre as sequências das cepas CL, Sylvio, Dm28c e marinkellei foi comparada utilizando a ferramenta CLUSTAL Ômega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Uma vez que os trabalhos experimentais foram realizados com a cepa CL clone 14, adotamos a sequência de TcSHMT proveniente da cepa CL como referência. Para fins de comparação esta sequência foi alinhada com SHMT de *E. coli* e as isoformas citosólica e mitocondrial de humanos. A partir do alinhamento foram destacados os resíduos conservados com o uso da ferramenta ESPript (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPript/ESPript/>).

A busca por domínios conservados em TcSHMT foi realizada na base de dados INTERPROSCAN (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>).

É bem relatado na literatura que SHMT pode localizar-se tanto no citosol como na mitocondria, portanto, realizamos uma busca por sequências putativas para direcionamento mitocondrial mediante o uso da ferramenta SIGNALP 4.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) e TARGETP 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). Utilizamos a ferramenta TMPRED para análise de regiões transmembrana (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html).

3.2.2 Análise comparativa de sintenia genômica utilizando dados presentes em TritypDB

A verificação de sintenia genômica em tripanossomatídeos foi realizada pela utilização dos resultados contidos em banco de dados do TritypDB (<http://TriTrypDB.org>) (ASLETT et al., 2010).

3.2.3 Modelagem molecular por homologia estrutural de TcSHMT

Esta etapa foi executada em parceria com Dr. Marcio Dias e Dr. Jademilson Santos do departamento de microbiologia. Assim, foram executadas análises através de modelagem molecular por homologia estrutural. Para isso, busca por proteínas homólogas utilizando a estrutura primária de TcSHMT foi realizada com o auxílio do programa BLASTP (ALTSCHUL et al., 1997) e o banco de estruturas tridimensionais depositadas no banco de dados de proteínas [PDB (WESTBROOK et al., 2002)]. O modelo molecular foi construído para o alvo identificado como emprego da ferramenta SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) e editado com o programa Swiss-pdb viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>).

3.3 Organismos utilizados

3.3.1 *Escherichia coli*

Neste trabalho foram utilizadas três cepas de *E. coli*. Para os experimentos de clonagem, escolhemos a cepa XL1blue genótipo endA1 gyrA96(nal^R) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F[::Tn10 proAB⁺ lacI^q Δ(lacZ)M15] hsdR17(r_K⁻ m_K⁺). Já para os experimentos de expressão de proteína recombinante a cepa utilizada foi BL21 (DE3) genótipo B F⁻ ompTgaldcmlonhsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ(DE3 [lacIIacUV5-T7p07ind1sam7nin5]) [malB⁺]_{K-12}(λ^S). E por fim, nos experimentos de complementação utilizamos a cepa GlyA derivada de *E. coli* K12 genótipo [araD139]_{B/r}, Δ(argF-lac)169, λ⁻, flhD5301, Δ(fruK-yeiR)725(fruA25), ΔglyA41::Mu, pheA905, relA1, rpsL150(strR), deoC1](STAUFFER; PLAMANN; STAUFFER, 1981).

3.3.2 *Trypanosoma cruzi*

Todos os experimentos deste trabalho foram realizados com as principais formas replicativas (epimastigotas e amastigotas) e infectivas (tripomastigotas metacíclicos e tripomastigotas derivados de células CHO-K1) da cepa CL clone 14 de *T. cruzi*.

Formas epimastigotas de *T. cruzi* cepa CL clone 14 foram mantidas em fase exponencial de crescimento por passagens regulares em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB v/v) a 28 °C (CAMARGO, 1964).

Formas tripomastigotas metacíclicas foram obtidas por metaciclogênese *in vitro* em meio TAU3AAG conforme detalhado no item 3.3.2.1.

As formas intracelulares amastigotas e epimastigotas intracelulares e formas infectivas tripomastigotas sanguíneas foram obtidas mediante infecção de células CHO-K1 (*Chinese Hamster Ovary*) conforme detalhado no item 3.3.2.3.

3.3.2.1 Metaciclogênese *in vitro* em meio TAU3AAG (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 xg 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 TAU3AAG (TAU suplementado com 10 mM glicose, 2 mM ácido aspártico, 50 mM ácido glutâmico, 10 mM prolina), e incubados a 28 °C. Nesta etapa os parasitas aderem à superfície das garrafas de cultivo e diferenciam-se nas formas tripomastigotas metacíclicas. Após sete dias os tripomastigotas metacíclicos começam a se liberarem do substrato.

3.3.2.2 Purificação de tripomastigotas metacíclicos por cromatografia de troca iônica

Para purificar e coletar as formas tripomastigotas metacíclicas obtidas conforme o item 3.3.2.1, foi realizada cromatografia de troca iônica com resina de DEAE celulose (DEAE-52 Whatman) (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986).

Ao sétimo dia de incubação em meio TAU3AAG o sobrenadante da cultura foi coletado (sem homogeneização) e transferido para tubo falcon de 50 mL e em seguida centrifugado a 7000 xg 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) preparada como a seguir.

Em uma coluna ou seringa estéril foi adicionada resina DEAE celulose equilibrada com PBS pH8 (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 um mL de PSG foram depositados sobre a coluna e eluídos com PSG. As frações coletadas da coluna foram centrifugadas a 7000 xg por cinco min a temperatura ambiente e ressuspensos em 1 mL de PBS. O número de tripomastigotas metacíclicos 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.

3.3.2.3 Obtenção de formas intracelulares e tripomastigotas de *T. cruzi*

Para obtenção de formas intracelulares e tripomastigotas de *T. cruzi*, células CHO-K1 foram mantidas em meio RPMI-1640 (VitrocellTM) suplementado com 10% de SFB (v/v), 0,15% NaHCO₃, 100 U/mL penicilina, 100 µg/mL estreptomicina e incubadas a 37 °C sob atmosfera úmida e 5% CO₂.

Assim, 5×10^5 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 xg) para a separação das formas intracelulares do parasita do debris celular. O sobrenadante foi transferido para outro tubo e centrifugado novamente (10 min a 4300 xg). 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 4300 xg) 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.

3.4 Clonagem da ORF de Serina Hidroximetiltransferase de *T. cruzi* (TcSHMT)

3.4.1 Obtenção de DNA genômico de *T. cruzi*

Um total de 5×10^7 formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram coletadas do meio LIT suplementado com 10% de SFB (v/v) por centrifugação a 7.000 xg por 5 min a 4 °C. As células foram lavadas em PBS, suspensas em 350 µL de tampão TELT (50 mM Tris-HCl pH8, 62,5 mM EDTA, 2,5 M LiCl e 4% triton X-100) e incubadas por 5 min a 4 °C. Então 350 µL de solução fenol/clorofórmio (v/v) foram adicionados, misturado por inversão e centrifugados a 12000 xg por 5 min a 4 °C. A fase aquosa foi transferida para novo tubo e o DNA foi precipitado pela adição de 1/10 volumes de 3 M acetato de sódio, pH 5,2, e 3 volumes de Etanol absoluto e novamente centrifugados a 12000 xg por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de DNA precipitado foi lavado por centrifugação

(10 min, 12.000 xg), seguida de uma lavagem com 70% Etanol (v/v). O precipitado foi seco a temperatura ambiente e ressuspensionado em 100 µL de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 1 mM EDTA) suplementada com 30 µg/mL de RNase A. Após uma hora de incubação a 37 °C o DNA purificado foi armazenado a 4 °C.

3.4.2 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A amplificação do fragmento de DNA *TcSHMT* foi realizada mediante a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando, inicialmente, os oligonucleotídeos designados para cada caso listados na tabela 01. Para isso, foram preparadas reações contendo: 100 ng de DNA genômico da cepa CL-14 de *T. cruzi*, 1 x de tampão para Taq DNA Polimerase sem MgCl₂ (Fermentas[®], Lituania), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas[®]) e H₂O mili-Q qsp 25, 50 ou 100 µL. Como controle negativo foi usado água ao invés de DNA na amostra. As condições de amplificação foram: **1)** desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos de **2)** desnaturação a 95 °C por 30 s, **3)** anelamento a 55 °C por 30 s, **4)** amplificação a 72 °C por 90 s e **5)** extensão final a 72 °C por 10 min.

Para a verificação da amplificação e do tamanho do fragmento de DNA correspondente a ORF de *TcSHMT*, as amostras foram resolvidas sob eletroforese em gel de agarose. Para isto, o gel foi preparado em 1% (p/v) de agarose dissolvida em tampão TAE 1 x (40 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8 ajustado com ácido acético), acrescentado de 0,5 µg/ml brometo de etídio. Aliquotas de DNA foram diluídas em tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol p/v, 0,25% xileno cianol p/v e 20% glicerol v/v) e aplicadas no gel. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 1Kb DNA *ladder* (Fermentas[®]). A corrida eletroforética foi realizada aplicando uma voltagem de 115 V e os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultravioleta utilizando um transiluminador Benchtop UV transiluminator (UVP).

Os amplicons obtidos foram precipitados com 10% (do volume da PCR) de acetado de sódio 3 M pH 5,2 e três volumes de etanol absoluto gelado e mantidos a -20 °C. Após a precipitação, a reação foi centrifugada a 12.000 xg por 10 min a 4 °C, o sedimento foi lavado com etanol 70%, e o DNA seco e ressuspensionado em água ultrapura.

Tabela 1- Lista de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados.

Nome do primer	Sequência	Sítio de restrição	TM em °C
<i>Tc</i> SHMTF	5'GGGgaat <i>Tc</i> ATGTCAAAGTCTCTCGTTGAA 3'	EcoRI	55
<i>Tc</i> SHMTR	5'GGGc <i>Tcgag</i> GGCAGCAGGTGGAATG 3'	XhoI	55
<i>Tc</i> SHMTR2	5'GGGc <i>Tcgag</i> <u>TTAGGCAGCAGGTGGAATG</u> 3'	XhoI	55
<i>Tc</i> SHMTF2	5'GGG c <i>Tcgag</i> ATGTCAAAGTCTCTCGTTGAA 3'	XhoI	55
<i>Tc</i> SHMTR3	5' GGG gaat <i>Tc</i> <u>TTAGGCAGCAGGTGGAAT</u> 3'	EcoRI	55
GlyAF	5' GGG ggtacc ATGTTAAAGCGTGAAATGAAC 3'	KpnI	55
GlyAR	5' GGG gaat <i>Tc</i> <u>TTATGCGTAAACCGGGTA</u> 3'	EcoRI	55
<i>Tcq</i> PCRF	5'CAACTTTGAGAGCCGCATAA 3'	Não há	59
<i>Tcq</i> PCRR	5'GATCGCAAACCTCCTTCATT 3'	Não há	59
UPSF	5'CGGggtaccTATGACATTTGCCCCTGAG 3'	KpnI	55
UPSR	5'ACGCg <i>Tcgac</i> CCCCAGTTCCTTGACG 3'	SalI	55
DOWNSF	5'CGCgga <i>Tcc</i> GGGGACTTGTGAAAGGAA 3'	BamHI	55
DOWNSR	5'GCTctagaGCCAACC AAAACCAAAT 3'	XbaI	55
<i>Tc</i> GAPDHF	GTGGCAGCACCGGTAACG	NA	57
<i>Tc</i> GAPDHR	CAGGTCTTTCTTTTGCGAATAGG	NA	57
M13	GTAAAACGACGGCCAG	NA	55
M13R	CGGATAACGCTTGCGACCTATG	NA	55
T7	TAATACGACTCACTATAGG	NA	45

A letra final de cada nome do *primer* indica (F) *forward* (R) *reverse*. Na sequência de cada *primer*, as letras em caixa baixas indicam a sequência do sítio de restrição reconhecido pelas enzimas indicadas na terceira coluna da tabela (Sítio de restrição). Os códons de iniciação estão destacados em negrito e os códons de terminação sublinhados. TM: temperatura de anelamento dos primers nas reações de PCR. NA, não se aplica.

3.4.3 Manipulação e clonagem de sequências de DNA

3.4.3.1 Clonagem de *Tc*SHMT em vetor de expressão

Todas as clonagens foram realizadas como descrito em Molecular Cloning (SAMBROOK; GREEN, 2012). A sequência nucleotídica do gene *Tc*CLB.509937.150 que codifica a enzima *Tc*SHMT foi amplificada com os *primers* (**Tabela 01**) *Tc*SHMTF e *Tc*SHMTR ou com *Tc*SHMTR2 para clonar em vetor pET28a, e purificada como descrito no item 3.4.2. Os amplicons foram tratados com enzimas de restrição apropriadas e submetidos à

ligação com o vetor de expressão pET28a digerido com as mesmas enzimas. A reação de ligação foi feita seguindo uma proporção de inserto e vetor de 3:1, em número de moléculas, utilizando 1 U de T4 DNA ligase (Promega®, USA) e 1 x do tampão ligase, de acordo com as indicações do fabricante, em um volume de reação de 20 µL. A reação procedeu-se por 16 h a 4 °C e 10 µL da reação foram utilizados para transformar bactérias competentes obtidas como descrito no item 3.4.4.

Os plasmídeos recombinantes foram sequenciados e denominados *TcSHMTRpET28a* ou *TcSHMTR2pET28a*.

3.4.3.2 Clonagem da região a montante de *TcSHMT* em vetor pBS-NEO

Nos experimentos de análise funcional de *TcSHMT* por nocaute gênico, utilizamos um vetor pBlueScript, no qual o gene *npt* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase que confere resistência ao antibiótico neomicina foi inserido. Este vetor foi gentilmente cedido pelo Dr. Stênio P. Fragoso do Instituto Carlos Chagas em Curitiba – PR, denominado pBS-NEO (**Figura 7**).

Figura 7- Esquema do cassete de integração para nocaute de *TcSHMT*.

As diferentes regiões que compõem o cassete de integração estão representadas por cores. Cinza e vermelho representam as regiões intergênicas a montante e a jusante ao gene *TcCLB.509937.150*. Em amarelo e rosa estão as regiões intergênicas entre os genes de enolase e *kap3* e entre as cópias do gene *GAPDH* respectivamente. O gene *npt* que conferem resistência à neomicina está representado pela região em azul. Os números na figura indicam o tamanho em pares de base de cada região.

Para amplificação da região intergênica *upstream* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (**tabela 01**) UPSF e UPSR, com as condições de amplificação e ciclagem descritas no item 3.4.2.

Foi digerido 1 µg do produto de PCR com 3 U de enzima *KpnI* (Fermentas[®]) e tampão tango 1 x em 50 µL de reação, que foi incubada a 37 °C por 2 h. O DNA foi purificado e em seguida o material foi digerido com 3 U de enzima *SalI* (Fermentas[®]) e tampão *Orange* 1 x em 50 µL. A reação foi incubada e purificada nas mesmas condições utilizadas para a digestão com *KpnI*. Para a digestão do vetor pBS-NEO, foi utilizada a mesma condição de digestão do inserto.

A reação de ligação utilizou uma proporção de 5:1 de inserto e vetor digeridos com *KpnI* e *SalI*, junto com 1U de T4 DNA ligase com 2 µL de tampão 10 x da T4DNA ligase em volume final de 20 µL. A incubação foi realizada por 16 h a 4 °C, e esta reação foi utilizada para transformar bactérias XL1Blue cálcio-competentes, conforme item 3.4.5. O plasmídeo resultante dessa clonagem foi denominado UNEO.

3.4.3.3 Clonagem da região a jusante de *TcSHMT* no plasmídeo UNEO

Para amplificação da região intergênica *downstream* foram utilizados os oligonucleotídeos iniciadores (**tabela 01**) DOWNSF e DOWNSR, com as condições de amplificação e ciclagem descritas no item 3.4.2.

Foi digerido 1 µg do produto de PCR com 3 U de enzima *BamHI* e 3 U de enzima *XbaI* (Fermentas[®]) em tampão tango 1 x em 50µL de reação, que foi incubada a 37 °C por 2 h Para a digestão do vetor UPSNEO, foi utilizada a mesma condição de digestão do inserto.

A reação de ligação utilizou uma proporção de 5:1 de inserto e vetor digeridos com *BamHI* e *XbaI*, junto com 1 U de T4 DNA ligase com 2 µL de tampão 10 x da T4DNA ligase em volume final de 20 µL. A incubação foi realizada por 16 h a 4 °C, e esta reação foi utilizada para transformar bactérias XL1Blue cálcio-competentes, conforme item 3.4.5. O plasmídeo resultante dessa clonagem foi denominado UND.

3.4.4 Preparo de bactéria cálcio competente

Para o preparo das células competentes, foi utilizado o método do cloreto de cálcio (SAMBROOK; GREEN, 2012). Uma colônia da bactéria *E. coli* linhagens descritas no item 3.3.1 foi inoculada em 2 mL de meio LB contendo o antibiótico apropriado. A cultura foi incubada a 37 °C por 18 h sob agitação constante de 200 rpm. Um volume de 1,0 mL (inóculo

de 1:100) desta cultura foi transferido para 100 mL de meio LB. As células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante até a fase de crescimento exponencial (DO_{600nm} : entre 0,4 e 0,6).

A cultura foi centrifugada (4000 xg por 5 min a 4 °C), as células foram suspendidas em 50 mL (metade do volume da cultura original) de solução de preparo ($CaCl_2$ 100 mM, Hepes 10 mM pH 7,0) resfriada e mantidas no gelo durante 30 min. A suspensão foi submetida a uma centrifugação nas mesmas condições anteriores e as células foram suspendidas em 2,0 mL (1/50 do volume original) de solução de estocagem ($CaCl_2$ 100 mM, Hepes 10 mM pH 7,0, Glicerol 10%). As células foram aliqüotadas e mantidas no gelo seco por pelo menos duas h antes da transformação ou estocadas a -80 °C.

3.4.5 Transformação de bactéria cálcio competente pelo método de choque térmico

As reações de ligação dos insertos com os respectivos vetores foram incubadas no gelo por 30 min com 50-100 µL de *E. coli* preparadas conforme item 3.4.4. Após esse período, a mistura foi incubada a 42 °C durante 2 min e em seguida deixada no gelo por mais 2 min. Cerca de 1,0 mL de meio LB foi adicionado aos tubos, e as células incubadas a 37 °C por uma h, antes do plaqueamento.

Diferentes diluições das bactérias transformadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio de cultura seletivo (meio LB; ágar 1,5%; Canamicina 30 µg/mL para transformação da recombinação com pET28a ou pET24a ou Ampicilina 100 µg/mL para os demais vetores) e distribuídas com auxílio de uma alça de Drigalski. As placas foram incubadas a 37 °C durante 18 h.

3.4.6 Análise dos plasmídeos recombinantes por PCR de colônia

Após o crescimento em meio seletivo, cada colônia foi coletada e transferida para um tubo de PCR. Foram acrescentados aos tubos de PCR os reagentes e os oligonucleotídeos iniciadores que anelam com regiões que flanqueiam o fragmento de DNA a ser amplificado, em um volume final de reação de 25 µL, como detalhado no item 3.4.2. As amostras de PCR de colônia foram analisadas por eletroforese em gel de agarose.

3.4.7 Extração de DNA plasmidial

Para extração dos plasmídeos obtidos por clonagem conforme descrito no item 3.4.3 e selecionados como no item 3.4.6, foi utilizado o método de lise alcalina (BIRNBOIM; DOLY, 1979) com algumas modificações.

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 18 h sob agitação constante. Em seguida, as células foram centrifugadas a 10.000 xg durante 2 min. O sedimento foi suspenso em 300 µL de solução I (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 10 mM e 200 µg/mL de RNase A). Em seguida, foram adicionados 300 µL 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 µL 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 xg 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 xg e submetido à lavagem com 1,0 mL de etanol 70% gelado. Após novamente centrifugado a 12.000 xg 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).

3.4.8 Sequenciamento de DNA

A identificação e confirmação dos fragmentos de DNA foram realizadas mediante o método de terminação de cadeia, descrito previamente (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Para isto 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 pH9, MgCl₂ 5mM), 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 xg). 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 xg). 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. As amostras foram ressuspensas em 10 µl de formamida, desnaturadas durante 3 min a 95 °C e incubadas 2 min no gelo. 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.

3.5 Manipulação de RNA

3.5.1 Extração de RNA total por Trizol™

Em tubo de 1,5 mL de polipropileno, 1×10^8 parasitas das diversas formas do *T. cruzi* foram lavadas com PBS e suspensas em 1 mL de Trizol (Invitrogen®), incubados por 5 min a temperatura ambiente e centrifugados a 12000 xg por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo e adicionado 200 µL de clorofórmio para cada mL de Trizol utilizado e o material foi agitado por aproximadamente 15 s e incubados por 5 min a temperatura ambiente. Após centrifugação a 12000 xg por 15 min a 4 °C a fase aquosa foi transferida para novo tubo onde foi adicionado 1 mL de isopropanol e novamente centrifugada. O sobrenadante foi descartado e o sedimento lavado com 1 mL de etanol 70%. Após seco, o RNA foi ressuspensionado em água livre de nucleases e tratado com 5 U da enzima DNase/RNase free (Fermentas®), 1 x de tampão para DNase e incubado por 40 min a 37 °C para eliminar restos de DNA contaminante em cada amostra. No entanto, isto foi ainda verificado mediante a realização de uma PCR convencional utilizando amostras de RNA, após o tratamento com DNase. Caso houvesse DNA contaminante na amostra, estas são submetidas a um tratamento adicional com DNase/RNase free.

O RNA final foi analisado mediante leitura espectrofotométrica a $DO_{260/280 \text{ nm}}$. Segundo descrito por Sambrook (SAMBROOK; GREEN, 2012) considera-se que 1 unidade de absorvância (UA) a $DO_{260 \text{ nm}}$ corresponde a 40 µg/ml de RNA. A qualidade do RNA é analisada com base na relação da absorvância $DO_{260 \text{ nm}}/DO_{230 \text{ nm}}$, assim como na visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) usando tampão TAE livre de RNase.

3.5.2 Síntese de cDNA

As amostras de RNA total, obtidas conforme descrito no item 3.5.1, foram utilizadas para a síntese de cDNA. As amostras de RNA tratadas com DNase foram submetidas à reação de transcrição reversa realizada com o KIT Maxima First Strand cDNA Synthesis (Fermentas[®]). Um µg de RNA total das diferentes formas do parasita foram incubados com tampão *Reaction Mix* 1 x, 2 µL de *Maxima Enzyme Mix* e H₂O miliQ qsp 20 µL. As condições de termo ciclagem para formação do cDNA foram: 1) 25 °C por 10 min, 2) 50 °C por 30 min, 3) A reação foi terminada por inativação da enzima a 85 °C por 5 min. Com este Kit o RNA é incubado com 500 ng/reação de oligo-dT para a síntese do cDNA. O cDNA, obtido com este procedimento, foi utilizado para subsequente análise de expressão por PCR quantitativo (qPCR).

3.5.3 Análise da expressão de TcSHMT por PCR quantitativo (qPCR)

A fim de verificarmos os níveis de expressão do mRNA de *TcCLB.509937.150* ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi* foi realizada extração de amostras de RNA total das principais formas evolutivas apresentadas pelo parasita durante o seu ciclo biológico (item 3.5.1).

Os cDNAs, obtidos conforme item 3.5.2, foram utilizados como molde em uma reação de PCR quantitativo, na qual se utilizou o sistema de detecção de sequências - alvo por meio do corante inespecífico *SYBR Green* (Fermentas[®]). Oligonucleotídeos iniciadores *TcqPCRf* e *TcqPCRR*; foram desenhados, utilizando como molde a sequência *TcCLB.509937.150* (<http://www.genedb.org/>). Escolhemos o gene *TcGAPDH* para ser utilizado como normalizador para o cálculo da expressão relativa. Paralelamente foram feitas reações sem cDNA ou sem a enzima como controle negativo. Para a construção da curva padrão nos experimentos de PCR tempo real, amostras de cDNA de formas epimastigotas de *T. cruzi* foram utilizadas em diluições seriadas de 5 x. Todas as amostras foram analisadas em triplicata técnica e duplicata biológica.

Nas reações de qPCR foram misturados 5 µL de cada amostra de cDNA, 5 µL da mistura de oligonucleotídeos iniciadores (1,6 pmoles de cada primer *TcqPCRf/TcqPCRR* ou *TcGAPDHf/TcGAPDHR*), 5 µL de Maxima SYBR green mix (Fermentas[®]) e 5 µL de H₂O mili-Q estéril. As amostras foram distribuídas em placas de 96 poços (Eppendorf[®],

Alemanha) para RT-PCR e seladas com vedante plástico. Todas as amostras foram analisadas em triplicata. As condições de amplificação foram realizadas no termociclador automático Mastercycler ep realplex (Eppendorf®, Alemanha), utilizando: **1)** desnaturação inicial a 95 °C por 2 min, seguida de 40 ciclos de **2)** desnaturação a 94 °C por 15 s, **3)** anelamento a 57 °C por 30 s, **4)** amplificação a 72 °C por 30 s, e uma curva de desnaturação final. Os dados foram coletados usando o programa RealPlex v1.5 (Eppendorf®). A variação na expressão de cada transcrito foi determinada mediante o método $(2^{-\Delta\Delta Ct})$ (BOOKOUT; MANGELSDORF, 2003), considerando a razão de expressão com respeito ao gene *TcGAPDH* (normalizador) e o estágio epimastigota como calibrador (valor = 1). As diferenças entre o *cycle threshold* (ABRAHAMSEN et al., 2004), que é definido como o número de ciclos requeridos para que o sinal de fluorescência supere uma linha de base obtida estatisticamente, foram calculadas através da diferença de médias dos Cts de cada amostra e a média dos Cts do gene normalizador ($\Delta Ct = Ct \text{ amostra} - Ct \text{ normalizador}$). O valor obtido é então elevado à potência de base 2, já que o valor de Ct é proporcional ao logaritmo do gene alvo na amostra de PCR. As diferenças entre as amostras testadas foram calculadas com o teste estatístico de ANOVA - uma via, seguido do pós-teste Tukey's, utilizando o programa GraphPad Prism v5.0 para Windows (GraphPad, USA). As variações foram consideradas como estatisticamente significativas quando o valor $p < 0.05$.

3.6 Manipulação de proteínas

3.6.1 Preparo de extrato proteico de *T. cruzi*

A detecção da proteína *TcSHMT*, bem como, outros marcadores utilizados foi realizada em lisados celulares do parasita. Cada lisado foi preparado a partir de 2×10^7 parasitas, das diferentes formas de desenvolvimento, cultivadas como descrito na seção 3.3.2. No caso das células CHO-K1, foram usadas 1×10^6 células. As células foram coletadas por centrifugação (10 min a 1.500 xg a 4 °C) e lavadas duas vezes com PBS. O precipitado foi ressuspensionado 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 µM 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 xg a 4 °C). uma alíquota do sobrenadante foi usado para a determinação da concentração proteica (BRADFORD, 1976).

3.6.2 Expressão de TcSHMT recombinante em *E. coli* competente

Bactérias competentes *E. coli* BL21(DE3) cálcio-competentes foram transformadas com o plasmídeo recombinante *TcSHMTpET28a* (item 3.4.3.1) contendo o gene *TcCLB.509937.150* clonado no vetor pET28a. Colônias selecionadas foram inoculadas em 2 mL de meio LB contendo 5 µg/mL de tetraciclina e 30 µg/mL de canamicina. As culturas foram incubadas a 37 °C durante 18 h sob constante agitação. Um volume de 200 µL (inóculo de 1:10) desta cultura foi transferido para 2 mL do mesmo meio. As células foram incubadas a 37 °C sob agitação constante até atingirem a fase de crescimento exponencial ($DO_{600\text{ nm}}$ entre 0,6 e 0,8). IPTG foi adicionado às culturas em concentração final de 0,1, 0,2, 0,3 e 0,5 mM e a incubação prosseguiu por mais 3 h a 37 °C ou 16 h a 25 ou 20 °C.

Em nossos primeiros testes de indução, *TcSHMT* apresentou-se de forma insolúvel. Na tentativa de obtermos a enzima recombinante em sua forma solúvel, repetimos os testes de indução descritos acima e adicionamos 11 µM de piridoxina. A adição de piridoxina ao meio de cultura, junto à adição de IPTG, aumentou consideravelmente a solubilidade de *TcSHMT* recombinante.

Culturas sem adição de IPTG também foram realizadas (controles não induzidos). As culturas induzidas e os controles foram sedimentados a 4000 xg por 10 min a 4 °C e lavadas com PBS. O sedimento foi suspenso em PBS, 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%.

3.6.3 Purificação de TcSHMT recombinante

Uma vez determinada uma condição de boa expressão de *TcSHMT* solúvel, partimos para padronizar as condições de purificação da enzima recombinante utilizando o sistema de cromatografia de afinidade em resina de agarose NTA-Ni⁺² (QUIAGEN®, Alemanha).

Colônias de bactérias BL21(DE3) transformadas com o plasmídeo *TcSHMTpET28a* foram selecionadas e inoculadas em 10 mL de meio LB contendo 5 µg/mL de tetraciclina e 30 µg/mL de canamicina. O pré-inóculo foi diluído em 1 L de meio LB suplementado com 5 µg/mL de tetraciclina e 30 µg/mL de canamicina (diluição de 1:100) e o inóculo foi incubado a 37 °C até atingirem a fase de crescimento exponencial ($DO_{600\text{ nm}}$ 0,6). Então 0,1 mM de IPTG e 11 µM de piridoxina foram adicionados ao inóculo e a incubação prosseguiu por 16 h a 20 °C. A cultura foi centrifugada a 4000 xg por 10 min a 4 °C, ressuspensionado em tampão A (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl e 5 mM de imidazol) suplementado com 1 mM de PMSF, dissolvido em Etanol puro, 1 mM de TLCK e 10 µM de E64 e submetida a oito ciclos de sonicação a 20% de potência e 30 segundos de duração com intervalos de 1 min em gelo entre cada um dos ciclos. O lisado foi clarificado por centrifugação (30 min, 16.000 xg a 4 °C). O lisado foi passado 3 x em coluna de resina de agarose NTA-Ni. A coluna foi lavada com 10 volumes de tampão A e 6 volumes de Tampão B (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl e 60 mM de imidazol). A proteína recombinante foi eluída com 6 volumes de tampão C (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl e 300 mM de imidazol). Durante o processo de purificação foram coletadas alíquotas para serem analisadas por SDS-PAGE 10%. A proteína recombinante presente nos eluatos foi utilizada nos ensaios de cinética enzimática e obtenção de soro policlonal em camundongos.

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

Os extratos proteicos e proteína recombinante foram analisados por gel vertical desnaturante SDS-PAGE (Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo SDS). Os volumes das soluções utilizadas para montagem dos géis de corrida e de empilhamento estão descritos na Tabela a seguir. As amostras de proteínas foram diluídas em tampão de amostra de proteína (40 mM Tris-HCl pH 6,8, 1% SDS, 2,5% β-mercaptoetanol, 6% glicerol e 0,005% azul de bromofenol), e aplicadas no gel, juntamente com um marcador de peso molecular. Os géis foram corados com Azul de comassie R-250 [0,1% comassie R-250 em 45% de metanol e 10% de ácido acético (w/v) e 45% de água].

Tabela 2- Soluções de preparo de gel SDS-PAGE.

	Gel de empilhamento	Gel de corrida
Reagentes	5%	10%
Acrilamida, estoque (33/0,9%)	0,33 mL	1,7 mL
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8	-	1,3 mL
Tris-HCl 1 M pH 6,8	0,25 mL	-
H2O ultra pura	1,4 mL	1,9 mL
SDS 10% (concentração final 0,1%)	0,02 mL	0,05 mL
Persulfato de amônio 10%	20 µL	50 µL
TEMED (concentração final 0,07%)	2 µL	2 µL
Volume Final	2mL	5 mL

A corrida eletroforética foi realizada em tampão de eletroforese para SDS-PAGE a 30 mA e aproximadamente 150 V.

3.6.5 Protocolo de *Thermal Shift* (HUYNH; PARTCH, 2015)

Primeiramente uma placa de 96 poços com capacidade para 2 mL em cada poço foi preparada de modo que cada poço tivesse um tampão específico 5 x mais concentrado. Em seguida, a proteína recombinante purificada foi diluída em tampão de diluição (10 mM fosfato de sódio pH 7.0, 50 mM NaCl) até completar o volume final de 5 mL (suficiente para uma placa de 96 poços). Adicionou-se 4 µL da sonda fluorescente (concentração de estoque 5000 vezes) SYPRO Orange (ThermoFisher®, EUA), de modo que a concentração final de proteína e de sonda seja 5 µM e 2 vezes respectivamente. A solução foi homogeneizada e 40 µL dessa mistura foi distribuída em cada poço de uma placa de 96 poços para PCR com uso de uma pipeta multicanal. A placa foi brevemente centrifugada para remover bolhas e em seguida, 10 µL de cada tampão a ser testado (os tampões estão na placa de 96 poços com capacidade para 2 mL) foram adicionado a cada poço da placa teste com uso de pipeta multicanal (volume final da reação 50 µL). A placa de teste foi selada com adesivo e centrifugada a 800 xg por 2 min a temperatura ambiente. Por fim a placa contendo as reações a serem testadas foi colocada em termociclador para PCR em tempo real (Applied Biosystems) com a seguinte configuração: **1)** incubação inicial de 2 min a 25 °C com aumento gradativo de 1 °C até a temperatura final de 95 °C e **2)** 25 °C por 2 min.

Curvas de melting foram determinadas a partir dos dados de PCR utilizando o software GraphPad Prism. Os dados foram ajustados a uma curva não linear.

3.7 Obtenção de soro policlonal contra *TcSHMT*

O uso de animais neste trabalho foi autorizado e seguiu as normas estabelecidas pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto de Ciências Biomédicas da USP (CEUA) sob registro 57/13 nº 57, folha 06, livro 03.

A enzima *TcSHMT* recombinante purificada conforme descrito anteriormente foi dialisada contra tampão PBS. Seguido disso, foi preparada a solução de imunização [300 µg da proteína em 450 µL de PBS misturados com 450 µL de adjuvante completo de Freund's (Sigma®)] e esta foi emulsificada através de dois ciclos de sonicação (30 s a 25% de potência, 30 s no gelo).

Quatro camundongos machos da linhagem Balb/C com 21 dias de nascimento foram selecionados para a inoculação de 100 µL da emulsão obtida (aprox. 30 µg da proteína de interesse) por via intraperitoneal. Um animal adicional foi inoculado com o mesmo volume de solução de imunização, contendo PBS-puro ao invés de proteína, e este foi utilizado como controle. Após 15 dias da inoculação foi aplicada uma dose adicional usando a mesma quantidade de proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund's (Sigma®). Após 30 dias, foi inoculada uma dose reforço, adicional, nas mesmas condições da última dose. 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 antissoro 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 xg a 4 °C) e armazenado a -20 °C com 25% glicerol (v/v) estéril e distribuído em alíquotas de 50 µL para posterior uso.

3.7.1 Purificação de anticorpo anti-*TcSHMT*

Em ensaios preliminares de imunolocalização por microscopia confocal, observamos que o soro não imune apresentou uma fraca marcação em formas epimastigotas de *T. cruzi*, o que não se observou nas análises por *Western blot*. Para eliminarmos marcações inespecíficas nos experimentos de localização sub celular de *TcSHMT*, optamos por purificar o soro anti-*TcSHMT* utilizando a enzima recombinante purificada seguindo o protocolo a seguir.

A enzima recombinante *TcSHMT* em gel SDS-PAGE foi transferida para membrana de nitrocelulose (Hybond-C Extra, GE Healthcare®) conforme item 3.8 e corada com Ponceau S. A banda correspondente a *TcSHMT* foi recortada em pequenos pedaços e os fragmentos foram bloqueados por uma hora a temperatura ambiente em solução de bloqueio para *Western blot* (Tampão PBS, 0,05% Tween 20 e 5% leite em pó desnatado). Enquanto os fragmentos de membrana estavam em bloqueio o soro anti-*TcSHMT* foi equilibrado em PBS. Os fragmentos de membrana contendo *TcSHMT* recombinante foram brevemente lavados com PBS, 0,1% Tween 20 e então incubados com o soro anti-*TcSHMT* equilibrado com PBS por 3 h a temperatura ambiente sob agitação suave. Ao final deste período anticorpos específicos contra a proteína recombinante interagem com *TcSHMT* imobilizada nos fragmentos de membrana e o sobrenadante é descartado. Então os fragmentos de membrana são lavados com PBS, 0,1% Tween 20 três vezes e incubados em 1 mL de solução 100 mM de glicina pH 2 por 10 min a temperatura ambiente sob agitação leve. O volume a ser utilizado desta solução depende do volume inicial de soro (utilizei 500 µL) e da quantidade de proteína recombinante (10 canaletas com 100 µg de proteína recombinante em cada). A solução de glicina foi recolhida e misturada gentilmente em 100 µL tampão 1,5 mM Tris-HCl pH 8,5. Procedeu-se diálise desta solução em PBS, 10% glicerol mais inibidores de proteases em ambiente refrigerado. Os anticorpos purificados foram recolhidos e adicionou-se BSA na concentração final de 1 mg/mL. Aliquotas de 20 µL cada foram armazenadas a - 20 °C para posterior uso.

3.8 Ensaaios de *Western blot*

A técnica de *Western blot* foi utilizada para avaliar o perfil de expressão de *TcSHMT* nas diferentes formas do parasita, bem como para analisar se houve diferença no nível de expressão de *TcSHMT* entre parasitas selvagens e simples nocaute.

Extratos proteicos em gel SDS-PAGE (item 3.6.4) foram transferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond-C Extra, GE Healthcare®) por uma diferença de potencial elétrico de 250 mA por 90 min, em tampão de transferência para *Western blot* (25 mM Tris-base, 192 mM glicina, 20% Metanol). Após a transferência, a membrana foi corada com Ponceau S por cinco min e, posteriormente, descorada em água bidestilada para a verificação da eficiência da transferência. A membrana foi incubada em solução de bloqueio para *Western blot* (Tampão PBS, 0,05% Tween 20 e 5% leite em pó desnatado) por uma hora sob agitação suave à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o anticorpo primário contra

a proteína *TcSHMT* (1:1500) ou *TcGAPDH* utilizada como gene normalizador (1:2000) em PBS, 0,1% Tween 20 e 3% leite em pó desnatado, por 16 h a 4 °C sob agitação, 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 1:2000 durante 1 hora, seguido de nova lavagem como acima descrito. Após as lavagens, os ensaios foram revelados por quimioluminescência usando o reagente ECL (ECL™ *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.

3.8.1 Ensaio 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 xg a 4 °C), lavadas com PBS e resuspendidas em 1 mL de tampão TSB (25 mM Tris-HCl, pH 7.6, 0.25M sucrose, 1mM EDTA, 1mM PMSF, and 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 18000 xg a 25 °C. O sobrenadante de cada amostra foi separado do pellet. O pellet foi ressuspenso em 1 mL de tampão TSB e submetido a sonicação. Cada amostra foi analisada por *Western blot* com anticorpo anti-*TcSHMT* e com anti-soros para os marcadores citosólico (TAT), glicosomal (GAPDH) e mitocondrial (mASAT)

3.9 Imunolocalização por microscopia ótica confocal

Para determinarmos a localização sub celular de *TcSHMT* utilizamos a técnica de imunolocalização por microscopia ótica confocal. Todos os experimentos de localização foram feitos com o uso de anticorpos anti-*TcSHMT* purificados conforme item 3.7.1.

Parasitas (5×10^6 células/ml) das formas principais de *T. cruzi* foram incubadas com 50 nM do substrato fluorescente Mitotracker (Invitrogen®), dissolvido em meio LIT, TAU3AAG ou RPMI conforme a forma do parasita, e incubados às correspondentes temperaturas de crescimento de cada estágio de *T. cruzi*. As células (50 µL por poço) foram fixadas na lâmina

com metanol durante 2 min a temperatura ambiente, lavadas duas vezes com PBS, seguido da permeabilização com 0,1% triton X-100 (v/v) durante 5 min a temperatura ambiente. Procedeu-se etapa de bloqueio em PBS, 1% BSA por 30 min seguida de duas lavagens em PBS. O anticorpo primário anti-*TcSHMT* purificado (1:5 diluído em PBS, 1% BSA p/v) foi adicionado à lâmina e incubado 1 h a temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram submetidas a 5 lavagens sucessivas com PBS, seguido da incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado à sonda Alexafluor488 (Invitrogen®) (1:400 diluído em PBS, 1% BSA p/v), Por último, as lâminas foram seladas com VECTASHIELD® Mounting Medium com DAPI (Vector Labs, USA) na diluição 1:2.000.

As imagens foram obtidas por séries z de 0.2 µm em objetiva de 100X 1.35NA usando o programa Cell R em microscópio Olympus IX81. As imagens foram deconvoluídas usando Autoquant X2.1.

3.10 Caracterização funcional de *TcSHMT* por nocaute gênico

3.10.1 Transfecção de *T. cruzi* e seleção dos parasitas transfectantes

Para os experimentos de análise funcional por meio de nocaute gênico formas epimastigotas de *T. cruzi* foram transfectadas com o fragmento linear UND obtido conforme detalhado no item 3.4.3.2 e 3.4.3.3, por meio de eletroporação.

Para cada transfecção um total de 1×10^8 parasitas em fase exponencial de crescimento foram centrifugados a 4000 rpm por 10 min a 4 °C, lavados uma vez com PBS estéril e ressuspendidos em 1 mL de tampão de eletroporação (140 mM NaCl, 25 mM HEPES pH6,5, 0,74 mM de Na_2HPO_4). Em seguida 0,4 mL dessa suspensão (equivalente a 4×10^7 parasitas) foram transferidos para cubeta de eletroporação de 0,2 mm de gap pré resfriada em gelo. Foram adicionado 50 µg do cassete de integração UND em volume de 20 µL à suspensão de células e incubado por 10 min em gelo. A mistura de células e DNA foi submetida a dois pulsos de 450 V e 500 µF em eletroporador GenePulser X Cell™ (BIORAD). Em seguida as células foram incubadas em gelo por 10 min e finalmente transferidas para garrafas de 25 cm³ contendo 10 mL de meio LIT e incubadas por 24 h a 28 °C. Paralelamente foi feita transfecção de formas epimastigotas sem adição de DNA como controle de transfecção. No dia seguinte foi adicionado 500 µg/mL de G418 às culturas que foram mantidas a 28 °C em

passagens regulares até que fosse observado a inibição total do crescimento dos parasitas da cultura controle eletroporada sem DNA, indicando a seleção dos parasitas nocaute simples.

A correta integração do cassete UND no locus de *TcSHMT* foi confirmada por meio de PCR utilizando um *primer* que anela em local fora da região de recombinação porém próximos a ela e um *primer* que anela na região codificante do gene *npt* do cassete UND.

3.10.2 Diluição limitante para seleção de clones de parasitas nocaute simples

De uma cultura em fase exponencial de crescimento, 10^6 formas epimastigotas foram diluídas em 1 mL de meio LIT. Desta diluição 100 μ L foram distribuídos em oito poços de uma placa de 96 poços. A partir desses poços foram feitas 9 diluições seriadas (1:10) em meio LIT. A placa foi incubada a 28 °C até observar a maior diluição onde houve crescimento de parasitas.

3.10.3 Curvas de crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*

Foram utilizadas $2,5 \times 10^6$ epimastigotas de *T. cruzi* selvagem, nocaute simples (STOLIC et al., 2005) e os clones derivados de sKO em fase de crescimento exponencial. As células foram transferidas para placas de cultura de 96 poços (200 μ L/poço). A placa foi mantida a 28 °C e a proliferação celular foi estimada por leitura da absorbância da densidade ótica ($DO_{620\text{ nm}}$) durante 8 dias. Como controle positivo de inibição de crescimento foi utilizado parasitas selvagens na presença de 500 μ g/mL de G418.

A absorbância foi transformada em valores de densidade celular (células/mL) usando uma equação de regressão linear que foi obtida previamente sob as mesmas condições. Cada curva foi avaliada em quadruplicata em cada experimento, sendo que o experimento foi realizado em triplicatas independentes.

3.10.4 Análise de diferenças na metaciclogênese entre parasitas selvagens e sKO

Os ensaios foram realizados conforme descrito no item 3.3.2.1. 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.

3.10.5 Análise dos parasitas selvagens e sKO no ciclo intracelular

3.10.5.1 Diferenças na infectividade de tripomastigotas metacíclicos selvagens e sKO.

Células CHO-K1 (5×10^4 /poço) foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com 10% SFB (v/v) a 37 °C. Após 24 h, quando já estavam aderidas à placa, as células foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas selvagens ou sKO ou ainda com os clones isolados de sKO ($2,5 \times 10^6$ /poço). Os parasitas ficaram em contato com as células por um período de quatro h. Após esse período os parasitas que ainda estavam no sobrenadante foram removidos. As células foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas em meio RPMI suplementado com 10% SFB (v/v). A placa foi mantida a 37 °C por 16 h. Após esse período o meio RPMI 10% SFB (v/v) foi substituído por meio RPMI suplementado com 2% SFB (v/v) e a placa foi incubada a 33 °C. Os tripomastigotas que eclodiram da célula infectada e que estavam no sobrenadante foram contados diariamente em câmara de Neubauer.

3.10.5.2 Diferenças no ciclo intracelular de parasitas selvagens e sKO.

Células CHO-K₁ (5×10^4 /poço) foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com 10% SFB (v/v) a 37 °C. Após 24 h, quando já estavam aderidas à placa, as células foram infectadas com formas tripomastigotas metacíclicas ($2,5 \times 10^6$ /poço) Selvagens ou sKO ou ainda com os clones isolados de sKO. Os parasitas ficaram em contato com as células por um período de quatro h. Após esse período os parasitas que ainda estavam no sobrenadante foram removidos e as células lavadas duas vezes com PBS e incubadas em meio RPMI suplementado com 10% SFB (v/v). A placa foi mantida a 37 °C por 16 h. Após esse período o meio foi substituído por RPMI suplementado com 2% SFB (v/v) e a placa foi incubada a 33 °C. Então, 48 h após a infecção as células foram lavadas com PBS, fixadas com paraformaldeído 4% (200 µL/poço) por 5 min e lavadas novamente com PBS. O DNA da célula hospedeira e das formas amastigotas em seu interior foram marcados com a DAPI na diluição 1:2.000 e lavadas com PBS. O número de células total, e células infectadas foram usados para calcular o índice de infecção de parasitas selvagens e sKO.

4.1 Predições *in silico*

4.1.1 Identificação de genes putativos do metabolismo de serina no genoma de *T. cruzi*

Como discutido na introdução deste trabalho, a serina pode ser obtida por transporte, síntese a partir de glicina, degradação de proteínas e lipídeos e a via de biossíntese *de novo* de serina a partir da glicólise (**Figura 4**). Para ter uma ideia panorâmica do metabolismo de serina em *T. cruzi*, realizamos uma busca em *in silico* com enzimas de diferentes organismos modelo através do programa BLASTP (item 3.1 em materiais e método). Por esta análise, podemos identificar em *T. cruzi*, sequências da enzima *TcPGDH* (EC: 1.1.1.95) responsável pelo primeiro passo enzimático da via de síntese de serina a partir do intermediário da glicólise, o 3-D-fosfoglicerato. Interessantemente não foi possível identificar genes putativos para as enzimas *TcPSAT* (EC:2.6.1.52) e *TcPSP* (EC: 3.1.3.3) responsáveis pelo segundo e terceiro passos enzimáticos desta via. Algumas hipóteses surgem dessa observação: (i) a via de síntese de serina a partir da glicólise não está conservada nesse parasita, (ii) durante o processo evolutivo tais enzimas tornaram-se muito diversificadas, a ponto de não serem identificadas por esse método, (iii) ou ainda esses passos enzimáticos foram transferidos para outras enzimas. Por esta abordagem também foram identificadas as enzimas *TcSHMT* (EC: 2.1.2.1) e *TcSDH/TcTDH* (EC: 4.3.1.19), estas enzimas estão anotadas no banco de dados do projeto genoma de *T. cruzi*.

4.1.2 O genoma do *T.cruzi* cepa CL contém duas sequências de DNA putativas para a enzima *TcSHMT*

A busca por genes putativos de enzimas envolvidas no metabolismo de serina por meio de BLASTP no banco de dados TritypDB (<http://tritypdb.org/>) revelou duas sequências putativas que codificariam a enzima *TcSHMT* na cepa CL. Os códigos de acesso para essas sequências, no genoma de *T. cruzi* (cepa CL), são: *TcCLB.510407.90* e *TcCLB.509937.150*. A identidade predita entre as sequências de aminoácidos para *TcSHMT* (461 aa) entre as cepas CL esmeraldo like, non esmeraldo like, Dm28c e Sylvio foi de 96% e de 97% de identidade com a cepa marinkellei strain B7 (item 3.2). Uma vez que todos os experimentos posteriores foram realizados como clone 14 proveniente da cepa CL e para fins de simplificação, *TcSHMT* refere-se à sequência desta cepa. Um alinhamento comparando as

sequências entre as diferentes cepas de *T. cruzi* e das isoformas mitocondrial e citosólica de humanos bem como SHMT de *E. coli*, é mostrado na figura 8.

Figura 8- Alinhamento múltiplo das sequências de SHMT.

Em preto denotam-se os resíduos que são idênticos e os resíduos conservados estão em caixa aberta. Os resíduos putativos para o sítio de ligação ao cofator PLP estão sublinhados. Os resíduos putativos do sítio ativo de *Tc*SHMT estão indicados por estrelas. No alinhamento estão presentes SHMTs de *E. coli* (E.), as isoformas mitocondrial (mHs) e citosólica (Hotez et al., 2007) de humanos e as cepas de *T. cruzi* CL esmeraldo like e non esmeraldo like, Dm28c, Sylvio e Marinkellei. As sequências foram alinhadas com a ferramenta CLUSTALΩ (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) e a imagem construída com a ferramenta ESPript 3.0 (<http://esprict.ibcp.fr/ESPript/ESPript/index.php>).

Na busca de domínios funcionais para *Tc*SHMT, observou-se que a sequência *Tc*SHMT possui domínios característicos de SHMTs, transferases dependentes de PLP e da

superfamília aspartato aminotransferase (**Figura 9 parte superior**). Resíduos putativos para o sítio ativo de *TcSHMT* (**Figura 9 parte inferior**) também foram identificados por meio do programa BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Estes resíduos putativos são S32, Y52, E54, Y61 e 62, G99, S100, L122, G126, H127, L128, S181, D206, H209, K235, R241, F268, N358 e R373 e estão baseados na estrutura cristalográfica da isoforma citoplasmática de SHMT murina e de humanos (SZEHENYI et al., 2000; VIJAYALAKSHMI; RAO, 1989).

Figura 9- Domínios proteicos encontrados para a sequência *TcSHMT*.

A busca foi realizada na base de dados InterProscan com a sequência completa de aminoácidos de *TcSHMT*. Os códigos de acesso nas bases de dados Pfam (PF), InterProscan superfamily (SSF), CATH superfamily (G3DSA), pantherdb (PTHR) estão mostrados à direita. A sequência também apresenta o sítio de ligação ao cofator PLP (PS00096). Na parte inferior da figura observam-se os resíduos putativos do sítio ativo de *TcSHMT* baseado na isoforma citoplasmática de SHMT murina (Szebenyi et al., 2000). Mais especificamente estão destacados os sítios de ligação ao cofator PLP e ao THF. Os sítios putativos relacionados com a interface entre as cadeias de SHMT também estão indicados.

Com o uso dos programas SIGNALP 4.1 e TARGETP 1.1 não observamos um peptídeo canônico de exportação para mitocôndria, e por meio da ferramenta TMPRED não identificamos regiões transmembranas na sequência de *TcSHMT*.

A composição de aminoácidos de *TcSHMT* foi analisada pela ferramenta ProtParam (ExPASy). Do total de 461 aa, Alanina e Leucina são os mais abundantes (10.2%). A soma total de resíduos carregados negativa (Glu+Asp) e positivamente (Arg+Lys) foi de 53%. O ponto isoelétrico predito foi de 7.14 com uma massa molecular predita de 50.592,1 Da.

Assumindo que todos os resíduos de cisteína estão reduzidos, o coeficiente de extinção molar foi de $43320 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ a 208 nm em água.

SHMT é uma enzima altamente conservada e ubiquamente expressa na natureza, porém não há uma sequência putativa de SHMT em *Trypanosoma brucei*, mas já está relatado na literatura a existência de isoformas citosólica e mitocondrial de SHMT em espécies de *Leishmania spp* (GAGNON et al., 2006), por isso foi feita análise de sintenia genômica entre alguns tripanossomatídeos através dos resultados depositados no banco de dados TritypDB a fim de verificarmos se a sintenia estava conservada. Foi observado que *TcSHMT* está presente no cromossomo 11 em *T. cruzi* e que a isoforma longa de SHMTs de várias espécies de *Leishmania spp* (SHMT-L) localizam-se no cromossomo 14 (**figura 10**). Há portanto uma perda de sintenia genômica de SHMTs entre os tripanossomatídeos.

Figura 10- Análise de sintenia de *TcSHMT*.

Destacado em vermelho está o gene putativo que codifica *TcSHMT* e que não está em sintenia com SHMT de *Leishmanias* destacadas nos retângulos verdes. Não há notação para sequências de SHMT em *T. brucei*. Os dados foram obtidos através do banco de dados TritypDB (Aslett et al., 2010).

4.1.3 Predição estrutural de TcSHMT

Em nossas análises *in silico* de TcSHMT, foi possível observar que todos os domínios característicos desse tipo de enzima estão presentes da sequência primária da enzima de *T. cruzi*. Adiciona-se a isto o fato de que estas enzimas são altamente conservadas. Dentro deste contexto, decidimos realizar também a análise por modelagem estrutural para buscar características de sequência específicas de TcSHMT, além de reforçar a ideia de sua função como enzima SHMT. Com o auxílio do programa BLASTP e utilizando apenas proteínas com estruturas depositadas no banco de dados PDB (PDB – *Protein Data Bank*), foi possível encontrar algumas proteínas similares. Escolhemos a proteína SHMT mitocondrial de humano (número de acesso no PDB: 3OU5) para utilizarmos como molde em nossa modelagem, pois esta apresentou um alto grau de identidade (52%) com TcSHMT e pela ampla cobertura de alinhamento (96%). Algumas das proteínas identificadas estão listadas na tabela 3.

Tabela 3- Proteínas identificadas por alinhamento BLASTp.

Proteína identificada	Cobertura do alinhamento	E-value	Identidade	Nº. PDB
Human Mitochondrial SHMT	96.0%	5E-168	52.0%	3OU5_A
Homo Sapiens Holo SHMT(mitochondrial)	96.0%	2E-167	52.0%	4PVF_A
Rabbit Cytosolic SHMT	96.0%	1E-159	52.0%	1CJ0_A
Rabbit Cytosolic SHMT	96.0%	1E-159	52.0%	1LS3_B
Mutant Of Rabbit Cytosolic SHMT	96.0%	3E-159	52.0%	1RVU_A
Mutant Of Rabbit Cytosolic SHMT	96.0%	2E-158	52.0%	1RV3_A
Recombinant SHMT (human)	96.0%	9E-156	52.0%	1BJ4_A
Recombinant SHMT (Mouse)	96.0%	3E-151	51.0%	1EJI_A
Plasmodium Vivax SHMT	96.0%	3E-144	46.0%	4OYT_A
SHMT With Covalently Bound Plp	94.0%	3E-141	46.0%	4O6Z_A
SHMT B.Stearothermophilus	85.0%	6E-115	45.0%	1KKJ_A
SHMT Y51fbsshmt Internal Aldimine	85.0%	2E-114	45.0%	2W7D_A

A tabela mostra as 12 primeiras sequências de uma lista de 36 proteínas identificadas em nosso alinhamento utilizando a sequência primária de TcSHMT. Das sequências identificadas que possuíam uma estrutura cristalográfica depositada no banco de dados PDB, a isoforma mitocondrial de humano foi a que apresentou os melhores valores.

O alinhamento estrutural de TcSHMT com a SHMT mitocondrial de humano (**Figura 11 A**) demonstrou que ambas são muito semelhantes espacialmente (disposição espacial atômica) com apenas pequenas regiões não conservadas. Neste alinhamento por homologia é possível notar a alta conservação estrutural de SHMT, principalmente nas regiões de α -hélice. As regiões menos conservadas localizam-se nas regiões de *loop* que constituem a menor parte

da enzima e pelo peptídeo sinal de exportação para a mitocôndria que esta presente apenas na enzima humana (**Figura 11 A região verde**).

Figura 11- Predição Estrutural de TcSHMT.

Em **A**, alinhamento estrutural de TcSHMT (azul) com a isoforma mitocondrial de humanos (amarelo). O peptídeo de importação para a mitocôndria presente apenas na enzima de humano está representado pela α -hélice em verde. **B**. Modelo estrutural por homologia de TcSHMT. Cada cadeia polipeptídica está representada por uma cor diferente. Os monômeros interagem entre si até se organizarem em uma estrutura tetramérica. Em **C**, monômero de TcSHMT evidenciando as estruturas secundárias da enzima. Vermelho indica α -hélice. Amarelo indica folha β e em verde estão indicados os *loops* de TcSHMT. Em **D**, os principais resíduos putativos de interação com o PLP. H127 interage com PLP por interação hidrofóbica. K235 interage com o átomo de oxigênio (destacado em vermelho) do PLP. Amarelo representam átomos de carbono e azul representa nitrogênio.

O modelo gerado por homologia estrutural a partir de SHMT mitocondrial de humano revelou que *TcSHMT* apresenta uma estrutura espacial homotetramérica predita (**Figura 11 B**), onde cada cadeia polipeptídica está representada por uma cor. Este tipo de conformação oligomérica já é descrito na literatura para SHMT de outros organismos (VATSYAYAN; ROY, 2007). As estruturas secundárias predominantes em *TcSHMT* são alfa-hélices (**Figura 11C**). A interface dimérica se dá no domínio amino terminal da cadeia polipeptídica, onde todos resíduos que compõem essa característica foram identificados em *TcSHMT* (FLORIO et al., 2009; JAGATH et al., 1997). O estado oligomérico de SHMT é regulado pela sua ligação ao cofator PLP (GIARDINA et al., 2015). Os resíduos putativos de interação com o cofator PLP, que é essencial para a atividade catalítica de SHMT, são conhecidos e mapeados na enzima de humanos (CHAVE et al., 1995; VIJAYALAKSHMI; RAO, 1989). Porém utilizamos nosso modelo alinhado com a SHMT citosólica de coelho (número de acesso no PDB: 1RVU) para verificar o possível sítio de ligação ao PLP na enzima de *T. cruzi*, pois esta foi cristalizada com o PLP (SCARSDALE et al., 1999). A figura 11 D revela que a posição do resíduo de lisina 235, onde possivelmente o PLP se liga a enzima do parasita, está localizado dentro de uma sequência conservada em relação à enzima de humano e de outras SHMTs (BHAVANI et al., 2005; TALWAR et al., 1997). Também foram identificados os resíduos histidina 127 e aspartato 206 que fazem parte do sítio putativo de interação com PLP em *TcSHMT* (**Figura 11 D**) (PASCARELLA et al., 1998; SCARSDALE et al., 1999). Sabe-se com base na literatura que SHMTs de outros organismos apresentam-se em uma conformação levemente aberta e que a ligação da enzima com o substrato serina promovem modificações espaciais que tornam a estrutura oligomérica de SHMT mais fechada o que permite que a reação de interconversão de glicina em serina ocorra (JAGATH; RAO; SAVITHRI, 1997; JAGATH et al., 1997). O modelo por homologia de *TcSHMT* foi baseado numa estrutura sem ligação ao substrato e, portanto, se apresenta na forma aberta. Apesar de nosso modelo ser apenas uma predição por homologia da estrutura de *TcSHMT*, este modelo apresenta-se de maneira muito fiel ao que tem se relatado para este tipo de enzima em outros organismos.

4.2 Clonagem, expressão e purificação de *TcSHMT*

A sequência completa de 1386 pb do gene *TcCLB.509937.150* foi amplificada utilizando os primers *TcSHMTF*, *TcSHMTR* ou *TcSHMTR2* (**Figura 12 A**) conforme descrito no item 3.4.2. Após tratada com as enzimas de restrição *EcoRI* e *XhoI*, a sequência foi clonada (conforme descrito no item 3.4.3.1) no vetor de expressão pET28a tratado com as

mesmas enzimas de restrição. Este vetor permite a expressão da proteína de interesse fusionada a seis resíduos de histidina no extremo N-terminal (usando o *primer* *TcSHMTR2*) ou no extremo N e C-terminal (usando o *primer* *TcSHMTR*).

Após a transformação de *E. coli* XL1blue com essas construções, vários clones foram analisados por PCR de colônia e três e dois clones de cada construção foram selecionados. Os plasmídeos recombinantes foram purificados e analisados por PCR (**Figura 12 B**) e sequenciamento. Como é possível observar na figura 12 B, em ambas as construções obteve-se produto de PCR de tamanho aproximado de 1.3 Kb, o que é esperado para o gene *TcCLB.509937.150* que codifica a enzima putativa *TcSHMT*. Após confirmação da clonagem, o clone 1 *TcSHMTR2pET28a* foi escolhido para os primeiros testes de expressão na cepa BL21 códon plus de *E. coli*.

O plasmídeo *TcSHMTR2pET28a* clone 1 foi utilizado para transformar *E. coli* cepa BL21 (DE3) competente, como descrito no item 3.4.5. Após a transformação e seleção de bactérias resistentes à canamicina e tetraciclina, uma colônia isolada foi escolhida para a indução da expressão da proteína recombinante conforme 3.6.2.

Figura 12- Clonagem de *TcSHMT* em pET28a.

Em **A**, perfil eletroforético de *TcSHMT* amplificada a partir de DNA genômico de *T. cruzi* cepa CL14 com a combinação de *primers* indicada acima da figura. Marcador utilizado foi *1 Kb plus DNA ladder* (Fermentas®). Em **B**, perfil eletroforético de clones positivos após serem purificados por mini preparação de plasmídeo. M: marcador de peso molecular *1 Kb DNA ladder* (Fermentas®). (+) e (-) indicam respectivamente o controle positivo e negativo de cada PCR. Os números 1, 2 e 3 indicam o número do clone. A combinação de *primers* está indicada acima dos números dos clones. Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL.

Inicialmente testamos diferentes condições de temperatura e tempo de crescimento das culturas após indução com 0,5 mM IPTG (**Figura 13 A**): 37 °C durante 3 h, 33 °C durante 5 h e 20 °C por 16 h. A expressão da proteína recombinante foi analisada mediante eletroforese em gel SDS-PAGE 10% comparando as frações solúveis e insolúveis dos extratos proteicos da cultura sem induzir e da cultura após indução com IPTG nas diferentes condições. Em seguida, escolhemos a condição de 20 °C por 16 h de incubação e variamos a concentração de IPTG necessária para a expressão de *TcSHMT* (**Figura 13 B**). Como não houve diferenças na expressão de *TcSHMT* recombinante, optamos pela menor concentração de IPTG testada (0,1 mM).

Nestes testes iniciais a proteína recombinante apresentou-se majoritariamente nas frações insolúveis (**Figura 13 A e B**). Na tentativa de otimizar a expressão de *TcSHMT* nas frações solúveis, adicionamos ao meio de cultura 11 µM de piridoxina antes da adição de IPTG. A piridoxina, nas células, é convertida em sua forma ativa conhecida como piridoxal-5-fosfato (PLP), o qual é essencial para enzimas PLP dependentes como SHMTs, atuando como cofator nas reações catalisadas por estas enzimas. Apesar de grande quantidade de *TcSHMT* recombinante ainda apresentar-se nas frações insolúveis, a adição de piridoxina ao meio de cultura aumentou significativamente a quantidade de enzima recombinante nas frações solúveis (**Figura 13 C**), o que foi confirmado posteriormente por *Western blot* (**Figura 13 D**) com anticorpo anti-histidina. Todos os experimentos de indução do gene *TcCLB.509937.150* para obter *TcSHMT* recombinante foram realizados com *TcSHMTR2pET28a* clone 1 a 20 °C por 16 h de indução com 0,1 mM de IPTG e 11 µM de piridoxina. Uma vez padronizada as condições de indução de *TcSHMT* recombinante nas frações solúveis partimos para os testes de purificação da enzima por cromatografia de afinidade como descrito no item 3.6.3.

Figura 13- Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 10% de indução de *TcSHMT* recombinante e teste de solubilidade.

Em **A**, teste de indução de *TcSHMT* recombinante em diferentes temperaturas e tempo de crescimento da cultura. Em **B**, teste de indução da enzima recombinante com diferentes concentrações de IPTG por 16 h de indução a temperatura fixa de 20 °C. Em **C**, teste de indução de *TcSHMT* recombinante com 0,1 mM de IPTG por 16 h a 20 °C e adição de 11 μM de piridoxina. **D**, Western blot de frações solúveis da figura C, utilizando anticorpo anti-histidina (1:1000) produzido em camundongo (INVITROGEN®), esta figura foi recortada digitalmente para excluir amostras não pertinentes ao experimento. Figuras A e B, marcador: *Pierce Unstained Protein Molecular Weight Marker* (ThermoFisher®). Nas figuras C e D, marcador: *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (ThermoFisher®). NI: fração não induzida por IPTG. *TcSHMT* recombinante está indicada por uma seta nas figuras A, B e C.

Como mostra a figura 14, apesar da maioria da enzima recombinante ainda apresentar-se na fração insolúvel, é possível obter quantidade considerável de *TcSHMT* recombinante solúvel. Nas lavagens em concentrações crescentes de imidazol, *TcSHMT* é eluída com pureza razoável com 300 mM de imidazol. A partir desses dados as purificações seguintes foram realizadas com tampão de ligação ou tampão A (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl e 5 mM de imidazol) seguida de lavagem com tampão B (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500

mM NaCl e 60 mM de imidazol) e eluída em tampão C (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl e 300 mM de imidazol). A quantidade de *TcSHMT* recombinante total nos eluatos varia entre 0,5 a 3 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$, em geral obtemos entre 15 a 20 mg de proteína recombinante por litro de cultura induzida nas condições estabelecidas acima. *TcSHMT* recombinante purificada foi então utilizada em experimentos posteriores.

Figura 14- Perfil eletroforético em gel SDS-PAGE 10% de purificação de *TcSHMT* recombinante por cromatografia de afinidade em resina de agarose NTA- Ni^{+2} .

M: *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (Thermo Fisher®). P: Fração insolúvel. S: lisado clarificado após centrifugação do extrato proteico induzido por IPTG, FT: fração coletada após a passagem do lisado clarificado pela coluna de agarose NTA- Ni^{+2} . B: fração coletada após a primeira lavagem com tampão A. L1 a L5: frações coletadas após lavagens com tampão B com concentrações crescentes de imidazol (60 mM, 100 mM, 200 mM, 300 mM e 500 mM respectivamente). *TcSHMT* recombinante está indicada pela seta.

4.2.1 Comportamento de *TcSHMT* recombinante em solução

Uma vez padronizada as condições de expressão e purificação de *TcSHMT* recombinante, realizamos várias tentativas de medir a atividade enzimática de *TcSHMT* e tentar determinar seus parâmetros cinéticos. Como todas as nossas tentativas não foram bem sucedidas, decidimos testar várias condições que poderiam aumentar a estabilidade da proteína recombinante através da técnica de *Thermal Shift* (HUYNH; PARTCH, 2015). Deste modo poderíamos aumentar as chances de medir a atividade de *TcSHMT* recombinante ao mesmo tempo em que utilizaríamos estas condições para tentar cristalizar a enzima.

Para tal, *TcSHMT* recombinante foi submetida à purificação por cromatografia de afinidade em resina de NTA- Ni^{+2} como mostrado na figura 15 A. Durante a purificação no equipamento AKTA purifier 900 (GE Healthcare®) *TcSHMT* apresentou dois picos de eluição

que foram detectados a 280 nm. As frações coletadas durante a purificação por cromatografia de afinidade foram analisadas por SDS-PAGE 10%, onde se observou a presença de *TcSHMT* purificada. Após esta primeira etapa de purificação, *TcSHMT* recombinante foi submetida a uma segunda etapa de purificação por gel filtração (**Figura 15 B**). Novamente, *TcSHMT* apresentou dois picos de detecção a 280 nm (P1 e P2 na figura 15 B) com tempos de eluição distintos, sugerindo que esta enzima apresenta dois estados oligoméricos. As frações coletadas por gel filtração foram analisadas em gel SDS-PAGE 10% (**Figura 15 C**), onde se pode observar que todas as frações possuem uma proteína de massa molecular de aproximadamente 50 KDa referente à *TcSHMT* recombinante.

Figura 15-Cromatografia por exclusão molecular de *TcSHMT* recombinante.

Em **A**, cromatograma da eluição de *TcSHMT* durante purificação em coluna de NTA-Ni²⁺. No eixo y à esquerda detecção de proteínas (linha azul) a 280 nm (mAU). O eixo y à direita representa o aumento gradativo do tampão de eluição [B] em porcentagem. Em **B**, Gel filtração de *TcSHMT*. Eixo y, detecção de proteína a 280 nm (mAU). *TcSHMT* foi eluída em dois picos (P1 e P2). **C**, frações coletadas durante a cromatografia de gel filtração em **B** e analisadas em gel SDS-PAGE 10%. As amostras foram quantificadas e quantidades iguais de cada fração foram aplicadas. Marcador de peso molecular *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (ThermoFisher®). **D**, cromatografia de exclusão molecular (BELISARIO et al.). As proteínas que compõem a curva de calibração estão representadas no gráfico seguidas das respectivas massas moleculares entre parênteses. ▲, *TcSHMT* eluída no pico P1 da figura B. ■, *TcSHMT* eluída no pico P2 da figura B. Experimento representativo de duplicatas independentes.

A massa molecular e o estado oligomérico de *TcSHMT* foi determinado por cromatografia de exclusão molecular (BELISARIO et al., 2017). Primeiramente construímos uma curva de calibração composta de proteínas de massas moleculares conhecidas, que foram utilizadas como padrão nos ensaios de SEC (**Figura 15 D**). Esta curva de calibração foi então utilizada para estimar a massa molecular de *TcSHMT*. De acordo com este experimento, a massa molecular do pico P1 de *TcSHMT* é de 212 KDa (**triângulo vermelho na figura 15 D**), já para o pico P2 a massa estimada foi de 51 KDa (**quadrado vermelho na figura 15 D**). Portanto, P1 corresponde a um tetrâmero enquanto que P2 corresponde a um monômero de *TcSHMT* (**Figura 15 D**). As frações P1 e P2 coletadas na cromatografia de gel filtração foram concentradas e utilizadas em ensaios de cristalização que infelizmente não resultaram em cristais. No entanto, utilizamos *TcSHMT* recombinante purificada em testes de *Thermal shift* na tentativa de aumentar a estabilidade da enzima recombinante.

Thermal shift é uma técnica que permite verificar tampões e ligantes que maximizam a estabilidade de uma dada proteína. Neste ensaio *TcSHMT* foi incubada com a sonda fluorescente SYPRO Orange e diferentes tampões e ligantes e em seguida submetida a aumento gradativo de temperatura. À medida que a proteína desnatura, esta expõem resíduos hidrofóbicos que se ligam a sonda emitindo uma fluorescência. Curvas de melting foram então construídas de modo a permitir determinar a temperatura de melting de *TcSHMT* em cada condição testada. Mudanças na estabilidade da proteína podem ser correlacionadas com mudanças na temperatura de melting. Os resultados destes ensaios estão demonstrados na figura 16.

A estabilidade de *TcSHMT* recombinante aumenta quando incubada em tampão fosfato de sódio com pH entre 6 e 7. A adição de cloreto de sódio a estes tampões não aumenta a estabilidade da proteína (**Figura 16 A**). A adição de 15% de glicerol ao tampão também aumenta a estabilidade da proteína recombinante (**Figura 16 B**), enquanto que a presença de imidazol diminui muito sua estabilidade (**Figura 16 C**). Também testamos se a adição dos substratos serina, treonina ou tetrahydrofolato (THF) teria algum efeito na estabilidade de *TcSHMT*. De acordo com a figura 16 D, nenhum dos três substratos aumenta a estabilidade da enzima recombinante quando comparada com a estabilidade do controle. Em paralelo, a adição de PLP à *TcSHMT* promoveu um aumento de quase 3 °C na temperatura de melting da proteína recombinante (**Figura 16 D**).

Em resumo, *TcSHMT* apresenta maior estabilidade quando em presença de tampão fosfato de sódio pH 6 e 7, com 15% glicerol na presença de 1 mM de PLP e ausência de imidazol. Estas condições foram utilizadas para medir a atividade de *TcSHMT*, mas mesmo

em condições de maior estabilidade não conseguimos medir a atividade da enzima recombinante, porém mais tentativas se fazem necessárias. Infelizmente não tivemos tempo de tentar cristalizar *TcSHMT* nas condições determinadas pelo *Thermal Shift*.

Figura 16-*Thermal Shift* de *TcSHMT* recombinante.

Em **A**, curvas de melting de *TcSHMT* recombinante na presença dos tampões que mais aumentaram a estabilidade da proteína quando comparados com a condição controle. Em **B**, curvas de melting de *TcSHMT* com adição de quantidades gradativas de glicerol. **C**, curvas de melting de *TcSHMT* na presença de diferentes quantidades de imidazol. Em **D**, curvas de melting de *TcSHMT* na presença de alguns ligantes. Ser, serina. Thr, treonina. THF, tetrahydrofolato. Apo, apoenzima em tampão de eluição. Control (linha preta) nas figuras A, B e C referem-se à *TcSHMT* em tampão de eluição.

4.3 Expressão e localização subcelular de *TcSHMT* ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*

4.3.1 Análise da expressão de *TcSHMT* por qPCR

Para avaliar o nível de expressão do gene *TcCLB.509937.150* durante o ciclo de vida do parasita, amostras de RNA total extraídas de cada forma do desenvolvimento do parasita foram obtidas conforme estabelecido no item 3.5.1 e utilizadas para a síntese da primeira fita de DNA complementar (cDNA) como detalhado no item 3.5.2. As amostras de cDNA foram

então analisadas por qPCR como descrito no item 3.5.3. Os níveis de mRNA foram determinados utilizando oligonucleotídeos específicos (*TcqPCRf* e *TcqPCRR*) que amplificam um fragmento idêntico entre os dois genes que codifica a enzima putativa *TcSHMT*. O gene *TcGAPDH* foi escolhido como normalizador (*in-house keeping*) uma vez que supostamente apresenta expressão constitutiva ao longo do ciclo de vida do parasita.

Para verificar se a expressão de *TcSHMT* nos estágios intracelulares era específica para *TcSHMT*, utilizamos cDNA de células CHO-K1 não infectadas como controle negativo. Como não detectamos qualquer expressão nesse cDNA (**Figura 17**) assumimos que os níveis de mRNA nas formas amastigotas e epimastigotas intracelulares são específicos para *TcSHMT*.

Figura 17- Perfil de expressão de *TcSHMT* nos distintos estágios do *T. cruzi*.

A figura mostra os níveis de mRNA de *TcSHMT* determinados por qPCR. Os níveis de expressão de cada estágio foram normalizados pelos níveis de expressão de *TcGAPDH*. A razão de expressão foi calculada a partir do estágio Epi utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, cujo valor por definição é 1 (BOOKOUT; MANGELSDORF, 2003). Os valores representados no gráfico são a média de três réplicas feitas separadamente, e as diferenças entre os perfis de expressão foram comparadas utilizando o teste de ANOVA-uma via (valor $p < 0.0001$) seguido do pós-teste Tukey's. Epi: epimastigota, Meta: tripomastigota metacíclico, Ama: amastigota, Epi-like: epimastigota intracelular, Trypo: tripomastigota derivado de infecção de CHO-K1, CHO: células CHO-K1 não infectadas com *T. cruzi*.

Os resultados obtidos por qPCR (**Figura 17**) evidenciam que o nível de mRNA de *TcSHMT* diminui nas formas amastigota e epimastigota intracelular quando comparados com o nível de mRNA da forma epimastigota. Nas formas infectivas tripomastigota metacíclico e tripomastigota derivado de CHO-K1, a expressão do gene aparentemente aumenta, mas a análise estatística realizada com o pós-teste Tukey's não considera que este aumento é

significativo. Em conjunto esses dados mostram que os níveis de mRNA de *TcSHMT* são diferencialmente expressos durante o ciclo de vida do parasita e que sua expressão diminui nas fases intracelulares de *T. cruzi*.

4.3.2 Obtenção de soro anti-*TcSHMT*

Para a obtenção de soro policlonal contra *TcSHMT*, foi realizada imunização de camundongos com *TcSHMT* purificada, conforme descrito no item 3.7.

A especificidade do soro policlonal anti-*TcSHMT* foi testado por *Western blot* (item 3.8) utilizando extratos totais de epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados observados na figura 18 revelam uma única marcação com peso molecular esperado de aproximadamente 50 KDa, enquanto que não houve marcação por parte do soro não imune. Em alguns de nossos experimentos, o soro anti-*TcSHMT* reconhecia fracamente uma banda de menor peso. Além disso, em testes preliminares de imunolocalização o soro não imune apresentou um sinal fraco em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Por estes motivos, resolvemos purificar o soro anti-*TcSHMT* conforme descrito no item 3.7.1, evitando assim que o soro reconhecesse algum outro antígeno que não fosse de nosso interesse.

Figura 18- Especificidade do soro policlonal e do anticorpo anti-*TcSHMT* produzido em camundongo.

À esquerda, *Western blot* contra extrato de *T. cruzi* utilizando soro anti-*TcSHMT* (A: 1:250, B: 1:500, C: 1:1000, D: 1:1500, E: 1:2000) e soro não imune (F:1:250, G: 1:500). À direita, *Western blot* contra extrato de *T. cruzi* utilizando soro anti-*TcSHMT* (A: 1:1500) e anticorpo anti-*TcSHMT* purificado (B: 1:20, C: 1:50, D: 1:100, E: 1:250). M: *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (ThermoFisher®).

Posteriormente verificamos que esta banda mais fraca com aproximadamente 40 KDa que aparecia apenas em alguns extratos poderia se tratar de degradação de *TcSHMT*. Uma análise de sítios putativos para proteases na sequência da enzima sugerem que é possível que esta marcação não esperada seja referente à *TcSHMT* degradada. Por uma questão de maior confiabilidade, decidimos utilizar o anticorpo purificado anti-*TcSHMT* nos ensaios de *Western blot* e de imunolocalização por microscopia ótica confocal.

4.3.3 Análise da expressão de *TcSHMT* por Western blot

Após analisarmos os níveis de mRNA de *TcSHMT* por qPCR (**Figura 17**) nos diferentes estágios de desenvolvimento do parasita. Decidimos investigar a expressão do gene *TcCLB.509937.150* em nível de proteína. Para verificarmos os níveis da proteína *TcSHMT*, utilizamos extratos totais das várias formas de *T. cruzi* em ensaios de *Western blot* conforme descrito no item 3.8.

A figura 19 mostra o perfil de expressão de *TcSHMT* ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*. Uma marcação de aproximadamente 50 kDa que corresponde a *TcSHMT* pode ser observada em todos os extratos das formas do parasita. Este experimento foi realizado em duplicata biológica e resultados semelhantes foram observados entre as réplicas. Normalizamos o experimento por quantidade total de proteína visto que há controversias sobre a escolha de uma proteína normalizadora para este tipo de experimento.

Figura 19- Análise de expressão de *TcSHMT* ao longo do ciclo biológico de *T. cruzi*

Western blot para verificação do perfil da proteína *TcSHMT* em diferentes estágios de desenvolvimento de *T. cruzi*. A diluição do anticorpo anti-*TcSHMT* utilizada foi de 1:100 conforme padronizado na figura 18. Experimento representativo de duas réplicas biológicas independentes. A imagem foi digitalmente recortada para excluir amostras não pertinentes a este experimento e a normalização foi feita pela quantidade total de proteína evidenciada pelo corante reversível Ponceau. Marcador de peso molecular utilizado foi *Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder* (ThermoFisher®). KDa: kilodalton, Epi: epimastigota, Meta: tripomastigota metacíclico, Ama: amastigota, Epi-like: epimastigota intracelular, Trypo: tripomastigota derivado de infecção de CHO-K1, CHO: células CHO-K1 não infectada com *T. cruzi*.

4.3.4 TcSHMT é uma proteína distribuída amplamente pelo citoplasma de *T. cruzi*

A localização subcelular de *TcSHMT* foi verificada por microscopia ótica confocal como detalhado no item 3.9, utilizando o anticorpo purificado anti-*TcSHMT*. A decisão de utilizar o anticorpo purificado nos ensaios de imunolocalização veio após constataremos que nosso soro não imune (controle negativo) apresentou uma marcação fraca em nossos primeiros testes. Apesar de muito mais fraca que a marcação observada nas imagens tiradas com o soro policlonal anti-*TcSHMT*, o uso do anticorpo purificado nos deu mais confiabilidade nos resultados.

A figura 20 demonstra as diferenças morfológicas entre as fases do ciclo de vida de *T. cruzi*, onde é possível observar também a posição no cinetoplasto em relação ao núcleo do parasita. Por ser uma rede concatenada de DNA mitocondrial característico dos organismos da ordem kinetoplastida, o cinetoplasto apresenta uma intensidade de fluorescência maior que a marcação do núcleo, quando se utiliza uma sonda que intercala DNA, no caso da figura 20 azul foi utilizada a sonda DAPI. Em vermelho na figura 20 é mostrado a marcação da mitocôndria única do *T. cruzi* evidenciada pela fluorescência da sonda *Mitotracker*. Para determinarmos a localização subcelular de *TcSHMT*, as lâminas de imunofluorescência foram incubadas com o anticorpo purificado anti-*TcSHMT*. Após essa incubação as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário anti IgG de camundongo conjugado ao fluoróforo Alexa Fluor-488 (Invitrogen®). Como mostra a figura 20 verde, *TcSHMT* apresenta-se amplamente distribuída pela célula em todas as formas do parasita, com exceção do núcleo (**Figura 20 painel inferior com a sobreposição das três marcações**) onde não há qualquer marcação nuclear com o anticorpo anti-*TcSHMT* purificado. Quando as imagens obtidas com a sonda *Mitotracker* nos diferentes estágios do parasita são sobrepostas com a marcação obtida com o anticorpo anti-*TcSHMT* é possível observar uma co-localização, o que indica que *TcSHMT* também está localizada na mitocôndria (**Figura 20 overlay**).

Figura 20- Localização celular de *TcSHMT* em *T. cruzi* CL14.

Imunofluorescência indireta analisada em microscopia confocal. As colunas da esquerda para a direita apresentam respectivamente DIC: contraste por interferência diferencial. Azul: DNA marcado com DAPI após excitação em comprimento de onda de 372 nm. Vermelho: parasitas marcados com 50 nM de *Mitotracker* (Invitrogen®). Verde: imunofluorescência indireta utilizando anticorpo primário anti-*TcSHMT* purificado (diluição 1:5, produzido em camundongo) e anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado com Alexa 488 (diluição 1:400) observado no comprimento de onda de 488 nm. *Overlay*, sobreposição de imagens capturadas por *Mitotracker* e anti-*TcSHMT* purificado. *Overlay* no painel inferior, sobreposição de imagens capturadas por DAPI, *Mitotracker* e anti-*TcSHMT* purificado. Epi: epimastigotas em fase exponencial de crescimento. Meta: tripomastigotas metacíclicos diferenciados em meio TAU3AAG. Ama: amastigotas extraídos de células CHO-K1. Epi-like: epimastigota intracelular extraído de célula CHO-K1. Trypo: tripomastigota derivado de célula CHO-K1 coletado do sobrenadante de cultura infectada. N: núcleo; K: cinetoplasto.

Figura 21-experimento de permeabilização de parasitas com digitonina

Epimastigotas foram permeabilizados com concentrações crescentes de digitonina (0-2.5 mg/mL). O sobrenadante e o sedimento de cada extrato foram analisados por *Western blot*. As membranas contendo as amostras foram testadas contra anticorpos anti-*TcSHMT* (1:100), anti-soro anti-Tirosina Aminotransferase de *T. cruzi* (TAT) utilizada como marcador citosólico, anti-GAPDH de *T. cruzi* (marcador glicossomal) e anti-Aspartato Aminotransferase de *T. cruzi* (mASAT), nosso marcador mitocondrial. TAT, 45 KDa. GAPDH, 39 KDa. mASAT, 50 KDa. (S) indica fração solúvel e (P) fração insolúvel ou sedimento de cada fração.

Como experimento adicional, utilizamos extratos de formas epimastigotas permeabilizadas com concentrações crescentes de digitonina. As fases solúveis e insolúveis de cada extrato permeabilizados a uma dada concentração de digitonina foram separadas e analisadas por *Western blot* com o anticorpo anti-*TcSHMT*, anti-*TcGAPDH* e os anti-soros anti Aspartato aminotransferase de *T. cruzi* (mASAT, marcador mitocondrial) e anti-Tirosina Aminotransferase de *T. cruzi* (TAT) utilizada como marcador citosólico (ambos anti-soros generosamente cedidos pela Dra. Cristina Nowicki da universidade de Buenos Aires). Nas condições desse experimento, proteínas citosólicas são liberadas nas frações solúveis primeiro. Em seguida proteínas glicossomais são encontradas nas frações solúveis e por último proteínas mitocondriais. A figura 21 mostra que a maior quantidade de *TcSHMT* foi detectada em 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). Em suma, *TcSHMT* apresenta uma localização

abrangente pelo citoplasma de *T. cruzi* inclusive na mitocôndria do parasita em todos os estágios do ciclo de vida de *T. cruzi*.

4.4 Análise do papel biológico de *TcSHMT* por meio de nocaute gênico

4.4.1 Deleção do gene *TcCLB.509937.150* por nocaute gênico

Para realizarmos abordagens que permitissem avaliar o papel biológico de *TcSHMT* em vários processos celulares foi necessário gerar parasitas mutantes em que o gene *TcCLB.509937.150* que codifica a enzima *TcSHMT* putativa estivesse deletado. Neste caso como o gene *TcCLB.509937.150* está presente em cópia única por genoma haploide em *T. cruzi* e no início deste trabalho a técnica de CRISPR/Cas9 não estava disponível para este parasita, a primeira tentativa foi obter linhagens de *T. cruzi* cujos alelos de *TcCLB.509937.150* estivessem nocauteados por meio da sua substituição por genes de resistência a antibióticos. Para tanto, oligonucleotídeos iniciadores foram desenhados com base nas regiões intergênicas de *TcCLB.509937.150*. Estas regiões intergênicas foram clonadas visando à obtenção de construções necessárias para a substituições dos alelos de *TcCLB.509937.150* através de recombinação homóloga.

4.4.1.1 Construção do cassete para nocaute do gene *TcCLB.509937.150*

Primeiramente as regiões intergênicas do gene *TcCLB.509937.150* foram amplificadas por PCR utilizando os *primers* UPSF e UPSR para a região intergênica a montante (*upstream*) e os *primers* DOWNSF e DOWNSR para a região a jusante (*downstream*) (Tabela 1). O resultado da amplificação das regiões a montante e a jusante do gene para clonagem no vetor pBS-NEO (cedido pelo Dr. Stênio P. Fragoso, FIOCRUZ-PR) pode ser visualizado na figura 22 A. Apesar de pouco aparente a região *downstream* do gene *TcCLB.509937.150* apresenta duas ampliações de tamanhos bem distintos (**a região de maior tamanho pode ser melhor visualizada na Figura 22 C**). Analisando essa região no banco de dados do parasita, verificamos que o amplicon de aproximadamente 1000 pb corresponde a região *downstream* do alelo *TcCLB.510407.90* enquanto que a região *downstream* de aproximadamente 750pb corresponde ao alelo *TcCLB.509937.150*. Devido às diferenças entre as regiões *downstream*, resolvemos iniciar a clonagem pela região *upstream* de *TcCLB.509937.150* pois esta se apresentou muito semelhante entre os alelos. O produto de PCR referente à região *upstream* de *TcCLB.509937.150* foi digerido com as enzimas KpnI e SalI, purificado e clonado no

vetor pBS-NEO. Após confirmação da clonagem por PCR do plasmídeo recombinante (**Figura 22 B**) e sequenciamento, o plasmídeo obtido (UNEO) foi utilizado para a clonagem da região *downstream*.

Antes de continuarmos com a clonagem das regiões *downstream* desenhamos um *primers* reverso que anela em um segmento interno presente somente na região *downstream* de maior tamanho, portanto, uma PCR com os *primers* DOWNSF e DOWNSR1 só apresentaria uma amplificação se esta região fosse de fato verdadeira e não apenas um erro de anotação no banco de dados do genoma do parasita e/ou uma especificidade dos *primers* DOWNSF e DOWNSR. Como mostrado na figura 22 C, foi possível amplificar as duas regiões *downstream* com os *primers* DOWNSF e DOWNSR (**Figura 22 C, canaleta D**). Da mesma forma amplificamos um segmento de aproximadamente 700 pb da região *downstream* de maior tamanho com uma PCR com os *primers* DOWNSF e DOWNSR1 (**Figura 22 C, canaleta D1**). Há, portanto, a presença de duas regiões *downstream* de tamanhos diferentes para o gene que codifica *TcSHMT*. Diante desse resultado, decidimos clonar separadamente as duas regiões *downstream* no plasmídeo UNEO. Neste caso, o produto de PCR correspondente as duas região *downstream* do gene foi clivado com as enzimas BamHI e XbaI separadamente e clonadas também separadamente no plasmídeo UNEO. Para confirmar a clonagem das regiões intergênicas no vetor pBS-NEO, o plasmídeo que apresentou amplificação positiva para as duas regiões intergênicas foi analisado por PCR com várias combinações de oligonucleotídeos iniciadores. O resultado das amplificações pode ser observado na figura 22 D que confirma a clonagem de ambas as regiões no vetor. Este plasmídeo foi sequenciado e nomeado UND e utilizado para transfectar formas epimastigotas de *T. cruzi*. Até o momento não conseguimos clonar a região intergênica *downstream* de 1158 pb, tanto no vetor pBS-NEO quanto em vetor pBS-HIGRO que contém o gene de resistência a higromicina.

Figura 22- Perfil Eletroforético da clonagem das regiões intergênicas de *TcSHMT* em vetor pBS-NEO

Em **A**, perfil eletroforético dos produtos de PCR de regiões intergênicas de *TcCLB.509937.150* para clonagem no vetor pBS-NEO. Em **B**, confirmação da clonagem da região *upstream* de aproximadamente 500 pb em vetor pBS-NEO. **C**, perfil eletroforético da região *downstream* amplificada com os primers DOWNSF e DOWNSR (canaleta D) e amplificação da região *downstream* maior utilizando os primers DOWNSF e DOWNSR1 agora com cerca de 700 pb (canaleta D1). Em **D**, confirmação de clonagem da região *upstream* (500 pb) e *downstream* (750 pb) em vetor pBS-NEO. Gel de agarose 1% após coloração com solução de brometo de etídio. M, Marcador de massa molecular *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas®). U, região intergênica *upstream* amplificada com os primers UPSF e UPSR. D, região intergênica *downstream* amplificada com os primers DOWNSF e DOWNSR. UND, cassete de integração para substituição de *TcSHMT* amplificado com os primers UPSF e DOWNSR. Esta construção contém as duas regiões intergênicas flanqueando o gene *npt* que confere resistência a neomicina.

4.4.1.2 Verificação do nocaute de um alelo do gene *TcCLB.509937.150* através de substituição por gene de resistência à Neomicina

Para os ensaios de transfecção, fragmentos de DNA correspondentes a UND (**Figura 22 D, canaleta UND**) que contem o gene de resistência à neomicina flanqueado pelas regiões *upstream* e *downstream* de *TcCLB.509937.150* foram então amplificados por PCR com os oligonucleotídeos UPSF e DOWNSR. O fragmento linear UND foi purificado por

eletroeluição e utilizado para transfecção de formas epimastigotas de *T. cruzi*, conforme item 3.10.1.

Figura 23-Verificação de nocaute de uma cópia do gene *TcCLB.509937.150*

A

B

C

Em **A** é apresentado um esquema do locus gênico de *TcCLB.510407.90* e seu alelo *TcCLB.509937.150* ambos com 1386 pb e suas respectivas regiões intergênicas *upstream* (521 bp e 505 bp) e *downstream* (1158 bp e 743 bp). Na parte inferior do esquema está representado o cassete de integração contendo o gene de resistência à Neomicina (800 bp) flanqueado pelas regiões intergênicas de *TcCLB.509937.150* (505 e 743 bp). As regiões aproximadas de anelamento dos *primers* utilizados para o experimento da figura **B** estão indicadas por setas e os seus respectivos nomes. Em **B**, confirmação por PCR da deleção de uma cópia de *TcCLB.509937.150* e da correta inserção do cassete de recombinação contendo o gene de resistência à Neomicina no locus de *TcCLB.509937.150*. Os *primers* utilizados em cada PCR estão indicados acima da figura. MW, Marcador de massa molecular *Gene Ruler 1 kb DNA Ladder* (Fermentas®). (-), PCR sem adição de DNA utilizada como controle negativo. A imagem foi recortada digitalmente para excluir amostras não pertinentes ao experimento. Em **C**, *Western blot* de extratos totais de *T. cruzi* selvagem e nocaute utilizando anticorpo anti-*TcSHMT* (1:100) e anti-*TcGAPDH* (1:2000). Wt, parasita selvagem. sKO, parasita nocaute. A9, F9 e G9 representam extratos de três populações clonais obtidas da população sKO.

Um esquema do locus gênico de *TcCLB.509937.150* é apresentado na figura 23 A. No esquema, a região aproximada de anelamento dos *primers* utilizados para a confirmação do nocaute gênico e indicado por setas e seus respectivos nomes para facilitar a compreensão dos resultados. Primeiramente foi nocauteado um alelo do gene *TcCLB.509937.150* utilizando o fragmento purificado referente ao gene de resistência à Neomicina, flanqueado

pelas regiões intergênicas de *TcSHMT*. Uma vez selecionada a população, o nocaute gênico na população mutante foi verificado por PCR (**Figura 23 B**). A correta inserção do cassete de integração UND no locus gênico de *TcCLB.509937.150* foi confirmada por PCR utilizando um *primer* que anela em uma região fora na sequência onde ocorreria a recombinação homóloga (EXTF ou EXTR) e um *primer* que anela na sequência do cassete de integração contendo o gene NEO. Por motivo desconhecido não conseguimos resultados com o uso do *primer* EXTR, por isso apresentamos na figura 23 B apenas os resultados obtidos com o *primer* EXTF (**Figura 23 B, painel direito**). Após a confirmação da deleção de um alelo de *TcCLB.509937.150*, os parasitas foram clonados por diluição limitante (item 3.10.2).

Em seguida, preparamos extratos totais de parasitas selvagens (Wt), da população nocaute original (STOLIC et al., 2009) e de três populações clonais obtidas dos parasitas sKO (A9, F9 e G9). Estes extratos foram utilizados em ensaios de *Western blot* a fim de verificarmos se a deleção de uma cópia de *TcCLB.509937.150* teria causado alguma diminuição nos níveis de proteína de *TcSHMT*. De acordo com os dados apresentados na figura 23 C, a deleção de uma cópia do gene que codifica *TcSHMT* putativa causou uma diminuição significativa nos níveis de proteína desta enzima, tanto na população sKO quanto nas três populações clonais (A9, F9 e G9). Neste caso, o simples nocaute foi suficiente para diminuir o nível de expressão da proteína *TcSHMT* quando comparada ao nível desta mesma enzima em extratos de parasitas Wt (**Figura 23 C**).

4.4.2 Caracterização fenotípica de parasitas sKO para *TcSHMT*.

4.4.2.1 Curvas de crescimento e metaciclogênese em parasitas sKO

Para avaliar se a diminuição da quantidade de proteína *TcSHMT* poderia interferir com o crescimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* ou gerar alguma alteração na morfologia, foi realizada uma curva de crescimento dos parasitas WT, sKO e os clones A9, F9 e G9. Para isso, parasitas Wt, sKO e os clones A9, F9 e G9 em fase exponencial de crescimento foram ajustados para a concentração de 5×10^6 parasitas/mL e distribuídos em placa de 96 poços. Foram feitas leituras diárias no comprimento de onda 620 nm e os valores de absorbância foram transformados em número de células usando uma curva de calibração previamente obtida nas mesmas condições. Durante a fase exponencial de crescimento dos parasitas, foi possível observar se existia alguma alteração fenotípica assim como obter a concentração de células para gerar a curva de crescimento. Como mostrado na figura 24,

nenhuma diferença significativa foi observada quanto à capacidade de divisão celular das formas epimastigotas.

Figura 24-Curva de crescimento de *T. cruzi* Wt, sKO e clones A9, F9 e G9 durante a fase exponencial de crescimento

Eixo y: Número de parasitas por mL. Eixo x: Intervalos em dias para a realização da contagem dos parasitas. O gráfico mostra a média entre três réplicas técnicas de um experimento representativo de triplicatas independentes. Wt, parasitas selvagens. sKO, parasitas simples nocaute. A9, F9 e G9 representam as três populações clonais isoladas dos parasitas sKO.

Do mesmo modo, também não foram encontradas alteração na morfologia das formas epimastigotas na população sKO (**Figura 25**) quando comparadas aos epimastigotas presentes na população selvagem. Nenhuma alteração foi encontrada nas três populações clonais (A9, F9 e G9). Sendo assim, podemos concluir que pelo menos no que se refere à capacidade de divisão celular e da morfologia de epimastigotas de *T. cruzi*, a diminuição do nível de TcSHMT não teve qualquer efeito.

Figura 25-Comparação da morfologia de *T. cruzi* selvagem e sKO

Em **A**, epimastigotas selvagens de *T. cruzi*. **B**, formas epimastigotas sKO. Em **C** é mostrado formas epimastigotas da população clonal A9 . Resultados semelhantes foram observados nos clones F9 e G9. Todos os parasitas foram marcados com anti-*TcSHMT* (1:100), DAPI (1:2000) e *Mitotracker* (50 nM). As imagens foram capturadas em microscópio invertido de fluorescência e as imagens sobrepostas com uso do software Image J.(<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>).

Para verificar se a deleção de uma cópia do gene *TcCLB.509937.150* teria algum efeito na capacidade de epimastigotas de se diferenciarem em formas tripomastigotas metacíclicas, realizamos ensaios de metaciclogênese *in vitro* (CONTRERAS et al., 1985). Para isto, parasitas selvagens, sKO e os clones A9, F9 e G9 foram diferenciados em meio TAU3AAG conforme descrito no item 3.3.2.1. As formas tripomastigotas metacíclicas foram contadas diariamente do sobrenadante das diferentes culturas para gerar o gráfico da figura 26. Pode-se notar que apesar de um discreto atraso no pico de liberação de formas metacíclicas no sobrenadante da cultura (dia 6), os parasitas sKO e as populações clonais (A9, F9 e G9) apresentam a mesma taxa de diferenciação durante a metaciclogênese que os parasitas selvagens mantidos sobre as mesmas condições. Portanto, podemos concluir que o nocaute de uma cópia do gene *TcCLB.509937.150* não causou alterações significativas na

metaciclologênese e que *TcSHMT* provavelmente não desempenha um papel relevante neste processo.

Figura 26-Metaciclologênese de *T. cruzi* Wt, sKO e clones A9, F9 e G9

Eixo y: Número de tripomastigotas metacíclicos. Eixo x: Intervalos em dias para a realização da contagem dos parasitas. O gráfico mostra a média entre três réplicas biológicas independentes. Wt, parasitas selvagens. sKO, parasitas simples nocaute. A9, F9 e G9 representam as três populações clonais isoladas dos parasitas sKO.

4.4.2.2 Efeitos do simples nocaute de *TcSHMT* no ciclo intracelular

Para avaliar os efeitos do nocaute simples de *TcSHMT* no ciclo intracelular, tripomastigotas metacíclicos Wt, sKO e clones A9, F9 e G9 diferenciados em meio TAU3AAG foram utilizados para infectar culturas de células CHO-K1 conforme detalhado nos itens 3.10.5.1 e 3.10.5.2. Quarenta e oito h após a infecção, as células CHO-K1 foram fixadas e o DNA marcado com DAPI. A partir das imagens desses experimentos, determinamos o número de células infectadas e o número de células totais para calcular a porcentagem de células infectadas tanto com parasitas Wt quanto com parasitas sKO. O número de células infectadas por parasitas sKO foi aproximadamente quatro vezes menor que a porcentagem de células infectadas pelos parasitas selvagens. Esta diminuição na porcentagem de células infectadas também foi observada nas três populações clonais (A9, F9 e G9), mas enquanto que o clone A9 apresentou quase a mesma porcentagem de células infectadas que a populações sKO, os clones F9 e G9 infectaram quase que o dobro de células

que os parasitas sKO, porém esse aumento ainda está muito abaixo da porcentagem de células infectadas por *T. cruzi* Wt. Em todos os casos observa-se uma diminuição significativa na porcentagem de células infectadas por todos os parasitas mutantes. Esses resultados podem ser verificados na figura 27.

Figura 27- Efeitos do nocaute simples de *TcSHMT* no número de células infectadas por *T. cruzi*

No eixo y está representada a porcentagem de células CHO-K1 infectadas com *T. cruzi*. O gráfico mostra as médias de três experimentos independentes. Wt parasitas selvagens. sKO, parasitas simples nocaute. A9, F9 e G9 representam as três populações clonais isoladas de parasitas sKO. As variações foram consideradas como estatisticamente significativas quando o valor $p < 0.05$.

Em seguida ensaios de infecção em células CHO-K1 também foram feitos para determinamos o índice de infecção (% de células infectadas pelo número de parasitas por célula) dos parasitas Wt, sKO e dos clones A9, F9 e G9, 48 h.após a infecção. O índice de infecção calculado quarenta e oito h após a infecção permite ter uma noção da capacidade dos amastigotas em se replicarem durante o primeiro ciclo de divisão dos parasitas. Como demonstrado na figura 28, os parasitas sKO e os três clones apresentaram uma drástica diminuição no índice de infecção quando comparados com o índice obtido de ensaios de infecção com parasitas selvagens. Em síntese pode se concluir que os parasitas mutantes possuem uma capacidade infectiva menor ou os amastigotas replicam menos ou no mínimo mais lentamente que os parasitas selvagens.

Figura 28-Efeitos do nocaute simples de *TcSHMT* no índice de infecção de *T. cruzi*

A, eixo y mostra o índice de infecção que cada parasita apresentou. **B**, eixo y mostra o índice de infecção obtido em **A** em porcentagem. Os gráficos mostram as médias de três experimentos independentes. Wt parasitas selvagens. sKO, parasitas simples nocaute. A9, F9 e G9 representam as três populações clonais isoladas de parasitas sKO. As variações foram consideradas como estatisticamente significativas quando o valor $p < 0.05$.

Por fim, investigamos se os parasitas sKO seriam capazes de completar o ciclo intracelular e se diferenciarem em formas tripomastigotas. Para tal, células CHO-K1 foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos como no experimento anterior, mas desta vez as

células não foram fixadas de modo que a infecção prosseguiu por vários dias, permitindo aos amastigotas replicarem e se diferenciarem em formas tripomastigotas. Os tripomastigotas que romperam as células e, portanto, completaram o ciclo intracelular foram contados diariamente do sobrenadante das culturas. A figura 29 mostra que as formas tripomastigotas começaram a surgir no sobrenadante de todas as culturas no sexto dia pós-infecção (DPI). O pico de liberação de tripomastigotas aconteceu no 8º e 9º DPIs, começando a diminuir desde então. Contudo, o número de tripomastigotas liberados no sobrenadante de culturas infectadas com metacíclicos selvagens foi maior que o número de tripomastigotas encontrados no sobrenadante de culturas infectadas com parasitas sKO ou dos clones A9, F9 e G9.

Figura 29-Número de tripomastigotas Wt, sKO e clones A9, F9 e G9 liberados no sobrenadante de cultura de células infectadas

No eixo y está indicado o número de tripomastigotas liberados no sobrenadante de cultura de células CHO-K1 infectadas com *T. cruzi*. DPI, dias pós-infecção com formas metacíclicas de *T. cruzi*. Os gráficos mostram as médias de três experimentos independentes. Wt parasitas selvagens. sKO, parasitas simples nocaute. A9, F9 e G9 representam as três populações clonais isoladas de parasitas sKO

Todos esses resultados mostram que o nocaute de um alelo de *TcSHMT* teve um impacto maior no ciclo intracelular de *T. cruzi*, e indicam que o simples nocaute do gene que codifica *TcSHMT* putativa interferiu na capacidade proliferativa ou de diferenciação dos amastigotas.

Apesar dos avanços que nosso grupo e outros pesquisadores conseguiram a respeito do metabolismo de aminoácidos em *T. cruzi*, o metabolismo de serina neste parasita permanece pouco explorado. Por este motivo, realizamos uma busca por sequências de enzimas relacionadas a este metabolismo nos bancos de dados de *T. cruzi*. Serina é a fonte predominante de unidades de carbono para a síntese de *de novo* purinas e de dTMP em células altamente proliferativas (DE KONING et al., 2003) como células tumorais (SNELL; NATSUMEDA; WEBER, 1987). A serina também é um importante precursor para a síntese de outros aminoácidos como glicina, cisteína, treonina (HAMPTON, 1971b) e D-serina (RODRIGUEZ-CRESPO, 2008). Nas células, serina pode ser obtida através do seu transporte do meio extracelular, da degradação de proteínas e lipídeos ou por meio de síntese a partir da glicólise (via fosforilativa) ou pela via não fosforilativa (DE KONING et al., 2003). A via fosforilativa de síntese de serina é composta por três passos enzimáticos. Nesta via, 3-PGDH converte 3-D-fosfoglicerato em 3-fosfopiruvato que é transaminado pela PSAT formando fosfoserina. A terceira enzima dessa via catalisa a reação irreversível de desfosforilação para gerar serina (GREENBERG; ICHIHARA, 1957; SALLACH, 1956; YAMASHITA et al., 2003). Nossa busca por enzimas do metabolismo de serina revelou a presença apenas da primeira enzima da via fosforilativa de síntese deste aminoácido. Não foram identificadas as enzimas PSAT e PSP. Três hipóteses se colocam nesse cenário. A primeira hipótese é que esta via de síntese de serina a partir da glicólise não está conservada nesse parasita. A segunda é que durante o processo evolutivo tais enzimas tornaram-se muito diversificadas, a ponto de não serem identificadas por esse método, e por último, é possível que as duas últimas atividades enzimáticas sejam catalisadas por outras enzimas com amplo espectro de substratos, um fenômeno comum em *T. cruzi* (NOWICKI et al., 2001). Entre as três hipóteses, a primeira parece ser a mais provável, pois é bem conhecido que esta via sofre influência da disponibilidade de nutrientes no meio (CHEUNG; COTROPIA; SALLACH, 1969) e, portanto, o transporte de serina do meio extracelular para o citoplasma do parasita (HAMPTON, 1971a) poderia compensar uma possível perda evolutiva dessa via. A perda desta via em *T. cruzi* torna-se mais evidente quando se soma a isto, o fato de que outros parasitas não possuem, parcial ou totalmente, esta via (ABRAHAMSEN et al., 2004; GARDNER et al., 2002).

Devido à irreversibilidade da última reação enzimática, esta via é basicamente biosintética no sentido de formação de serina não tendo nenhuma contribuição na gluconeogênese das células. E como discutido acima, é provável que esta via não esteja

presente em *T. cruzi*. Portanto, o metabolismo de serina poderia atuar na geração de energia nas células através da enzima SDH que converte reversivelmente serina em piruvato (RAMOS; WIAME, 1982). Nossa busca *in silico* indicou uma sequência que codificaria SDH em *T. cruzi*. A análise da sequência primária de *TcSDH* indicou os subdomínios e características próprias de enzimas dependentes de PLP, sugerindo fortemente que esta sequência pode codificar uma SDH neste parasita. *TcSDH* pode desempenhar um papel importante no metabolismo de *T. cruzi*, uma vez que esta enzima nodal seria a conexão mais direta da serina com o metabolismo energético.

Por último, nossa busca por enzimas do metabolismo de serina em *T. cruzi* revelou a presença de duas sequências putativas para SHMT neste parasita. SHMT é uma das enzimas mais conservadas e bem distribuída entre os diversos grupos de organismos, sendo encontrada em procariotos e eucariotos com alto grau de conservação (SCHIRCH; SZE BENYI, 2005). Esta conservação fica evidente quando alinhamos as sequências *TcCLB.510407.90* e *TcCLB.509937.150* com SHMTs de outras cepas de *T. cruzi* que mostram uma identidade de 96% entre si. Mesmo entre organismos mais distantes como humanos e bactérias (**Figura 8**), sequências importantes para este tipo de enzima podem ser visualizados facilmente e baseados em estudos sobre outras SHMTs (SZE BENYI et al., 2000; VIJAYALAKSHMI; RAO, 1989), fomos capazes de indicar resíduos putativos para o sítio ativo de *TcSHMT*. A identificação desses resíduos pode permitir estudar mais a fundo o papel desses resíduos no mecanismo enzimático de *TcSHMT* por meio de mutação sítio dirigida (FU et al., 2005; HOPKINS; SCHIRCH, 1986), e assim identificar semelhanças e diferenças entre *TcSHMT* e as enzimas de humanos. Esse tipo de estudo tem demonstrado que possíveis inibidores podem ter efeitos diferentes entre isoformas de SHMTs do mesmo organismo ou entre SHMTs de espécies do mesmo gênero (CHANG et al., 2007; PAIARDINI et al., 2016; SOPITTHUMMAKHUN et al., 2009). Este tipo de abordagem seria interessante e pode no futuro validar *TcSHMT* como um atraente alvo quimioterápico, como já tem sido feito para diversos tipos de tumores (HISHIDA et al., 2003; RENWICK; SNELL; BAUMANN, 1998; WANG et al., 2014) e para outros protozoários parasitas (MAENPUEN et al., 2009).

Uma análise filogenética de *TcSHMT* (**Figura 30**) revelou que esta enzima putativa é mais semelhante com as isoformas citoplasmáticas e mitocondrial de SHMT de *Leishmania spp* (GAGNON et al., 2006). O cenário evolutivo para SHMTs é complexo entre os protozoários. SHMTs são encontradas na maioria dos organismos (MUKHERJEE et al., 2006; NOSEI; AVILA, 1985) menos em *T. brucei*, *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*, provavelmente devido à ausência de metabolismo de folato nesses organismos.

Na tentativa de explorar melhor as sequências de *TcSHMT* e obter dessa forma maior compreensão sobre esta enzima putativa em *T. cruzi*, geramos um modelo por homologia baseado na isoforma mitocondrial de SHMT humana (mHs). mHs foi escolhida por apresentar os melhores resultados em nossa busca por estruturas cristalográficas e porque os resíduos do sítio ativo de mHs são conhecidos. Também geramos um modelo por homologia baseado na isoforma mitocondrial de SHMT murina (usada para identificar os resíduos putativos de *TcSHMT*) e resultados semelhantes foram observados. Várias estruturas cristalográficas estão disponíveis para SHMTs de vários organismos (RENWICK; SNELL; BAUMANN, 1998; SCARSDALE et al., 1999; SCARSDALE et al., 2000; TALWAR et al., 1997), o que permite fazer correlações entre estrutura e função. As estruturas conhecidas de SHMTs de procariotos e eucariotos formam dímeros ou tetrâmeros (GIARDINA et al., 2015; JALA; APPAJI RAO; SAVITHRI, 2003; JALA et al., 2002; KRISHNA RAO et al., 1999). Nosso modelo de

TcSHMT (**Figura 11**) indica que esta enzima pode apresentar-se como tetrâmero. Cada monômero apresenta um subdomínio amino terminal maior, onde se localiza um resíduo de lisina em uma sequência conservada entre SHMTs e um subdomínio carboxi terminal menor e menos conservado. Esta estrutura tetramérica predita para *TcSHMT* está em concordância com o fato de que *TcSHMT* recombinante foi purificada em dois picos distintos em nossos experimentos de cromatografia de exclusão molecular. Um desses picos (**P1 na Figura 15**) teve sua massa molecular estimada em 212 KDa, o que corresponde a um tetrâmero da enzima recombinante. O segundo pico detectado por cromatografia de exclusão molecular (**P2 na Figura 15**) corresponde ao monômero de *TcSHMT* recombinante cuja massa molecular estimada foi de 51 KDa. Sabemos, baseado na literatura, que *TcSHMT* monomérica é enzimaticamente ativa (CAPELLUTO et al., 2000), mas como não conseguimos medir a atividade de *TcSHMT* recombinante, não podemos determinar se o tetrâmero de *TcSHMT* possui atividade, mas considerando que várias SHMTs tetraméricas possuem atividade e considerando que nosso modelo apresenta boa robustez, é possível que ambos os estados oligoméricos de *TcSHMT* sejam ativos e funcionais.

SHMTs são enzimas particularmente importantes em células altamente proliferativas devido ao seu papel na síntese e metilação de DNA (EICHLER; HUBBARD; SNELL, 1981; HERBIG et al., 2002; KASTANOS; WOLDMAN; APPLING, 1997). Por isso resolvemos investigar o perfil de expressão de *TcSHMT* nos diferentes estágios de desenvolvimento de *T. cruzi*. Como os tripanosomatídeos são conhecidos pela sua regulação majoritariamente pós transcricional, analisamos os níveis tanto de mRNA quanto de proteína de *TcSHMT*. Os resultados obtidos por qPCR (**Figura 17**) evidenciam que o nível de mRNA de *TcSHMT* diminui nas formas amastigota e epimastigota intracelular quando comparados com o nível de mRNA da forma epimastigota. Este resultado nos pareceu bastante intrigante, pois os parasitas cujo um alelo de *TcSHMT* foi nocauteado apresentaram fenótipo exatamente nas fases intracelulares de *T. cruzi*. Nos ensaios de *Western blot* observamos que os níveis de *TcSHMT* também variam entre as formas do parasita (**Figura 19**), o que indicam que *TcSHMT* é expressa em todas as formas de *T. cruzi*. Porém é importante medir a atividade de *TcSHMT* em extratos de todas as formas do parasita. Sabe-se também que a expressão e atividade de SHMTs são reguladas pela condição metabólica da célula (DEV; HARVEY, 1984; DI SALVO et al., 2013; FLYNN; CHRISTOPHERSON; DOWNS, 2013; PERRY et al., 2007; SCHEER; MACKEY; GREGORY, 2005; TENDLER; THREADGILL; TISDALE, 1987). Esta via de investigação poderia ser realizada com estudos de metabolômica dirigida, tanto nos parasitas selvagens quanto nos parasitas sKO, e nos daria informações valiosas a

respeito das funções que esta enzima desempenha nos diversos estágios de desenvolvimento de *T. cruzi*.

SHMTs de eucariotos são enzimas que apresentam uma localização sub-celular ampla, sendo encontradas no citosol, nas mitocôndrias, e em plantas há uma isoforma localizada nos plastos (SCHIRCH et al., 1984; SCHIRCH; PETERSON, 1980; ZHANG et al., 2010). Na maioria dos casos as diferentes isoformas de SHMTs são codificadas por genes distintos, inclusive em tripanosomatídeos (GAGNON et al., 2006), mas em outros protozoários como no caso de *Plasmodium falciparum* a mesma isoforma de SHMT pode se apresentar em mais de um compartimento celular (READ et al., 2010). Em 2000, Capelluto e colaboradores purificaram *Tc*SHMT de extrato de epimastigotas e verificaram a partir de fracionamento com digitonina, que esta enzima era citosólica (CAPELLUTO et al., 2000). Adicionalmente a esta informação, o genoma de *T. cruzi* apresenta apenas duas sequências que codificam *Tc*SHMT, cujas características são compatíveis com uma enzima citosólica, porém todos os organismos eucariotos estudados até o momento apresentam isoformas citosólica e mitocondrial de SHMT, sendo que em *Crithidia fasciculata* há uma terceira isoforma glicosomal (CAPELLUTO et al., 1999). De acordo com os resultados apresentados na figura 20, *Tc*SHMT se distribui amplamente pelo citoplasma do parasita e não há qualquer evidência de marcação nuclear para esta enzima. Para avaliar se *Tc*SHMT teria uma possível marcação mitocondrial, foi utilizada a sonda fluorescente Mitotracker (Invitrogen®). Em tripanossomatídeos, a marcação desta sonda não se localiza em uma única região, visto que esses organismos apresentam uma única mitocôndria que se estende ao longo do corpo do parasita. Quando a marcação de *Tc*SHMT obtida com o anticorpo anti-*Tc*SHMT é sobreposta com a marcação da sonda Mitotracker, é possível ver a co-localização das duas marcações, demonstrando que *Tc*SHMT além de estar distribuída pelo citoplasma de *T. cruzi*, também localiza-se na mitocôndria desse organismo. Adicionalmente, o padrão de marcação de *Tc*SHMT em extratos de epimastigotas permeabilizados com digitonina evidencia que a maior parte de *Tc*SHMT se localiza em frações de baixa concentração de digitonina (0.1-1 mg/mL) mas que também foi possível detectar a enzima em frações permeabilizadas com maior concentração de digitonina (1.25-2.5 mg/mL) indicando que ao menos parte de *Tc*SHMT pode estar em frações de proteínas envoltas por membranas internas. Em suma, *Tc*SHMT apresenta uma localização ampla no citoplasma de *T. cruzi* em especial na mitocôndria desse parasita. Parece que o mecanismo que determina a localização de *Tc*SHMT não está baseado em um peptídeo sinal. Este fenômeno também foi observado em outras SHMTs (READ et al., 2010) e permitiria ao *T. cruzi* distribuir *Tc*SHMT em diferentes compartimentos celulares

mesmo não possuindo isoformas distintas codificadas por genes diferentes. Esse dinamismo na localização de *TcSHMT* pode ser uma vantagem, uma vez que os derivados de folato são confinados ao compartimento celular onde foram sintetizados (KIM et al., 1997; VICKERS; BEVERLEY, 2011). *TcSHMT* poderia assim regular outras vias metabólicas em várias regiões do parasita (HERBIG et al., 2002; MACFARLANE et al., 2008).

Para avaliar o papel biológico de *TcSHMT* geramos parasitas mutantes em que o gene *TcCLB.509937.150* que codifica a enzima putativa *TcSHMT* estivesse deletado. A estratégia adotada foi a deleção desse gene por meio de sua substituição pelo gene de resistência a Neomicina. Para tanto, clonamos as regiões intergênicas *upstream* e *downstream* de *TcSHMT* em um vetor pBlueScript modificado cedido pelo Dr. Stênio P. Fragoso do Instituto Carlos Chagas em Curitiba-PR (**Figura 22**). Assim fomos capazes de obter construções necessárias para a substituição de *TcCLB.509937.150* através de recombinação homóloga. A escolha dessa técnica foi baseado no fato de que o gene *TcCLB.509937.150* está presente em cópia única no genoma de *T. cruzi* e porque no início desse trabalho a técnica de CRISPR/Cas9 não estava disponível para esse parasita. O gene *TcCLB.509937.150* e seu haplótipo apresentam regiões intergênicas *downstream* de tamanhos diferentes o que é comum em cepas híbridas como no caso da CL clone 14 utilizada nesse trabalho. Após confirmarmos a substituição de *TcCLB.509937.150* pelo gene *npt* que codifica a enzima neomicina fosfotransferase, confirmamos que o simples nocaute de *TcCLB.509937.150* causou uma diminuição significativa nos níveis de *TcSHMT* (**Figura 23 C**). Uma vez constatada essa diminuição, partimos para caracterizar fenótipos nos parasitas mutantes para verificar se a diminuição dos níveis de *TcSHMT* teria algum efeito na biologia do parasita.

Não observamos nenhum efeito na capacidade proliferativa (**Figura 24**) nem na morfologia (**Figura 25**) de formas epimastigotas sKO, indicando que a redução nos níveis de *TcSHMT* pode não desempenhar um papel central nessas formas. Se *TcSHMT* desempenha de fato um papel na síntese de unidades de carbono para a síntese de pirimidinas, pode ser que o simples nocaute de *TcCLB.509937.150* seja compensado pelo transporte de precursores do meio de cultivo para esse metabolismo (VICKERS; BEVERLEY, 2011). É intrigante o fato que uma forma replicativa não apresenta um fenótipo marcante para um nocaute simples que impactou tanto os níveis de uma enzima amplamente relacionada com proliferação. Contudo, precisamos considerar que esses experimentos de proliferação com as formas epimastigotas selvagens e sKO foram realizadas cultivando os parasitas em meio LIT que é um meio extremamente rico e suplementado com 10% de SFB. O cultivo desses parasitas em um meio rico pode ser a causa da não observação de fenótipos nas curvas de proliferação de

epimastigotas, pois o transporte tanto de aminoácidos como serina e glicina quanto de precursores de nucleotídeos poderia suprir as necessidades dos parasitas sKO e assim mascarando possíveis fenótipos. Em 2014 foi publicado um meio definido para o cultivo de *T. cruzi* (DE PAULA LIMA et al., 2014). Com a disponibilidade desse meio, podemos depletar isoladamente ou em combinação alguns componentes desse meio, o que permitiria avaliar melhor possíveis vias metabólicas afetadas pelo simples nocaute de *TcCLB.509937.150*. O nocaute simples de *TcCLB.509937.150* também não afetou a taxa de metaciclogênese dos parasitas sKO (**Figura 26**) e, portanto, *TcSHMT* não parece desempenhar um papel importante na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos.

Se formas epimastigotas cultivadas em meio rico são menos suscetíveis a possíveis efeitos deletérios do nocaute de *TcCLB.509937.150*. Talvés as formas intracelulares de *T. cruzi* seriam mais propensas a apresentarem fenótipos relacionados ao nocaute de *TcCLB.509937.150*, uma vez que estão em um ambiente cuja a disponibilidade de nutrientes é limitada ao conteúdo da célula hospedeira. Para verificar esta hipótese, células CHO-K1 foram infectadas com tripomastigotas metacíclicos Wt e sKO e o primeiro resultado mostra que apesar dos parasitas sKO se diferenciarem da mesma forma que os parasitas Wt (**Figura 26**), metacíclicos sKO infectam quase cinco vezes menos células CHO-K1 do que os metacíclicos Wt (**Figura 27**). Quando analisamos a porcentagem de células infectadas pelas três populações clonais isoladas dos parasitas sKO, é possível observar que há diferenças de infectividade entre os clones de parasitas mutantes. A porcentagem de células infectadas pelos clones F9 e G9 foi quase o dobro do que os valores apresentados pelo clone A9 ou pelos parasitas sKO. Quando calculamos o índice de infecção desses parasitas (**Figura 28**) fica mais evidente as diferenças entre os parasitas Wt e sKO. O clone F9 apresentou um índice de infecção cinco vezes menor que os parasitas Wt, enquanto que os demais parasitas mutantes apresentaram uma diminuição maior ainda no índice de infecção. Por último verificamos se os parasitas sKO conseguiriam completar o ciclo intracelular, se diferenciando em tripomastigotas (**Figura 29**). O resultado desse experimento mostra que formas tripomastigotas podem ser visualizadas no sobrenadante das culturas de células infectadas a partir do sexto dia pós infecção (DPI) tanto para os parasitas Wt quanto para os parasitas sKO. Em todo caso, o número de tripomastigotas sKO e de seus clones no sobrenadante das culturas foi menor que o número de tripomastigotas selvagens. Esses experimentos realizados durante o ciclo intracelular de *T. cruzi* demonstra que o simples nocaute de *TcCLB.509937.150* foi mais impactante nessa fase do ciclo de vida do parasita do que nas

formas epimastigotas ou na metaciclogênese. Parece que *TcSHMT* desempenha um papel importante para o estabelecimento do ciclo intracelular. Com tudo, não podemos determinar se os fenótipos observados são devido a diminuição da infectividade ou da replicação dos parasitas sKO. Mais experimentos são necessários para identificar especificamente quais mecanismos foram de fato afetados pelo simples nocaute de *TcCLB.509937.150*.

Até o presente momento não conseguimos deletar o segundo alelo de *TcCLB.509937.150* por meio de sua substituição pelo gene de resistência a Higromicina. As tentativas feitas até agora não foram bem sucedidas pois não conseguimos selecionar os parasitas na presença tanto de Neomicina quanto de Higromicina. Não podemos afirmar que isso se deve a essencialidade de *TcSHMT* pois um dos problemas em relação ao nocaute gênico em *T. cruzi* é que não é possível determinar se a impossibilidade de obter parasitas mutantes nulos é devido à essencialidade do gene deletado ou devido a outro fator inerente a remoção do gene. Uma alternativa atual a esse problema é tentar nocautear *TcCLB.509937.150* por CRISPR/Cas9 (LANDER et al., 2015), nosso laboratório tem estabelecido parceria com Dr. Roberto Docampo e seu grupo para implementar essa técnica em nosso laboratório. Apesar de não podermos afirmar que *TcSHMT* é essencial em *T. cruzi*, podemos supor que esta enzima é essencial se considerarmos que não é possível obter o nocaute duplo do gene que codifica a enzima bifuncional DHFR-TS de *T. cruzi* devido a sua essencialidade (PEREZ BRANDAN et al., 2011) e que SHMT é a primeira enzima dessa via (NOSEI; AVILA, 1985; SCHIRCH; SZEBENYI, 2005). Também faz se necessário confirmar se *TcSHMT* atua na síntese de unidades de carbono por meio do uso de serina marcada com isótopos pesados (^{14}C ou ^{13}C), porem esse trabalho mostra que *TcSHMT* é uma enzima importante em particular para as formas intracelulares de *T. cruzi* e que esta enzima é um alvo interessante a ser mais explorado. O estudo dessa enzima pode levar a descobertas de novas características para esse grupo de enzimas, pois mesmo com vários trabalhos sobre SHMTs de outros organismos, novas características tem sido relatadas em trabalhos com essa enzima em protozoários (CHITNUMSUB et al., 2014).

- Neste trabalho identificamos duas sequências putativas de *TcSHMT* no genoma de *T. cruzi*, número sistemático *TcCLB.509937.150* (non esmeraldo like). Devido a natureza híbrida da cepa CL, foi possível identificar seu haplótipo (esmeraldo like) cujo número sistemático no banco de dados do genoma do parasita é *TcCLB.510407.90*.
- As duas sequências codificariam um polipeptídeo de 461 aminoácidos com massa molecular predita de 50,5 KDa, cuja identidade entre as sequências é de 96%. Esta identidade é a mesma quando comparamos com sequências putativas encontradas nas cepas Dm28c e Sylvio, aumentando para 97% quando comparada com a cepa marinkellei.
- *TcSHMT* é uma enzima altamente conservada entre os diversos grupos de organismos.
- Utilizando a estrutura cristalográfica da isoforma citoplasmática de SHMT murina, podemos identificar os resíduos putativos relacionados ao sítio ativo de *TcSHMT*. Estes resíduos são S32, Y52, E54, Y61 e 62, G99, S100, L122, G126, H127, L128, S181, D206, H209, K235, R241, F268, N358 e R373. Entre eles K235 foi assinada como o possível resíduo de ligação ao cofator PLP.
- A sequência primária de *TcSHMT* apresenta os domínios característicos de enzimas da superfamília das Aspartato Aminotransferases (fold type I) de enzimas dependentes de PLP. No entanto, *TcSHMT* não apresenta um peptídeo canônico de exportação para a mitocôndria.
- Há uma perda de sintenia entre *TcSHMT* e SHMT de *Leishmania spp.* Não foi possível analisar a sintenia entre *T. cruzi* e *T. brucei* pois estes não possuem uma sequência para SHMT.
- Geramos um modelo por homologia de *TcSHMT*, baseado na isoforma mitocondrial de SHMT humana (mHs). De acordo com o modelo gerado *TcSHMT* apresenta uma conformação oligomérica de um tetrâmero. *TcSHMT* também apresentou um alto grau de identidade estrutural com mHs.
- *TcCLB.509937.150* foi clonado e expresso. *TcSHMT* recombinante se apresentou bastante solúvel, sendo possível purificar entre 15 a 20 mg de proteína recombinante por litro de cultura induzida.
- Por meio de cromatografia de exclusão molecular determinamos que *TcSHMT* se apresenta em conformação tetramérica ou monomérica.

- *TcSHMT* recombinante se apresenta mais estável na presença de tampões com pH entre 6 e 7 e na ausência de imidazol. A adição de glicerol e PLP à enzima recombinante também contribui para o aumento de sua estabilidade.
- O perfil de expressão de *TcSHMT* é diferente quando de comparar os níveis de mRNA e de proteína. Os níveis de mRNA de *TcSHMT* parecem diminuir nas formas intracelulares de *T. cruzi*, mas como evidenciado por *Western blot*, os níveis da proteína *TcSHMT* se mantém de forma semelhante em todas as formas do parasita.
- *TcSHMT* se distribui amplamente pelo citoplasma da célula, inclusive na mitocôndria de *T. cruzi* mesmo não apresentando um peptídeo canônico de exportação para esta organela.
- Através de recombinação homóloga, foi possível gerar parasitas heterozigotos para *TcSHMT* (STOLIC et al., 2009), onde um alelo foi substituído pelo gene de resistência à Neomicina. Também isolamos três populações clonais dos parasitas sKO.
- O simples nocaute de *TcSHMT* não afetou a capacidade dos parasitas sKO e seus clones de proliferar em meio LIT, nem sua capacidade de diferenciarem-se em formas tripomastigotas metacíclicas.
- O número de células CHO-K1 infectadas por tripomastigotas metacíclicos sKO e seus clones é muito menor que o número de células infectadas pelos parasitas selvagens.
- Os parasitas sKO apresentaram um índice de infecção muito menor que os parasitas selvagens.
- O número de tripomastigotas liberados no sobrenadante de culturas de células CHO-K1 infectadas com os parasitas sKO foi consideravelmente menor que o número de tripomastigotas liberadas no sobrenadante de células infectadas com parasitas selvagens nas mesmas condições.

REFERÊNCIAS*

- ABRAHAMSEN, M. S.; TEMPLETON, T. J.; ENOMOTO, S.; ABRAHANTE, J. E.; ZHU, G.; LANCTO, C. A.; DENG, M.; LIU, C.; WIDMER, G.; TZIPORI, S.; BUCK, G. A.; XU, P.; BANKIER, A. T.; DEAR, P. H.; KONFORTOV, B. A.; SPRIGGS, H. F.; IYER, L.; ANANTHARAMAN, V.; ARAVIND, L.; KAPUR, V. Complete genome sequence of the apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. **Science**, v. 304, p. 441-445, 2004.
- ADL, S. M.; SIMPSON, A. G.; FARMER, M. A.; ANDERSEN, R. A.; ANDERSON, O. R.; BARTA, J. R.; BOWSER, S. S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R. A.; FREDERICQ, S.; JAMES, T. Y.; KARPOV, S.; KUGRENS, P.; KRUG, J.; LANE, C. E.; LEWIS, L. A.; LODGE, J.; LYNN, D. H.; MANN, D. G.; MCCOURT, R. M.; MENDOZA, L.; MOESTRUP, O.; MOZLEY-STANDRIDGE, S. E.; NERAD, T. A.; SHEARER, C. A.; SMIRNOV, A. V.; SPIEGEL, F. W.; TAYLOR, M. F. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 52, p. 399-451, 2005.
- AKSOY, S. C.; UZEL, A.; BEDIR, E. Cytosine-type nucleosides from marine-derived *Streptomyces rochei* 06CM016. **J. Antibiot. (Tokyo)**, v. 69, p. 51-56, 2016.
- ALMEIDA-DE-FARIA, M.; FREYMULLER, E.; COLLI, W.; ALVES, M. J. Trypanosoma cruzi: characterization of an intracellular epimastigote-like form. **Exp. Parasitol.**, v. 92, p. 263-274, 1999.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 3389-3402, 1997.
- ANDERSON, D. D.; STOVER, P. J. SHMT1 and SHMT2 are functionally redundant in nuclear de novo thymidylate biosynthesis. **PLoS One**, v. 4, p. e5839, 2009.
- APT, W.; ZULANTAY, I. Update on the treatment of Chagas' disease. **Rev. Med. Chil.**, v. 139, p. 247-257, 2011.
- ASLETT, M.; AURRECOECHEA, C.; BERRIMAN, M.; BRESTELLI, J.; BRUNK, B. P.; CARRINGTON, M.; DEPLEDGE, D. P.; FISCHER, S.; GAJRIA, B.; GAO, X.; GARDNER, M. J.; GINGLE, A.; GRANT, G.; HARB, O. S.; HEIGES, M.; HERTZ-FOWLER, C.; HOUSTON, R.; INNAMORATO, F.; IODICE, J.; KISSINGER, J. C.; KRAEMER, E.; LI, W.; LOGAN, F. J.; MILLER, J. A.; MITRA, S.; MYLER, P. J.; NAYAK, V.; PENNINGTON, C.; PHAN, I.; PINNEY, D. F.; RAMASAMY, G.; ROGERS, M. B.; ROOS, D. S.; ROSS, C.; SIVAM, D.; SMITH, D. F.; SRINIVASAMOORTHY, G.; STOECKERT, C. J., JR.; SUBRAMANIAN, S.; THIBODEAU, R.; TIVEY, A.; TREATMAN, C.; VELARDE, G.; WANG, H. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Res.**, v. 38, p. D457-462, 2010.

* De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. NBR6023: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARISON, M. J.; DAMASCENO, F. S.; MANTILLA, B. S.; SILBER, A. M. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 48, p. 437-449, 2016.

BELISARIO, C. J.; PESSOA, G. C.; SILVA, E. M.; ROSA, A. C.; FERREIRA, R. E.; BEDIN, C.; WILHELMS, T.; DE MELLO, F.; COUTINHO, H. S.; FONSECA, E. L.; DOS SANTOS, R. F.; RODRIGUES, V. L.; DIAS, J. C.; DIOTAIUTI, L. Genetic characterization of residual *Triatoma infestans* populations from Brazil by microsatellite. **Genetica**, 2017.

BELTRAO HDE, B.; CERRONI MDE, P.; FREITAS, D. R.; PINTO, A. Y.; VALENTE VDA, C.; VALENTE, S. A.; COSTA EDE, G.; SOBEL, J. Investigation of two outbreaks of suspected oral transmission of acute Chagas disease in the Amazon region, Para State, Brazil, in 2007. **Trop. Doct.**, v. 39, p. 231-232, 2009.

BHAVANI, S.; TRIVEDI, V.; JALA, V. R.; SUBRAMANYA, H. S.; KAUL, P.; PRAKASH, V.; APPAJI RAO, N.; SAVITHRI, H. S. Role of Lys-226 in the catalytic mechanism of *Bacillus stearothermophilus* serine hydroxymethyltransferase--crystal structure and kinetic studies. **Biochemistry**, v. 44, p. 6929-6937, 2005.

BIRNBOIM, H. C.; DOLY, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. **Nucleic Acids Res.**, v. 7, p. 1513-1523, 1979.

BOOKOUT, A. L.; MANGELSDORF, D. J. Quantitative real-time PCR protocol for analysis of nuclear receptor signaling pathways. **Nucl. Recept. Signal**, v. 1, p. e012, 2003.

BOSCARDIN, S. B.; TORRECILHAS, A. C.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E. G.; TONELLI, R. R.; SILBER, A. M. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 14, p. 1373-1384, 2010.

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

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

BROSNAN, M. E.; MACMILLAN, L.; STEVENS, J. R.; BROSNAN, J. T. Division of labour: how does folate metabolism partition between one-carbon metabolism and amino acid oxidation? **Biochem. J.**, v. 472, p. 135-146, 2015.

CAMARGO, E. GROWTH AND DIFFERENTIATION IN *TRYPANOSOMA CRUZI*. I. ORIGIN OF METACYCLIC *TRYPANOSOMES* IN LIQUID MEDIA. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 6, p. 93-100, 1964.

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

CAPELLUTO, D. G.; HELLMAN, U.; CAZZULO, J. J.; CANNATA, J. J. Purification and partial characterization of three isoforms of serine hydroxymethyltransferase from *Crithidia fasciculata*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 98, p. 187-201, 1999.

_____. Purification and some properties of serine hydroxymethyltransferase from *Trypanosoma cruzi*. **Eur. J. Biochem.**, v. 267, p. 712-719, 2000.

CAZZULO, J. J. Energy metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Subcell. Biochem.**, v. 18, p. 235-257, 1992.

_____. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 26, p. 157-165, 1994.

CAZZULO, J. J.; FRANKE DE CAZZULO, B. M.; ENGEL, J. C.; CANNATA, J. J. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. **Mol Biochem. Parasitol.**, v. 16, p. 329-343, 1985.

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. Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CHANG, W. N.; TSAI, J. N.; CHEN, B. H.; HUANG, H. S.; FU, T. F. Serine hydroxymethyltransferase isoforms are differentially inhibited by leucovorin: characterization and comparison of recombinant zebrafish serine hydroxymethyltransferases. **Drug Metab. Dispos.**, v. 35, p. 2127-2137, 2007.

CHAVE, K. J.; RENWICK, S. B.; SANDERS, P. G.; SNELL, K. Site directed mutagenesis of human cytosolic serine hydroxymethyltransferase. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 23, p. 622S, 1995.

CHEUNG, G. P.; COTROPIA, J. P.; SALLACH, H. J. The effects of dietary protein on the hepatic enzymes of serine metabolism in the rabbit. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 129, p. 672-682, 1969.

CHITNUMSUB, P.; ITTARAT, W.; JARUWAT, A.; NOYTANOM, K.; AMORNWATCHARAPONG, W.; PORNTANAKASEM, W.; CHAIYEN, P.; YUTHAVONG, Y.; LEARTSAKULPANICH, U. The structure of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase reveals a novel redox switch that regulates its activities. **Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.**, v. 70, p. 1517-1527, 2014.

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.**, v. 16, p. 315-327, 1985.

DE KONING, T. J.; SNELL, K.; DURAN, M.; BERGER, R.; POLL-THE, B. T.; SURTEES, R. L-serine in disease and development. **Biochem. J.**, v. 371, p. 653-661, 2003.

DE PAULA LIMA, C. V.; BATISTA, M.; KUGERATSKI, F. G.; VINCENT, I. M.; SOARES, M. J.; PROBST, C. M.; KRIEGER, M. A.; MARCHINI, F. K. LM14 defined medium enables continuous growth of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol.**, v. 14, p. 238, 2014.

DE SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 17-36, 1999.

DEV, I. K.; HARVEY, R. J. Role of methionine in the regulation of the synthesis of serine hydroxymethyltransferase in *Escherichia coli*. **J. Biol. Chem.**, v. 259, p. 8402-8406, 1984.

DI SALVO, M. L.; CONTESTABILE, R.; PAIARDINI, A.; MARAS, B. Glycine consumption and mitochondrial serine hydroxymethyltransferase in cancer cells: the heme connection. **Med. Hypotheses**, v. 80, p. 633-636, 2013.

DIAS, J. C. Chagas disease: successes and challenges. **Cad. Saude Publica**, v. 22, p. 2020-2021, 2006.

EICHLER, H. G.; HUBBARD, R.; SNELL, K. The role of serine hydroxymethyltransferase in cell proliferation: DNA synthesis from serine following mitogenic stimulation of lymphocytes. **Biosci. Rep.**, v. 1, p. 101-106, 1981.

ELIAS, M. C.; DA CUNHA, J. P.; DE FARIA, F. P.; MORTARA, R. A.; FREYMULLER, E.; SCHENKMAN, S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. **Protist.**, v. 158, p. 147-157, 2007.

FERREIRA IDE, L.; SILVA, T. P. Transmission elimination of Chagas' disease by *Triatoma infestans* in Brazil: an historical fact. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, p. 507-509, 2006.

FIGUEIREDO, R. C.; STEINDEL, M.; SOARES, M. J. The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*: occurrence during in vitro cultivation. **Parasitol. Res.**, v. 80, p. 517-522, 1994.

FLORIO, R.; CHIARALUCE, R.; CONSALVI, V.; PAIARDINI, A.; CATACCHIO, B.; BOSSA, F.; CONTESTABILE, R. Structural stability of the cofactor binding site in *Escherichia coli* serine hydroxymethyltransferase--the role of evolutionarily conserved hydrophobic contacts. **FEBS J.**, v. 276, p. 7319-7328, 2009.

FLYNN, J. M.; CHRISTOPHERSON, M. R.; DOWNS, D. M. Decreased coenzyme A levels in *ridA* mutant strains of *Salmonella enterica* result from inactivated serine hydroxymethyltransferase. **Mol. Microbiol.**, v. 89, p. 751-759, 2013.

FU, T. F.; HUNT, S.; SCHIRCH, V.; SAFO, M. K.; CHEN, B. H. Properties of human and rabbit cytosolic serine hydroxymethyltransferase are changed by single nucleotide polymorphic mutations. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 442, p. 92-101, 2005.

GAGNON, D.; FOUCHER, A.; GIRARD, I.; OUELLETTE, M. Stage specific gene expression and cellular localization of two isoforms of the serine hydroxymethyltransferase in the protozoan parasite *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, p. 63-71, 2006.

GARDNER, M. J.; HALL, N.; FUNG, E.; WHITE, O.; BERRIMAN, M.; HYMAN, R. W.; CARLTON, J. M.; PAIN, A.; NELSON, K. E.; BOWMAN, S.; PAULSEN, I. T.; JAMES, K.; EISEN, J. A.; RUTHERFORD, K.; SALZBERG, S. L.; CRAIG, A.; KYES, S.; CHAN, M. S.; NENE, V.; SHALLOM, S. J.; SUH, B.; PETERSON, J.; ANGIUOLI, S.; PERTEA, M.; ALLEN, J.; SELENGUT, J.; HAFT, D.; MATHER, M. W.; VAIDYA, A. B.; MARTIN,

D. M.; FAIRLAMB, A. H.; FRAUNHOLZ, M. J.; ROOS, D. S.; RALPH, S. A.; MCFADDEN, G. I.; CUMMINGS, L. M.; SUBRAMANIAN, G. M.; MUNGALL, C.; VENTER, J. C.; CARUCCI, D. J.; HOFFMAN, S. L.; NEWBOLD, C.; DAVIS, R. W.; FRASER, C. M.; BARRELL, B. Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Nature**, v. 419, p. 498-511, 2002.

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

GIARDINA, G.; BRUNOTTI, P.; FIASCARELLI, A.; CICALINI, A.; COSTA, M. G.; BUCKLE, A. M.; DI SALVO, M. L.; GIORGI, A.; MARANI, M.; PAONE, A.; RINALDO, S.; PAIARDINI, A.; CONTESTABILE, R.; CUTRUZZOLA, F. How pyridoxal 5'-phosphate differentially regulates human cytosolic and mitochondrial serine hydroxymethyltransferase oligomeric state. **FEBS J.**, v. 282, p. 1225-1241, 2015.

GOLDSMITH, R. S.; ZARATE, R.; KAGAN, I.; CEDENO-FERREIRA, J.; GALINDO-VASCONCELOS, M.; ANTONIO PAZ, E. Transmission potential of Chagas' disease by blood transfusion: serological findings among donors of the State of Oaxaca. **Salud Publica Mex**, v. 20, p. 439-444, 1978.

GREENBERG, D. M.; ICHIHARA, A. Further studies on the pathway of serine formation from carbohydrate. **J. Biol. Chem.**, v. 224, p. 331-340, 1957.

GUTTERIDGE, W. E.; GABORAK, M. A re-examination of purine and pyrimidine synthesis in the three main forms of *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Biochem.**, v. 10, p. 415-422, 1979.

HAMPTON, J. R. Serine metabolism in the culture form of *Trypanosoma cruzi*: distribution of ¹⁴C from serine into metabolic fractions. **Comp. Biochem. Physiol. A. Comp. Physiol.**, v. 38, p. 535-540, 1971a.

_____. Serine metabolism in the culture form of *Trypanosoma cruzi*: synthesis of other amino acids. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 39, p. 999-1003, 1971b.

HASHIMOTO, M.; MORALES, J.; FUKAI, Y.; SUZUKI, S.; TAKAMIYA, S.; TSUBOUCHI, A.; INOUE, S.; INOUE, M.; KITA, K.; HARADA, S.; TANAKA, A.; AOKI, T.; NARA, T. Critical importance of the de novo pyrimidine biosynthesis pathway for *Trypanosoma cruzi* growth in the mammalian host cell cytoplasm. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 417, p. 1002-1006, 2012.

HERBIG, K.; CHIANG, E. P.; LEE, L. R.; HILLS, J.; SHANE, B.; STOVER, P. J. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase mediates competition between folate-dependent deoxyribonucleotide and S-adenosylmethionine biosyntheses. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 38381-38389, 2002.

HISHIDA, A.; MATSUO, K.; HAMAJIMA, N.; ITO, H.; OGURA, M.; KAGAMI, Y.; TAJI, H.; MORISHIMA, Y.; EMI, N.; TAJIMA, K. Associations between polymorphisms in the thymidylate synthase and serine hydroxymethyltransferase genes and susceptibility to malignant lymphoma. **Haematologica**, v. 88, p. 159-166, 2003.

HOARE, C. A. Rationalization of the terminology for the developmental stages of trypanosomatid flagellates. **Med. Parazitol. (Mosk)**, v. 40, p. 307-309, 1971.

HOPKINS, S.; SCHIRCH, V. Properties of a serine hydroxymethyltransferase in which an active site histidine has been changed to an asparagine by site-directed mutagenesis. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 3363-3369, 1986.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of neglected tropical diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 357, p. 1018-1027, 2007.

HUYNH, K.; PARTCH, C. L. Analysis of protein stability and ligand interactions by thermal shift assay. **Curr. Protoc. Protein Sci.**, v. 79, p. 28 29 21-14, 2015.

JAGATH, J. R.; RAO, N. A.; SAVITHRI, H. S. Role of Arg-401 of cytosolic serine hydroxymethyltransferase in subunit assembly and interaction with the substrate carboxy group. **Biochem. J.**, v. 327 (Pt 3), p. 877-882, 1997.

JAGATH, J. R.; SHARMA, B.; BHASKAR, B.; DATTA, A.; RAO, N. A.; SAVITHRI, H. S. Importance of the amino terminus in maintenance of oligomeric structure of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase. **Eur. J. Biochem.**, v. 247, p. 372-379, 1997.

JAGATH, J. R.; SHARMA, B.; RAO, N. A.; SAVITHRI, H. S. The role of His-134, -147, and -150 residues in subunit assembly, cofactor binding, and catalysis of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v. 272, p. 24355-24362, 1997.

JALA, V. R.; APPAJI RAO, N.; SAVITHRI, H. S. Identification of amino acid residues, essential for maintaining the tetrameric structure of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase, by targeted mutagenesis. **Biochem. J.**, v. 369, p. 469-476, 2003.

JALA, V. R.; PRAKASH, V.; RAO, N. A.; SAVITHRI, H. S. Overexpression and characterization of dimeric and tetrameric forms of recombinant serine hydroxymethyltransferase from *Bacillus stearothermophilus*. **J. Biosci.**, v. 27, p. 233-242, 2002.

KASTANOS, E. K.; WOLDMAN, Y. Y.; APPLING, D. R. Role of mitochondrial and cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase isozymes in de novo purine synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. **Biochemistry**, v. 36, p. 14956-14964, 1997.

KELLY, S.; WICKSTEAD, B.; GULL, K. An in silico analysis of trypanosomatid RNA polymerases: insights into their unusual transcription. **Biochem. Soc. Trans.**, v. 33, p. 1435-1437, 2005.

KIM, D. W.; DELLE FRATTE, S.; JEONG, S. S.; SCHIRCH, V. Determination of serine hydroxymethyltransferase and reduced folate pools in tissue extracts. **Anal Biochem.**, v. 253, p. 201-209, 1997.

KRISHNA RAO, J. V.; JAGATH, J. R.; SHARMA, B.; APPAJI RAO, N.; SAVITHRI, H. S. Asp-89: a critical residue in maintaining the oligomeric structure of sheep liver cytosolic serine hydroxymethyltransferase. **Biochem. J.**, v. 343 Pt 1, p. 257-263, 1999.

LANDER, N.; LI, Z. H.; NIYOGI, S.; DOCAMPO, R. CRISPR/Cas9-Induced Disruption of Paraflagellar Rod Protein 1 and 2 Genes in *Trypanosoma cruzi* Reveals Their Role in Flagellar Attachment. **MBio**, v. 6, p. e01012, 2015.

LISVANE SILVA, P.; MANTILLA, B. S.; BARISON, M. J.; WRENGER, C.; SILBER, A. M. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. **Curr. Pharm. Des.**, v. 17, p. 2074-2099, 2011.

LUND, K.; MERRILL, D. K.; GUYNN, R. W. The reactions of the phosphorylated pathway of L-serine biosynthesis: thermodynamic relationships in rabbit liver in vivo. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 237, p. 186-196, 1985.

MACFARLANE, A. J.; LIU, X.; PERRY, C. A.; FLODBY, P.; ALLEN, R. H.; STABLER, S. P.; STOVER, P. J. Cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase regulates the metabolic partitioning of methylenetetrahydrofolate but is not essential in mice. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 25846-25853, 2008.

MAENPUEN, S.; SOPITTHUMMAKHUN, K.; YUTHAVONG, Y.; CHAIYEN, P.; LEARTSAKULPANICH, U. Characterization of *Plasmodium falciparum* serine hydroxymethyltransferase-A potential antimalarial target. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 168, p. 63-73, 2009.

MAGDALENO, A.; AHN, I. Y.; PAES, L. S.; SILBER, A. M. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 4, p. e4534, 2009.

MAGDALENO, A.; SUAREZ MANTILLA, B.; ROCHA, S. C.; PRAL, E. M.; SILBER, A. M. The Involvement of Glutamate Metabolism in the Resistance to Thermal, Nutritional, and Oxidative Stress in *Trypanosoma cruzi*. **Enzyme Res.**, v. 2011, p. 486928, 2011.

MANTILLA, B. S.; PAES, L. S.; PRAL, E. M.; MARTIL, D. E.; THIEMANN, O. H.; FERNANDEZ-SILVA, P.; BASTOS, E. L.; SILBER, A. M. Role of Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 290, p. 7767-7790, 2015.

MARCIANO, D.; LLORENTE, C.; MAUGERI, D. A.; DE LA FUENTE, C.; OPPERDOES, F.; CAZZULO, J. J.; NOWICKI, C. Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 161, p. 12-20, 2008.

MARCIANO, D.; SANTANA, M.; MANTILLA, B. S.; SILBER, A. M.; MARINO-BUSLJE, C.; NOWICKI, C. Biochemical characterization of serine acetyltransferase and cysteine desulphydrase from *Leishmania major*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 173, p. 170-174, 2010.

MARCIANO, D.; SANTANA, M.; NOWICKI, C. Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H₂S production in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 185, p. 114-120, 2012.

MARIN-NETO, J. A.; RASSI, A., JR. Update on Chagas heart disease on the first centenary of its discovery. **Rev. Esp. Cardiol.**, v. 62, p. 1211-1216, 2009.

MARTINS-MELO, F. R.; LIMA MDA, S.; RAMOS, A. N., JR.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Trop. Med. Int. Health.**, v. 19, p. 943-957, 2014.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N., JR.; ALENCAR, C. H.; HEUKELBACH, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. **Acta Trop.**, v. 130, p. 167-174, 2014.

MARTINS, R. M.; COVARRUBIAS, C.; ROJAS, R. G.; SILBER, A. M.; YOSHIDA, N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infect. Immun.**, v. 77, p. 3023-3032, 2009.

MEDECINS SANS FRONTIERES. CAMPAIGN FOR ACCESS TO ESSENTIAL, M. International meeting: new diagnostic tests are urgently needed to treat patients with Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 41, p. 315-319, 2008.

MICHELS, P. A.; HANNAERT, V.; BRINGAUD, F. Metabolic aspects of glycosomes in trypanosomatidae - new data and views. **Parasitol. Today**, v. 16, p. 482-489, 2000.

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

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

MUKHERJEE, M.; SIEVERS, S. A.; BROWN, M. T.; JOHNSON, P. J. Identification and biochemical characterization of serine hydroxymethyl transferase in the hydrogenosome of *Trichomonas vaginalis*. **Eukaryot Cell**, v. 5, p. 2072-2078, 2006.

NOSEI, C.; AVILA, J. L. Serine hydroxymethyltransferase activity in *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma rangeli* and American *Leishmania* spp. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 81, p. 701-704, 1985.

NOWICKI, C.; HUNTER, G. R.; MONTEMARTINI-KALISZ, M.; BLANKENFELDT, W.; HECHT, H.; KALISZ, H. M. Recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*: structural characterization and site directed mutagenesis of a broad substrate specificity enzyme. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1546, p. 268-281, 2001.

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

PAES, L. S.; SUAREZ MANTILLA, B.; ZIMBRES, F. M.; PRAL, E. M.; DIOGO DE MELO, P.; TAHARA, E. B.; KOWALTOWSKI, A. J.; ELIAS, M. C.; SILBER, A. M. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 8, p. e69419, 2013.

PAIARDINI, A.; TRAMONTI, A.; SCHIRCH, D.; GUIDUCCI, G.; DI SALVO, M. L.; FIASCARELLI, A.; GIORGI, A.; MARAS, B.; CUTRUZZOLA, F.; CONTESTABILE, R. Differential 3-bromopyruvate inhibition of cytosolic and mitochondrial human serine hydroxymethyltransferase isoforms, key enzymes in cancer metabolic reprogramming. **Biochim. Biophys Acta**, v. 1864, p. 1506-1517, 2016.

PANDEY, S.; GARG, P.; LEE, S.; CHOUNG, H. W.; CHOUNG, Y. H.; CHOUNG, P. H.; CHUNG, J. H. Nucleotide biosynthesis arrest by silencing SHMT1 function via vitamin B6-coupled vector and effects on tumor growth inhibition. **Biomaterials**, v. 35, p. 9332-9342, 2014.

PANG, C. K.; HUNTER, J. H.; GUJJAR, R.; PODUTOORI, R.; BOWMAN, J.; MUDEPPA, D. G.; RATHOD, P. K. Catalytic and ligand-binding characteristics of Plasmodium falciparum serine hydroxymethyltransferase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 168, p. 74-83, 2009.

PAONE, A.; MARANI, M.; FIASCARELLI, A.; RINALDO, S.; GIARDINA, G.; CONTESTABILE, R.; PAIARDINI, A.; CUTRUZZOLA, F. SHMT1 knockdown induces apoptosis in lung cancer cells by causing uracil misincorporation. **Cell Death Dis.**, v. 5, p. e1525, 2014.

PASCARELLA, S.; ANGELACCIO, S.; CONTESTABILE, R.; DELLE FRATTE, S.; DI SALVO, M.; BOSSA, F. The structure of serine hydroxymethyltransferase as modeled by homology and validated by site-directed mutagenesis. **Protein Sci.**, v. 7, p. 1976-1982, 1998.

PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; IVALDI, S.; SILBER, A. M.; ALVES, M. J.; TORRES, H. N.; FLAWIA, M. M. Arginine kinase overexpression improves Trypanosoma cruzi survival capability. **FEBS Lett.**, v. 554, p. 201-205, 2003.

PEREIRA, C. A.; ALONSO, G. D.; TORRES, H. N.; FLAWIA, M. M. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. **J. Eukaryot Microbiol.**, v. 49, p. 82-85, 2002.

PEREZ BRANDAN, C.; PADILLA, A. M.; XU, D.; TARLETON, R. L.; BASOMBRI, M. A. Knockout of the dhfr-ts gene in Trypanosoma cruzi generates attenuated parasites able to confer protection against a virulent challenge. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, p. e1418, 2011.

PERRY, C.; YU, S.; CHEN, J.; MATHARU, K. S.; STOVER, P. J. Effect of vitamin B6 availability on serine hydroxymethyltransferase in MCF-7 cells. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 462, p. 21-27, 2007.

PINTHONG, C.; MAENPUEN, S.; AMORNWATCHARAPONG, W.; YUTHAVONG, Y.; LEARTSAKULPANICH, U.; CHAIYEN, P. Distinct biochemical properties of human serine hydroxymethyltransferase compared with the Plasmodium enzyme: implications for selective inhibition. **FEBS J.**, v. 281, p. 2570-2583, 2014.

PINTO DIAS, J. C. The treatment of Chagas disease (South American trypanosomiasis). **Ann. Intern. Med.**, v. 144, p. 772-774, 2006.

PONCE, C. Transfusion transmission of Chagas disease in Honduras and other Central American countries. **Medicina (B Aires)**, v. 59 Suppl 2, p. 135-137, 1999.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, p. 92-100, 2001.

PUNUKOLLU, G.; GOWDA, R. M.; KHAN, I. A.; NAVARRO, V. S.; VASAVADA, B. C. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. **Int. J. Cardiol.**, v. 115, p. 279-283, 2007.

RAMOS, F.; WIAME, J. M. Occurrence of a catabolic L-serine (L-threonine) deaminase in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur. J. Biochem.**, v. 123, p. 571-576, 1982.

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

RASSI, A., JR.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388-1402, 2010.

READ, M.; MULLER, I. B.; MITCHELL, S. L.; SIMS, P. F.; HYDE, J. E. Dynamic subcellular localization of isoforms of the folate pathway enzyme serine hydroxymethyltransferase (SHMT) through the erythrocytic cycle of *Plasmodium falciparum*. **Malar. J.**, v. 9, p. 351, 2010.

RECHE, P.; ARREBOLA, R.; OLMO, A.; SANTI, D. V.; GONZALEZ-PACANOWSKA, D.; RUIZ-PEREZ, L. M. Cloning and expression of the dihydrofolate reductase-thymidylate synthase gene from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 65, p. 247-258, 1994.

RENWICK, S. B.; SNELL, K.; BAUMANN, U. The crystal structure of human cytosolic serine hydroxymethyltransferase: a target for cancer chemotherapy. **Structure**, v. 6, p. 1105-1116, 1998.

RODRIGUEZ-CRESPO, I. D-amino acids in the brain: pyridoxal phosphate-dependent amino acid racemases and the physiology of D-serine. **FEBS J.**, v. 275, p. 3513, 2008.

ROHLOFF, P.; MONTALVETTI, A.; DOCAMPO, R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 52270-52281, 2004.

ROHLOFF, P.; RODRIGUES, C. O.; DOCAMPO, R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 126, p. 219-230, 2003.

RUEDA, K.; TRUJILLO, J. E.; CARRANZA, J. C.; VALLEJO, G. A. Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* : a new epidemiological scenario for Chagas' disease in Colombia and other South American countries. **Biomedica**, v. 34, p. 631-641, 2014.

SALLACH, H. J. Formation of serine hydroxypyruvate and L-alanine. **J. Biol. Chem.**, v. 223, p. 1101-1108, 1956.

SAMBROOK, J.; GREEN, M. R. Molecular Cloning a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, v. 4th, 2012.

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

SAYE, M.; MIRANDA, M. R.; DI GIROLAMO, F.; DE LOS MILAGROS CAMARA, M.; PEREIRA, C. A. Proline modulates the Trypanosoma cruzi resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. **PLoS One**, v. 9, p. e92028, 2014.

SCARSDALE, J. N.; KAZANINA, G.; RADAEV, S.; SCHIRCH, V.; WRIGHT, H. T. Crystal structure of rabbit cytosolic serine hydroxymethyltransferase at 2.8 Å resolution: mechanistic implications. **Biochemistry**, v. 38, p. 8347-8358, 1999.

SCARSDALE, J. N.; RADAEV, S.; KAZANINA, G.; SCHIRCH, V.; WRIGHT, H. T. Crystal structure at 2.4 Å resolution of E. coli serine hydroxymethyltransferase in complex with glycine substrate and 5-formyl tetrahydrofolate. **J. Mol. Biol.**, v. 296, p. 155-168, 2000.

SCHEER, J. B.; MACKEY, A. D.; GREGORY, J. F., 3RD. Activities of hepatic cytosolic and mitochondrial forms of serine hydroxymethyltransferase and hepatic glycine concentration are affected by vitamin B-6 intake in rats. **J. Nutr.**, v. 135, p. 233-238, 2005.

SCHIRCH, L.; GAVILANES, F.; PETERSON, D.; BULLIS, B.; BARRA, D.; BOSSA, F. Structural studies on rabbit liver cytosolic and mitochondrial isozymes of serine hydroxymethyltransferase. **Prog. Clin. Biol. Res.**, v. 144A, p. 301-308, 1984.

SCHIRCH, L.; PETERSON, D. Purification and properties of mitochondrial serine hydroxymethyltransferase. **J. Biol. Chem.**, v. 255, p. 7801-7806, 1980.

SCHIRCH, V.; SZEKENYI, D. M. Serine hydroxymethyltransferase revisited. **Curr. Opin. Chem. Biol.**, v. 9, p. 482-487, 2005.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Trop.**, v. 115, p. 14-21, 2010.

SCHOIJET, A. C.; MIRANDA, K.; GIRARD-DIAS, W.; DE SOUZA, W.; FLAWIA, M. M.; TORRES, H. N.; DOCAMPO, R.; ALONSO, G. D. A Trypanosoma cruzi phosphatidylinositol 3-kinase (TcVps34) is involved in osmoregulation and receptor-mediated endocytosis. **J. Biol. Chem.**, v. 283, p. 31541-31550, 2008.

SCOTT, D. A.; DOCAMPO, R. Characterization of isolated acidocalcisomes of Trypanosoma cruzi. **J. Biol. Chem.**, v. 275, p. 24215-24221, 2000.

SILBER, A. M.; COLLI, W.; ULRICH, H.; ALVES, M. J.; PEREIRA, C. A. Amino acid metabolic routes in Trypanosoma cruzi: possible therapeutic targets against Chagas' disease. **Curr. Drug Targets Infect. Disord.**, v. 5, p. 53-64, 2005.

SILBER, A. M.; ROJAS, R. L.; URIAS, U.; COLLI, W.; ALVES, M. J. Biochemical characterization of the glutamate transport in Trypanosoma cruzi. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, p. 157-163, 2006.

SIMPSON, L.; THIEMANN, O. H.; SAVILL, N. J.; ALFONZO, J. D.; MASLOV, D. A. Evolution of RNA editing in trypanosome mitochondria. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 97, p. 6986-6993, 2000.

SNELL, K.; NATSUMEDA, Y.; WEBER, G. The modulation of serine metabolism in hepatoma 3924A during different phases of cellular proliferation in culture. **Biochem. J.**, v. 245, p. 609-612, 1987.

SOARES, M. J.; DE SOUZA, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, v. 77, p. 461-468, 1991.

SOPITTHUMMAKHUN, K.; MAENPUEN, S.; YUTHAVONG, Y.; LEARTSAKULPANICH, U.; CHAIYEN, P. Serine hydroxymethyltransferase from *Plasmodium vivax* is different in substrate specificity from its homologues. **FEBS J.**, v. 276, p. 4023-4036, 2009.

SOUZA-LIMA RDE, C.; BARBOSA, M.; COURA, J. R.; ARCANJO, A. R.; NASCIMENTO ADA, S.; FERREIRA, J. M.; MAGALHAES, L. K.; ALBUQUERQUE, B. C.; ARAUJO, G. A.; GUERRA, J. A. Outbreak of acute Chagas disease associated with oral transmission in the Rio Negro region, Brazilian Amazon. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 46, p. 510-514, 2013.

SOUZA, W. Electron microscopy of trypanosomes--a historical view. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 103, p. 313-325, 2008.

STAUFFER, G. V.; PLAMANN, M. D.; STAUFFER, L. T. Construction and expression of hybrid plasmids containing the *Escherichia coli* glyA genes. **Gene**, v. 14, p. 63-72, 1981.

STOLIC, I.; MISKOVIC, K.; MAGDALENO, A.; SILBER, A. M.; PIANTANIDA, I.; BAJIC, M.; GLAVAS-OBROVAC, L. Effect of 3,4-ethylenedioxy-extension of thiophene core on the DNA/RNA binding properties and biological activity of bisbenzimidazole amidines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, p. 2544-2554, 2009.

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

SZEBENYI, D. M.; LIU, X.; KRIKSUNOV, I. A.; STOVER, P. J.; THIEL, D. J. Structure of a murine cytoplasmic serine hydroxymethyltransferase quinonoid ternary complex: evidence for asymmetric obligate dimers. **Biochemistry**, v. 39, p. 13313-13323, 2000.

TALWAR, R.; JAGATH, J. R.; DATTA, A.; PRAKASH, V.; SAVITHRI, H. S.; RAO, N. A. The role of lysine-256 in the structure and function of sheep liver recombinant serine hydroxymethyltransferase. **Acta Biochim. Pol.**, v. 44, p. 679-688, 1997.

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

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

TENDLER, S. J.; THREADGILL, M. D.; TISDALE, M. J. Activities of serine hydroxymethyltransferase in murine tissues and tumours. **Cancer Lett.**, v. 36, p. 65-69, 1987.

TONELLI, R. R.; SILBER, A. M.; ALMEIDA-DE-FARIA, M.; HIRATA, I. Y.; COLLI, W.; ALVES, M. J. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cell Microbiol.**, v. 6, p. 733-741, 2004.

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

VATSYAYAN, R.; ROY, U. Molecular cloning and biochemical characterization of *Leishmania donovani* serine hydroxymethyltransferase. **Protein Expr. Purif.**, v. 52, p. 433-440, 2007.

VICKERS, T. J.; BEVERLEY, S. M. Folate metabolic pathways in *Leishmania*. **Essays Biochem.**, v. 51, p. 63-80, 2011.

VIJAYALAKSHMI, D.; RAO, N. A. Identification of amino acid residues at the active site of human liver serine hydroxymethyltransferase. **Biochem. Int.**, v. 19, p. 625-632, 1989.

WANG, Q.; LU, K.; DU, H.; ZHANG, Q.; CHEN, T.; SHU, Y.; HUA, Y.; ZHU, L. Association between cytosolic serine hydroxymethyltransferase (SHMT1) gene polymorphism and cancer risk: a meta-analysis. **Biomed. Pharmacother.**, v. 68, p. 757-762, 2014.

WESTBROOK, J.; FENG, Z.; JAIN, S.; BHAT, T. N.; THANKI, N.; RAVICHANDRAN, V.; GILLILAND, G. L.; BLUHM, W.; WEISSIG, H.; GREER, D. S.; BOURNE, P. E.; BERMAN, H. M. The Protein Data Bank: unifying the archive. **Nucleic Acids Res.**, v. 30, p. 245-248, 2002.

WHO, W. W. H. O.-. Chagas Disease (American trypanosomiasis). 2015.

XU, X. L.; CHEN, S.; GRANT, G. A. Kinetic, mutagenic, and structural homology analysis of L-serine dehydratase from *Legionella pneumophila*. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 515, p. 28-36, 2011.

YAMASHITA, N.; SAKAI, K.; FURUYA, S.; WATANABE, M. Selective expression of L-serine synthetic enzyme 3PGDH in schwann cells, perineuronal glia, and endoneurial fibroblasts along rat sciatic nerves and its upregulation after crush injury. **Arch Histol Cytol.**, v. 66, p. 429-436, 2003.

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

ZHANG, Y.; SUN, K.; SANDOVAL, F. J.; SANTIAGO, K.; ROJE, S. One-carbon metabolism in plants: characterization of a plastid serine hydroxymethyltransferase. **Biochem. J.**, v. 430, p. 97-105, 2010.