

MARIA JULIA BARISON

Caracterização e avaliação do papel da degradação de  
histidina na bioenergética 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  
2015

MARIA JULIA BARISON

Caracterização e avaliação do papel da degradação de  
histidina na bioenergética 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 original

São Paulo  
2015

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

reprodução não autorizada pelo autor

Barison, Maria Julia.

Caracterização e avaliação do papel da degradação de histidina na bioenergética do *Trypanosoma cruzi* / Maria Julia Barison. -- São Paulo, 2015.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Bioquímica de tripanossomatídeos.

Versão do título para o inglês: Characterization and evaluation of the role of histidine degradation in *Trypanosoma cruzi* bioenergetics.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Doença de Chagas 3. Histidina 4. Bioenergética 5. Aminoácidos 6. Metabolômica I. Silber, Prof. Dr. Ariel Mariano II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB0154/2015

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidato(a): Maria Julia Barison.

Título da Tese: Caracterização e avaliação do papel da degradação de histidina na bioenergética do *Trypanosoma cruzi*.

Orientador(a): Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

Aprovado(a)

Reprovado(a)

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

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

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

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

Presidente: Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....



**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](mailto:cep@icb.usp.br)

## **CERTIFICADO**

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **113** nas fls. **92** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) Ariel Mariano Silber, Coordenador(a) da Linha de pesquisa **Perspectivas das enzimas do metabolismo de histidina do Trypanosoma cruzi como novos alvos terapêuticos** do qual participam o(s) alunos **Maira Julia Barisón**, 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 **23.11.2010**, com **validade de 3 anos**.

São Paulo, 25 de novembro de 2010.

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

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



Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
Comissão de Ética em Pesquisa - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

Decl. CEUA.070/2015.

## DECLARAÇÃO

Em adendo ao Certificado 113/2010/CEUA, informo que o título do Projeto foi alterado para "*Caracterização e avaliação do papel de degradação da histidina na bioenergética de Trypanosoma cruzi*" sem modificações de seu conteúdo.

São Paulo, 27 de agosto de 2015.

Prof. Dr. **Anderson de Sá Nunes**  
Coordenador da Comissão de  
Ética no Uso de Animais - ICB/USP

*A Leo, porque sem ele, nada disso teria acontecido.*

## AGRADECIMENTOS

Uma tese é um desafio enorme do qual não somos cientes até andar o caminho. Mas o percurso é mais ameno quando se tem as pessoas indicadas andando junto com você. Por isso, quero dizer meu “muito obrigada!”....

Ao Ariel, por me dar esta oportunidade, por me orientar dentro e fora do lab, pela confiança, pela paciência, pelo carinho de todos esses anos.

A Beth, pela ajuda imensurável, pelos conselhos, por ser minha mãe no Brasil.

A Flá Dama, exemplo de humildade e generosidade, pela sua ajuda infinita, pelo seu tempo, mas sobre tudo, pela sua amizade maravilhosa nesses anos todos.

A Lud, por ser essa amiga incrível, pelos momentos e experiências que compartilhamos, por me escutar e aconselhar. Obrigada por estar sempre disposta para me ajudar.

Ao Briam, colega e amigo desde o início, porque sempre estive ali para me responder, pela paciência e pela sua amizade.

A Rá, por estar sempre do meu lado, pela ajuda sempre pronta, pelas risadas que mudavam a cor do dia, por ser minha irmãzinha brasileira.

Ao Marcellzito, peça fundamental do grupo, pela amizade de todos esses anos, pelo seu tempo e disposição para dar uma mão sempre que necessário.

A Lets, Manchi, Flá Z, pela amizade carinhosa e companheira, pela alegria na convivência de todos os dias. Ao Gustavo, Rodolpho, Richard e Alê, pelo companheirismo, pelas risadas. Obrigada a todos pela ajuda sempre disposta.

Ao Prof. Dr. Carsten Wrenger e seu grupo, porque também fazem parte desse trabalho. Ao Prof. Dr. Agustín Hernández López, pela sua disposição e colaboração.

Aos que já passaram pelo lab deixando saudades e gratidão: Lis, Inga, Jean, Rosi, Sandrinha, Higo. Pessoas incríveis com quem teve a sorte de trabalhar.

Ao Manoel, pela competência e paciência para ajudar, pela sua simpatia e amabilidade.

À Profa. Dra. Belén Cassera e ao Dr. Emilio Merino, por abrir as portas do seu lab na Virginia, pela paciência e compromisso. Aos seus alunos Christian e Jessica.



À Prof. Dra. Cristina Nowicki, por ser minha “companheira” de bancada durante um mês cheio de aprendizados.

À Profa. Dra. Alicia Kowaltowsky, Camille e todo seu grupo, pela disposição para ajudarnos nos experimentos de bioenergética.

Ao Prof. Dr. Mauro Cortez e seu grupo, pelo suporte técnico e por compartilhar nesse último tempo os seminários semanais.

À Prof. Dra. Carolina Elias Sabbaga e seu grupo, pelo companheirismo e ajuda com as microscopias de fluorescência.

Ao Prof. Dr. Cláudio Marinho e seu grupo, pela disposição para ajudar com as citometrias de fluxo e imagens de microscopia.

À Profa. Dra. Sayuri Miyamoto e seu grupo, por disponibilizar seu equipo de HPLC, assim como o tempo e ajuda para desenvolver os experimentos.

À Universidade de São Paulo, ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao pessoal do departamento. Obrigada pelo coleguismo de todo esse tempo.

À FAPESP, pelo apoio financeiro otorgado para desenvolver o projeto.

Aos amigos que ganhei fora do lab: Kalil, Mireia, Joyce, Thiago, o pessoal da Matilha do Rizzo... todos sempre presentes no meu coração.

À amiga que a ciência argentina me deu: Luci, obrigada por ser essa pessoa tão especial que chegou à minha vida como se nos conheceramos desde sempre.

Às amigas de toda minha vida: Ivi, Mar, Caro, Ichu, Cate. Por estarem comigo, mesmo com a distancia, me dando forças para continuar.

À minha família, apoio fundamental de hoje e sempre: meus pais Ana e Adalberto, meu irmão Gerardo, minhas avós Lali e Rosi, meu tío Luis, Vicky e o pequeno Leonardo. À Mari, Norber e Ani. Obrigada por estarem ao meu lado me apoiando, encurtando as distâncias.

À minha outra metade, Leo, por seu amor incondicional e pela sua paciência todo este tempo, por me entender e me dar suas asas para voar, sempre juntos. Ao Renzo e ao Carlito, motivo de alegria e amor sem limites, todas as horas, todos os dias.

Este trabalho foi desenvolvido graças ao apoio financeiro concedido pela FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), número de processo: 2009/53415-8. Além disso, o laboratório pertence ao Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças infecciosas (INBEQMeDI) auxiliado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.*

Madre Teresa de Calcuta

## RESUMO

BARISON, M. J. **Caracterização e avaliação do papel da degradação de histidina na bioenergética de *Trypanosoma cruzi***. 2015. 153 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2015.

*Trypanosoma cruzi* é capaz de utilizar aminoácidos como uma eficiente fonte de energia. Histidina (His), um aminoácido abundante no inseto vetor, é um metabólito essencial para o parasita, que deve incorporá-lo desde o meio extracelular para sua utilização. No presente trabalho mostramos que epimastigotas de *T. cruzi* incorporam His através de um único sistema de transporte saturável. O transportador para His mostrou alta especificidade pelo seu substrato e dependência do conteúdo intracelular de ATP para a sua atividade. Uma vez no citoplasma, His é degradada a glutamato através de uma via de degradação não descrita em outros tripanossomatídeos: a primeira enzima, histidina amônio-liase (*Tc*HAL) catalisa a desaminação não oxidativa da His rendendo urocanato, que por sua vez é convertido por uma urocanato hidratase (*Tc*UH) ao intermediário 4-imidazolona-5-propionato. Posteriormente através da atividade de duas enzimas (imidazolona propionase e formimino glutamase) é produzido glutamato. O glutamato produzido pode ser desaminado a  $\alpha$ -cetoglutarato, um intermediário do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA). No presente trabalho, as duas primeiras enzimas da via, *Tc*HAL e *Tc*UH foram expressas e purificadas em sistema heterólogo e diferentes parâmetros cinéticos e bioquímicos foram determinados. Observamos também que parasitas incubados com [<sup>14</sup>C(U)]-His são capazes de liberar CO<sub>2</sub> radioativo, demonstrando que a oxidação completa da His é operativa em *T. cruzi*. Por outro lado, a caracterização da His como fonte de energia para epimastigotas, foi estabelecida mediante a medição de parâmetros tais como a produção de ATP, estabelecimento de potencial de membrana interna mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e consumo de oxigênio. Observamos também que quando parasitas submetidos a estresse nutricional são recuperados com His, os valores de  $\Delta\Psi_m$  são recuperados, e são promovidos o consumo de oxigênio na mitocôndria e a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa. Quando comparado o metabolismo de His entre as fases exponencial e estacionária de crescimento de epimastigotas, observamos que na fase exponencial há um consumo de His mais ativo, de acordo com o papel proposto para este aminoácido na bioenergética de *T. cruzi*. Em contraste, o transporte de His mostrou-se mais ativo na fase estacionária, além de observarse um aumento nos níveis intracelulares tanto de His quanto de urocanato, sugerindo uma possível acumulação desses metabólitos nessa fase de crescimento. Interessantemente, His é também capaz de estimular a metacicloênese *in vitro*, com taxas de diferenciação comparáveis ao meio de diferenciação padrão, TAU-3AAG. Estudos metabolômicos mostraram que His é utilizada principalmente no início da diferenciação, possivelmente como fonte energética. Nossos dados indicam a relevância da His na bioenergética *T. cruzi*, demonstrando o importante papel da utilização de His pelo parasita principalmente nas fases presentes no inseto vetor.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Histidina. Bioenergética. Aminoácidos. Metabolômica.

## ABSTRACT

BARISON, M. J. **Characterization and evaluation of the role of histidine degradation in *Trypanosoma cruzi* bioenergetics.** 2015. 153 p. Ph. D. Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2015.

*Trypanosoma cruzi* is able to use amino acids as an efficient energy source. Histidine, an abundant amino acid in the insect vector, is an essential metabolite for *T. cruzi*, so it must be incorporated from the extracellular medium. In the present work we show that *T. cruzi* epimastigotes incorporate His through a single and saturable transport system. His uptake system is highly specific and is dependent on intracellular ATP content. Once in the cytoplasm, His can be degraded to glutamate through a metabolic pathway not described in other trypanosomatids. The first enzyme, histidine ammonia-lyase (*TcHAL*) catalyzes the non-oxidative deamination of His to urocanate, which in turn is converted into the intermediate 4-imidazolone-5-propionate by an urocanate hydratase. Afterwards, through the action of two additional enzymes (imidazolone propionase and formimino glutamase) glutamate is produced. The produced glutamate can be deaminated to  $\alpha$ -ketoglutarate, a Tricarboxylic Acids Cycle (TCA) intermediate. In the present work, the first two enzymes of the pathway, *TcHAL* and *TcUH* were expressed and purified in heterologous system and their kinetic and biochemical parameters were determined. We also observed that parasites incubated with [<sup>14</sup>C(U)]-His produce radiolabeled CO<sub>2</sub>, demonstrating that the complete oxidation pathway of His is operative in *T. cruzi*. In addition, the characterization of His as an energy source for epimastigotes was performed by measuring parameters such as ATP production, mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and oxygen consumption. We also observed that parasites submitted to nutritional stress and then recovered with His, had their  $\Delta\Psi_m$  restored, promoted oxygen consumption and ATP synthesis by oxidative phosphorylation. When His metabolism of epimastigotes in exponential and stationary phase of growth were compared we observed that His is degraded more actively in exponential phase, according to the proposed role of His in *T. cruzi* bioenergetic. In contrast, His uptake was higher in stationary phase, and consequently intracellular levels of His and its first degradation intermediate urocanate, were also increased, suggesting a probable accumulation of these metabolites in that phase of growth. Furthermore, we observed that His can stimulate metacyclogenesis, in comparable levels to that obtained in standard differentiation media, TAU-3AAG. A metabolomic approach showed that His can be used by the parasite as energy source, particularly, in the early stages of differentiation. Our results show the relevance of this amino acid in *T. cruzi* bioenergetics, indicating the important role of His for the parasite, more specifically in the insect vector stages.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Histidine. Bioenergetics. Amino acids. Metabolomics.

## LISTA DE FIGURAS

|   |    |
|---|----|
| <b>Figura 1:</b> Representação esquemática do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i> .....                                | 27 |
| <b>Figura 2:</b> Via geral de degradação da His .....   | 38 |
| <b>Figura 3:</b> Esquema experimental utilizado para coleta de amostras a serem analisadas por metabolômica.....    | 57 |
| <b>Figura 4:</b> Curvas de crescimento de epimastigotas incubados em AR103 e AR103 <sup>His-</sup> .....            | 63 |
| <b>Figura 5:</b> Incorporação de His em função do tempo em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                   | 64 |
| <b>Figura 6:</b> Efeito da concentração de substrato no transporte de His em epimastigotes de <i>T. cruzi</i> ..... | 65 |
| <b>Figura 7:</b> Efeito de cátions extracelulares no transporte de His .....  | 66 |
| <b>Figura 8:</b> Determinação da força motriz para o transportador de His em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> ..... | 67 |
| <b>Figura 9:</b> Dependência da incorporação de His com a temperatura.....  | 68 |
| <b>Figura 10:</b> Avaliação da especificidade do transporte de His em <i>T. cruzi</i> .....                         | 69 |
| <b>Figura 11:</b> Alinhamento das sequências de aminoácidos das HAL e UH presentes em três tripanossomatídeos ..... | 71 |
| <b>Figura 12:</b> Alinhamento das sequencias de aminoácidos da TcHAL com alguns de seus ortólogos .....             | 74 |
| <b>Figura 13:</b> Clonagem de TcHAL e TcUH. ....  | 77 |
| <b>Figura 14:</b> Expressão da TcHALr (A) e TcUhr (B) em <i>E. coli</i> .....                                       | 78 |
| <b>Figura 15:</b> Purificação da TcHALr (A) e TcUhr (B).....  | 79 |
| <b>Figura 16:</b> Parâmetros cinéticos para a TcHAL. ....   | 80 |
| <b>Figura 17:</b> Parâmetros cinéticos para a TcUH.....   | 82 |
| <b>Figura 18:</b> Ensaios de <i>western blotting</i> para titulação de soros policlonais.....                       | 83 |
| <b>Figura 19:</b> Expressão das TcHAL e TcUH nas formas presentes no hospedeiro invertebrado .....                  | 84 |
| <b>Figura 20:</b> Imunofluorescencia indireta para TcHAL e TcUH nas formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> .....   | 85 |
| <b>Figura 21:</b> Avaliação da viabilidade de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de His.....              | 87 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>Figura 22:</b> Produção de $^{14}\text{CO}_2$ por epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados em [ $^{14}\text{C}$ ]-His 3 mM na presença de diferentes substratos oxidáveis. .... | 88  |
| <b>Figura 23:</b> Produção de ATP a partir do catabolismo de His em função do tempo .....  | 89  |
| <b>Figura 24:</b> Taxas de respiração em epimastigotas recuperados .....   | 90  |
| <b>Figura 25:</b> Recuperação do potencial de membrana mitocondrial pelo catabolismo de His ..   | 91  |
| <b>Figura 26:</b> Análise das atividades envolvidas no metabolismo de His .....  | 93  |
| <b>Figura 27:</b> Análise de componentes principais entre as fases exponencial e estacionária de crescimento .....   | 94  |
| <b>Figura 28:</b> <i>Heat map</i> dos metabólitos analisados entre as fases exponencial e estacionária ..  | 96  |
| <b>Figura 29:</b> Metabolismo energético entre as fases exponencial e estacionária .....   | 99  |
| <b>Figura 30:</b> Moléculas enxofradas e estado redox celular nas fases exponencial e estacionária. ....   | 101 |
| <b>Figura 31:</b> Diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos em meio definido. ....   | 102 |
| <b>Figura 32:</b> Análise de componentes principais entre amostras submetidas a estresse nutricional em TAU puro. ....   | 104 |
| <b>Figura 33:</b> <i>Heatmap</i> dos metabólitos analisados entre amostras submetidas a estresse nutricional em TAU puro .....   | 105 |
| <b>Figura 34:</b> Análise de componentes principais entre amostras obtidas na diferenciação em TAU-3AAG. ....  | 108 |
| <b>Figura 35:</b> <i>Heatmap</i> dos metabólitos analisados durante a diferenciação em TAU-3AAG .  | 109 |
| <b>Figura 36:</b> Níveis dos intermediários do metabolismo energético durante a metaciclogênese em meio TAU-3AAG .....   | 111 |
| <b>Figura 37:</b> Níveis dos intermediários da glicólise e TCA durante a metaciclogênese em meio TAU-His .....   | 113 |
| <b>Figura 38:</b> Níveis dos intermediários da glicólise e TCA durante a metaciclogênese em meio TAU-Pro .....   | 115 |
| <b>Figura 39:</b> Níveis dos intermediários da glicólise e TCA durante a metaciclogênese em meio TAU-His-Pro .....   | 116 |
| <b>Figura 40:</b> Análise de tióis de baixo peso molecular por HPLC .....  | 119 |
| <b>Figura 41:</b> Representação esquemática da utilização de His em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> ..  | 142 |

## LISTA DE TABELAS

|  |     |
|--|-----|
| <b>Tabela 1:</b> Composição do meio AR103 .....  | 42  |
| <b>Tabela 2:</b> Iniciadores utilizados nas reações de PCR .....   | 47  |
| <b>Tabela 3:</b> <i>Standards</i> internos utilizados para normalização .....  | 58  |
| <b>Tabela 4:</b> Porcentagens de identidade das HAL e UH encontradas em outros<br>tripanossomatídeos .....   | 71  |
| <b>Tabela 5:</b> Produção de $^{14}\text{CO}_2$ por epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados em [ $^{14}\text{C}$ ]-His .....  | 88  |
| <b>Tabela 6:</b> Lista de metabólitos utilizados para a análise metabolômica em <i>T. cruzi</i> .....  | 94  |
| <b>Tabela 7:</b> Metabólitos cujos níveis intracelulares aumentaram significativamente quando<br>epimastigotas em fase estacionária foram transferidos ao meio TAU ..... | 106 |
| <b>Tabela 8:</b> Metabólitos cujos níveis intracelulares diminuiram significativamente quando<br>epimastigotas em fase estacionária foram transferidos ao meio TAU ..... | 106 |
| <b>Tabela 9:</b> Atividades das enzimas relacionadas à síntese de cisteína (aminoácidos enxofrados)<br>e relacionadas à produção de NADPH .....                          | 118 |
| <b>Tabela 10:</b> Parâmetros cinéticos para transportadores de aminoácidos descritos em<br><i>T. cruzi</i> .....   | 126 |
| <b>Tabela 11:</b> Parâmetros cinéticos descritos para HALs em outros organismos.....   | 128 |
| <b>Tabela 12:</b> Parâmetros cinéticos descritos para UHs em outros organismos .....   | 129 |



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|                         |  |
|-------------------------|--|
| <b>Ad</b>               | Fração aderida   |
| <b>ADP</b>              | Adenosina difosfato  |
| <b>ATP</b>              | Adenosina trifosfato                                       |
| <b>BLAST</b>            | <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>                   |
| <b>BSA</b>              | Albumina Sérica Bovina                                     |
| <b>CEM</b>              | Coefficiente de Extinção Molar                             |
| <b>CHES</b>             | Ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfônico                   |
| <b>DCPIP</b>            | 2,6-diclorofenolindofenol                                  |
| <b>dNTP</b>             | Desoxirribonucleosídeo trifosfato                          |
| <b>DO</b>               | Densidade Ótica  |
| <b>DTNB</b>             | Dinitrofeniltiocianato                                     |
| <b>E-64</b>             | N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida    |
| <b>Ea</b>               | Energia de Ativação  |
| <b>EDTA</b>             | Ácido etilenodiaminotetracético                            |
| <b>ESI</b>              | Ionização por Electrospray                                 |
| <b>FCCP</b>             | Trifluorocarbonilcianeto de fenilhidrazona                 |
| <b>FITC</b>             | Isotiocianato de fluoresceína                              |
| <b>GAPDH</b>            | Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase                      |
| <b>Glc</b>              | Glicose  |
| <b>GSH</b>              | Glutathiona reduzida                                       |
| <b>HPLC</b>             | Cromatografia Líquida de Alta Performance                  |
| <b>IPA</b>              | 4-imidazolona-5-propionato                                 |
| <b>IPTG</b>             | Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosídeo               |
| <b>kDNA</b>             | DNA do cinetoplasto  |
| <b><math>K_m</math></b> | Constante de Michaelis – Menten                            |
| <b>LIT</b>              | <i>Liver Infusion Tryptose</i>                             |
| <b>MRC</b>              | Meio de Respiração Celular                                 |
| <b>MRM</b>              | Monitoramento Múltiplo de Reação                           |
| <b>MS</b>               | Espectrometria de Massas                                   |
| <b>MTT</b>              | 4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio                    |
| <b>NAD<sup>+</sup></b>  | Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada          |
| <b>NADH</b>             | Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida         |
| <b>NADP<sup>+</sup></b> | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada  |
| <b>NADPH</b>            | Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida |
| <b>Ni-NTA</b>           | Níquel-Nitrilotriacetato                                   |
| <b>Olig</b>             | Oligomicina  |

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| <b>P5C</b>                    | $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato                    |
| <b>P5CDH</b>                  | $\Delta$ 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase      |
| <b>PBS</b>                    | Tampão fosfato salino                                 |
| <b>PBS-BSA</b>                | Tampão fosfato salino + albumina sérica bovina        |
| <b>PBS-T</b>                  | Tampão fosfato salino + Tween 20                      |
| <b>PCA</b>                    | Análise de Componentes Principais                     |
| <b>PEP</b>                    | Fosfoenolpiruvato                                     |
| <b>PRODH</b>                  | Prolina desidrogenase                                 |
| <b>PSG</b>                    | Tampão fosfato salino + glicose 5,4%                  |
| <b>qsp</b>                    | quantidade suficiente para                            |
| <b>Rh123</b>                  | Rhodamina 123   |
| <b>SDS</b>                    | Dodecil sulfato de sódio                              |
| <b>SFB</b>                    | Soro Fetal Bovino                                     |
| <b>Sn</b>                     | Fração do sobrenadante                                |
| <b>TA</b>                     | Temperatura Ambiente                                  |
| <b>TAE</b>                    | Tampão Tris-Acetato-EDTA                              |
| <b>TAU</b>                    | <i>Triatomine Artificial Urine</i>                    |
| <b>TCA</b>                    | Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos                      |
| <b>TE</b>                     | Tampão Tris-EDTA                                      |
| <b>TEMED</b>                  | Tetra Metil Etileno Diamina                           |
| <b>THF</b>                    | Tetrahidrofolato                                      |
| <b>UPLC</b>                   | Cromatografia Líquida de Ultra Performance            |
| <b>X-gal</b>                  | 5-bromo-4-cloro-3-indolil $\beta$ -galactopiranosídeo |
| <b><math>\alpha</math>-KG</b> | alfa-cetogluturato                                    |

## SUMARIO

|  |    |
|--|----|
| <b>CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO</b> .....  | 24 |
| <i>1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas</i> .....   | 25 |
| <i>1.2 O Trypanosoma cruzi</i> .....   | 26 |
| <i>1.3 Metabolismo energético em T. cruzi</i> .....  | 28 |
| <i>1.3.1 Metabolismo intermediário em T. cruzi</i> .....   | 28 |
| <i>1.3.2 T. cruzi e os aminoácidos</i> .....   | 30 |
| <i>1.4 Fases do crescimento de formas epimastigotas: fase estacionária como pre-adaptação para a metaciclogênese</i> ..... | 31 |
| <i>1.4.1 Metabolismo energético</i> .....  | 32 |
| <i>1.4.2 Outras características especiais das fases exponencial e estacionária</i> .....                                   | 33 |
| <i>1.5 Metaciclogênese</i> .....   | 34 |
| <i>1.6 L-histidina: um aminoácido com uma diversidade de funções biológicas</i> .....                                      | 35 |
| <i>1.6.1 Participação da His em processos biológicos</i> .....   | 35 |
| <i>1.6.2 Metabolismo da His</i> .....  | 35 |
| <b>CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....   | 39 |
| <i>2.1 Microorganismos utilizados e condições de crescimento</i> .....   | 40 |
| <i>2.1.1 Trypanosoma cruzi</i> .....   | 40 |
| <i>2.1.1.1 Epimastigotas</i> .....   | 40 |
| <i>2.1.1.2 Tripomastigotas metacíclicos</i> .....  | 40 |
| <i>2.1.2 Escherichia coli</i> .....  | 41 |
| <i>2.2 Avaliação da essencialidade do aminoácido His para epimastigotas de T. cruzi</i> .....                              | 41 |
| <i>2.2.1 Curvas de crescimento</i> .....   | 41 |
| <i>2.2.2 Viabilidade</i> .....   | 43 |
| <i>2.3 Transporte de His em epimastigotas de T. cruzi</i> .....  | 44 |
| <i>2.3.1 Ensaio de transporte</i> .....  | 44 |
| <i>2.3.1.1 Ensaio de competição</i> .....  | 44 |
| <i>2.3.1.2 Efeito da depleção de His intracelular</i> .....  | 44 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.3.1.3 Dependência do transporte com íons extracelulares e energia .....  | 45        |
| 2.3.1.4 Incorporação de His a proteínas .....  | 45        |
| <b>2.4 Manipulação de DNA .....</b>  | <b>45</b> |
| 2.4.1 Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i> .....  | 45        |
| 2.4.2 Reações de amplificação de DNA por PCR .....   | 46        |
| 2.4.3 Eletroforese em gel de agarose .....   | 47        |
| 2.4.4 Clonagem em vetores tipo <i>T</i> : construções em pGEM <i>T</i> -Easy .....                                       | 47        |
| 2.4.5 Construções pET28a-TcHAL e pET24a-TcUH .....   | 47        |
| 2.4.6 Preparação de bactérias quimiocompetentes .....  | 48        |
| 2.4.7 Transformação de bactérias competentes .....   | 48        |
| 2.4.8 Sequenciamento de DNA .....  | 49        |
| <b>2.5 Manipulação de proteínas .....</b>  | <b>49</b> |
| 2.5.1 Expressão e purificação das TcHAL e TcUH recombinantes em <i>E. coli</i> .....                                     | 49        |
| 2.5.2 Determinação da atividade da TcHAL e TcUH .....  | 50        |
| 2.5.3 Separação de proteínas mediante eletroforese em géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) .....              | 51        |
| 2.5.4 Obtenção de soros policlonais anti-TcHAL e anti-TcUH .....   | 51        |
| 2.5.5 Western Blotting .....   | 52        |
| 2.5.6 Preparação de extratos protéicos a partir de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos de <i>T. cruzi</i> ..... | 52        |
| 2.5.7 Quantificação de proteínas .....   | 53        |
| 2.5.8 Imunofluorescência indireta .....  | 53        |
| <b>2.6 Avaliação do papel da His na bioenergética do <i>T. cruzi</i> .....</b>   | <b>54</b> |
| 2.6.1 Viabilidade .....  | 54        |
| 2.6.2 Captura de CO <sub>2</sub> emitido pela oxidação de His em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                  | 54        |
| 2.6.3 Síntese de ATP utilizando His como substrato .....   | 54        |
| 2.6.4 Consumo de oxigênio utilizando His como substrato .....  | 55        |
| 2.6.5 Medida do potencial de membrana interno mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....                                      | 55        |

|   |    |
|---|----|
| <b>2.7. Análise metabolômica</b> .....  | 56 |
| 2.7.1 Coleta de amostras e quenching do metabolismo .....   | 56 |
| 2.7.2 Extração dos metabólitos .....  | 57 |
| 2.7.3 Detecção dos metabólitos por cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massas ..... | 58 |
| 2.7.4 Análises estatísticas .....   | 59 |
| <b>2.8 Avaliação do papel da His na resistência à estresse oxidativo</b> .....                                | 59 |
| 2.8.1 Medida das atividades enzimáticas relacionadas a aminoácidos enxofrados e à produção de NADPH.....      | 59 |
| 2.8.2 Determinação do IC <sub>50</sub> para peróxido de hidrogênio em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....  | 59 |
| 2.8.3 Determinação de tióis de baixo peso molecular por HPLC.....   | 60 |
| <b>CAPITULO 3: RESULTADOS</b> .....   | 61 |
| <b>3.1 His: um aminoácido essencial para o <i>T. cruzi</i>?</b> .....   | 62 |
| 3.1.1 Crescimento e viabilidade de parasitas expostos a estresse nutricional pela carência de His.....        | 62 |
| <b>3.2 Caracterização bioquímica do transporte de His em epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b> .....           | 63 |
| 3.2.1 Cinética.....   | 63 |
| 3.2.2 Mecanismo .....   | 65 |
| 3.2.3 Termodinâmica .....   | 67 |
| 3.2.4 Transporte de His em tripomastigotas metacíclicos .....   | 68 |
| 3.2.5 Especificidade.....   | 68 |
| 3.2.6. Incorporação de His a proteínas.....   | 70 |
| <b>3.3 Identificação, clonagem e expressão das sequências codificantes para TcHAL e TcUH</b> .....            | 70 |
| 3.3.1 Análises <i>in silico</i> .....   | 70 |
| 3.3.2 Identificação e clonagem.....   | 76 |
| 3.3.3 Expressão e purificação das TcHAL e TcUH recombinantes .....  | 78 |
| <b>3.4 Caracterização cinética e bioquímica da TcHAL</b> .....  | 79 |
| <b>3.5 Caracterização cinética e bioquímica da TcUH</b> .....   | 80 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>3.6 Expressão e localização sub-celular das TcHAL e TcUH em epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b>   | 82  |
| 3.6.1 Obtenção de anticorpos específicos contra TcHAL e TcUH.....   | 82  |
| 3.6.2 Análise da expressão proteica da TcHAL e TcUH nas formas presentes no hospedeiro invertebrado .....                                     | 83  |
| 3.6.3 Localização subcelular da TcHAL e TcUH em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....  | 84  |
| <b>3.7 Avaliação da via His-Glu como fonte de energia para epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b>   | 85  |
| 3.7.1 Avaliação da capacidade da His para estender ou reestabelecer a viabilidade celular em parasitas submetidos a estresse metabólico ..... | 86  |
| 3.7.2 Medida da produção de CO <sub>2</sub> gerado pela oxidação da His.....  | 87  |
| 3.7.3 Produção de ATP a partir do catabolismo da His .....  | 88  |
| 3.7.4 Consumo de O <sub>2</sub> a partir da respiração mitocondrial em células íntegras.....  | 89  |
| 3.7.5 Restauração do potencial de membrana mitocondrial.....  | 91  |
| <b>3.8 Análise do metabolismo de His nas fases exponencial e estacionária de crescimento em formas epimastigotas</b>                          | 92  |
| 3.8.1 Análise das atividades envolvidas no metabolismo de His .....   | 92  |
| 3.8.2 Análise metabolômica nas fases exponencial e estacionária de crescimento.....   | 93  |
| 3.8.3 Análises iniciais.....  | 94  |
| 3.8.4 Metabolismo energético .....  | 97  |
| 3.8.5 Análise dos níveis intracelulares de moléculas enxofradas e estado redox da célula nas fases exponencial e estacionária .....           | 100 |
| <b>3.9 Papel da His na metaciclologênese</b>  | 101 |
| 3.9.1 Metaciclologênese em CL14.....  | 101 |
| 3.9.2 Efeito da His na diferenciação de <i>T. cruzi</i> em meio TAU .....   | 102 |
| 3.9.3 Análise metabolômica da metaciclologênese <i>in vitro</i> .....   | 103 |
| 3.9.3.1 Análise metabolômica entre a fase estacionária e TAU-puro: o passo inicial da metaciclologênese.....                                  | 103 |
| 3.9.3.2 Análise metabolômica na diferenciação em TAU-3AAG.....  | 107 |
| 3.9.3.3 Análise metabolômica da metaciclologênese dependente de His .....   | 112 |
| 3.9.3.4 Perfil do metabolismo energético em parasitas diferenciados em TAU-Pro e TAU-His-Pro.....   | 114 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>3.10 Papel da His na resistência à estresse oxidativo</b> .....  | 117 |
| 3.10.1 Análise dos níveis intracelulares de tióis de baixo peso molecular por HPLC .....                                      | 118 |
| <b>CAPITULO 4: DISCUSSÃO</b> .....  | 120 |
| <b>4.1 A utilização de His é conservada entre procariotas e eucariotas, com peculiaridades entre tripanossomatídeos</b> ..... | 121 |
| 4.1.1 <i>Trypanosoma grayi</i> .....  | 121 |
| 4.1.2 <i>Trypanosoma rangeli</i> .....  | 122 |
| <b>4.2 His, um aminoácido essencial capaz de ser incorporado pelo <i>T. cruzi</i></b> .....                                   | 123 |
| 4.2.1 His no meio extracelular é vital para o <i>T. cruzi</i> .....   | 124 |
| 4.2.2 His é incorporada através de um único sistema específico e dependente de ATP.....                                       | 125 |
| <b>4.3 As enzimas TcHAL e TcUH são funcionais e participam da degradação de His em epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b> ..... | 127 |
| 4.3.1 TcHAL.....  | 127 |
| 4.3.2 TcUH .....  | 128 |
| 4.3.3 TcHAL e TcUH são enzimas citoplasmáticas expressas nos estágios presentes no inseto vetor .....                         | 129 |
| <b>4.4 His como aminoácido chave na bioenergética de epimastigotas de <i>T. cruzi</i></b> .....                               | 130 |
| 4.4.1 Epimastigotas em fase exponencial de crescimento consomem Glc de forma preferencial.....                                | 130 |
| 4.4.2 Epimastigotas em fase estacionária consomem aminoácidos e se preparam para a metaciclologênese.....                     | 131 |
| 4.4.3 His é consumida em ambas as fases de crescimento, mas é acumulada na fase estacionária .....                            | 131 |
| 4.4.4 His é uma eficiente fonte de energia e carbono para epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....                              | 132 |
| <b>4.5 His é capaz de promover a metaciclologênese</b> .....  | 134 |
| 4.5.1 A incubação em meio TAU puro induz um estresse nutricional necessário para iniciar a diferenciação .....                | 135 |
| 4.5.2 Metabolismo energético durante a diferenciação em TAU-3AAG.....   | 136 |
| 4.5.3 Metabolismo energético durante a diferenciação em TAU-His.....  | 136 |
| 4.5.4 Metabolismo energético durante a diferenciação em TAU-Pro e TAU-HP .....  | 137 |

|  |     |
|--|-----|
| <i>4.6 His e os mecanismos de resistência a estresse oxidativo</i> ..... | 139 |
| <b>5 CONCLUSÕES</b> .....  | 141 |
| <b>REFERÊNCIAS</b> .....   | 143 |



## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

---

### ***1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas***

A doença de Chagas, classificada como negligenciada, é a terceira doença parasitária no mundo, seguida da malária e esquistossomose, com maiores índices de morte, onde estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas e que haja aproximadamente 100000 a 14000 mortes por ano (World Health Organization, 2015). A doença é endêmica em 21 países do continente americano, incluindo o sul dos Estados Unidos (Buhaya et al., 2015). Devido à migração de pessoas da zona rural para as cidades, somada ao intenso fluxo de imigrantes das áreas endêmicas para áreas não endêmicas como Europa, Estados Unidos e Canadá, tornou-se uma doença presente em diversos países não endêmicos (Rassi et al., 2012).

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemático antigamente localizado na ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Na taxonomia sugerida para organismos protozoários proposto por Adl e colaboradores, o *T. cruzi* é incluído dentro do super-grupo Excavata (antigamente reino Protista) e dentro desse grupo é classificado, seguindo a ordem hierárquica, como Euglenozoa, Kinetoplastea, Metakinoplastina e Trypanosomatidae (Adl et al., 2005). *T. cruzi* é transmitido entre mamíferos principalmente por insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. As espécies de triatomíneos de maior importância epidemiológica são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Barrett et al., 2003).

A doença de Chagas pode ser transmitida através de diferentes vias, as quais são enumeradas em ordem decrescente de relevância epidemiológica: a transmissão vetorial, através da contaminação com tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes depositadas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo; por transfusão sanguínea e transplante de órgãos provenientes de pacientes infectados; por transmissão vertical, de mãe para filho; e por acidentes de laboratório através de manipulações nas quais formas infetivas de *T. cruzi* são utilizadas. A transmissão por via oral, pela ingestão de alimentos contaminados foi também demonstrada e é considerada epidemiologicamente relevante (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015).

*T. cruzi* quando infecta o ser humano induz o desenvolvimento de uma fase aguda da doença seguida de uma longa fase crônica. Inicialmente a fase aguda, com duração de 4 a 8 semanas, caracteriza-se por alta parasitemia e presença de parasitas em praticamente todos os tecidos. Porém a ausência de sintomas específicos faz com que a doença seja dificilmente diagnosticada em pacientes agudos (Rassi, 2012). Já a fase crônica, caracteriza-se por uma

reduzida ou muitas vezes indetectável parasitemia. Essa fase pode manifestar-se de forma indeterminada (assintomática) ou sintomática. Neste último caso, a sintomatologia pode estar relacionada com o desenvolvimento de cardiopatias, alterações gastrointestinais com diferentes graus de severidade, ou ambas, podendo levar a óbito (Gattuso et al., 1993; Moncayo et al., 2006; Punukollu et al., 2007)

As duas drogas atualmente disponíveis para o tratamento da doença são o Nifurtimox [3-metil-4(5'-nitrofurfurilideneamina) tetraidro-4H-tiazina-1,1-dioxida] e o Benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) o qual é fabricado no Brasil por um laboratório federal e disponibilizado pelo governo para o tratamento de pacientes chagásicos. Essas drogas surgiram na década de 1970 e são utilizadas apesar dos efeitos colaterais e de toxicidade descritos. Ambas são efetivas na fase aguda da doença, porém, a eficiência na fase crônica é controversa (Duschak et al., 2007; Silber et al., 2005a).

A complexidade do ciclo de vida do *T. cruzi*, o qual envolve diferentes estágios do parasita e mudanças bioquímicas associadas às interações entre o parasita e o hospedeiro, dificultam o desenvolvimento de novos fármacos (De Souza, 2002). Nesse contexto, evidencia-se a necessidade do estudo da biologia do parasita e validação de novos alvos terapêuticos visando o desenvolvimento de drogas eficazes para o tratamento da doença.

## **1.2 O *Trypanosoma cruzi***

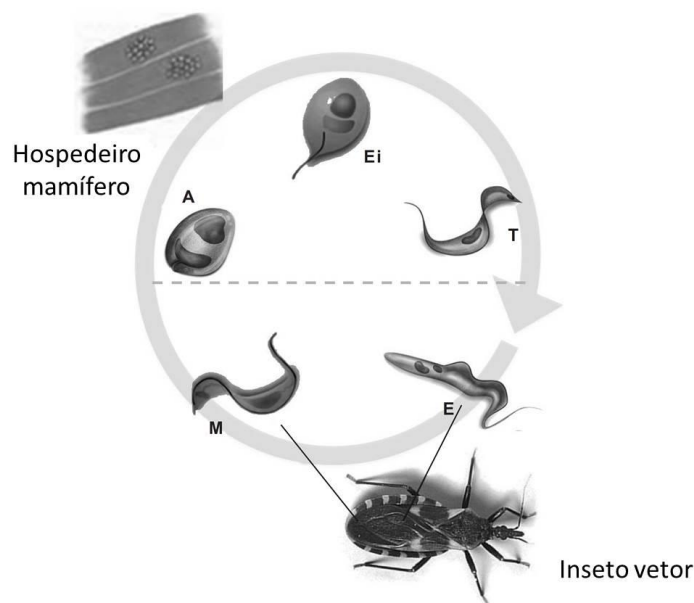
O *T. cruzi* possui um ciclo de vida digenético, alternando entre um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado mamífero entre os quais se encontra o homem.

Quatro estágios de desenvolvimento são descritos em *T. cruzi*: amastigota intracelular (forma replicativa e não infectante) e tripomastigota sanguíneo (forma infectante e não replicativa) no hospedeiro vertebrado; e epimastigota (forma replicativa e não infectante) e tripomastigota metacíclico (forma infectante e não replicativa) no hospedeiro invertebrado (Brenner, 1973). Mais recentemente, uma forma intermediária entre os estágios de amastigota e tripomastigota foi descrita, e devido às semelhanças morfológicas e bioquímicas (com a forma epimastigota) foi denominada epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria et al., 1999; Elias et al., 2007; Tyler et al., 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* pode se iniciar quando as formas tripomastigotas metacíclicos presentes na porção final do intestino do inseto vetor são depositadas pelas fezes e urina durante o repasto sanguíneo realizado pelo triatomíneo (Fig. 1). Essas formas penetram pelas mucosas, descontinuidades da pele ou pela via oral, atingindo diferentes tipos celulares,

principalmente macrófagos (Barrett, 2003; Brener, 1971; Coura, 2006; de Araujo-Jorge, 1989). O parasita invade as células do hospedeiro mamífero através de um vacúolo parasitóforo a partir do qual escapa alcançando o citoplasma e diferenciando à forma amastigota, passando pelo estágio transiente denominado epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria, 1999; Schenkman et al., 1988). Após vários ciclos de divisões binárias, as formas amastigotas diferenciam-se nas formas infetivas tripomastigotas, as quais são liberadas ao meio extracelular, podendo atingir a corrente sanguínea, invadindo outras células ou sendo ingeridas pelo inseto vetor em um novo repasto sanguíneo.

Após o repasto sanguíneo, a maior parte dos tripomastigotas sanguíneos ingeridos diferenciam-se em epimastigotas no estômago do inseto vetor. Após a passagem para o intestino médio os epimastigotas se dividem repetidamente. Posteriormente, já na porção final do intestino do inseto, os parasitas se aderem às células epiteliais do reto iniciando o processo de metaciclogênese pelo qual se diferenciam às formas infectantes tripomastigotas metacíclicos (Kollien et al., 2000). Estas formas podem ser depositadas novamente pelo inseto vetor em um novo repasto sanguíneo, completando assim o ciclo.



**Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*.** Formas presentes no hospedeiro mamífero: A, amastigota; Ei, epimastigota intracelular; T, tripomastigota sanguínea. Formas presentes no hospedeiro invertebrado: E, epimastigotas; M, tripomastigota metacíclico. Adaptada de (Silva Paes et al., 2011).

*T. cruzi* apresenta diversas peculiaridades com relação a outros eucariotas: esses parasitas possuem organelas especializadas denominadas glicossomos, os quais são peroxissomos modificados onde acontece a maior parte da glicólise, assim como a via das pentoses fosfato (Oppenheimer, 1987). Outra organela própria de tripanossomatídeos é o reservossomo,

estruturas endocíticas que armazenam proteínas e lipídeos, assim como atividades de hidrolases, para serem usadas em condições de estresse. Os reservossomos se localizam na parte posterior do parasita e possuem morfologia e tamanho variado de acordo com as condições nutricionais (Sant'Anna et al., 2008). Outra organela especializada inicialmente descoberta em tripanossomatídeos e depois descrita em uma variedade de outros organismos são os acidocalcissomos, organelas ácidas com alta concentração de fósforo (pirofosfato e polifosfato) complexado com  $\text{Ca}^{2+}$  e outros íons (Docampo et al., 1995; Docampo et al., 2010).

*T. cruzi* e todos os flagelados do grupo Kinetopastea possuem uma única mitocôndria que se estende ao longo do corpo do parasita, apresentando ramificações que se estendem sob os microtubulos subpeliculares. Essa mitocôndria possui as estruturas e compartimentos típicos dessa organela: membrana externa, espaço intermembrana, membrana interna com as clássicas estruturas denominadas cristas, e a matriz mitocondrial. Dependendo das condições nutricionais, a mitocôndria pode ocupar uma porção variável do volume celular total (de Souza et al., 2009). O DNA mitocondrial se localiza em uma porção determinada da organela, dentro da matriz mitocondrial, próxima ao corpo basal e perpendicular ao eixo do flagelo, formando uma estrutura incomum denominada cinetoplasto (kDNA). Com relação aos componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, dados do genoma e experimentais mostraram a presença e funcionalidade dos complexos II e V, enquanto que o complexo I parece ter uma funcionalidade limitada devido à ausência de algumas subunidades (Carranza et al., 2009; Opperdoes et al., 2008). Análises proteômicas em *T. cruzi* mostraram a presença de várias subunidades do complexo IV, proteína Rieske Fe-S, NADH desidrogenase, subunidades alfa da ATP sintase, entre outros (Ferella et al., 2008). Antimicina e KCN inibem a transferência de elétrons desde o succinato, sugerindo que os complexos III e IV são funcionais em *T. cruzi*. Além disso, os citocromos *aa3*, *b* e *c558* foram identificados no parasita, sugerindo-se ao citocromo *aa3* como a principal oxidase terminal do *T. cruzi* (Affranchino et al., 1986; Stoppani et al., 1980).

### ***1.3 Metabolismo energético em T. cruzi***

#### ***1.3.1 Metabolismo intermediário em T. cruzi***

O *T. cruzi* não possui reserva intracelular de carboidratos, como o glicogênio. Assim, a glicose (Glc) necessita ser obtida do ambiente (por exemplo, do sangue de mamíferos) por

meio de um sistema de transporte para depois ser catabolizada e produzir metabólitos reduzidos, principalmente succinato e L-alanina (Cazzulo, 1994a). A glicólise em *T. cruzi* apresenta características diferenciadas em relação a outros eucariotas. Nesses parasitas a glicólise não apresenta as formas de regulação clássicas, como a regulação alostérica da hexoquinase e a fosfofructoquinase (Cazzulo, 1992). Contudo, *T. cruzi* apresenta uma glicólise compartimentalizada nos glicossomos, que contém as primeiras sete enzimas da via glicolítica (Heise et al., 1999; Oppendoes, 1987). Alguns autores propõem que a compartimentação da glicólise e a falta de regulação clássica são fenômenos relacionados, e que poderiam dever-se ao fato de que o fluxo glicolítico poderia estar controlado simplesmente pela incorporação de Glc ao glicossomo e ao balanço ADP/ATP dentro do mesmo (Bakker et al., 2000).

Em muitos organismos, a transição da anaerobiose para a aerobiose é acompanhada por uma rápida diminuição na taxa de utilização de Glc. Essa inibição do fluxo glicolítico pela presença do oxigênio é conhecida como “Efeito Pasteur”. No entanto, em *T. cruzi* não se verifica a ocorrência do “Efeito Pasteur”, ou seja, ocorrem taxas parecidas do consumo de Glc tanto em anaerobiose quanto em condições aeróbicas, o que é característico de um metabolismo do tipo fermentativo. Devido a esse fato, os termos “fermentação aeróbica” ou “fermentação succínica” da Glc foi proposto para descrever o processo de oxidação da Glc (Cazzulo, 1992; 1994a). Nessas condições, a Glc é degradada de forma incompleta, resultando uma mistura final de CO<sub>2</sub>, ácidos mono e dicarboxílicos, dos quais o succinato representa cerca de 70%, e pequenas quantidades de acetato e piruvato.

Dentro do glicossomo, uma molécula de Glc é convertida em duas moléculas de gliceraldeído 1,3-bifosfato, que são translocadas ao citosol e convertidas a fosfoenolpiruvato (PEP). O PEP pode ter diferentes destinos: i. pode ser convertido a piruvato pela enzima citosólica piruvato quinase ou ii. pode voltar ao glicossomo, onde é carboxilado para formar oxaloacetato pela enzima PEP carboxiquinase (PEPCK) gerando ATP, e posteriormente reduzido a malato pela malato desidrogenase re-oxidando o NADH gerado pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Assim, é reestabelecido o balanço redox e energético dentro do glicossomo. O malato gerado dentro do glicossomo pode ser translocado ao citosol, onde pode ser convertido a piruvato pela enzima málica II, gerando NADPH necessário para processos biossintéticos no citosol. Por outro lado, o malato pode ingressar à mitocôndria, onde pode ter dois destinos diferentes: em condições anaeróbicas, onde o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) pode estar funcionando de maneira mais lenta, o malato é convertido em fumarato e posteriormente em succinato pela fumarato reductase, reoxidando uma molécula

de NADH. Em condições aeróbicas, com o TCA funcionando ativamente, o malato pode ser convertido a piruvato pela enzima málica I, o qual é oxidado a acetil-CoA entrando assim no TCA. Dessa forma, o malato poderia ter um papel fundamental no processo da fermentação aeróbica, assim como a enzima málica poderia ser considerada importante na regulação da via (Boveris et al., 1986; Bringaud et al., 2006; Cannata et al., 1984; Cannata et al., 1979).

### 1.3.2 *T. cruzi* e os aminoácidos

Os tripanossomatídeos são capazes de catabolizar além de Glc, aminoácidos, com produção de amônio [revisado em (Silber et al., 2005c)]. Dentre os aminoácidos, tem sido demonstrado que prolina (Pro), aspartato (Asp) e glutamato (Glu) são metabolizados pelo *T. cruzi* (Sylvester et al., 1976b). Além disso, asparagina (Asn), glutamina (Gln), leucina (Leu) e isoleucina (Ile) participam do metabolismo energético (Mancilla et al., 1967; Zeledon, 1960b). O metabolismo da Pro vem sendo estudado em mais detalhe pelo nosso grupo. Sabe-se que a Pro é degradada em dois passos enzimáticos a Glu: primeiro, a Pro desidrogenase (*Tc*PROD<sub>H</sub>) oxida a Pro em  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) que posteriormente é convertido em Glu pela *Tc*P5CDH na presença de NAD(P)<sup>+</sup>. Foi descrito que a oxidação de Pro acontece na mitocôndria, estimulando a respiração celular e levando à síntese de ATP através do processo de fosforilação oxidativa (Mantilla et al., 2015; Paes et al., 2013).

Acredita-se que os aminoácidos utilizados pelo *T. cruzi* são convertidos em Asp ou Glu, os quais podem ser transportados desde o citoplasma para a mitocôndria e incorporados ao TCA (Silber et al., 2005b). O grupo amino do Glu pode ser transferido a piruvato pela alanina aminotransferase (ALAT) ou pela tirosina aminotransferase, rendendo como produtos alanina e  $\alpha$ -cetoglutarato ( $\alpha$ -KG) (Nowicki et al., 2007; Zelada et al., 1996). Além disso, o grupo amino do Glu pode também ser convertido a  $\alpha$ -KG ou transferido para água (formação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) através de alguma das isoformas da Glu desidrogenase, (Cazzulo et al., 1977; Juan et al., 1978; 1979). O Asp também está envolvido no fornecimento de intermediários do TCA pela Asp aminotransferase, que transfere o grupo -NH<sub>2</sub> do Asp para o  $\alpha$ -KG, rendendo oxalacetato e Glu, que ingressa ao TCA pela via já descrita (Cazzulo, 1977).

Existe uma ampla evidência sobre o rol que diferentes aminoácidos possuem na biologia do *T. cruzi*, além do seu papel na síntese protéica e no metabolismo energético. Pereira e colaboradores envolveram a arginina na administração dos recursos energéticos da célula em *T. cruzi* e *T. brucei* através de uma arginina quinase, enzima de função análoga à creatina quinase dos mamíferos (Pereira et al., 2000; Pereira et al., 2002c). Esses autores, em

colaboração com nosso grupo de trabalho, mostraram também que essa atividade está envolvida no crescimento e em mecanismos de resistência a estresses (Pereira et al., 2002a; Pereira et al., 2003). Mais recentemente foi proposta também a participação de vários aminoácidos, dentre eles Glu, glicina, Pro e alanina, na regulação do volume celular, como parte de um mecanismo de resistência a estresse osmótico (Rohloff et al., 2008).

Com relação ao papel da Pro em diferentes processos biológicos do *T. cruzi*, sabe-se que esse aminoácido, ou os intermediários do seu metabolismo, induzem a metaciclogênese (Contreras et al., 1985c). Além disso, foi proposto que Leu e Ile, inibidores do catabolismo da Pro, são capazes de inibir a metaciclogênese (Contreras et al., 1985b; Homsy et al., 1989a). Também foi demonstrada a participação da Pro na diferenciação das formas intracelulares (Tonelli et al., 2004a). Mais recentemente, foi mostrado que a Pro é o sustento energético na invasão das células no hospedeiro vertebrado (Martins et al., 2009). Demonstrou-se nesse trabalho que em condições de depleção nutricional o parasita diminui consideravelmente os níveis intracelulares de ATP, assim como a sua capacidade para infectar células de mamífero, condição que é revertida após a adição de Pro ao meio. Nosso laboratório tem envolvido também a Pro na resistência a diferentes tipos de estresse, em particular estresse oxidativo (Magdaleno et al., 2009; Paes, 2013). Recentemente, foi descrito que parasitas superexpressando um transportador para Pro possuem uma maior concentração intracelular deste aminoácido, assim como uma resistência aumentada a espécies reativas de oxigênio tais como peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, assim como a drogas tripanocidas (Saye et al., 2014).

#### ***1.4 Fases do crescimento de formas epimastigotas: fase estacionária como pre-adaptação para a metaciclogênese***

As formas epimastigotas, não infectantes e replicativas presentes no intestino do inseto vetor, são facilmente cultivadas axênicamente *in vitro*. Em uma curva de crescimento típica deste estágio de *T. cruzi* podem ser identificadas duas fases principais no crescimento: a fase exponencial, onde o parasita se replica ativamente e a duplicação das células é proporcional ao tempo. Esta fase é caracterizada por uma densidade celular entre 4,5 e 6,5 x 10<sup>7</sup> células por ml. Na medida em que a cultura prolifera e aumenta sua densidade, os nutrientes e as moléculas relevantes para o crescimento presentes no meio começam a ser mais escassos e o parasita entra em uma fase onde cessa a proliferação, denominada fase estacionária do crescimento. Em geral, consideramos que uma cultura de epimastigotas atingiu a fase



estacionária quando a mesma possui uma densidade celular em torno de  $8-10,5 \times 10^7$  cél/ml. Como observado por Camargo e colaboradores (Camargo, 1964), culturas de epimastigotas em fase estacionária podem dar origem a tripomastigotas metacíclicos, o seguinte estágio no ciclo biológico do *T. cruzi*. Na natureza, o estado que mencionamos como fase estacionária nas culturas *in vitro* pode se corresponder com aqueles parasitas presentes no intestino do inseto vetor, aonde a disponibilidade de nutrientes diminui na medida em que os epimastigotas transitam até atingir o ponto onde a diferenciação às formas metacíclicas acontece. Vários trabalhos foram publicados descrevendo as características bioquímicas e morfológicas presentes na fase estacionária de crescimento em epimastigotas. Em seguida serão brevemente comentadas ditas características:

#### 1.4.1 Metabolismo energético

Como já mencionado anteriormente, *T. cruzi* é capaz de metabolizar tanto Glc quanto aminoácidos como fonte de energia. Foi descrito que durante a fase exponencial do crescimento, o parasita consome preferencialmente Glc, que é rapidamente consumida quando disponível no meio (Cannata, 1984). A glicólise acontece seguida da fermentação aeróbica onde os principais produtos são metabólitos reduzidos, como succinato e alanina (Brand, 1979). No início da fase estacionária, quando a Glc começa a ser escassa, há uma ativação de enzimas mitocondriais, observada pelo aumento de citocromos em culturas envelhecidas. Essas condições são necessárias para iniciar a oxidação de aminoácidos. O aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$  observado nesse momento do crescimento é consistente com uma degradação ativa de aminoácidos (Cazzulo et al., 1985; Engel et al., 1987). Além disso, foi relatada uma alta taxa de degradação proteolítica na fase estacionária (Henriquez et al., 1993), possivelmente para prover com aminoácidos à célula. De forma interessante, foi relatado que durante a diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos, *T. cruzi* é capaz de degradar proteínas e lipídeos armazenados nos reservossomos, os quais o parasita utilizaria como fonte de energia. Assim, os reservossomos sofrem mudanças morfológicas ao longo da diferenciação, sendo quase imperceptíveis nas formas metacíclicas (Soares et al., 1989). Em relação ao metabolismo de tripomastigotas metacíclicos, foi relatado que essas formas usam principalmente aminoácidos como fontes de energia (Urbina, 1989). Considerando o exposto até aqui, pode-se considerar que o metabolismo na fase estacionária seria uma forma pre-adaptativa para os processos que aconteceram posteriormente durante a metaciclogênese. (Hernandez et al., 2012).

#### *1.4.2 Outras características especiais das fases exponencial e estacionária*

Diversos trabalhos mostraram que as diferenças entre epimastigotas em fase exponencial e estacionária de crescimento não são apenas metabólicas: epimastigotas em fase estacionária apresentam uma morfologia mais alongada, tanto do corpo celular como do flagelo (Tyler et al., 2000). Outra característica interessante observada em parasitas em fase estacionária está relacionada ao seu núcleo: em tripomastigotas metacíclicos, o núcleo se apresenta como uma organela alongada com um conteúdo alto e disperso de heterocromatina, e não apresenta nucléolo (Elias et al., 2001). Em contraste, as formas epimastigotas crescendo ativamente em fase exponencial apresentam um nucléolo granular bem definido. Quando são observados núcleos de parasitas em fase estacionária, são observadas características intermediárias entre aquelas vistas em tripomastigotas metacíclicos e em epimastigotas de fase exponencial: na fase estacionária, os epimastigotas apresentam nucléolo, mas com uma estrutura reduzida e heterocromatina mais dispersa (Nepomuceno-Mejia et al., 2010). Em relação à mitocôndria, foi descrito por Tyler e colaboradores que parasitas em fase estacionária de crescimento apresentam mitocôndrias de tamanho e complexidade maiores, apresentando uma ativação de enzimas mitocondriais e respiração dependente de citocromos (Cazzulo, 1985; Tyler, 2000). Processos como transcrição e tradução de proteínas, os quais demandam energia para o parasita, são regulados entre as fases exponencial e estacionária de crescimento. Quando comparadas as taxas de transcrição, parasitas crescendo ativamente em fase exponencial apresentam entre 6 e 10 vezes mais transcrição que parasitas em fase estacionária (Nepomuceno-Mejia, 2010). Em relação à tradução de proteínas, foi mostrado que há uma redução da mesma quando os parasitas enfrentam condições de estresse, e que a fosforilação do fator de início da tradução eIF2 $\alpha$ , o qual causa uma inibição da síntese de proteínas, é necessária para a metaciclogênese acontecer (Tonelli et al., 2011).

Vários dos processos descritos na fase estacionária descritos aqui podem ser revertidos quando o parasita é incubado novamente em meio fresco, indicando um reinício no ciclo celular. Assim, como dito anteriormente, a fase estacionária pode ser considerada como uma fase pre-adaptativa para as etapas seguintes no ciclo de vida do parasita, onde mudanças bioquímicas e estruturais acontecem, mas de forma transitória caso o parasita encontre condições favoráveis (Hernandez, 2012).

### 1.5 Metacicloênese

Como descrito anteriormente, a transformação de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas, formas infectivas de *T. cruzi*, é denominada metacicloênese. Este processo acontece na porção final do intestino do inseto vetor e é de relevante importância para o ciclo de vida do parasita. Vários fatores estão envolvidos na indução da metacicloênese. Foi observado que o empobrecimento do meio estimula a diferenciação (Contreras, 1985c; Sullivan, 1982) e que a adesão das formas epimastigotas ao epitélio no reto do inseto vetor é uma condição necessária mas não suficiente para iniciar a metacicloênese (Boker et al., 1984; Zeledon et al., 1984). De fato foi observado que a adesão de epimastigotas *in vitro* é estimulada sob estresse nutricional (Bonaldo et al., 1988; Contreras, 1985c; Figueiredo et al., 2000). Como parte de um mecanismo de sinalização, foi descrito que um incremento no nível intracelular de cAMP é acompanhado de um incremento na diferenciação a formas metacíclicas, e que uma quinase A (PKA) estaria envolvida nesse mecanismo (Gonzales-Perdomo et al., 1988; Rangel-Aldao et al., 1988). Em relação aos requerimentos para a metacicloênese *in vitro*, Contreras e colaboradores mostraram que *T. cruzi*, cepa Dm28, é capaz de diferenciar quando cultivada *in vitro*, utilizando um meio definido que denominaram TAU (*Triatomine Artificial Urine*), suplementado com Pro (Contreras, 1985c), um aminoácido também encontrado nos fluidos do inseto vetor (Engel, 1987). Os autores sugerem que dito aminoácido poderia agir como um disparador do processo de diferenciação, ou talvez como fonte de energia quando, em condições de estresse fisiológico, o parasita deve iniciar o processo de diferenciação a formas metacíclicas (Contreras, 1985c; Homsy et al., 1989b). Por outro lado, Homsy e colaboradores, mostraram que Glu também estimula a metacicloênese, enquanto que aminoácidos como Leu e Ile inibem a diferenciação induzida pela Pro. Interessantemente, esses dois aminoácidos foram relatados como inibidores da P5C desidrogenase, uma das enzimas do metabolismo de Pro (Lundgren et al., 1973). Além disso, os mesmos autores observaram que a Glc estimula em uma proporção muito menor a metacicloênese, sugerindo que a Pro poderia ter um papel alternativo no processo de diferenciação. Após os relatos descritos, estudos envolvendo diferenciação de *T. cruzi* em meios definidos, utilizam como padrão para diferenciação o meio TAU 3AAG, contendo os aminoácidos Asp, Glu e Pro, além de Glc.

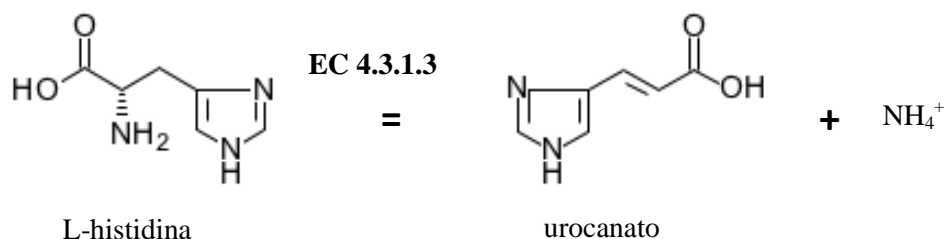
## 1.6 L-histidina: um aminoácido com uma diversidade de funções biológicas

### 1.6.1 Participação da His em processos biológicos

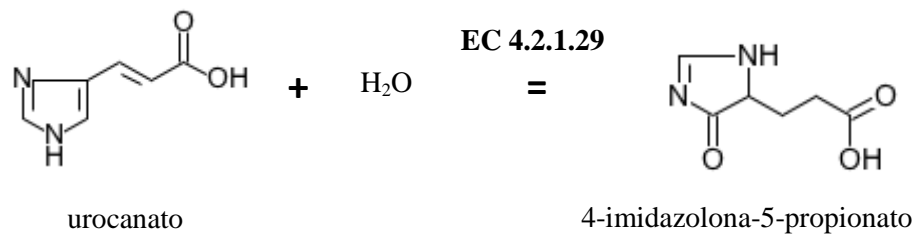
Distintos trabalhos demonstraram que a L-histidina (His) possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias em diferentes organismos. Demonstrou-se que a His, assim como pequenos peptídeos que a contém, funcionam como “sequestradores” tanto do radical hidroxila quanto de espécies não radicais tóxicas, tais como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), um importante fator que participa em muitos processos oxidativos deletérios. A His parece interagir quimicamente com essas espécies do oxigênio através de pelo menos dois mecanismos: (1) interferindo com reações redox que envolvem íons metálicos, e produzem o radical hidroxila e (2) por interações diretas do anel imidazólico da His com o oxigênio singlete (Wade et al., 1998). A His participa também da formação do ovotiol A (*N*<sup>1</sup>-metil-4-mercaptopistidina). Os ovotióis possuem propriedades antioxidantes: podem agir como “sequestradores” de radicais livres e como “sequestradores” não enzimáticos do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formando água e ovotiol-disulfeto (OS-SO). Em um estudo onde foi avaliada a proporção de ovotiol A com relação ao conteúdo total de tióis em distintos tripanosomatídeos, observou-se que essa espécie química representaria apenas um 7% em epimastigotas de *T. cruzi* cultivados na presença de putrescina. Porém, representa cerca de 28% dos tióis totais em tripomastigotas sanguíneos (Ariyanayagam et al., 2001).

### 1.6.2 Metabolismo da His

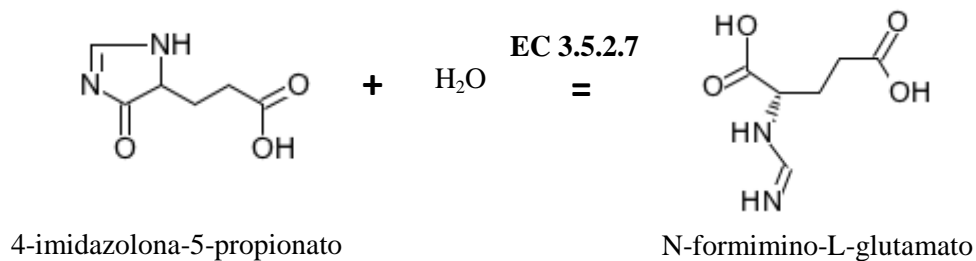
É interessante o fato de que apesar de bem conhecidas as diferentes propriedades biológicas da His, não tenha sido estudado seu metabolismo ainda em tripanossomatídeos. A via geral da degradação da His envolve vários passos que conduzem ao Glu. As primeiras três reações são semelhantes na maioria das espécies. Em primeiro lugar produz-se a eliminação do grupo  $\alpha$ -amino da His pela Histidina Amonio Liase (HAL, EC 4.3.1.3), rendendo como produtos urocanato e amônio:



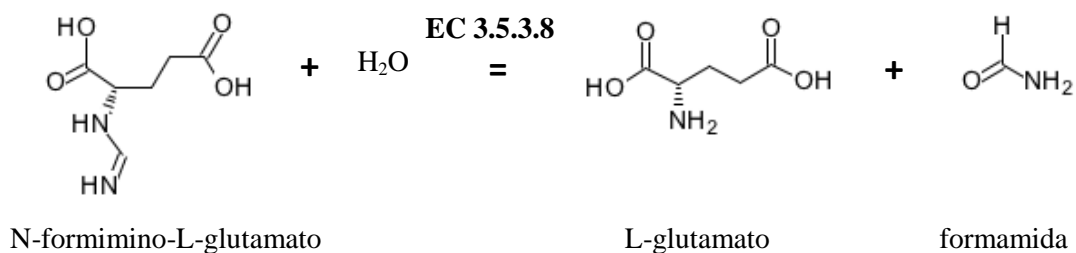
Essa enzima é membro da família das liases de aminoácidos aromáticos. Primeiro identificado em *Pseudomonas putida*, o cofator utilizado pelas HALs é o 3,5-diidro-5-metilidene-4H-imidazol-4-one (MIO) o qual é gerado pós-traducionalmente pela ciclação de uma tríade de resíduos Ala-Ser-Gly presentes na sequência primária (Louie et al., 2006; Schwede et al., 1999). O urocanato é posteriormente convertido em 4-imidazolona-5-propionato através da enzima Urocanato Hidratase (UH, EC 4.2.1.49). Essa classe de enzimas possui uma molécula de  $\text{NAD}^+$  unido a sua estrutura, que atua como grupo electrófilo na catálise enzimática (Retey, 1994):



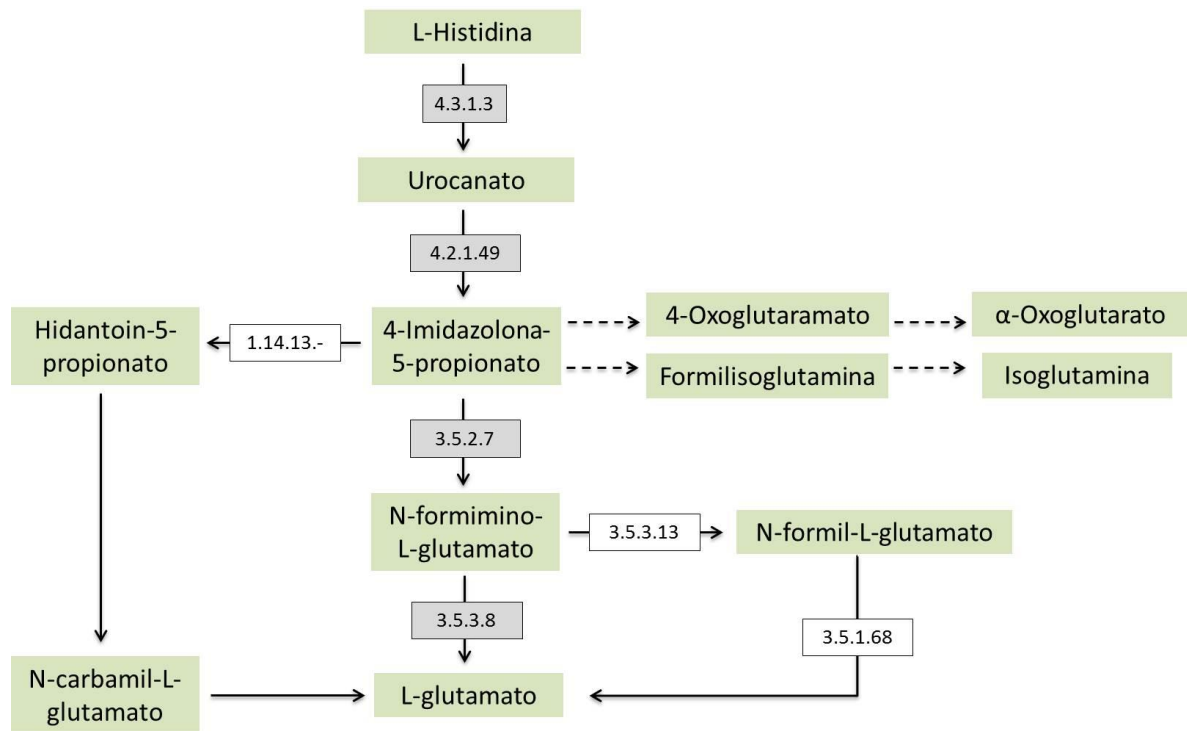
O enlace amida no anel desse intermediário é hidrolisado pela atividade Imidazolona-propionase (EC 3.5.2.7) gerando os produtos:



O grupo formimino pode ser transferido ao tetraidrofolato para formar Glu e  $\text{N}^5$ -formimino-THF através da Glu-formimidoil transferase (EC 2.1.2.5), ou pode ser hidrolisado diretamente para gerar formamida e L-Glu pela enzima formimidoil-glutamase (EC 3.5.3.8) (Magasanik et al., 1955):







**Figura 2: Via geral de degradação da His.** Em *T. cruzi*, a via de degradação parece ocorrer de forma linear, gerando como produtos Glu e formamida. As enzimas indicadas com quadros cinzas correspondem às identificadas no genoma de *T. cruzi*. EC 4.3.1.3: histidina amônia-liase, EC 4.2.1.49: urocanato hidratase, EC 3.5.2.7 imidazolona propionase, EC 3.5.3.8: formimino-glutamase, EC 3.5.3.13: formimidoilglutamato deiminase, EC 3.5.1.68: N-formilglutamato deformilase. As setas pontilhadas indicam reações não enzimáticas.

## **CAPÍTULO 2: MATERIAIS E MÉTODOS**

---



## **2.1 Microorganismos utilizados e condições de crescimento**

### **2.1.1 *Trypanosoma cruzi***

#### **2.1.1.1 Epimastigotas**

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

#### **2.1.1.2 Tripomastigotas metacíclicas**

Duas metodologias foram utilizadas para a diferenciação a formas tripomastigotas metacíclicas: diferenciação em meio Grace ou em meio TAU (Contreras, 1985c). Inicialmente, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento ( $5 \times 10^7$  p/ml) foram transferidas a meio LIT na concentração de  $0,5 \times 10^7$  p/ml. Após quatro dias de crescimento, quando atingiram a fase estacionária, as células foram lavadas e transferidas do meio LIT para um dos meios utilizados:

- Meio Grace (Gibco<sup>®</sup>, Waltham, MA, EUA), onde foram incubadas na concentração de  $5 \times 10^6$  p/ml por nove dias a 28 °C.
- Meio TAU puro (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 8 mM tampão fosfato pH 6) na concentração de  $5 \times 10^7$  p/ml. Foram incubadas nesse meio por duas horas a 28 °C, e após esse tempo, transferidas ao meio TAU-3AAG (TAU puro suplementado com 10 mM glicose, 2 mM ácido aspártico, 50 mM ácido glutâmico, 10 mM prolina), TAU-Pro (TAU puro suplementado com 10 mM prolina), TAU-His (suplementado com 10 mM histidina) ou TAU-His-Pro (suplementado com 10 mM prolina e 10 mM histidina) a 28 °C por sete dias.

As formas metacíclicas obtidas por ambos os métodos foram purificadas utilizando uma coluna de DEAE-celulose, como descrito previamente (Teixeira et al., 1986). Brevemente, os parasitas foram lavados duas vezes e ressuspensos em 3-5 ml de PBS-glicose 5,4% (PSG). Posteriormente foram adicionados à matriz de troca iônica (DEAE-celulose, Sigma, Saint Louis, MO, EUA<sup>®</sup>) previamente equilibrada com 5 volumes de coluna de PSG. A saída de tripomastigotas metacíclicas foi acompanhada por microscopia de luz, analisando-se alíquotas

de aproximadamente 2 ml coletadas. Os tripomastigotas metacíclicos purificados foram então contados em câmara de Neubauer para determinar a pureza da purificação e utilizados em experimentos posteriores.

### 2.1.2 *Escherichia coli*

Duas cepas diferentes foram utilizadas nesse trabalho: a cepa DH5 $\alpha$ , a qual apresenta o genótipo: F-  $\phi$ 80lacZ $\Delta$ M15  $\Delta$ (lacZYA-argF)U169 *recA1 endA1 hsdR17(rk-, mk+)* *phoA supE44 thi-1gyrA96 relA1  $\lambda$ -*, e foi utilizada para as clonagens do DNA dos genes de interesse. Para os ensaios de expressão das proteínas recombinantes foi utilizada a cepa BL21-Codon Plus, (genótipo F- *ompT hsdS* ( $r_B$ ,  $m_B$ -) *dcm+* Tetr gal  $\lambda$  *endA Hte argU proL Camr*).

Para a cultura de cepas bacterianas foi utilizado o meio Luria Bertani (LB) que contém por litro: 10 g de peptona de carne, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl. Dependendo do caso, foram utilizados os seguintes antibióticos: ampicilina (100  $\mu$ g/ml), tetraciclina (5  $\mu$ g/ml), canamicina (30  $\mu$ g/ml) e cloranfenicol (10  $\mu$ g/ml). Para a preparação de meios sólidos foi adicionado agar na concentração final de 15 g/l. Os clones selecionados como positivos foram conservados em uma solução de LB suplementada com 15% de glicerol (v/v) para serem armazenados a -70 °C.

## 2.2 Avaliação da essencialidade do aminoácido His para epimastigotas de *T. cruzi*

### 2.2.1 Curvas de crescimento

As curvas de crescimento de formas epimastigotas foram realizadas por cultivo em meio semi-definido AR103 (Tabela 1) suplementado com 10% soro, adicionando ou não His (AR103<sup>His-</sup>). Brevemente, parasitas foram cultivados em placas de cultura de 6, 24 ou 96 poços e a evolução do crescimento foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer ou por leitura espectrofotométrica da densidade ótica, eventualmente, como descrito por Magdaleno e colaboradores (Magdaleno, 2009).

| <b>Quadro A: Meio definido AR103 com uso das misturas em pó</b> |                      |
|---|----------------------|
| <b>Compostos</b>  | <b>g/L</b>           |
| <b>Frutose</b>  | 2                    |
| <b>Base principal (quadro B)</b>                                | 31,06                |
| <b>Mistura de aminoácidos (quadro C)</b>                        | 8,312                |
| <b>Mistura de purinas (quadro D)</b>                            | 0,145                |
| <b>Mistura de vitaminas (quadro E)</b>                          | 0,115                |
| <b>Colina Cl</b>  | 0,012                |
| <b>Hemina</b>   | 0,015                |
| <b>Quadro B: Mistura Base principal para AR103</b>              |                      |
| <b>Compostos</b>  | <b>g (para 50L)</b>  |
| Beta-Na glicerofosfato.5H <sub>2</sub> O                        | 1000                 |
| NaCl  | 200                  |
| Na <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O             | 250                  |
| KCl   | 20                   |
| Na <sub>3</sub> citrato.2H <sub>2</sub> O                       | 30                   |
| Na acetato.3H <sub>2</sub> O                                    | 39,5                 |
| Na succinato  | 13,5                 |
| <b>Quadro C: Mistura de aminoácidos para AR103</b>              |                      |
| <b>Compostos</b>  | <b>g (para 50 L)</b> |
| L-Alanina   | 14,25                |
| L-Arginina  | 27,5                 |
| L-Aspartato   | 27,5                 |
| L-Asparagina  | 5                    |
| L-Cisteína  | 5                    |
| L-Cistina   | 7                    |
| L-Glutamato   | 52,25                |
| L-Glutamina   | 5                    |
| L-Histidina-HCl(*)  | 13                   |
| Glicina   | 17,5                 |
| L-Isoleucina  | 20                   |
| Glutationa, reduzida  | 0,125                |
| L-Hidroxiprolina  | 2,5                  |
| L-Leucina   | 38                   |
| L-Lisina-HCl  | 37,5                 |
| L-Metionina   | 9,75                 |
| L-Fenilalanina  | 13,75                |
| L-Prolina   | 39                   |
| L-Serina  | 14,25                |
| L-Treonina  | 13,5                 |
| L-Triptofano  | 7                    |
| L-Tirosina etilester  | 18                   |
| L-Valina  | 24,25                |

| Quadro D: Mistura de purinas para AR103   |               |
|---|---------------|
| Compostos                                 | g (para 50L)  |
| Adenina-HCl                               | 2,5           |
| Adenosina                                 | 1             |
| Guanina HCl                               | 0,075         |
| Guanosina                                 | 1             |
| Hipoxantina                               | 0,075         |
| Xantina                                   | 0,075         |
| AMP                                       | 0,05          |
| ATP                                       | 2,5           |
| Quadro E: Mistura de vitaminas para AR103 |               |
| Compostos                                 | g (para 50 L) |
| Ácido fólico                              | 1,5           |
| D-alfa-tocoferol succinato                | 0,2           |
| DL-alfa- ácido lipóico                    | 0,02          |
| Menadiona                                 | 0,0225        |
| Tiamina HCl                               | 0,5           |
| Nicotinamida                              | 0,5           |
| Ca pentotenato                            | 0,00625       |
| Piridoxina HCl                            | 0,5           |
| Piridoxal HCl                             | 0,00625       |
| Inositol                                  | 0,5           |
| Riboflavina                               | 1             |
| Biotina                                   | 0,5           |
| Ácido ascórbico                           | 0,0125        |
| p-Ácido aminobenzóico                     | 0,0125        |

**Tabela 1:** Composição do meio AR103 (\*Ausente no meio AR103<sup>His-</sup>).

### 2.2.2 Viabilidade

A viabilidade das formas epimastigotas incubadas em meio semi-definido AR103 com e sem His, durante diferentes períodos de tempo, foi avaliada utilizando o método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetraazolium bromide) (Mosmann, 1983). Brevemente, após a incubação na condição de interesse, as células foram lavadas com tampão fosfato-salino pH 7,4 (PBS) estéril e foi adicionado 20 µl do reagente de MTT (5 mg/ml). As placas foram incubadas a 28 °C durante 24 horas (protegidas da luz) e a reação foi interrompida com a adição de 100 µl SDS 10%. A viabilidade das células foi observada mediante o aparecimento do complexo azul de formazan homogêneo “thiazolidin” utilizando-se  $\lambda$  595 nm e como referência  $\lambda$  690 nm.

## 2.3 Transporte de His em epimastigotas de *T. cruzi*

### 2.3.1 Ensaio de transporte

Epimastigotas de *T. cruzi* cultivados em meio LIT a 28 °C foram lavados duas vezes por centrifugação e resuspendidos em PBS. As células foram contadas em câmara de Neubauer, ajustadas com o mesmo tampão a uma densidade final de  $20 \times 10^7$  células/ml e distribuídas em alíquotas de 100 µl ( $2 \times 10^7$  células cada). O ensaio de transporte foi iniciado pela adição de 100 µl de His em PBS na diluição correspondente, na presença de 0,1 µCi de L-[<sup>14</sup>C(U)]-Histidina (Perkin-Elmer, Boston, MA, EUA). A menos que outra coisa seja especificada, a velocidade inicial ( $V_0$ ) da incorporação foi medida a 28 °C por um minuto, pela incorporação de 3 mM His marcada radioativamente. Em todos os casos, o transporte foi interrompido pela adição de 800 µl de His 50 mM fria em PBS e os parasitas foram lavados por centrifugação a  $10\,000 \times g$  por 2 minutos. Posteriormente os parasitas foram ressuspendidos em 100 µl de PBS e transferidos ao líquido de cintilação. As amostras foram medidas no detetor de cintilação Perkin Elmer Tri-Carb 2910 TR.

#### 2.3.1.1 Ensaio de competição

O ensaio de transporte foi realizado utilizando His marcada radioativamente, como descrito acima, na diluição correspondente ao  $K_M$  do transportador previamente determinado (0,12 mM). Para avaliar o efeito de possíveis inibidores, aminoácidos e análogos estruturais da His foram acrescentados em uma concentração 10 vezes superior à de His. Como controle positivo de inibição, foi adicionada His fria (não radioativa) em uma concentração de 10 vezes o  $K_M$  do transportador.

#### 2.3.1.2 Efeito da depleção de His intracelular

Para avaliar o possível efeito da depleção de His no meio intracelular, formas epimastigotas foram pre-incubadas 3 horas em PBS, prévio ao ensaio de transporte. A incorporação em parasitas estressados foi comparada com a incorporação em parasitas mantidos em meio LIT durante o mesmo período de tempo.

### 2.3.1.3 Dependência do transporte com íons extracelulares e energia

A dependência de íons extracelulares como  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  no transporte de His foi determinada pela utilização de tampão PBS contendo só esses íons (149,5 mM  $\text{Na}^+$  ou  $\text{K}^+$ ) ou em tampão colina (139,7 mM) como controle. O efeito do pH extracelular foi também avaliado utilizando PBS (pH 6-7,5) ou tampão citrato (pH 5-7). Para avaliar a possível dependência do transportador com o gradiente de prótons foi utilizado o ionóforo FCCP (carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona) na concentração de 0,5  $\mu\text{M}$  em PBS, na presença ou ausência de oligomicina 5  $\mu\text{g/ml}$ . Os parasitas foram resuspensos na solução correspondente e usados imediatamente para o ensaio de transporte. Para os experimentos onde foi avaliada a dependência do transportador com os níveis de ATP intracelular, os parasitas foram incubados em PBS-oligomicina A (5  $\mu\text{g/ml}$ ), e o transporte foi medido em diferentes tempos: imediatamente após a adição de oligomicina e após 30 e 120 minutos.

### 2.3.1.4 Incorporação de His a proteínas

Para determinar a porcentagem de His marcada incorporada a proteínas, as células foram incubadas durante 60 minutos com 3 mM His na presença de 0,1  $\mu\text{Ci}$  de L-[ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-His. Após duas lavagens com PBS, os parasitas foram ressuspensos em 500  $\mu\text{l}$  do mesmo tampão e adicionado um volume de ácido tricloroacético 20%, incubados por uma hora a temperatura ambiente (TA) e centrifugados 30 minutos a 10000 x g. O sobrenadante foi medido e associado a metabólitos solúveis. A radioatividade incorporada a macromoléculas foi medido no pellet ressuspensado em 0,1% SDS em tampão Tris-HCl 15 mM pH 7,4.

## 2.4 Manipulação de DNA

### 2.4.1 Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

A obtenção de DNA genômico de *T. cruzi* foi feita a partir de formas epimastigotas. Aproximadamente  $5 \times 10^6$  células/ml foram lavadas com PBS por centrifugação a 6000 x g por 5 minutos a 4 °C. Posteriormente as células foram homogeneizadas em 200  $\mu\text{l}$  de tampão de lise (Tris-HCl 0,2 M; EDTA 0,01 M; SDS 0,5% v/v, pH 8) com adição de 50  $\mu\text{g/ml}$  de proteinase K e incubadas à TA por 5 minutos. Após esse período, o DNA da amostra foi extraído por tratamento com fenol/clorofórmio. A fase aquosa foi recuperada por

centrifugação a 6000 x g por 5 minutos. O DNA foi precipitado com dois volumes de isopropanol gelado e centrifugado a 10000 x g por 15 minutos. Os sobrenadantes foram descartados e o DNA precipitado lavado com três volumes de etanol 70% e centrifugado a 6000 x g por 5 minutos. A amostra de DNA foi seca à TA e ressuspensa em 150 µl de solução TE (Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM, pH 8). A concentração de DNA foi determinada em aparelho *NanoDrop* (Spectrophotometer ND-1000).

#### 2.4.2 Reações de amplificação de DNA por PCR

Com base nas sequências gênicas das *TcHAL* e *TcUH* descritas nas bases de dados, foram desenhados e sintetizados oligonucleotídeos com diferentes combinações de sítios de clivagem para as endonucleases de restrição utilizadas em cada clonagem (Tabela 2), possibilitando a amplificação dos fragmentos de interesse. Nas reações de PCR foram usados 100 ng de DNA genômico (molde), oligonucleotídeos na concentração de 0,2 pmol/ml, dNTPs 0,2 mM, concentrações finais de 2 mM MgCl<sub>2</sub> e 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA<sup>®</sup>). As condições de amplificação para ambos os genes compreenderam 35 ciclos com desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos oligos ao DNA molde a 58 °C por 1 minuto e extensão da cadeia nucleotídica a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, além de uma extensão final adicional a 72 °C durante 5 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit GeneJET<sup>®</sup> (Thermo<sup>®</sup>) segundo as indicações do fabricante.

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

| Iniciador   | Sequencia 5' - 3'             | Descrição                              |
|-------------|-------------------------------|--|
| TcHAL-Fw    | AAGGATCCATGAGGGTTATCCTTGACG   | Clonagem da TcHAL em vetor pGEM-T Easy |
| TcHAL-Rv    | AACTCGAGCTCACATCTTGGATTTTCAGC | Clonagem da TcHAL em vetor pGEM-T Easy |
| TcHAL467-Fw | TGCTTGGCGAGGGACTTCTTGC        | Sequenciamento de DNA                  |
| TcUH-Fw     | AAGAATTCATGACTTCCATGAAGAAGGTC | Clonagem da TcUH em vetor pGEM-T Easy  |
| TcUH-Rv     | AACTCGAGATACTTCTTAAGCACATCGG  | Clonagem da TcUH em vetor pGEM-T Easy  |
| TcUH674-Rv  | ATGGTACTACCATCACCTTCCGC       | Sequenciamento de DNA                  |

**Tabela 2:** Iniciadores utilizados nas reações de PCR. Fw: forward (direto); Rv: reverse (reverso).

### 2.4.3 Eletroforese em gel de agarose

As eletroforeses dos fragmentos de DNA foram conduzidas em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 1X (0,04 M Tris, 1 mM EDTA, pH 8 ajustado com ácido acético) e brometo de etídio na concentração final de 0,3 µg/ml. Antes da aplicação adicionou-se ao DNA o tampão de amostras (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol e 20% de glicerol). O padrão de peso molecular utilizado foi 1 kb DNA Ladder (Thermo®). As corridas electroforéticas foram conduzidas a 100 mA. Os géis foram visualizados no transiluminador sob fonte de luz UV e fotografados em sistema ImageQuant® 300 (GE Healthcare®, Pittsburg, PA, EUA).

### 2.4.4 Clonagem em vetores tipo T: construções em pGEM T-Easy

Os produtos de amplificação por PCR (TcHAL e TcUH) foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit comercial GeneJET (Thermo®) segundo as indicações do fabricante e posteriormente quantificados como descrito anteriormente. Os produtos foram ligados em 50 ng de vetor pGEM T-Easy (razão molar de inserto:vetor 3:1) utilizando 1U de T4 DNA ligase (Promega®, Madison, WI, EUA) e 1X do tampão ligase, incubando 16 h a 4°C.

### 2.4.5 Construções pET28a-TcHAL e pET24a-TcUH

As sequências clonadas no vetor pGEM T-Easy foram sub-clonadas por corte com enzimas de restrição e posterior ligação nos vetores de expressão pET. No caso da sequência



da *TcHAL*, 2 µg da construção pGEM-*TcHAL* e 2 µg do plasmídeo pET28a foram digeridos com 2U das enzimas BamHI e XhoI (Thermo<sup>®</sup>) seguindo as instruções do fabricante. Por sua vez, 2 µg da construção pGEM-*TcUH* e 2 µg do plasmídeo pET24a foram digeridos com 2U das enzimas EcoRI e XhoI (Thermo<sup>®</sup>). Todas as digestões foram submetidas a electroforese em gel de agarose, a partir do qual purificaram-se tanto os insertos a serem clonados quanto o vetor digerido. Por fim, foram realizadas as reações de ligação utilizando uma relação vetor:inserto de 1:3, T4 DNA ligase 1U/µl (Thermo<sup>®</sup>) em tampão e condições recomendados pelo fabricante. As reações foram incubadas a 4 °C até o dia seguinte.

#### 2.4.6 Preparação de bactérias quimiocompetentes

Para a clonagem das construções acima mencionadas foi utilizada a cepa de *E. coli* DH5α. Para tornar as células competentes, foi utilizado o método que utiliza cloreto de cálcio (Sambrook, 1989). Inicialmente, a partir de uma colônia isolada foi preparada uma cultura em médio LB (5 ml) e crescida durante 16 h a 37 °C com agitação constante. Posteriormente, a cultura foi diluída (1:100) e crescida nas mesmas condições até atingir uma densidade ótica (DO) a 600 nm entre 0,4 e 0,6. Nesse ponto, as células foram incubadas em gelo por 15 minutos e posteriormente coletadas por centrifugação a 3000 x g, por 5 minutos a 4 °C. O pellet de células foi ressuscitado em uma solução de cloreto de cálcio 100 mM fria e incubada por 30 minutos em gelo. Após esse tempo, as células foram centrifugadas e esse passo repetido mais uma vez. O precipitado obtido foi ressuscitado em 3 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM acrescentando 140 µl de DMSO e incubado em gelo por 15 min. As células foram distribuídas em alíquotas de 100 µl em tubos de 1,5 ml estéreis, congeladas em etanol-gelo seco e armazenadas a -80 °C.

#### 2.4.7 Transformação de bactérias competentes

As alíquotas das suspensões de células competentes (100 µl), preparadas como descrito acima, foram incubadas com o DNA plasmidial ou produtos de ligações por 30 minutos. Em seguida as células foram submetidas a choque térmico (42 °C por 2 minutos) e imediatamente incubadas em gelo por mais 10 minutos. Após a recuperação das células em meio LB por 1 hora a 37 °C com agitação (200 rpm), as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o respectivo antibiótico e/ou IPTG e X-Gal para seleção das colônias recombinantes.

#### 2.4.8 Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo Método de Sanger (Sanger et al., 1977), utilizando os iniciadores T7 direto e reverso, assim como os específicos para cada um dos genes em estudo (Tabela 2), e o kit de sequenciamento de DNA BigDye™ 3.1 (Thermo®) segundo instruções do fabricante. As reações foram analisadas em um sequenciador automático ABI 3100. Os alinhamentos e comparações entre as sequências foram realizados mediante o uso dos programas Align versão 6.2.0, BLAST versão 2.2.19 (NCBI), BioEdit versão 7.0.0 e outros disponíveis.

### 2.5 Manipulação de proteínas

#### 2.5.1 Expressão e purificação das TcHAL e TcUH recombinantes em *E. coli*

Os genes correspondentes as *TcHAL* e *TcUH* foram sub-clonados no vetor pET28a e pET24a, respectivamente, para expressão recombinante em *E. coli*. Ambas as construções foram utilizadas para transformar bactérias quimiocompetentes derivadas da cepa BL21 Codon-Plus segundo o descrito no ponto 2.4.7. Para a indução da expressão as células foram incubadas (37 °C e 200 rpm) em um litro de meio LB com canamicina (30 µg/ml) e tetraciclina (5 µg/ml). Quando as células atingiram uma densidade óptica de 0,5 foram adicionados 0,5 mM de IPTG e as células se incubadas a 25 °C durante 16 horas (150 rpm). Em ambos os casos, as células foram coletadas por centrifugação (15 min, 5000 g) e ressuspensas em tampão de ligação 1X (10 ml de tampão por cada 500 ml de cultura) (Tris-HCl 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 500 mM NaCl e 10 mM de imidazol). A lise foi feita por tratamento com lisozima (Sigma®) 1 mg/ml (30 min a 4 °C) e seis pulsos de sonicação (1 minuto a 40% de potência e 1 minuto no gelo). O lisado foi clarificado por centrifugação (30 min-16000 g a 4°C).

Os lisados obtidos da forma acima descrita foram passados três vezes através de uma coluna de agarose carregada com níquel (Ni<sup>2+</sup>-NTA) (Quiagen®, Germantown, MD, EUA). A coluna (2 ml) foi equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação e posteriormente lavada com 20 volumes do mesmo tampão. Uma lavagem adicional com 10 volumes de tampão de lavagem (idem ao anterior com 60 mM de imidazol) para continuar com o processo de eluição (idem ao anterior com 500 mM de imidazol) onde foram coletadas frações de 1,5 ml.

Após purificação, as frações contendo as *TcHAL* e *TcUH* foram dialisadas para a remoção do imidazol utilizando membranas de diálise com diâmetro de poro de 10 kDa. Com o objetivo de manter a solubilidade das proteínas recombinantes, a remoção do imidazol foi realizada de forma gradual, utilizando tampão de eluição com quantidades decrescentes de imidazol (400, 300, 150 e 0 mM), em uma relação 1:1000. Cada tampão foi trocado cada duas horas, mantendo a diálise sob agitação constante a 4 °C. A dosagem proteica foi realizada pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando albumina sérica bovina como padrão.

### 2.5.2 Determinação da atividade da *TcHAL* e *TcUH*

As medições de atividade foram feitas através de ensaios espectrofotométricos em tempo real, monitorando o aumento (para *TcHAL*) ou a diminuição (para *TcUH*) na absorbância a 277 nm, correspondentes à formação ou desaparecimento do urocanato, respectivamente (Mehler et al., 1953). A reação para *TcHAL* contém: His, na concentração indicada em cada caso, 100 mM de tampão Tris-HCl pH 9; 0,1 mM de  $MnCl_2$ ; 1,7 mM de GSH reduzido; e água para completar um volume final de 1,5 ml. A reação foi iniciada pela adição da enzima recombinante *TcHAL* pura (10-50  $\mu g$ ) ou extrato de formas epimastigotas (50-100  $\mu g$ ). A reação para *TcUH* contém: urocanato, na concentração indicada em cada caso, 100 mM de tampão fosfato de potássio pH 7; enzima recombinante (10- 50  $\mu g$ ) ou extrato de formas epimastigotas (50-100  $\mu g$ ) e água para completar um volume final de 1,5 ml. O branco de cada reação foi a mesma combinação de reagentes sem a adição da enzima. A absorbância foi monitorada durante 5 minutos a 28 °C, com agitação contínua. A velocidade inicial da reação ( $V_0$ ) foi calculada na região de linearidade, utilizando o coeficiente de extinção molar para o urocanato ( $CEM_{277nm} = 1,88 M^{-1} cm^{-1}$ ).

Os valores obtidos a partir das velocidades iniciais ( $V_0$ ) medidas foram transformados em unidades de produto formado ou substrato consumido por unidade de tempo ( $\mu mol/min$ ) e graficados em função da concentração de substrato, His (0-5 mM) ou urocanato (0-50  $\mu M$ ). As constantes cinéticas  $K_M$  e  $V_{MAX}$  específica foram determinadas a partir do gráfico resultante, ajustado à função hiperbólica que descreve o modelo de *Michaelis-Menten*, no programa de análise de dados GraphPad Prism 5.

Para avaliar a dependência de ambas as enzimas recombinantes com o pH, a atividade da *TcHAL* foi medida nos tampões Tris-HCl 100 mM entre pH 6,8 e 9, e CHES 100 mM (ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfônico) entre os pH 9 e 10. Para o ensaio com a *TcUH*, foi utilizando o tampão fosfato de potássio (100 mM) entre os pH 5,5 e 8. A dependência das

enzimas com a temperatura foi avaliada variando a temperatura de ambos os ensaios de atividade entre 20 e 55 °C.

### 2.5.3 Separação de proteínas mediante eletroforese em géis desnaturantes de poliacrilamida (SDS-PAGE)

A separação de proteínas foi realizada mediante electroforese em géis de poliacrilamida (12%) em condições desnaturantes e redutoras (Sambrook, 1989). O gel de separação é composto de 375 mM de Tampão Tris-HCl pH 8,8, 0,1% de SDS v/v, 12% de solução acrilamida/bis-acrilamida (29:1) e água destilada qsp 10 ml, 5 µl de TEMED (Tetra Metil Etileno Diamina, Sigma<sup>®</sup>) e 0,05% de persulfato de amônio (v/v). Após a polimerização, foi adicionado o gel de empilhamento (125 mM de tampão Tris-HCl pH 6,8, 0,1% SDS v/v, 5% de solução acrilamida/bis-acrilamida p/v (29:1), água destilada qsp 5 ml, 5 µl de TEMED e 0,05% de persulfato de amônio (v/v).

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

Os géis foram corados com uma solução de Coomassie Brilliant Blue (0,1% *Coomassie blue R-250* p/v, 50% MetOH v/v e 10% ácido acético v/v) e descorados com uma solução contendo 12,5 % isopropanol e 25% ácido acético. As massas moleculares das proteínas foram estimadas por comparação com os marcadores Unstained Protein Molecular Weight Marker e Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (Thermo<sup>®</sup>).

### 2.5.4 Obtenção de soros policlonais anti-TcHAL e anti-TcUH

A TcHALr obtida na purificação por cromatografia de afinidade foi dessalinizada e concentrada por gravidade (15 min a 4000 x g) utilizando uma coluna com uma medida de corte para o peso molecular (MWCO = 10 kDa) (Centricon, Millipore). Posteriormente, foram inoculados 50 µg da enzima, junto com coadjuvante completo de Freund's (Sigma<sup>®</sup>) em camundongos fêmeas (4) da linhagem BALB/c com 25 dias de nascimento. Após duas semanas, foram aplicadas duas imunizações adicionais na presença de coadjuvante incompleto de Freund's. Transcorridos cinco dias, após a segunda imunização, os animais

foram anestesiados (pentobarbital de sódio 40-50 intra peritoneal) e sacrificados por punção cardíaca. O sangue total foi coletado e incubado em dois intervalos de 40 min (4 °C/37 °C) e o soro separado por centrifugação (15 min a 2500 x g). O mesmo protocolo de imunização foi feito utilizando PBS, ao invés da proteína antigênica, para ser utilizado como grupo controle. Os soros policlonais obtidos a partir dos animais imunizados foram diluídos (1:2) em glicerol (25%) e armazenados por congelamento (-20°C). Os títulos para cada anticorpo foram determinados pela técnica de western blot contra extratos protéicos totais das formas epimastigotas.

### 2.5.5 Western Blotting

Os extratos protéicos obtidos foram separados eletroforeticamente em géis de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE) e transferidos para filtros de nitrocelulose (Hybond-C Extra, GE Healthcare®) como descrito por (Towbin et al., 1992) utilizando o sistema Panter® semi-dry (Owl, Thermo®). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S 0,1% (p/v) diluído em ácido acético 10% (v/v) e descoradas com água para verificação da eficiência do processo de transferência. As membranas foram bloqueadas por 1 h em solução PBS-Tween-20 0,05% (PBS-T) contendo 5% de leite desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário na diluição indicada, sob agitação leve por 2 h à TA e depois lavadas três vezes por 5 min com PBS-T. Procedeu-se então as incubações durante 1 h com o anticorpo secundário, conjugado a HRP (1:5000) (horseradish peroxidase-GE Healthcare®), seguido de nova lavagem como acima descrito. Após as lavagens, os ensaios foram revelados por quimiluminescência usando o reagente ECL (ECLTM Western Blotting Analysis System, GE Healthcare®) de acordo com o manual do fabricante.

### 2.5.6 Preparação de extratos protéicos a partir de epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos de *T. cruzi*

Os extratos protéicos foram obtidos a partir de epimastigotas ou tripomastigotas metacíclicos obtidos pela diferenciação em meio TAU-3AAG. As células foram lavadas duas vezes por centrifugação com PBS e homogeneizadas em tampão de lise (Tris 50 mM; sacarose 0,25 M; NaCl 100 mM; 0,2% Triton X-100, pH 7,6) na presença de 1% de coquetel contendo inibidores de proteases (AEBSF, E-64, aprotinina, pepstatina A, leupeptina e

cloridrato de bestatina, Sigma<sup>®</sup>). As células foram submetidas à lise por sonicação através de quatro ciclos de 20 segundos com intervalos de descanso em gelo de 1 min entre cada um dos ciclos. Após centrifugação a 7000 x g por 10 min, os sobrenadantes contendo os extratos protéicos foram quantificados pelo método de Bradford e utilizados para ensaios de *Western blotting*.

#### 2.5.7 Quantificação de proteínas

A dosagem de proteínas foi feita em triplicata pelo método de Bradford (Bradford, 1976), utilizando-se uma solução de BSA (albumina bovina sérica) como padrão para a construção de curvas de calibração.

#### 2.5.8 Imunofluorescência indireta

Formas epimastigotas de *T. cruzi* ( $5 \times 10^6$  células/ml) foram lavadas por centrifugação duas vezes com PBS e posteriormente fixadas às lâminas com paraformaldeído 2% à TA por 20 minutos. Após três lavagens com PBS os parasitas foram permeabilizados com Triton X-100 (0,1%) e as lâminas foram bloqueadas com PBS-BSA (0,1% de BSA) durante 30 minutos, e novamente lavadas como descrito acima. Posteriormente foram incubadas durante uma hora com o soro anti-*Tc*HAL (1:100) ou anti-*Tc*UH (1:200). Junto a cada um, foi adicionado o soro anti-*Tc*MDHc (malato desidrogenase, 1:20) como marcador para localização citosólica (gentilmente cedido pela Prof. Dra. Cristina Nowicki, UBA). Posteriormente, as lâminas foram incubadas por 30 min a TA com anticorpo secundário anti-imunoglobulina G de camundongo conjugado a Alexa Fluor<sup>®</sup> 488 ou anti-imunoglobulina G de coelho conjugado à Alexa Fluor<sup>®</sup> 546 na diluição de 1:400. Depois de realizada mais duas lavagens rápidas foi adicionado às lâminas o corante de DNA total Hoechst 33258 (1:2000), durante um minuto e as lâminas foram montadas com Fluromount G. As preparações foram analisadas em microscópio de fluorescência Axio Imager motorized M.2 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, USA), em objetivo de 100X. O software ImageJ para Windows foi utilizado para análises das imagens.

## 2.6 Avaliação do papel da His na bioenergética do *T. cruzi*

### 2.6.1 Viabilidade

Para determinar se epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de manter sua viabilidade utilizando His como única fonte energética, parasitas em fase exponencial de crescimento cultivados em meio LIT foram lavados duas vezes com PBS e incubados no mesmo tampão, suplementando ou não (controle negativo) com diferentes substratos (Pro, Glc, Glu e His). Um controle com parasitas em LIT também foi adicionado. Por cada condição, foram utilizados  $3 \times 10^7$  células. Após 24 h de incubação a 28 °C, as células foram lavadas em PBS e incubadas com MTT (4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrasolium) para avaliar a viabilidade celular, como previamente descrito (Mosmann, 1983). Por outro lado, epimastigotas em fase exponencial que foram retirados do meio LIT, lavados e incubados por 30 h em PBS para induzir estresse nutricional foram recuperados em diferentes substratos (Pro, Glc e His) e sua viabilidade foi avaliada, utilizando a mesma metodologia acima descrita.

### 2.6.2 Captura de CO<sub>2</sub> emitido pela oxidação de His em epimastigotas de *T. cruzi*

Epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes, ressuspensos em PBS e incubadas com His 3 mM marcada com 0,1 µCi de L-[<sup>14</sup>C(U)]-His durante diferentes tempos: tempo zero, uma e quatro horas a 28 °C. Para “capturar” o CO<sub>2</sub> liberado, foi utilizado papel Whatman (tamanho aproximado: 2 cm x 2 cm) umedecido com KOH 2M como “trap” de CO<sub>2</sub>, e colocado na parte superior de um tubo Falcon de 15 ml onde foram incubados os parasitas. A formação de K<sub>2</sub><sup>14</sup>CO<sub>3</sub> no papel foi medida no contador de cintilação.

### 2.6.3 Síntese de ATP utilizando his como substrato

Para avaliar se epimastigotas são capazes de produzir ATP utilizando His como única fonte energética, parasitas (aproximadamente  $5 \times 10^7$  células ml<sup>-1</sup>) foram estressados nutricionalmente em PBS durante 30 h a 28 °C e recuperados durante 1 h a 28 °C na presença de: meio LIT, 5 mM Pro e 5 mM Glc (controles positivos), só PBS (controle negativo) ou 5 mM His. Após esse tempo, as células foram lisadas e incubadas com o kit comercial adenosine 5'-triphosphate (ATP) assay mix (Sigma®). A enzima luciferase tem como

substrato a luciferina e a sua atividade enzimática está acoplada à emissão de fótons de luz. Essa reação é, necessariamente, acoplada à hidrólise de adenosina trifosfato (ATP) e, portanto, pode-se utilizar como um método indireto de medição de ATP no meio. A detecção da emissão de luz ( $\lambda 570$  nm) foi realizada em luminômetro de placa (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, EUA). Os valores de ATP nas amostras foram extrapolados a partir de uma curva de calibração com quantidades conhecidas de ATP (Sigma<sup>®</sup>) e normalizados posteriormente por mg de proteína na amostra (método de Bradford).

#### 2.6.4 Consumo de oxigênio utilizando His como substrato

Para avaliar as taxas de respiração a partir da degradação de His, epimastigotas (aproximadamente  $5 \times 10^7$  células/ml) foram estressados nutricionalmente por 16 h em PBS a 28 °C e recuperados durante 30 min a 28 °C na presença de 5 mM His. Os parasitas foram adicionados ao tampão de respiração (MRC: 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Posteriormente foram adicionados de forma sequencial, oligomicina A (5 µg/ml) e FCCP (0,5µM). As taxas de consumo de oxigênio foram medidas utilizando células íntegras no oxígrafo de alta resolução (OROBOROS, Oxygraph-2k, Innsbruck, AU).

#### 2.6.5 Medida do potencial de membrana interno mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

Para avaliar a capacidade da His para energizar a mitocôndria reestabelecendo o  $\Delta\Psi_m$ , parasitas estressados 30 h em PBS a 28 °C foram ajustados a  $2 \times 10^7$  células/ml e recuperados em: tampão MRC (controle negativo), LIT ou MRC suplementado com 5 mM Pro (controles positivos), e 5 mM His. Posteriormente, foi adicionado o agente desacoplante FCCP (1 µM) por 15 min a 28 °C na metade das amostras, deixando a outra metade sem FCCP, como controle onde o potencial de membrana não foi desacoplado. Posteriormente foi adicionado 250 nM Rhodamina 123 em todos os tubos e incubados por 20 min a 28 °C. A Rh123 é um marcador fluorescente cuja emissão é proporcional ao potencial de membrana da mitocôndria. Posteriormente os parasitas foram lavados com o tampão “Cytomix” (25 mM HEPES-KOH, 120 mM KCl, 0,15 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM EDTA, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM tampão fosfato de potássio e 10 µM FCCP se necessário). A fluorescência das amostras foi avaliada por citometria de fluxo (detector FL-1 do citômetro de fluxo FACSCalibur). O cambio relativo no



$\Delta\Psi_m$  foi determinado como a razão da fluorescência em ambas as condições avaliadas (estado acoplado e desacoplado pelo FCCP).

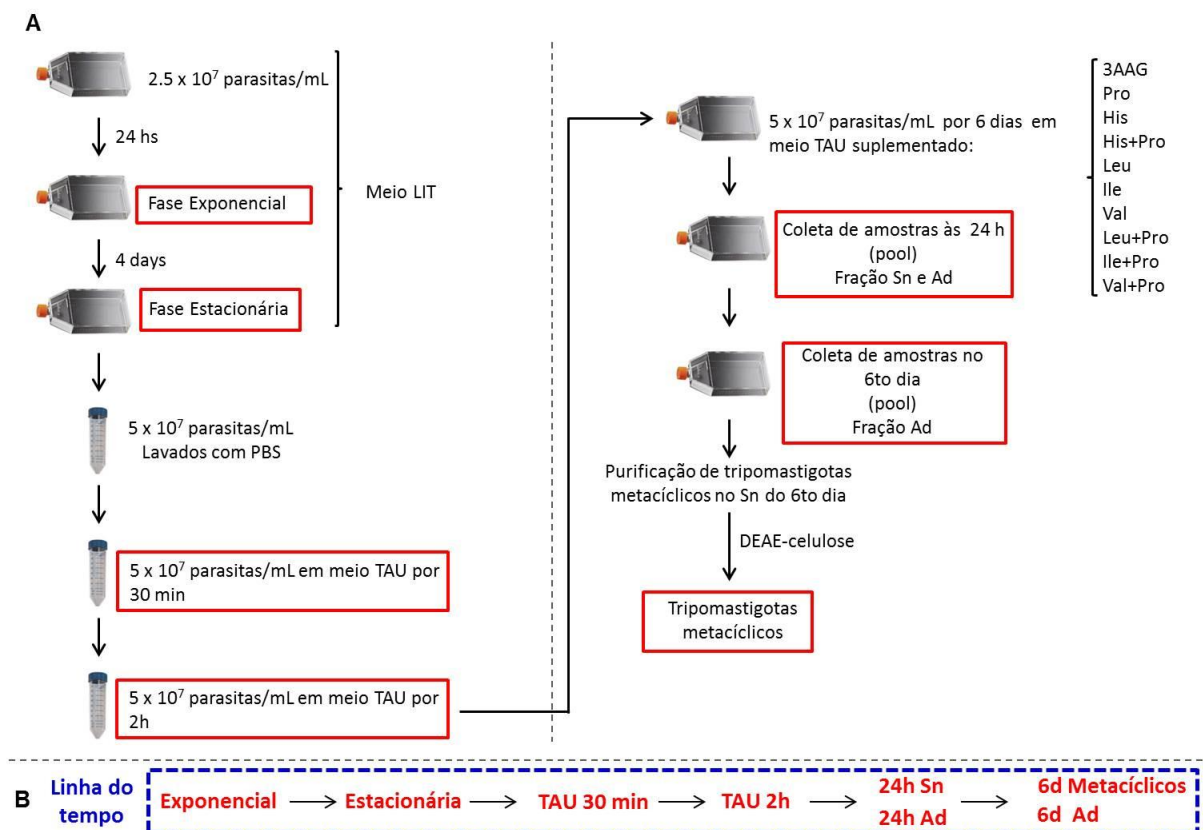
## 2.7. Análise metabolômica

### 2.7.1 Coleta de amostras e quenching do metabolismo

Na figura 3 é apresentado o esquema experimental seguido para a coleta de amostras que foram analisadas por metabolômica. Os parasitas em fase exponencial de crescimento foram obtidos a partir de uma cultura inicial de  $2,5 \times 10^7$  parasitas/ml crescida durante 24 h (densidade final aproximada:  $5 \times 10^7$  p/ml). A partir dessa cultura, foi iniciada outra com uma densidade de  $5 \times 10^6$  parasitas/ml que foi crescida durante 4 dias até atingir a fase estacionária (densidade final aproximada:  $1 \times 10^8$  p/ml). A metaciclologênese foi realizada em meio TAU como descrito por (Contreras, 1985c). Brevemente, formas epimastigotas em fase estacionária, foram lavadas e transferidas à meio TAU puro (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM  $MgCl_2$ , 2 mM  $CaCl_2$ , 8 mM tampão fosfato pH 6) ( $5 \times 10^7$  parasitas/ml). Foram incubadas nesse meio por duas horas a 28 °C (coletando amostras aos 30 min e depois das 2 horas). Após esse tempo, os parasitas foram transferidos ao meio TAU-3AAG (TAU puro suplementado com 10 mM Glc, 2 mM Asp, 50 mM Glu, 10 mM Pro), ou TAU-His (TAU puro suplementado com 10 mM His), ou TAU-Pro (TAU puro suplementado com 10 mM Pro), ou TAU-His-Pro (TAU puro suplementado com 10 mM His e 10 mM Pro). As amostras coletadas correspondentes aos diferentes tempos durante a diferenciação foram:

- Amostras de 24 h, fração sobrenadante e aderida: a fração sobrenadante (Sn) corresponde aos parasitas livres no meio de cultura, enquanto que a fração aderida (Ad) corresponde aos parasitas que já iniciaram a diferenciação pela adesão na superfície da garrafa. Após a retirada do sobrenadante, foram adicionados 10 ml do mesmo meio e as células foram removidas.
- Amostras de 6 dias, fração sobrenadante e aderida: a fração aderida foi retirada como descrito acima, enquanto que a sobrenadante foi utilizada para a purificação das formas tripomastigotas metacíclicas utilizando uma coluna de DEAE-celulose (seção 2.1.1.2).

Todas as frações coletadas foram lavadas três vezes em um volume de PBS, centrifugando a  $10000 \times g$  por 3 min. Antes da última centrifugação, uma alíquota foi extraída para contagem dos parasitas, a qual foi utilizada para posterior normalização por número de células. O pellet obtido foi imediatamente incubado em gelo seco com etanol puro para o *quenching* do metabolismo: esse passo é necessário para deter todos os processos metabólicos da célula. O pellet resultante foi armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  até a extração dos metabólitos.



**Figura 3: Esquema experimental utilizado para coleta de amostras a serem analisadas por metabolômica.** **A.** Diagrama das coletas. **B.** Linha do tempo obtida pela coleta de todas as amostras descritas: fase exponencial e estacionária em meio LIT e diferenciação em meio TAU.

### 2.7.2 Extração dos metabólitos

Os pellets de parasitas foram ressuspensos em 400-800  $\mu\text{l}$  de tampão de extração, o qual consiste em  $\text{H}_2\text{O}$ :metanol (50%-50%) e uma mistura dos *standards* internos (Master Mix) necessários para normalização dos resultados obtidos por UPLC-MS (Tabela 3). Os pellets ressuspensos foram homogeneizados em vortex por 20 segundos, e posteriormente vortexados a  $4^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Em seguida, foram submetidos a 3 ciclos de sonicação em banho

de água e gelo por 2 min e incubação em gelo seco por 5 min para favorecer a ruptura celular. Após centrifugação a 10000 x *g* por 20 min, o sobrenadante foi retirado e seco no sistema *speed-vac*. As amostras secas foram armazenadas a -80°C até análise por UPLC-MS.

| SI                       | Concentração no Master Mix (mM) | Conc. Final nas amostras (µM) |
|--------------------------|---------------------------------|-------------------------------|
| Lisina-SI (AA)           | 30                              | 2                             |
| Fenilalanina-SI (AA)     | 15                              | 1                             |
| Ácido Glutâmico-SI (AA)  | 75                              | 5                             |
| Metionina-SI (AA)        | 75                              | 5                             |
| Acido Succínico-SI (TCA) | 75                              | 5                             |

**Tabela 3: Standards internos utilizados para normalização:** diferentes *standards* foram utilizados, os quais representam os diferentes grupos de moléculas analisadas (entre parêntesis: AA, aminoácidos; TCA, ciclo de Krebs).

### 2.7.3 Detecção dos metabólitos por cromatografia líquida de alta performance e espectrometria de massa

Dois protocolos previamente descritos (Birkler et al., 2010; Li et al., 2014) foram adaptados para a análise dos metabólitos. Brevemente: a separação e análise dos metabólitos foram realizados por sistema Waters ACQUITY H-class de cromatografia líquida de alta performance (UPLC) acoplada a espectrometro XEVO TQ-MS Waters (Waters, USA) equipado com ionização por eletrospray (ESI) operando em modo positivo e negativo de ionização. O sistema de cromatografia líquida (CL) é equipado com um sistema de bomba quaternária e a temperatura da coluna foi mantida a 40-45 °C. As colunas Waters ACQUITY UPLC HSS T3 (1,8 µm-2,1 mm x 100 mm) e BEH C18 column (1,7 µm-2,1 mm x 50 mm) ACQUITY foram utilizadas com injeção de amostras a 10 °C. A quantificação relativa foi realizada no modo de íon negativo e positivo (ESI) pelo modo de monitoramento múltiplos de reação (MRM). As transições de íons, do cone de tensão (CV) e da energia de colisão (CE) utilizados para a análise de ESI-MS / MS foram determinados utilizando o software MassLynx V4.1 Intellistart. Os dados foram adquiridos pelo MassLynx Software, v. 4. e processados em TargetLynx™ Application Manager (Waters, USA).

#### 2.7.4 Análises estatísticas

A análise de componentes principais (PCA), *heatmap* e teste *T* para os resultados obtidos por metabolômica foram realizados utilizando o software MetaboAnalyst (Xia et al., 2015).

### 2.8 Avaliação do papel da His na resistência à estresse oxidativo

#### 2.8.1 Medida das atividades enzimáticas relacionadas a aminoácidos enxofrados e à produção de NADPH

A atividade de desidrogenases NADPH dependentes (enzimas málicas e isocitrato desidrogenases) foi avaliada comparativamente em extratos livres de células de epimastigotas submetidos aos distintos tratamentos. Foram utilizados métodos espectrométricos. A formação de NADPH em presença de malato ou isocitrato foi determinada por absorvância de luz a 340 nm. Similarmente, foi avaliada a atividade das enzimas com capacidade de sintetizar cisteína (cisteína sintase, cistationina  $\gamma$ -liase e cistationina  $\beta$  sintase) nos distintos extratos celulares. A formação do aminoácido enxofrado foi estimada colorimetricamente por reação com o 5,5'-ditio-bis(ácido 2-nitrobenzoico) (DTNB).

#### 2.8.2 Determinação do $IC_{50}$ para peróxido de hidrogênio em epimastigotas de *T. cruzi*

Formas epimastigotas de *T. cruzi* ( $5 \times 10^6$  células/ml) foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas no mesmo tampão com diferentes concentrações de  $H_2O_2$  (10 a 200  $\mu$ M) durante 60 min a 28 °C. Após esse tempo as células foram centrifugadas (1000 x g, 2 min, 4 °C) ressuspensas em meio LIT e distribuídas em placa de 96 poços. A placa foi mantida na estufa a 28 °C. A proliferação celular foi estimada por leitura da absorvância em 620 nm a cada 24 h durante 6 dias. A absorvância foi transformada em valores de densidade celular (células/ml) usando uma equação de regressão linear que foi obtida previamente sob as mesmas condições. A concentração de  $H_2O_2$  que inibiu 50% da proliferação dos parasitas ( $IC_{50}$ ) foi determinada na fase exponencial de crescimento (4to. dia) mediante ajuste dos dados da curva dose-resposta com a equação clássica sigmoide (GraphPad Prism 5).

### 2.8.3 Determinação de tióis de baixo peso molecular por HPLC

Com o objetivo de avaliar os níveis de tióis de baixo peso molecular por HPLC presentes em extratos de parasitas, inicialmente foram determinados os tempos de retenção para os padrões a serem analisados. Cisteína, glutatona, homocisteína e tripanotona (Sigma<sup>®</sup>, concentração final 5  $\mu$ M) foram previamente derivatizados com a sonda fluorescente monobromobimane (Sigma<sup>®</sup>) em tampão Hepes 40 mM – EDTA 4 mM pH 8 durante 3 min a 70 °C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético. Na cromatografia, a fase móvel consistiu no solvente A (0,25% ácido acético) e solvente B (100% acetonitrila). Como fase estacionária foi utilizada uma coluna C18 Luna 100 A 250 x 4,60 mm (Phenomenex, Torrance, CA, EUA). Os padrões foram separados utilizando o seguinte gradiente (em % de solvente B): 0-10 min, 0%; 10-40 min, 8%; 40-60 min, 15%; 60-70 min, 50%; 70-71 min, 0%; 71-80 min, 0%; 80,01 min. Os tióis foram detectados por fluorescência (excitação, 365 nm; emissão, 480 nm). Os extratos de parasitas foram preparados da seguinte forma: cada cultura foi lavada duas vezes por centrifugação com PBS e homogeneizadas em tampão de lise na presença de 1% de coquetel contendo inibidores de proteases (AEBSF, E-64, aprotinina, pepstatina A, leupeptina e cloridrato de bestatina, Sigma<sup>®</sup>). As células foram submetidas à lise por sonicação através de dois ciclos de 20 segundos com intervalos de descanso em gelo de 1 min entre cada um dos ciclos. Após centrifugação a 10000 x g por 30 min, os sobrenadantes contendo os extratos protéicos foram deproteinizados utilizando ácido tricloroacético 20%. Após centrifugação, os sobrenadantes foram derivatizados pela adição da sonda fluorescente monobromobimane em buffer Hepes 40 mM – EDTA 4 mM pH 8 durante 3 min a 70 °C. A reação foi interrompida pela adição de ácido acético.

## **CAPITULO 3: RESULTADOS**

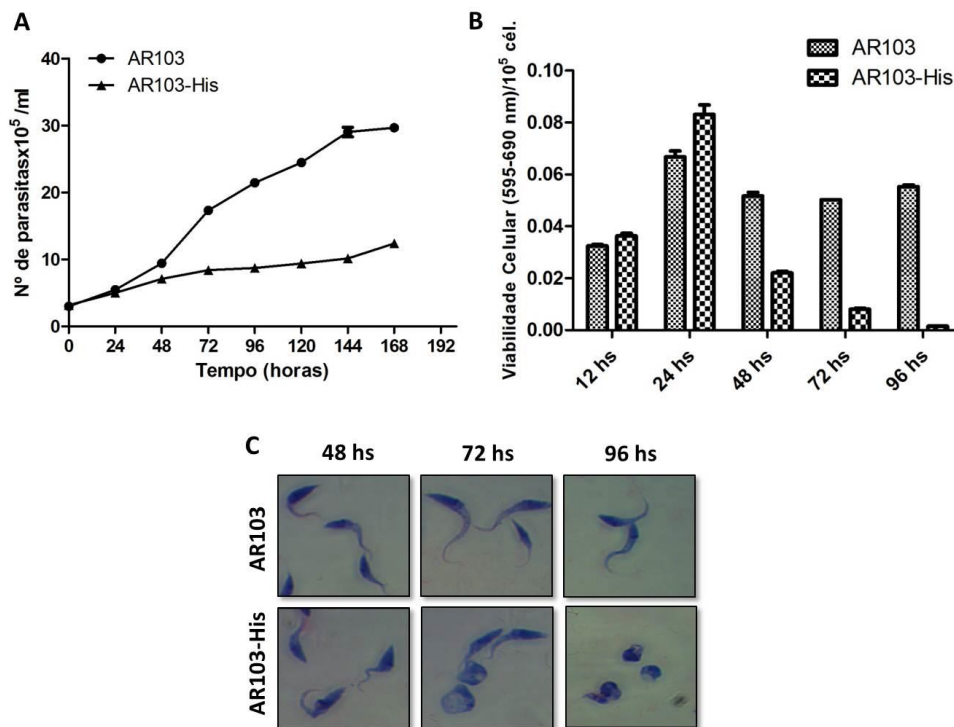
---

### 3.1 His: um aminoácido essencial para o *T. cruzi*?

Um aspecto importante referente a qualquer metabólito é saber se ele é ou não essencial para o organismo em estudo. No caso particular do metabolismo de His em *T. cruzi* a ausência de genes putativos para as enzimas clássicas de biossíntese desse aminoácido no genoma de *T. cruzi* foram o primeiro indício de que o parasita seria auxotrófico para esse aminoácido. Para avaliar se a incorporação de His desde o meio extracelular é essencial para a biologia de *T. cruzi* epimastigotas foram incubados em meio semi-definido AR103 (suplementado com 10% soro) contendo todos os aminoácidos (AR103) ou sem His na sua formulação (AR103<sup>His-</sup>).

#### 3.1.1 Crescimento e viabilidade de parasitas expostos a estresse nutricional pela carência de His

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram incubadas em meio AR103<sup>His-</sup> ou AR103 como controle. Os parasitas mantidos em AR103<sup>His-</sup> tiveram a sua proliferação diminuída em relação com aqueles incubados em meio controle (AR103) (Fig. 4A), o que permite inferir que esta condição configura uma situação de estresse nutricional. Para confirmar essa situação, esses mesmos parasitas foram avaliados, quanto sua viabilidade e morfologia após 12, 24, 48, 72 e 96 horas de incubação. Após 48 h de incubação em meio AR103<sup>His-</sup> começaram a ser observadas diferenças na viabilidade dos parasitas em relação ao controle, e após 96 h não foi detectada viabilidade celular nos parasitas submetidos a estresse, mostrando que a carência de His não só diminui o crescimento mas também compromete a viabilidade dessas células (Fig. 4B). As observações por microscopia de luz mostraram também que após 48 h de serem submetidos a estresse, os parasitas sofreram mudanças morfológicas (Fig. 4C): com o decorrer do tempo, os parasitas adquirem formas arredondadas, diminuem o volume celular, até apresentar lise celular, mudanças que não foram observadas nos parasitas cultivados no meio AR103 completo.



**Figura 4:** A. Curvas de crescimento de epimastigotas incubados em AR103 e AR103<sup>His-</sup> obtidas pela contagem diária em câmara de Neubauer. B. Viabilidade celular de parasitas depletados do aminoácido His durante 12, 24, 48, 72 e 96 horas. Como controle, AR103 completo. Para cada experimento foi feito um ajuste de acordo com o número de parasitas. C. Imagens de microscopia mostrando as alterações morfológicas ocorridas pelos parasitas submetidos a estresse nutricional induzido pela carência de His.

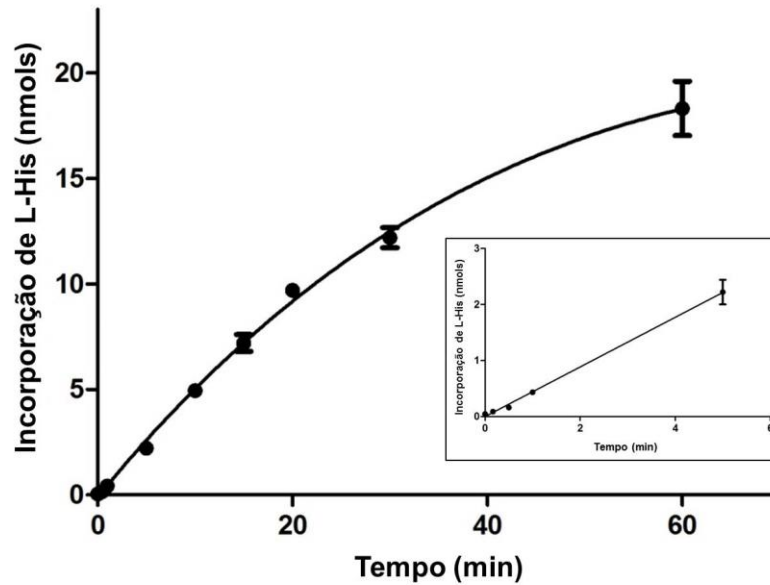
### 3.2 Caracterização bioquímica do transporte de His em epimastigotas de *T. cruzi*

#### 3.2.1 Cinética

Devido ao fato do suplemento de His ser relevante no crescimento e manutenção celular de formas epimastigotas de *T. cruzi*, e ao fato de que a utilização de um metabólito depende da sua internalização por parte da célula, resolvemos estudar como essa internalização é realizada. Para iniciar a caracterização do processo de transporte de His, utilizaram-se condições iniciais de concentração de substrato presumivelmente saturantes. A ausência de trabalhos prévios descrevendo o transporte de His em organismos relacionados ao *T. cruzi*, forçou-nos a escolher condições iniciais já descritas para outros transportadores (Silber et al., 2006; Silber et al., 2002). Nesse sentido, a dependência do transporte de His em função do tempo, foi medida utilizando-se uma concentração de substrato de 3 mM. A incorporação de His ao longo do tempo ajustou a uma função de decaimento exponencial ( $R^2$  0,994), mostrando uma relação aproximadamente linear até 20 minutos de iniciado o transporte (Fig.

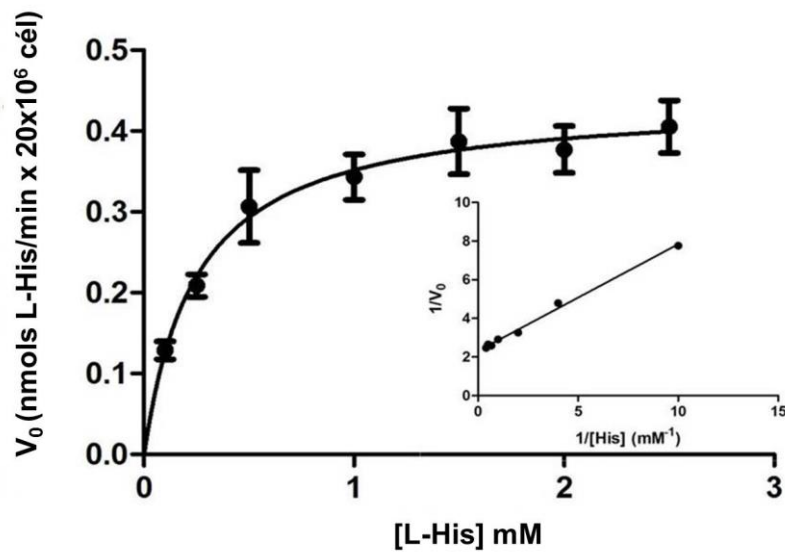


5). Baseados nesses resultados, foi escolhido um tempo apreciavelmente mais curto (60 segundos) para realizar medições confiáveis de  $V_0$  (velocidade inicial).



**Figura 5: Incorporação de His em função do tempo em epimastigotas de *T. cruzi*.** O transporte de His 3 mM marcada com  $[^{14}\text{C}]$ -His em função do tempo foi seguido como descrito em Materiais e Métodos. *Inset:* linearidade do transporte até 5 minutos ( $R^2$  0,998).

Para determinar a dependência do transporte de His com a concentração desse substrato,  $V_0$  foi medida em função da concentração extracelular de His. Os dados obtidos foram ajustados à função hiperbólica derivada do modelo cinético de Michaelis-Menten ( $R^2$  0,924, Fig. 6). A partir desses ajustes, foram obtidos os valores de  $V_{\text{max}}$  ( $0,24 \pm 0,023$ ) nmoles/min por  $20 \times 10^6$  células e  $K_M$  de ( $0,12 \pm 0,01$ ) mM. Foram confirmadas também as condições de saturação previstas, utilizadas nas curvas de progresso, já que foram realizadas a uma concentração de 3 mM, o que representa 25 vezes o valor do  $K_M$ . O tipo de ajuste utilizado permite inferir também um único sistema de transporte saturável de His.

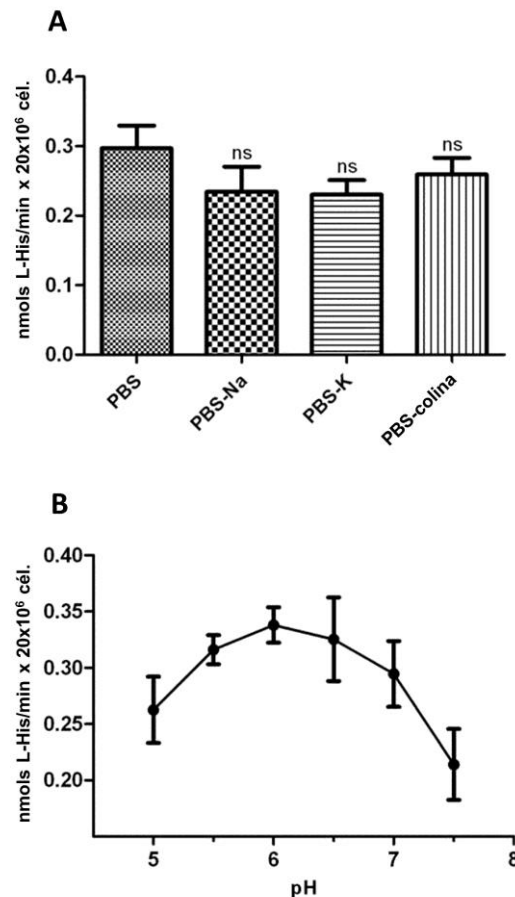


**Figura 6: Efeito da concentração de substrato no transporte de His em epimastigotes de *T. cruzi*.** A velocidade inicial da incorporação de His ( $V_0$ ) foi medida como uma função da concentração de substrato como descrito em Materiais e Métodos. **Inset:** representação de Lineweaver-Burk para os dados obtidos ( $R^2$  0,99).

### 3.2.2 Mecanismo

Uma vez determinados os parâmetros cinéticos, foi possível analisar a atividade específica de transporte de His em diferentes condições metabólicas. Em transportadores que funcionam por difusão facilitada, o transporte do substrato depende das diferenças de concentração relativas entre o meio extracelular e o citoplasma da célula em estudo. Foi então analisado o efeito da depleção intracelular de His no transporte desse aminoácido. Para isso, formas epimastigotas foram pre-incubadas em PBS para promover o consumo da His intracelular livre presente no parasita. Posteriormente, foi medida a incorporação de His como já descrito, e comparada com a incorporação em parasitas incubados em meio LIT durante o mesmo tempo (controle). Não foram observadas diferenças entre ambas as condições (dados não mostrados) sugerindo que o transporte de His não estaria influenciado de forma direta pelo conteúdo intracelular de His, sendo pouco provável que esse processo aconteça por um mecanismo de difusão facilitada. Com o intuito de aprofundar nas bases bioquímicas do tipo de transporte, foi avaliado o efeito de cátions extracelulares na incorporação de His. Inicialmente foi avaliada a dependência em relação ao  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$ , utilizando tampões contendo só esses íons no ensaio de transporte. Não foram observadas diferenças significativas nas condições avaliadas, indicando que a incorporação de His é independente da presença desses íons no meio extracelular (Fig. 7A). Posteriormente, foi avaliado o transporte de His em

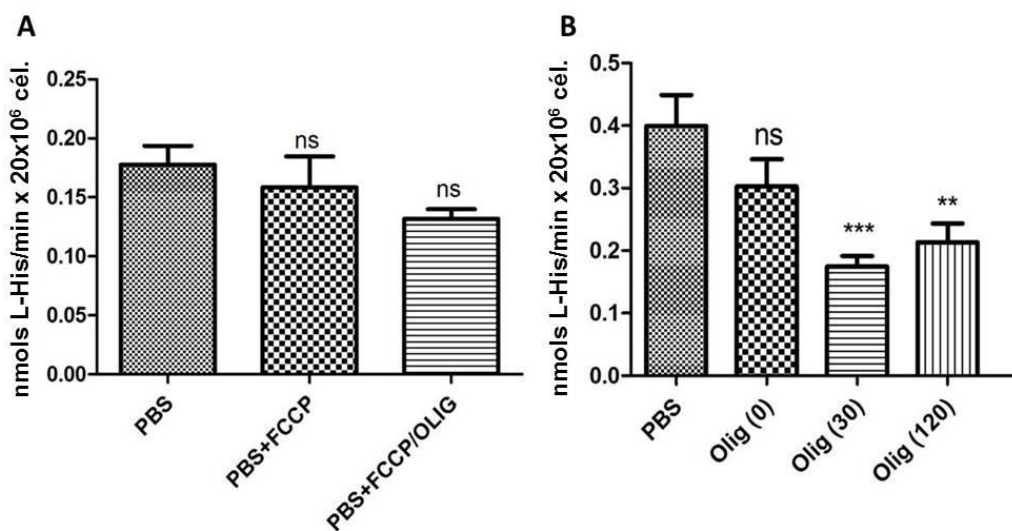
função do pH extracelular. Como observado na figura 7B, o transporte mostrou-se moderadamente dependente da concentração de  $H^+$  no meio extracelular, com um aumento na atividade a pH entre 5,5 e 6,5.



**Figura 7: Efeito de cátions extracelulares no transporte de His.** **A:** Efeito dos cátions divalentes  $Na^+$  e  $K^+$ : a velocidade inicial do transportador foi medida em tampão fosfato-salino (PBS), em tampões fosfato contendo só íons  $Na^+$  e  $K^+$  ou em tampão colina como controle (*post-test: Tukey*, ns:  $p > 0,05$ ). **B:** Dependência do transportador com o pH: a velocidade inicial do transportador foi medida entre os pHs 5 e 7,5 nos tampões PBS e citrato.

Baseados nesse resultado, nos perguntamos se o gradiente de prótons a través da membrana citoplasmática agiria como força motriz para o transporte de His. Para isso, a incorporação do aminoácido foi medida na presença do ionóforo FCCP. O desacoplamento do gradiente de  $H^+$  pelo FCCP pode desencadear uma rápida hidrólise de ATP pela ATPase mitocondrial para restabelecer o gradiente de  $H^+$ , depletando a célula de ATP (Nicholls et al., 1998). Para distinguir entre ambos os fenômenos, os parasitas foram incubados com FCCP em presença e ausência de oligomicina A, inibidor da fração  $F_0$  da ATP sintase. Em ambos os casos, não houve diferença significativa em relação ao controle (PBS), mostrando que o

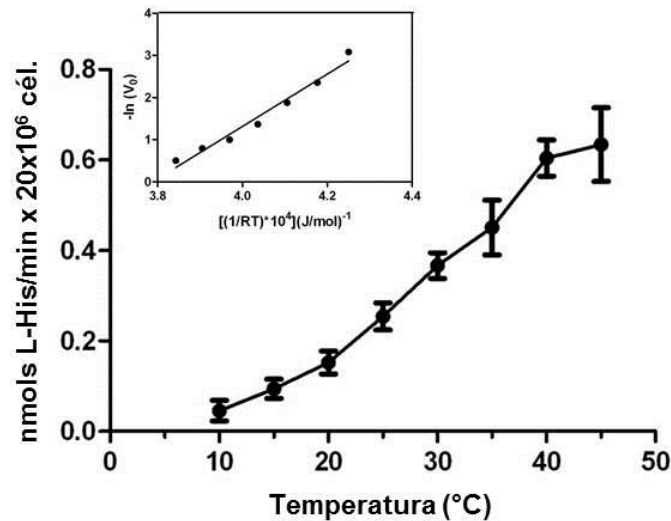
transporte de His é independente da força próton motriz (Fig. 8A). Finalmente, foi avaliada a possível dependência do transporte de His com relação ao ATP como fonte de energia. Para isso, os parasitas foram incubados em PBS-oligomicina A (5 µg/ml), e o transporte foi medido em diferentes tempos: imediatamente após a adição de oligomicina e após 30 e 120 min. Como mostra a figura 8B, após 30 minutos há uma inibição de aproximadamente 55% na incorporação de His, sendo o perfil de inibição mantido por 120 min, sugerindo a presença de um sistema de transporte dependente da energia do ATP para a incorporação de His.



**Figura 8: Determinação da força motriz para o transportador de His em epimastigotas de *T. cruzi*.** **A:** Efeito do FCCP no transporte de His. O desacoplamento do gradiente de prótons pelo ionóforo não altera a incorporação de His. **B:** Oligomicina A como inibidor do transporte: após 30 minutos de incubação com oligomicina, a incorporação de His é reduzida em aproximadamente 55%, mostrando a dependência do processo com o ATP como fonte de energia (*post-test: Tukey*. \*\*\* valor de  $p < 0,0001$ , \*\* valor de  $p < 0,001$ , ns: valor de  $p > 0,05$ , em relação ao PBS).

### 3.2.3 Termodinâmica

O efeito da temperatura na incorporação de His foi avaliado medindo o transporte entre 10 e 45 °C. O transporte de His teve um incremento linear entre 10 e 40 °C. A 45 °C não foi observado um incremento significativo e não foi detectada uma diminuição, o que provavelmente indica que a essa temperatura se atinge uma situação de equilíbrio entre o aumento da velocidade de transporte e a desnaturação das proteínas envolvidas (Fig. 9). A energia de ativação para a incorporação de His foi calculada utilizando os dados presentes na região linear do gráfico, a través da equação de Arrhenius, obtendo-se um valor de  $(55,25 \pm 4,21)$  kJ/mol de His (Fig. 9, *inset*).



**Figura 9: Dependência da incorporação de His com a temperatura.** O transporte foi realizado variando a temperatura do ensaio entre 10 e 45 °C. *Inset:* determinação da energia de ativação através do gráfico de Arrhenius ( $r^2=0,97$ ).

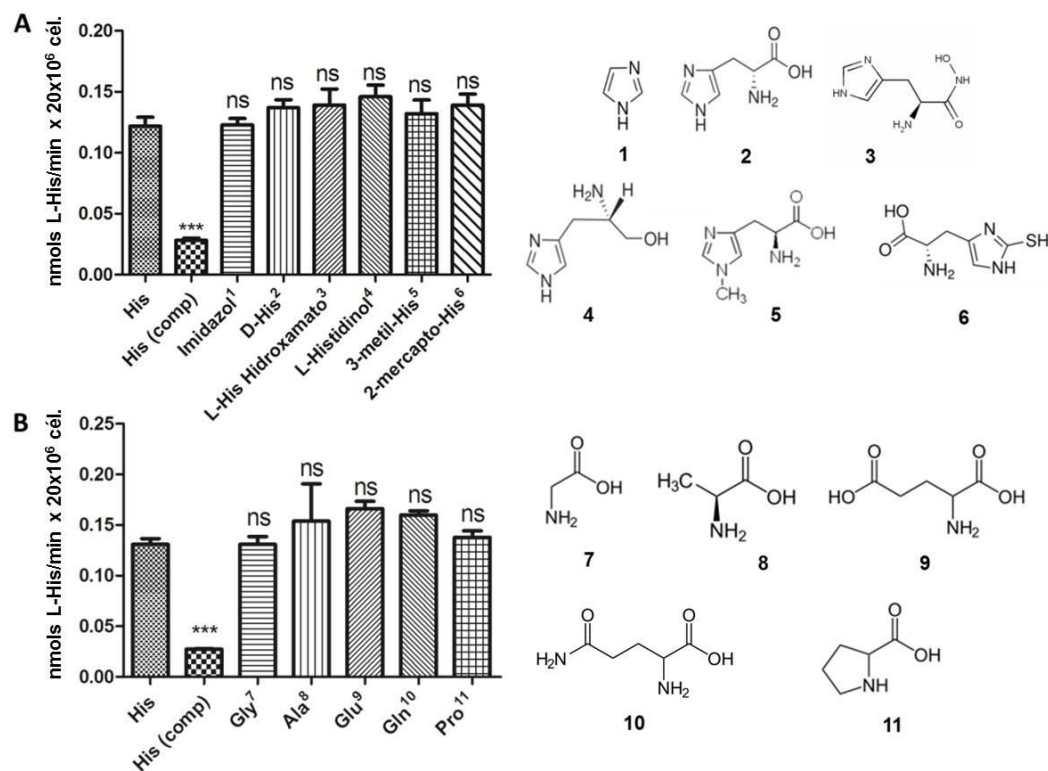
### 3.2.4 Transporte de His em tripomastigotas metacíclicos

Uma vez caracterizado o transporte de His em formas epimastigotas foi de nosso interesse avaliar essa atividade em formas tripomastigotas metacíclicas. Essas formas foram obtidas por diferenciação *in vitro* em meio Grace, como descrito em materiais e métodos, e foi avaliada nelas a atividade específica do transportador de His. Os epimastigotas apresentaram aproximadamente 75% mais atividade que as formas metacíclicas, sugerindo uma maior dependência dessa atividade nas formas replicativas do parasita no hospedeiro invertebrado.

### 3.2.5 Especificidade

Para testar a especificidade do transportador de His, nos perguntamos se análogos estruturais teriam a capacidade de inibir competitivamente a incorporação de His. Para avaliar essa questão, as formas epimastigotas foram incubadas com uma concentração de His equivalente ao  $K_M$  (0,12 mM) na presença dos possíveis competidores em concentração 10 vezes maior. Como controle positivo de inibição, foi adicionada His não marcada na mesma concentração que os competidores para mostrar que a incorporação (da marcação radioativa) pode ser inibida. Nenhum dos análogos testados mostrou capacidade inibitória no transportador de His (Fig. 10A). Devido ao fato de análogos estruturais de His não inibirem a incorporação, nos perguntamos se poderia existir algum tipo de inibição não competitiva,

gerada por outras moléculas metabolicamente relacionadas. Para responder essa hipótese, o ensaio de competição previamente descrito foi realizado na presença de aminoácidos selecionados em função da sua estrutura e da sua relação com o metabolismo da His. Glicina, o aminoácido estruturalmente mais simples, do qual esperaríamos ver inibição se o transportador fosse inespecífico e o único requerimento para o transporte fosse a presença de um grupo  $-NH_2$  e um  $-COOH$ ; alanina, um dos principais subprodutos do metabolismo energético; Glu, o produto final da via de degradação da His; Gln, outro aminoácido metabolicamente relacionado à His; e Pro, um importante aminoácido no metabolismo energético de *T. cruzi*, o qual pode ser sintetizado a partir de Glu no parasita. Como pode ser observado na figura 10B, nenhum dos aminoácidos testados competiu com His pelo seu transporte, sugerindo um transportador altamente específico para His.



**Figura 10: Avaliação da especificidade do transporte de His em *T. cruzi*.** **A.** Análogos estruturais como competidores: o transporte de His foi medido na presença dos análogos indicados na figura (painel direito), em uma concentração 10X superior à de His ( $K_m = 0,12$  mM). Nenhum dos compostos testados apresentou atividade inibitória. **B.** Aminoácidos como inibidores: seguindo a mesma metodologia descrita acima, foram avaliados os aminoácidos apresentados no painel direito. Nenhum dos aminoácidos apresentou atividade inibitória. Em ambos os casos, o controle positivo de inibição foi realizado utilizando His fria [His (comp)] como competidor (*post-test*: Tukey. \*\*\* valor de  $p < 0,0001$ , ns: valor de  $p > 0,05$ , em relação à His).

### 3.2.6. Incorporação de His a proteínas

Utilizando uma concentração saturável de His (3 mM) foi avaliada a incorporação de His radioativamente marcada à proteínas nas formas epimastigotas. Após 60 minutos de incubação, 20% da His transportada para o interior celular foi detectada em macromoléculas, enquanto que o 80% restante permaneceu na forma de metabólitos solúveis (dados não mostrados).

### 3.3 Identificação, clonagem e expressão das sequências codificantes para *TcHAL* e *TcUH*

Uma vez caracterizado o transporte de His para o interior da célula, foi do nosso interesse identificar e caracterizar as primeiras enzimas responsáveis pelo seu catabolismo, *TcHAL* e *TcUH*. Inicialmente foi confirmada em extratos proteicos de forma qualitativa a presença das atividades enzimáticas correspondentes a essas enzimas (dados não mostrados). Uma vez confirmados esses dados, iniciou-se uma busca sistemática nos bancos de dados do genoma de *T. cruzi* para genes putativos codificantes da *TcHAL* e a *TcUH*.

#### 3.3.1 Análises *in silico*

As sequências de aminoácidos da *TcHAL* (Tc00.1047053506247.220) e da *TcUH* (Tc00.1047053504045.110) foram analisadas inicialmente em bases de dados para tripanossomatídeos (TriTrypDB): foram encontradas sequências relacionadas à presença dessa via metabólica nas cepas de *T. cruzi* Dm28c, Sylvio, e Marinkellei, mostrando identidades entre 96 e 99% com a sequência presente na nossa cepa de estudo, CL14 (Tabela 4). Em relação a sequências ortólogas em outros tripanossomatídeos, apenas em duas espécies foram obtidas sequências relacionadas à degradação de His: *Trypanosoma rangeli* e *Trypanosoma grayi*. O gene ortólogo para HAL foi achado em ambas as espécies (Fig. 11A). Já o gene para UH foi achado apenas no genoma de *T. grayi* (Fig. 11B).



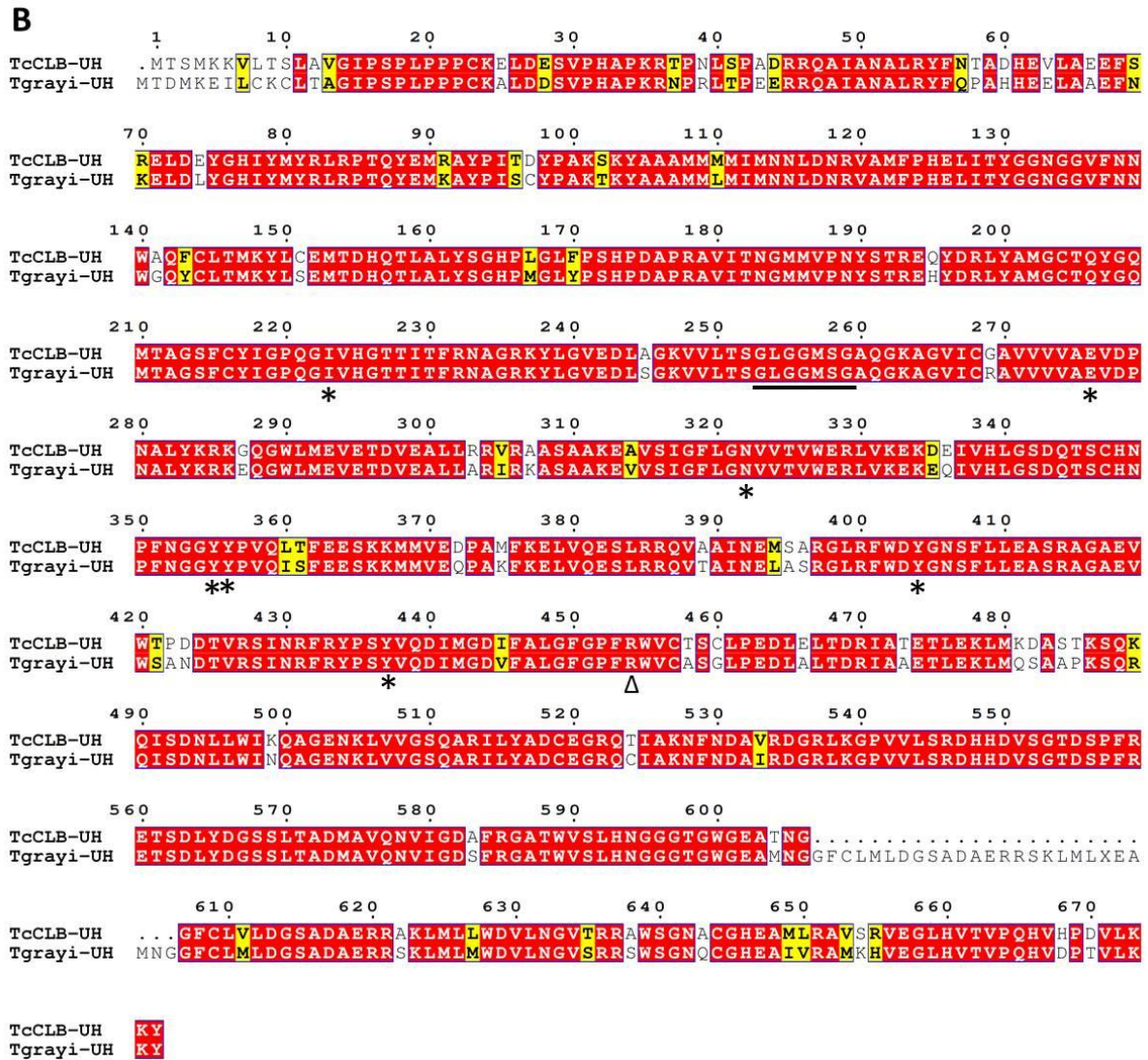
| Enzima    | <i>T. cruzi</i> |        |             | <i>T. grayi</i> | <i>T. rangeli</i> |
|-----------|-----------------|--------|-------------|-----------------|-------------------|
|           | Dm28c           | Sylvio | Marinkellei |                 |                   |
| TcCL14HAL | 99%             | 99%    | 96%         | 85%             | 83%               |
| TcCL14UH  | 99%             | 99%    | 96%         | 85%             | -                 |

**Tabela 4: Porcentagens de identidade das HAL e UH encontradas em outros tripanossomatídeos, obtidos pelo alinhamento das seqüências de aminoácidos presentes nas bases de dados. N° de acesso: HAL em DM28c, TCDM\_05967; HAL em *Sylvio*, TCSYLVIO\_004599; HAL em *Marinkellei*, TcMARK\_6123; HAL em *T. grayi*, Tgr.53.1090; HAL em *T. rangeli*, TRSC58\_01548. UH em Dm28, TCDM\_03984 e 03985; UH em *Sylvio*, TCSYLVIO\_006380; UH em *Marinkellei*, TcMARK\_5083; UH em *T. grayi*, Tgr.1215.1000.**



**Figura 11 A: Alinhamento das seqüências de aminoácidos das HAL presentes em três tripanossomatídeos. Em vermelho se indicam os aminoácidos idênticos entre as três seqüências, e em amarelo os aminoácidos conservados. No retângulo se destacam os três aminoácidos responsáveis pela formação do MIO.**





**Figura 11 B:** Alinhamento das sequências de aminoácidos das UH presentes em três tripanossomatídeos. Em vermelho se indicam os aminoácidos idênticos entre as duas sequências, e em amarelo os aminoácidos conservados. Com asteriscos e a barra se detalham os aminoácidos importantes para a união com NAD<sup>+</sup> e com um triângulo o resíduo envolvido na união do substrato.

Quando as sequências para *Tc*HAL e *Tc*UH foram comparadas com sequências ortólogas presentes em diferentes organismos a través do programa ClustalW observamos que as sequências de *T. cruzi* possuem uma porcentagem de identidade de 60% (*Tc*HAL) e 61% (*Tc*UH) com as correspondentes em *Homo sapiens* (Fig. 12A e B). Uma importante característica das HALs é o grupo prostético que elas possuem. O 3,5-diidro-5-metilidene-4H-imidazol-4-one (MIO) é gerado de forma pós-traducional pela ciclização do tripeptídeo interno Ala-Ser-Gly (ASG), seguido da eliminação de duas moléculas de água. Como pode ser observado na figura 12A (destacados no retângulo) estes resíduos se encontram altamente conservados em todas as sequências analisadas, incluindo a *Tc*HAL (também destacados no alinhamento entre tripanossomatídeos).

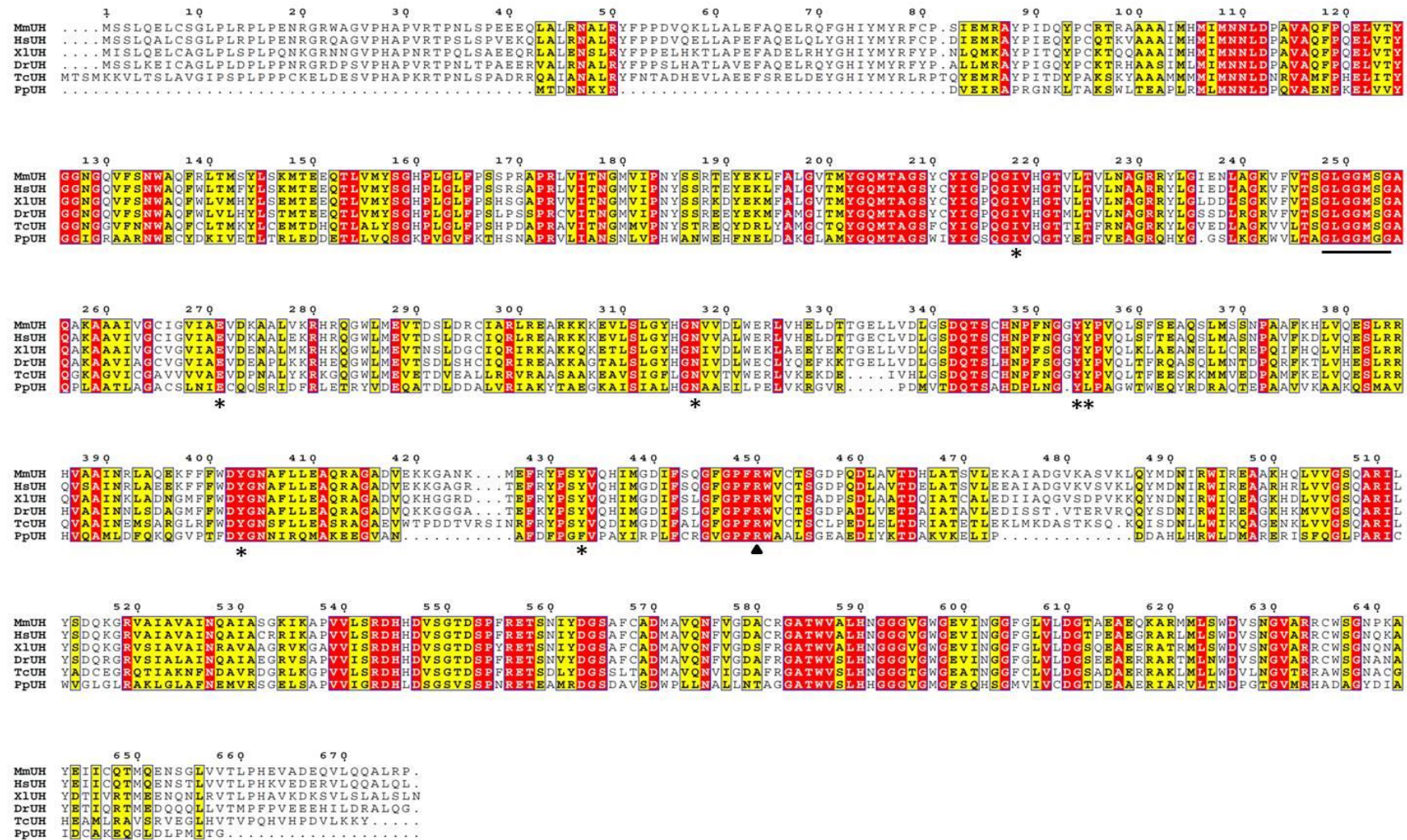
As UH também possuem um cofator incomum: essas enzimas se unem ao nicotinamida adenina dinucleotídeo ( $\text{NAD}^+$ ) de forma não covalente, o qual participa da catálise atuando como grupo eletrofílico na reação enzimática. O  $\text{NAD}^+$  se une via pirofosfatos numa região conservada rica em glicinas (marcada com uma barra na figura 12B). Além disso, formam-se interações do tipo ponte de hidrogênio e não polares com aminoácidos específicos (marcados com asteriscos na figura 12B). Estes resíduos foram encontrados na sequência da *Tc*UH, mostrando que a conservação desses sítios é necessária no processo catalítico mediado pela enzima de *T. cruzi*. Por outro lado, foi descrito que a Arg<sup>362</sup> (marcada com um triângulo na figura 12B) forma uma ponte salina (do inglês, *salt-bridge*) com o substrato urocanato. A presença desse resíduo também foi evidenciada na sequência da *Tc*UH (essas características também são marcadas no alinhamento entre tripanossomatídeos).

A presença de domínios protéicos conservados para ambas as sequências foi analisada mediante a utilização da base de dados Pfam (versão 25.0, *Sanger Institute*). Esta análise resultou na detecção dos domínios fenilalanina e histidina amônio-liase para *Tc*HAL (*PAL*, PF00221), e o domínio urocanase para *Tc*UH (PF01175). Nenhum outro domínio ou motivo para as duas sequências foi predito pela base de dados. Além disso, a predição de domínios transmembrana, utilizando o servidor TMHMM versão 2.0, foi realizada. O resultado dessa análise mostrou a ausência desse tipo de estruturas para ambas as proteínas segundo os algoritmos utilizados por esses programas.

A análise da sequência de aminoácidos através dos programas de predição da localização celular PSORT v. 6.4, TargetP v. 1.1 e Predotar v. 1.03 para as sequências de aminoácidos da *Tc*HAL e a *Tc*UH foi obtida. Em todos os casos, uma alta probabilidade para localização citoplasmática de ambas as proteínas foi observada.





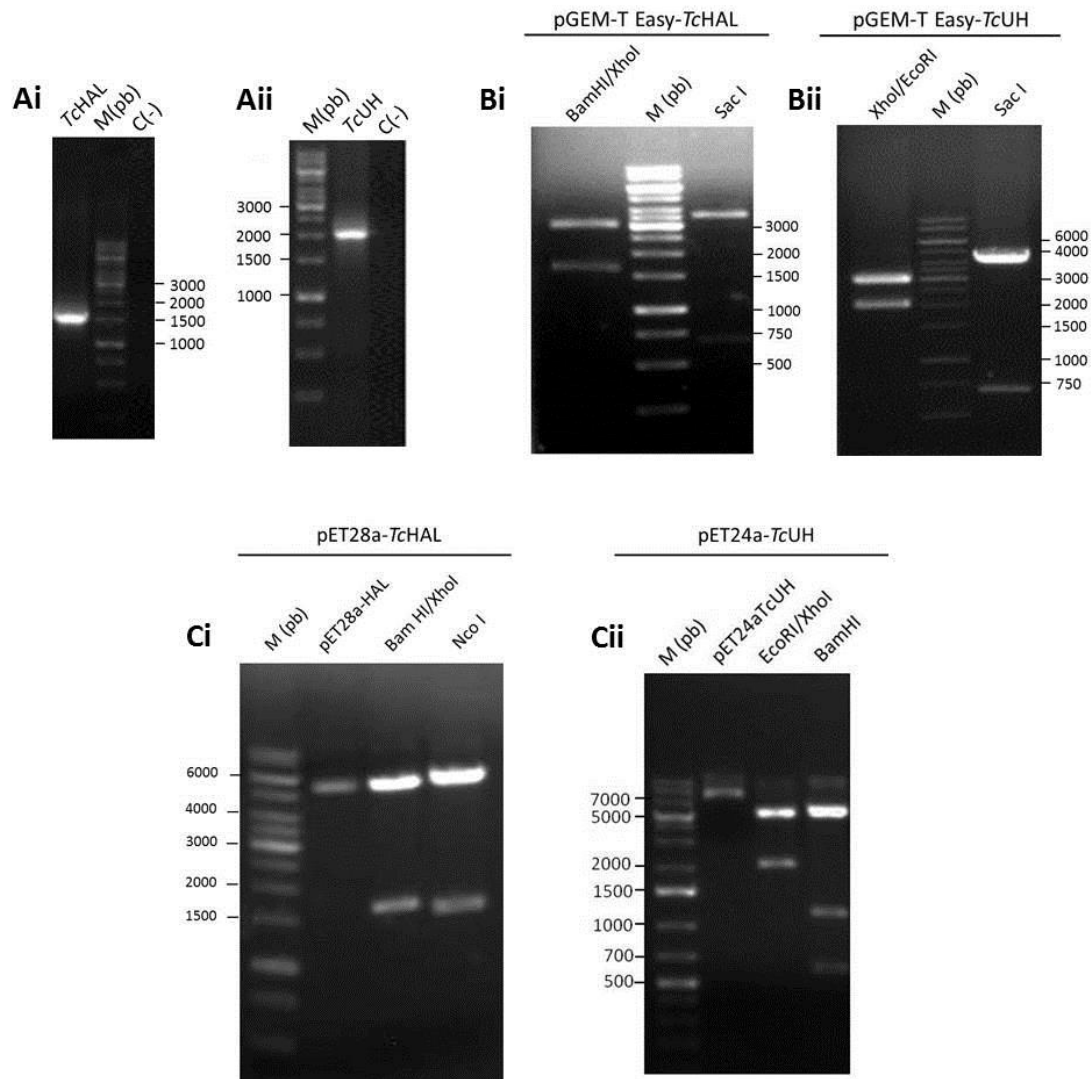


**Figura 12 B:** Alinhamento das sequências de aminoácidos da *TcUH* com alguns de seus ortólogos. Em vermelho se indicam os aminoácidos idênticos entre as seis seqüências, e que em amarelo os aminoácidos conservados. Com asteriscos se detalham os aminoácidos importantes para a união com  $\text{NAD}^+$  e com um triângulo o resíduo envolvido na união do substrato comentado no texto. *HsUH*, urocanato hidratase de *Homo sapiens* (NP\_653240.1); *MmUH*, urocanato hidratase de *Mus musculus* (NP\_659189.2); *XlUH*, urocanato hidratase de *Xenopus laevis* (NP\_001089654.1); *DrUH*, urocanato hidratase de *Danio rerio* (NP\_001128601.1); *TcUH*, urocanato hidratase de *Trypanosoma cruzi* (EAN 89283); *PpUH*, urocanato hidratase de *Pseudomonas putida* (AAA50311).

### 3.3.2 Identificação e clonagem

As sequências putativas para *TcHAL* (Tc00.1047053506247.220) e *TcUH* (Tc00.1047053504045.110) foram amplificadas por PCR usando DNA da cepa de *T. cruzi* CL14 (Fig. 13A). Após purificação a partir do gel de agarose, os fragmentos obtidos correspondentes a *TcHAL* e *TcUH*, foram clonados no vetor T pGEM-T Easy (Promega<sup>®</sup>) e o produto da reação de ligação foi utilizada para a transformação de bactérias *E. coli* DH5 $\alpha$ . Três clones positivos para cada transformação (pGEM-T-*TcHAL* e pGEM-T-*TcUH*) foram analisados pela técnica de PCR em colônia, utilizando os iniciadores correspondentes a cada gene (não mostrado). Posteriormente, um clone positivo foi escolhido por cada construção, e ambas foram isoladas e analisadas utilizando enzimas de restrição, obtendo os padrões de digestão esperados em cada caso (Fig. 13B).

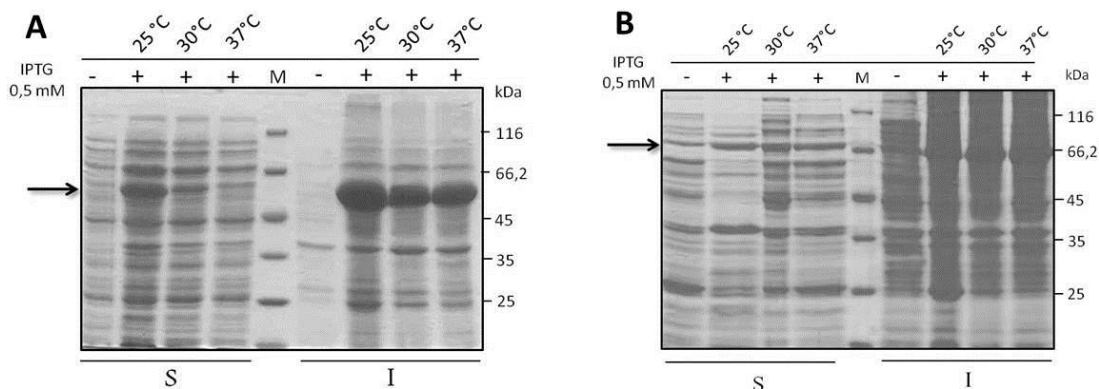
Para a obtenção das proteínas recombinantes *TcHAL* e *TcUH*, os genes correspondentes foram sub-clonados por corte e ligação no vetor de expressão pET28a e pET24a (Novagem<sup>®</sup>), respectivamente, usando as enzimas adequadas. Estes vetores permitem a expressão da proteína de interesse fusionada a seis resíduos de His no extremo N-terminal (pET28a) e no extremo C-terminal (pET24a). Após a transformação de *E. coli* DH5 $\alpha$  com essas construções, vários clones foram analisados por PCR em colônia e um deles, em cada caso, por corte com enzimas de restrição (Fig. 13C) e sequenciamento.



**Figura 13: Clonagem de *TcHAL* e *TcUH*.** **A:** Gel de agarose com os produtos obtidos na amplificação por PCR a partir do DNA genômico da cepa CL14. Em cada caso foram observados amplificadores com os tamanhos esperados para cada gene: (i) *TcHAL* (aproximadamente 1600 pb) e (ii) *TcUH* (aproximadamente 2000 pb), C(-), controle negativo da reação. **B:** Corte com enzimas de restrição para cada construção obtida após a clonagem em pGEM-T Easy. (i) fragmentos obtidos na digestão de pGEM-T Easy-*TcHAL* com as enzimas BamHI e XhoI, as quais liberam o inserto correspondente a *TcHAL* gerando produtos de aproximadamente 3000 e 1600 pb; e com SacI, a qual gera produtos de aproximadamente 3600, 720 e 300 pb (banda de baixa intensidade na figura). (ii): fragmentos obtidos na digestão de pGEM-T Easy-*TcUH* com as enzimas XhoI e EcoRI, as quais liberam o inserto correspondente a *TcUH* gerando produtos de aproximadamente 3000 e 2000 pb; e SacI, a qual gera produtos de digestão de aproximadamente 4300 e 690 pb. **C.** Corte com enzimas de restrição para cada construção obtida após a clonagem nos vetores pET28a e pET24a: géis de agarose mostrando os fragmentos obtidos após digestão das construções com enzimas de restrição. Em cada caso foram obtidos produtos de digestão com os tamanhos esperados. (i) Corte de pET28a-*TcHAL* com BamHI e XhoI: aproximadamente 1600 e 5300 pb; e NcoI: aproximadamente 1500 e 5400 pb. (ii) Fragmentos obtidos na digestão de pET24a-*TcUH* com as enzimas EcoRI e XhoI: aproximadamente 5000 e 2000 pb; e BamHI: aproximadamente 5000, 1100 e 600 pb.

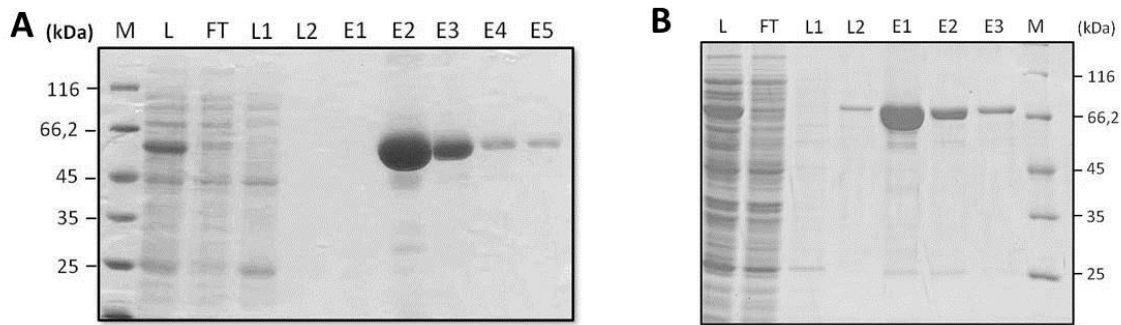
### 3.3.3 Expressão e purificação das *TcHAL* e *TcUH* recombinantes

Para a expressão das proteínas recombinantes *TcHAL* (*TcHALr*) e *TcUH* (*TcUhr*), foram transformadas células de *E. coli* da cepa BL21 codon plus (CP) com as construções pET28a-*TcHAL* e pET24a-*TcUH*. Inicialmente, foram avaliadas as condições ótimas para a expressão, modificando variáveis como temperatura e tempo de crescimento da cepa BL21 CP após a indução com 0,5 mM IPTG: 37° C durante 3 horas, 33° C durante 5 horas e 25° C com incubação por 16 horas. A expressão das proteínas recombinantes foi analisada mediante eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), comparando os extratos proteicos totais dos clones transformantes sem induzir e após indução com 0,5 mM de IPTG. Como se observa na figura 14 foi possível obter as proteínas recombinantes na fração solúvel dos extratos quando a expressão foi realizada incubando as células nas três condições avaliadas, assim como na fração insolúvel, mostrando a massa molecular esperada em cada caso (*TcHALr*: 62 kDa= ~58 kDa da *TcHAL* + ~4 kDa da etiqueta de 6 histidinas; e *TcUhr*: ~75 kDa= ~71 kDa da *TcUH* + ~4 kDa da etiqueta de 6 histidinas).



**Figura 14: Expressão da *TcHALr* (A) e *TcUhr* (B) em *E. coli*.** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) a partir de extratos protéicos obtidos na expressão das proteínas recombinantes nas diferentes condições avaliadas, assim como o controle sem induzir. A seta indica a posição da proteína expressa com a massa molecular esperada, aproximadamente 62 kDa para *TcHALr* e 75 kDa para *TcUH*. T.A.: temperatura ambiente, M: marcador de massa molecular, S: fração solúvel, I: fração insolúvel.

A partir desse resultado, procedeu-se à purificação das proteínas recombinantes mediante cromatografia de afinidade, utilizando uma coluna de Ni<sup>+2</sup>-agarose, expressando ambas as proteínas recombinantes pela incubação durante 16 h a 25 °C. Como mostra a figura 15, *TcHALr* e *TcUhr* foram obtidas em maior quantidade entre as frações 1 e 2, em concentrações variando entre 1 e 5 µg de proteína por µl de tampão de eluição.



**Figura 15: Purificação da *TcHALr* (A) e *TcUhr* (B).** Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) das diferentes frações obtidas na purificação das enzimas *TcHALr* e *TcUhr*. M: marcador de massa molecular, L: lisado clarificado após centrifugação do extrato protéico induzido com IPTG, FT: fração coletada após a passagem do lisado clarificado pela coluna de Ni<sup>+2</sup>-agarose, L1: fração coletada após a primeira lavagem com tampão de ligação, L2: fração coletada após a segunda lavagem com tampão de lavagem, E1-5: frações obtidas após o processo de eluição.

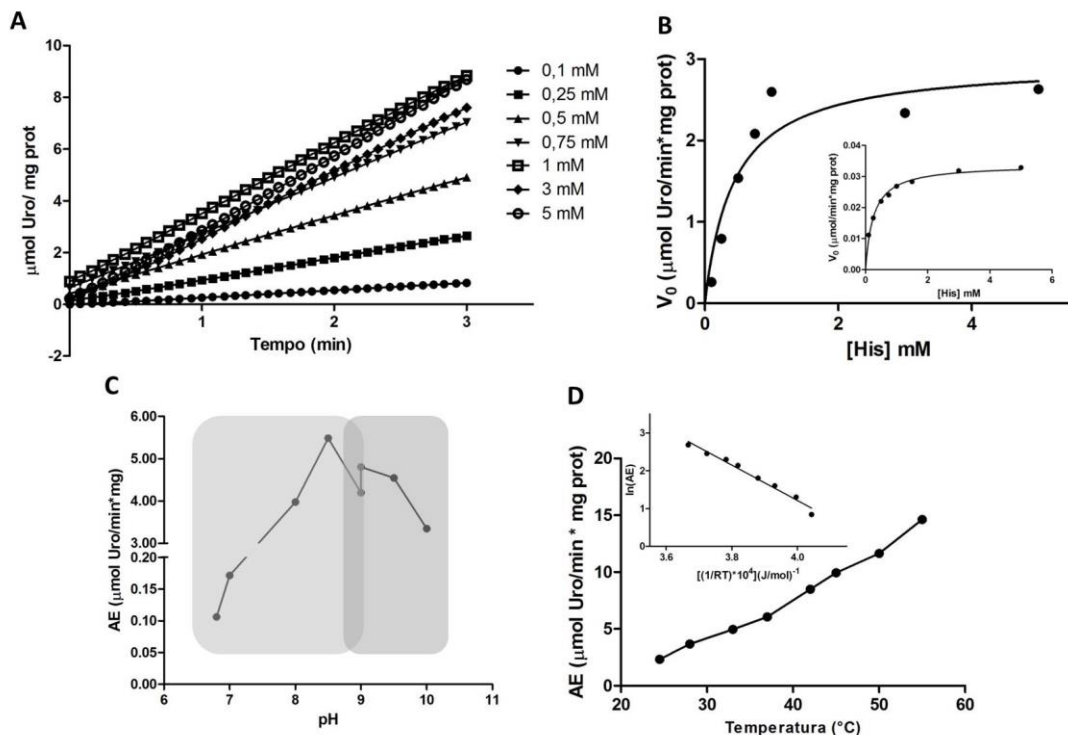
Em ambos os casos, as proteínas recombinantes purificadas foram dialisadas utilizando o mesmo tampão de eluição (20 mM Tris-HCl pH 7,4 e 500 mM NaCl) com concentrações decrescentes de imidazol: 400 mM, 300 mM, 150 mM e sem imidazol, em uma relação 1:1000. Devido às proteínas em estudo possuírem como substrato His ou urocanato (estrutura análoga à His) é de grande relevância eliminar o imidazol utilizado na eluição da proteína da coluna de purificação, já que esta molécula também é estruturalmente análoga à His, e poderia interferir nos ensaios de atividade. Para evitar a precipitação das proteínas fizeram-se dialises com o objetivo de manter as mesmas condições salinas da eluição, mas eliminar progressivamente o imidazol. Assim, utilizando o gradiente de imidazol na diálise as proteínas recombinantes se mantiveram solúveis.

### 3.4 Caracterização cinética e bioquímica da *TcHAL*

A partir do produto proteico recombinante obtido foi medida a atividade HAL como descrito em materiais e métodos. Os resultados obtidos mostraram que a enzima *TcHAL* apresenta uma cinética de formação de produto ajustável a uma curva hiperbólica segundo o modelo proposto por Michaelis-Menten. Os valores de  $K_M$  e  $V_{MAX}$  calculados para a enzima recombinante foram  $(0,77 \pm 0,33)$  mM e  $(4,03 \pm 1,87)$   $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , respectivamente (Fig. 16B). Quando medidos os mesmos parâmetros em extratos de formas epimastigotas obtivemos os valores de  $K_M$  aparente de  $(0,32 \pm 0,08)$  mM e  $V_{MAX}$  aparente de  $(0,03 \pm 0,01)$   $\mu\text{moles} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$  (Fig. 16B, *inset*).



Uma vez realizada a caracterização cinética, foram avaliados outros aspectos bioquímicos tais como a dependência da *TcHAL* recombinante com fatores como temperatura e pH. Observamos que *TcHAL* possui uma atividade maior numa faixa de pH básico, entre 8 e 9 (Fig. 16C) e que sua atividade depende linearmente com a temperatura entre os 25 e 55 °C (Fig. 16D). A partir dessas medições, foi calculada a energia de ativação ( $E_a$ ) utilizando a equação de Arrhenius, obtendo o valor de  $(39,8 \pm 6,1) \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$  (Fig. 16D, *inset*).

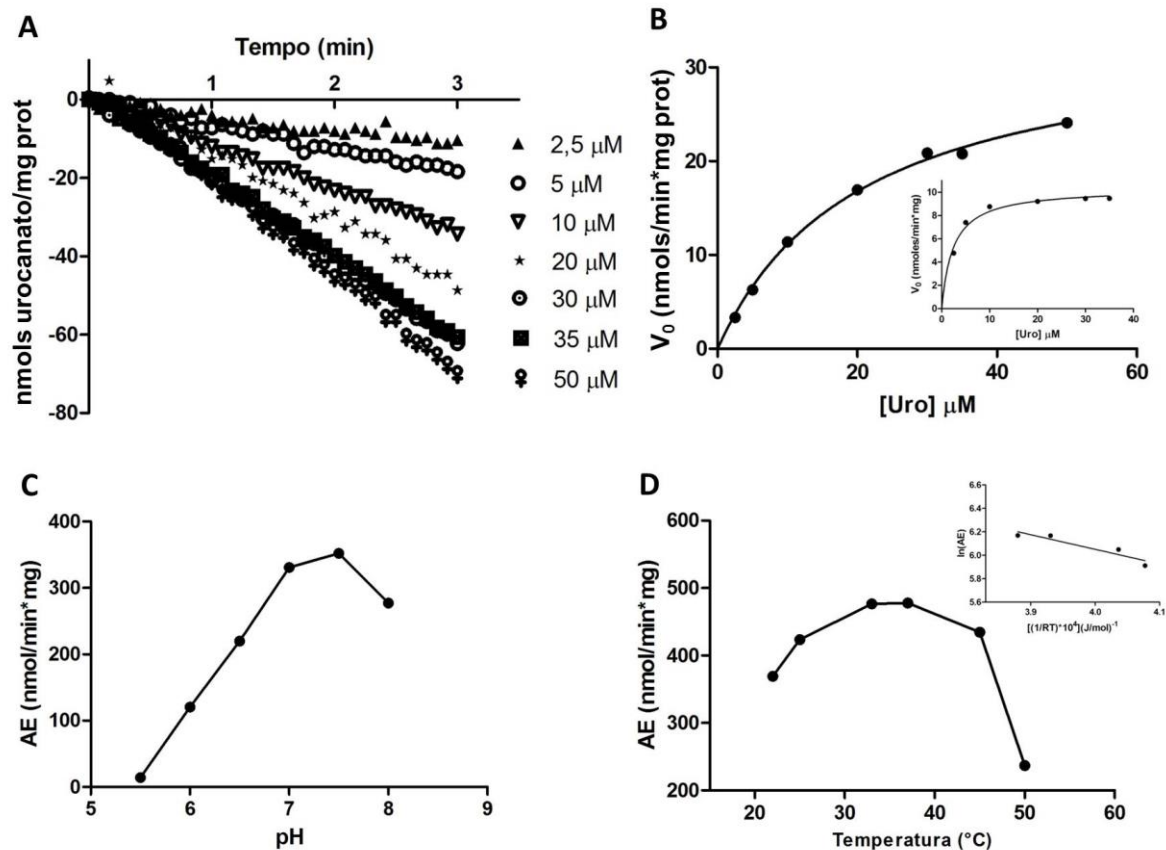


**Figura 16: Parâmetros cinéticos para a *TcHAL*.** **A:** Atividade da *TcHAL* em função do tempo. As medições de atividade foram realizadas a partir de ensaios espectrofotométricos em tempo real, monitorando o aumento na absorbância a 277 nm, correspondentes à conversão de His no produto urocanato (Mehler, 1953). A reação para *TcHAL* contém: 100 mM de tampão Tris-HCl pH=9; 0,1 mM de  $\text{MnCl}_2$ ; 1,7 mM de GSH reduzido, as concentrações finais de His indicadas; e água para completar um volume final de 1,5 ml. A reação foi iniciada pela adição da enzima recombinante *TcHAL* pura (10-40  $\mu\text{g}$ ) ou extrato proteico de epimastigotas (50-100  $\mu\text{g}$ ). O branco de cada reação foi a mesma combinação de reagentes sem a adição da enzima. A temperatura da reação foi 28 °C, com agitação contínua. A velocidade inicial da reação ( $V_0$ ) foi calculada na região de linearidade, utilizando o coeficiente de extinção molar para o urocanato ( $\text{CEM}_{277\text{nm}} = 1,88 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). **B:** Curva de Michaelis-Menten para *TcHAL* recombinante, *inset*: curva obtida quando utilizado o extrato proteico de epimastigotas. **C:** Dependência da *TcHAL* recombinante com o pH. Foram utilizados como tampões de reação Tris-HCl (pH 6,8-9, sombreado cinza claro) e CHES (ácido N-ciclohexil-2-aminoetanosulfônico) entre os pH 9-10, no sombreado cinza escuro. **D:** Dependência da *TcHAL* recombinante com a temperatura. A atividade da *TcHAL* foi medida na faixa de temperaturas entre 25 e 55 °C. O valor de energia de ativação foi calculado a partir do gráfico de Arrhenius (*inset*).

### 3.5 Caracterização cinética e bioquímica da *TcUH*

A partir da proteína recombinante obtida, foi medida a atividade da urocanato hidratase. Na figura 17B observamos que a enzima *TcUhr* apresenta uma cinética ajustável a uma curva

hiperbólica segundo o modelo de Michaelis Menten, com valores de  $K_M$  e  $V_{MAX}$  específica calculados correspondendo a:  $(19,07 \pm 2,09) \mu M$  e  $(39,9 \pm 4,06) \text{ nmols. min}^{-1} \cdot \text{mg de prot}^{-1}$ , respectivamente. Com o intuito de validar esses resultados, foi medida a atividade *TcUH* em extratos proteicos obtidos de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados mostraram que a enzima *TcUH* nativa apresenta uma cinética ajustável a uma curva hiperbólica, com valores de  $K_M$  e  $V_{MAX}$  específica de  $(2,72 \pm 0,47) \mu M$  e  $(10,59 \pm 0,37) \text{ nmols. min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ , respectivamente (figura 17 B, *inset*). Quando avaliada a dependência da *TcUH* recombinante com o pH, observamos um aumento na atividade entre os pH 7 e 8 (figura 17C), e quando avaliada a temperatura ótima, observamos que a atividade da *TcUH* recombinante depende com a temperatura, diminuindo a partir dos 45 °C (figura 17D). Utilizando os dados na região entre 22 e 37 °C foi calculada a energia de ativação a través da equação de Arrhenius, obtendo um valor de  $(11,7 \pm 1,1) \text{ kJ/mol}$ .



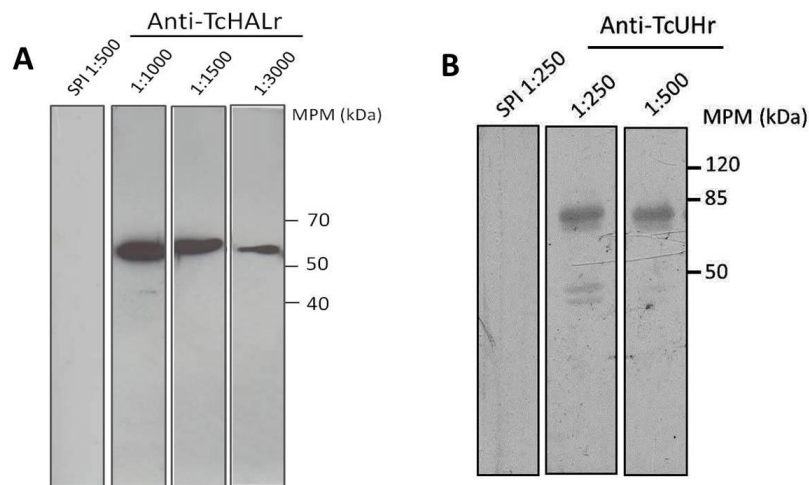
**Figura 17: Parâmetros cinéticos para a TcUH.** **A:** Atividade da TcUH recombinante em função do tempo. As medições de atividade foram feitas através de ensaios espectrofotométricos em tempo real, monitorando a diminuição na absorbância a 277 nm, correspondentes ao desaparecimento do substrato urocanato (Mehler, 1953). A reação para TcUH contém: 100 mM de tampão fosfato de potássio pH=7; urocanato, na concentração indicada em cada caso, e água para completar um volume final de 1,5 ml. A reação foi iniciada pela adição de enzima recombinante (10-100  $\mu\text{g}$ ) ou extrato proteico de epimastigotas (100  $\mu\text{g}$ ). O branco de cada reação foi a mesma combinação de reagentes sem a adição da enzima. A temperatura da reação foi 28  $^{\circ}\text{C}$ , com agitação contínua. A velocidade inicial da reação ( $V_0$ ) foi calculada na região de linearidade, utilizando o coeficiente de extinção molar para o urocanato ( $\text{CEM}_{277\text{nm}} = 18800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). **B:** Curva de Michaelis-Menten para TcUH recombinante, *inset*: curva obtida quando utilizado o extrato proteico de epimastigotas. **C:** Dependência da TcUH recombinante com o pH. Foi utilizado tampão fosfato de potássio 100 mM nos pH indicados. **D:** Dependência da TcUH recombinante com a temperatura. A atividade da TcUH foi medida na faixa de temperaturas entre 25 e 50 $^{\circ}\text{C}$ . O valor de energia de ativação foi calculado a partir do gráfico de Arrhenius (*inset*).

### 3.6 Expressão e localização sub-celular das TcHAL e TcUH em epimastigotas de *T. cruzi*

#### 3.6.1 Obtenção de anticorpos específicos contra TcHAL e TcUH

Para a produção de anticorpos policlonais contra TcHAL e TcUH, foi realizada a imunização de camundongos com ambas as proteínas recombinantes. Ambos os soros foram titulados avaliando diferentes diluições, contra extratos protéicos totais de epimastigotas. Ambos os soros reconhecem positivamente uma única proteína do tamanho esperado para

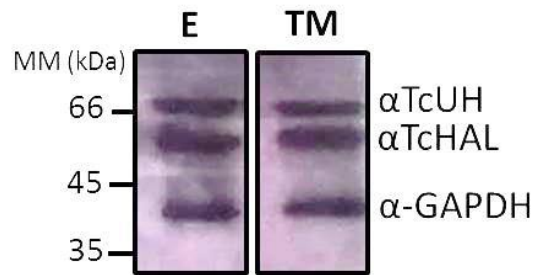
cada caso (~58 kDa para *TcHAL* e ~72 kDa para *TcUH*) na maior diluição analisada (1:3000) para anti-*TcHAL* e para anti-*TcUH* (1:500) (Fig. 18).



**Figura 18: Ensaios de *western blotting* para titulação de soros policlonais. A:** Titulação do soro anti-*TcHAL*. As membranas com extratos de epimastigotas foram incubadas com soro pré-imune (SPI) em uma diluição 1:500, e com diferentes diluições do soro anti-*TcHAL*. Como observado, até na maior diluição avaliada (1:3000) observou-se uma banda imunoreativa do tamanho esperado (aproximadamente 58 kDa). **B:** Titulação do soro anti-*TcUH*. As membranas com extratos de epimastigotas foram incubadas com soro pré-imune (SPI) em uma diluição 1:250, e com diferentes diluições do soro anti-*TcUH*. Como observado, incluindo a maior diluição avaliada (1:500) observou-se uma banda imunoreativa do tamanho esperado (aproximadamente 72 kDa).

### 3.6.2 Análise da expressão proteica da *TcHAL* e *TcUH* nas formas presentes no hospedeiro invertebrado

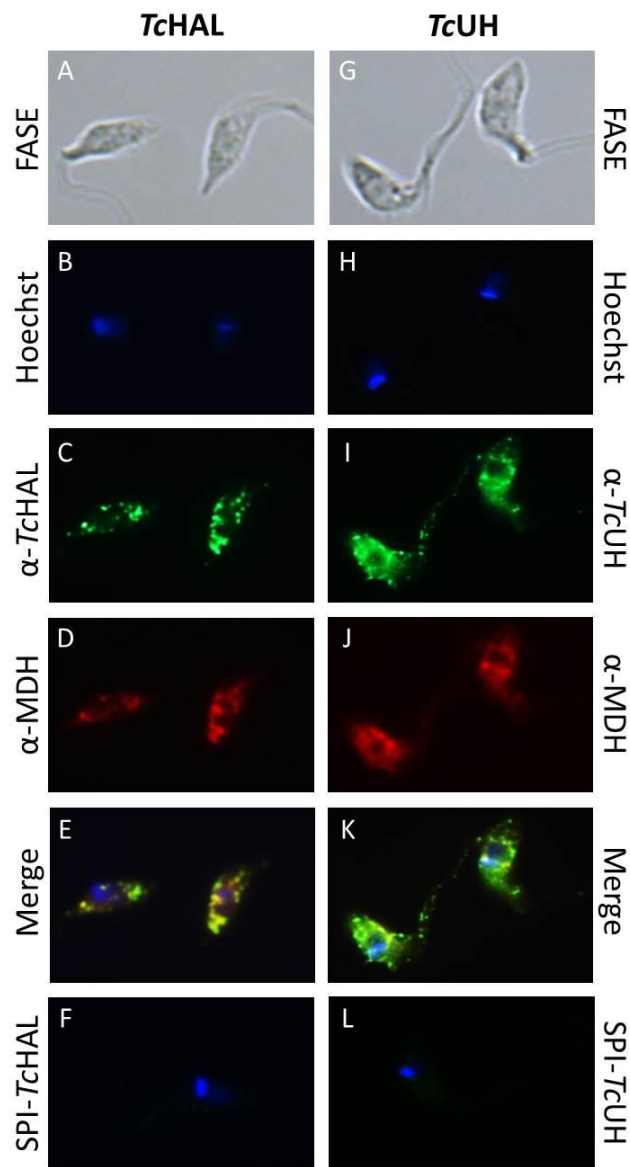
Como descrito na introdução, as enzimas *TcHAL* e *TcUH* são mais expressas nos estágios presentes no inseto vetor. Para corroborar, os soros policlonais obtidos foram utilizados nas diluições determinadas anteriormente para analisar a expressão da *TcHAL* e *TcUH* em extratos proteicos totais de formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos obtidos pela diferenciação em TAU-3AAG. Como se observa na figura 19, ambas as formas apresentam expressão tanto da *TcHAL* quanto da *TcUH*, não havendo diferenças entre ambas. Como normalizador da quantidade de proteína utilizou-se o anticorpo anti-GAPDH.



**Figura 19: Expressão das *TcHAL* e *TcUH* nas formas presentes no hospedeiro invertebrado.** Ambas as proteínas são expressas nos dois estágios analisados (*TcHAL*=58 kDa, *TcUH*=72 kDa). O anticorpo  $\alpha$ *TcGAPDH* foi utilizado como normalizador. E: epimastigotas, M: tripomastigotas metacíclicas.

### 3.6.3 Localização subcelular da *TcHAL* e *TcUH* em epimastigotas de *T. cruzi*

Um dos aspectos importantes na análise de vias metabólicas é o compartimento subcelular onde elas acontecem. Sob a hipótese do metabolismo de His ser relevante na bioenergética de epimastigotas de *T. cruzi*, avaliamos a localização subcelular das enzimas *TcHAL* e *TcUH*. Tanto a *TcHAL* quanto a *TcUH* mostraram um padrão de localização citoplasmático (Fig. 20C e I), co-localizando com a enzima malato desidrogenase, isoforma citoplasmática (*TcMDHc*, E e K). O soro pré-imune, usado como controle negativo, não apresentou reação de fluorescência (F e L). Como marcador do DNA do cinetoplasto e do núcleo foi utilizada a sonda Hoechst 33258 (B e H). Ambas as enzimas não co-localizaram com a marcação obtida para o núcleo ou cinetoplasto, como observado pela fluorescência obtida com Hoechst.



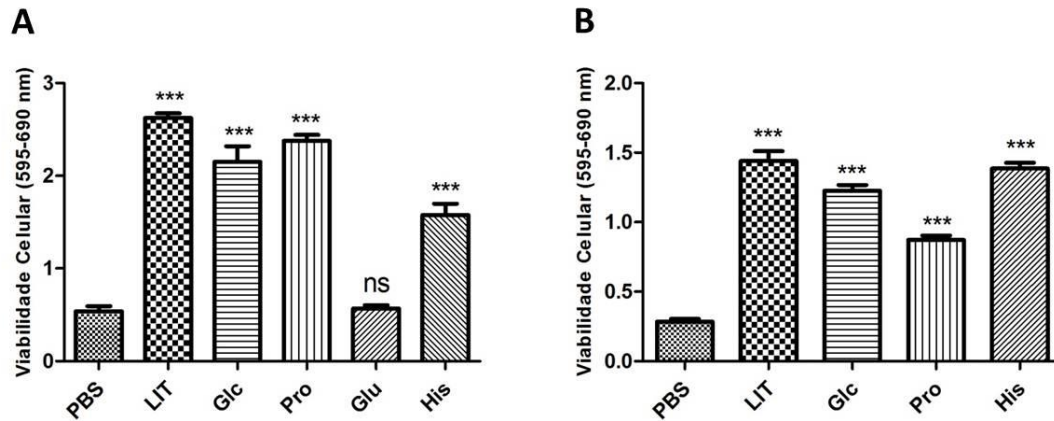
**Figura 20: Imunofluorescência indireta para TcHAL e TcUH nas formas epimastigotas do *T. cruzi*.** As células foram incubadas com soro anti-TcHAL (1:100) e anti-TcUH (1:200), junto ao soro anti-TcMDHc (1:20) como marcador de localização citoplasmática. Posteriormente foram lavadas e incubadas com anticorpo secundário anti- imunoglobulina G de camundongo conjugado a Alexa Fluor® 488 ou anti-imunoglobulina G de coelho conjugado à Alexa Fluor® 546 na diluição de 1:400. O DNA (nucleo e cinetoplasto) foi marcado utilizando Hoechst 33258 na diluição 1:2000 (Invitrogen). A colocalização de imagens foi feita utilizando o software ImageJ (NIH).

### 3.7 Avaliação da via His-Glu como fonte de energia para epimastigotas de *T. cruzi*

Os resultados obtidos até agora demonstram que formas presentes no hospedeiro vetor, principalmente epimastigotas, estariam adaptadas ao consumo de His, aminoácido relatado como abundante no meio extracelular onde essas formas se desenvolvem. Para avaliar essa possibilidade, a capacidade da His para funcionar como fonte de carbono e energia, e para manter as células viáveis em situação de estresse metabólico severo foi avaliada.

### 3.7.1 Avaliação da capacidade da His para estender ou reestabelecer a viabilidade celular em parasitas submetidos a estresse metabólico

Formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase exponencial de crescimento, crescendo em meio LIT, foram transferidas a PBS suplementado ou não com His em concentrações saturantes para o seu transporte. Outros substratos com conhecida capacidade de estender a sobrevivência dessas células em condições de estresse metabólico (Glc, Pro, e Glu) foram simultaneamente avaliados para efeitos comparativos. Após 24 horas de incubação nessas condições, a viabilidade celular dos parasitas foi avaliada, observando-se que His foi capaz de ser incorporada e utilizada pelo parasita para estender sua viabilidade. O mesmo foi observado, como esperado, para os parasitas incubados em meio LIT, e em Glc e Pro, fontes de energia amplamente descritas para o parasita (Fig. 21A). Posteriormente, avaliamos se além de manter o parasita viável, a His seria capaz de reestabelecer a viabilidade após um longo período de estresse nutricional. Para isso, o mesmo experimento foi realizado, dessa vez, partindo de parasitas previamente estressados nutricionalmente pela incubação por 30 horas em PBS. Essa condição tem como objetivo a exaustão de metabólitos intracelulares mantendo o parasita viável capaz de responder a um novo estímulo metabólico. Quando avaliada a viabilidade, observamos que a His foi capaz de recuperar significativamente os epimastigotas submetidos a estresse, de forma comparável ao meio LIT ou aos parasitas recuperados em Glc. Interessantemente, His parece ser mais eficiente que a Pro na recuperação de parasitas estressados nutricionalmente (Fig. 21B).



**Figura 21: Avaliação da viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* na presença de His.** **A.** Ensaio de MTT em epimastigotas em fase exponencial de crescimento incubados em PBS suplementado. Parasitas inicialmente cultivados em meio LIT foram transferidos a PBS suplementado (ou não, controle negativo) com diferentes substratos: Glc, Pro, Glu e His, e incubados por 24 horas. Como controle positivo, uma fração de parasitas foi mantida em meio LIT. **B.** Ensaio de MTT em epimastigotas estressados nutricionalmente em PBS e recuperados. Parasitas inicialmente cultivados em meio LIT foram transferidos a PBS e estressados durante 30 horas. Após esse tempo, foram adicionados diferentes substratos: Glc, Pro e His, e incubados por 24 horas. Como controle positivo, uma fração de parasitas foi mantida em meio LIT (*post-test: Tukey*. \*\*\* valor de  $p < 0,0001$ , ns: valor de  $p > 0,05$ , em relação ao PBS).

### 3.7.2 Medida da produção de $CO_2$ gerado pela oxidação da His

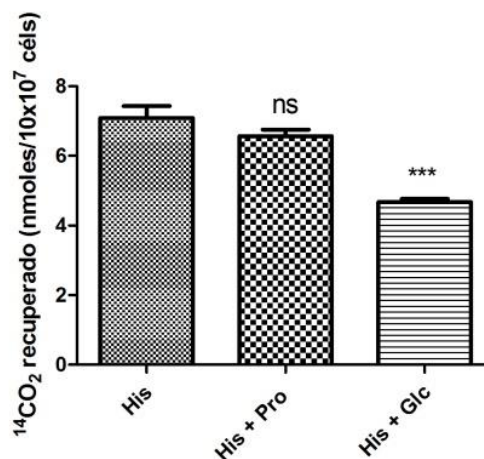
A conversão da His em Glu e posteriormente a  $\alpha$ -KG fariam desse aminoácido um substrato oxidável no TCA. Assim, a incorporação e consumo de His marcado uniformemente com  $^{14}C$ , deveria gerar  $^{14}CO_2$ . Para validar esta hipótese, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram incubadas com His 3 mM marcada radioativamente e foi “capturado” o  $^{14}CO_2$  produzido. A quantidade de  $^{14}C$  recuperada como  $CO_2$  após 60 min de incubação foi o equivalente à oxidação completa de 11,2 nmols de His ( $\pm 1,7$ ) por cada  $100 \times 10^6$  células, e após 240 min (4 horas), aproximadamente 46,5 nmols ( $\pm 0,6$ ) mostrando uma evolução linear da produção de  $CO_2$  a partir de His em relação ao tempo de incubação (Tabela 5). Em ensaios de transporte observamos que durante 60 min são incorporados em média, 35,8 ( $\pm 5,3$ ) nmols de His por cada  $20 \times 10^6$  células. Com base no número de células utilizado no presente experimento ( $100 \times 10^6$  células), observamos que aproximadamente 30% da His transportada seria convertida a  $CO_2$ . Esses resultados em conjunto demonstram a utilização de His como fonte de carbono oxidável em epimastigotas de *T. cruzi*.



| Tempo (min) | $^{14}\text{C}$ recuperado como $\text{CO}_2$ (nmols/ $10 \times 10^7$ parasitas) | His incorporada (nmols/ $10 \times 10^7$ parasitas) | % His |
|-------------|---|---|-------|
| 60          | $11,16 \pm 1,67$  | $35,8 \pm 5,29$                                     | 31,14 |
| 240         | $46,47 \pm 0,56$  |   |       |

**Tabela 5:** Produção de  $^{14}\text{CO}_2$  por epimastigotas de *T. cruzi* incubados em [ $^{14}\text{C}$ ]-His.

Para avaliar uma possível interferência de outros metabólitos oxidáveis pela célula na degradação e metabolismo da His, o experimento de captura de  $\text{CO}_2$  gerado pela oxidação da His foi realizado na presença de Glc ou Pro, durante uma hora. Nessa condição a Pro não mostrou nenhum tipo de inibição da oxidação de His, pois não foram detectadas diferenças no  $^{14}\text{CO}_2$  capturado. Quando Glc é introduzida no sistema, observamos uma diminuição na oxidação da His de aproximadamente 34%, sugerindo que poderia existir algum tipo de interação entre os metabolismos de His e Glc (Fig. 22).

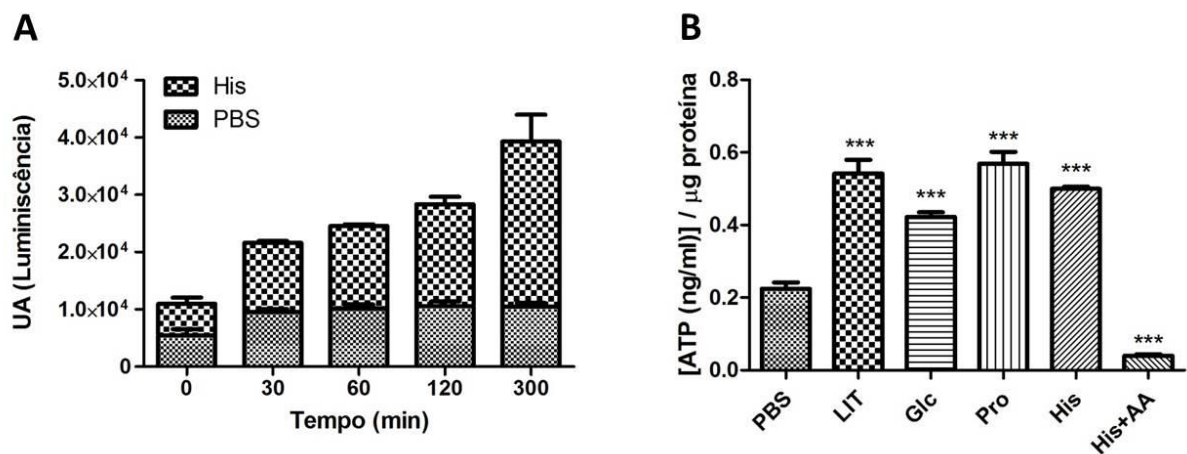


**Figura 22:** Produção de  $^{14}\text{CO}_2$  por epimastigotas de *T. cruzi* incubados em [ $^{14}\text{C}$ ]-His 3 mM na presença de diferentes substratos oxidáveis. O  $^{14}\text{CO}_2$  foi capturado durante uma hora na presença de Pro ou Glc (*post-test*: Tukey). \*\*\* valor de  $p < 0,0001$ , em relação à His).

### 3.7.3 Produção de ATP a partir do catabolismo da His

Canonicamente, a única via de oxidação total de His a  $\text{CO}_2$  requer a sua conversão em Glu e posteriormente em  $\alpha$ -KG, o que seria metabolizado via TCA. Portanto, a comprovação da oxidação de His a  $\text{CO}_2$  permite inferir que esta via é operativa. Por sua vez, os equivalentes de redução gerados deveriam ser capazes de abastecer a cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, gerando ATP como produto final a través da fosforilação oxidativa. Para avaliar essa possibilidade, formas epimastigotas foram incubadas em PBS por 30 horas (estresse nutricional) e após esse tempo, foi adicionada His como substrato em concentrações

saturantes para promover a recuperação. Extratos dos parasitas recuperados com His foram submetidos à dosagem de ATP. A luminescência gerada pela reação do ATP com a enzima luciferase foi detectada e analisada em função do tempo, comparando esses resultados com parasitas não recuperados. Observamos que as formas epimastigotas mostraram um incremento linear na produção de ATP com relação ao tempo (Fig. 23A), dando sustento novamente à ideia de que His pode ser a fonte de energia para a produção de ATP para esse estágio de *T. cruzi*. A fim de comparar quantitativamente os rendimentos no ATP intracelular produzido, os parasitas submetidos a estresse nutricional foram recuperados por uma hora com His, ou com os substratos oxidáveis: Glc e Pro ou com médio LIT como controles. Adicionalmente foi realizado um controle no qual antimicina A, um inibidor do complexo III da cadeia de transporte mitocondrial foi adicionado junto à His na recuperação. Assim, uma interrupção no transporte de elétrons até a ATP sintase mitocondrial daria como resultado uma diminuição na produção de ATP. Os parasitas recuperados com His apresentaram taxas de síntese de ATP comparáveis com Pro ou Glc, e o mesmo com o meio LIT (Fig. 23B), indicando que His é um substrato oxidável envolvido na síntese de ATP a través da fosforilação oxidativa mitocondrial.

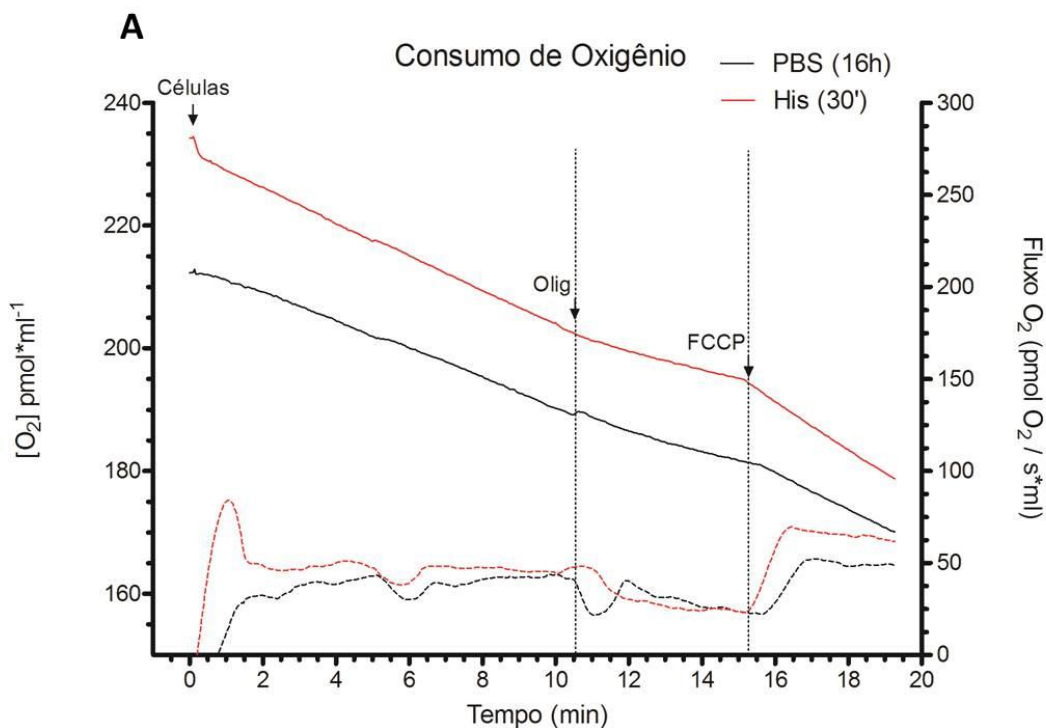


**Figura 23: A. Produção de ATP a partir do catabolismo de His.** A. Produção de ATP em função do tempo. Após estresse nutricional, observou-se um incremento na concentração de ATP intracelular após a adição de His, indicando que esse aminoácido pode atuar como fonte de energia para o parasita. B: Comparação da produção de ATP na recuperação de parasitas estressados utilizando diferentes substratos. A concentração intracelular de ATP foi determinada utilizando o método da enzima luciferase, e os resultados foram normalizados pela concentração de proteína utilizando o método de Bradford (*post-test: Tukey*. \*\*\* valor de  $p < 0,0001$ , em relação ao PBS).

#### 3.7.4 Consumo de $O_2$ a partir da respiração mitocondrial em células íntegras

Considerando que a His é capaz de agir como um substrato para a produção de ATP através da fosforilação oxidativa, o seguinte passo foi avaliar as taxas de respiração

dependentes do metabolismo de His. Para isso, parasitas estressados durante 16 h foram recuperados durante 30 min com His. Assim, os parasitas recuperados foram adicionados no oxígrafo em tampão de respiração (MRC) e foram medidas as taxas de respiração após a adição das células, após a adição de oligomicina A (inibição da fração Fo da ATP sintase) e após a adição do agente desacoplador FCCP (estimulação da máxima taxa de respiração). Foi observado o consumo de O<sub>2</sub> (respiração celular dependente de His) em relação com o controle negativo (MRC), respiração que foi inibida na presença de oligomicina e restaurada mediante a adição de FCCP (Fig. 24).



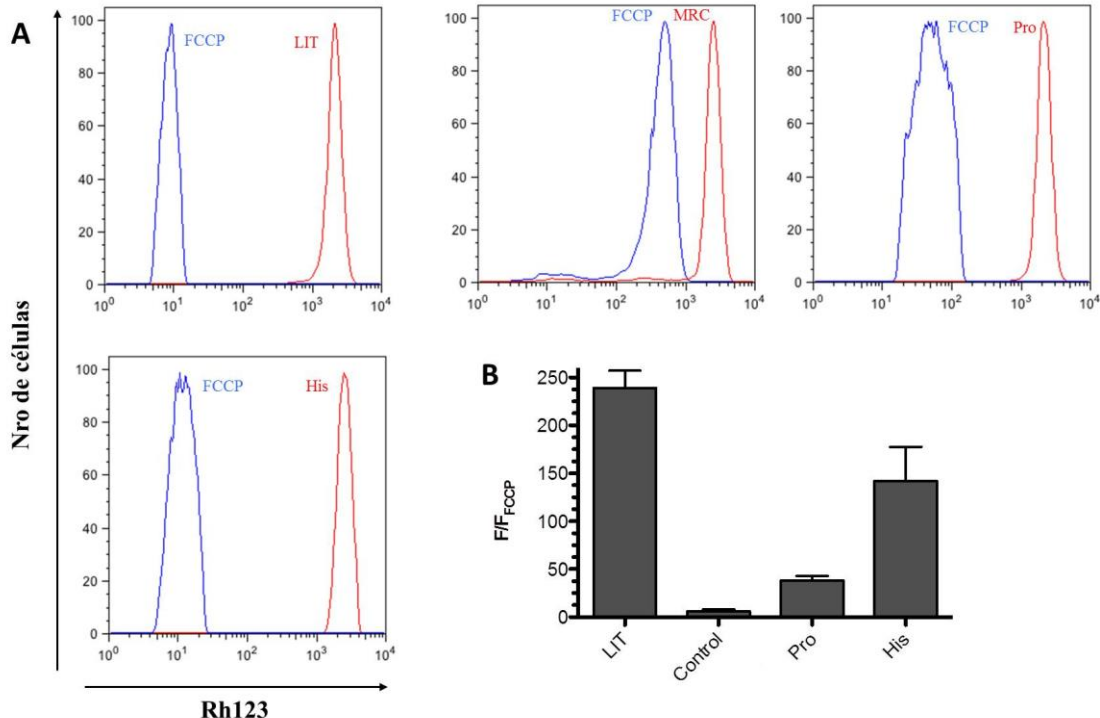
**B**

|                                | Fluxo O <sub>2</sub> (pmol O <sub>2</sub> / s * ml) |             |
|--------------------------------|---|-------------|
|                                | PBS (16h)   | His (30')   |
| Células (5 x 10 <sup>7</sup> ) | 1,28 ± 0,28   | 2,58 ± 0,76 |
| Oligomicina A                  | 1,15 ± 0,34   | 1,78 ± 0,08 |
| FCCP                           | 2,04 ± 0,33   | 2,58 ± 0,16 |

**Figura 24: Taxas de respiração em epimastigotas recuperados:** **A.** Consumo de oxigênio em células estressadas por 16 horas que não foram recuperadas (PBS 16h), e que foram recuperadas em His 5 mM durante 30 min. Com linhas pontilhadas indica-se a variação na concentração de oxigênio em função do tempo (eixo esquerdo), enquanto que com linhas sólidas indica-se o fluxo de oxigênio (eixo direito). **B.** Taxas de respiração medidas após cada agregado no oxígrafo: células estressadas (PBS 16h) e células recuperadas (His 30'), oligomicina A (5 µg/ml) e FCCP (0,5 µM).

### 3.7.5 Restauração do potencial de membrana mitocondrial

Outro aspecto da bioenergética do parasita avaliado quando epimastigotas estressados são recuperados com His como única fonte de energia é a capacidade desse aminoácido para restaurar o potencial de membrana interna mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ). Para isso, parasitas estressados nutricionalmente por incubação 30 h em PBS foram recuperados por uma hora com His, usando parasitas sem recuperar (em MRC) como controle negativo, e recuperados em LIT ou Pro como controles positivos. Cada amostra foi dividida em dois, e em uma metade foi adicionado FCCP para dissipar o  $\Delta\Psi$ . Posteriormente, foi adicionada Rhodamina 123 para detectar o  $\Delta\Psi$  tanto nas células desacopladas quanto em aquelas nas quais o potencial de membrana permaneceu intacto. Assim, a razão entre a fluorescência dos parasitas em presença e ausência de FCCP foi calculada. Os resultados obtidos mostraram que mediante o catabolismo de His o potencial de membrana mitocondrial foi recuperado (Fig. 25) em níveis similares aos obtidos por incubação em meio LIT, e de forma mais eficiente que quando os parasitas foram recuperados por incubação em Pro.



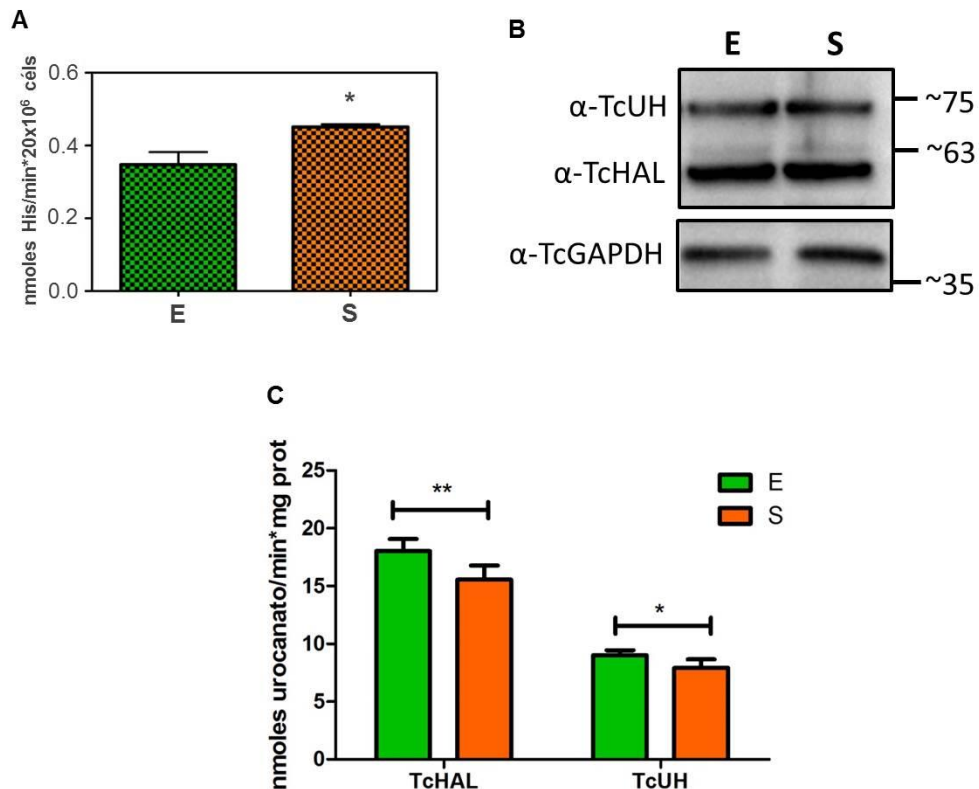
**Figura 25: Recuperação do potencial de membrana mitocondrial pelo catabolismo de His:** **A.** Intensidade de fluorescência da Rhodamina 123 (Rh123) quando parasitas estressados nutricionalmente por 30 horas foram recuperados em LIT, Pro e His. Em vermelho, fluorescência da Rh123 na presença do substrato e em azul, fluorescência após o agregado do agente desacoplante FCCP. A razão entre a fluorescência sem e com FCCP a cada condição testada é representada na parte **B**.

### ***3.8 Análise do metabolismo de His nas fases exponencial e estacionária de crescimento em formas epimastigotas***

#### *3.8.1 Análise das atividades envolvidas no metabolismo de His*

Como mencionado na introdução, as fases exponencial e estacionária da curva de crescimento de formas epimastigotas possuem características morfológicas e bioquímicas bem definidas, sendo a fase estacionária considerada como uma etapa pré-adaptativa para a metaciclologênese. Para avaliar como o metabolismo de His acontece durante ambas as fases de crescimento, nos interessou avaliar as possíveis diferenças na incorporação desse aminoácido, e na expressão e atividade das duas primeiras enzimas da via de degradação, *TcHAL* e *TcUH*.

Quando avaliada a atividade do transportador de His (Fig. 26A), observamos um pequeno incremento estatisticamente significativo da incorporação nos parasitas em fase estacionária. Por outro lado foram comparadas a expressão e as atividades de *TcHAL* e *TcUH* em ambas as fases da curva de crescimento. Inicialmente comparamos a expressão de ambas às proteínas em extratos de epimastigotas em fase exponencial e estacionária de crescimento. Não foram observadas diferenças na expressão de ambas as enzimas (Fig. 26 B). Com relação às atividades das duas primeiras enzimas da via de degradação, *TcHAL* e *TcUH*, ambas foram medidas utilizando extratos proteicos de epimastigotas em fases exponencial e estacionária de crescimento. Curiosamente, observamos uma diferença significativa nas atividades em cada uma das fases, mostrando que tanto *TcHAL* quanto *TcUH* são mais ativas na fase exponencial de crescimento, embora ainda exista uma atividade específica na fase estacionária (Fig. 26C).



**Figura 26: Análise das atividades envolvidas no metabolismo de His:** **A.** Transporte de His medido em epimastigotas em fase exponencial (E) e estacionária (S). Parasitas em ambas as fases de crescimento foram utilizados para medir a incorporação de His marcada uniformemente com <sup>14</sup>C como descrito previamente. **B.** Expressão das enzimas TcHAL e TcUH entre as fases exponencial e estacionária. Extratos de epimastigotas em ambas as fases de crescimento foram analisados contra os soros policlonais anti-TcHAL e anti-TcUH. Como normalizador foi utilizado o soro anti-TcGAPDH. **C.** Atividade das TcHAL e TcUH em extratos de epimastigotas em fase exponencial e estacionária. No caso da TcHAL foi medida a atividade específica na produção de urocanato, enquanto que para TcUH foi medido o consumo (*teste t*. \*\* valor de  $p < 0,01$ , \* valor de  $p < 0,05$ ).

### 3.8.2 Análise metabolômica nas fases exponencial e estacionária de crescimento

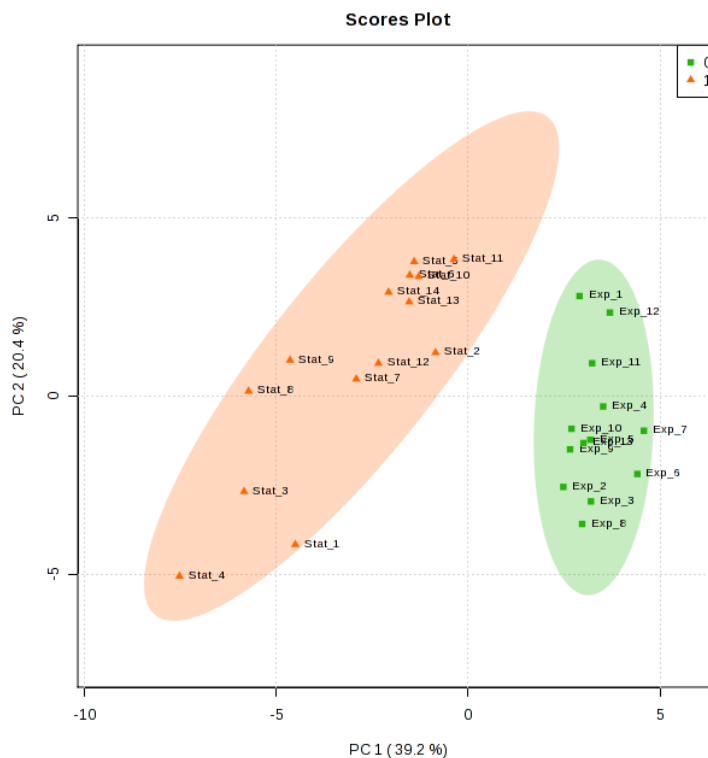
Com o objetivo de conhecer qual o perfil da His e das moléculas relacionadas ao seu metabolismo, assim como as vias metabólicas predominantes nas fases exponencial e estacionária, utilizamos uma abordagem metabolômica centrada principalmente na análise do metabolismo energético. Os metabólitos analisados com este objetivo se encontram detalhados na tabela 6. Em este contexto avaliaremos como a His é utilizada pelo parasita em ambas as fases de crescimento, o seu conteúdo intracelular, assim como o de outros metabólitos relacionados.

| Glicolise          | Aminoácidos  |            | Metabolismo de enxofrados |
|--------------------|--------------|------------|---------------------------|
| Glicose            | Histidina    | Prolina    | Homocisteine              |
| Piruvato           | Urocanato    | Alanina    | O-Acetilserina            |
| TCA                | Glutamato    | Serina     | Cistationina              |
| Fumarato           | Leucina      | Treonina   | Glutationa                |
| Succinato          | Isoleucina   | Aspartato  | Tripanotiona              |
| Malato             | Valina       | Asparagina |                           |
| Alfa-cetoglutarato | Fenilalanina | Arginina   |                           |
| Citrato            | Triptofano   | Cisteína   |                           |
| Isocitrato         | Tirosina     | Metionina  |                           |
| Succinato          |              |            |                           |

**Tabela 6:** Lista de metabólitos utilizados para a análise metabólica em *T. cruzi*.

### 3.8.3 Análises iniciais

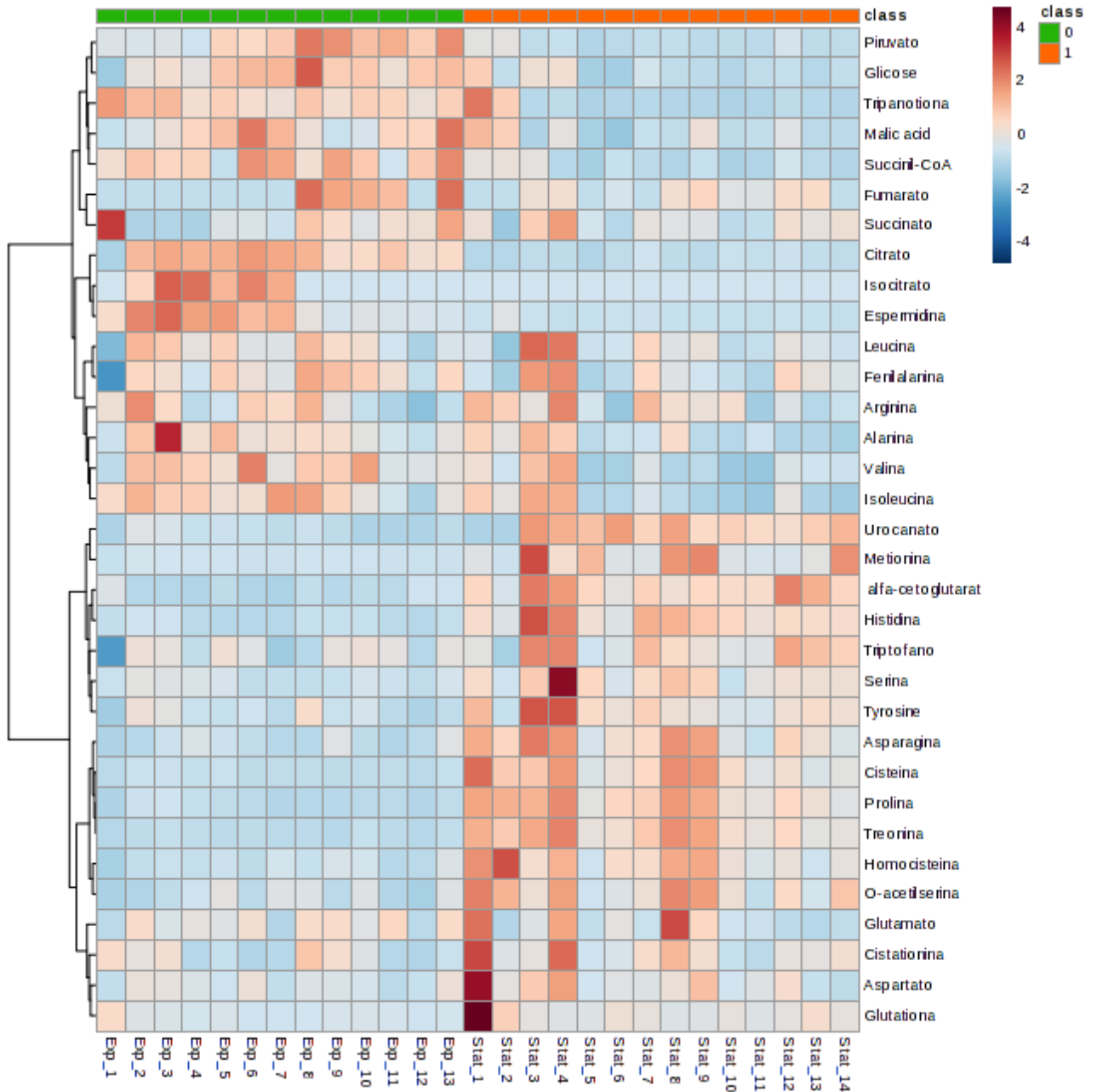
Os resultados obtidos para os níveis dos metabólitos de interesse nos parasitas em cada uma das fases de crescimento foram avaliados inicialmente por uma análise multivariada, utilizando a ferramenta de análise de componentes principais (PCA) disponível no *software* utilizado. As réplicas correspondentes a uma mesma fase do crescimento se agrupam no PCA, diferenciando-se das réplicas correspondentes à outra fase (Fig. 27), o qual permite afirmar que os resultados obtidos com parasitas em fase exponencial são significativamente diferentes de aqueles obtidos com parasitas em fase estacionária.



**Figura 27:** Análise de componentes principais entre as fases exponencial e estacionária de crescimento. Foram utilizados os resultados obtidos para amostras de parasitas em fase exponencial (13 amostras, quadrado verde) e estacionária (14 amostras, triangulo laranja).

Posteriormente, mediante um *heatmap* foram identificados padrões de aumento ou diminuição dos metabolitos entre as condições analisadas. A maior parte dos aminoácidos e as moléculas relacionadas aos mesmos se encontram agrupados na região do *heatmap* que se corresponde com um aumento na fase estacionária. Enquanto aos metabólitos que se encontram em maiores níveis na fase exponencial se encontram aqueles relacionados à glicólise e TCA, entre outros metabólitos que serão discutidos posteriormente (Fig. 28).





**Figura 28: Heat map dos metabolitos analisados entre as fases exponencial e estacionária.** Cada linha representa os metabolitos (43) detectados por UPLC-MS, e os valores são representados em unidades arbitrárias. As colunas representam as 13 réplicas biológicas independentes na fase exponencial (lado esquerdo, marcadas em verde) e as 14 réplicas de fase estacionária (lado direito, marcadas em laranja). Os asteriscos indicam metabolitos com diferença significativa entre as fases exponencial e estacionária. Os valores de  $p$  obtidos pelo teste  $t$  foram: citrato,  $2,8602 \times 10^{-8}$ ; prolina,  $3,3976 \times 10^{-8}$ ; treonina  $5,4456 \times 10^{-8}$ ; alfa-cetoglutarato,  $1,5511 \times 10^{-7}$ ; histidina,  $1,8051 \times 10^{-6}$ ; succinil-CoA,  $3,8307 \times 10^{-6}$ ; cisteína,  $5,3487 \times 10^{-6}$ ; urocanato,  $6,399 \times 10^{-6}$ ; piruvato,  $8,7222 \times 10^{-6}$ ; asparagina,  $3,5832 \times 10^{-5}$ ; espermidina,  $1,0409 \times 10^{-4}$ ; homocisteina,  $1,3175 \times 10^{-4}$ ; tripanotona,  $1,6862 \times 10^{-4}$ ; glicose,  $2,2827 \times 10^{-4}$ ; O-acetilserina,  $2,3152 \times 10^{-4}$ ; tirosina, 0,0018; metionina, 0,0021; valina, 0,0050; serina, 0,0050; isocitrato, 0,0052; malato, 0,0056; triptofano, 0,0108; isoleucina, 0,0157.

### 3.8.4 Metabolismo energético

Como descrito anteriormente, as fases exponencial e estacionária apresentam perfis diferentes com relação ao metabolismo energético. Parasitas em fase exponencial catabolizam ativamente Glc com produção de succinato e alanina, metabólitos que podem ser excretados ao meio extracelular. Após a exaustão da Glc, o parasita inicia o catabolismo de aminoácidos, os quais podem ser incorporados do meio ou degradados das proteínas de reserva, como já descrito anteriormente. Na figura 29 apresentamos esquematicamente parte do metabolismo energético de epimastigotas de *T. cruzi*: a glicólise, representada pela Glc e seu produto de degradação, o piruvato; intermediários do TCA e as vias de degradação de His e aminoácidos relacionados.

Em geral, os metabólitos relacionados à glicólise e TCA mostram um perfil onde os maiores níveis são encontrados na fase exponencial, como esperado, embora com diferentes graus de significância. Glc, piruvato, citrato, isocitrato, succinil-CoA e malato mostraram um incremento significativo na fase exponencial. Os níveis elevados de Glc, provavelmente através da sua incorporação do meio extracelular, assim como os maiores níveis de piruvato, mostram que a glicólise é mais ativa nessa fase do crescimento, e que essa via estimula o funcionamento do TCA, considerando os maiores níveis dos seus intermediários durante a fase exponencial. Por outro lado, succinato e fumarato não mostraram diferenças significativas. O único metabólito desta via que mostrou um comportamento inverso, ou seja, um aumento na fase estacionária foi o  $\alpha$ -KG, provavelmente devido ao consumo de aminoácidos na fase estacionária.

Outras vias metabólicas relevantes para a produção de energia são as vias de degradação de aminoácidos (Fig. 29). Com relação à His, um dos aminoácidos importantes no metabolismo energético de formas epimastigotas, observamos que os níveis intracelulares desse aminoácido se mostraram mais abundante na fase estacionária de crescimento, assim como o primeiro produto da sua degradação, o urocanato. No caso do Glu, produto final da via, seus níveis não mostraram diferenças significativas entre as fases exponencial e estacionária, o que é esperado para um aminoácido que constitui um verdadeiro nó do metabolismo energético, a partir do qual vias catabólicas e anabólicas surgem segundo as necessidades da célula.

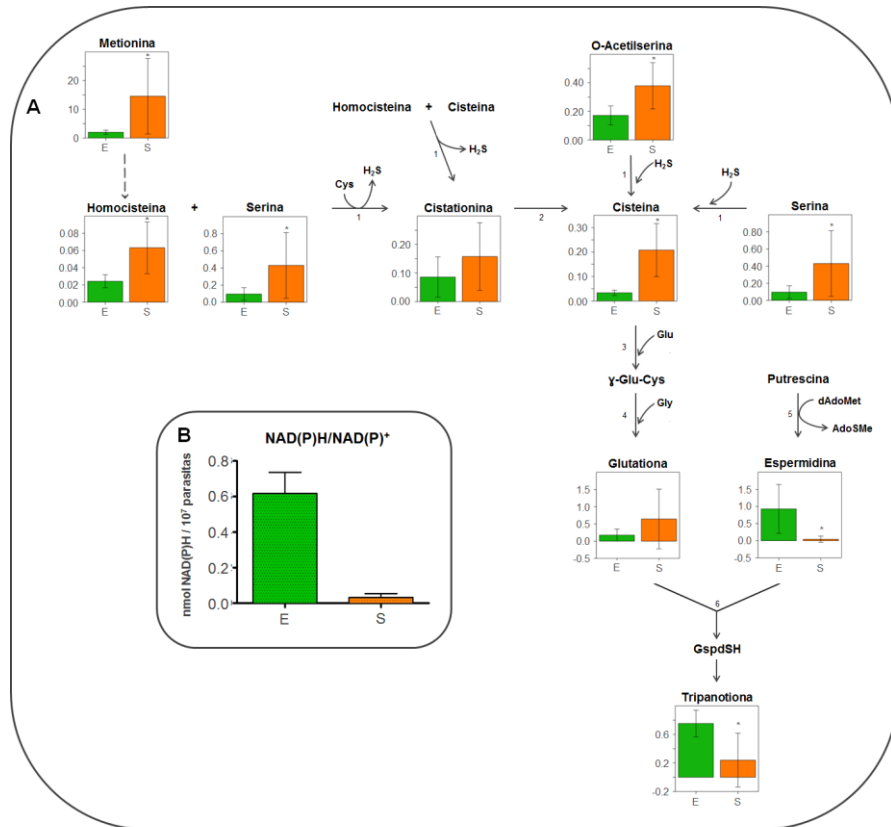
Como já mencionado, Pro é um dos aminoácidos mais relevantes na bioenergética do parasita e objeto de estudo do nosso grupo. Quando avaliados os níveis de Pro intracelular,

observamos que foram claramente mais altos em parasitas em fase estacionária com respeito à fase exponencial. Embora não sejam comparáveis quantitativamente os níveis dos diferentes metabólitos, é claro que a célula possui níveis elevados de Pro intracelular. O transporte de Pro para o interior celular também foi avaliado mostrando um aumento da atividade do sistema B, na fase estacionária. O mesmo foi observado para o transportador de Glu.



### *3.8.5 Análise dos níveis intracelulares de moléculas enxofradas e estado redox da célula nas fases exponencial e estacionária*

Outro grupo de moléculas importantes e relacionadas ao metabolismo energético são os tióis de baixo peso molecular, os quais participam de mecanismos importantes para o metabolismo da célula, como a regulação do estado redox. Para avaliar as variações desses metabólitos entre as fases exponencial e estacionária, foram analisados os intermediários das diferentes vias de síntese de cisteína que operam no parasita, assim como os níveis de glutathiona, espermidina e tripanotiona, o principal agente antioxidante no metabolismo redox de tripanossomatídeos. Todos os intermediários da síntese de Cys aumentaram na fase estacionária, com diferentes graus de significância. Por sua parte, tripanotiona (sua forma reduzida) mostrou-se significativamente menor na fase estacionária (Fig. 30A). O fato dos níveis de moléculas vinculadas à resposta contra o estresse oxidativo avaliadas estarem aumentadas na fase estacionária, deve-se provavelmente à resposta da célula ao ambiente oxidativo resultante do metabolismo energético na fase exponencial. Para confirmar a existência de uma ambiente mais oxidativo durante a fase estacionária foi avaliada a razão  $\text{NAD(P)H/NAD(P)}^+$  em parasitas em ambas as condições. Essa relação foi maior na fase exponencial, confirmando que durante a fase estacionária o parasita está submetido a um ambiente celular mais oxidado (Fig. 30B).



**Figura 30. Moléculas exofradas e estado redox celular nas fases exponencial e estacionária.** **A:** Vias de biosíntese de cisteína e tripanotona: vias de biosíntese de Cys presentes em *T. cruzi* (*de novo* e transulfuração) e passos enzimáticos que conduzem à tripanotona. Os valores correspondem a unidades arbitrárias obtidas da análise por UPLC-MS. Asteriscos indicam diferenças significativas entre fases exponencial e estacionária (teste *t*,  $p < 0.05$ ). 1. cistationina β sintase, 2. cistationina γ liase, 3. γ-glutamilcistein sintetase, 4. glutatona sintetase, 5. espermidina sintetase, 6. tripanotona sintetase. Linhas pontilhadas representam mais de uma reação enzimática. **B:** Estado redox da célula em parasitas em exponencial e estacionária. Os níveis de NAD<sup>+</sup> and NADH foram medidos em parasitas em ambas as fases de crescimento.

### 3.9 Papel da His na metaciclôgenese

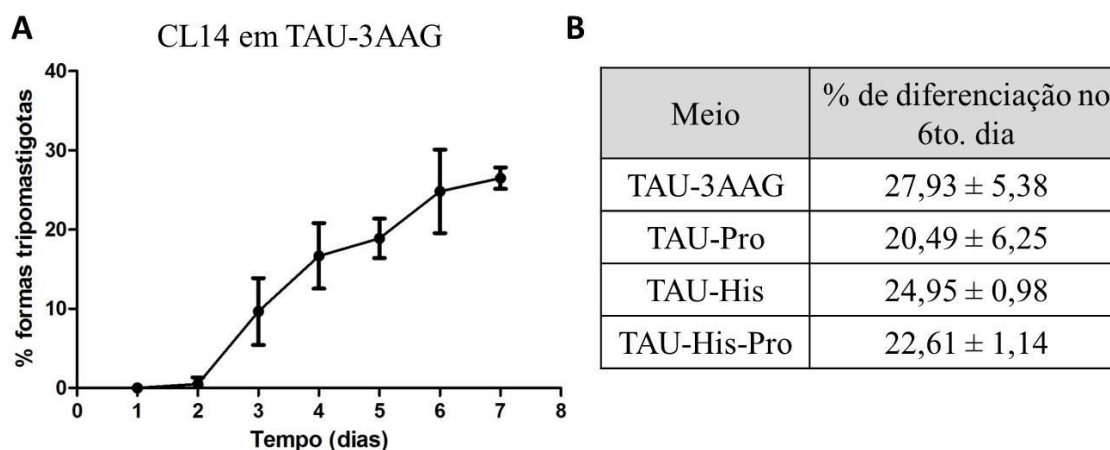
#### 3.9.1 Metaciclôgenese em CL14

Como comentado na introdução, os relatos na literatura mostrando diferenciação de *T. cruzi* *in vitro* utilizaram como modelo diferentes cepas do parasita (Dm28c, Y, isolados de campo, entre outras), mas nenhuma utilizando nossa cepa de estudo, CL14. Portanto, foi necessário padronizar o método de diferenciação *in vitro*. Para isso, epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram crescidas em meio LIT durante 4 dias até atingir a fase estacionária. Posteriormente foram transferidos a meio TAU puro, o qual consiste só em sais e tem como objetivo gerar estresse nutricional ao parasita. Após esse tempo, foram transferidos a meio TAU-3AAG, para iniciar a diferenciação. Como observado na figura 31, a cepa CL14

de *T. cruzi* é capaz de diferenciar as formas metacíclicas no meio mencionado, atingindo uma média de 30% de diferenciação após seis dias em meio TAU-3AAG.

### 3.9.2 Efeito da His na diferenciação de *T. cruzi* em meio TAU

Como mostrado anteriormente, *T. cruzi* poderia estar adaptado à utilização de His como fonte de energia ou carbono durante os estágios no hospedeiro invertebrado. Sendo assim, nos perguntamos se His poderia atuar como promotora para a metaciclo gênese, a transformação das formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas que acontece na região final do intestino do inseto vetor. Para isso, parasitas foram incubados em meio definido TAU-His 10 mM, e TAU-His-Pro (suplementado com 10 mM de cada aminoácido) para avaliar o efeito da combinação de ambos os aminoácidos no meio de diferenciação. Os meios TAU-3AAG e TAU-Pro foram utilizados como controle. A porcentagem de tripomastigotas foi calculada no sexto dia de incubação pela contagem em câmara de Neubauer. Como mostrado na tabela da figura 31, a His favoreceu o processo de diferenciação, mostrando um 24,95% de formas tripomastigotas metacíclicas. A presença de His e Pro no meio de diferenciação não teve influência no número de formas metacíclicas obtidas no 6to. dia.



**Figura 31: Diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos em meio definido.** A diferenciação de epimastigotas ( $5 \times 10^7$  parasitas/ml, 15 ml de cultura) foi acompanhada durante sete dias pela contagem em câmara de Neubauer. No gráfico observa-se uma curva de diferenciação em TAU-3AAG representativa onde se observa a porcentagem de formas tripomastigotas em função do tempo. O sexto dia de incubação foi escolhido para analisar a porcentagem máxima de tripomastigotas em cada condição. **B. Tabela:** porcentagens de diferenciação de parasitas incubados em TAU-3AAG, TAU-Pro, TAU-His e TAU-His-Pro avaliados no 6to. dia de incubação.

### 3.9.3 Análise metabômica da metaciclogênese *in vitro*

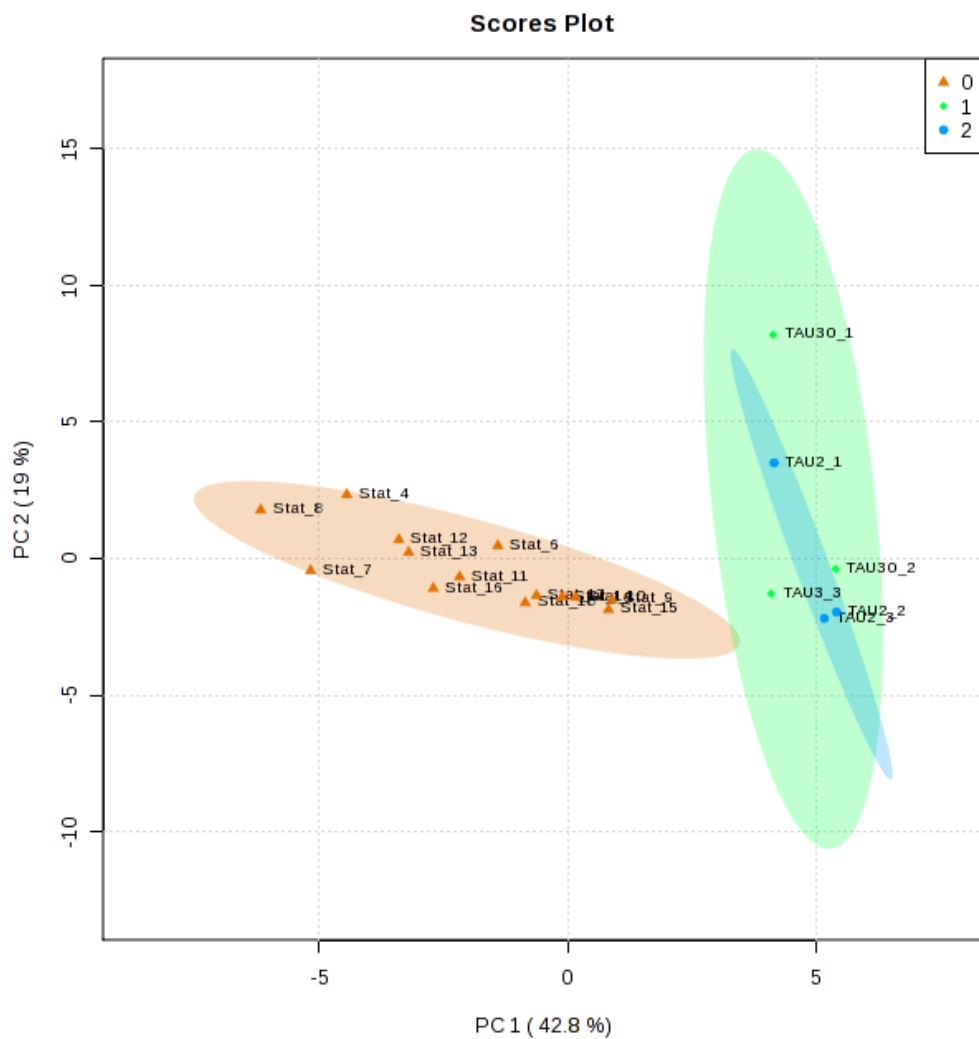
Considerando os resultados mostrados anteriormente, nos interessou entender como His estaria participando na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas. Para isso utilizamos uma abordagem metabômica dirigida, focando nossa atenção nas vias descritas na análise das fases exponencial e estacionária. Inicialmente avaliamos as mudanças que acontecem quando parasitas em fase estacionária (em meio rico) são transferidos ao meio TAU-puro (contendo apenas sais), o qual induz um estresse nutricional necessário para o início da diferenciação. Posteriormente, analisamos o metabolismo durante a diferenciação em meio padrão, TAU-3AAG, para conhecer como opera o metabolismo energético durante a metaciclogênese *in vitro*. Por último avaliamos a diferenciação em meio TAU suplementado com His (TAU-His) como única fonte de carbono e energia. Os resultados foram comparados com a diferenciação em Pro (TAU-Pro), um indutor da metaciclogênese já descrito e com parasitas diferenciados em TAU suplementado com ambos os aminoácidos His e Pro (TAU-HP).

#### 3.9.3.1 Análise metabômica entre a fase estacionária e TAU-puro: o passo inicial da metaciclogênese

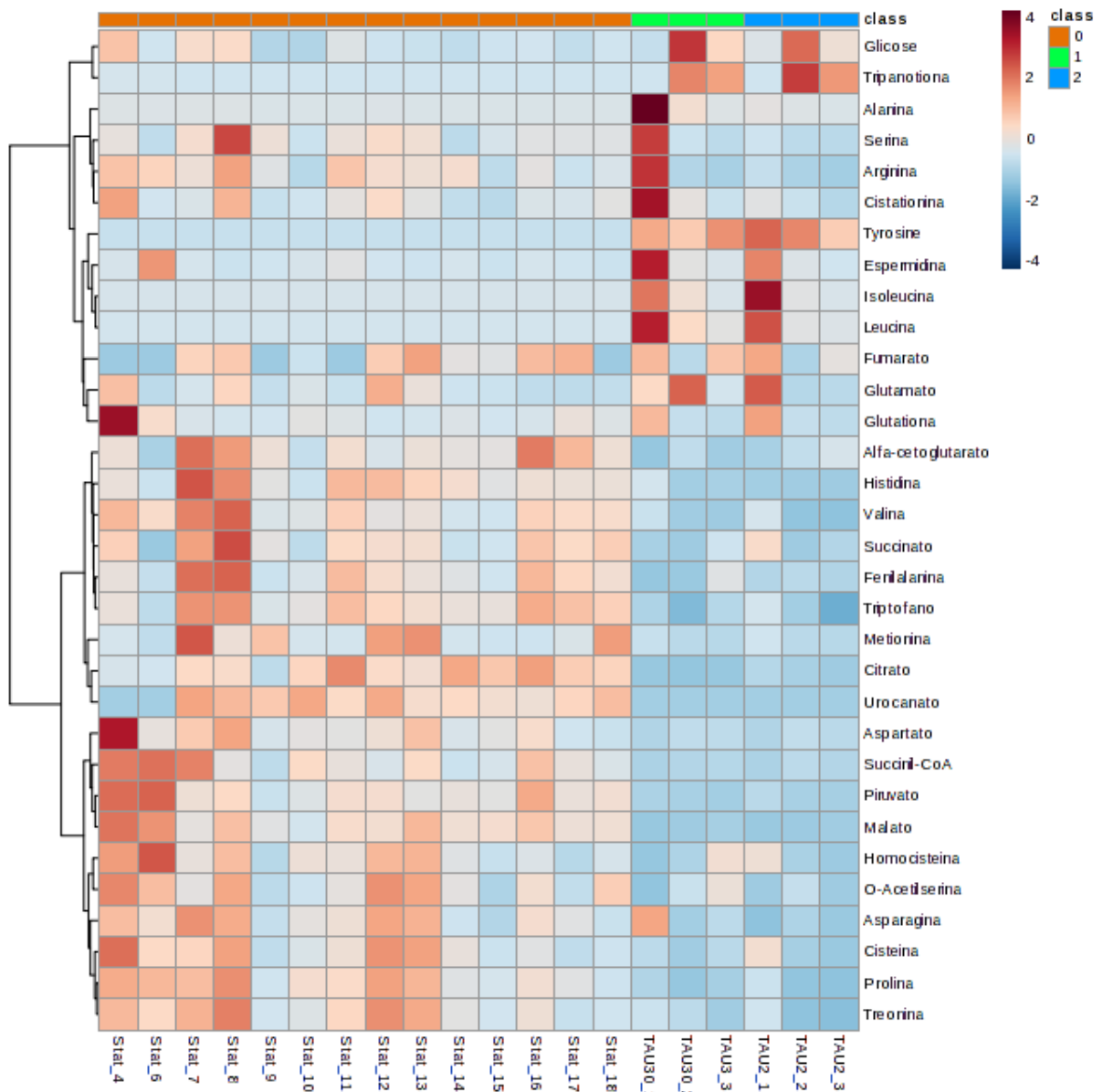
Após a fase estacionária, os parasitas são incubados em TAU puro por duas horas para induzir um estresse nutricional necessário para iniciar o processo de metaciclogênese. Em seguida são descritas as variações que acontecem com os metabólitos analisados quando o parasita em fase estacionária é transferido de um meio completo e rico como o meio LIT, a um meio pobre em nutrientes como o TAU, após 30 minutos e duas horas de incubação.

A análise de componentes principais (PCA) indicou que os epimastigotas em fase estacionária provenientes de meio LIT diferem dos incubados em meio TAU (Fig. 32). Essas diferenças são evidenciadas pela análise de *heat map* (Fig. 33), que destaca os metabólitos responsáveis por diferenciar metabolicamente os epimastigotas em meio LIT dos incubados em meio TAU, onde não há diferenças quando comparado 30 minutos e 2 horas de incubação.





**Figura 32: Análise de componentes principais entre amostras submetidas a estresse nutricional em TAU puro.** Foram utilizados os dados de metabolômica de epimastigotas em fase estacionária (13 amostras – triângulo laranja) e incubadas em meio TAU por 30 minutos (3 amostras – losango verde) e 2 horas (3 amostras – círculo azul).



**Figura 33: Heat map dos metabólitos analisados entre amostras submetidas a estresse nutricional em TAU puro.** As linhas indicam os metabólitos detectados por UPLC-MS com valores representados em unidades arbitrárias. As colunas representam réplicas biológicas independentes de amostras de *T. cruzi* em fase estacionária (laranja, 13 réplicas), incubadas em meio TAU por 30 minutos (verde, 3 réplicas) e 2 horas (azul, 3 réplicas).

Dos 32 metabólitos analisados 20 apresentaram variações significativas devido a incubação em meio TAU: desses, 5 aumentaram (Tabela 7) e 15 diminuíram (Tabela 8) seus níveis.

| Metabólitos com aumento após incubação em TAU | Valor de p           | Pos-test                          |
|---|----------------------|-----------------------------------|
| <b>Tirosina</b>                               | 1,156E <sup>-9</sup> | TAU 30min-estac; TAU 2h-estac     |
| <b>Tripanotona</b>                            | 0,001077             | TAU 30min-estac; TAU 2h-estac     |
| <b>Leucina</b>                                | 0,010129             | TAU 30min-estac; TAU 2h-estac     |
| <b>Alanina</b>                                | 0,019215             | TAU 30min-estac; TAU 30min-TAU 2h |
| <b>Isoleucina</b>                             | 0,032671             | TAU 2h-estac                      |

**Tabela 7:** Metabólitos cujos níveis intracelulares aumentaram significativamente (*post test: Fisher*,  $p < 0,05$ ) quando epimastigotas em fase estacionária (em meio LIT) foram transferidos ao meio TAU e incubados por 30 minutos e 2 horas.

| Metabólitos com diminuição após incubação em TAU | Valor de p | Pos-test                      |
|--|------------|-------------------------------|
| <b>Malato</b>                                    | 9,2974E-5  | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Citrato</b>                                   | 1,476E-4   | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Triptofano</b>                                | 6,7735E-4  | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Prolina</b>                                   | 7,4593E-4  | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Urocanato</b>                                 | 8,0128E-4  | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Piruvato</b>                                  | 0,0038529  | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Valina</b>                                    | 0,0038888  | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Histidina</b>                                 | 0,0040153  | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Treonina</b>                                  | 0,0064299  | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Succinil-CoA</b>                              | 0,019263   | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b>Fenilalanina</b>                              | 0,02035    | estac-TAU 30min; estac-TAU 2h |
| <b><math>\alpha</math>-cetogluturato</b>         | 0,021365   | estac-TAU 30min               |
| <b>Asparagina</b>                                | 0,04071    | estac-TAU 2h                  |
| <b>O-acetilserina</b>                            | 0,038935   | estac-TAU 2h                  |
| <b>Cisteina</b>                                  | 0,044076   | estac-TAU 30min               |

**Tabela 8:** Metabólitos cujos níveis intracelulares diminuíram significativamente (*post test: Fisher*,  $p < 0,05$ ) quando epimastigotas em fase estacionária (em meio LIT) foram transferidos ao meio TAU e incubados por 30 minutos e 2 horas.

Dentre os metabólitos cujos níveis intracelulares diminuíram (Tabela 8) destacam-se os intermediários do TCA, piruvato e alguns aminoácidos. Dos intermediários do TCA, o citrato,  $\alpha$ -KG, succinil-CoA e malato apresentaram diminuição significativa, os demais intermediários succinato e fumarato não apresentaram diferenças significativas, e o isocitrato não foi detectado em nenhuma amostra. Apesar do LIT ser um meio "completo" devido sua suplementação (Glc 0,2% e soro fetal bovino 10%), alguns metabólitos aumentaram seus níveis quando incubados em TAU (Tabela 7). Destacamos os aminoácidos ramificados

representados pela Leu e Ile que aumentaram em 30 minutos e 2 horas de incubação no meio TAU-puro. Além deles, a tripanotona, também mostrou um aumento durante a incubação nesse meio.

### 3.9.3.2 Análise metabolômica na diferenciação em TAU-3AAG

Com o objetivo de entender melhor os processos metabólicos envolvidos durante a metaciclologênese, e a sua dependência com a disponibilidade de diferentes aminoácidos, analisamos inicialmente o perfil metabólico em parasitas diferenciados em meio TAU-3AAG, o meio padrão para a metaciclologênese *in vitro*.

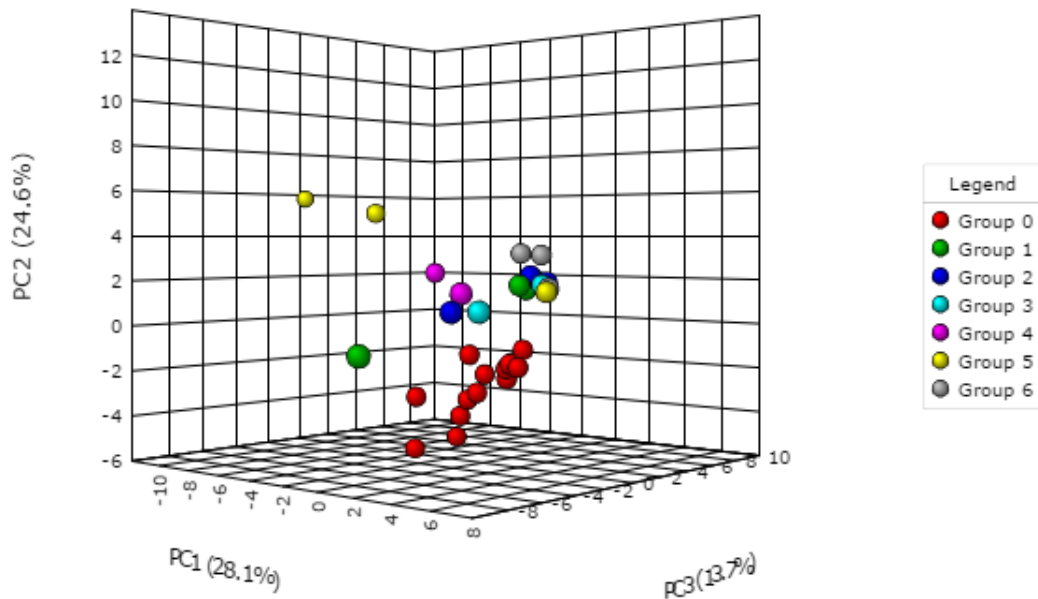
O processo da metaciclologênese foi avaliado analisando o perfil metabólico em diferentes tempos ao longo da diferenciação:

0. Epimastigotas em fase estacionária de crescimento.
1. Parasitas incubados por 30 minutos em meio TAU puro.
2. Parasitas incubados por 2 horas em meio TAU puro.
3. Parasitas incubados por 24 horas em meio TAU-suplementado, na fração do sobrenadante.
4. Parasitas incubados por 24 horas em meio TAU-suplementado, na fração aderida.
5. Parasitas incubados por 6 dias em meio TAU-suplementado, na fração aderida.
6. Tripomastigotas metacíclicos purificados da fração sobrenadante após 6 dias de incubação em meio TAU-suplementado.

Os resultados a serem descritos e discutidos aqui são principalmente descritivos, mostrando os perfis metabólicos obtidos para cada condição de diferenciação. Experimentos adicionais serão necessários para ampliar nosso entendimento dos processos que acontecem durante a diferenciação entre as formas epimastigotas e as tripomastigotas metacíclicas.

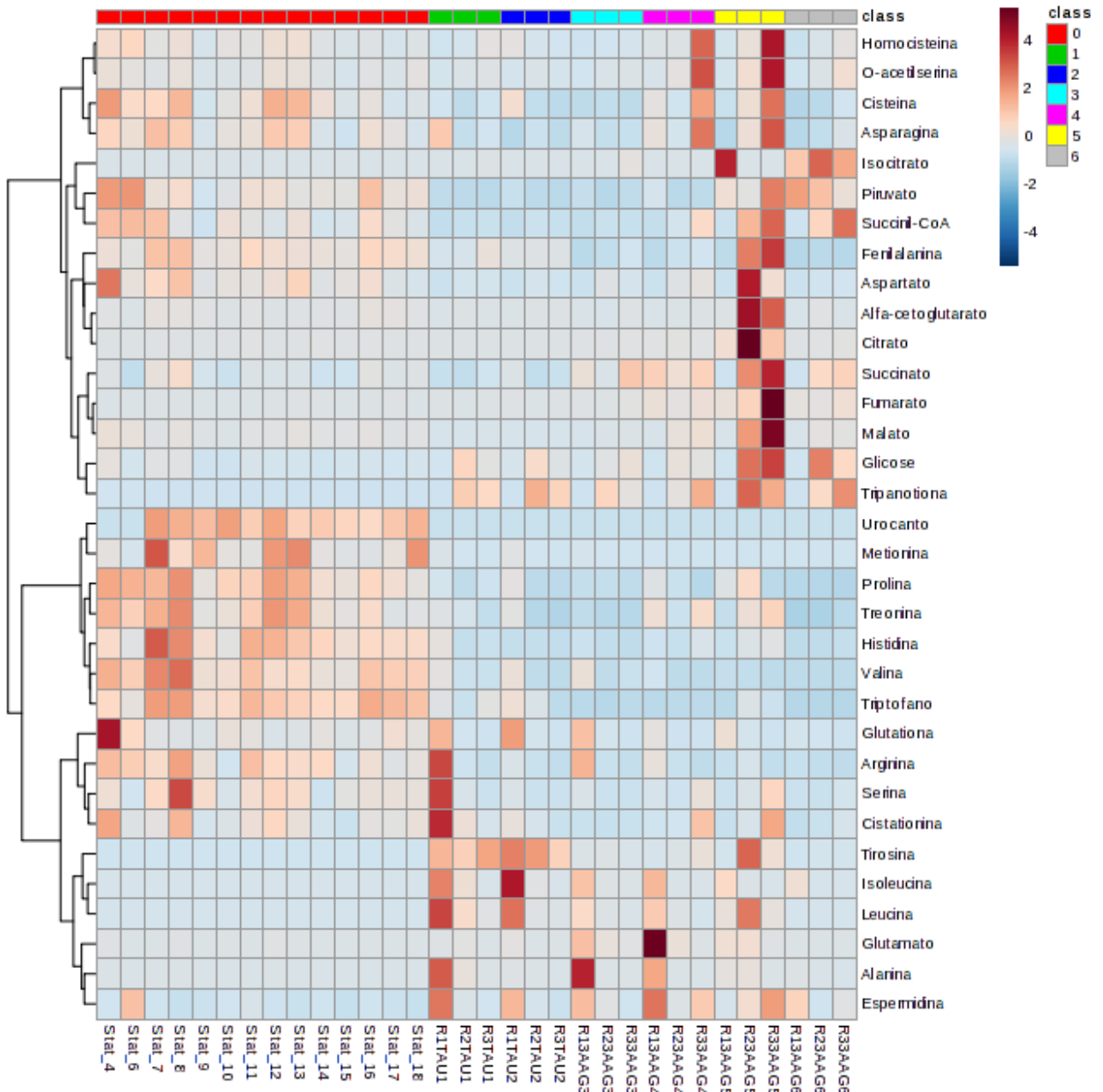
Inicialmente, analisamos os resultados obtidos a cada tempo utilizando a análise de componentes principais. Observamos que as amostras de parasitas em fase estacionária (em meio LIT), são diferentes o suficiente para se agruparem separadamente dos outros pontos correspondentes ao meio definido, os quais embora possuam diferenças, se mostram sobrepostos na análise (Fig. 34). Entre os pontos analisados, pode se observar que os correspondentes à fração aderida de 6 dias são os mais heterogêneos, mostrando uma maior dispersão na análise de PCA. Isto pode ser explicado considerando que no sexto dia da

diferenciação, é esperada a presença de diferentes populações de parasitas, as quais apresentaram diferentes graus de diferenciação e por tanto, diferentes perfis metabólicos.



**Figura 34: Análise de componentes principais entre amostras obtidas na diferenciação em TAU-3AAG.** Foram utilizados os dados de metabolômica de epimastigotas em fase estacionária (13 réplicas), e em diferentes pontos ao longo da diferenciação em meio TAU-3AAG (3 réplicas cada um). Grupo 0: parasitas em fase estacionária, Grupo 1: parasitas em meio TAU-puro por 30 minutos, Grupo 2: parasitas em meio TAU-puro por 2 horas, Grupo 3: parasitas em meio TAU-3AAG (24 hs, fração Sn), Grupo 4: parasitas em meio TAU-3AAG (24 hs, fração Ad), Grupo 5: parasitas em meio TAU-3AAG (6 dias, fração Ad), Grupo 6: tripomastigotas metacíclicos purificados no 6to. dia em TAU-3AAG.

A continuação, os níveis de todos os metabólitos de interesse foram analisados através do *heatmap* (Fig. 35).



**Figura 35: Heatmap dos metabólitos analisados durante a diferenciação em TAU-3AAG.** As linhas indicam os metabólitos (total de 43) detectados por UPLC-MS com valores representados em unidades arbitrárias. As colunas representam réplicas biológicas independentes de amostras de *T. cruzi* em fase estacionária (Grupo 0, 13 réplicas), e em diferentes pontos ao longo da diferenciação [3 réplicas cada um: Grupo 1: parasitas em meio TAU-puro por 30 minutos, Grupo 2: parasitas em meio TAU-puro por 2 horas, Grupo 3: parasitas em meio TAU-3AAG (24 hs, fração Sn), Grupo 4: parasitas em meio TAU-3AAG (24 hs, fração Ad), Grupo 5: parasitas em meio TAU-3AAG (6 dias, fração Ad), Grupo 6: tripomastigotas metacíclicos purificados no 6to. dia em TAU-3AAG]

### Metabolismo energético durante a diferenciação em TAU-3AAG

Nosso estudo abordou parte do metabolismo intermediário (representado esquematicamente na figura 36), incluindo os metabólitos de entrada e saída da via glicolítica, a Glc e o piruvato, assim como os intermediários do TCA. Os níveis de Glc se mantiveram praticamente constantes desde a passagem pelo TAU-puro até o TAU-3AAG, provavelmente

devido à presença desse açúcar no meio de cultura. Só é observado um aumento após seis dias de incubação. Um comportamento similar é observado para o piruvato: aparentemente é consumido após a passagem ao meio TAU puro, e depois de seis dias de incubação, seus níveis são incrementados. É importante mencionar que a presença de Glc e seus derivados na fração correspondente aos tripomastigotas metacíclicos (grupo 6) pode ser influenciada pela presença de Glc no tampão de eluição na purificação de estas formas. Os resultados obtidos para o TCA mostraram altos níveis de todos os intermediários na fração 5 (6dAd), de acordo com o observado para Glc e piruvato. Com relação aos níveis dos outros aminoácidos presentes no meio de cultura (Pro, Glu e Asp), surpreendentemente não observamos diferenças nos níveis destes metabólitos ao longo do processo de diferenciação (dados não mostrados). A única diferença significativa observada foi nos níveis de Pro e Asp, só entre a fase estacionária (meio LIT) e os outros pontos analisados.

Enquanto ao metabolismo de His durante a metaciclogênese, foram detectados níveis basais desse aminoácido em todos os pontos da diferenciação. Como esperado, não detectamos degradação da mesma, visto que não foram detectados níveis de urocanato ao longo do processo de diferenciação.





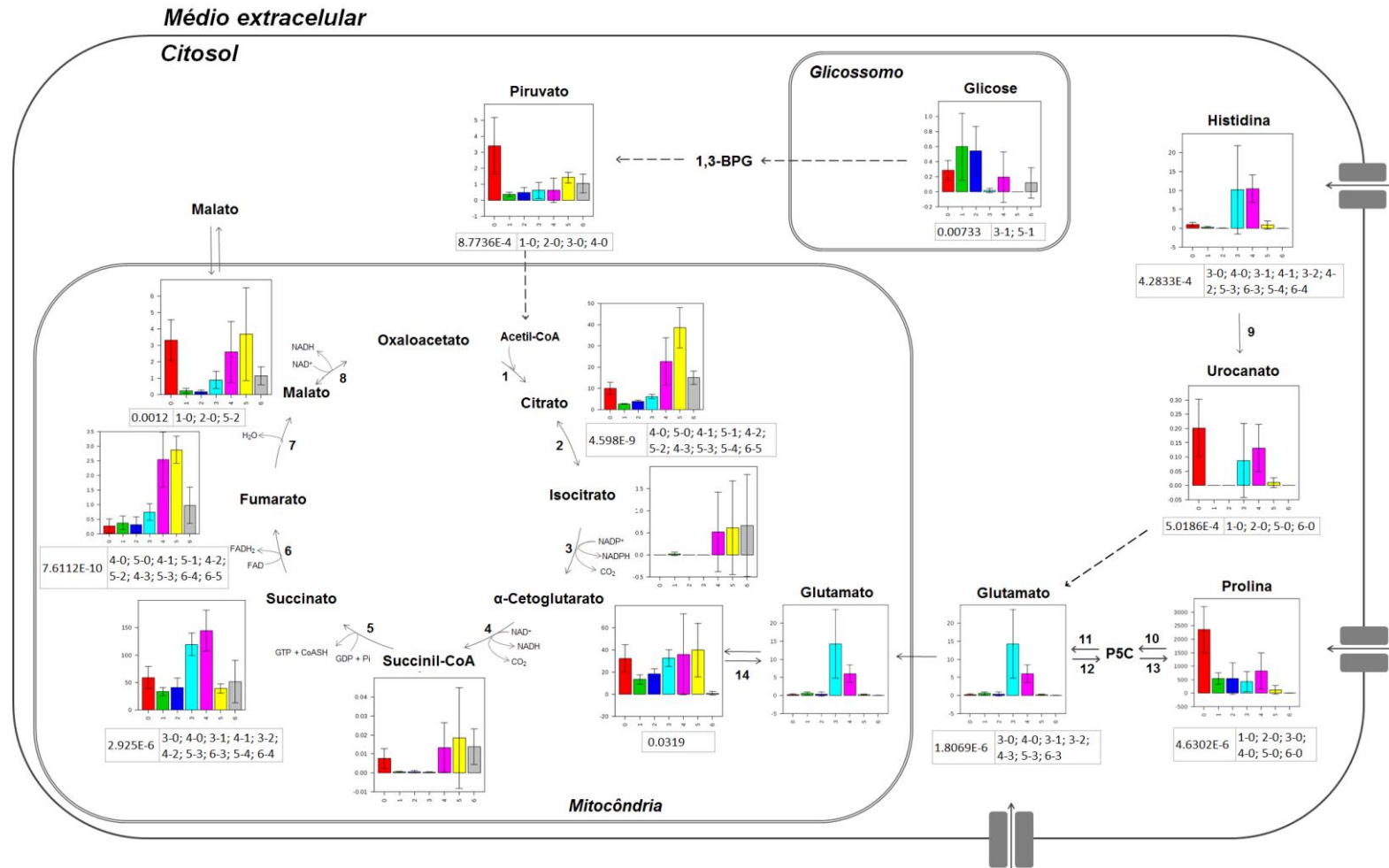
Em relação aos aminoácidos enxofrados, assim como às moléculas consideradas importantes envolvidas no metabolismo redox, como glutatona e tripanotona, não observamos mudanças significativas importantes durante a metaciclologênese (dados não mostrados).

### 3.9.3.3 Análise metabolômica da metaciclologênese dependente de His

Para compreender como His pode estimular a metaciclologênese, parasitas diferenciados em TAU suplementado com His como única fonte de carbono e energia foram analisados por metabolômica, com ênfase nas vias avaliadas nos parasitas diferenciados em TAU-3AAG. Com o objetivo de obter padrões e os destinos metabólicos em parasitas submetidos à metaciclologênese *in vitro*, os parasitas diferenciados em TAU-His foram comparados a parasitas diferenciados em TAU-Pro, meio no qual também acontece uma diferenciação similar à observada com TAU-3AAG. Posteriormente foram comparados com aqueles diferenciados em TAU combinando His e Pro, o que permitirá entender melhor os destinos metabólicos desses dois aminoácidos quando presentes no mesmo meio.

#### Perfil do metabolismo energético em parasitas diferenciados em TAU-His

Após 24 horas de incubação em TAU-His, os níveis de His e urocanato aumentam nas frações sobrenadante e aderida, mostrando que após transferência ao meio com His ela é incorporada e degradada (Fig. 37). O aumento observado no urocanato não é significativo entre os pontos da diferenciação, provavelmente por ser um intermediário que está sendo consumindo ativamente dentro da via. Também se observam níveis aumentados de Glu, produto final do catabolismo da His. Em relação ao TCA, o ponto de entrada da His é através do  $\alpha$ -KG, gerado pela desaminação oxidativa do Glu. Todos os intermediários do TCA foram detectados com exceção do oxaloacetato, mostrando diferenças com diferentes graus de significância. Os intermediários que mostraram diferenças significativas entre as frações após a passagem a TAU-His foram succinato, com níveis aumentados nas duas frações correspondentes às 24 h de incubação; fumarato, com níveis significativamente diferentes nas frações aderidas de 24 h e 6 dias; malato e citrato, o qual mostrou um perfil idêntico ao succinato. Interessantemente, após seis dias de incubação, os níveis de His, urocanato e Glu estão diminuídos, enquanto nesse tempo, os intermediários do TCA estão aumentados, principalmente na fração correspondente aos parasitas aderidos de seis dias.

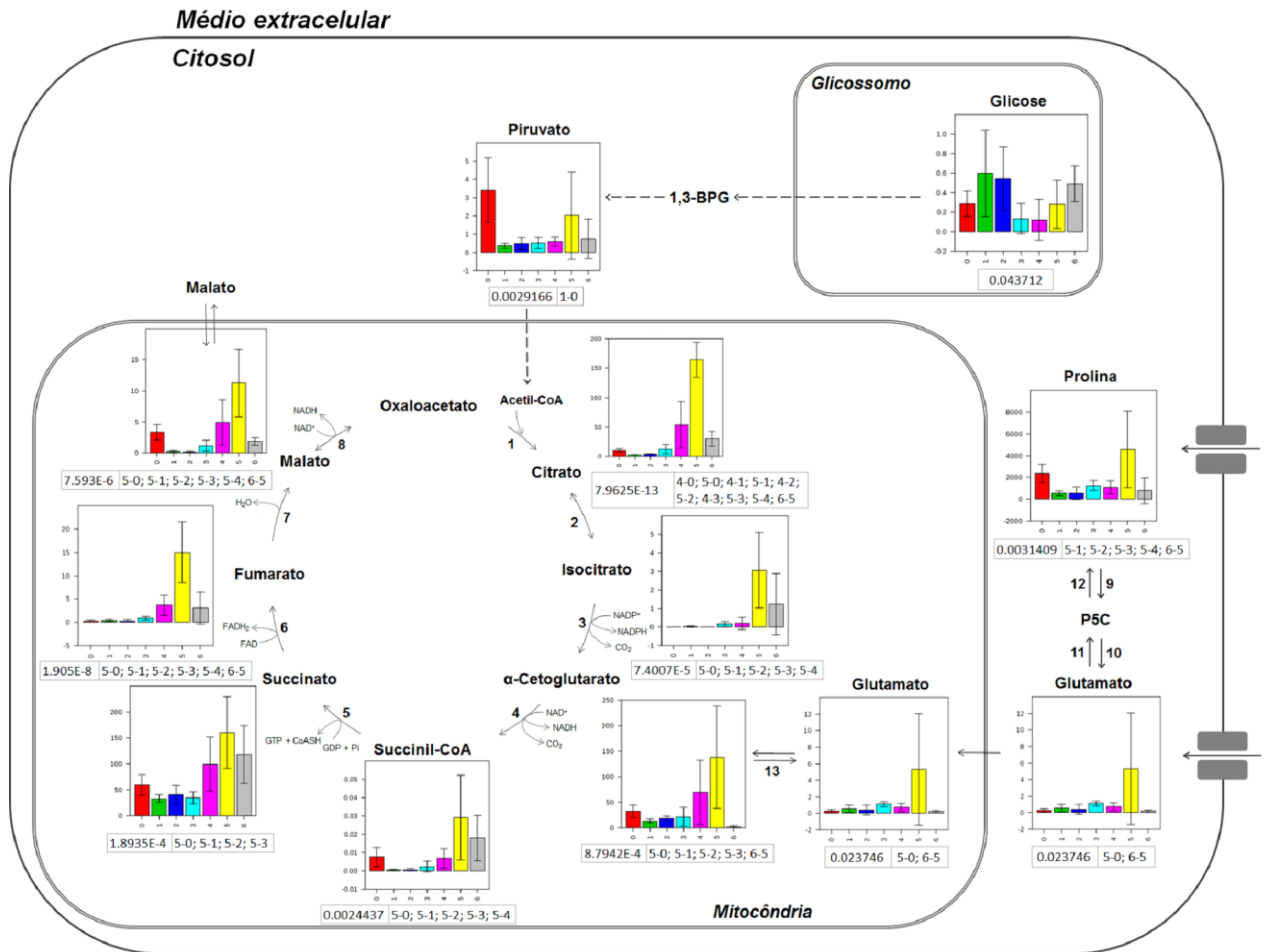


**Figura 37: Níveis dos intermediários da glicólise e TCA durante a metaciclógenese em meio TAU-His.** Da glicólise, foram analisados Glc e piruvato, e todos os intermediários do TCA. Os valores correspondem a unidades arbitrárias obtidas pela análise por UPLC-MS. Os quadros por debaixo dos gráficos indicam, à esquerda, o valor de p (ANOVA) e à direita, entre quais pontos há diferença significativa (*post-test: Tukey*). 1. citrato sintase, 2. aconitase, 3. Isocitrato desidrogenase, 4. α-cetoglutarato desidrogenase, 5. succinil CoA-sintetase, 6. succinato desidrogenase, 7. fumarase, 8. Malato desidrogenase, 9. Histidina amônia-liase, 10. Prolina desidrogenase, 11. P5C desidrogenase, 12. P5C sintetase, 13. P5C reductase, 14. Glu desidrogenase. Linhas pontilhadas representam mais de uma reação enzimática.

Os outros metabólitos analisados não mostraram diferenças significativas entre os diferentes pontos ao longo da diferenciação.

#### 3.9.3.4 Perfil do metabolismo energético em parasitas diferenciados em TAU-Pro e TAU-His-Pro

Quando observamos os níveis de Pro intracelular após 24 h de incubação em TAU-Pro, após a passagem pelo TAU-puro, não observamos um aumento nos mesmos como era esperado (Fig. 38). Contrariamente, observamos um aumento da Pro intracelular apenas na fração correspondente ao sexto dia, e na fração aderida da cultura. Isto nos pareceu interessante, visto que no caso dos parasitas incubados em TAU-His, o aumento no aminoácido presente no meio já era evidente às 24 h de incubação. O produto final da degradação da Pro, o Glu, não mostrou grandes variações: só na mesma fração, aderida de seis dias, observou-se um aumento significativo com respeito aos tripomastigotas metacíclicos. Seguindo na mesma linha de raciocínio, observamos que os intermediários do TCA que mostram um aumento significativo durante a metaciclogênese, o fazem na mesma fração, na correspondente aos parasitas aderidos do sexto dia de incubação. O mesmo foi observado quando no TAU-3AAG, os níveis de piruvato provenientes provavelmente da glicólise e os intermediários do TCA estavam aumentados na mesma fração.



**Figura 38: Níveis dos intermediários da glicólise e TCA durante a metacicloênese em meio TAU-Pro.** Da glicólise, foram analisados Glc e piruvato, e todos os intermediários do TCA. Os valores correspondem a unidades arbitrárias obtidas pela análise por UPLC-MS. Os quadros por debaixo dos gráficos indicam, à esquerda, o valor de p (ANOVA) e a direita, entre quais pontos há diferença significativa (post-test: Tukey). 1. citrato sintase, 2. aconitase, 3. Isocitrato desidrogenase, 4. α-cetoglutarato desidrogenase, 5. succinil CoA-sintetase, 6. succinato desidrogenase, 7. fumarase, 8. Malato desidrogenase, 9. Prolina desidrogenase, 10. P5C desidrogenase, 11. P5C sintetase, 12. P5C reductase, 13. Glutamato desidrogenase. Linhas pontilhadas representam mais de uma reação enzimática.

Com relação ao metabolismo energético observado em parasitas diferenciados em TAU suplementado com His e Pro (TAU-HP), o resultado foi interessante: o nível observado de His intracelular às 24 h de incubação são menores que no TAU-His (Fig. 39). Com relação ao perfil da Pro na diferenciação no meio TAU-HP, é muito similar ao observado em TAU-Pro, com aumento na fração aderida dos seis dias de diferenciação. O mesmo é observado para os intermediários do TCA, sugerindo que na presença de Pro, o perfil metabólico corresponde mais com o observado quando a Pro é o único metabólito disponível no meio.



### 3.10 Papel da His na resistência à estresse oxidativo

Diversos estudos mostraram a participação de His em processos relacionados à resistência ao estresse oxidativo. Para avaliar a possível participação deste aminoácido nos mecanismos de controle redox das formas epimastigotas, avaliamos as atividades enzimáticas relacionadas com o metabolismo de aminoácidos enxofrados tais como cisteína sintase (CS), cistationina  $\gamma$ -sintase (CGL) e cistationina  $\beta$  sintase (CBS); assim como as atividades específicas das enzimas com capacidade de formar NADPH *in vivo*: enzima málica (EM) e isocitrato desidrogenase (IDH) em extratos de epimastigotas de *T. cruzi* submetidos à estresse oxidativo (Tabela 9). Assim, caso houvessem diferenças, seriam avaliadas novamente na presença de His para detectar um possível papel protetor. Com a ideia de verificar se a atividade de alguma dessas enzimas poderia estar modificada perante um estímulo oxidativo, utilizou-se como estressor o peróxido de hidrogênio. Inicialmente determinamos o IC<sub>50</sub> para o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, como descrito na metodologia, obtendo um valor de 87,8  $\mu$ M. Uma cultura em fase exponencial de crescimento de epimastigotas de *T. cruzi* foi lavada e dividida em três frações: uma foi incubada em PBS, outra incubada em PBS suplementado com uma concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> próxima ao valor da IC<sub>50</sub>, e a outra foi diluída em meio de cultura habitual (meio LIT) durante 12 horas. Uma vez obtidos os extratos, foram medidas as atividades enzimáticas em forma paralela, e comparadas as atividades específicas dos extratos obtidos a partir dos parasitas incubados em cada uma das três condições experimentais. Nas distintas condições ensaiadas não foram observadas diferenças significativas nas atividades específicas de nenhuma das enzimas objeto de estudo. Ou seja, obtiveram-se atividades específicas equivalentes tanto para as enzimas produtoras de NADPH como para as envolvidas na biossíntese de cisteína na presença e ausência de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

| Atividades enzimáticas (nmols.mg <sup>-1</sup> de proteína.min <sup>-1</sup> , mU.min <sup>-1</sup> ) |            |            |                                     |
|---|------------|------------|-------------------------------------|
| Metabolismo de aminoácidos enxofrados   |            |            |                                     |
|   | LIT        | PBS        | PBS + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| Cisteína Sintase (OAS + S <sup>2-</sup> )   | 2,0 ± 0,3  | 2,3 ± 0,3  | 2,0 ± 0,3                           |
| Cisteína sulfidrilase (Ser + S <sup>2-</sup> )  | 0,5 ± 0,2  | 0,8 ± 0,3  | 0,7 ± 0,3                           |
| Cystathionina γ liase   | 0,3 ± 0,02 | 0,3 ± 0,03 | 0,2 ± 0,03                          |
| Produção de NADPH   |            |            |                                     |
|   | LIT        | PBS        | PBS + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> |
| Enzima málica   | 44,7 ± 4   | 43,3 ± 5   | 49,7 ± 6                            |
| Isocitrato desidrogenase  | 113,9 ± 6  | 129,9 ± 7  | 122,6 ± 8                           |

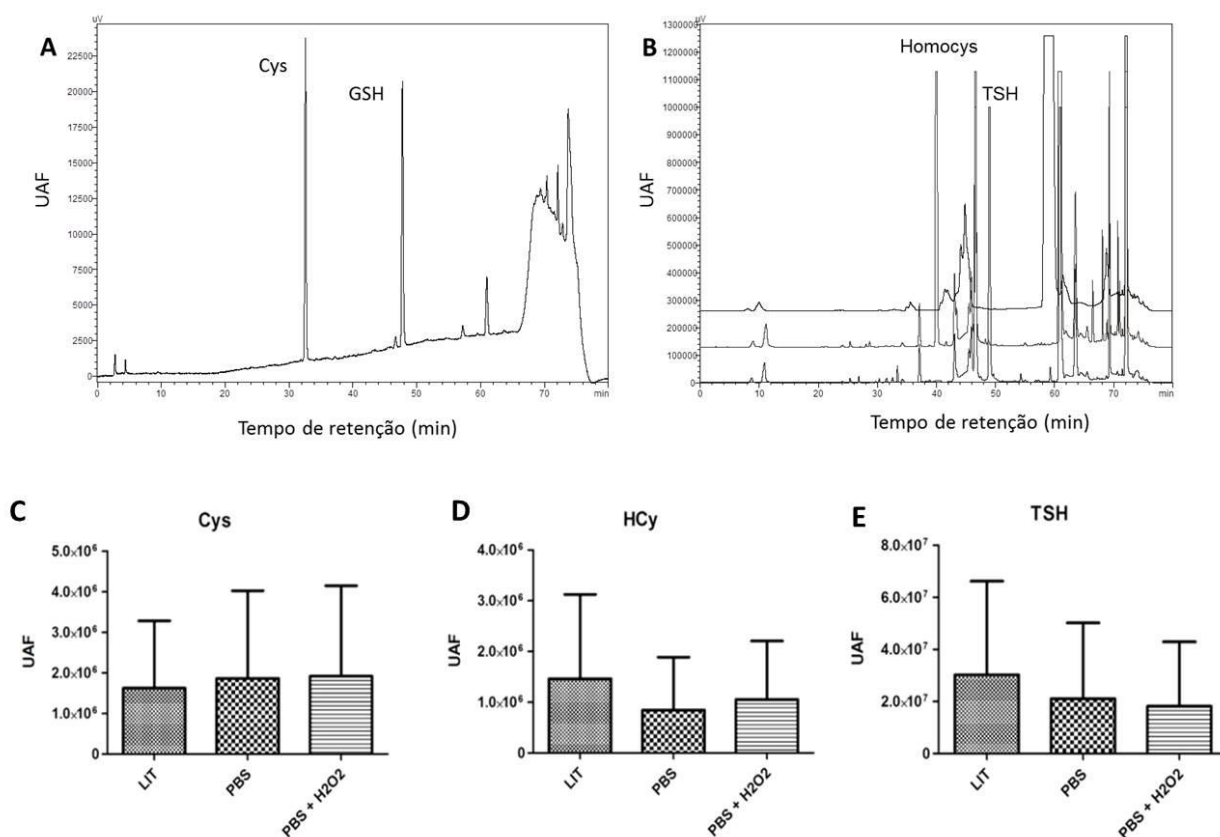
**Tabela 9:** Atividades das enzimas relacionadas à síntese de cisteína (aminoácidos enxofrados) e relacionadas à produção de NADPH. LIT: atividades medidas em extratos de parasitas incubados em LIT; PBS: atividades medidas em extratos de parasitas incubados em LIT; PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: atividades medidas em extratos de parasitas incubados em PBS e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em uma concentração próxima ao IC<sub>50</sub>.

Essas observações nos levaram a avaliar se o transporte de His poderia estar modificado como resposta ao estresse oxidativo. Assim, parasitas incubados nas três condições descritas acima foram utilizados para ensaios de transporte de His. Não observamos diferenças significativas na incorporação de His entre células estressadas e não estressadas oxidativamente (dados não mostrados).

### 3.10.1 Análise dos níveis intracelulares de tióis de baixo peso molecular por HPLC

Com o objetivo de estender nosso conhecimento aos possíveis mecanismos envolvidos no estresse oxidativo de *T. cruzi* nos interessou saber se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia estar afetando o nível intracelular de algum dos tióis de baixo peso molecular envolvidos no metabolismo de aminoácidos enxofrados. Com esse objetivo, utilizamos o reagente fluorescente monobromobimane para modificar os tióis de baixo peso molecular e identifica-los após sua separação por cromatografia em fase reversa utilizando um equipamento de HPLC acoplado a um detector de fluorescência. Inicialmente foram estabelecidas as condições de reação mais apropriadas para derivatização e separação cromatográfica dos compostos padrão (cisteína, homocisteína, glutathiona e tripanotona), assim como seus tempos de retenção (a figura 40A e B são um exemplo do perfil obtido com padrões). Nesse caso, nos interessava saber se o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poderia alterar o nível intracelular de algum dos tióis de baixo peso molecular envolvidos no metabolismo de aminoácidos enxofrados. Utilizando a metodologia mencionada foram avaliados os níveis de tióis de baixo peso molecular presentes nos extratos provenientes de

parasitas desafiados com  $H_2O_2$  ( $80 \mu M$ ), em parasitas que cresceram em médio LIT e em parasitas que foram incubados em PBS como controle. Como observado na figura 40C, embora a reprodutibilidade dos experimentos tenha sido baixa, não foram observadas diferenças marcantes nos níveis de tióis de baixo peso molecular nas condições testadas, quando avaliadas as áreas dos picos obtidos para cada um nos cromatogramas (não foram detectados níveis significantes de glutatona). O fato de não ter observado diferenças nos parâmetros avaliados: atividades enzimáticas relacionadas à produção de NADPH, assim como as de síntese de aminoácidos enxofrados, transporte de His e níveis de tióis de baixo peso molecular em parasitas submetidos a estresse oxidativo, não foi possível avaliar o papel da His em dita condição.



**Figura 40: Análise de tióis de baixo peso molecular por HPLC.** Cromatograma dos padrões cisteína (Cys) e glutatona (GSH) em **A**, e da homocisteína (Homocys) e tripanotona (TSH) em **B**, resolvidos por HPLC. Cada padrão ( $5 \mu M$  concentração final) foi previamente derivatizado com a sonda fluorescente monobromobimane, ( $0,1 \mu M$  concentração final). Os tempos de retenção foram para Cys, 32,59 min; GSH, 47,75 min; HomoCys, 40 min; e TSH 49 min. UAF: Unidades Arbitrárias de Fluorescência. **Painel inferior:** níveis intracelulares de tióis de baixo peso molecular analisados por HPLC (**C**, Cys; **D**, HomoCys e **E**, TSH). Extratos proteicos de epimastigotas cultivados 12 horas em meio LIT, PBS e PBS  $H_2O_2$   $80 \mu M$ , foram deproteinizados e derivatizados com a sonda fluorescente monobromobimane. A área dos picos correspondentes aos tempos de retenção, previamente determinados, foram integradas e analisadas como unidades arbitrárias de fluorescência normalizadas por  $mg \text{ ml}^{-1}$  de aminoácidos totais presente em cada amostra.



## **CAPITULO 4: DISCUSSÃO**

---

#### 4.1 A utilização de His é conservada entre procariontes e eucariotes, com peculiaridades entre tripanossomatídeos

A via de degradação de His até Glu pode ser encontrada nos domínios archaea, procarionte e eucariote, mostrando-se com maior frequência entre os diferentes grupos filogenéticos bacterianos. Nesses organismos a caracterização das enzimas participantes da via assim como da sua estrita regulação metabólica são amplamente descritas. Bactérias são adaptadas ao uso de His como fonte de carbono e nitrogênio, utilização que é altamente regulada por mecanismos já descritos, como por exemplo, regulação por repressão catabólica (Bender, 2012). Já em eucariotes, a presença da via completa de degradação de His é mais intermitente, sendo encontrada principalmente em vertebrados desde equinodermos até mamíferos incluindo humanos. Nestes, a primeira enzima da via de degradação, a HAL, pode ser encontrada principalmente no fígado e na pele. No fígado, acontece a degradação completa até Glu, enquanto que na pele acontece uma acumulação de *trans*-urocanato devido à carência da enzima UH. Esse intermediário pode ser isomerizado a *cis*-urocanato na presença de radiação ultravioleta, absorvendo esse tipo de energia e agindo como proteção natural para a radiação UV (Norval et al., 1995; Reilly et al., 1991). Por outro lado, existem diversos estudos mostrando a importância da His como fator antioxidante e anti-inflamatório: autores como Wade e Tucker sugerem que a manutenção de *pools* de His pode contribuir à capacidade fisiológica antioxidante do corpo humano, sugerindo uma proteção contra esse tipo de estresse (Wade, 1998). Assim, a utilização de His em humanos parece estar mais relacionada a processos de proteção celular exercido pelo próprio aminoácido. Já em tripanossomatídeos, a história é diferente. Quando procurados ortólogos das enzimas de *Trypanosoma cruzi* na principal base de dados para cinetoplastídeos ([www.tritrypdb.org](http://www.tritrypdb.org)), não achamos sequências ortólogas para TcHAL e TcUH em nenhum dos grupos de *Trypanosoma brucei* ou das espécies de *Leishmania*. Somente foram achadas sequências ortólogas para HAL e UH em um tripanossomatídeo: *Trypanosoma grayi*; enquanto que no genoma de *Trypanosoma rangeli* só uma sequência ortóloga para HAL foi achada.

##### 4.1.1 *Trypanosoma grayi*

*T. grayi* é um tripanossomatídeo extracelular que infecta crocodilos, principalmente na África. Embora sua ocorrência esteja restrita geograficamente, *T. grayi* se acha relacionado a outros tripanossomatídeos capazes de infectar crocodilos na América do Sul. Enquanto a seu

ciclo de vida, *T. grayi* tem como hospedeiro invertebrado a *Glossina morsitans*, conhecida como mosca tsé-tsé, inseto mais conhecido por ser o hospedeiro invertebrado do *T. brucei*, agente causador da doença do sono na África. Diferente do *T. brucei*, que se estabelece na glândula salivar, *T. grayi* reside principalmente no intestino da mosca, portanto, a diferença de *T. brucei*, a transmissão de *T. grayi* ocorre entre répteis pela contaminação oral com formas metacíclicas infectivas presentes nas fezes da mosca ou diretamente pela ingestão das mesmas (Hoare, 1929). Estudos genômicos mostraram que *T. grayi* é filogeneticamente mais relacionado ao *T. cruzi* que ao *T. brucei*, com quem compartilha seu hospedeiro invertebrado (Kelly et al., 2014). De acordo com essa afirmação, as sequências ortólogas com maior identidade achadas para *TcHAL* e *TcUH* entre todos os genomas sequenciados até hoje foram as presentes em *T. grayi*. Esse achado sugere que a aquisição (ou conservação) da via de degradação de His poderia estar não tão diretamente relacionada a uma co-evolução entre parasita e hospedeiro invertebrado (considerando o fato de *T. cruzi* e *T. grayi* possuírem diferentes insetos vetores), e sim mais estreitamente relacionada com o "território" colonizado no inseto, assim como com sua forma de transmissão. Um exemplo similar (mas diferente) é o caso do *Trypanosoma rangeli*.

#### 4.1.2 *Trypanosoma rangeli*

*T. rangeli* é um tripanossomatídeo relacionado ao *T. cruzi* em vários aspectos: possui uma distribuição geográfica sobreposta e portanto compartilham os mesmos reservatórios e vetores. Em algumas áreas, ambas as espécies produzem infecções mistas em vetores, dificultando a sua diferenciação morfológica (Grisard et al., 1999; Vallejo, 1998). Embora não seja patogênico para o homem, *T. rangeli* pode infectar humanos, gerando uma resposta humoral que pode incorrer em diagnósticos falsos positivos para doença de Chagas (Schottelius, 1987). Com relação ao seu ciclo de vida, *T. rangeli* alterna entre as formas epimastigotas (replicativas, presentes no intestino do inseto vetor) as quais podem penetrar o intestino, passar à hemolinfa e invadir as glândulas salivares do inseto onde acontece a metaciclogênese, dando lugar às formas tripomastigotas metacíclicas (infectivas). Assim, *T. rangeli* é transmitido aos hospedeiros vertebrados através da picada do inseto vetor (Guhl et al., 2003). O genoma de *T. rangeli* foi sequenciado e recentemente publicado (Stoco et al., 2014): quando investigada a presença dos genes responsáveis para a via de degradação de His, curiosamente, só foi identificada a sequência da histidina amônio-liase (*TrHAL*), a primeira enzima da via. Em um estudo onde foi avaliado o perfil proteico da diferenciação, foi

observado que a *TrHAL* é expressa principalmente no estágio epimastigota (Luckemeyer, 2014). Como mencionado, a principal diferença do *T. rangeli* e *T. cruzi* é sua forma de transmissão, sendo inoculativa no caso do primeiro, e por contaminação por fezes, no caso do segundo. Embora deva ser ressaltada essa importante diferença na biologia de ambos os parasitas, *T. rangeli* tem em comum com *T. cruzi* o fato de que uma parte fundamental do seu ciclo de vida acontece no intestino do barbeiro, onde também acontece a replicação das formas epimastigotas (forma onde é mais expressa a *TrHAL*). De acordo com o exposto anteriormente, algum tipo de interação entre o parasita e fatores presentes no intestino dos insetos vetores (seja barbeiro ou mosca tsé-tsé), podem ter influenciado evolutivamente na aquisição ou conservação dos genes relacionados à degradação de His.

#### **4.2 His, um aminoácido essencial capaz de ser incorporado pelo *T. cruzi***

A disponibilidade de metabólitos no meio intracelular depende da sua biossíntese, da sua degradação a partir de outras moléculas e/ou da sua incorporação desde o meio extracelular. Quando um organismo não é capaz de sintetizar um determinado metabólito, e o seu transporte é a única forma de obtê-lo, se diz que aquela molécula é essencial para o organismo. Em *T. cruzi* pouco é conhecido sobre os metabólitos essenciais para o parasita. Um exemplo deles são as poliaminas: *T. cruzi* é auxótrofo para essas importantes moléculas devido à carência das enzimas ornitina decarboxilase e arginina descarboxilase, envolvidas no primeiro passo da biossíntese de poliaminas (Carrillo et al., 1999; Carrillo et al., 2003). Poliaminas são moléculas importantes para a proliferação celular, diferenciação e síntese de macromoléculas (Tabor et al., 1984). Assim, foram descritos em formas epimastigotas de *T. cruzi* transportadores para poliaminas com diferentes afinidades (Gonzalez et al., 1992; Le Quesne et al., 1996), os quais permitem à célula dispor dessas importantes moléculas quando necessárias durante seu ciclo de vida.

His é um aminoácido essencial na maioria dos organismos. Em alguns microorganismos como *Salmonella typhimurium* e em plantas como *Arabidopsis thaliana* His pode ser sintetizada *de novo* através de uma via que envolve oito passos enzimáticos a partir de uma ribosa-5-fosfato (Ames et al., 1960; Petersen et al., 2010). Quando procurados os genes putativos para as enzimas encarregadas da biossíntese de His em bases de dados genômicas para *T. cruzi*, não foram encontradas sequências ortólogas às codificantes para as enzimas clássicas que participam da via biossintética, sugerindo que a His presente no meio extracelular seria a fonte desse aminoácido para o parasita, que o incorporaria exclusivamente

através do seu transporte para o interior celular. Uma forma de confirmar que His é um aminoácido essencial para formas epimastigotas de *T. cruzi*, seria cultivá-lo em um meio definido que careça desse aminoácido.

#### 4.2.1 His no meio extracelular é vital para o *T. cruzi*

Epimastigotas são cultivados rotineiramente em meios ricos que em geral são variações do denominado LIT [*Liver Infusion Tryptose*, (Camargo, 1964)]. O meio LIT possui na sua composição extrato de levedura, triptose, infusão de fígado e soro fetal bovino, os quais possuem uma composição desconhecida, dificultando a eliminação de algum metabólito ou molécula de interesse do meio. Inicialmente utilizamos o meio definido AR103, descrito por Roitman e Azevedo em 1984 (Azevedo, 1984). Esse meio foi desenvolvido como uma versão simplificada do meio HX25, que foi criado por Cross e Manning (Cross et al., 1973) para *Trypanosoma brucei* e posteriormente utilizado também para *T. cruzi*. De forma contrária ao observado pelos autores, as formas epimastigotas foram incapazes de proliferar quando cultivadas no meio AR103, embora se mantivessem viáveis. Recentemente, De Paula Lima e colaboradores (De Paula Lima et al., 2014) descreveram um novo meio definido para *T. cruzi*, demonstrando que o meio AR103 não é suficiente para sustentar o crescimento e proliferação de epimastigotas de *T. cruzi*, assim como observamos nas nossas culturas. Os autores mostraram que, entre outros fatores, o meio AR103 não sustentava a proliferação de epimastigotas pela carência de poliaminas na sua composição. Diante o exposto e como alternativa para sustentar a proliferação de *T. cruzi* no meio AR103, decidimos suplementá-lo com soro fetal bovino (SFB), o qual provavelmente melhoraria o desempenho do parasita, embora o mesmo deixasse de ser um meio definido para ser um meio semi-definido. Assim, após avaliar diferentes concentrações, estabelecemos uma concentração de 10% SFB para suplementar o meio AR103.

Quando a His foi retirada do meio AR103, observamos que as formas epimastigotas conseguiram se manter viáveis até 48 h após a passagem para o meio sem His, e a partir desse momento, a viabilidade diminuiu progressivamente até ser praticamente nula às 96 h de incubação. Esses resultados sugerem que o meio sem His não sustentaria o crescimento de epimastigotas, além de aproximadamente 48 h. Provavelmente, durante esse tempo, os parasitas conseguem suprir a falta de His com componentes do soro, ou através dos aminoácidos armazenados na célula em forma de proteínas nos reservossomos (Sant'Anna, 2008). Após 48 h, a viabilidade diminui e a morfologia dos parasitas começa a mostrar

alterações significativas, sugerindo que o estresse gerado pela carência de His pode desencadear processos na célula que levariam à morte celular. Assim, nossos experimentos sugerem que His é um aminoácido essencial para o parasita, e que sua disponibilidade no meio extracelular é extremamente importante para a biologia de *T. cruzi*, colocando ao sistema de transporte desse aminoácido como a principal via de obtenção de His.

#### 4.2.2 His é incorporada através de um único sistema específico e dependente de ATP

O fato de *T. cruzi* se desenvolver, ao menos em parte do seu ciclo de vida, em ambientes ricos em aminoácidos levou o parasita a se adaptar ao uso de aminoácidos como fonte de energia, carbono e nitrogênio. Assim, o parasita desenvolveu diferentes sistemas para a incorporação dessas importantes moléculas. Em *T. cruzi* foram caracterizados alguns transportadores de aminoácidos. Foram descritos dois sistemas para a incorporação de L-arginina, um de alta e outro de baixa afinidade (Canepa et al., 2004; Pereira et al., 1999). Características similares foram observadas para o transporte de Pro: o transporte desse aminoácido ocorre entre dois transportadores de alta e baixa afinidade (sistemas A e B respectivamente). O sistema A é um transportador dependente do gradiente de prótons como força motriz, enquanto o sistema B depende da energia proveniente do ATP para a incorporação de Pro (Silber, 2002). Esse mecanismo envolvendo transportadores com diferentes afinidades poderia permitir ao parasita uma rápida adaptação às variações nas concentrações que são encontradas pelo parasita ao longo do seu ciclo de vida. Além desses, foram descritos transportadores para Glu e aspartato (Canepa et al., 2005; Silber, 2006) e mais recentemente, foram publicadas as caracterizações dos transportadores de lisina e cisteína (Canepa et al., 2009; Inbar et al., 2010). No presente trabalho, mostramos que formas epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de incorporar His através de um sistema único e saturável com parâmetros cinéticos determinados. A constante de Michaelis-Menten e a atividade específica obtidas são similares as descritas para outros transportadores de aminoácidos já descritos em *T. cruzi* (Tabela 10). Devido à sugerida abundância de His nos fluidos excretados do inseto vetor, decidimos comparar a incorporação desse aminoácido nas duas formas presentes no hospedeiro invertebrado. As formas epimastigotas, forma replicativa presente no hospedeiro invertebrado, incorpora 75% mais His em comparação com tripomastigotas metacíclicas, sugerindo uma maior dependência dos epimastigotas com a disponibilidade extracelular de His.

| Aminoácido       | $K_M$ (mM) | $V_{MAX}$ (nmols . min <sup>-1</sup> . 20x10 <sup>6</sup> células) | Ref.           |
|------------------|------------|--|----------------|
| <b>Prolina</b>   | 0,31/1,36  | 0,012/0,065  | (Silber, 2002) |
| <b>Glutamato</b> | 0,30       | 0,098  | (Silber, 2006) |
| <b>Arginina</b>  | 0,35       | 0,097 (por 10 <sup>7</sup> cél)                                    | (Canepa, 2004) |

**Tabela 10:** Parâmetros cinéticos para transportadores de aminoácidos descritos em *T. cruzi*.

*T. cruzi* alterna entre diferentes ambientes, como o inseto vetor e o hospedeiro mamífero, e por tanto é exposto a condições variáveis, como diferentes temperaturas. Quando avaliamos a dependência do transportador de His com a temperatura observamos um aumento progressivo na atividade do transportador entre 10 e 40 °C. A 45 °C, a incorporação se manteve ativa, mostrando que o parasita pode incorporar His em condições extremas de temperatura.

O mecanismo envolvido no transporte de His também foi avaliado. Observamos que His é incorporada a través de um sistema independente de íons Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup>, mas é levemente dependente da concentração extracelular de H<sup>+</sup> (pH), mostrando maior atividade entre 5,5 e 6,5. Por outro lado, quando o gradiente de H<sup>+</sup> da membrana plasmática foi desacoplado utilizando FCCP não observamos diferenças no transporte, demonstrando que a força próton-motriz não é responsável pela incorporação de His. Devido a que observamos uma leve dependência do transporte com o pH, sugerimos que o pH ótimo para a incorporação de His pode estar determinado pelo estado de oxidação da His, cujo pKa é aproximadamente 6. Esse fato resulta interessante, devido ao *T. cruzi* ser exposto a diferentes pHs extracelulares durante seu ciclo de vida. Especificamente, o pH presente no trato digestivo e urina do hospedeiro invertebrado é 5,5 (Contreras, 1985c), sustentando a hipótese que His, um aminoácido abundante nesse meio, poderia ser usada preferencialmente pelo parasita durante esses estágios. Posteriormente, avaliamos a dependência de ATP do processo de transporte de His. Para isso, o ensaio de transporte foi realizado na presença de Oligomicina A, um inibidor da ATP sintetase. Neste caso, observamos uma diminuição na incorporação de His, indicando que o transporte depende da presença de ATP na célula, e de um estado energético favorável para a sua incorporação. A partir de este resultado, e considerando o valor de energia de ativação obtido (55,25 kJ/mol) podemos concluir que é necessária a hidrólise de duas moléculas de ATP para a ativação e incorporação de uma molécula de His ( $\Delta G$  para a hidrólise de 1 mol de ATP ~ 30 kJ/mol). Também em relação ao mecanismo envolvido na incorporação de His, avaliamos a possibilidade do transportador ser ativado pelos níveis intracelulares de His livre. Não foram observadas diferenças significativas no transporte quando os parasitas foram submetidos à estresse nutricional, mostrando que, de acordo com

um transportador dependente do ATP, a atividade do transportador não é regulada pela diferença entre concentrações extra e intracelulares do aminoácido.

O transportador de His mostrou-se um sistema específico, pois nenhuma das moléculas estruturalmente relacionadas com His mostrou uma inibição no transporte do aminoácido. Se nenhum dos análogos estruturais testados foi capaz de competir com His pelo transportador, nos perguntamos se este poderia ser um transportador de aminoácidos geral, de baixa especificidade. Aminoácidos com a estrutura mais simples como glicina e alanina foram testados sem observar inibição no transporte. Foram testados também como inibidores, aminoácidos relacionados metabolicamente à His: Glu, o produto final da via de degradação de His não inibe sua incorporação, mostrando que o transporte não é regulado por um mecanismo de retroalimentação. Como já mencionado, o primeiro passo no catabolismo da His consiste na desaminação não-oxidativa catalisada pela enzima *TcHAL*, produzindo urocanato e amônia. Em *T. cruzi*, essa amônia pode ser utilizada por enzimas detoxificadoras que removem amônia do meio, como a glutamina sintase, já descrita como participante nesse mecanismo de detoxificação (dados não publicados do nosso grupo). Por outro lado, a Pro é um relevante metabolito sintetizado a partir de Glu que também seria abundante no inseto vetor. Gln e Pro não mostraram um efeito inibitório na incorporação de His, sugerindo que as vias envolvendo estes metabólitos poderiam funcionar de uma forma independente.

### ***4.3 As enzimas TcHAL e TcUH são funcionais e participam da degradação de His em epimastigotas de T. cruzi***

#### ***4.3.1 TcHAL***

De uma forma geral, o primeiro passo na degradação de aminoácidos acontece pela transaminação ou pela desaminação oxidativa do aminoácido, rendendo como produto o correspondente ceto-ácido. No caso da His, a primeira reação enzimática é a eliminação não oxidativa do grupo  $\alpha$ -amino pela HAL (EC 4.3.1.3), rendendo como produtos urocanato e amônio. O cofator utilizado por este tipo de enzimas é o MIO, gerado pós- traducionalmente pela ciclagem de três resíduos altamente conservados (Ala-Ser-Gly) (Louie, 2006; Schwede, 1999). Quando analisado o gene putativo para HAL em *Trypanosoma cruzi* achamos o tripéptido ASG, mostrando que a enzima presente no parasita possui esse grupo funcional importante na catálise enzimática, assim como os mecanismos pós traducionais que permitem dita modificação.



A *TcHAL* foi obtida de forma solúvel quando expressa em sistema heterólogo e foram determinados seus parâmetros cinéticos. Os valores de  $K_M$  e  $V_{MAX}$  obtidos se relacionam com dados já descritos na literatura para as HALs caracterizadas em outros organismos (Tabela 11) (Brand et al., 1976; Consevage et al., 1985; Hernandez et al., 1993; Shibatani et al., 1975).

| Organismo                     | $K_M$ (mM) | $V_{MAX}$ ( $\mu\text{mols. min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) | Ref.              |
|-------------------------------|------------|---|-------------------|
| <i>Pseudomonas putida</i>     | 5,3        | 70,4  | (Hernandez, 1993) |
| <i>Rattus novergicus</i>      | 2,1        | 9,94  | (Brand, 1976)     |
| <i>Achromobacter liquidum</i> | 3,6        | 63  | (Shibatani, 1975) |

**Tabela 11:** Parâmetros cinéticos descritos para HALs em outros organismos.

Curiosamente, a *TcHAL* é mais ativa a pH básico, entre 8 e 10, a diferença do observado para o transportador, o qual possui uma atividade específica maior a pH levemente ácido. Quando avaliada a dependência da *TcHAL* com a temperatura, observamos uma alta estabilidade da enzima, mostrando uma atividade que se incrementa de forma linear com a temperatura até os 55 °C.

#### 4.3.2 *TcUH*

O urocanato formado na primeira reação é posteriormente convertido em 4-imidazolona-5-propionato (IPA) através da enzima UH (EC 4.2.1.49), a qual utiliza como cofator  $\text{NAD}^+$  covalentemente unido, funcionando como grupo electrófilo. No caso da sequência putativa para UH achada no banco de dados genômico de *T. cruzi* observamos a conservação nos resíduos descritos como importantes para a união do grupo  $\text{NAD}^+$  assim como de aqueles encarregados da interação com o substrato, mostrando que como no caso da *TcHAL*, a *TcUH* possui os elementos necessários para a catálise enzimática correspondente.

A partir da enzima *TcUH* recombinante foram determinados os parâmetros cinéticos: os valores de  $K_M$  e  $V_{MAX}$  obtidos foram comparados aos mesmos parâmetros já descritos na literatura, observando-se similaridade da *TcUH* com relação a outros organismos (Tabela 12). Quando comparamos os valores de  $K_M$  calculados para a enzima recombinante [ $(19,07 \pm 2,09) \mu\text{M}$ ] e o calculado para a enzima presente em extrato de epimastigotas [ $(2,72 \pm 0,47) \mu\text{M}$ ] observamos uma diferença importante. Embora ambas as constantes sejam consideradas aparentes, a enzima recombinante mostrou uma afinidade menor pelo substrato, a qual poderia estar relacionada a uma diferença no enovelamento ou na conformação apropriada da enzima.

| Organismo                 | $K_M$ ( $\mu\text{M}$ ) | $V_{MAX}$ ( $\mu\text{mols}/\text{min}^{-1}.\text{mg}^{-1}$ ) | Referência               |
|---------------------------|-------------------------|---|--------------------------|
| <i>Bos taurus</i>         | 5,0                     | 0,131   | (Hassall, 1971)          |
| <i>Bacillus subtilis</i>  | 77                      | 0,278   | (Kaminskas et al., 1970) |
| <i>Pseudomonas putida</i> | 35,4                    | 4,17 (U/mg)   | (Lenz et al., 1993)      |

**Tabela 12:** Parâmetros cinéticos descritos para UHs em outros organismos.

Quando avaliada a dependência da TcUH recombinante respeito do pH e da temperatura, observamos que o consumo de urocanato é mais eficiente a pH levemente básico, similar ao obtido com a TcHAL. Enquanto à temperatura, observamos uma dependência menor da TcUH, mostrando mais atividade entre 30 e 40 °C, e caindo quando a temperatura aumenta além dos 45 °C. Provavelmente, a conformação da TcUH recombinante não seja o suficientemente estável para suportar aumentos maiores na temperatura, como observamos com a TcHAL.

#### 4.3.3 TcHAL e TcUH são enzimas citoplasmáticas expressas nos estágios presentes no inseto vetor

A partir das TcHAL e TcUH recombinantes foram obtidos soros policlonais contra ambas as enzimas e os mesmos utilizados para avaliar sua expressão e localização sub-celular. Estudos prévios mostram que tanto a TcHAL quanto a TcUH são expressas preferencialmente nos estágios presentes no inseto vetor: quando avaliados os níveis de transcriptos se observou uma maior expressão das enzimas da via de degradação da His nas formas epimastigotas (Minning et al., 2009), enquanto que Atwood e colaboradores mostraram que a nível proteico, TcHAL e TcUH são abundantemente expressas nas formas no inseto vetor e quase indetectáveis nas formas no hospedeiro mamífero. O mesmo observou-se quando avaliamos a expressão utilizando nossos anticorpos, corroborando o observado na literatura. Enquanto à localização sub-celular da TcHAL e TcUH em epimastigotas de *T. cruzi*, observamos que ambas as proteínas apresentam um padrão de localização citoplasmática, como já predito pela análise *in silico* e confirmada pela co-localização com a enzima malato desidrogenase (marcador de localização sub-celular citoplasmática).

#### ***4.4 His como aminoácido chave na bioenergética de epimastigotas de T. cruzi***

##### *4.4.1 Epimastigotas em fase exponencial de crescimento consomem Glc de forma preferencial*

Como descrito por vários autores, *T. cruzi* é capaz de catabolizar preferencialmente Glc, utilizando-a como fonte de energia, e após sua exaustão, inicia o consumo de aminoácidos, com uma atividade mitocondrial aumentada, necessária para a utilização desses metabólitos como fonte de energia (Cannata, 1984; Cazzulo, 1985; Engel, 1987). Quando avaliados os metabólitos relacionados ao metabolismo energético durante as fases exponencial e estacionária de crescimento utilizando uma abordagem metabolômica, os dados anteriormente descritos foram corroborados. Parasitas em fase exponencial de crescimento mostraram uma incorporação maior de Glc, observada pelos maiores níveis desse açúcar, assim como uma glicólise ativa, detectada pelos maiores níveis do seu produto, piruvato, quando comparados aos observados na fase estacionária. O piruvato, convertido em acetil-CoA, alimenta o TCA, como observado pelo aumento nos níveis dos seus intermediários: citrato, isocitrato, succinil-CoA e malato mostraram um incremento significativo na fase exponencial. Por outro lado, succinato e fumarato não mostraram diferenças significativas. Esses dois intermediários são o substrato e o produto respectivamente da succinato desidrogenase, complexo II da cadeia de transporte de elétrons. É esperado que os seus níveis se mantivessem estáveis, vista a importância desses intermediários para a homeostase mitocondrial e do metabolismo energético.

O único metabólito do TCA que mostrou um comportamento inverso, ou seja, um aumento na fase estacionária foi o  $\alpha$ -KG. Como mencionado na introdução, a fase estacionária é caracterizada por um aumento na degradação de aminoácidos que são utilizados como fonte de energia. Assim, a degradação de Glu e a de todos os aminoácidos que são convertidos em Glu (Pro, His, Gln), darão como produto  $\alpha$ -KG. Além disso, quando analisado o proteoma de *T. cruzi* através da metaciclo gênese (Hernandez, 2012; Parodi-Talice et al., 2007) duas proteínas foram identificadas como Glu desidrogenases (GluDH), as quais se acumulavam durante a condição de estresse nutricional. As GluDHs são enzimas importantes que relacionam os metabolismos de carbono e nitrogênio, através da conversão reversível de Glu em  $\alpha$ -KG. Esses fatos poderiam explicar a presença de maiores níveis de esse ceto-ácido na fase estacionária de crescimento.

#### 4.4.2 *Epimastigotas em fase estacionária consomem aminoácidos e se preparam para a metaciclo gênese*

Na natureza, o estado que mencionamos como fase estacionária nas culturas *in vitro* pode se corresponder com aqueles parasitas presentes na porção terminal (posterior) do intestino do inseto vetor, onde a disponibilidade de nutrientes seria limitada, e os metabólitos de escolha para serem utilizados como fonte de energia são os aminoácidos. Assim, a fase estacionária de crescimento é descrita como uma fase pré-adaptativa para a metaciclo gênese. No que diz respeito à disponibilidade de aminoácidos, é sabido que His, Lys, Leu, Val e Pro estão presentes e são constituintes da hemolinfa e dos fluidos excretados do inseto vetor (Barrett et al., 1975; Harington, 1956; 1961a; b). Além disso, foi relatado que durante a fase estacionária há uma alta taxa de degradação proteolítica (Henriquez, 1993), assim como uma diminuição nas taxas de tradução proteica (Tonelli, 2011) nos epimastigotas, o que disponibilizaria maiores quantidades de aminoácidos livres. Assim, na nossa análise encontramos que a maior parte dos aminoácidos (Ser, Tyr, Met, Trp, Cys, Pro, Thr, Asn, Val, Ile e His) são significativamente mais abundantes na fase estacionária de crescimento.  $\alpha$ -KG, produto da degradação de aminoácidos através do Glu, também mostrou-se significativamente aumentado na fase estacionária.

#### 4.4.3 *His é consumida em ambas as fases de crescimento, mas é acumulada na fase estacionária*

Para investigar mais em detalhe o metabolismo de His entre as fases exponencial e estacionária, decidimos avaliar cada um dos passos do metabolismo de His em epimastigotas: transporte ao interior celular, níveis de expressão proteica e atividade das duas primeiras enzimas de degradação da His (*TcHAL* e *TcUH*), e comparamos esses parâmetros com os dados obtidos por metabolômica. Quando avaliamos a atividade do transportador, vimos que este é mais ativo na fase estacionária. Não foram observadas diferenças na expressão da *TcHAL* e *TcUH* entre as fases exponencial e estacionária, sugerindo que não há uma regulação a nível de tradução entre ambas as fases de crescimento. Ao contrário ao esperado, *TcHAL* e *TcUH* foram mais ativas na fase exponencial de crescimento. Como já discutido, epimastigotas nessa fase de crescimento consomem preferencialmente Glc, antes de começar a degradar aminoácidos. É importante lembrar que, como mencionado anteriormente, as culturas axênicas de epimastigotas de *T. cruzi* mantidas em grande parte dos laboratórios ao

redor do mundo são crescidas em meio LIT (Camargo, 1964) ou semelhantes. Estes meios além de componentes não definidos como soro fetal bovino, são em todos os casos suplementados com Glc. Assim, nos últimos 50 anos todas as culturas de epimastigotas de *T. cruzi* vem sendo adaptados ao uso de Glc como fonte de energia. Mas não necessariamente, a composição do LIT reflete o que acontece na natureza, no interior do inseto vetor, onde a Glc livre é escassa devido à rápida incorporação pelas células epiteliais do inseto, ou à sua conversão em trealose. Interessantemente, epimastigotas em fase exponencial de crescimento não são capazes de incorporar trealose, e não são capazes de secretar uma atividade trealase (Ariel M. Silber, comunicação pessoal). Tendo isso em mente, não seria inesperada a utilização de um aminoácido como His durante a fase exponencial de crescimento, considerando os relatos descrevendo a presença de His nos fluídos excretados do inseto.

De acordo com esse resultado, a maior quantidade de His detectada no meio intracelular nos parasitas em fase estacionária poderia ser o resultado da menor degradação do aminoácido nessa fase, gerando um acúmulo de His, que seria incrementado pela maior taxa de incorporação desse aminoácido desde o meio extracelular. Assim, podemos sugerir que o parasita utiliza His em ambas as fases de crescimento, mostrando uma maior degradação na fase exponencial e certo acúmulo do aminoácido na fase estacionária de crescimento. O motivo pelo qual o parasita acumula His na fase estacionária é desconhecido, mas a provável utilização desse aminoácido em processos relacionados à metaciclologênese parece ser a hipótese mais interessante.

#### *4.4.4 His é uma eficiente fonte de energia e carbono para epimastigotas de T. cruzi*

O seguinte passo na nossa caracterização do papel da His na biologia do *T. cruzi* foi avaliar sua possível utilização como fonte energética. Já é amplamente descrito que o parasita utiliza aminoácidos como fonte de energia e carbono: é sabido que Asn, Gln, Glu, Leu, Ile e Pro são consumidos pelo parasita gerando intermediários do TCA (Sylvester et al., 1976a; Zeledon, 1960a). Também arginina, através da sua forma fosforilada, participa na administração de recursos energéticos da célula (Pereira et al., 2002b).

Inicialmente, avaliamos se His poderia sustentar a viabilidade de epimastigotas, transferindo os parasitas em fase exponencial de crescimento em meio LIT a PBS e PBS suplementado com diferentes substratos oxidáveis. Após um período de 24 horas os parasitas mostraram-se viáveis nessas condições, indicando que são capazes de utilizar His como única fonte de carbono e energia. O mesmo foi realizado, utilizando parasitas estressados

nutricionalmente durante 30 h. Esse tratamento gera a diminuição dos *pools* intracelulares de metabólitos livres e permite avaliar mais precisamente o efeito do substrato adicionado para promover a recuperação da viabilidade celular. Assim, observamos que His promoveu a recuperação dos parasitas estressados, de forma comparável à Glc ou Pro, substratos já descritos como importantes para o metabolismo energético do parasita.

Se o parasita consegue utilizar His como fonte energética, então o Glu gerado na sua degradação deve ser convertido por transaminases ou por alguma das Glu desidrogenases em  $\alpha$ -KG o qual entraria no TCA, para posterior oxidação. Para avaliar a existência dessa via, utilizamos His marcada radioativamente com  $^{14}\text{C}$  em todos os seus carbonos e detectamos a produção de  $^{14}\text{CO}_2$  gerado no TCA após degradação de His. Mais de 30% da His incorporada foi recuperada como  $\text{CO}_2$ , mostrando que a degradação desse aminoácido gera  $\alpha$ -KG o qual representa o ponto de entrada no TCA. Quando Pro é adicionada junto a His e detectamos  $\text{CO}_2$  produzido, não observamos diferenças entre a adição ou não de Pro, sugerindo que em parasitas em fase exponencial de crescimento, ambas as fontes podem ser utilizadas, sem interferir uma na degradação da outra. Interessantemente, quando a Glc estava presente no meio junto à His, observamos uma diminuição significativa na emissão do gás, sugerindo que o catabolismo da His poderia estar sendo inibido na presença da Glc, o qual é esperado para um parasita cujo metabolismo consegue mudar facilmente entre um metabolismo baseado em consumo de açúcar e um baseado na degradação de aminoácidos. Além do  $\text{CO}_2$ , no TCA também são produzidos cofatores reduzidos como NADH e  $\text{FADH}_2$ , os quais representam equivalentes de redução que serão reoxidados na cadeia de transporte de elétrons, permitindo o fluxo dos mesmos até a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa. Portanto, o seguinte passo na nossa caracterização foi avaliar a síntese de ATP dependente de His, assim como os parâmetros mitocondriais: taxa de respiração e restauração do potencial de membrana interno mitocondrial. A recuperação com His após o período de estresse nutricional foi capaz de restabelecer o  $\Delta\Psi_m$ , com uma eficiência comparável ao meio LIT. A diferença da Pro, *T. cruzi* é incapaz de sintetizar His. Em ambos os casos, as enzimas responsáveis pela degradação de His e a biosíntese de Pro são citosólicas (dados não publicados do nosso grupo), enquanto que a Pro deve atravessar as membranas mitocondriais para ser oxidada. Assumindo que os elétrons da His entram ao TCA a través do  $\alpha$ -KG e posteriormente à cadeia de transporte de elétrons, esse mecanismo parece ser mais eficiente sob condições de estresse nutricional. Além disso, detectamos produção de ATP a partir da fosforilação oxidativa e consumo de oxigênio na mitocôndria quando parasitas foram recuperados com His, em magnitudes comparáveis aos obtidos utilizando Pro, mostrando que

His é um aminoácido essencial envolvido nos processos bioenergéticos e na persistência do parasita dentro do hospedeiro invertebrado.

#### ***4.5 His é capaz de promover a metaciclogênese***

O fato de His ser acumulada durante a fase estacionária nos levou a pensar que esse aminoácido poderia participar do processo de diferenciação de formas epimastigotas à tripomastigotas metacíclicas. É sabido que metabólitos como Pro e Glc podem induzir a metaciclogênese *in vitro*, em meio quimicamente definido (Contreras, 1985c). Por outro lado, Homsy e colaboradores, mostraram que Glu também estimula a metaciclogênese, enquanto aminoácidos como Leu e Ile inibem a transformação induzida pela Pro (Homsy, 1989b). É sabido que diferentes cepas de *T. cruzi* respondem de forma variada à metaciclogênese *in vitro* em meio definido (Contreras, 1985c), portanto foi necessária inicialmente, a padronização da metaciclogênese na nossa cepa de estudo, CL14. Utilizando o meio TAU-3AAG, conseguimos uma porcentagem de diferenciação aproximada de 30%, um valor comparável ao obtido com a cepa Dm28c, amplamente utilizada em estudos de metaciclogênese. Quando a diferenciação de epimastigotas de CL14 foi avaliada em diferentes meios definidos, suplementados com Pro ou His, observamos que as porcentagens de diferenciação foram similares às obtidas pelo meio padrão, TAU 3AAG, mostrando que His é capaz de promover a metaciclogênese, assim como Pro. Quando ambos os aminoácidos se combinaram no TAU-HP, não foi observado um efeito aditivo, mostrando uma diferenciação similar à obtida quando ambos os aminoácidos foram utilizados separadamente.

Para analisar quais as mudanças metabólicas induzidas pela His durante a diferenciação, utilizamos uma abordagem metabolômica dirigida, pela qual foram avaliados diferentes grupos de metabólitos ao longo da diferenciação. A fim de entender como His estimula a metaciclogênese, primeiro foi necessário analisar o processo no meio padrão, TAU-3AAG para posteriormente analisar as mudanças nos outros meios definidos.

#### 4.5.1 A incubação em meio TAU puro induz um estresse nutricional necessário para iniciar a diferenciação

O primeiro passo na diferenciação *in vitro* em meio definido é a incubação por duas horas em meio TAU puro, composto apenas por sais e tem como objetivo induzir um estresse nutricional no parasita, o qual é incubado no TAU a partir de culturas em fase estacionária em meio LIT. Um dos fatores que pode desencadear a metaciclologênese é o empobrecimento do meio: foi descrito que o esgotamento de nutrientes pode estimular a transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (Contreras et al., 1985a; Contreras, 1985c; Sullivan, 1982), o que foi observado inicialmente por Camargo e colaboradores, quando formas tripomastigotas metacíclicas se desenvolveram espontaneamente em culturas de epimastigotas em fase estacionária tardia (Camargo, 1964).

Quando analisado o padrão metabólico em parasitas incubados em meio TAU puro, observamos que aos 30 minutos após a passagem para o meio TAU, moléculas responsáveis pelo metabolismo energético em epimastigotas, como aminoácidos e intermediários do TCA, mostraram uma diminuição significativa nos seus níveis intracelulares. Outro metabólito que mostrou uma diminuição foi o piruvato, um dos produtos da glicólise também pode estar relacionado à redução do estado energético do parasita, uma vez que o epimastigota em fase estacionária foi mantido por 4 dias em LIT, e por ser um meio suplementado com 0.2% de Glc favorece o catabolismo desse açúcar como fonte de energia e carbono; e quando incubado em meio TAU os níveis de piruvato diminuíram devido a redução/não disponibilidade dessa fonte de energia. Esses resultados em conjunto indicam que 30 minutos de incubação em meio TAU foram suficientes para alterar o estado energético dos parasitas, que foi reduzido até o final da incubação em TAU, corroborando o relatado anteriormente por outros autores. Destacamos os aminoácidos ramificados representados pela Leu e Ile que aumentaram em 30 minutos e 2 horas de incubação. O possível papel desses aminoácidos no estresse nutricional induzido pelo TAU ainda é desconhecido e mais estudos serão necessários para entender a sua relevância.

A tripanotona, uma das moléculas características da defesa contra o estresse oxidativo e indicadora do estado redox no parasita aumentou durante a incubação no meio TAU, evidenciando esse período como um momento de estresse fisiológico da célula (Ariyanayagam, 2001).



#### 4.5.2 Metabolismo energético durante a diferenciação em TAU-3AAG

Parasitas submetidos a diferenciação *in vitro* em TAU-3AAG estão expostos a quatro metabólitos no meio extracelular: Glc, Pro, Glu e Asp. Quando analisados os perfis da Glc e piruvato ao longo da diferenciação, observou-se uma maior atividade glicolítica na parte final da metaciclologênese, no sexto dia. Esses resultados poderiam sugerir uma maior incorporação da Glc na parte final da diferenciação, assim como a sua degradação, representada pelo aumento nos níveis de piruvato. Em relação aos níveis dos intermediários do TCA, observamos o mesmo padrão que comentamos anteriormente: níveis maiores no final da diferenciação. O fato de essas vias estarem mais ativas só na parte final da metaciclologênese poderia sugerir que as formas aderidas, as quais se encontram no passo final para diferenciar, teriam uma demanda energética maior, e utilizariam a Glc ou algum dos aminoácidos presentes no meio para esses fins. É descrito na literatura que formas tripomastigotas metacíclicas possuem um metabolismo energético baseado no consumo de aminoácidos, e que algumas enzimas do TCA como a citrato sintase, a isocitrato desidrogenase dependente de  $\text{NADP}^+$ , e a succinato desidrogenase apresentam atividades incrementadas nessas formas quando comparados a epimastigotas. Por outro lado o metabolismo baseado na glicólise estaria reprimido (Adroher et al., 1988; Urbina, 1989). Interessantemente, como relatado acima, após seis dias de incubação em meio TAU os parasitas mostraram níveis maiores de Glc, mostrando que provavelmente, em condições *in vitro* e na presença desse açúcar no meio extracelular, o parasita também utilize a Glc como fonte de energia.

Com relação ao metabolismo de His, não observamos mudanças nos níveis de urocanato, o primeiro produto da sua degradação. Isto é esperado, considerando que não há disponibilidade de His no meio para ser incorporada e que, como já descrito, o parasita não possui os genes putativos para a biossíntese de His. Embora possa existir um nível basal de His nesses parasitas, há disponibilidade de moléculas como Pro e Glc, precursoras do metabolismo energético já descritas (Cazzulo, 1994b; Mantilla, 2015).

#### 4.5.3 Metabolismo energético durante a diferenciação em TAU-His

Como descrito nesse trabalho, His pode ser incorporada desde o meio extracelular através de um transportador específico que depende de um estado energético favorável da célula. Quando avaliados os níveis dos intermediários do metabolismo de His, assim como os intermediários do TCA em parasitas incubados em TAU-His, observamos que His estaria

sendo incorporada, degradada a Glu e oxidada no TCA, já a partir das 24 horas após incubação no TAU-His. Interessantemente, após seis dias de incubação, os níveis de His, urocanato e Glu estão diminuídos, mostrando que provavelmente nesse ponto da diferenciação o catabolismo de His é reduzido. Embora isso, após 6 dias se observam níveis altos de intermediários do TCA, o que poderia sugerir que a degradação de His que acontece durante a diferenciação é suficiente para suprir o TCA com intermediários mesmo quando não há catabolismo da His; ou também não podemos descartar que na fase final da diferenciação o parasita esteja utilizando uma fonte de energia alternativa, que pelos nossos resultados não pode ser identificada. Um dado a ser levado em consideração nesse momento é o fato do *T. cruzi* possuir estruturas denominadas reservossomos, que estocam macromoléculas como lipídeos, proteínas e enzimas lisossomais. É descrito que, durante a metacicloênese em meio definido, devido à intensa degradação de proteínas e lipídeos armazenados, o reservossomo diminui seu tamanho e essa estrutura desaparece ao final do processo de metacicloênese (Cunha-e-Silva et al., 2006; Soares, 1989). Assim, o parasita poderia utilizar os aminoácidos estocados nos reservossomos na parte final da diferenciação, uma vez que não é observada degradação de His nesse ponto da diferenciação. Dessa forma, devemos considerar que, apesar das análises de metabolômica terem sido realizadas em parasitas mantidos em meios definidos, onde a disponibilidade de nutrientes no meio externo (de cultura) é conhecida, não é possível afirmar o mesmo do conteúdo intracelular, que estaria relacionado tanto com os nutrientes do meio externo quanto com os liberados dos reservossomos.

Os outros metabólitos analisados não mostraram diferenças significativas entre os diferentes pontos ao longo da diferenciação, sugerindo que talvez entre as vias metabólicas analisadas, a única que mostrou variações e portanto, aporte da His presente no meio, foi a própria degradação de His e o TCA. Esses resultados mostram que His estaria sendo utilizada principalmente como fonte de energia durante a diferenciação. Outro papel para este aminoácido na metacicloênese não pode ser descartado, pois as vias analisadas não são suficientemente abrangentes para ter um panorama completo do processo.

#### *4.5.4 Metabolismo energético durante a diferenciação em TAU-Pro e TAU-HP*

Em 1985, Contreras e colaboradores mostraram que Pro é capaz de sustentar a metacicloênese, mostrando altas taxas de formas metacíclicas. Os autores sugerem que dito aminoácido poderia agir como um disparador do processo de diferenciação, ou talvez como

fonte de energia quando, em condições de stress fisiológico, o parasita deve iniciar o processo de diferenciação a formas metacíclicas (Contreras, 1985c). Quando avaliado o metabolismo de Pro e seus derivados em parasitas diferenciados em TAU-Pro, surpreendentemente observamos que os níveis de Pro intracelular só se mostraram incrementados na fração aderida correspondente ao sexto dia de incubação e não após 24 hs de incubação, como observado no caso dos parasitas incubados em TAU-His. O produto final da degradação da Pro, o Glu, não mostrou grandes variações: apenas na fração aderida de seis dias observou-se um aumento significativo com respeito aos tripomastigotas metacíclicos. Talvez o uso de Pro pelo parasita é muito mais rápido, consumindo toda a Pro de forma imediata após esta ser incorporada, o que poderia resultar em níveis não tão altos quanto os esperados. Embora o Glu seja um intermediário central no metabolismo de aminoácidos, e possa estar procedendo de outras vias, o perfil aqui é diferente do observado quando os parasitas são incubados em TAU-3AAG ou TAU-His, mostrando um incremento aos seis dias de incubação. Esse resultado sugere que realmente a Pro pode ser degradada mais ativamente na parte final da metaciclogênese, no momento prévio a diferenciação completa a tripomastigotas metacíclicos. Seguindo na mesma linha de raciocínio, observamos que os intermediários do TCA que mostram um aumento significativo durante a metaciclogênese, o fazem na mesma fração, na correspondente aos parasitas aderidos do sexto dia de incubação, apoiando a ideia de que este ponto da diferenciação seja mais ativo e mais demandante energeticamente. Nesse sentido, o mesmo foi observado no TAU-3AAG: os níveis de piruvato provenientes provavelmente da glicólise e os intermediários do TCA estavam aumentados na mesma fração.

Quando os parasitas foram diferenciados em meio TAU suplementado com Pro e His obteve-se um resultado interessante: na presença desses dois aminoácidos, o nível intracelular de His 24 h após a passagem ao TAU suplementado foi menor que o obtido em TAU-His, sugerindo que na presença de Pro, pode existir uma necessidade menor da célula em diferenciação com respeito a His, caso exista outra fonte energeticamente mais favorável (como a Pro). Esse resultado se torna mais interessante quando consideramos alguns dos resultados descritos na presente tese: na presença de Pro não é alterada a atividade do transportador de His (figura 10, pág. 69), nem a sua oxidação no TCA, evidenciado pela produção de CO<sub>2</sub> inalterada quando Pro é acrescentada no experimento utilizando <sup>14</sup>C-His (figura 22, pág. 88). Ambos os experimentos foram realizados utilizando epimastigotas em fase exponencial de crescimento. De forma diferente, quando o parasita inicia o processo de diferenciação, uma aparente preferência pela Pro é evidenciada quando incubado em TAU-HP.

Essa hipótese se mantém quando analisamos os perfis dos outros metabólitos envolvidos no metabolismo energético, como Pro e intermediários do TCA em parasitas incubados TAU-HP: nesse caso, o perfil se corresponde com o observado na diferenciação em TAU-Pro, mostrando um aumento nos níveis intracelulares no sexto dia de incubação, na fração aderida. Assim, podemos sugerir que quando parasitas são diferenciados em meio definido contendo aminoácidos, entre os quais se encontra a Pro, o metabolismo energético envolvendo essas moléculas será determinado pela Pro. A Pro é um aminoácido relevante na biologia do parasita, podendo agir como fonte de energia em diversos processos como infectividade, invasão celular (Martins, 2009), diferenciação no ciclo intracelular (Tonelli et al., 2004b) e metaciclogênese (Contreras, 1985c). Mais especificamente, Pro é degradada oxidativamente em dois passos enzimáticos a Glu, os quais derivam seus elétrons diretamente à cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, estimulando a síntese de ATP a través do processo de forforilação oxidativa (Mantilla, 2015; Paes, 2013). Considerando a relevância da Pro para o metabolismo energético do parasita, é esperado que exista certa “predominância metabólica” na utilização deste aminoácido quando presente junto a outro metabólito cujo rendimento energético para o parasita pode ser menor.

#### ***4.6 His e os mecanismos de resistência a estresse oxidativo***

Diferentes trabalhos na literatura relatam o papel protetor da His perante o estresse oxidativo [(revisado em (Wade, 1998)]. Por sua parte, é descrito *T. cruzi* enfrenta ao longo do seu ciclo de vida condições altamente oxidantes, como o interior do intestino do barbeiro, onde os produtos de degradação do grupo heme geram um entorno altamente oxidativo. No hospedeiro mamífero, os tripomastigotas metacíclicos devem sobreviver em um ambiente altamente oxidativo para poder estabelecer a infecção (o interior de células fagocíticas) além de evadir a ação de numerosas espécies como peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e peroxinitritos ( $ONOO_-$ ) que são elicitados via sistema imunológico do hospedeiro. Considerando esses fatos, nos perguntamos se His poderia estar exercendo um papel protetor na resistência ao estresse oxidativo em *T. cruzi*. Para isso, inicialmente analisamos as atividades relacionadas à produção de NADPH como as enzimas málicas, e as isocitrato desidrogenases (Leroux et al., 2011a; Leroux et al., 2011b), assim como as enzimas relacionadas à biossíntese de cisteína (Marciano et al., 2012), em parasitas submetidos a estresse oxidativo. Além das atividades enzimáticas, também avaliamos o conteúdo de tióis de baixo peso molecular em parasitas em ditas condições. Assim, após determinar quais os parâmetros afetados pelo estresse oxidativo,

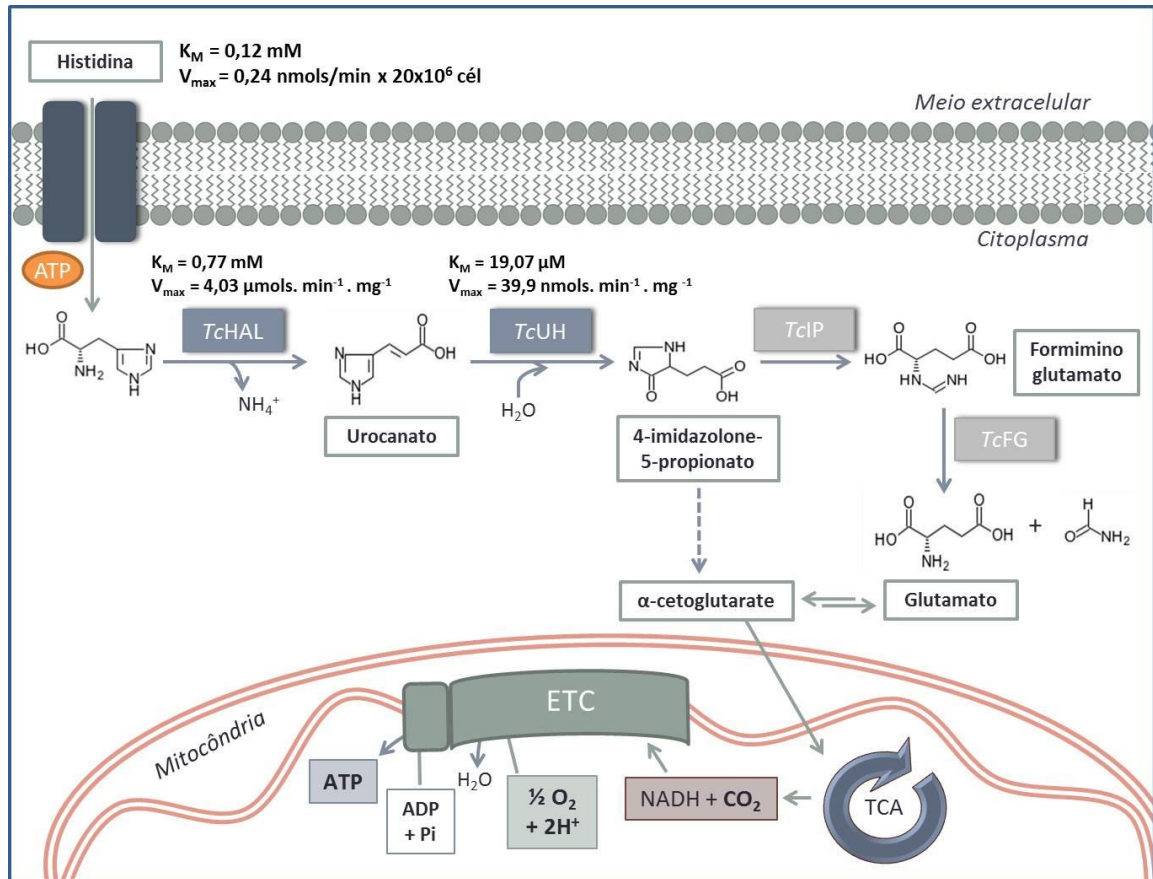
poderíamos avaliar o possível papel protetor da His. Contrário ao esperado, não foram observadas variações esperadas nos principais parâmetros que estariam relacionados com o balanço redox intracelular como consequência da exposição ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Porém, sobre esta base não pode ser descartada a hipótese de que as enzimas estudadas participem genuinamente na manutenção do balanço redox intracelular. Pelo contrario, se tratando de um processo essencial para a vida do patógeno, este poderia priorizar a sua atividade as custas de outros mecanismos não tão vitais no curto prazo. Portanto, os resultados obtidos abrem um novo marco de perguntas que procuraremos responder.

## 5 CONCLUSÕES

---

- His é um aminoácido essencial para *T. cruzi*: a carência desse aminoácido induz no parasita um estresse metabólico que afeta sua viabilidade e proliferação.
- A incorporação de His desde o meio extracelular acontece por um sistema único que apresenta uma alta especificidade de substrato, ativo principalmente nas formas epimastigotas e dependente do conteúdo intracelular de ATP para sua atividade.
- *TcHAL* e *TcUH*, as duas primeiras na via de degradação da His, são funcionais em epimastigotas de *T. cruzi*, participando da degradação até Glu nas formas epimastigotas.
- Na fase exponencial de crescimento ambas as enzimas são mais ativas, de acordo com a nossa proposta de que a His estaria atuando como uma importante fonte energética.
- Na fase estacionária de crescimento, os epimastigotas incorporam mais His e degradam menos esse aminoácido, levando a um acúmulo dos níveis intracelulares de His e seu produto urocanato, sugerindo que na fase estacionária, considerada como uma pré-adaptação para a metaciclogênese, seria importante um acúmulo de His no interior celular.
- Em relação ao papel da His na bioenergética de *T. cruzi*, observamos que a conversão do Glu a  $\alpha$ -KG e posterior entrada no TCA acontece após a degradação de His, o qual foi observado através da detecção de CO<sub>2</sub> liberado em parasitas incubados em His como única fonte energética. His é capaz de manter a viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* quando incubados unicamente na presença desse aminoácido e que, além disso, é capaz de restaurar a viabilidade após um importante período de estresse nutricional.
- A degradação de His consegue restabelecer o potencial de membrana interna mitocondrial, assim como estimular a síntese de ATP através da forforilação oxidativa e o consumo de oxigênio na mitocôndria.
- His é capaz de induzir o processo de metaciclogênese. Estudos metabolômicos referentes à diferenciação em meios definidos contendo His, Pro ou ambos os aminoácidos combinados, indicaram que embora ambos sejam fontes de energia para o processo de diferenciação, o metabolismo dos mesmos apresenta diferentes padrões metabólicos, incluso com variações no tempo, o que sugere que a utilização de ambos os aminoácidos pode ser regulada de forma diferente, dependendo da necessidade da célula.

A figura 41 é uma representação esquemática da utilização de His em epimastigotas de *T. cruzi*, e tem como objetivo integrar os resultados obtidos nessa tese, desde o transporte de His do meio extracelular, sua degradação e utilização como fonte energética.



**Figura 41: Representação esquemática da utilização de His em epimastigotas de *T. cruzi*.** A His é incorporada desde o meio extracelular através de um único transportador específico, dependente do conteúdo intracelular de ATP. Posteriormente é degradada através de quatro passos enzimáticos a Glu, sendo os dois primeiros (*TcHAL* e *TcUH*) caracterizados na presente tese. O  $\alpha$ -KG, gerado a partir do Glu ou pela possível conversão não enzimática do intermediário 4-imidazolona-5-propionato (linhas pontilhadas), ingressa ao TCA para continuar com a sua oxidação. Os equivalentes de redução alimentam a cadeia de transporte de elétrons (ETC), conduzindo à produção de ATP pela forforilação oxidativa e ao consumo de oxigênio na mitocôndria.

## REFERÊNCIAS\*

---

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

Adroher FJ, Osuna A, Lupianez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 1988;267(1):252-61.

Affranchino JL, Schwarcz de Tarlovsky MN, Stoppani AO. Terminal oxidases in the trypanosomatid *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B.* 1986;85(2):381-8.

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

Ames BN, Garry B, Herzenberg LA. The genetic control of the enzymes of histidine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol.* 1960;22:369-78.

Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115(2):189-98.

Azevedo JPR, I. . Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in defined media. *Genes and Antigens of parasites A laboratory manual.* 1984;2nd. Edition:29-36.

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

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

Barrett FM, Friend WG. Differences in the concentration of free amino acids in the haemolymph of adult male and female *Rhodnius prolixus*. *Comp Biochem Physiol B.* 1975;52(3):427-31.

Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasc AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiasis. *Lancet.* 2003;362(9394):1469-80.

\*De acordo com:

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



- Bender RA. Regulation of the histidine utilization (*hut*) system in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(3):565-84.
- Birkler RI, Stottrup NB, Hermannson S, Nielsen TT, Gregersen N, Botker HE, Andreasen MF, Johannsen M. A UPLC-MS/MS application for profiling of intermediary energy metabolites in microdialysis samples--a method for high-throughput. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(4):983-90.
- Boker CA, Schaub GA. Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. *Z Parasitenkd.* 1984;70(4):459-69.
- Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol.* 1988;106(4):1349-58.
- Boveris A, Hertig CM, Turrens JF. Fumarate reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1986;19(2):163-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Brand LM, Harper AE. Histidine ammonia-lyase from rat liver. Purification, properties, and inhibition by substrate analogues. *Biochemistry.* 1976;15(9):1814-21.
- Brand v. *Biochemistry and Physiology of Endoparasites.* Elsevier/North Holland, Amsterdam. 1979.
- Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1971;13(3):171-8.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27:347-82.
- Bringaud F, Riviere L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;149(1):1-9.
- Buhaya MH, Galvan S, Maldonado RA. Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines collected at Indio Mountains Research Station. *Acta Trop.* 2015;150:97-9.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964;6:93-100.
- Canepa GE, Bouvier LA, Miranda MR, Uttaro AD, Pereira CA. Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;292(1):27-32.
- Canepa GE, Bouvier LA, Urias U, Miranda MR, Colli W, Alves MJ, Pereira CA. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;247(1):65-71.
- Canepa GE, Silber AM, Bouvier LA, Pereira CA. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236(1):79-84.

- Cannata JJ, Cazzulo JJ. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B*. 1984;79(3):297-308.
- Cannata JJ, Frasch AC, Cataldi de Flombaum MA, Segura EL, Cazzulo JJ. Two forms of 'malic' enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1979;184(2):409-19.
- Carranza JC, Kowaltowski AJ, Mendonca MA, de Oliveira TC, Gadelha FR, Zingales B. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *J Bioenerg Biomembr*. 2009;41(3):299-308.
- Carrillo C, Cejas S, Gonzalez NS, Algranati ID. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Lett*. 1999;454(3):192-6.
- Carrillo C, Cejas S, Huber A, Gonzalez NS, Algranati ID. Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50(5):312-6.
- Cazzulo J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB journal*. 1992.
- Cazzulo J. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1994a;26(2):157-65.
- Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo BM, Engel JC, Cannata JJ. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;16(3):329-43.
- Cazzulo JJ, Juan SM, Segura EL. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B*. 1977;56(3):301-3.
- Conseavage MW, Phillips AT. Presence and quantity of dehydroalanine in histidine ammonia-lyase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*. 1985;24(2):301-8.
- Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1985a;14(1):83-96.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*. 1985b;16(3):315-27.
- Coura JR. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39 Suppl 3:113-7.
- Cross GA, Manning JC. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. *Parasitology*. 1973;67(3):315-31.
- Cunha-e-Silva N, Sant'Anna C, Pereira MG, Porto-Carreiro I, Jeovanio AL, de Souza W. Reservoirsomes: multipurpose organelles? *Parasitol Res*. 2006;99(4):325-7.

de Araujo-Jorge TC. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84(4):441-62.

De Paula Lima CV, Batista M, Kugeratski FG, Vincent IM, Soares MJ, Probst CM, Krieger MA, Marchini FK. LM14 defined medium enables continuous growth of *Trypanosoma cruzi*. BMC Microbiol. 2014;14:238.

De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid Biol Dis. 2002;1(1):3.

de Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(10):2069-80.

Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular  $Ca^{2+}$  storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 1995;310 ( Pt 3):1005-12.

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

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

Elias MC, da Cunha JP, de Faria FP, Mortara RA, Freymuller E, Schenkman S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. Protist. 2007;158(2):147-57.

Elias MC, Marques-Porto R, Freymuller E, Schenkman S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. Mol Biochem Parasitol. 2001;112(1):79-90.

Engel JC, Franke de Cazzulo BM, Stoppani AO, Cannata JJ, Cazzulo JJ. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1987;26(1-2):1-10.

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

Ferella M, Nilsson D, Darban H, Rodrigues C, Bontempi EJ, Docampo R, Andersson B. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*--localization of novel proteins to various organelles. Proteomics. 2008;8(13):2735-49.

Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. J Parasitol. 2000;86(6):1213-8.

Gattuso JM, Kamm MA. Review article: the management of constipation in adults. Aliment Pharmacol Ther. 1993;7(5):487-500.

- Gonzales-Perdomo M, Romero P, Goldenberg S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Exp Parasitol*. 1988;66(2):205-12.
- Gonzalez NS, Ceriani C, Algranati ID. Differential regulation of putrescine uptake in *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;188(1):120-8.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology*. 1999;118 ( Pt 4):375-82.
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2003;98(4):435-42.
- Harington JS. Histamine and histidine in excreta of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Nature*. 1956;178(4527):268.
- Harington JS. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* I. Analysis of the haemolymph. *Parasitology*. 1961a;51:309-18.
- Harington JS. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* II. Analysis of the excretory material. *Parasitology*. 1961b;51:319-26.
- Hassall HG, D. M. Urocanase (beef liver). *Methods Enzymol*. 1971;17B:84-8.
- Heise N, Opperdoes FR. Purification, localisation and characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol*. 1999;99(1):21-32.
- Henriquez DA, Perez N, Pance A, Bradley C. Mechanisms of protein degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res*. 1993;26(1-2):151-7.
- Hernandez D, Phillips AT. Purification and characterization of *Pseudomonas putida* histidine ammonia-lyase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 1993;4(5):473-8.
- Hernandez R, Cevallos AM, Nepomuceno-Mejia T, Lopez-Villasenor I. Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. *Parasitol Res*. 2012;111(2):509-14.
- Hoare CA. Studies on *Trypanosoma grayi*. III. Life-Cycle in the Tsetse-fly and in the Crocodile. *Parasitology*. 1929;23:449.
- Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool*. 1989a;36(2):150-3.
- Inbar E, Canepa GE, Carrillo C, Glaser F, Suter Grotemeyer M, Rentsch D, Zilberstein D, Pereira CA. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino Acids*. 2010;42(1):347-60.
- Juan SM, Segura EL, Cazzulo JJ. Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem*. 1978;9(6):395-400.

- Juan SM, Segura EL, Cazzulo JJ. Inhibition of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by silver nitrate. *Experientia*. 1979;35(9):1139-40.
- Kaminskas E, Kimhi Y, Magasanik B. Urocanase and N-formimino-L-glutamate formiminohydrolase of *Bacillus subtilis*, two enzymes of the histidine degradation pathway. *J Biol Chem*. 1970;245(14):3536-44.
- Kelly S, Ivens A, Manna PT, Gibson W, Field MC. A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. *Sci Data*. 2014;1:140024.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*. 2000;16(9):381-7.
- Le Quesne SA, Fairlamb AH. Regulation of a high-affinity diamine transport system in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem J*. 1996;316 ( Pt 2):481-6.
- Lenz M, Retey J. Cloning, expression and mutational analysis of the urocanase gene (hutU) from *Pseudomonas putida*. *Eur J Biochem*. 1993;217(1):429-34.
- Leroux AE, Maugeri DA, Cazzulo JJ, Nowicki C. Functional characterization of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2011a;177(1):61-4.
- Leroux AE, Maugeri DA, Opperdoes FR, Cazzulo JJ, Nowicki C. Comparative studies on the biochemical properties of the malic enzymes from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011b;314(1):25-33.
- Li Q, Zhang S, Berthiaume JM, Simons B, Zhang GF. Novel approach in LC-MS/MS using MRM to generate a full profile of acyl-CoAs: discovery of acyl-dephospho-CoAs. *J Lipid Res*. 2014;55(3):592-602.
- Louie GV, Bowman ME, Moffitt MC, Baiga TJ, Moore BS, Noel JP. Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chem Biol*. 2006;13(12):1327-38.
- Luckemeyer DD. Avaliação do perfil proteico de *trypanosoma rangeli* durante o processo de diferenciação celular *in vitro*. [tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências)]. Florianópolis: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina; 2014.
- Lundgren DW, Ogur M. Inhibition of yeast 1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase by common amino acids and the regulation of proline catabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1973;297(2):246-57.
- Magasanik B, Bowser HR. The degradation of histidine by *Aerobacter aerogenes*. *J Biol Chem*. 1955;213(2):571-80.
- Magdaleno A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 2009;4(2):e4534.

- Mancilla R, Naquira C, Lanas C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1967;21(2):154-9.
- Mantilla BS, Paes LS, Pral EM, Martil DE, Thiemann OH, Fernandez-Silva P, Bastos EL, Silber AM. Role of Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2015;290(12):7767-90.
- Marciano D, Santana M, Nowicki C. Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H<sub>2</sub>S production in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;185(2):114-20.
- Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect Immun*. 2009;77(7):3023-32.
- Mehler AH, Tabor H. Deamination of histidine to form urocanic acid in liver. *J Biol Chem*. 1953;201(2):775-84.
- Minning TA, Weatherly DB, Atwood J, 3rd, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*. 2009;10:370.
- Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100(8):663-77.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- Nepomuceno-Mejia T, Lara-Martinez R, Cevallos AM, Lopez-Villasenor I, Jimenez-Garcia LF, Hernandez R. The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;313(1):41-6.
- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):97-112.
- Norval M, Gibbs NK, Gilmour J. The role of urocanic acid in UV-induced immunosuppression: recent advances (1992-1994). *Photochem Photobiol*. 1995;62(2):209-17.
- Nowicki C, Cazzulo JJ. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007.
- Opperdoes FR. Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Symp*. 1987;53:123-9.
- Opperdoes FR, Michels PA. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends Parasitol*. 2008;24(7):310-7.

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

Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, Correa A, Dallagiovanna B, Cayota A, Krieger M, Goldenberg S, Robello C. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. J Mass Spectrom. 2007;42(11):1422-32.

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

Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. FEBS Lett. 2003;554(1-2):201-5.

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

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

Pereira CA, Alonso GD, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. J Eukaryot Microbiol. 2002b;49(1):82-5.

Pereira CA, Alonso GD, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. J Eukaryot Microbiol. 2002c;49(1):82-5.

Petersen LN, Marineo S, Mandala S, Davids F, Sewell BT, Ingle RA. The missing link in plant histidine biosynthesis: *Arabidopsis* myoinositol monophosphatase-like2 encodes a functional histidinol-phosphate phosphatase. Plant Physiol. 2010;152(3):1186-96.

Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. Int J Cardiol. 2007;115(3):279-83.

Rangel-Aldao R, Triana F, Fernandez V, Comach G, Abate T, Montoreano R. Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Biochem Int. 1988;17(2):337-44.

Rassi A, Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012;26(2):275-91.

Reilly SK, De Fabo EC. Dietary histidine increases mouse skin urocanic acid levels and enhances UVB-induced immune suppression of contact hypersensitivity. Photochem Photobiol. 1991;53(4):431-8.

- Retey J. The urocanase story: a novel role of NAD<sup>+</sup> as electrophile. *Arch Biochem Biophys*. 1994;314(1):1-16.
- Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2008;118(1):17-24.
- Sambrook JF,; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
- Sant'Anna C, Pereira MG, Lemgruber L, de Souza W, Cunha e Silva NL. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. *Microsc Res Tech*. 2008;71(8):599-605.
- Saye M, Miranda MR, di Girolamo F, de los Milagros Camara M, Pereira CA. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. *PLoS One*. 2014;9(3):e92028.
- Schenkman S, Andrews NW, Nussenzweig V, Robbins ES. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell*. 1988;55(1):157-65.
- Schottelius J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Trop Med Parasitol*. 1987;38(4):323-7.
- Schwede TF, Retey J, Schulz GE. Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry*. 1999;38(17):5355-61.
- Shibatani T, Kakimoto T, Chibata I. Crystalline L-histidine ammonia-lyase of *Achromobacter liquidum*. Crystallization and enzymic properties. *Eur J Biochem*. 1975;55(1):263-9.
- Silber A, Colli W, Ulrich H, Alves M, Pereira C. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Current drug targets Infectious disorders*. 2005a;5(1):53-64.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005b;5(1):53-64.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005c;5(1):53-64.
- Silber AM, Rojas RL, Urias U, Colli W, Alves MJ. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2006;36(2):157-63.
- Silber AM, Tonelli RR, Martinelli M, Colli W, Alves MJ. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol*. 2002;49(6):441-6.



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

Soares MJ, Souto-Padron T, Bonaldo MC, Goldenberg S, de Souza W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 1989;75(7):522-7.

Stoco PH, Wagner G, Talavera-Lopez C, Gerber A, Zaha A, Thompson CE, Bartholomeu DC, Luckemeyer DD, Bahia D, Loreto E, Prestes EB, Lima FM, Rodrigues-Luiz G, Vallejo GA, Filho JF, Schenkman S, Monteiro KM, Tyler KM, de Almeida LG, Ortiz MF, Chiurillo MA, de Moraes MH, Cunha Ode L, Mendonca-Neto R, Silva R, Teixeira SM, Murta SM, Sincero TC, Mendes TA, Urmenyi TP, Silva VG, DaRocha WD, Andersson B, Romanha AJ, Steindel M, de Vasconcelos AT, Grisard EC. Genome of the avirulent human-infective trypanosome--*Trypanosoma rangeli*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3176.

Stoppani AO, Docampo R, de Boiso JF, Frasch AC. Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth. *Mol Biochem Parasitol*. 1980;2(1):3-21.

Sullivan JJ. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro: a simplified procedure. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982;76(3):300-3.

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

Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem*. 1984;53:749-90.

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

Tonelli RR, Augusto Lda S, Castilho BA, Schenkman S. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2alpha is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PLoS One*. 2011;6(11):e27904.

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

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

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 1992;24:145-9.

Tyler KM, Engman DM. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000;46(4):269-78.

- Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001;31(5-6):472-81.
- Urbina JA, Osorno, C. E., Rojas, A. The central role of phosphoenol pyruvate carboxykinase in the energy metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Studies using 3-mercaptopycolinic acid. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989;84.
- Vallejo GA. Estudios comparativos entre las secuencias de kADN en *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico de la tripanosomiasis americana. *Rev Actual Biol.* 1998;20:43-56.
- Wade MA, Tucker HN. Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nutr Biochem.* 1998;9(6):308-15.
- Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W251-7.
- Zelada C, Montemartini M, Cazzulo JJ, Nowicki C. Purification and partial structural and kinetic characterization of an alanine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;79(2):225-8.
- 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.* 1960a;46:541-51.
- Zeledon R, Bolanos R, Rojas M. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop.* 1984;41(1):39-43.