

BRIAN ALEJANDRO SUÁREZ MANTILLA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E PAPEL FISIOLÓGICO DA
 Δ^1 -PIRROLINA-5-CARBOXILATO DESIDROGENASE DE *Trypanosoma cruzi*:
UMA ENZIMA DO METABOLISMO DE PROLINA**

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
2013

BRIAN ALEJANDRO SUÁREZ MANTILLA

**CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL E PAPEL FISIOLÓGICO DA
 Δ^1 -PIRROLINA-5-CARBOXILATO DESIDROGENASE DE *Trypanosoma cruzi*:
UMA ENZIMA DO METABOLISMO DE PROLINA**

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
2013

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

Mantilla, Brian Alejandro Suárez.

Caracterização funcional e papel fisiológico da enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcP5CDH): uma enzima do metabolismo de prolina / Brian Alejandro Suárez Mantilla. -- São Paulo, 2013.

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: Metabolismo de aminoácidos em tripanossomas.

Versão do título para o inglês: Functional characterization and physiological role of the Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* (TcP5CDH): an enzyme of proline metabolism.

1. Trypanosoma 2. Doença de Chagas 3. Catabolismo de prolina
4. Mitocôndria 5. Ácido delta-1-pirrolin-5-óico 6. Disulfiram
I. Prof. Dr. Silber, Ariel Mariano II. Universidade de São Paulo.
Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em
Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB088/2013

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Brian Alejandro Suárez Mantilla.

Título da Tese: Caracterização funcional e papel fisiológico da enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcP5CDH): uma enzima do metabolismo de prolina

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:

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 – telefax : (55) (011) 3091.7438
e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **017** nas fls. **54** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade de Ariel Mariano Silber, Coordenador(a) da Linha de pesquisa "**Caracterização funcional e papel fisiológico da [delta]-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5C-Dh) de Trypanosoma cruzi: uma enzima do metabolismo da prolina**" do qual participou(aram) o(s) alunos **Brian Alejandro Suárez Mantilla, Lisvane Silva Paes** está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA)** em **24.03.08**, com validade de 3 anos.

São Paulo, 25 de março de 2008.

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

Profa. Dra. PATRÍCIA CASTELUCCI
Secretária
CEEA - ICB/USP

Dedicado a Simon, Amparo, Esteban e Flávia o meu combustível emocional, mesmo que à distância.

AGRADECIMENTOS

Ao Ariel, chefe e amigo, pela oportunidade dada na formação do seu grupo e, sobretudo, por haver me ensinado a fazer ciência;

À Beth pela sua enorme disposição para o bom funcionamento do laboratório e sua grata amizade;

A minha colega e amiga, Lisvane Paes com que compartilhamos muitas experiências dentro e fora da bancada;

À Juli Barisón pela sua amizade e coleguismo;

Aos que passaram pelo lab. 024: Robert, Josué, Anahí, Jean, Inga, Denise, Julia C., André H. e aqueles que ainda fazem deste um lugar agradável para trabalhar: Lets, Roxi, Lud, Flá, Marcell, Raissa, Higo, Thales, Carolina. Aos nossos colegas Alemães com quem agora conformamos o UDD, Carsten, Kamila, Jasmin e Frank.

Ao Prof. Erick Bastos (IQ/USP) pela amizade e as suas grandes contribuições na parte química;

À Prof. Cristina Nowicki e Marianela Santana (UBA) pela grata experiência de trabalharmos juntos;

Ao Prof. Otávio Thiemann (IFSC/USP São Carlos) e especialmente, à doutoranda Daiana Martil, onde foram realizadas os ensaios de cristalografia;

Ao laboratório do Prof. José Roberto Meyer-Fernandes (UFRJ) onde foram realizadas as medições de respiração celular e síntese líquida de ATP;

Ao Prof. Álvaro Acosta-Serrano (LSTM, UK) e o seu grupo (Clair, Naomi, Nick, Waleed, Chris, Ambi, Vicki, Dom) por ter permitido estudar a TbP5CDH na mosca tsé-tsé;

À Dra. Lee Haines (LSTM, UK) pela sua didática e paciência para manipular moscas;

À Simone Guedes e o lab. Da Prof. Carol Elias (CAT/Butantã) onde foram obtidos os parasitas transfectantes;

Ao lab. do Prof. Claudio Romero (ICB) pela disponibilidade para realizar os ensaios de microscopia;

Ao Prof. Patrício Fernandez-Silva (U. Zaragoza) pelas contribuições nos ensaios de EGN;

A Prof. Sirlei Daffre pela sua amizade dentro do Departamento;

Ao pessoal técnico do departamento de Parasitologia (ICB), Manoel, Sandra, Marcio, Claudia, Erica, Alexandre, que contribuíram de alguma forma com a realização deste trabalho;

Ao Claudio Pereira pela amizade e discussões científicas;

À Rep. Zimbabwe, minha família em SP durante três anos inesquecíveis;

Ao meu amigo Gustavo Oliveira pela paciência e disposição com o meu português;

A Sandra Kalil porque este processo também a inclui;

Aos meus amigos Bira, Julian, Omar, André, Cristian, Marcia, Guilherme, Rodrigo B., Rodrigo S., Alessandro, Renan, Fabio, Rapha, Ricardo Renata, Camila pela amizade e bons momentos;

Ao Prof. Luís Eduardo Soares Netto (IB/USP) quem sempre teve disponibilidade para o uso do banco EUROSCARF;

Ao Prof. Mario Henrique Barros (ICB) quem cedeu alguns plasmídeos para os ensaios em levedura;

À Prof. Nobuko Yoshida (UNIFESP) quem cedeu o anticorpo EF6;

Ao Prof. Robson Lopes (CAT/Butantã) por alguns ensaios de espectrometria de massa;

À melhor instituição de apoio a pesquisa que já vi, a FAPESP;

À USP por possibilitar a realização deste logro e me mostrar o que é bem-estar universitário;

A Misha pelo apoio dado em tantas horas de insônia;

Este trabalho foi desenvolvido graças ao apoio financeiro concedido pela FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP), números de processo: 2007/56079-3 e 2011/22697-8. 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).

Science is not about the stuff we know, but just as importantly about the stuff we don't.
Mark Henderson

RESUMO

MANTILLA, B. S. **Caracterização funcional e papel fisiológico da Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de *Trypanosoma cruzi* (TcP5CDH):** uma enzima do metabolismo de prolina. 2013. 217 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

A prolina é um aminoácido versátil que pode suprir os requerimentos energéticos do parasita, além de ser um constituinte das proteínas. Duas oxidorreduções atuam na rota de conversão de prolina em glutamato no *T. cruzi*. Primeiro, a prolina desidrogenase (TcPRODH) oxida a prolina em Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato (P5C) que posteriormente é convertido em glutamato pela TcP5CDH na presença de NAD(P)⁺. A TcP5CDH (MW: 63 kDa) foi funcionalmente expressa em um sistema heterólogo de *S. cerevisiae* Δ PUT2 (homólogo do *TcP5CDH*). Além disso, a TcP5CDH foi expressa e purificada homogeneamente como produto de fusão a uma etiqueta de 6x-Histidinas no extremo C-terminal (TcP5CDH-6xHis). Os parâmetros cinéticos (K_m , k_{cat} , pH ótimo) foram determinados utilizando P5C sintetizado quimicamente tanto na forma TcP5CDH-6xHis como a partir de lisados mitocondriais do *T. cruzi*. E usando essas informações junto a dados da literatura determinamos que o substrato da TcP5CDH é o γ GSA. Análises em solução da apoenzima TcP5CDH-6xHis (filtração em gel, SAXS, DLS) revelou uma conformação quaternária do tipo homo-hexâmero (364,6 kDa). Quando analisamos a TcP5CDH em frações mitocondriais sob condições não desnaturantes (gel nativo, MS e 2D em SDS-PAGE) esta conformação foi também evidenciada. A análise da estrutura primária da TcP5CDH sugere a presença de um peptídeo de direcionamento mitocondrial, bem como, a interação com membranas através de uma estrutura do tipo hélice-alfa (Phe¹⁹⁸ – Gly²¹⁵). Isto último coincide com um perfil de imunomarcção próprio de proteínas mitocondriais. Esses dados junto com testes enzimáticos e de *western blot*, sugerem que a TcP5CDH localiza-se na membrana interna mitocondrial. Ensaio com parasitas permeabilizados mostraram que a oxidação do P5C em *T. cruzi* estimula a respiração celular, levando à síntese de ATP através do processo de fosforilação oxidativa. Este processo foi revertido na presença de inibidores da CTE e, o efeito oposto foi observado em parasitas mutantes que super-expressam a TcP5CDH (pTEX-TcP5CDH⁺⁺). Também, observamos que a TcP5CDH é expressa diferencialmente nos estágios infectivos tripomastigota metacíclico e tripomastigotas derivados da infecção em células CHO-k₁. Os mutantes pTEX-TcP5CDH⁺⁺ apresentaram morfologia alterada e níveis aumentados de TcGP82; uma molécula de superfície envolvida em processos de adesão e invasão celular. Entretanto, quando células CHO-k₁ foram expostas a formas epimastigotas pTEX-TcP5CDH⁺⁺ se observou um aumento no número de parasitas no sobrenadante após o sexto dia pós-infecção. Por outro lado, o DSF, reportado como inibidor de aldeído desidrogenase s, levou a uma diminuição da atividade TcP5CDH (CI₅₀ = 2,6 μ M). Quando testado em ensaios de proliferação de epimastigotas, observou-se um efeito tripanocida dose-dependente (CI₅₀ = 402 nM). Este valor foi maior (CI₅₀ = 647 nM) nos parasitas pTEX-TcP5CDH⁺⁺, sugerindo que a super-expressão da TcP5CDH aumenta a resistência ao DSF. Finalmente, o metabolismo de L-prolina em *T. brucei*, dentro do seu hospedeiro vetor (mosca tsé-tsé), foi abordado através de testes bioquímicos e a análise da expressão da TbP5CDH nas diferentes formas de desenvolvimento no inseto. Os nossos dados reforçam o papel bioquímico da via prolina-glutamato em *T. cruzi*, e constituem as primeiras evidências sobre as características do metabolismo de P5C nessas espécies de tripanossomatídeos.

Palavras-chave: Tripanossomatídeo. Doença de Chagas. Catabolismo de Prolina. Mitocôndria. P5C.

ABSTRACT

MANTILLA, B. S. **Functional characterization and physiological role of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* (TcP5CDH): an enzyme of proline metabolism.** 2013. 217 p. Ph. D. Thesis (Parasitology) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

Proline is a versatile amino acid, which fulfills energy requirements beyond of being a protein constituent. Two oxidoreductases act in the conversion pathway of proline into glutamate in *T. cruzi*. Firstly, the proline dehydrogenase (TcPRODH) oxidizes proline in Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate (P5C), which is further converted into glutamate by TcP5CDH using NAD(P)^+ . A TcP5CDH (63 kDa) was functionally expressed in a heterologous system of *Saccharomyces cerevisiae* mutant ΔPUT2 (TcP5CDH's counterpart). Furthermore, TcP5CDH was expressed and purified to homogeneity as a 6x-Histidine tagged protein at C-terminal (TcP5CDH-6xHis). Kinetic data (K_m , k_{cat} , optimal pH) were determined by using P5C chemically-synthesized either in TcP5CDH-6xHis or mitochondrial lysates from epimastigotes. These data along previous reports provided information to conclude that γGSA opened form, is the substrate of TcP5CDH. In-solution analysis of the apoenzyme TcP5CDH-6xHis showed a quaternary arrangement resembling a homohexamer (molecular mass 364,6 kDa). When TcP5CDH was analyzed in mitochondrial fractions under non-denaturing conditions (native gel, MS identification and second dimensional assay) this quaternary conformation was confirmed. Moreover, analysis of primary structure suggested the existence of a mitochondrial targeting peptide, as well as one α -helix (Phe¹⁹⁸ - Gly²¹⁵) spanning mitochondrial membranes. Indeed, the TcP5CDH showed an immunolabelling profile own of mitochondrial proteins in trypanosomatids. This microscopic staining, along biochemical and western blot assays, suggests that TcP5CDH is bound to inner mitochondrial membranes. Experiments with digitonized parasites revealed that P5C oxidation is coupled to oxygen consumption, and thus leading to ATP production by mean of oxidative phosphorylation. This process was abolished when inhibitors of electron transport chain were added, and opposed process was stimulated in parasites overexpressing TcP5CDH (pTEX-TcP5CDH⁺⁺). Expression of TcP5CDH was developmentally regulated throughout parasite's life stages. The mutant cells (pTEX-TcP5CDH⁺⁺) exhibited altered morphology and increased levels of TcGP82; a parasite surface protein involved in cellular adhesion and invasion processes. Indeed, when epimastigotes from pTEX-TcP5CDH⁺⁺ were exposed (1h) to CHO-k₁ cells, an increased number of parasites at sixth day after infection were released to culture supernatant. Conversely, the DSF a non-profit FDA-approved drug reported as an inhibitor of aldehyde dehydrogenases exhibited a decreasing in enzymatic rates of TcP5CDH ($\text{EC}_{50} = 2,6 \mu\text{M}$). When DSF was tested in epimastigotes proliferation assays, there was seen a dose-dependent trypanocidal effect ($\text{IC}_{50} = 402 \text{ nM}$). The resistance to DSF was increased in pTEX-TcP5CDH⁺⁺ ($\text{IC}_{50} = 647 \text{ nM}$), thus suggesting the participation of this enzyme as drug target. Therefore, our data suggest that TcP5CDH might be involved in parasite infectivity beyond mitochondrial glutamate production. Finally, the linking through proline metabolism between the African trypanosome (*T. brucei*) and its natural host (tsetse fly) was addressed through silencing assays (RNAi) of TbP5CDH, and its developmental expression within insect stages. Overall, our data support the biochemical relevance of proline-glutamate pathway in *T. cruzi*, and constitute the first evidences regarding occurrence and uniqueness of P5C metabolism over these trypanosomatid species.

Keywords: Trypanosomatid. Chagas's Disease. Proline Catabolism. Mitochondrion. P5C.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Alinhamento múltiplo das sequências TcP5CDH anotadas no genoma de.....	99
Figura 2 - Domínios proteicos encontrados para as sequências TcP5CDHs.....	101
Figura 3 - Regiões proteicas conservadas entre P5CDHs de distintas espécies.....	102
Figura 4 - Análise da região predita como hélice transmembrana (hTM) para a.....	104
Figura 5 - Fragmentos de DNA utilizados nas correspondentes clonagens.....	105
Figura 6 - Ensaio de complementação funcional em <i>S. cerevisiae</i>	107
Figura 7 - Expressão e purificação da enzima TcP5CDH-6xHis.....	108
Figura 8 - Perfil de separação da TcP5CDH-6xHis através da cromatografia de.....	109
Figura 9 - Análise da fração P1 sob condições não desnaturantes.....	111
Figura 10 - Análise pela técnica de SAXS para a TcP5CDH em solução	112
Figura 11 - Determinação da massa molecular e número de subunidades para a	113
Figura 12 - Modelo de sobreposição para a TcP5CDH obtido pelo SAXS.	114
Figura 13 - Cristalização da enzima TcP5CDH.	115
Figura 14 - Análise qualitativa do P5C sintetizado quimicamente.	118
Figura 15 - Avaliação da dependência de substratos para a TcP5CDH.	120
Figura 16 - Análise dos produtos na reação catalisada pela TcP5CDH.....	121
Figura 17 - Avaliação do efeito de pH e temperatura sobre a atividade TcP5CDH	123
Figura 18 – Avaliação do espectro de absorção para o P5C sintético.....	125
Figura 19 - Análise por <i>western blot</i> do soro anti-TcP5CDH.	127
Figura 20 - Análise da enzima TcP5CDH em vesículas mitocondriais do <i>T. cruzi</i>	129
Figura 21 - Análise bidimensional da TcP5CDH em frações mitocondriais do <i>T. cruzi</i>	131
Figura 22 - Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina no <i>T. cruzi</i>	134
Figura 23 - Detecção da enzima TcP5CDH com um anticorpo comercial anti-.....	136
Figura 24 - Análise por IFI em todas as formas de desenvolvimento do <i>T. cruzi</i>	138
Figura 25 - Análise por IFI de células CHO-k ₁ infectadas com formas.....	139
Figura 26 - Análise da expressão de TcP5CDH nas distintas fase de desenvolvimento do <i>T. cruzi</i>	141
Figura 27 - Avaliação do efeito citotóxico de P5C em formas epimastigotas	142
Figura 28 - Análise do efeito de P5C na viabilidade celular e síntese de ATP.....	143
Figura 29 - Efeito dose-resposta do P5C no processo de eclosão de formas	145
Figura 30 - Dosagem de ATP sob distintos substratos mitocondriais.....	146

Figura 31 - Avaliação das linhagens de <i>T. cruzi</i> super-expressoras para a TcP5CDH	148
Figura 32 - Dosagem de ATP em parasitas mutantes e wt.....	151
Figura 33 - Dosagem de peróxido de hidrogênio em parasitas mutantes e wt.	154
Figura 34 - Análise da infectividade na linhagem mutante pTEX-TcP5CDH ⁺⁺	158
Figura 35 - Avaliação do efeito de DSF no <i>T. cruzi</i>	161
Figura 36 - Avaliação do efeito de DSF em mutantes pTEX-TcP5CDH ⁺⁺ do <i>T. cruzi</i>	164
Figura 37 - Avaliação do efeito de DSF na atividade da enzima TcP5CDH.	166
Figura 38 - Dosagem de prolina livre na hemolinfa de <i>Glossina morsitans</i>	168
Figura 39 - Perfil de expressão da TbP5CDH nas diferentes formas de	170
Figura 40 - Ensaio de RNAi para o gene <i>TbP5CDH</i> em formas procíclicas de	172

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Análise da proteína TcP5CDH-6xHis pela técnica de GF	110
Tabela 2 - Análise dos picos P1 e P2 pela técnica de DLS	110
Tabela 3 - Estatística da coleta e processamento dos dados de difração de raios-X.....	115
Tabela 4 - Parâmetros cinéticos para a enzima TcP5CDH.....	126
Tabela 5 - Proteínas identificadas na análise por MS das bandas 1 – 4 resolvidas por EGN.	132

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição das cepas de levedura, utilizadas neste estudo, com os seus correspondentes genótipos.....	54
Quadro 2 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.	62
Quadro 3 - Descrição de plasmídeos utilizados no trabalho.	65
Quadro 4 - Padrões moleculares utilizados na GF	72
Quadro 5 - Soluções utilizadas para a preparação do gel nativo.....	80

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1 - Representação do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	28
Esquema 2 - Panorama mundial da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	30
Esquema 3 - Distribuição geográfica dos distintos grupos de <i>T. cruzi</i> em humanos	31
Esquema 4 - Representação dos principais componentes da CTE de <i>T. cruzi</i>	35
Esquema 5 - Exemplos de estruturas quaternárias para outras enzimas P5CD.....	41
Esquema 6 - Esquema compartimentalizado das vias de oxidorredução para o metabolismo.....	42
Esquema 7 - Rota para a preparação de P5C a partir de cloridrato de DL-5-	117
Esquema 8 - Representação estrutural do processo de conversão da forma aberta P5C ao γ GSA em meio aquoso.....	182
Esquema 9 - Rota de interconversão entre prolina e glutamato em <i>T. cruzi</i>	184
Esquema 10 -Árvore filogenética baseada em sequencias de P5CDH para outras espécies.....	195

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Amastigota
AA	Acetaldeído
AAC	Ácido aminocapróico
aas	Aminoácidos
AcNa	Acetato de sódio
ADA	Ácido adípico
ADP	Adenosina difosfato
AE	Atividade específica
ALDH	Aldeído desidrogenase s
ATP	Adenosina trifosfato
BEAST	<i>Bayesian Evolutionary Analysis Sampling Trees</i>
BLASTP	<i>Basic Local Alignment Search Tool Protein</i>
BLOSSUM	<i>Blocks of Amino Acid Substitution Matrix</i>
BOD	<i>Biochemical oxygen demand</i>
BrEt	Brometo de etídeo
BSA	Albumina de soro bovino
BZ	Benzonidazol
α-CG	alfa-cetoglutarato
CAT	Carboxiatractilósido
cDNA	DNA complementar
CEM	Coefficiente de extinção molar
CHO-k₁	Linhagem celular proveniente de ovário de hamster Chinês
CIAP	<i>Calf Intestinal Alkaline Phosphatase</i>
COX	Citocromo c oxidase
CS	Citrato sintase
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DDC	Dietilditiocarbamato
DDM	Dodecil maltosida
DEPC	Dietilpirocarbonato
DHQ	Dihidroxiquinolona
DIG	Digitonina
DL-P5C	Mistura racémica do ácido Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
D_{máx}	Dimensão máxima
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DO	Densidade ótica
dox	Doxiciclina
DP	Desvio padrão
DSF	Dissulfeto de tetraetiltiurano
dsRNA	RNA dupla fita
E	Epimastigota
E_a	Energia de ativação
E-64	N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida
EC	<i>Enzyme Commission</i> (Comissão de nomenclatura de enzimas)
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético

EGN	Eletroforese em gel nativo
EGTA	Ácido etilenoglicol-bis-aminoetiletertracético
Ei	Epimastigota intracelular
EP	Múltiplas repetições do dipeptídeo glutamato-prolina
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FAD	Flavina adenosina dinucleotídeo
FCCP	Trifluorocarbonilcianeto de fenilhidrazona
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FeMIM	Face externa da membrana interna mitocondrial
FiMEM	Face interna da membrana externa mitocondrial
FMR	Fumarato redutase
Fpc	Formas procíclicas de <i>Trypanosoma brucei</i>
Fsc	Formas sanguícolas de <i>Trypanosoma brucei</i>
G418	Geneticina
GA	Ácido glutâmico
GABA	Ácido- γ -aminobutírico
gal	Galactose
GF	Gel filtração
GI	<i>Geneinfo Identifier</i>
GPI	Glicofosfatidilinositol
GRA	Ácido glutárico
gs	Glândulas salivares
γGSA	Glutamato- γ -semialdeído
HEPES	4-(2-hidroxiethyl)-1-ácido piperazina etano sulfônico
HQ	Hexocinase
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	Cromatografia líquida de alta performance
hTM	Hélice transmembrana
IFI	Imunofluorescência indireta
im	Intestino médio
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
k_{cat}	Constante de eficiência catalítica
kDNA	DNA do cinetoplasto
kdp5cdh2	Clone 2 <i>knock down</i> for TcP5CDH
K_m	Constante de Michaelis – Menten
LDL	<i>Low density lipoprotein</i>
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
M	Tripomastigota metacíclico
MA	Ácido malônico
Me-DDC	Dietilditiometilcarbamato
Me-DTC	S-metil-N,N-dietiltiocarbamato
Me-DTC-SO	S-metil-N,N-dietiltiocarbamoil sulfóxido
MEM	Membrana externa mitocondrial
3-MFA	Ácido 3-metoxifenilacético
MIM	Membrana interna mitocondrial
MOPS	Ácido 3-[N-morfolino] propanosulfônico
MPD	2-metil-2,4-pentanodiol
MPR1	Enzima acetil-transferase
MS	Espectrometria de massa

MTT	4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio
MUSCLE	<i>Multiple Sequence Comparison by Log-Expectation</i>
MWCO	<i>Molecular Weight Cut-Off</i>
NA	Ácido nicotínico
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NH₃	Amônio
-NH₂	Grupo amino
Ni-NTA	Níquel-Nitrilotriacetato
<i>o</i>AB	<i>o</i> -aminobenzaldeído
OAT	Ornitina aminotransferase
ORF	<i>Open reading frame</i> (fase aberta de leitura)
PBS	Solução salina tamponada
PBS-BSA	Solução salina tamponada + albumina de soro bovino
PBST	Solução salina tamponada + Tween 20
PBSTL	Solução salina tamponada + Tween 20 + leite desnatado
PDm	Peptídeo de direcionamento mitocondrial
PEG	Poliétilenoglicol
PQ	Piruvato quinase
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfônio
Prol	Prolina
<i>ProtParam</i>	<i>Protein Parameters</i>
<i>PUT</i>	<i>Proline utilization</i>
pv	Proventrículo
<i>PVDF</i>	<i>Polyvinylidene fluorid</i>
<i>q</i>RT-PCR	PCR em tempo real quantitativa
qsp	quantidade suficiente para
R	Rotenona
reg-TM	Regiões transmembrana
R_g	Radio de giro
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucléico
RNAi	RNA de interferência
RNA_m	Ácido ribonucléico mensageiro
RNA_r	Ácido ribonucléico ribossomal
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT-PCR	Reação em cadeia da Polimerase com transcriptase reversa
SA	Sulfato de amônia
SAXS	Espalhamento de raio-X a baixo angulo
SC	Meio mínimo sintéticos completo
SD	Meio mínimo sintético depletado
SDH	Succinato desidrogenase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro feral bovino
SOD-Fe	Superóxido dismutase dependente de ferro
SPI	Soro pré-imune
SSA	Succinato semialdeído
SScDNA	<i>Single Strand carrier DNA</i>

St	Raio de Stokes
T	Tripomastigota
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TCA	Ácido tricloroacético
TcALAT	Alanina aminotransferase
TcASAT_m	Aspartato aminotransferase, isoforma mitocondrial de <i>T. cruzi</i>
TcGAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase de <i>T. cruzi</i>
TcP5CDH	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase de <i>T. cruzi</i>
TcPRODH	Prolina desidrogenase de <i>T. cruzi</i>
TcSAT	Serina aminotransferase
TcTAT	Tirosina aminotransferase
Te	Extrato total do parasita
TE	Tampão Tris-EDTA
TLC	Cromatografia de camada fina
TLCK	Tosillisina clorometil cetona hidrocloreto
Tmhmm	<i>Transmembrane helix based on hidden Markov model</i>
TMpred	<i>Prediction of Transmembrane Regions and Orientation</i>
UA	Unidade de absorvância
UniProt	<i>Universal Protein Resource</i>
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
Ve	Volume de eluição
vPBS	<i>Voorheis's modified PBS</i>
x-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosídeo
YPD	<i>Yeast Peptone Dextrose medium</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	26
1.1 Os tripanossomas e a Doença	27
1.1.1 Características gerais do <i>Trypanosoma cruzi</i>	27
1.1.2 Transmissão do parasita ao humano	29
1.1.3 Patologia da doença de Chagas	30
1.1.4 Panorama epidemiológico atual	29
1.1.5 Quimioterapia	30
1.2 Particularidades celulares do <i>T. cruzi</i>, o agente causador	32
1.2.1 Organelas especializadas	32
1.2.2 A singularidade da mitocôndria do <i>T. cruzi</i>	33
1.2.3 O metabolismo energético do <i>T. cruzi</i>	36
1.2.4 Metabolismo de aminoácidos como alternativa energética no <i>T. cruzi</i>	37
1.3 O papel da prolina na relação parasita – hospedeiro	38
1.3.1 Características das enzimas P5CDHs	40
1.3.2 O papel fisiológico do P5C	41
1.3.3 Perspectivas terapêuticas do metabolismo de prolina e P5C	42
1.3.4 O DSF e o seu papel no metabolismo de aldeídos	43
2 MATERIAIS E MÉTODOS	27
2.1 Análise <i>in silico</i>	47
2.1.1 Análise da sequência primária para a enzima TcP5CDH	47
2.1.2 Comparação da sequência de aminoácidos com enzimas do tipo P5CDH de outras	47
2.1.3 Análise de regiões funcionais presentes na enzima TcP5CDH	48
2.2 Microorganismos utilizados e condições de crescimento	49
2.2.1 <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
2.2.1.1 Epimastigotas	49
2.2.1.2 Tripomastigotas metacíclicos	49
2.2.1.3 Formas intracelulares obtidas pela infecção <i>in vitro</i> na linhagem CHO-k ₁	49
2.2.1.4 Amastigotas e epimastigotas intracelulares	50
2.2.1.5 Tripomastigotas metacíclicos derivados de CHO-k ₁	50
2.2.2 <i>Trypanosoma brucei</i>	50
2.2.2.1 Formas procíclicas	51
2.2.2.2 Formas sanguíneas	51
2.2.2.3 Formas derivadas da infecção na mosca tsé-tsé	51
2.2.2.4 Extração de hemolinfa e dosagem de prolina livre	52
2.2.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
2.2.4 <i>Escherichia coli</i>	54
2.3 Manipulação do DNA	55
2.3.1 Clonagem da ORF TcP5CDH	55
2.3.1.1 Extração de DNA genômico do <i>T. cruzi</i>	55
2.3.1.2 Verificação da integridade do DNA	56
2.3.1.3 Amplificação do DNA e clonagem no vetor tipo-T	57
2.3.1.4 Preparação de bactérias quimiocompetentes	57
2.3.1.5 Transformação de bactérias quimiocompetentes	58
2.3.1.6 Extração de DNA plasmidial	58
2.3.1.7 Transformação de leveduras	59
2.3.1.8 Extração de DNA plasmidial de levedura	60
2.3.2 Sequenciamento do DNA	61

2.3.3 <i>Sub-clonagem da ORF TcP5CDH em vetores específicos</i>	62
2.3.3.1 <i>Construção pYES-TcP5CDH</i>	62
2.3.3.2 <i>Construção pYES-HIS3</i>	63
2.3.3.3 <i>Construção pET24-TcP5CDH</i>	63
2.3.3.4 <i>Construção pTEX-TcP5CDH</i>	64
2.3.3.5 <i>Construção pZJM-Tb5'P5CDH</i>	64
2.4 Manipulação de RNA	65
2.4.1 <i>Extração de RNA de tripanossomas</i>	65
2.4.2 <i>Extração de RNA de leveduras</i>	66
2.4.3 <i>Eletroforese de RNA</i>	67
2.4.4 <i>Síntese de cDNA</i>	67
2.4.5 <i>Quantificação dos transcritos por qRT-PCR</i>	68
2.4.6 <i>Reação em cadeia da Polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)</i>	68
2.5 Manipulação de proteínas	69
2.5.1 <i>Eletroforese de proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE)</i>	69
2.5.2 <i>Expressão e purificação da TcP5CDH produzida em bactéria</i>	70
2.5.3 <i>Cromatografia de exclusão por peso molecular em gel filtração (GF)</i>	71
2.5.4 <i>Espalhamento de luz dinâmica (Dynamic Light Scattering, DLS)</i>	73
2.5.5 <i>Análise da TcP5CDH em solução pela técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (Small Angle X-Ray Scattering-SAXS)</i>	73
2.5.6 <i>Obtenção de cristais da TcP5CDH</i>	74
2.5.7 <i>Obtenção de soro policlonal</i>	74
2.5.8 <i>Purificação do anticorpo anti-TcP5CDH</i>	76
2.5.9 <i>Preparação de extratos protéicos totais</i>	76
2.5.9.1 <i>T. cruzi/T. brucei para ensaios de western blot</i>	76
2.5.9.2 <i>T. cruzi/T. brucei para ensaios de atividade enzimática</i>	77
2.5.9.3 <i>Extratos protéicos de levedura</i>	77
2.5.10 <i>Western blot</i>	78
2.5.11 <i>Análise da proteína TcP5CDH por eletroforese em condições não desnaturantes (gel nativo)</i>	79
2.6 Determinação da localização sub-celular para TcP5CDH	81
2.6.1 <i>Ensaio de imunolocalização</i>	81
2.6.2 <i>Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina</i>	82
2.6.3 <i>Preparação de vesículas mitocondriais do T. cruzi pelo método de pérola de vidro</i>	83
2.6.4 <i>Preparação de frações mitocondriais do T. cruzi pelo método da lise hipotônica</i>	84
2.7 Ensaio bioquímicos	85
2.7.1 <i>Síntese química do substrato P5C</i>	85
2.7.1.1 <i>Quantificação do P5C sintético</i>	85
2.7.1.2 <i>Análise do P5C por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectrometria de massa (MS)</i>	86
2.7.1.3 <i>Análise do P5C em função do pH</i>	86
2.7.2 <i>Determinação dos parâmetros cinéticos da TcP5CDH</i>	86
2.7.2.1 <i>Cálculo da constante de afinidade (K_m), eficiência catalítica (k_{cat}) e constante de especificidade (k_{cat} / K_m)</i>	87
2.7.2.2 <i>Especificidade de substrato</i>	88
2.7.2.3 <i>Dependência de pH</i>	88
2.7.2.4 <i>Energia de ativação e dependência de temperatura</i>	89
2.7.3 <i>Medição de outras atividades enzimáticas</i>	89
2.7.3.1 <i>Citrato sintase (CS)</i>	89

2.7.3.2 Hexocinase (HQ)	90
2.7.3.3 Piruvato quinase (PQ).....	90
2.7.3.4 Fumarato redutase (FMR)	90
2.8 Avaliação do papel fisiológico da enzima TcP5CDH	91
2.8.1 Ensaio de estresse nutricional	91
2.8.2 Avaliação da citotoxicidade do P5C no <i>T. cruzi</i>	91
2.8.3 Avaliação da síntese de ATP dependente de P5C (método com luciferase)	91
2.8.4 Obtenção e caracterização de parasitas super-expressores da TcP5CDH	92
2.8.4.1 Avaliação do processo de metaciclologênese	93
2.8.4.2 Avaliação do processo de eclosão de tripomastigotas P5C-dependente	94
2.8.4.3 Determinação do consumo de oxigênio.....	94
2.8.4.4 Síntese de ATP (método radioativo)	94
2.8.4.5 Dosagem de peróxido de hidrogênio	95
2.8.4.6 Análise dos níveis de TcGP82.....	95
2.9 Avaliação da enzima TcP5CDH como um possível alvo terapêutico	96
2.9.1 Ensaio de proliferação celular com DSF	96
2.9.2 Avaliação do efeito do DSF no processo de metaciclologênese	97
2.9.3 Avaliação do efeito de DSF na eclosão de formas tripomastigotas metacíclicas	97
2.9.4 Ensaio de atividade TcP5CDH com DSF.....	97
3 RESULTADOS	98
3.1 Predições <i>in silico</i>	99
3.1.1.1 O genoma do <i>T. cruzi</i> contém três sequências de DNA putativas para a enzima TcP5CDH.....	99
3.2 Avaliação funcional da sequência TcP5CDH1	105
3.2.1 O genoma do parasita apresenta uma sequência de DNA (1,686 Kb) que.....	105
codifica para a TcP5CDH.....	105
3.2.2 A sequência TcP5CDH complementa a atividade enzimática em uma cepa de	105
levedura defeituosa no gene ortólogo (PUT2)	105
3.2.3 A enzima recombinante TcP5CDH é uma proteína oligomérica	108
3.3 Caracterização bioquímica da enzima TcP5CDH	116
3.3.1 Síntese química e caracterização do substrato P5C	116
3.3.2 A reação catalisada pela enzima TcP5CDH é dependente de NAD ⁺ /NADP ⁺	118
3.3.3 A atividade enzimática da TcP5CDH é irreversível	120
3.3.4 Determinação dos parâmetros cinéticos para TcP5CDH.....	122
3.4 Caracterização da enzima TcP5CDH nas distintas formas do parasita	127
3.4.1 O soro policlonal anti-TcP5CDH é específico	127
3.4.2 A enzima TcP5CDH está associada à membrana mitocondrial do <i>T. cruzi</i>	128
3.4.3 A enzima TcP5CDH é regulada positivamente nos estágios infectivos do <i>T. cruzi</i>	139
3.5 Avaliação do papel fisiológico da TcP5CDH e o seu substrato (P5C)	142
3.5.1 O substrato P5C pode ser utilizado como fonte energética pelo <i>T. cruzi</i>	142
3.5.2 A super-expressão da enzima TcP5CDH produz alterações morfológicas no	146
parasita e estimula a respiração celular	146
3.5.3 O mutante pTEX-TcP5CDH ⁺⁺ apresentou mudanças na superfície celular	155
3.6 O metabolismo de P5C como um alvo anti- <i>T. cruzi</i>	159
3.6.1 O DSF produz um efeito tripanocida	159
3.6.2 O mutante pTEX-TcP5CDH ⁺⁺ é mais resistente ao DSF	162
3.6.3 O DSF interfere na atividade da TcP5CDH	165
3.7 O papel da L-prolina na relação <i>T. brucei</i> – mosca tsé-tsé	167

3.7.1 Os níveis de L-prolina são alterados na hemolinfa da mosca tsé-tsé durante a infecção com o <i>T. brucei</i>	167
3.7.2 A TbP5CDH apresenta uma expressão diferencial nos diferentes estágios de desenvolvimento do <i>T. brucei</i>	168
3.7.3 A indução do RNA dupla fita (dsRNA) diminui os níveis de transcrito para a enzima TbP5CDH, mas os níveis proteicos permanecem estáveis	171
4 DISCUSSÃO	173
4.1 Correlação dos dados <i>in silico</i> com a função e localização celular da TcP5CDH	174
4.2 Estrutura quaternária da TcP5CDH e sua interação com as membranas mitocondriais	176
4.3 Caracterização bioquímica da TcP5CDH	180
4.4 O papel fisiológico da TcP5CDH	186
4.6 A TcP5CDH como um alvo tripanocida	190
4.7 A prolina e sua relação entre o <i>T. brucei</i> e o seu hospedeiro vetor	192
5 CONCLUSÕES	195
REFERÊNCIAS	177

CAPITULO I
INTRODUÇÃO

Há mais de um século que a Doença de Chagas foi descoberta. Desde então, inúmeros estudos tentando desvendar as particularidades moleculares, bioquímicas e patológicas do seu agente causador, o *Trypanosoma cruzi*, tem sido realizados. O nosso grupo tem o interesse particular de compreender como as preferências nutricionais do *T. cruzi* favorecem à persistência deste patógeno e, sobretudo, se a interferência nestes mecanismos pode gerar alternativas para combatê-lo. Neste trabalho, descreve-se pela primeira vez, em um parasita deste gênero, a funcionalidade da segunda enzima que atua na rota de conversão de prolina em glutamato; dois aminoácidos centrais em processos fisiológicos dessa espécie.

1.1 Os tripanossomas e a Doença

No ano de 1907, o médico mineiro Carlos Chagas encontrava-se atendendo um surto de malária na cidade de Lassance (MG), onde acidentalmente, descobriu o *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909). O parasita foi identificado em amostras de insetos hematófagos da espécie *Triatoma infestans*. Esses insetos são conhecidos popularmente no Brasil como barbeiros (em inglês: *kissing bugs*), devido a que sugam sangue do rosto das pessoas (DOYLE; HSIEH; ENGEL, 2000). Após essas observações, Chagas encontrou uma paciente infectada com *T. cruzi*. Com isto, concluiu-se que o *T. cruzi* era a segunda espécie de tripanossomas que podia ser transmitida ao homem e causar uma complexa patologia tissular conhecida como doença de Chagas (MOSELEY; MILLER, 1945).

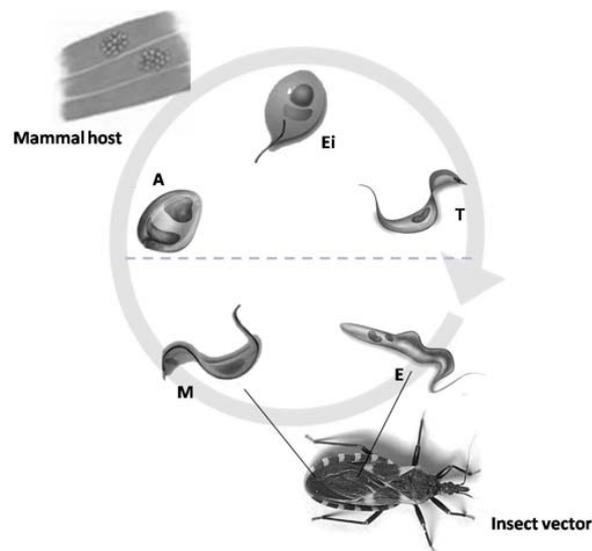
A outra espécie havia sido descoberta alguns anos atrás pelo médico escocês David Bruce, o *T. brucei* (1894) (BRUCE, 1895). Bruce descobriu que este parasita era transmitido na saliva da mosca tsé-tsé após a picada, causando a peste nagana em gado bovino, equino, entre outros. Anos mais tarde (1903) se confirmou que o *T. brucei* era a espécie causadora da doença do sono em humanos (BRUCE; NABARRO; GRIEG, 1903) [revisado em (COX, 2004)].

1.1.1 Características gerais do *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário hemoflagelado que alterna seu ciclo de vida entre barbeiros e hospedeiros vertebrados, dentre eles o homem. O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e se caracteriza pela presença de vários estágios de desenvolvimento nos dois tipos de hospedeiros. Classicamente, sobre a base de critérios morfológicos e moleculares, foi

estabelecida a existência de quatro estágios ao longo do seu ciclo de vida (TYLER; ENGMAN, 2001). As formas epimastigotas (E), são formas não infectivas, flageladas e divisíveis, que estão presente no lúmen do intestino do barbeiro e que, sob condições de estresse nutricional na porção terminal do intestino, se diferenciam à forma tripomastigota metacíclica (M); processo conhecido como metaciclogênese. Esta forma é infectiva, mas não proliferativa, e por sua vez, é transmitida nas fezes do inseto vetor. Quando as formas M aderem à célula hospedeira, se forma um vacúolo endocítico, denominado vacúolo parasitóforo, que possibilita a invasão do parasita na célula. O pH ácido do vacúolo facilita a liberação das formas tripomastigotas metacíclicas ao citoplasma da célula hospedeira onde se transformam na forma intracelular, replicativa, conhecida como amastigota (A) (ANDREWS, 1993). Estas se caracterizam pela presença de um flagelo incipiente que não emerge da superfície da célula, e se replicam por fissão binária. Após a proliferação dentro da célula, os parasitas se transformam nas formas tripomastigotas sanguíneas (T), as quais eclodem da célula provocando a ruptura desta. Embora os T não se repliquem, estes invadem outras células e tecidos, o que pode provocar dano tissular (ZINGALES; COLLI, 1985) (Esquema 1).

Esquema 1 - Representação do ciclo de vida do *T. cruzi*



As principais formas de desenvolvimento presentes no hospedeiro vertebrado (A, Ei e T) e no inseto barbeiro (E e M). Fonte: (PÁES et al., 2011).

1.1.2 *Transmissão do parasita ao humano*

A alternância de hospedeiros, onde o *T. cruzi* transita, é mediada por diferentes vias de transmissão. A mais comum é a via natural, onde fezes contaminadas com as formas M são secretadas logo após o repasto sanguíneo, devido ao significativo aumento no volume do intestino do inseto. A resposta pela picada do barbeiro produz coceira, o que favorece a entrada dos parasitas no epitélio. Entre as outras vias de transmissão destacam-se a mediada por transfusões sanguíneas, a transmissão vertical, que pode ocorrer por via trans-placentária e a transmissão oral que caracteriza-se pela contaminação de alimentos com formas M do *T. cruzi* capazes de se ligar à mucina gástrica e, posteriormente, atingir as células do epitélio intestinal (CORTEZ, M. et al., 2006; COVARRUBIAS et al., 2007).

1.1.3 *Patologia da doença de Chagas*

A doença de Chagas apresenta duas fases clínicas. Inicialmente, após a invasão pelo parasita nos diferentes tecidos, pode-se apresentar uma fase aguda caracterizada por uma baixa quantidade de anticorpos, alta parasitemia e, eventualmente, alguns sintomas não específicos, como febre e dor de cabeça. Após a fase aguda, o paciente entra, na maioria dos casos, na fase crônica. Esta se caracteriza pela diminuição da parasitemia e pela ausência de sintomas. As principais formas da fase crônica são: a indeterminada, cardíaca ou digestiva (PRATA, 2001).

Estima-se que 70% dos chagásicos apresentam a fase indeterminada da doença sem a aparição de sintomas ou dano tissular. O restante pode apresentar um quadro de cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), o que pode resultar no óbito (BOSCARDIN et al., 2010). A forma digestiva consiste de duas síndromes, o megaesôfago levando a disfagia e regurgitação, e o megacólon que produz constipação e retenção fecal [revisado em (BOSCARDIN et al., 2010)].

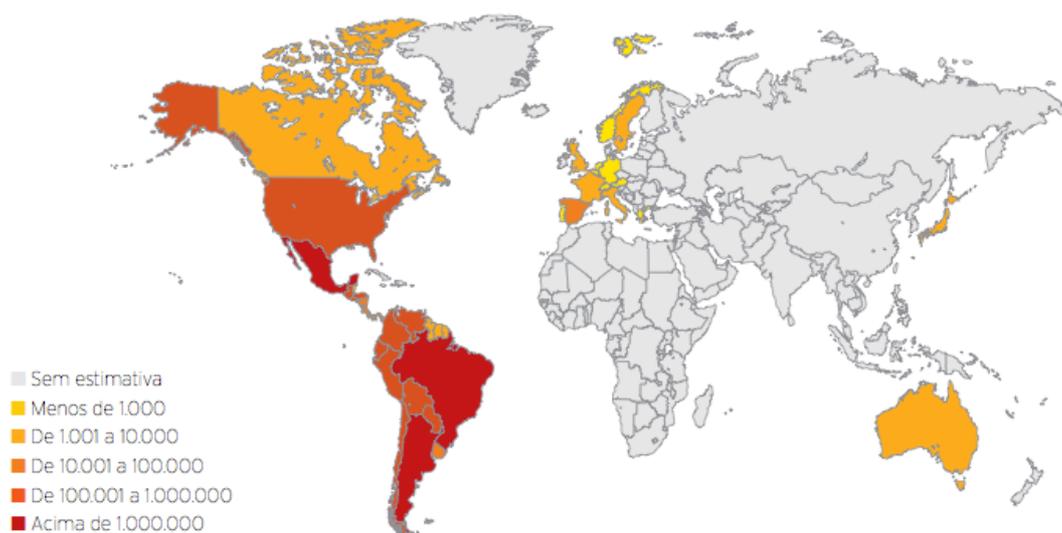
1.1.4 *Panorama epidemiológico atual*

O intenso controle regional realizado em países como Uruguai, Chile e o Brasil interrompeu a transmissão vetorial do parasita. Isto reduziu significativamente o número de pessoas infectadas com o parasita em áreas antigamente consideradas como endêmicas

(WHO, 2012). Desde a última década, baixou de quase 4 em cada grupo de 100 mil por ano para menos de 3 o índice de mortes por causa da doença. No entanto, ainda estima-se que de 2 a 3 milhões de pessoas estejam infectadas com o protozoário causador da doença no Brasil. A única região em que a taxa aumentou foi no Nordeste (MARTINS-MELO et al., 2012).

O fluxo migratório desde países da América do Sul a regiões não endêmicas (Esquema 2) tem aumentado os índices de pessoas infectadas através de transfusões de sangue. Estima-se que cerca de 300.000 indivíduos estão infectados com o *T. cruzi* em EUA, a grande maioria provenientes do México e América Central. Espanha é a segunda região mais afetada com uma estimativa de entre 47.000 – 68.000 casos de infectados, originários de Ecuador, Bolívia, Argentina e Perú (WHO, 2012).

Esquema 2 - Panorama mundial da infecção pelo *T. cruzi*



Fonte: (SCHMUNIS, 2007) (PEREZ-MOLINA; NORMAN; LOPEZ-VELEZ, 2012, FAPESP, 2009).

1.1.5 Quimioterapia

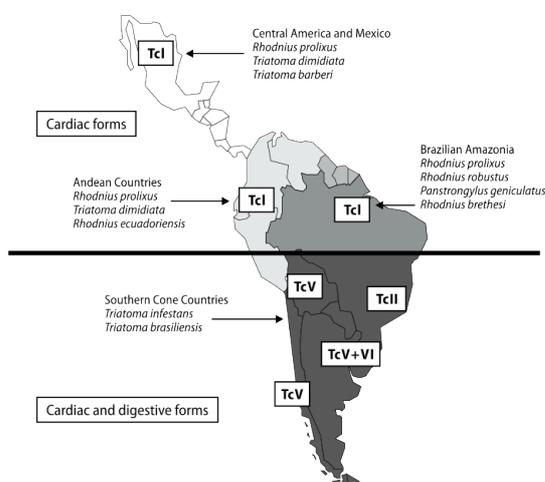
Há quase quarenta anos que a doença de Chagas é tratada com dois compostos, conhecidos como Benznidazole® (Bz) e Nifurtimox® (DOCAMPO; STOPPANI, 1980). Esses compostos são considerados pró-drogas, porque precisam da ativação enzimática catalisada por uma nitro-redutase presente no parasita (WILKINSON et al., 2008). A efetividade dessas drogas é maior na fase aguda da doença e, parece estar ligada à susceptibilidade de cada cepa do parasita (STOPPANI, 1999). Porém, há relatos mostrando que o Bz diminui as alterações

cardíacas provocadas na fase crônica da doença (GARCIA et al., 2005). Além disso, a administração de Bz produz múltiplos efeitos colaterais (URBINA, 2001).

Na busca de compostos alternativos com atividade tripanocida, tem-se analisado diferentes alvos moleculares. Entre estes se destacam: inibidores da cruzipaína (principal cisteíno-proteinase de *T. cruzi*), a via de biossíntese de ergosterol, síntese de poliisoprenoides, a via de salvamento das purinas, síntese de nucleotídeos, proteínas envolvidas na edição do RNA, inibidores enzimáticos da tripanotiona redutase e da topoisomerase I e II, entre outros (BODLEY; SHAPIRO, 1995; ENGEL et al., 1998; FOURNET et al., 2000; LIENDO; LAZARDI; URBINA, 1998; MONTALVETTI et al., 2001; NAKAJIMA-SHIMADA; HIROTA; AOKI, 1996; POLLARD; HARRIS; HAJDUK, 1992; URBINA et al., 2000).

Além da complexidade no ciclo de vida do parasita e à eficácia limitada das drogas acima mencionadas, existe uma alta variabilidade genética intraespecífica (ZINGALES et al., 2009). Este fenômeno parece estar ligado a eventos de co-evolução entre parasita e o inseto vetor (STEVENS; GIBSON, 1999). A relevância desta variabilidade radica no fato de também haver associação com características do parasita como: virulência (LAURIA-PIRES; TEIXEIRA, 1996), infectividade (CORTEZ, C. et al., 2012) e patogenicidade (MACEDO; PENA, 1998) (Esquema 3). Atualmente, baseados em parâmetros moleculares denominados como unidades discretas de tipagem (DTU) os isolados do *T. cruzi* classificam-se em seis grupos principais (ZINGALES et al., 2009) (TcI – TcVI).

Esquema 3 – Distribuição geográfica dos distintos grupos de *T. cruzi* em humanos



Fonte: WHO, 2012.

1.2 Particularidades celulares do *T. cruzi*, o agente causador

O *T. cruzi* é um tipo celular que apresenta diferentes particularidades morfológicas e cujos compartimentos celulares o diferenciam de outro tipo de células eucariotas. Entre estes se destacam a composição dos lipídeos de membrana, a presença de uma rede concatenada de DNA, análogo ao mitocondrial, chamada de cinetoplasto (kDNA), os glicossomas, os acidocalcissomas, os reservossomas, o flagelo e uma única mitocôndria por célula, entre outros. Todos estes participam de diferentes processos celulares, onde o metabolismo será o foco principal a ser aprofundado.

1.2.1 Organelas especializadas

T. cruzi apresenta uma camada de microtúbulos subpeculiares localizados na parte inferior da membrana plasmática, conhecidos como microtúbulos subpeculiares. A associação destes microtúbulos confere uma rigidez particular a célula que dificulta a lise por métodos mecânicos comuns (DE SOUZA, 2002).

Todos os membros da família *Trypanosomatidae* possuem um flagelo que emerge desde uma invaginação chamada bolsa flagelar. O flagelo corresponde à região anterior do parasita e nos estágios E e T este emerge da região lateral. De acordo com o estágio de desenvolvimento, o flagelo pode ter elongações que variam entre 2 – 20 µm de comprimento (DE SOUZA, 2002).

Estruturas citoplásmicas, ligadas a membranas e semelhantes aos peroxissomos de eucariotas superiores, foram identificadas em tripanossomatídeos e chamados de glicossomos. Ali encontram-se localizadas as enzimas que participam das primeiras reações da via glicolítica (OPPERDOES; BORST, 1977). Estas e outras proteínas que se localizam ali, são codificadas no núcleo, traduzidas nos ribossomos livres e importadas pós-traducionalmente a essa organela. Isto último é mediado por um motivo SKL posicionado no extremo C-terminal da proteína. Ao microscópio os glicossomos aparecem como estruturas densas de forma arredondada (BLATTNER et al., 1992).

Outras estruturas importantes no armazenamento de metabólitos, osmólitos e, particularmente, de ortofosfato foram observadas em *T. cruzi*. Estas estruturas denominadas como acidocalcissomos apresentam uma eletrodensidade que pode ser evidenciada no citoplasma do tripanossoma. Denominam-se assim, porque previamente demonstrou-se que o

T. brucei tinha concentrações elevadas de Ca^{2+} intracelular que podiam ser liberadas desde compartimentos vacuolares ácidos levando a uma atividade ATPase translocadora de H^+ (VERCESI; MORENO; DOCAMPO, 1994). Posteriormente, foi também evidenciada a presença destas organelas no *T. cruzi* (DOCAMPO; MORENO, 1999).

O *T. cruzi* sintetiza ergosterol ao invés de colesterol. Este último é captado a partir do LDL e processado em outro compartimento ácido conhecido como reservossomas (SOARES; SOUTO-PADRON; DE SOUZA, 1992). Outros autores tem os sugerido como um compartimento os pré-lisossomal. Os reservossomas estão localizados na região posterior da célula e contêm um elevado número de macromoléculas, sendo esta uma característica principal das formas E. Além disso, os reservossomas fazem parte da via endocítica em *T. cruzi* e contêm um amplo conteúdo de proteases (cruzipaina principalmente) que são liberadas no estágio M (CAZZULO et al., 1990; CUNHA-E-SILVA et al., 2002).

1.2.2 A singularidade da mitocôndria do *T. cruzi*

O *T. cruzi* possui uma única mitocôndria por célula que se estende ao longo do corpo do parasita e é distribuída em distintos ramos sobre os microtubulos subpeculiares. Esta organela apresenta os compartimentos classicamente conhecidos: a matriz, a MEM e a MIM. Esta última forma invaginações conhecidas como cristas. Dependendo do ambiente e da disponibilidade de substratos a mitocôndria pode ocupar uma quantidade variável do volume total celular (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009).

Em uma porção da mitocôndria há uma complexa rede de DNA na matriz mitocondrial que forma a estrutura conhecida como cinetoplasto. O kDNA representa o 25% do DNA total do parasita composto por redes concatenadas de minicírculos que variam entre 20 – 30.000 por célula (RIOU; DELAIN, 1969) e que não codificam para produtos proteicos específicos. Os maxicírculos, no entanto, parecem conter material codificante como sucederia com o DNA mitocondrial de outras células eucariotas. Evidências sobre um fragmento do maxicírculo que codifica para a subunidade II do complexo citocromo *c* oxidase tem sido descritas (JOHNSON et al., 1982).

Na maioria de eucariotas, a CTE é composta de quatro complexos integrais da MIM. O NADH: ubiquinona oxidorreductase (C-I), succinato: ubiquinona redutase (C-II), ubiquinol: citocromo c^{3-} oxidorreductase (C-III) e o complexo citocromo c^{2+} oxidase (C-IV). Além destes,

a ubiquinona (Coenzima Q) e o citocromo *c* funcionam como carregadores de elétrons móveis entre os complexos. Os elétrons dos átomos de ferro central, presentes no C-I ou C-II, são então transferidos à ubiquinona (forma oxidada da coenzima Q) reduzindo-a em ubiquinol revisado em [(MONZOTE; GILLE, 2010)]. A forma ubiquinol é desprotonada formando-se a semiquinona que doa os elétrons ao citocromo *b-c₁* e posteriormente ao citocromo *c*. Estas passagens de elétrons estão acompanhadas do bombeamento de prótons da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana. O gradiente eletroquímico gerado favorece à re-entrada dos prótons através da ATP sintase. A F_0F_1 ATPase (também chamada de C-V) utiliza esta força protonmotriz para promover a síntese de ATP, processo conhecido como fosforilação oxidativa (NELSON; COX, 2008).

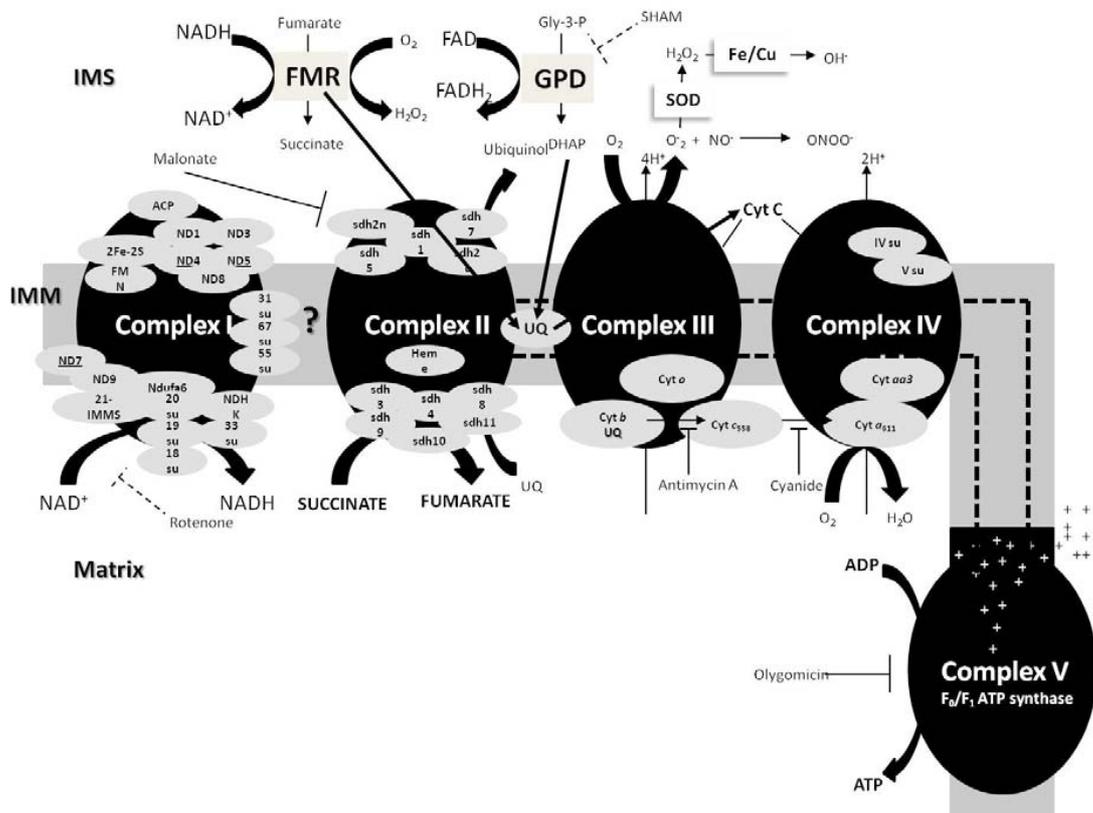
Em *T. brucei* e *T. cruzi* tem sido demonstrado que a atividade mitocondrial alterna entre um estado altamente ativo e outro parcial, o que é regulado durante o ciclo de desenvolvimento do parasita. Dados do genoma e experimentais têm mostrado a presença e funcionalidade dos complexos C-II e C-V, entanto que o C-I parece ter uma função limitada devido à ausência de algumas subunidades (OPPERDOES; MICHELS, 2008). A presença de um atividade NADH-desidrogenase sensível a rotenona (em altas doses) sugeriu-se que C-I é responsável pela reoxidação do NADH mitocondrial, mas não da transferência de elétrons a Coenzima Q (HERNANDEZ; TURRENS, 1998). Recentemente, um estudo com mutantes para os genes codificantes das subunidades *ND4*, *ND5* e *ND7* do C-I em *T. cruzi* mostrou que estas deleções não afetam as taxas respiratórias e nem o potencial de membrana mitocondrial na presença de substratos geradores de NADH ou $FADH_2$. Isto confirmou que o C-I possui atividade tem funções limitadas em *T. cruzi* (CARRANZA et al., 2009; TIELENS; VAN HELLEMOND, 1998).

O C-II em *T. cruzi* apresenta um rearranjo supramolecular atípico composto de sete subunidades catalíticas e uma subunidade heterodimérica ferro-enxofre cuja massa molecular é de aprox. 550 kDa (MORALES et al., 2009). O C-II se liga ao grupo proto-heme, mas este não esta diretamente relacionado à redução da ubiquinona.

Estudos de proteomica tem revelado a presença das subunidades IV, V, VI e VIII do C-IV, proteína Rieske ferro-enxofre, NADH desidrogenase, subunidades alfa da ATP sintase, entre outros (FERELLA et al., 2008; STOPPANI et al., 1980). Antimicina e KCN inibem a transferência de elétrons a partir de succinato sugerindo a funcionalidade dos C-III e C-IV respetivamente. Além disto, os citocromos *aa3*, *b*, *c558* e possivelmente o *d*, têm sido identificados em *T. cruzi*. Particularmente, o citocromo *aa3* foi sugerido como a principal

oxidase terminal do parasita (AFFRANCHINO; SCHWARCZ DE TARLOVSKY; STOPPANI, 1986; ROGERSON; GUTTERIDGE, 1979). Além disso, a funcionalidade das proteínas responsáveis pela biossíntese de heme O e sua conversão em heme A, um importante grupo protético do complexo citocromo oxidase (COX), foram descritas em *T. cruzi* (BUCHENSKY et al., 2010). A participação dos complexos e substratos acima mencionados no *T. cruzi* representa-se no esquema 4.

Esquema 4 – Representação dos principais componentes da CTE de *T. cruzi*



Os complexos que compõem a CTE em *T. cruzi* se localizam na MIM e alguns intermediários são gerados no espaço intermembrana ou na matriz. As subunidades ausentes no C-I de mutantes de *T. cruzi* estão indicadas (sublinhadas). O C-I insensível a R é indicada pela linha pontilhada. A atuação da FMR como encarregada da reoxidação de NAD^+ mitocondrial, cujo produto formado o succinato pode ser reoxidado através do C-II, onde o fluxo de elétrons pode continuar através da ubiquinone (UQ). A atividade do C-II é inibida pelo malonato. GPD: glicerol-3-fosfato (Gly-3P) desidrogenase dependente de FAD, DHAP: dihidroxiacetona fosfato, SHAM: ácido salicilhidroxâmico, SOD: superóxido dismutase, Citocromos *c*, *b* (sensíveis a AA), *a*₆₁₁ (oxidase terminal), *c*₅₅₈ (sensível a KCN), CCCP (carbonil cianeto 3-clorofenilhidrazona). A F₀/F₁ ATP sintase é sensível a oligomicina e é dependente de magnésio (HILL, 1976) revisado em (PAES, L. S., 2010).

1.2.3 O metabolismo energético do *T. cruzi*

A síntese de ATP em *T. cruzi* acontece principalmente através de dois mecanismos. A fosforilação ao nível do substrato, por via glicolítica ou no ciclo de Krebs (Succinil CoA-sintase) e através da fosforilação oxidativa como mencionado anteriormente.

Em *T. cruzi*, a glicólise apresenta algumas diferenças respeito de outros organismos. O efeito Pasteur, caracterizado pela variação desta via dependendo das tensões de oxigênio no meio, não acontece. Isto é, a atuação desta via acontece de forma semelhante em condições aeróbicas ou anaeróbicas, pelo que foi sugerido que esta via seguia um padrão de tipo fermentativo (CAZZULO, 1992). Assim, a glicólise gera malato, piruvato, succinato e CO₂. O malato produzido pode ser utilizado pela malato desidrogenase (gerando oxalacetato), a enzima málica (produzindo piruvato) ou pela FMR na mitocôndria (gerando succinato) (CANNATA; CAZZULO, 1984; CANNATA et al., 1979). O succinato é o principal doador de elétrons ao C-II e, sob condições de anaerobiose este é secretado ao meio extracelular (DENICOLA-SEOANE et al., 1992).

A regulação da via glicolítica não acontece ao nível de hexocinase ou fosfofrutoquinase. A glicose é convertida a gliceraldeído-1,3-bifosfato (GBP) no glicossomo e, posteriormente, em glicerol, onde se gera ATP. O GBP pode ser convertido em fosfoenolpiruvato (PEP). O PEP pode ser convertido em piruvato através da enzima piruvato quinase citossólica (PQ), onde novamente, gera-se ATP, ou voltar ao glicossoma para formar oxalacetato pela fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK). A partir de oxalacetato pode-se regerar succinato. Já o piruvato pode ser transaminado, decarboxilado ou reduzido (sob anaerobiose), formando alanina, Acetil-CoA, ou lactato, respectivamente (CAZZULO, 1994).

A fosforilação oxidativa pode ser alimentada a partir de diferentes substratos respiratórios. Entre estes destacam-se o piruvato/malato, NADH, succinato e o Gly-3P. Os elétrons presentes nestas moléculas pode ser transferidos ao *pool* de ubiquinona resultando na consequente passagem aos citocromos. Este processo redox, como mencionado anteriormente, leva à síntese de ATP via ATP-sintase. Este processo requer do importe de ADP à mitocôndria. O carregador ADP/ATP encontra-se localizada na MEM do *T. brucei* como reportado recentemente (PENA-DIAZ et al., 2012). No entanto, em tripanossomas, as taxas respiratórias não tem mostrado diferenças significativas na presença de estes substratos (HILL, 1976; ROGERSON; GUTTERIDGE, 1979; SILVA et al., 2011). Recentemente, mostrou-se que as formas T apresentam um potencial de membrana mitocondrial menor que

as formas E. Isto contrasta com a atividade aumentada das atividades para os C-II e C-III em T com respeito de T, e um aumento correlativo na geração de EROs, sugerindo que nos estágios intracelulares o parasita possui mecanismo endógenos para atenuar o desbalanço redox enfrentado no humano (GONCALVES et al., 2011).

1.2.4 *Metabolismo de aminoácidos como alternativa energética no T. cruzi*

É bem sabido que os aminoácidos são os constituintes essenciais das proteínas. Eles se classificam entre essenciais, não essenciais, e, apresentam características estruturais e físico-químicas diferentes. Devido a disponibilidade metabólica presente em fluídos e tecidos dos insetos barbeiros, o parasita adaptou-se a obter energia a partir destes metabólitos. Relatos prévios mostraram que na hemolinfa do *Rhodnius prolixus* abundam aminoácidos como Prol, Tyr, His, Val na sua forma livre (BARRETT; FRIEND, 1975; HARINGTON, 1961). No entanto, esses dados amostram variações entre os valores relatados, segundo a colônia e condições de manutenção dos insetos. Alguns destes também podem ser captados do meio extracelular, obtidos por proteólise ou gerados por rotas biossintéticas.

Os primeiros trabalhos sobre o catabolismo de aminoácidos mostraram que Asn, Gln, Glu, Leu, Ile e Prol são consumidos pelo parasita gerando intermediários do ciclo de Krebs (SYLVESTER; KRASSNER, 1976; ZELEDON, 1960). Estes processos geram CO₂, succinato e NH₃ e, conseqüentemente, ATP. Diante da não funcionalidade de um ciclo da ureia em tripanossomas (YOSHIDA; CAMARGO, 1978), o excesso de NH₃ pode, eventualmente, ser reutilizado pela glutamina ou asparagina sintetase que regeneram Gln, Asn a partir de Glu e Asp, respectivamente (CALDAS et al., 1980; MAGDALENO et al., 2011). Por sua vez, o parasita possui transaminases altamente eficientes na transferência do grupo –NH₂ entre Ala (TcALAT), Asp (TcASAT), Tyr (TcTAT), Ser (TcSAT) regenerando Glut, Phe, Ala e cetoácidos como α -CG, oxalacetato ou piruvato (MARCIANO et al., 2008; MARCIANO et al., 2009; NOWICKI et al., 2001).

A arginina também é importante na geração de energia através de uma arginina quinase que cuja fosforilação, reversível, gera ATP a partir de fosfoarginina e ATP; um sistema de armazenamento energético comparável ao sistema fosfocreatinina de eucariotas superiores (PEREIRA et al., 2002).

A prolina, particularmente é um aminoácido cuja rota de interconversão em glutamato gera equivalentes reduzidos que podem abastecer a CTE ou, o ciclo de Krebs mediante a

deaminação de Glu em α -CG. Observou-se também que a sua degradação estimula o consumo de oxigênio e a síntese de ATP (prolina-dependente) já foi demonstrada em formas M do *T. cruzi* (MARTINS et al., 2009; SYLVESTER; KRASSNER, 1976). Quando foram comparados os metabolismos de prolina e glicose nos estágios intracelulares de *T. cruzi*, observou-se que a glicose é consumida pelas formas extracelulares, enquanto que a prolina foi consumida pelas formas intracelulares, mostrando que nas formas extracelulares prevalece um metabolismo baseado no consumo de glicose e nas formas intracelulares prevalece um metabolismo baseado no consumo de prolina (SILBER et al., 2009).

1.3 O papel da prolina na relação parasita – hospedeiro

O papel da prolina em modelos que envolvem a presença de um patógeno dentro de um hospedeiro tem mostrado coisas interessantes em distintos modelos. Por exemplo, *Helicobacter pylori*, uma bactéria gram-negativa causadora de ulcerações gastrointestinais, vive em um ambiente rico em L-prolina (BLASER, 1990). Concentrações elevadas desse aminoácido, em amostras de suco gástrico provenientes de paciente infectados com *H. pylori*, estão correlacionadas com a capacidade desta bactéria para consumir oxigênio na presença de L-prolina (NAGATA et al., 2003).

Outro exemplo é o observado na mosca tsé-tsé (*G. morsitans*), e na maioria dos insetos da ordem díptera, onde a L-prolina é o principal combustível para o processo de voo (BURSELL et al., 1973; LEHANE; AKSOY; LEVASHINA, 2004). As concentrações desse aminoácido dentro do inseto são suficientes para que as formas procíclicas do *T. brucei* apresentem um metabolismo energético prolina-dependente (NJAGI; OLEMBO; PEARSON, 1992; WALSH et al., 2009). Por outro lado, estudos em *T. brucei* têm demonstrado a funcionalidade e importância da enzima TbPRODH. Nessa espécie, a prolina é o único aminoácido capaz de manter a capacidade replicativa sob ausência de glicose. Quando o gene codificante para a TbPRODH foi silenciado (via RNAi), e os parasitas foram crescidos na presença de L-prolina como fonte nutricional (LAMOUR et al., 2005), a proteína mostrou ser essencial.

No caso específico do metabolismo de prolina em *T. cruzi* se sabe que a sua presença em um meio condicionado, que mimetiza a urina do barbeiro (TAU), promove o processo de metaciclogênese (CONTRERAS et al., 1985). Este aminoácido é relevante na diferenciação dos estágios intracelulares no *T. cruzi* (TONELLI et al., 2004). Demonstrou-se nesse trabalho

que, quando culturas infectadas pelo *T. cruzi* foram carenciadas de prolina, existia um acúmulo dessas formas e uma diminuição correlativa de formas T, sugerindo um arresto da diferenciação nessa fase do ciclo intracelular (TONELLI et al., 2004). Isto levou a concluir que a prolina é relevante para a diferenciação entre os estágios Ei e T, passo fundamental no ciclo de vida desse parasita.

No *T. cruzi* é sabido que o processo de invasão nas células do hospedeiro mamífero precisa de energia, mais precisamente na forma de ATP (SCHENKMAN; ROBBINS; NUSSENZWEIG, 1991). Recentemente, foi mostrado que a prolina é o sustento energético da invasão, já que está envolvida na geração de ATP nas formas infectivas tripomastigotas metacíclicas (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 incapacidade para infectar células de mamífero. No entanto, observou-se que após a adição de prolina ao meio controlado, o parasita conseguiu restabelecer os níveis intracelulares de ATP e recuperar a sua capacidade infectiva. Em paralelo, quando analisado o efeito gerado pela adição de glicose no lugar de prolina, não se observou o mesmo resultado, ressaltando o papel da prolina como metabólito que sustenta energeticamente a invasão celular (SILBER et al., 2009). Sugere-se então a prolina como um substrato relevante na biologia do *T. cruzi*, sendo o estudo do seu metabolismo de particular interesse para o nosso grupo.

Tendo como ponto de partida que o catabolismo de prolina acontece via ciclo de Krebs (SYLVESTER; KRASSNER, 1976), foi caracterizado o transporte desse aminoácido ao citoplasma do parasita. Esse processo é mediado pela ação de dois sistemas ativos de transporte (A e B): o sistema A possui alta afinidade e baixa capacidade de transporte e depende do gradiente de H^+ da membrana plasmática; o sistema B, que possui baixa afinidade e a alta capacidade de transporte, dependente da hidrólise direta de ATP (SILBER et al., 2002). Posteriormente, foi revelada a presença, estrutura e atividade imunogênica da enzima prolina racemase (TcPRAC). Essa enzima catalisa a conversão da forma D a L-prolina. A TcPRAC é codificada por dois genes parálogos, e uma vez traduzida é liberada ao meio extracelular (CHAMOND et al., 2003). Não se sabe a certo ainda qual é o papel biológico da prolina racemase no metabolismo de *T. cruzi*. Porém, parece bem estabelecido que a TcPRAC funciona como um mitógeno de células B, o que possibilita a evasão da resposta imune humoral e favorece à infectividade (BUSCHIAZZO et al., 2006; CHAMOND et al., 2009; CHAMOND et al., 2003). Os resultados obtidos nesse contexto postularam à prolina

racemase como um possível alvo terapêutico na infecção pelo *T. cruzi* (BRYAN; NORRIS; COUTINHO et al., 2009).

O catabolismo de prolina em *T. cruzi* é mediado inicialmente pela participação da enzima prolina desidrogenase (PRODH) (EC 1.5.99.8) que oxida a prolina rendendo Δ^1 pirrolina-5-carboxilato (P5C), utilizando o FAD como acceptor de elétrons. A TcPRODH é uma enzima localizada na matriz mitocondrial, e a diferença entre outras PRODHs é que a enzima de *T. cruzi* possui um domínio de ligação a cálcio (*ef-hand*). Também foi visto que a TcPRODH doa elétrons à cadeia respiratória ao nível do C-II, sugerindo a sua atividade na geração de ATP (PAES, L.S et al., 2013). O P5C produzido é então reduzido em glutamato pela ação da enzima P5CDH em presença de NAD^+ . O P5C produzido é então reduzido em glutamato pela ação da enzima P5CDH em presença de NAD^+ .

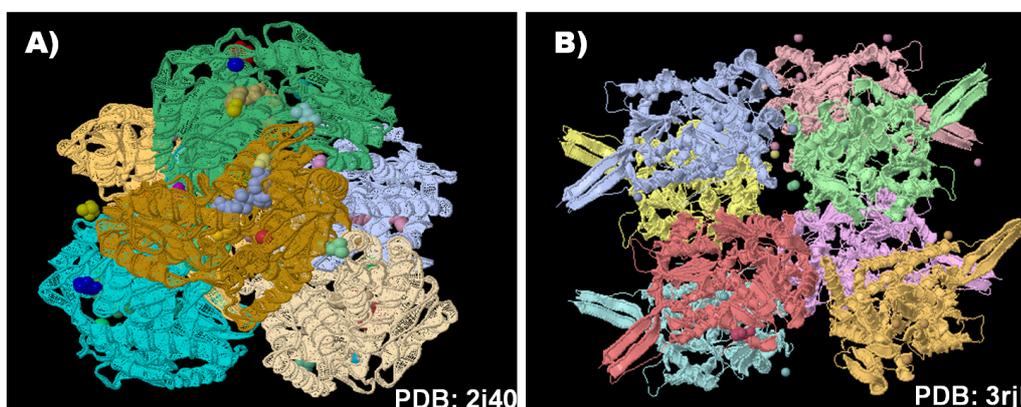
1.3.1 Características das enzimas P5CDHs

A enzima P5CDH pertence à família das aldeído desidrogenases tipo 4 (ALDH4) (ELTHON; STEWART, 1981; FORTE-MCROBBIE; PIETRUSZKO, 1986). A atividade enzimática da P5CDH pode ser reduzida significativamente na presença do succinato semialdeído (FORTE-MCROBBIE; PIETRUSZKO, 1986; SMALL; JONES, 1990), produto intermediário do metabolismo do ácido- γ -aminobutírico (GABA) (CLARK et al., 2009; TABERNER; BARNETT; KERKUT, 1972). Dados do nosso laboratório mostraram que formas epimastigotas do *T. cruzi* são capazes de transportar GABA ao citoplasma da célula, o que foi confirmado pela detecção de GABA com um anticorpo específico contra esse composto (dados sem publicar). A ausência de sequências putativas no genoma do *T. cruzi* que codifiquem uma enzima responsável pelo metabolismo de GABA, poderia sugerir uma eventual participação da TcP5CDH na conversão de succinato semialdeído, produto da transaminação do GABA e α -cetoglutarato, em succinato.

A atividade enzimática para P5CDH tem sido demonstrada em diversas espécies como: *Thermus thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Fasciola gigantica*, *Arabidopsis thaliana*, *Homo sapiens*, entre outras (BRANDRISS, 1983; DEUSCHLE et al., 2001; HU; LIN; VALLE, 1996; INAGAKI et al., 2006; MOHAMED et al., 2008). Estudos com a enzima P5CDH (EC 1.5.1.12) em células de ovário de rato chinês (CHO-*k1*), linhagem auxotrófica para prolina, demonstraram que o P5C é transportado ao interior da célula através de um

mecanismo que contribui com a transferência de potencial oxido-redutor, dada a natureza química deste (MIXSON; PHANG, 1988). De acordo com os dados disponíveis na literatura para a P5CDH de espécies bacterianas foi observado que a P5CDH pode apresentar uma conformação quaternária composta de seis e oito unidades, para *Thermus thermophilus* e *Bacillus liqueniformis*, respectivamente (Esquema 5).

Esquema 5 – Exemplos de estruturas quaternárias para outras enzimas P5CDH



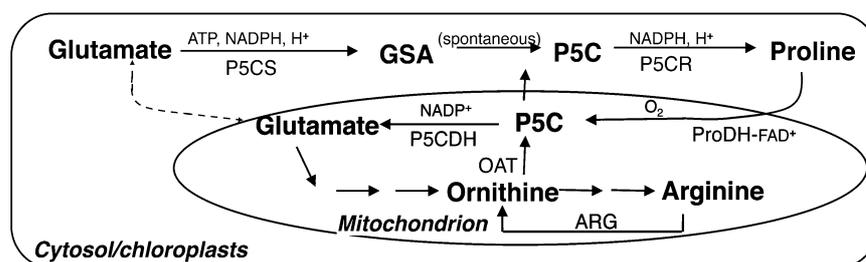
Estruturas quaternárias resolvidas pela técnica de difração por raios-X para as proteínas P5CDH das espécies *T. thermophilus* (A) e *B. liqueniformis*, formando um hexâmero ou um octâmero, respectivamente (B). Os números de acesso indicam-se em cada estrutura. Fonte: (INAGAKI et al., 2006).

1.3.2 O papel fisiológico do P5C

O substrato da enzima P5CDH, o P5C, é um nodo metabólico entre as vias da prolina, ornitina e glutamato (Esquema 6), fazendo dele um composto enlace entre os ciclos de Krebs' e da uréia (ADAMS; FRANK, 1980). P5C e prolina formam um par redox que utilizando FAD/NAD (P)⁺ como co-factores, possuem relevância nas vias metabólicas de oxidorredução. Sugere-se que o P5C pode agir como um acceptor de elétrons importante na regulação do poder redutor ao nível intra e extracelular em plantas (MILLER et al., 2009). Em leveduras mutantes para o gene *PUT2*, o acúmulo de P5C aumenta a produção de EROs demonstrando a toxicidade celular desse metabólito (NOMURA; TAKAGI, 2004). Nesse mesmo sistema foi demonstrado que o P5C pode ser acetilado pela ação de uma enzima acetil-transferase (MPR1) como mecanismo de regulação nos níveis de EROs geradas pelo acúmulo de P5C intracelular (NOMURA; TAKAGI, 2004). Os estudos com plantas demonstraram que o P5C

regula a resposta celular sob condições de estresse osmótico (DEUSCHLE et al., 2001). Recentemente foi visto que tanto os níveis de RNA - mensageiro como a atividade enzimática das enzimas P5C-redutase e PRODH, são aumentados como mecanismo de defesa quando a planta é submetida a condições de estresse oxidativo gerado pelo acúmulo de P5C intracelular (MILLER et al., 2009). Em células humanas foi visto que o metabolismo de prolina possui um papel chave na morte celular programada, sendo a PRODH regulada pela proteína p53 (DONALD et al., 2001). Em outro trabalho utilizando células de pacientes deficientes da enzima P5CDH (doença conhecida como hiper-prolinemia tipo II) observou-se que o acúmulo de P5C pode inibir quimicamente o piridoxal fosfato (Vitamina B6 - PLP) (FARRANT et al., 2001). O PLP é o principal co-factor das enzimas amino-transferases, enzimas previamente reportadas e de grande importância no metabolismo de aminoácidos em *T. cruzi* (MARCIANO et al., 2008; MONTEMARTINI et al., 1993; ZELADA et al., 1996).

Esquema 6 - Esquema compartimentalizado das vias de oxidorredução para o metabolismo de prolina-glutamato segundo o reportado em plantas



Fonte: (MILLER et al., 2009)

1.3.3 Perspectivas terapêuticas do metabolismo de prolina e P5C

Considerando a importância da prolina e seu metabolismo em vários aspectos da biologia do *T. cruzi*, optou-se pela busca de análogos estruturais de prolina que possam ter atividade inibitória sob as enzimas em estudo (TcPRODH e TcP5CDH). A análise do possível efeito tripanocida de um análogo estrutural da L-prolina, o ácido L-tiazolidina-4-Carboxílico (T4C), demonstrou atividade inibitória do crescimento nas formas E mantidas em cultura, assim como na eclosão das formas T na infecção *in vitro* (STOLIC et al., 2009). Foi mostrado que o T4C age como um inibidor competitivo dos transportadores de prolina, diminuindo o estoque de prolina intracelular do parasita, o que afetaria a disponibilidade desse aminoácido

nessas células. Também foi visto que, sob condições de estresse oxidativo, a própria prolina estaria envolvida nos mecanismos de resistência a esse estresse, constituindo seu acúmulo um mecanismo de resistência a esse tipo de desafio (STOLIC et al., 2009). A importância da prolina na biologia do *T. cruzi* e as propriedades bioquímicas demonstradas para o produto da sua oxidação (P5C) geram várias hipóteses que serão abordadas nesta tese. Nesse sentido, optou-se pela busca de compostos cuja atividade inibitória estivesse associada à interferência do metabolismo oxidativo de P5C.

Relatos prévios indicaram que uma droga utilizada normalmente para o tratamento da alcoolemia, o Disulfiram[®] (DSF), inibe a atividade da enzima P5CDH em células derivadas de placenta humana (FARRES; JULIA; PARES, 1988). Recentemente, usando uma combinação de técnicas bioinformáticas, dados da literatura e ensaios *in vitro* com associações de drogas aprovadas pela FDA, foram identificados oito alvos terapêuticos cuja interferência pode resultar em efeitos letais ou inibição do crescimento em formas replicativas de *Leishmania major* (CHAVALI et al., 2012). Dentre os alvos descritos, destaca-se a presença da enzima ALDH2 [1.2.1.3], que também pertence à família das aldeído desidrogenases (tipo II). E entre as drogas utilizadas se destacam as observações com o DSF, que administrado individualmente e, em combinação com outras drogas mostrou um efeito leishmanicida (CHAVALI et al., 2012).

1.3.4 O DSF e o seu papel no metabolismo de aldeídos

O DSF é um inibidor de enzimas que pertencem a família aldeído desidrogenases (HALD, 1948). O efeito inibitório do DSF em humanos está ligado à acumulação de acetaldeído na corrente sanguínea. Especificamente, sabe-se que o DSF inibe as enzimas aldeído desidrogenases do tipo II (ALDH2), presentes no fígado, que catalisam a conversão de acetaldeído em acetato (DEITRICH; ERWIN, 1971). Uma vez que o DSF é ingerido, este é metabolizado no estômago, gerando duas moléculas de dietilditiocarbamato (DDC), as quais podem formar complexos com metais como o cobre e ferro (LIU et al., 2012). A afinidade do DDC pelo cobre tem sido relatada como potencializador do efeito citotóxico (SKROTT; CVEK, 2012). Após a absorção pela mucosa gástrica e distribuição pelo sangue, o DDC é convertido em dietilditiometilcarbamato (Me-DDC). Os produtos de oxidação do Me-DDC são o *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato (Me-DTC) e o *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamoil sulfóxido (MeDTC-SO) que agem como potentes inibidores da isoforma mitocondrial da ALDH1 e da

ALDH2 citosólica, respectivamente (JOHANSSON, 1992; LIPSKY; SHEN; NAYLOR, 2001). O mecanismo de inibição se baseia na formação covalente de um aducto enzimático com resíduos de cisteína presentes no sítio ativo da proteína alvo (JOHANSSON, 1992; LIPSKY et al., 2001). Dentre as diversas aplicações do DSF, o seu efeito anti-proliferativo tem sido relatado em linhagens celulares neoplásicas (LIU et al., 2012), bem como, inibidor da replicação viral de HIV (MCDONNELL et al., 1997), entre outros.

Considerando que: i) prolina é um aminoácido abundante na urina do barbeiro, ii) prolina estimula os processos de diferenciação tanto em formas intracelulares como em aquelas mantidas *in vitro* (meio TAU), iii) prolina é uma fonte geradora de ATP e facilita o processo de invasão celular e iv) prolina é convertida em P5C pela TcPRODH na mitocôndria do parasita, cujos elétrons podem entrar na CTE via C-II; ficava por preencher o passo enzimático seguinte, catalisado pela TcP5CDH. Visto que o seu substrato, de natureza aldeídica, é altamente reativo e que também possui um papel relevante em outros processos fisiológicos, além da conversão em glutamato, partimos para a caracterização da enzima TcP5CDH. Pelo anterior, acreditamos que a interferência nesta rota metabólica, via P5C, pode alterar a homeostase da mitocôndria, o que poderia contribuir a uma melhor compreensão dos mecanismos que o parasita utiliza para garantir a sua sobrevivência.

1.4 Objetivos

Gerais:

- Caracterizar a enzima TcP5CDH do ponto de vista molecular e bioquímico, e, determinar o seu papel funcional ao longo do ciclo de vida do parasita;
- Testar análogos do substrato P5C como inibidores específicos da TcP5CDH e avaliar as possibilidades desta enzima como alvo terapêutico para a infecção pelo *T. cruzi*;

Específicos:

- Clonar e caracterizar o produto gênico para a enzima TcP5CDH;
- Determinar os parâmetros enzimáticos da TcP5CDH;

- Determinar a localização subcelular da enzima TcP5CDH no parasita;
- Determinar os possíveis processos fisiológicos onde a TcP5CDH possa estar envolvida;
- Avaliar o efeito da interferência no metabolismo do P5C em *T. cruzi*;
- Avaliar o papel do metabolismo de prolina, através da enzima TbP5CDH, na espécie africana, *T. brucei*, durante a infecção no seu hospedeiro vetor, a mosca tsé-tsé.

CAPITULO II
MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Análise *in silico*

2.1.1 Análise da sequência primária para a enzima TcP5CDH

Baseados em relatos anteriores sobre a existência de sequências de DNA putativas para a enzima TcP5CDH no genoma do *T. cruzi* (SILBER et al., 2005), foi realizada a busca na base de dados de tripanossomatídeos *TRITRYPDB* (trytripDB.org/tritrypdb/). A identidade entre as sequências de aminoácidos foi comparada mediante o uso da ferramenta *CLUSTALW2* (www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/) (THOMPSON; HIGGINS; GIBSON, 1994). A busca de domínios conservados foi realizada, individualmente, na base de dados *INTERPROSCAN* (www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/). Parâmetros como: composição de aminoácidos, massa molecular e ponto isoelétrico foram preditos mediante a ferramenta *ProtParam* (www.web.expasy.org/protparam/).

2.1.2 Comparação da sequência de aminoácidos com enzimas do tipo P5CDH de outras espécies

A identidade da sequência primária para TcP5CDH com proteínas ortólogas presentes em outras espécies também foi analisada. Assim, utilizou-se a sequência TcP5CDH1 como molde para realizar uma busca por similaridade (BLAST-P) na base de dados para proteínas do *NCBI* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando a matriz *BLOSSUM-45*. As sequências proteicas utilizadas descrevem-se a seguir, indicando o código de acesso, segundo o identificador do gene (do inglês *Geneinfo Identifier: GI*), em parêntese: *Trypanosoma cruzi* cepa CL-Brener (71657117), *Trypanosoma cruzi* cepa Sylvio (407849823), *Trypanosoma cruzi marinkellei* (407410377), *Trypanosoma brucei* (71747036), *Trypanosoma brucei gambiense* (261332327), *Trypanosoma congolense* (342184024), *Leishmania major* strain Friedlin (389592514), *Leishmania mexicana* (401414387), *Leishmania donovani* (398009572), *Leishmania braziliensis* (154331587), *Leishmania infantum* (146075787), *Leishmania amazonensis* (328833761), *Glossina morsitans morsitans* (110611283), *Thermus thermophilus* (55981547), *Escherichia coli* (468874), *Saccharomyces cerevisiae* (151943981), *Candida tenius* (344233451), *Drosophila melanogaster* (20151468), *Sodalis glossinidius* strain *morsitans* (85059221), *Wigglesworthia glossinidia* strain *morsitans* (379009572), *Wolbachia endosymbiont of D. Melanogaster* (42520010473), *Culex quinquefasciatus* (170042990), *Dictyostelium purpureum* (330798920), *Xenopus laevis*

(148228402), *Daphnia pulex* (321479085), *Tribolium castaneum* (91084231), *Ciona intestinalis* (198427016), *Harpegnathos saltator* (307200647), *Mus musculus* (26336725), *Homo sapiens* (25777734), *Macaca mulata* (355557606), *Thellungiella halophila* (312283557), *Zea mays* (293333403), *Arabidopsis thaliana* (18395300), *Branchiostoma floridae* (260812990), *Nematostella vectans* (156382238), *Meleagris gallopavo* (326932468). As sequências foram alinhadas utilizando especificações padrão do programa *MUSCLE* e editadas manualmente. Após isso, foi construída uma árvore filogenética utilizando o método de inferência Bayesiana com 10×10^6 réplicas e sumarização do 75% dos dados, suporte estatístico de probabilidade posterior, matriz de substituição JTT do programa *BEAST* (LEMEY et al., 2010).

2.1.3 Análise de regiões funcionais presentes na enzima TcP5CDH

Para a predição de algumas características funcionais da enzima TcP5CDH foram aplicadas ferramentas bioinformáticas. Para isso, foi utilizada a sequência de aminoácidos correspondente à sequência obtida para TcP5CDH1 (código de acesso na base *UniProt*: Q4DRT8). A busca de sequências putativas para direcionamento mitocondrial realizou-se mediante o uso das ferramentas *SIGNALP 4.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>), *PREDOTAR* (<http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html>) e *TARGETP1.1* (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>). A busca de domínios transmembranais realizou-se mediante o uso das ferramentas *PHOBIUS* (http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web_phobius/) e *TMpred* (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). A predição da estrutura secundária para a TcP5CDH foi realizada mediante a ferramenta *PSIPRED* (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>). A análise de hélices-alfa foi realizada através do programa *heliQuest* (<http://heliquest.ipmc.cnrs.fr/>) (GAUTIER et al., 2008). Os possíveis sítios catalíticos para a TcP5CDH foram identificados a partir da estrutura tridimensional para a proteína de TtP5CDH (código na base de dados do PDB: 2j40) (INAGAKI et al., 2006).

2.2 Microorganismos utilizados e condições de crescimento

2.2.1 *Trypanosoma cruzi*

Este trabalho se realizou com culturas axênicas das principais formas proliferativas e infectivas utilizando como modelo o clone 14 da cepa CL de *T. cruzi* (BRENER; CHIARI, 1963).

2.2.1.1 Epimastigotas

As formas epimastigotas se mantiveram em fase exponencial de crescimento por passagens sucessivas (cada 48 h a 28 °C) em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) que contém: 5 g l⁻¹ de infusão de fígado, 5 g l⁻¹ triptose, 4 g l⁻¹ cloreto de sódio, 0,4 g l⁻¹ de cloreto de potássio, 8 g l⁻¹ de NaH₂PO₄, 2 g l⁻¹ de glicose, 10 g l⁻¹ de hemina dissolvida em 100 mM de NaOH, ajustando o pH final a 7,2 e suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (SFB) (VitrocellTM, Brasil) (CAMARGO, 1964).

2.2.1.2 Tripomastigotas metacíclicos

Para a diferenciação em formas metacíclicas se usaram formas epimastigotas no 3ro dia de crescimento (5 x 10⁸ células). As células foram centrifugadas (10 min a 850 x g), ressuspendas em 25 ml de meio *Grace's* (Gibco[®]) ajustado a pH final 6,0 sem adição de SFB, e incubadas a 28 °C em frascos de vidro estéreis durante nove dias. Após este tempo, as formas tripomastigotas metacíclicas foram purificadas mediante cromatografia de troca iônica utilizando uma coluna de DEAE-celulose (Sigma[®]). Para isso, a resina se equilibrou com tampão fosfato salino modificado (PBSG: 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM NaH₂PO₄, 2 mM KH₂PO₄, 4% de glicose ajustando a pH final 8,0). Os parasitas foram lavados 1 x e ressuspendos em 3 ml de PBSG, como descrito previamente (TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986).

2.2.1.3 Formas intracelulares obtidas pela infecção *in vitro* na linhagem CHO-k₁

Para a obtenção das formas intracelulares de *T. cruzi* foram utilizadas células aderentes da linhagem CHO-k₁. As células CHO-k₁ foram mantidas em meio RPMI-1640 (VitrocellTM) suplementado com 10% SFB (v/v), 0,15% NaHCO₃ (p/v), 100 U ml⁻¹ penicilina, 100 µg ml⁻¹ estreptomicina e incubadas a 37 °C sob atmosfera úmida de 5% de dióxido de carbono

(BOD). Assim, 5×10^5 células ml^{-1} de CHO-k₁ foram incubadas até se aderirem na garrafa de 75 cm² e, posteriormente, estas foram infectadas com formas tripomastigotas mantendo uma proporção de 40:1 (tripomastigotas: célula CHO-k₁). As formas tripomastigotas foram obtidas a partir de estoques armazenados a - 80 °C em solução de congelamento (7% DMSO v/v e 40% SFB v/v em meio RPMI). Os parasitas foram incubados com as células durante 3 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂, lavados 2 x com PBS estéril, seguido da adição de meio RPMI novo suplementado com 10% SFB (v/v). Após 24 h de incubação a 37 °C, as células foram lavadas 2 x com PBS, seguido da adição de meio RPMI novo suplementado com 2% SFB (v/v) e as garrafas foram transferidas a 33 °C sob atmosfera de CO₂.

2.2.1.4 Amastigotas e epimastigotas intracelulares

Após o segundo e quarto dia de infecção sincrônica em CHO-k₁, foram obtidas as formas amastigotas e epimastigota intracelular, respectivamente (TONELLI et al., 2004). Para a liberação das formas intracelulares, as células CHO-k₁ foram desgrudadas da garrafa pelo tratamento (5 min a 37 °C) com 10% tripsina (v/v) e com a ajuda de raspador estéril. Em seguida, foram acrescentados 10 ml de PBS suplementado com 10% SFB (v/v), e, a ruptura das células CHO-k₁ foi feita pela adição de 0,05% de dodecil sulfato de sódio (SDS) (p/v). A suspensão celular foi centrifugada (5 min a 480 x g) e o sobrenadante foi transferido a outro tubo para ser centrifugado novamente (10 min a 4300 x g). O sedimento foi ressuspensão em meio RPMI sem soro para posterior uso.

2.2.1.5 Tripomastigotas metacíclicos derivados de CHO-k₁

As formas tripomastigotas de cultura foram coletadas do sobrenadante de garrafas infectadas após o sexto dia de infecção a 33 °C, tempo em que o parasita tem proliferado intracelularmente e diferenciado até as células CHO-k₁ arrebentarem. Em todos os casos, a densidade celular se determinou através da contagem microscópica em câmara de Neubauer.

2.2.2 *Trypanosoma brucei*

O clone 29.13, da cepa 427, de *T. brucei brucei* foi utilizado para os ensaios de RNA de interferência em formas procíclicas (fpc) (WIRTZ et al., 1999). A cepa 2T1 foi utilizada nos ensaios com formas sanguícolas (fsc) mantidas *in vitro*. Formas fpc da cepa TSW196

MSUS/CI/78/TSW196, clone A, foram utilizadas para a obtenção das fpc derivadas de infecção na mosca *Glossina morsitans morsitans* (PAINDAVOINE et al., 1986).

2.2.2.1 Formas procíclicas

As formas proliferativas, procíclicas, de *T. brucei* foram cultivadas em meio SDM-79 (Gibco®) suplementado com 10% SFB (v/v), 2 g l⁻¹ NaHCO₃, 7,5 mg l⁻¹ de hemina, 25 µg ml⁻¹ higromicina, 15 µg ml⁻¹ G418, ajustado a pH final 7,3. A presença do plasmídeo utilizado para os ensaios de RNAi (pZJM) confere resistência a fleomicina, sendo este adicionado na seleção dos parasitas transfectantes a uma concentração final de 2,5 µg ml⁻¹ (CROSS; KLEIN; LINSTED, 1975). A densidade inicial foi de 2,5 x 10⁶ células ml⁻¹, e as células foram mantidas mediante passagens sucessivas a cada 48 h.

2.2.2.2 Formas sanguícolas

As formas infectivas, sanguícolas, da cepa 2T1, de *T. brucei* foram cultivadas em meio HM19 suplementado com 15% SFB (v/v) a 37 °C sob atmosfera úmida de 5% CO₂. A densidade inicial foi de 5 x 10⁴ células ml⁻¹, sendo o meio trocado a cada 40 h.

2.2.2.3 Formas derivadas da infecção na mosca tsé-tsé

A obtenção das formas do parasita presentes no hospedeiro invertebrado *Glossina morsitans morsitans* foi realizada na colônia de moscas tsé-tsé da (LSTM, Liverpool, UK). Para isso, o repasto sanguíneo foi preparado após dissolver um criotubo contendo aproximadamente 4 x 10⁶ de fsc da cepa TSW196 (derivada da infecção em ratos Wistar com 75% de parasitemia) em 5 ml de sangue desfibrinada de cavalo estéril (*TCS Biosciences Ltd*, Buckingham, UK). As moscas, machos no período *teneral* (que não haviam recebido o seu primeiro repasto sanguíneo), foram alimentadas utilizando membranas de silicone (estéreis) a 37 °C. As moscas foram mantidas a 26 °C em 65 - 70% de umidade relativa. As formas de *T. brucei* presentes no intestino médio (im), proventrículo (pv) e glândulas salivais (gs) foram obtidas mediante a dissecação e posterior visualização microscópica dos indivíduos infectados após 9, 15 e 22 dias, respectivamente. Para o grupo *naïve* (indivíduos que nunca foram expostos à infecção pelo parasita) foi realizado o mesmo número de dissecações que o grupo infectado.

2.2.2.4 Extração de hemolinfa e dosagem de prolina livre

Amostras de hemolinfa a partir de moscas infectadas experimentalmente com formas fsc de *T. brucei* foram coletadas em distintos intervalos de tempo durante o curso da infecção no inseto. Para isso, as patas do inseto foram removidas através de um corte na região anterior, o que permitiu a liberação da hemolinfa. Após isso, as amostras foram imersas em 40 µl de PBS gelado e agitadas vigorosamente. Em seguida, procedeu-se com a verificação da infecção do parasita mediante a dissecação, e, posterior visualização microscópica das formas presentes no intestino médio da mosca. As amostras de hemolinfa, a partir de moscas infectadas foram separadas e o mesmo número de amostras foi coletado a partir de indivíduos naïve. As moscas foram infectadas e alimentadas rotineiramente como descrito no parágrafo anterior. A coleta das amostras foi realizada após três dias da alimentação para permitir a digestão da hemoglobina, o que pode interferir na detecção dos parasitas no trato digestivo. Assim, amostras correspondentes ao tempo zero, 4 horas, 5, 10, 15, 20, 25, 30 e 35 dias após a infecção foram coletadas e armazenadas a - 80 °C para posterior uso. Após concluído o experimento, as amostras foram descongeladas e misturadas com 100 µl de PBS gelado. Os tecidos da mosca foram separados mediante centrifugação (2 min a 600 x g) e o sobrenadante foi então misturado com uma solução a 20% de ácido tricloroacético (TCA) (p/v). As amostras foram incubadas 1 h no gelo e centrifugadas (1 h, 15.000 x g a 4 °C). O sobrenadante resultante (200 µl) foi utilizado no ensaio para a quantificação de prolina livre.

O ensaio para a dosagem de prolina livre foi realizado seguindo o protocolo descrito previamente (BATES, 1973). Para isto, as amostras foram misturadas com 200 µl de ácido acético glacial e 200 µl de solução de ninídrina fresca (0,25 g de ninídrina em 6 ml de ácido acético e 4 ml de H₃PO₄ 6 M). A reação foi realizada sob fervura (1 h a 95 °C) e parada no gelo. O complexo prolina – ninídrina foi separado mediante uma extração com 1 volume de tolueno (agitada 20 s em *vortex*) e a fase aquosa foi transferida a placas de 96 poços para a leitura espectrofotométrica ($\lambda_{520\text{nm}}$). O branco da reação foi uma solução de 200 µl de 10% TCA em PBS. A concentração de prolina foi determinada a partir de uma curva de calibração feita com concentrações pré-estabelecidas de L-prolina (0,5 – 100 µM) dissolvida em PBS. Os valores finais foram determinados considerando o número de moscas utilizadas na extração de hemolinfa (µM prolina por mosca).

2.2.3 *Saccharomyces cerevisiae*

O modelo levedura foi utilizado para estudar a funcionalidade do gene *TcP5CDH*. A disponibilidade de um banco de leveduras mutantes (EUROSCARF, Alemanha), para genes específicos, permite a análise de sequências cuja função não tem sido descrita. Além disso, *S. cerevisiae* é uma espécie de fácil manipulação genética, onde podem ser aplicados diferentes tipos de vetores e o fenótipo dos mutantes pode ser facilmente avaliado em meios de crescimento definidos.

A cepa selvagem S288c, referência nos estudos do genoma de *S. cerevisiae*, foi usada como cepa tipo selvagem e crescida em meio enriquecido para levedura *Yeast Peptone Dextrose* (YPD) que contém: 10 g l⁻¹ extrato de levedura, 20 g l⁻¹ peptona, 20 g l⁻¹ D-glicose (MORTIMER; JOHNSTON, 1986). A deleção do gene *PUT2* (do inglês: *Proline Utilization 2*), o ortólogo correspondente a *TcP5CDH* em *S. cerevisiae*, foi realizada, previamente, pela inserção do gene dominante *Kan4MX*, que confere resistência a geneticina (G418) (BAUDIN et al., 1993), no locus específico para a ORF *PUT2*, presente no cromossoma VII da levedura (BRACHMANN et al., 1998). O anterior resultou na cepa mutante YHR037w (*defeituosa no gene PUT2*), que é derivada geneticamente da linhagem BY4741, sendo este um mutante diploide homocigoto para o gene *PUT2* (ver quadro 1 com a descrição dos genótipos). Apesar da mutação $\Delta PUT2$, a cepa se mantém viável no meio YPD suplementado com 300 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de G418.

Os mutantes derivados da linhagem BY4741 apresentam auxotrofias adicionais que podem ser usadas como marcadores de seleção na análise fenotípica (ver quadro 1). Devido a que a avaliação do fenótipo, para os mutantes $\Delta PUT2$ e a cepa complementada com o gene em estudo, consiste na capacidade exibida pela levedura para crescer num meio definido cuja fonte de nitrogênio é a L-prolina, foi necessário reestabelecer a funcionalidade das auxotrofias para os genes *HIS3* e *LEU2* (detalhes da manipulação de levedura na seção 2.3.1.7). Caso contrário, a adição desses aminoácidos no meio de cultura poderia interferir na avaliação fenotípica para $\Delta PUT2$ (GODARD et al., 2007). Dessa forma, a levedura $\Delta PUT2$ usada como controle terá o genótipo: *HIS3*⁺, *LEU2*⁺ e *URA3*⁺; este último devido à presença do vetor pYES cujo marcador de seleção em levedura é a expressão do gene *URA3*.

O crescimento das leveduras em meio sintético completo (SC) permite a seleção dos transformantes positivos sob a ausência do aminoácido de interesse. O meio SC *URA*⁻ está composto de: 50 mg l⁻¹ fenilalanina, 100 mg l⁻¹ triptofano, 100 mg l⁻¹ glutamato, 100 mg l⁻¹

aspartato, 100 mg l⁻¹ valina, 20 mg l⁻¹ arginina, 20 mg l⁻¹ metionina, 30 mg l⁻¹ tirosina, 30 mg l⁻¹ isoleucina, 30 mg l⁻¹ lisina, 200 mg l⁻¹ treonina, 375 mg l⁻¹ serina, 50 mg l⁻¹ adenina e 0,67% de bases nitrogenadas sem adição de aminoácidos (p/v) (Amresco®), ajustando-o meio a um pH final de 6,0 e suplementado com 1,5% ágar-base (p/v). Após a esterilização, o meio foi suplementado com 2% galactose estéril (p/v), usada como fonte de carbono (LUNDBLAD; STRUHL, 2003). A avaliação da funcionalidade do gene *TcP5CDH* no ensaio de complementação foi feita no meio sintético depletado (SD) contendo: 20 mg l⁻¹ metionina, 0,17% de bases nitrogenadas sem adição de aminoácidos nem sulfato de amônio (p/v), 2% galactose (p/v), e, 10 mM de L-prolina ou 0,5% de uréia (p/v), como as únicas fontes de nitrogênio.

Quadro 1 - Descrição das cepas de levedura, utilizadas neste estudo, com os seus correspondentes genótipos.

<i>Cepa origem</i>	<i>Nome</i>	<i>Plasmídeos inseridos</i>	<i>Genótipo</i>
S288c	WT	nenhum	MAT α ; SUC2; <i>gal2</i> ; <i>mal</i> ; <i>mel</i> ; <i>flo1</i> ; <i>flo8-1</i> ; <i>hap1</i> ; <i>ho</i> ; <i>bio1</i> ;
BY4741	<i>APUT2</i>	nenhum	MAT α ; <i>HIS3</i> Δ 1; <i>LEU2</i> Δ 0; <i>MET15</i> Δ 0; <i>URA3</i> Δ 0; YHR037w:: <i>KANMX4</i>
	controle	pYEp351, pYES- <i>HIS3</i>	MAT α ; <i>MET15</i> Δ 0; YHR037w:: <i>KANMX4</i>
	<i>TcP5CDH</i>	pYEp351, pYES- <i>HIS3</i> , pYES- <i>TcP5CDH</i>	MAT α ; <i>MET15</i> Δ 0; YHR037w:: <i>KANMX4</i> ; <i>TcP5CDH</i>

2.2.4 *Escherichia coli*

Dois tipos de cepas de *E. coli* foram utilizadas no trabalho. A cepa DH5 α TM foi utilizada para os experimentos de clonagem do DNA. Esta cepa apresenta o genótipo: F⁻ ϕ 80lacZ Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*)*UI69 recA1 endA1 hsdR17(rk⁻, mk⁺) phoA supE44 thi⁻¹ gyrA96 relA1 λ ⁻, e é utilizada rotineiramente no ensaio de α -complementação para seleção dos transformantes brancos/azuis ou pela resistência ao antibiótico de seleção. Adicionalmente, a cepa *Bacteriophage lambda Lysogen with bacteriophage 21 immunity*, conhecida como BL21(DE3) (Stratagene®, USA), foi utilizada nos ensaios de expressão da proteína recombinante. Esta cepa apresenta o genótipo: F⁻ *dcm ompT hsdS(r⁻ m⁻) gal λ (DE3)*, e tem a vantagem de ser deficiente nas proteases *lon* e *ompT*, o que evita a proteólise do produto de expressão. Além disso, a cepa BL21(DE3) permite a expressão da RNA*

polimerase T7, codificada no fago λ DE3, sob a regulação do promotor *lacUV5* (STUDIER; MOFFATT, 1986).

A cepa BL21(DE3) apresentou uma modificação adicional. Esta cepa foi transformada com o plasmídeo pGro7 (Takara[®], *Bio Inc.*) que codifica para as proteínas chaperonas *groES* e *groEL*. Este plasmídeo confere resistência a cloranfenicol e contém o promotor *araB* que regula a expressão dessas chaperonas. Este promotor é ativado pela adição de L-arabinose ao meio de cultura. A cepa BL21(DE3) pGro7 foi gentilmente cedida pela Prof. Dra. Cristina Nowicki (Universidad de Buenos Aires).

As cepas bacterianas utilizadas foram crescidas em meio base *Luria Bertani* (LB) composto de: 10 g l⁻¹ triptona, 10 g l⁻¹ NaCl, 5 g l⁻¹ extrato de levedura, suplementado com 2% ágar-base (p/v) para o meio sólido. Quando necessário foram adicionados os antibióticos correspondentes a concentrações finais de: 100 μ g ml⁻¹ ampicilina (LB-A), 30 μ g ml⁻¹ canamicina (LB-K), ou 20 μ g ml⁻¹ de cloranfenicol (LB-K+C). As bactérias foram crescidas a 37 °C e 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.

2.3 Manipulação do DNA

2.3.1 Clonagem da ORF *TcP5CDH*

2.3.1.1 Extração de DNA genômico do *T. cruzi*

A clonagem dos fragmentos de interesse foi realizada utilizando DNA genômico purificado a partir de formas epimastigotas. Os parasitas (5×10^7 células ml⁻¹) foram lavados duas vezes com PBS gelado mediante centrifugação (10 min, 5.000 x g a 4 °C). O precipitado celular foi ressuspenso em 200 μ l de tampão de lise TES (200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS p/v, ajustado a pH final 8,0) acrescentado com 200 μ g ml⁻¹ de Proteinase-K (QUIAGEN[®], Alemanha) e incubado a 56 °C durante 40 min. Após desse tempo, a amostra foi tratada com 25 μ g ml⁻¹ de RNase A (Fermentas[®], Lituania) e incubado por 1 h a 37 °C. O DNA foi extraído da amostra mediante a adição de 1 volume de solução de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico (25:24:1 v/v) e misturado por inversão. A separação do DNA foi realizada mediante centrifugação (5 min, 12.000 x g a 4 °C). O sobrenadante, fase aquosa contendo o DNA, foi acrescentado com 1 volume de clorofórmio misturando por

inversão e centrifugado novamente. O sobrenadante foi transferido a um tubo novo e o DNA foi precipitado pela adição de 1/10 volumes de 3 M acetato de sódio, pH 5,2, e 3 volumes de EtOH absoluto. O DNA foi precipitado por centrifugação (15 min, 12.000 x g), seguido de uma lavagem com 70% EtOH(v/v). O precipitado foi secado a temperatura ambiente e o DNA ressuspenso em 100 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 1 mM EDTA).

2.3.1.2 Verificação da integridade do DNA

O DNA foi analisado mediante a densidade ótica (DO) obtida a 260 e 280_{nm}. Segundo o descrito por (SAMBROOK, 2001), considera-se que 1 unidade de absorvância (UA) a DO_{260 nm} corresponde a 50 µg ml⁻¹ de DNA. O valor a DO_{280 nm} corresponde à absorvância de proteínas contaminantes na amostra. Portanto, a razão de absorvância, entre as leituras a 260/280 nm, é um indicativo da pureza do DNA. A amostra foi considerada pura quando este valor encontrava-se entre 1,8 - 2,0. As leituras foram realizadas com o espectrofotômetro *NanoDrop2000/2000c, software* versão 1.4.2 (Thermo, Scientific), utilizando tampão TE como amostra de referência.

Para a verificação do tamanho e integridade dos fragmentos de DNA, as amostras foram resolvidas sob eletroforese em gel de agarose. Para isto, o gel foi preparado em concentrações de agarose que variam entre 0,8 – 2% (p/v) dissolvidas em tampão Tris-Acetato-EDTA 1x (TAE: 40 mM Tris, 1 mM EDTA, ajustando a pH final 8,0 com ácido acético), acrescentado com 0,5 µg ml⁻¹ brometo de etídeo. O tamanho do poro no gel diminui quando a concentração de agarose é aumentada, portanto, a separação de moléculas de DNA cujo tamanho era ≥ 5 Kb foi realizada em géis ao 0,8%, enquanto que moléculas entre 100 – 600 pb foram separadas em géis ao 2% (p/v). As amostras de DNA foram diluídas em tampão de amostra 6 x (0,25% de azul de bromofenol p/v, 0,25% xileno cianol p/v e 20% glicerol v/v) e aplicadas no gel. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 1Kb *DNA Plus ladder* (Fermentas[®], Lituania). A corrida eletroforética foi realizada aplicando uma voltagem de 115 V e os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultravioleta utilizando um transiluminador *Benchtop UV transiluminator* (UVP).

2.3.1.3 Amplificação do DNA e clonagem no vetor tipo-T

A amplificação do fragmento de DNA *TcP5CDH1* foi realizada mediante a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR) utilizando, inicialmente, os oligonucleotídeos Tc1 (quadro 2). Para isso, foram preparadas reações contendo: 30 ng de DNA genômico da cepa CL-14 de *T. cruzi*, 1X de tampão para *Taq* Polimerase sem $MgCl_2$ (Fermentas[®], Lituania), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 μM de dNTPs, 20 pmoles de cada oligonucleotídeo (Tc1), 1 U de *Taq* DNA Polimerase (Fermentas[®], Lituania) e H_2O mili-Q qsp 25 μl . Como controle negativo foi usado água ao invés de DNA na amostra. As condições de amplificação foram: 1) desnaturação inicial a 95 °C por 3 min, seguido por 35 ciclos de 2) desnaturação a 95 °C por 30 s, 3) anelamento a 60 °C por 30 s, 4) amplificação a 72 °C por 90 s e 5) extensão final a 72 °C por 10 min.

O fragmento de interesse foi purificado do gel de agarose utilizando o *kit* comercial *QIAquick DNA gel extraction* (QUIAGEN[®], Alemanha) e, posteriormente, quantificado segundo a razão de absorção a 260/280 nm. Após disso, 84 ng do produto *TcP5CDH* purificado foram ligados em 50 ng do vetor pGEM T-Easy (razão molar 3:1, de inserto: vetor) utilizando 1 U de T4 DNA ligase (Promega[®], USA) e 1X do tampão ligase, seguindo indicações do fabricante.

2.3.1.4 Preparação de bactérias quimiocompetentes

A clonagem dos fragmentos de DNA foi realizada em bactérias quimiocompetentes da cepa DH5 α de *E. coli*. Para as células se tornarem competentes foi utilizado o método de cloreto de cálcio (SAMBROOK, 2001). Assim, uma colônia bacteriana foi transferida a meio LB líquido e crescida durante 16 h a 37 °C sob agitação constante a 200 r.p.m. O pré- inóculo obtido foi diluído 1:100 em meio LB líquido e incubado até atingir uma $DO_{600nm} = 0,5$ UA. Nesse ponto, as células foram transferidas a tubos plásticos estéreis e incubadas 10 min no gelo. As células foram coletadas por centrifugação (1770 x g por 5min) e o sobrenadante descartado. O precipitado foi ressuscitado com 50 ml de 100 mM $CaCl_2$ gelado, e as células foram incubadas no gelo por 30 min. Este passo foi repetido por mais uma vez. O precipitado resultante foi ressuscitado em 3 ml de 100 mM $CaCl_2$ gelado acrescentado de 140 μl de DMSO e incubado no gelo por 15 min. As células foram distribuídas em alíquotas de 200 μl em tubos de 1,5 ml estéreis, congeladas utilizando nitrogênio líquido e armazenadas a -70 °C.

2.3.1.5 Transformação de bactérias quimiocompetentes

As alíquotas de células competentes armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ foram descongeladas no gelo e misturadas com $5\text{ }\mu\text{l}$ do produto de ligação ou 50 ng de DNA plasmidial. A suspensão celular foi incubada por 20 min no gelo e, posteriormente, procedeu-se com a inserção do DNA através do choque térmico (75 s a $42\text{ }^{\circ}\text{C}$). Em seguida, as células foram incubadas, novamente, durante 5 min no gelo. Após isso, as células foram recuperadas pela adição de $900\text{ }\mu\text{l}$ de meio SOC (2% triptone p/v, 0,5% extrato de levedura p/v, 10 mM NaCl , $2,5\text{ mM KCl}$, 10 mM MgCl_2 , $10\text{ mM MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ e 20 mM de glicose) e incubadas durante 50 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sob agitação constante (200 r.p.m.). As células foram centrifugadas (5 min a 3000 x g) e o precipitado foi ressuspensão em $100\text{ }\mu\text{l}$ de meio LB fresco. Para o isolamento dos transformantes, as células foram plaqueadas no correspondente meio sólido durante 16 h a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$.

No caso da transformação com a construção pGEM-*TcP5CDH*, as placas de meio LB-A sólido foram suplementadas com $20\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ do substrato cromógeno 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosídeo (*x-gal*) e 1 mM de isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) para a realização do teste de brancas e azuis. As colônias que não possuem o inserto no sítio T do gene *lacZ*, expressarão funcionalmente a enzima β -galactosidase devido ao fenômeno de alfa-complementação do gene *lacZ*. A expressão de *lacZ* é controlada pelo operon *lac*, sendo induzida pela adição de IPTG ao meio de cultura. A atividade β -galactosidase pode ser verificada pela degradação do substrato *x-gal* cujo produto formado é insolúvel no meio e apresenta uma coração azul. Assim, as colônias brancas, cujo inserto interrompe o gene *lacZ*, serão consideradas como positivas e serão usadas para a verificação da presença do vetor (SAMBROOK, 2001).

2.3.1.6 Extração de DNA plasmidial

O DNA dos clones bacterianos selecionados foi extraído pelo método de lise alcalina. A extração a pequena escala foi feita a partir de uma colônia crescida em 3 ml de meio LB líquido suplementado com o antibiótico de seleção em bactéria. As células foram coletadas por centrifugação (20 s a 14.100 x g), ressuspensas em $100\text{ }\mu\text{l}$ da solução GTE (25 mM Tris-HCl , 50 mM glicose, 10 mM EDTA , ajustada a pH final $8,0$, acrescentada com $100\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ RNase-A) e incubadas por 5 min a temperatura ambiente. Em seguida, foram acrescentados

200 µl da solução NaOH/SDS (200 mM NaOH, 1% SDS p/v), misturada por inversão e incubada durante 5 min no gelo. A reação foi equilibrada pela adição de 150 µl de solução de acetato de potássio (5 M acetato de potássio, pH 4,8), misturada vigorosamente e incubada por 5 min no gelo. Os ácidos nucléicos foram separados por centrifugação (3 min a 14.100 x g) e o sobrenadante transferido a um tubo novo. O DNA foi precipitado pela adição de 800 µl de 95% EtOH (v/v) e incubado durante 2 min a temperatura ambiente. A amostra foi centrifugada, o precipitado foi lavado com 1 ml de 70% EtOH (v/v) e centrifugado, novamente, como no passo anterior. O precipitado foi secado a temperatura ambiente e o DNA dissolvido em 30 µl de H₂O mili-Q estéril. A integridade do DNA foi analisada como descrito na seção 2.3.1.2.

2.3.1.7 Transformação de leveduras

A inserção do DNA plasmidial, utilizado na transformação das leveduras anteriormente mencionadas, foi realizada seguindo o descrito previamente (GIETZ; SCHIESTL, 2007). A partir de uma colônia de levedura isolada em meio YPD-G418 sólido, esta foi transferida a 3 ml de meio líquido e incubada durante 16 h a 30 °C sob constante agitação (200 r.p.m). A densidade celular foi determinada pela DO_{600 nm}, onde 0,1 UA correspondem a 1 x 10⁶ células ml⁻¹, sendo então transferidas 2,5 x 10⁸ células a 50 ml de meio líquido 2X-YPD-G418 e incubadas a 30 °C até atingirem uma densidade celular de 2 x 10⁷ células ml⁻¹ (aprox. 4 h). Em paralelo, um estoque 2 mg ml⁻¹ de esperma de salmão desnaturada (5 min a 95 °C) foi descongelada para ser usada como carregador do DNA (SScDNA). As células foram coletadas por centrifugação (5 min, 3.000 x g a 4 °C), o precipitado foi lavado com 25 ml de H₂O mili-Q estéril e centrifugado novamente. Este passo foi repetido mais uma vez, sendo o precipitado ressuspensão em 1 ml de H₂O mili-Q e transferido a um tubo de 1,5 ml estéril. As células foram distribuídas em alíquotas de 100 µl dependendo do número de transformações. As células foram centrifugadas (30 s, 13.000 x g) e a água foi removida com a micropipeta. Após isso, as células foram ressuspensas na mistura de transformação (240 µl 50% PEG 3350 v/v, 36 µl acetato de lítio 1 M, 50 µl SScDNA, 34 µl do DNA plasmidial dissolvido em H₂O mili-Q estéril), misturadas vigorosamente e incubadas por 40 min a 42 °C. Após esse tempo, as células foram centrifugadas (30 s, 13.000 x g) e o precipitado foi ressuspensão em 100 µl de H₂O mili-Q estéril para serem plaqueadas nos correspondentes meios sólidos.

Primeiramente, a cepa $\Delta PUT2$ foi transformada com o plasmídeo pYEp351, que restaura a auxotrofia para leucina. Os transformantes $LEU2^+$ foram selecionados em meio $SC^{leu^- ura^+}$. A levedura resultante $\Delta PUT2 LEU2^+$ foi então transformada com a construção pYES-*HIS3* que restaura a auxotrofia a histidina, e cuja seleção foi feita no meio $SC^{leu^- ura^+ his^-}$. A cepa resultante $\Delta PUT2 LEU2^+ HIS3^+$, aqui chamada ‘controle’ (quadro 1) foi usada na transformação seguinte com a construção pYES-*TcP5CDH*, e a seleção foi feita no meio $SC^{leu^- ura^- his^- prol^+}$. Em todos os casos foi seguido o mesmo protocolo de transformação. As placas foram incubadas a 30 °C até a aparição dos transformantes.

2.3.1.8 Extração de DNA plasmidial de levedura

As leveduras foram crescidas em 25 ml de meio YPD-G418 durante 24 h a 30 °C. As células foram coletadas por centrifugação (10 min, 3.000 x g a 4 °C) e ressuspensas em 10 ml de H₂O mili-Q. Após uma nova centrifugação, as células foram ressuspensas em 3 ml de tampão SED (0,9 M sorbitol, 0,1 M EDTA, 50 mM DTT, ajustado a pH final 7,5). A enzima zimolase (0,25 mg zimolase em 200 µl de 0,9 M sorbitol) foi adicionada às células, e a mistura incubada durante 1 h a 37 °C sob constante agitação. A confirmação da formação de esferoplastos foi verificada mediante a visualização microscópica, considerando entre 80-90% das células que apresentavam uma cor escura. Os esferoplastos foram centrifugados (10 min, 3.000 x g a 4 °C) e o sobrenadante foi descartado cuidadosamente. O precipitado foi ressuspenso em 3 ml de 50 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, pH 8,0 mediante pipetagens sucessivas. Uma solução de 1% SDS (p/v) foi adicionada e deixou-se incubando a 65 °C por 30 min. A mistura foi neutralizada pela adição de 5 M de acetato de potássio, incubados por 60 min no gelo, e centrifugados (15.000 x g, 30 min a 4 °C). O sobrenadante foi misturado com 4 ml de EtOH absoluto e os ácidos nucléicos foram precipitados por centrifugação (10.000 x g, 10 min a 4 °C). O precipitado foi lavado com 70% EtOH (v/v) e centrifugado novamente. O precipitado foi secado, ressuspenso em 300 µl de TE e incubado 10 min a 42 °C para favorecer a solubilização. O RNA foi removido da amostra, pelo tratamento com *DNase-free RNase A* (Fermentas[®], Lituania), e incubada 30 min a 37 °C. Uma extração adicional com fenol/clorofórmio (1:1), misturada por inversão e centrifugada (15.000 x g, 10 min), foi realizada. O DNA foi precipitado pela adição de 15 µl de 3 M acetato de sódio e 900 µl de isopropanol. Uma lavagem com 70% EtOH (v/v) foi realizada e o precipitado foi secado a temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 100 µl de tampão TE, pH 7,5.

O DNA obtido foi utilizado para a transformação de bactérias DH5 α crescidas em LB-A. O DNA plasmidial resultante dos transformantes bacterianos foi utilizado para posterior análise por sequenciamento.

2.3.2 Sequenciamento do DNA

A identificação e confirmação dos fragmentos de DNA foi realizada mediante o método de terminação da cadeia descrito previamente (SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977). Para isto 100 ng de DNA plasmidial foram misturados com 0,75 μ l do reagente *Big Dye*[®] *Terminator v3.1* (Applied Biosystems[®]), 1,25 μ l do tampão *Save Money* (200 mM Tris-HCl, pH 9,0, 5 mM MgCl₂), 5 pmoles dos oligonucleotídeos universais (M13f/M13r/T7f/T7r), ou oligonucleotídeos específicos (ver quadro 2), e H₂O mili-Q qsp 10 μ l. As condições de amplificação foram: 1) desnaturação inicial a 96 °C por 1 min, seguida de 30 ciclos de 2) desnaturação a 96 °C por 15 s, 3) anelamento a 50 °C por 15 s e 4) amplificação a 60 °C por 4 min.

As amostras de DNA foram precipitadas pela adição de 90 μ l de 66% isopropanol (v/v), homogeneizadas cuidadosamente, incubadas a temperatura ambiente por 15 min e centrifugadas (20 min, 15.300 x g). O sobrenadante foi descartado com a micropipeta e 150 μ l de 75% isopropanol (v/v) foram adicionados em cada amostra. As amostras foram homogeneizadas e centrifugadas (10 min a 15.300 x g). O sobrenadante foi descartado, e o DNA precipitado foi secado a temperatura ambiente protegido da luz. O DNA foi armazenado a -20°C para posterior uso. As amostras foram ressuspensas em 10 μ l de formamida (*Applied Biosystems, Inc. USA*), desnaturadas durante 3 min a 95 °C e incubadas 2 min no gelo. Após isso, as amostras foram submetidas ao sequenciador automático *ABI PRISM*[®] *3100 Gene analyzer* (*Applied Biosystems, Inc. USA*) operado através do programa *ABI Prism 3100 Data collection v1.1*. As sequências obtidas foram comparadas contra as bases de dados disponíveis para DNA de tripanossomatídeos mediante a busca por similaridade (BLASTN) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). O alinhamento e edição das sequências foi realizado mediante as ferramentas disponíveis do pacote *DNASTar*TM v4.0 para *Windows*.

Quadro 2 - Sequências de oligonucleotídeos utilizados neste trabalho.

<i>Oligonucleotídeo</i>	<i>Sequência 5' – 3'</i>	<i>Descrição</i>
Tc1-S <i>Bam</i> HI	GGATCCATGTTACGTCGCACACTGC	Clonagem da <i>ORF TcP5CDH</i>
Tc1-AS <i>Xho</i> I	CTCGAGCTAAACAAACAGGCGGTC	Clonagem da <i>ORF TcP5CDH</i>
Tc2-AS <i>Xho</i> I	CTCGAGAACAAACAGGCGGTC	Clonagem da <i>ORF TcP5CDH (stop-)</i>
Tc3-S	ATGCTTGGTGTGCACGAACA	Fragmento de <i>TcP5CDH</i> para <i>qRT-PCR</i>
Tc3-AS	CATCGATAACGGCGCACATA	Fragmento de <i>TcP5CDH</i> para <i>qRT-PCR</i>
Tcgapdh-S	GTGGCAGCACCGGTAACG	Gene normalizador <i>qRT-PCR</i>
Tcgapdh-AS	CAGGTCTTTCTTTTTCGGAATAGG	Gene normalizador <i>qRT-PCR</i>
Tbp5cdh5'-S <i>Xho</i> I	CTCGAGATGCTTCGCCGTACGTTGC	Fragmento de DNA para ensaios de RNAi
Tbp5cdh5'-AS <i>Hind</i> III	AAGCTTCACCGAAAATCGAAGGAAGTCGC	Fragmento de DNA para ensaios de RNAi
M13-S	GTAAAACGACGGCCAGT	Sequenciamento de DNA (pGEM T-Easy)
M13-AS	AACAGCTATGACCATG	Sequenciamento de DNA (pGEM T-Easy)
T7-S	TAATACGACTCACTATAGGG	Sequenciamento de DNA (pYES / pZJM / pTEX)
T7-AS	GCTAGTTATTGCTCAGCGG	Sequenciamento de DNA (pET24a)
P5C-int	CGAAGTGCGCTACACTTC	Sequenciamento de <i>TcP5CDH</i>
P5C-5'	GACAATGTTATTTCGCCGCAC	Sequenciamento de <i>TcP5CDH</i>
intGAPDH	GCCCTACCCACAACAACACTACTC	PCR confirmatório em pTEX-TcP5CDH

Os sítios de restrição indicam-se sublinhados. S: oligonucleotídeo *sense*, AS: oligonucleotídeo *antisense*. *Stop-*: corresponde ao oligonucleotídeo cuja trinca de bases de parada foi removida. *qRT-PCR*: análise por PCR em tempo real quantitativa.

2.3.3 Sub-clonagem da *ORF TcP5CDH* em vetores específicos

2.3.3.1 Construção pYES-TcP5CDH

O fragmento *TcP5CDH* (1686 pb) foi inserido nos sítios de restrição *Bam*HI e *Xho*I do vetor pYES2 (InvitrogenTM, USA). Para isto, 3 µg da construção pGEM-*TcP5CDH* foram digeridos com 3 U das endonucleases *Fast Bam*HI e *Xho*I (Fermentas[®], Lituania) durante 15 min a 37 °C e inativada por desnaturação térmica (10 min a 65 °C). Do mesmo modo, 3 µg do vetor pYES2 vazio (InvitrogenTM, USA) foram linearizados com 3 U das enzimas *Fast digest Bam*HI e *Xho*I (Fermentas[®], Lituania). Os fragmentos foram resolvidos em gel de agarose e purificados como descrito na seção 2.3.1.3. Para a reação de ligação foram utilizados 71 ng do inserto *TcP5CDH* digerido, 50 ng do vetor pYES2 linearizado (razão molar 5:1 de inserto: vetor), 1 µl da enzima *T4 DNA ligase* (Fermentas[®], Lituania), 1X de tampão ligase (Fermentas[®], Lituania) e H₂O qsp 10 µl. A reação de ligação foi incubada durante 16 h a 4 °C. A transformação bacteriana foi realizada na cepa DH5α meio LB-A para a seleção dos clones. Cinco clones, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para a análise do DNA mediante

digestão com endonucleases de restrição e sequenciamento com T7-S. Um clone positivo foi utilizado nos ensaios de complementação funcional em levedura.

2.3.3.2 Construção pYES-HIS3

O fragmento de DNA *HIS3* foi liberado do plasmídeo pMA 210 mediante o corte com a enzima de restrição *Bam*HI e inserido no sítio correspondente do vetor pYES. Cinco µg do plasmídeo pYES (vazio) foram digeridos com 5 U da enzima *Bam*HI durante 30 min a 37 °C. A reação foi inativada por denaturação térmica (10 min a 65°C) e o DNA foi purificado do gel de agarose. O vetor digerido foi tratado com 0,1 U de *Calf Intestinal Alkaline Phosphatase* (CIAP) (Fermentas[®], Lituania), 5 µl de 1X tampão CIAP e H₂O qsp 50 µl. O DNA foi separado mediante uma extração com fenol/clorofórmio e precipitado com AcNa/EtOH, como descrito na seção 2.3.1.1. Para a reação de ligação, 20 ng do vetor pYES linearizado e tratado com CIAP, foram misturados com 45 ng do fragmento *HIS3* digerido com *Bam*HI, 1 U de T4 *DNA ligase* e 1X de tampão ligase (Fermentas[®], Lituania), e incubados 16 h a 4 °C. A transformação bacteriana foi realizada e analisada como descrito no anterior parágrafo.

2.3.3.3 Construção pET24-TcP5CDH

Para a expressão da proteína recombinante TcP5CDH em bactéria, o fragmento de DNA *TcP5CDH* (1686 pb) foi inserido nos sítios de restrição *Bam*HI e *Xho*I do vetor pET24 a(+) (Novagen[®], USA). Também, foi necessária a remoção da trinca de bases para o códon de parada presente no oligonucleotídeo reverso Tc2-AS (quadro 2). Essa modificação permite a fusão da etiqueta de seis histidinas no extremo carboxila-terminal da TcP5CDH. A digestão do inserto foi realizada com 0,4 µg do produto de PCR *TcP5CDH* (*stop*⁻) com 1U de *Bam*HI e *Xho*I, resolvido em gel de agarose, purificado e ligado nos correspondentes sítios de restrição do plasmídeo pET24a(+). A reação de ligação foi realizada utilizando 25 ng do vetor pET24a(+) e 94 ng do inserto *TcP5CDH* (*stop*⁻) (razão molar 6:1), como descrito anteriormente.

A transformação bacteriana foi realizada na cepa DH5α em meio LB-K para a seleção dos clones. Cinco clones, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para a análise do DNA mediante digestão com endonucleases de restrição e sequenciamento com os oligonucleotídeos T7-S/T7-AS/P5C-3'/P5C-int. Após a identificação do fragmento *TcP5CDH*

(*stop*⁻), e, verificação da presença e orientação, *in frame*, da etiqueta de histidinas fundido à enzima TcP5CDH, procedeu-se com a transformação na cepa para expressão proteica. Para isto, 20 ng de DNA plasmidial foram inseridos em células quimiocompetentes da cepa BL21 (DE3) pGro7 mediante choque térmico. A seleção dos transformantes foi feita em meio LB-K+C e armazenados a -80 °C para posterior uso.

2.3.3.4 Construção pTEX-TcP5CDH

Para a expressão de uma cópia ectópica da ORF *TcP5CDH* no *T. cruzi* foi utilizado o plasmídeo pTEX (KELLY et al., 1992). Para isto, o fragmento de DNA *TcP5CDH* foi liberado da construção pYES-*TcP5CDH* com as enzimas *Bam*HI e *Xho*I e ligado nos mesmos sítios de restrição do vetor pTEX, utilizando uma razão molar de 6:1. A transformação bacteriana foi realizada na cepa DH5 α em meio LB-A para a seleção dos clones. Cinco clones, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para a análise do DNA mediante digestão com endonucleases de restrição e sequenciamento com o oligonucleotídeo T7-S. O clone positivo pTEX-*TcP5CDH* foi crescido em 150 ml de meio LB-A para a extração do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina em maior escala (maxiprep), seguindo indicações do fabricante *Invisorb* (Invitex[®], Alemanha) *Plasmid Maxi kit*.

2.3.3.5 Construção pZJM-Tb5'P5CDH

Para ensaios de interferência no RNA foi utilizado o vetor pZJM. Este vetor apresenta duas regiões promotoras do tipo T7, com orientações opostas, em ambas extremidades do fragmento de interesse. Assim, uma dupla fita de RNA será transcrita, sob a indução de tetraciclina no meio, a partir do fragmento clonado no pZJM. O RNA de dupla fita será utilizado como substrato pela maquinaria de degradação do RNA e, portanto, o gene de interesse será silenciado ao nível transcricional (WANG et al., 2000). Um fragmento de 480 pb correspondente à região 5' da ORF *TbP5CDH* (número no TritypDB: Tb10.70.4280) foi amplificado por PCR utilizando DNA genômico de formas procíclicas da cepa 427-29.13 e clonado no vetor pGEM T Easy. O fragmento foi liberado do vetor mediante o corte com as endonucleases *Xho*I e *Hind*III, para posteriormente, ser ligado nos mesmos sítios do vetor pZJM. A digestão do vetor pZJM com *Xho*I e *Hind*III remove o fragmento da alfa-tubulina (aprox. 700 pb), permitindo a inserção do fragmento *Tb5'P5CDH*. A transformação

bacteriana foi realizada na cepa DH5 α em meio LB-A para a seleção dos clones. Cinco clones, selecionados aleatoriamente, foram utilizados para a análise do DNA mediante digestão com endonucleases de restrição e sequenciamento com o oligonucleotídeo T7-S. O clone positivo pZJM-Tb5'P5CDH foi crescido em 150 ml de meio LB-A para a extração do DNA plasmidial pelo método de lise alcalina em maior escala, utilizando o *Plasmid Maxi kit* (maxiprep), seguindo indicações do fabricante *Invisorb*[®] (Invitex, Alemanha).

Quadro 3 - Descrição de plasmídeos utilizados no trabalho.

<i>Vetor</i>	<i>Descrição</i>	<i>Origem</i>
pGEM T-Easy	Plasmídeo do tipo 'T' usado para clonagem de produtos de PCR	Promega [®]
Pyes	Plasmídeo usado para ensaios de complementação funcional em leveduras mutantes	Invitrogen [®]
pYEp351	Plasmídeo usado para complementação da auxotrofia <i>LEU2</i> própria da linhagem BY4741 de levedura	(HILL et al., 1986)
pMA210	Plasmídeo usado para complementação da auxotrofia <i>HIS3</i> própria da linhagem BY4741 de levedura	(MA; PTASHNE, 1987)
pET-24a(+)	Plasmídeo usado para expressão de TcP5CDH-6xHis em <i>E. coli</i>	Novagen [®]
pTEX	Plasmídeo usado para expressão de uma cópia ectópica de <i>TcP5CDH</i> no <i>T. cruzi</i>	(KELLY et al., 1992)
pZJM	Plasmídeo usado para indução de RNA dupla fita nos ensaios de RNA de interferência no <i>T. brucei</i>	(WANG et al., 2000)

Tipo 'T': contém duas extremidades coesivas com uma timidina livre que permite a complementaridade com a 'A' do fragmento de PCR

2.4 Manipulação de RNA

2.4.1 Extração de RNA de tripanossomas

Amostras de RNA total a partir das distintas formas do ciclo de vida do *T. cruzi* e *T. brucei* foram extraídas. Para isto, 50 x 10⁶ parasitas por tubo foram coletados por centrifugação (10 min, 1850 x g a 4 °C), lavados duas vezes com PBS gelado, que foi preparado em H₂O mili-Q tratada com 0,1% dietilpirocabonato (H₂O-DEPC) (v/v). Este último age como inibidor de enzimas do tipo RNase. Como grupo controle foi necessário extrair RNA a partir de células da linhagem CHO-k₁. Neste caso, foram apenas utilizadas 3 x 10⁵ células. Após as lavagens, as amostras celulares foram ressuspensas em 1 ml do reagente TRIzol (Invitrogen[™], USA), homogeneizadas vigorosamente (no *vortex*) e incubadas durante 5 min a temperatura ambiente. Após a dissociação dos complexos de nucleoproteínas, a solução foi centrifugada (15 min, 12000 x g a 4 °C), sendo a fase aquosa

transferida a um novo tubo para realizar uma lavagem com 200 µl de clorofórmio (por ml de TRIzol usado) sob agitação vigorosa por 15 s e posterior incubação a temperatura ambiente. A mistura se separa em três fases: inferior orgânica (avermelhada contendo o fenol), interfase e superior aquosa (mais clara). A fase aquosa, contendo os ácidos nucleicos, foi cuidadosamente transferida para um tubo novo e o RNA total foi precipitado com isopropanol (500 µl de isopropanol gelado por ml de TRIzol usado). Após a adição de isopropanol, a amostra é centrifugada (10 min, 12.000 x g a 4 °C), e o precipitado lavado com 75% EtOH em H₂O-DEPC (v/v). O precipitado foi secado a 37 °C durante 10 min, e o RNA total foi ressuspenso em 30 µl de H₂O-DEPC.

Após a obtenção do RNA, este foi tratado com 5 U da enzima DNase (Fermentas[®], Lituania), 1 x de tampão para DNase e incubado por 40 min a 37 °C. A reação foi inativada por desnaturação térmica na presença de 1 mM EDTA (10 min a 65 °C); para eliminar restos de DNA contaminantes em cada amostra. No entanto, isto foi ainda verificado mediante a realização de uma PCR convencional utilizando amostras de RNA, após o tratamento com DNase. Caso haja DNA contaminante na amostra, estas são submetidas a um tratamento adicional com DNase.

O RNA final foi analisado mediante leitura espectrofotométrica e a DO_{260/280 nm} foi registrada. Segundo o descrito por Sambrook (SAMBROOK, 2001) considera-se que 1 unidade de absorvância (UA) a DO_{260nm} corresponde a 40 µg ml⁻¹ de RNA. A qualidade do RNA é analisada com base na relação da absorvância DO_{260nm} DO_{320nm}, assim como na visualização do RNA após eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) usando tampão TAE livre de RNase.

2.4.2 *Extração de RNA de leveduras*

Para o isolamento de RNA total nas cepas de *S. cerevisiae* é necessário de um tratamento prévio que facilite a ruptura das células. As células de levedura apresentam uma parede celular rica em polissacarídeos, principalmente, composta de β-1,3 glicano (MANNERS et al., 1973). Dessa forma, as leveduras foram coletadas por centrifugação (5min, 5000 x g), lavadas uma vez com 1 ml de H₂O-DEPC e ressuspenso no volume residual de água. A ruptura foi realizada mecanicamente, utilizando nitrogênio líquido, e macerando vigorosamente em almofariz de porcelana estéril (previamente lavado com 1% SDS p/v em H₂O-DEPC e secados a -95 °C), que encontrava-se sobre gelo seco. As células foram

maceradas até se obter um pó homogêneo de cor branca. Seguido disso, foram adicionados 2 ml do reagente TRIzol e a extração do RNA foi continuada como descrito na seção anterior. Este procedimento foi realizado para os quatro tipos de leveduras utilizados nesse estudo (ver quadro 1). Todas as amostras de RNA foram armazenadas a -70 °C até posterior uso.

2.4.3 Eletroforese de RNA

Amostras de RNA podem ser resolvidas em condições não-desnaturantes quando se trata de procedimentos, onde só pretende-se verificar a integridade do RNA. A agarose 1,2% (p/v) é dissolvida em H₂O-DEPC, acrescentada de 13,75 ml de tampão MOPS 10 x (0,02 M de 3-*N*-morfolino ácido propano sulfônico, 0,005 M de acetato de sódio, 0,001 M EDTA, pH 7,0, em H₂O-DEPC) e 4,1 ml de formaldeído. As amostras de RNA foram dissolvidas em 50 µl de tampão de amostra (1 x MOPS, 1,77 ml de formaldeído, 5 ml de formamida, e H₂O-DEPC qsp 10 ml), utilizando 10 µl de tampão de carregamento (0,1 M EDTA pH 8,0, 5 ml de glicerol, 0,25% azul de bromofenol p/v, 0,25% de xileno cianol p/v) e 2 µl de BrEt (0,5 µg ml⁻¹ em H₂O-DEPC). Estas foram aquecidas (10 min a 65 °C) e mantidas no gelo até a corrida. A cuba de eletroforese, contendo tampão MOPS 1 x, foi pré-aquecida 10 min a 70 V, seguida da aplicação das amostras no gel. Quando as amostras entraram no gel, a corrida foi continuada sob agitação constante.

2.4.4 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir das amostras de RNA obtidas nas diferentes formas de crescimento do parasita. Assim, 3-5 µg de RNA total obtido foram misturados com 1 µl de *random primers* (InvitrogenTM, USA) e 1 µl de dNTP mix (10 mM de cada) até completar um volume final de 12 µl com H₂O estéril. As amostras foram aquecidas (5 min a 65 °C) e mantidas no gelo. Após da incubação, foram acrescentados 4 µl de 5X *First-Strand Buffer*, 2 µl de 0,1 M DiTioTretitol (DTT) e 1 µl de *RNAseOUT*. Os tubos foram agitados cuidadosamente e incubados a 25°C por 2 min. Um µl (200 U) da enzima *SuperScriptTM II-RT* foi adicionado a cada amostra e deixou-se incubar por mais 10 min a 25 °C. Seguido disso, a temperatura foi aumentada a 42 °C durante 50 min, e a reação foi inativada mediante uma incubação adicional a 70 °C por 15 min. O volume final de cada amostra foi de 20 µl, sendo necessário fazer uma diluição 1: 5 em H₂O mili-Q estéril.

2.4.5 Quantificação dos transcritos por qRT-PCR

A quantificação dos níveis de transcrição para os genes *TcP5CDH*, *TcGAPDH*, *TbP5CDH* foi realizada por PCR em tempo real quantitativa (qRT-PCR). Para isto, foram misturados 5 µl de cada amostra de cDNA, 5 µl da mistura de primers (1,6 pmoles de cada primer Tc3-S/Tc3-AS ou Tcgapdh-S/Tcgapdh-AS), 5 µl de Maxima SYBR green mix (Fermentas[®], Lituania) e 5 µl de H₂O mili-Q estéril. As amostras (20 µl c/u) foram distribuídas em placas de 96 poços (Eppendorf[®], Alemanha) para RT-PCR e seladas com vedante plástico. Todas as amostras foram analisadas em triplicata usando H₂O como controle da reação. As condições de amplificação foram realizadas no termociclador automático *Mastercycler ep realplex* (Eppendorf[®], Alemanha), utilizando: 1) desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguida de 40 ciclos de 2) desnaturação a 94 °C por 1 min, 3) anelamento a 57 °C por 60 s, 4) amplificação a 72 °C por 2 min, e uma curva de desnaturação final. Os dados foram coletados usando o programa *RealPlex v1.5* (Eppendorf[®], Alemanha). A variação na expressão de cada transcrito foi determinada mediante o método ($2^{-\Delta\Delta C_t}$) (BOOKOUT; CUMMINS; MANGELSDORF, 2003), considerando a razão de expressão com respeito ao gene *TcGAPDH* (normalizador) e o estágio epimastigota como calibrador (valor = 1). As diferenças entre o *threshold cycle* (Ct), que é definido como o número de ciclos requeridos para que o sinal de fluorescência supere uma linha de base obtida estatisticamente, foram calculadas através da diferença de médias dos Cts de cada amostra e a média dos Cts do gene normalizador ($\Delta C_t = C_{t_{amostra}} - C_{t_{normalizador}}$). O valor obtido é então elevado à potência de base 2, já que o valor de Ct é proporcional ao logaritmo do gene alvo na amostra de PCR.

As diferenças entre as amostras testadas foram calculadas com o teste estatístico de ANOVA - uma via, seguido do pós-teste *Tukey's*, utilizando o programa *GraphPad Prism v5.0* para *Windows* (*GraphPad*, USA). As variações foram consideradas como estatisticamente significativas quando o valor $p > 0,01$.

2.4.6 Reação em cadeia da Polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR)

A avaliação da expressão do gene *TcP5CDH*, no modelo levedura, foi realizada mediante amplificação por PCR convencional usando cDNA de cada uma das cepas utilizadas. A amplificação do fragmento de interesse é um indicativo de que o gene está sendo transcrito nas condições avaliadas. Para isto, 3 µg das amostras de RNA total de leveduras

foram usadas na síntese de cDNA, como descrito na seção 2.4.4. O cDNA amplificado, foi dosado utilizando a opção correspondente a fragmentos de fita simples de DNA, e H₂O mili-Q estéril usou-se como referência. Assim, 30 ng de amostras de cDNA obtidas de levedura foram usados como molde em reações de PCR convencional para o fragmento *TcP5CDH*. Como controle positivo da reação foram usados 30 ng de DNA genômico da cepa CL-14 e os oligos Tc1, como descrito na seção 2.3.1.3.

2.5 Manipulação de proteínas

Os ensaios com amostras proteicas compreendem desde a preparação de amostras, de distintas fontes, para a detecção da enzima sob diferentes condições, até a purificação e obtenção de cristais da TcP5CDH.

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

A maioria das análises proteicas foi realizada mediante a separação, por peso molecular, de proteínas em géis de acrilamida/*bis*-acrilamida sob condições desnaturantes. Na maioria dos casos, os géis foram preparados ao 12% de acrilamida/*bis*-acrilamida, onde se tem uma boa separação da TcP5CDH (massa aprox.. 64 kDa). O gel de separação estava composto de: 0,375 M de tampão Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS v/v, 12% de solução acrilamida: *bis*-acrilamida [29:1 (p/v)] (*BioRad Systems*[®], USA) (v/v), 4,2% glicerol v/v, H₂O destilada qsp 10 ml, 5 µl de **TE**tra**M**etil**E**tileno**D**iamina (TEMED) (*Sigma*[®]) e 0,05% persulfato de amônio (v/v). Após do período de polimerização (30-40 min a temperatura ambiente), foi adicionado o gel de empilhamento (0,125 M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS v/v, 5% de solução acrilamida:*bis*-acrilamida [29:1 (p/v)] (*BioRad Systems*[®], USA) (v/v), H₂O destilada qsp 5 ml, 5 µl de TEMED (*Sigma*) e 0,05% persulfato de amônio (v/v). As amostras foram preparadas com tampão Laemmli 2 x (120 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS p/v, 20% glicerol v/v, 10% β-mercaptoetanol v/v, 0,02% azul de bromofenol p/v) e fervidas (5 min a 95 °C) para serem aplicadas no gel (LAEMMLI, 1970). 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. As proteínas no gel foram detectadas pela tincão com solução de azul de Coomassie (0,1% *Coomassie blue R-250* p/v, 50% MetOH v/v e 10% ácido acético v/v), seguido de uma incubação com solução de descoloração (40% MetOH v/v e 10% ácido acético v/v em H₂O).

2.5.2 Expressão e purificação da TcP5CDH produzida em bactéria

A enzima recombinante TcP5CDH foi expressa em *E. coli* como produto de fusão a uma etiqueta de seis histidinas no extremo C-terminal. Esta característica possibilita a purificação da proteína mediante a sua passagem através de uma coluna de afinidade carregada com níquel. Este metal é imobilizado numa resina composta de ácido nitrilotriacético (NTA) através da interação de quatro, dos seis, sítios de ligação com a resina. Os sítios de ligação livres interagem com as histidinas presentes na proteína de interesse.

A construção pET24-*TcP5CDH* contém o repressor *lacI*, na região 5' do inserto, que age como inibidor da enzima T7 RNA polimerase, presente na cepa de expressão BL21-codon plus-pGro7. Essa inibição é reversível na presença do IPTG, que agiria como indutor da expressão da TcP5CDH. Após a transformação e seleção dos clones positivos para esta construção, um destes foi crescido em 20 ml de meio LB-K+C (16 h a 37 °C). No dia seguinte, uma diluição (1:100) foi realizada no mesmo meio até as células atingirem uma $DO_{600nm} = 0,4$ (aprox. 2 h 30 min). Nesse momento, foram adicionados $0,5 \text{ mg ml}^{-1}$ de L-arabinose (Sigma[®]) estéril, para a indução da expressão das chaperonas groES e groEL. Quando se atingiu a $DO_{600nm} = 0,6$; foram adicionados 200 μM de IPTG e as células foram incubadas durante 4 horas a 28 °C sob constante agitação (200 r.p.m). Após a indução, as células foram coletadas por centrifugação (15 min a 5000 x g) e o precipitado foi pesado (gr). O precipitado celular foi ressuspensão em tampão de *binding* (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 500 mM NaCl e 5 mM de imidazole), mantendo uma proporção de 3 ml de tampão por grama de cultura. A lise bacteriana foi realizada, inicialmente, pelo tratamento com $0,1 \text{ mg ml}^{-1}$ lisozima (Sigma[®]) (30 min a 4 °C), seguida de seis ciclos de sonicação (1 minuto a 40% de potência e 1 minuto no gelo). O lisado foi clarificado por centrifugação (30 min, 16.000 x g a 4 °C) e a fração solúvel foi usada na cromatografia de afinidade em coluna de níquel.

A suspensão de resina (Ni^{2+} -NTA) (QUIAGEN[®], Alemanha) foi aplicada numa coluna plástica vazia (*BioRad Systems*[®], USA) até completar um volume de 4 ml de resina empacotada. Baseado nesse volume de resina, foram realizados os passos seguintes de equilíbrio, lavagens e eluição. A resina foi equilibrada adicionando o correspondente a 3 volumes de coluna (12 ml) do tampão de *binding* e a fração solúvel da cultura foi passada duas vezes pela coluna. Depois, esta foi lavada com 20 volumes do tampão de *binding*. Uma lavagem adicional com 10 volumes de tampão de lavagem (idem ao tampão de *binding* e suplementado com 20 mM de imidazole) foi realizada. A proteína TcP5CDH-6xHis (massa

aproximada de 66 kDa) foi eluída da coluna utilizando 3 volumes de tampão de eluição (idem ao tampão de *binding* e suplementado com 100 mM de imidazole). Os eluatos foram coletados em frações de 1 ml para posterior uso.

Após purificada, a remoção do sal, nas eluições contendo a TcP5CDH-6xHis, foi realizada em membranas de diálise (com um diâmetro de poro 10 kDa), contra uma solução (1:1000) de tampão TcP5CDH (100 mM HEPES-NaOH, pH 7,2 e 5% glicerol v/v). O tampão foi trocado mais duas vezes durante um período total de 12 h, a 4 °C, sob agitação constante. A fração dialisada foi concentrada, mediante a passagem através de uma coluna com uma medida de corte para o peso molecular (MWCO, *Molecular Weight Cut-Off* = 10 kDa) (Centricon, Millipore), por centrifugação (15 min a 4.000 x g). A dosagem proteica foi realizada pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como controle (BRADFORD, 1976).

2.5.3 Cromatografia de exclusão por peso molecular em gel filtração (GF)

A partir de um lisado bacteriano obtido pela expressão em 3 litros de meio LB-K+C, foi realizada a purificação da TcP5CDH através da cromatografia de afinidade, como descrito acima. Devido que, lavagens com baixas concentrações de imidazole possibilitavam a perda de quantidades significativas de TcP5CDH e, perante à co-purificação de proteínas contaminantes na eluição (100 mM imidazole), foi necessária a utilização dessas frações nos ensaios de GF. Para isso, os eluatos coletados foram concentrados por gravidade (15 min, 4.000 x g a 4 °C), utilizando uma coluna com *MWCO* = 10 kDa (Centricon, Millipore). A fração proteica foi concentrada e lavada três vezes com tampão de equilíbrio (100 mM HEPES-NaOH pH 7,2 e 5% glicerol v/v). O volume obtido (500 µl) foi aplicado a uma coluna de *Superdex 200TM 10/300 GL* (Amersham, Pharmacia), equilibrada com o mesmo tampão. A cromatografia foi realizada utilizando um fluxo de 0,5 ml min⁻¹ e uma pressão de 1,5 MPa, à temperatura ambiente. As frações que apresentavam picos de absorvância ($\lambda_{280\text{ nm}}$) foram coletadas (1 ml) para serem posteriormente analisadas. A cromatografia foi completada após a passagem de 1,5 volumes de coluna (1 vol = 23,56 ml). A curva de calibração foi realizada utilizando o *kit* comercial para proteínas padrão de alto peso molecular (*High Molecular Weight- G.E*). As proteínas: ovoalbumina (43 kDa), conalbumina (75 kDa), aldolase (158 kDa), ferritina (440 kDa), tiroglobulina (669 kDa) e o azul dextran-2000 foram aplicadas separadamente. Para cada proteína foram determinados os valores de raio de *Stokes* (nm) e o

volume de eluição (ml), para, posteriormente, determinar a massa molecular (MW) da TcP5CDH através da curva de calibração. Os volumes de eluição da TcP5CDH e das proteínas padrões (V_e) foram convertidos em K_{av} utilizando a seguinte equação (1):

$$K_{av} = \frac{V_e - V_0}{V_c - V_0}$$

onde V_e é o volume de eluição da amostra, V_0 é o volume *void* da coluna e V_c é o volume geométrico da coluna em ml. A MW e o raio de Stokes foram determinados para cada pico resultante da cromatografia por GF, utilizando os gráficos da calibração linear de K_{av} versus $\log MW$ e $[(-\log K_{av})^{1/2}]$ versus raio de Stokes, respectivamente. Estes gráficos foram obtidos a partir dos dados para as proteínas padrões com MW e raio de Stokes conhecidos (Quadro 4).

Quadro 4 - Padrões moleculares utilizados na GF

<i>Proteína</i>	<i>Massa Molecular (kDa)</i>	<i>Radio de Stokes (nm)</i>	<i>Volume de eluição (ml) *</i>
Ovoalbumina	43	3.05	16.36
Conalbumina	75	3.57	15.11
Aldolase	158	4.81	13.66
Ferritina	440	6.10	11.44
Tiroglobulina	669	8.5	10.23

* O volume de eluição foi calculado a partir da coluna pré-equilibrada com 100 mM Hepes-NaOH pH 7,2; 500 mM NaCl, 5% glicerol v/v e 5 mM DTT.

O volume *void* da coluna, obtido pela aplicação do dextrano, foi de 8,75 ml e o volume geométrico da coluna *Superdex-200 10/30* (Amersham, Pharmacia) foi de 23,56 ml. Os volumes de eluição para cada padrão estão ilustrados na quadro 4.

Por meio da curva de calibração, obtemos a equação para o cálculo da massa molecular que é dada pela equação (2):

$$K_{av} = 1.07137 - 0.34007 * \log MW$$

e através da curva de calibração, obtemos a equação (3) para o cálculo do raio de Stokes (St), dada por:

$$(-\log K_{av})^{1/2} = 0.29328 + 0.08568 * \text{Raio } St.$$

Tendo isso, utilizando as equações 2 e 3 e os volumes de eluição ilustrados na quadro 4, obtemos a massa molecular e o raio de Stokes para cada um dos picos. As frações obtidas a partir dos ensaios de GF foram quantificadas pelo método de Bradford e pela absorvância ($\lambda_{280 \text{ nm}}$) utilizando o coeficiente de extinção molar para a TcP5CDH (CEM = 71.280, assumindo que os resíduos de cisteína estão reduzidos). O CEM foi calculado através da ferramenta *ProtParam* (ExpASy.org).

2.5.4 Espalhamento de luz dinâmica (*Dynamic Light Scattering, DLS*)

A análise da massa molecular também foi realizada através da técnica de DLS. A presença da TcP5CDH, após a purificação por afinidade e GF, foi verificada através da técnica de SDS-PAGE ao 12%. As frações com picos correspondente a proteínas com massa aproximada de 66 kDa foram concentradas pela passagem em coluna de 10 kDa (*MWCO*) (Centricon, Millipore). As massas moleculares e seus raios hidrodinâmicos foram calculados através da leitura de DLS aplicando 2 μl da proteína TcP5CDH em solução (2 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$) no leitor *Zetasizer UV* (Malvern®).

2.5.5 Análise da TcP5CDH em solução pela técnica de espalhamento de raio-X a baixo ângulo (*Small Angle X-Ray Scattering-SAXS*)

Após da purificação da TcP5CDH procedeu-se com medidas de SAXS, na forma apo da enzima, a fim de verificarmos o estado oligomérico em solução. Para isto, a TcP5CDH foi purificada como descrito anteriormente e, concentrada até se obter uma solução de 2,5 mg ml^{-1} para a realização das análise. As medidas foram realizadas no Laboratório Nacional de Luz Sincrotron (LNLS, Campinas, SP), na linha SAXS2. Os dados foram processados utilizando procedimentos padrão do programa Fit2D (HAMMERSLEY, 1998).

O espalhamento foi realizado utilizando o momento de transferência de $0,14 < q < 3,4 \text{ nm}^{-1}$, dado pela formula:

$$q = \frac{4\pi \sin \theta}{\lambda}$$

onde 2θ é o ângulo de espalhamento e $\lambda = 0,1488 \text{ nm}$ é o comprimento de onda dos raios X. As medidas foram realizadas no vácuo com tempo de exposição de 5 minutos. As funções de distribuição de distâncias $p(r)$ e a distância máxima ($D_{\text{máx}}$) foram calculadas pelo método da Transformada Inversa de Fourier. Esse método é implementado no programa GNOM

(SVERGUN, 1992). Este *software* pode tratar dados experimentais de sistemas monodispersos de partículas globulares, monodispersos de partículas alongadas, monodispersos de partículas achatadas, monodispersos de partículas esféricas e polidispersos de partículas com um fator forma arbitrários. Os modelos *ab initio* a baixa resolução foram gerados pelos programas GASBOR (SVERGUN; PETOUKHOV; KOCH, 2001). E a comparação das curvas de espalhamento previstas com as dos modelos de alta resolução foi realizada pelo CRY SOL (SVERGUN, 1995). A determinação da massa molecular, a partir das medições de SAXS realizadas, foi feita através do programa SAXSMoW (FISCHER et al., 2010; KAKIUCHI et al., 1993). O alinhamento do modelo de baixa resolução com o de alta resolução (TtP5CDH, código PDB: 1UZB) foi realizado por meio do software SUPCOMB (KOZIN; SVERGUN, 2001).

2.5.6 Obtenção de cristais da TcP5CDH

A enzima TcP5CDH foi purificada como descrito na seção 2.5.3, até obter uma fração de $3 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ de proteína pura. Os ensaios para a obtenção de cristais da TcP5CDH foram realizados no robô de cristalização *Roneybee*, utilizando os kits *Classics Suite*, *Classics II Suite*, *PEGs Suite*, *PEGs II Suite* e *MPD Suite* (QUIAGEN®, Alemanha). Usando as diferentes combinações desses kits, foram testadas aproximadamente 480 condições diferentes de cristalização. Quatro dessas condições foram selecionadas para a obtenção dos cristais que se apresentaram em melhor tamanho e quantidade. As condições descrevem-se a seguir: 1) 0,2 M Tris pH 8,5, 0,2 M de CaCl_2 e 25% de PoliEtilenoGlicol-4000 (PEG-4000); 2) 0,1 M MES pH 6,0 e 65% de 2-Metil-2,4-PentanoDiol (MPD); 3) 0,1 M bicine pH 9,0 e 65% MPD; 4) 0,1 M HEPES pH 7,5, 30% MPD, 5% PEG-4000 e 5 mM de Nicotinamida Adenina Dinucleótido (NAD^+). Os cristais foram conservados em solução crioprotetora (20% de etilenoglicol v/v) e armazenados em tanques de nitrogênio líquido.

2.5.7 Obtenção de soro policlonal

Diferentes soros policlonais que reagem, de forma específica, contra proteínas do *T. cruzi* foram produzidos em camundongo para serem usados nesse estudo. Assim, os soros reativos contra as proteínas gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (TcGAPDH), tirosina aminotransferase (TcTAT), aspartato aminotransferase, isoforma mitocondrial (TcASATm) e

TcP5CDH, foram gerados a partir de imunizações com as suas correspondentes proteínas recombinantes. As proteínas TcTAT e TcASATm foram purificadas por cromatografia de afinidade, como se descreve na seção 2.5.2, a partir dos correspondentes clones bacterianos, gentilmente cedidos pela Prof. Dra. Cristina Nowicki (UBA) (MARCIANO et al., 2008; MONTEMARTINI et al., 1993). A proteína TcGAPDH-pura foi gentilmente cedida pelo Prof. Dr. Otavio Thiemann (IFSC-USP, São Carlos) (SOUZA et al., 1998). A TcP5CDH foi obtida como descrito anteriormente.

Todas as proteínas foram dialisadas contra tampão PBS 1X e concentradas por gravidade utilizando uma coluna *Centricon* 10 kDa (*MWCO*) (Centricon, Millipore), até uma concentração de $0,4 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. Seguido disto, foi preparada a solução de imunização [350 μl da proteína em PBS misturados com 350 μl de adjuvante completo de Freund's (Sigma[®])] e esta foi emulsificada através de dois ciclos de sonicação (30 s a 25% de potência, 30 s no gelo). Três camundongos, machos, da linhagem Balb/C, com 25 dias de nascimento, foram empregados para a inoculação de 150 μl da emulsão obtida (aprox. 40 μg da proteína de interesse) por via intraperitoneal. Um animal adicional foi inoculado com o mesmo volume de solução de imunização, contendo PBS-puro, ao invés de proteína, e este foi utilizado como grupo controle. Após 15 dias da inoculação, foi aplicada uma dose adicional usando a mesma quantidade de proteína emulsificada em adjuvante incompleto de Freund's (Sigma[®]). Após 30 dias, foi inoculada uma dose reforço, adicional, nas mesmas condições da ultima dose. Quatro dias, depois da última dose, os animais foram anestesiados pela administração de uma mistura de quetamina/xilazina ($100 \text{ mg kg}^{-1}/10 \text{ mg kg}^{-1}$), por via intraperitoneal, e uma amostra de sangue (1 ml) foi retirada mediante punção ocular, para a titulação do anticorpo. Uma vez determinado que o anticorpo reagia positivamente contra a proteína de interesse, procedeu-se com a coleção total do sangue nos animais positivos. O sangue foi coletado mediante punção no plexo radial e incubado durante 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, seguido de uma incubação adicional por 30 min a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. O soro total foi coletado por centrifugação (15 min, $1.000 \times g$ a $4 \text{ }^\circ\text{C}$), acrescentado com 1 volume de 30% glicerol (v/v) estéril, distribuído em alíquotas de 100 μl e armazenados a $-20 \text{ }^\circ\text{C}$, para posterior uso.

Os animais foram mantidos a $22 \text{ }^\circ\text{C} \pm 2$, $50\% \pm 5$ umidade relativa do ar, com ciclos circadianos alternados de 12 h claro/escuro, no biotério do departamento de Parasitologia, seguindo as normas de bioética em experimentação animal estabelecidas pelo ICB-USP.

2.5.8 Purificação do anticorpo anti-TcP5CDH

Para a obtenção de um anticorpo, puro, contra a enzima TcP5CDH, esta proteína foi resolvida em gel SDS-PAGE ao 12% e transferida a uma membrana de nitrocelulose, de 0,45 µm (G.E, Life Sciences) para imobilizá-la. A membrana foi bloqueada durante 1 h pela adição de leite desnatado (5% em PBS v/v), seguido da incubação com 2 ml do soro policlonal anti-TcP5CDH (diluído 1:10 em PBS) durante 1 h à temperatura ambiente. A membrana foi então lavada, três vezes (5 min cada lavagem) com PBS e incubada durante 10 min com 2 ml da solução de eluição do anticorpo (0,1 M glicina, pH 2,5 e 1 mM EGTA). O eluato recuperado foi imediatamente neutralizado com 1 volume da solução de parada (0,1 M Tris base) e concentrado através da passagem pela coluna de 10 kDa (*MWCO*) (Centricon, Millipore).

2.5.9 Preparação de extratos protéicos totais

2.5.9.1 *T. cruzi/T. brucei* para ensaios de western blot

A detecção da proteína TcP5CDH, bem como, outros marcadores utilizados foi realizada em lisados celulares do parasita. Cada lisado foi preparado a partir de 2×10^7 parasitas, das diferentes formas de desenvolvimento, cultivadas como descrito na secção 2.2.1. No caso das células CHO-k₁ foram usadas 1×10^6 células. As células foram coletadas por centrifugação (10 min a 1.500 x g) e lavadas duas vezes com PBS. O precipitado foi ressuspenso em 1 volume de tampão de extração [50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 50 mM NaCl, 2 mM EGTA, 2 mM EDTA, 20% glicerol (v/v), 1% Triton X-100 (v/v), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfônio (PMSF), dissolvido em EtOH puro, 10 µl/ml extrato de *cocktail* de inibidores de proteases (Sigma[®])]. As células foram incubadas durante 40 min no gelo, para o processo de lise ocorrer, e o lisado foi clarificado por centrifugação (15 min, 16.000 x g a 4 °C). O sobrenadante foi usado para a determinação da concentração proteica (BRADFORD, 1976), misturado com 1 vol de tampão Laemmli 2 x (120 mM Tris-HCl, pH 6,8, 4% SDS p/v, 20% glicerol v/v, 10% β-mercaptoetanol v/v, 0,02% azul de bromofenol p/v) e fervidas (5 min a 95 °C) (LAEMMLI, 1970). Quantidades iguais de proteína (30 µg) foram aplicadas em cada canaleta do gel SDS-PAGE.

2.5.9.2 *T. cruzi/T. brucei* para ensaios de atividade enzimática

Lisados totais do parasita foram preparados a partir de uma cultura de 25 ml contendo formas epimastigotas/procíclicas (5×10^6 células ml^{-1}) crescidas em meio LIT/SDM-79, durante 48 h a 28 °C. As células foram coletadas por centrifugação (10 min, 1000 x g a 4 °C) e lavadas duas vezes com tampão PBS gelado. O precipitado resultante foi ressuspensão em 500 μl de tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,25 M sacarose, 1 mM EDTA, 0,1% triton-X 100 (v/v), 1 mM PMSF, 0,5 mM TLCK e *cocktail* de inibidor de proteases Sigma[®]). A lise foi completada mediante 3 ciclos de sonicação (10 s a 20% potência e 30 s no gelo). O sobrenadante foi clarificado por centrifugação (15 min, 13.000 x g a 4 °C) e passado através de uma coluna de dessalinização *Prepacked PD-10 desalting columns* (G.E, Healthcare), para remover restos de aminoácidos ou substratos livres. A amostra foi eluída com 100 mM tampão fosfato de potássio pH 7,2 e a concentração de proteínas foi determinada pelo método de Bradford.

2.5.9.3 Extratos protéicos de levedura

Os extratos protéicos de levedura foram preparados como descrito previamente (DIEKERT et al., 2001). As leveduras foram crescidas em 100 ml de meio SD^{his- leu- ura- prol-} até atingirem uma $\text{DO}_{600\text{nm}} = 2$ (aprox. 4 dias). As células foram coletadas por centrifugação (5 min, 3000 x g), lavadas uma vez com H₂O e ressuspensas em 1 ml de tampão SHP gelado (0,6 M sorbitol, 20 mM HEPES-KOH, pH 7,4, 1 mM PMSF fresco) a uma densidade de 0,5 gr de células ml^{-1} . As pérolas de vidro (0,4-0,5 mm de diâmetro) foram adicionadas às células até ocuparem 2/3 do volume final. As células foram rompidas pela agitação vigorosa em dois ciclos de *vortex* (15 s e 15 s no gelo). A suspensão celular resultante foi submetida a centrifugação em baixa velocidade (3 min, 1000 x g), para separar células não lisadas, restos celulares (*debris*) e o núcleo. Seguindo disso, as células foram centrifugadas novamente (5 min, 600 x g, a 2 °C). O sobrenadante contém as mitocôndrias, membranas celulares e o conteúdo citoplasmático, sendo então coletado cuidadosamente. A separação das mitocôndrias foi completada mediante uma passo adicional de centrifugação (10 min, 10.000 x g a 2 °C). O precipitado, contendo as mitocôndrias e algumas membranas contaminantes, foi ressuspensão em 10 μl de tampão SHP. A concentração de proteínas totais foi determinada

pelo método de Bradford, usando BSA como padrão (BRADFORD, 1976). Os extratos obtidos foram usados em ensaios de atividade enzimática e *western blot*.

2.5.10 *Western blot*

Para a detecção da proteína de interesse em amostras proteicas de diferentes fontes foi aplicada a técnica de *western blot*. As proteínas foram resolvidas em gel SDS-PAGE e, posteriormente, eletro-transferidas a membranas de nitrocelulose de 0,45 μm (Amersham, Biosciences) utilizando um sistema de transferência semi-seco. Foi aplicada uma voltagem constante (1,2 mAmp x cm^2 de gel, durante 1 h 15 min), sendo que o gel foi colocado no cátodo, para que a transferência ocorra em direção ao ânodo, onde encontra-se a membrana. O sistema foi impregnado com tampão de transferência [25 mM Tris, 192 mM glicina, 20% MetOH (v/v)], utilizando papel filtro (*Whatman*). Após concluída a transferência, as proteínas foram coradas na membrana mediante o tratamento com solução de vermelho Ponceau [0,5% vermelho Ponceau (p/v) dissolvido em 10% ácido acético (v/v)].

A membrana foi descolorada pela lavagem rápida com PBS suplementado de 0,3% Tween-20 (v/v) (PBST). Seguido disso, as proteínas na membrana foram bloqueadas com uma solução de PBST acrescentada de 5% leite desnatado (Molico, Nestle[®]) (p/v) (PBST-L), durante 1 h sob constante agitação. Após o bloqueio, procedeu-se à incubação (1 h a temperatura ambiente) com o anticorpo primário, diluído em PBST-L nos correspondentes títulos (anti-TcP5CDH 1:2.000, anti-TcGAPDH 1:2.500, anti-TcASATm 1:3.000, anti-TcTAT 1:2.000, anti-TcPRODH 1:500). O excesso de anticorpo foi retirado mediante três lavagens sucessivas (5 min c/u) com PBST. O anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo acoplado a peroxidase de rabanete (Sigma[®]) foi diluído (1:5.000) em solução PBST-L acrescentada de 3% leite desnatado (p/v) e incubado durante 1 h sob constante agitação. Duas lavagens sucessivas com PBST (5 min c/u) e uma com PBS (15 min) foram realizadas à membrana. Os sinais de reatividade foram reveladas mediante a adição de 1 ml (500 μl do reagente A + 500 μl do reagente B) do *kit* quimioluminescente *SuperSignal[®] West Pico Chemiluminescent* (Thermo, scientific). Após isso, as membranas foram expostas em filme de raio-X e reveladas com soluções reveladora e fixadora, seguindo indicações do fabricante (Kodak[®]).

2.5.11 *Análise da proteína TcP5CDH por eletroforese em condições não desnaturantes (gel nativo)*

Com o intuito de determinar a massa molecular da enzima TcP5CDH, esta enzima foi submetida a eletroforese de proteínas sob condições não desnaturantes em gel nativo (EGN). Para isto, as proteínas são resolvidas em um gradiente de acrilamida/*bis*-acrilamida (AB *mix*), cujas concentrações estão entre 5-15% (v/v). Para isto, uma amostra da proteína TcP5CDH-pura foi diluída (3:1) em tampão de amostra [5% azul de Coomassie G-250 (p/v) dissolvido em 0,75 M ácido aminocapróico], sendo aplicados 10 µl por canaleta. Como marcador de peso molecular foram aplicados 8 µl do *Kit for molecular weights 14-500,000 non-denaturing* (Sigma®). O gel de separação foi preparado misturando duas soluções de acrilamida [AB 5% e AB 15% (v/v)], utilizando um sistema formador de gradiente acoplado a uma bomba peristáltica com fluxo de 3 ml min⁻¹ (Amersham®, Pharmacia). Os volumes de cada solução utilizada se descrevem na quadro 5.

Os tampões de corrida foram: ânodo (50 mM Bis-Tris pH 7,0) e cátodo (50 mM tricina, 50 mM Bis-Tris, pH 7,0 e 0,02% de azul de Coomassie G-250 p/v). A eletroforese foi realizada em frio (4-8 °C), utilizando uma voltagem inicial (80 V por 25-30 min.), e posteriormente aumentada (300 V por 90 min) (SCHAGGER; VON JAGOW, 1991). Após a corrida, as proteínas foram coradas com solução de azul de Coomassie ([0,2% azul de Coomassie R-250 (p/v), 50% MetOH (v/v), 10% ácido acético (v/v) e água destilada] ou transferidas a membranas de nitrocelulose para serem analisadas por *western blotting* utilizando o soro policlonal anti-TcP5CDH (1:2.000).

Quadro 5 - Soluções utilizadas para a preparação do gel nativo.

Componente	AB 5% (µl)	AB 15% (µl)	Empilhamento (µl)
AB <i>mix</i> (48:1,5)	500	1040	250
Tampão do gel 3X	1660	1110	1000
Água destilada	2800	600	1750
Glicerol	-	560	-
Persulfato de amônio 10% (p/v) *	40	24	25
TEMED *	4	3	3

AB *mix*: solução de acrilamida: bis-acrilamida. *Adicionados antes de adicionar as soluções na cuba formadora de gradiente.

A técnica de EGN também foi utilizada para resolver amostras mitocondriais solubilizadas com os detergentes dodecil maltoside (DDM) e digitonina (DIG) (preparadas como descrito na secção 2.6.4). Para isto, foram aplicados 10 µl de cada extração e resolvidas em EGN. Em seguida, as proteínas foram transferidas a membranas de nitrocelulose para serem analisadas por *western blotting* utilizando o anti-TcP5CDH (1:2000) ou para serem analisadas sob uma segunda dimensão (2D) em SDS-PAGE ao 12%.

Para o gel da 2D foi necessário cortar a região da canaleta com as amostras correspondentes ao tratamento com DDM e DIG, que foram previamente resolvidas no gel nativo. A região do gel foi escolhida segundo o que foi observado em ensaios de *western blotting* a partir de EGN. O pedaço de acrilamida com a amostra proteica foi incubado (30 min a temperatura ambiente) com uma solução de 2-mercaptoetanol 1% e SDS 1% (SCHAGGER; CRAMER; VON JAGOW, 1994). Para este passo, as duas amostras foram posicionadas de forma vertical na região onde se costuma colocar o gel de empilhamento. Após esse tempo, o excesso dessa solução foi retirado do gel e procedeu-se à montagem do mesmo. O gel de separação foi preparado seguindo procedimentos padrão para eletroforese em condições desnaturantes SDS-PAGE 12%. Para o gel de empilhamento, foi necessário adicionar a mistura sem polimerizar ao redor da região do gel onde se encontram as duas amostras a serem resolvidas. Uma vez que o gel polimerizou, procedeu-se à adição do tampão de corrida e à corrida do gel SDS-PAGE tradicional (120 V por 5 horas a T° ambiente). Após isso, as proteínas foram transferidas a membranas de nitrocelulose para a detecção da TcP5CDH por *western blotting*.

2.6 Determinação da localização sub-celular para TcP5CDH

A localização da enzima TcP5CDH foi abordada mediante o uso de técnicas imunohistoquímicas, bem como, de alguns ensaios bioquímicos. A obtenção do anti-TcP5CDH, somado ao fato de se obterem frações enriquecidas com conteúdo mitocondrial, permitiram a determinação da localização. Também, a detecção enzimática da TcP5CDH, mediante a aplicação de um ensaio de atividade aqui padronizado, forneceram dados úteis que confirmam algumas das nossas observações.

2.6.1 Ensaios de imunolocalização

Ensaios de imunofluorescência indireta (IFI), nas formas predominantes do ciclo de vida de *T. cruzi*, foram realizados para determinar a eventual co-localização da TcP5CDH, através de um marcador mitocondrial, disponível comercialmente. Para isto, lâminas de vidro, para IFI, foram pré-tratadas com poli-lisina 1 mg ml⁻¹ (Sigma[®]), durante 30 min a 37 °C.

Parasitas (5 x 10⁶ células ml⁻¹) das formas epimastigotas, tripomastigotas metacíclicas, tripomastigotas obtidas a partir da infecção em CHO-k₁ e amastigotas foram incubadas com 50 nM do substrato fluorescente *MitoTracker-CMXROS* (Invitrogen[®]), dissolvido em meio LIT/Grace/RPMI, e incubados às correspondentes temperaturas de crescimento. As proteínas foram fixadas na lâmina pela adição de 2% *p*-formaldeído (p/v) e incubadas durante 20 min a temperatura ambiente, seguido da permeabilização com 0,1% triton X-100 (v/v) durante 5 min a temperatura ambiente.

A detecção da TcP5CDH também foi realizada em células CHO-k₁ (5 x 10⁵ células x poço), aderidas a lamínulas de vidro, em placas de 24 poços, previamente infectadas com formas tripomastigotas, mantendo uma proporção de 50:1 (tripomastigotas:CHO-k₁). O anticorpo primário anti-TcP5CDH (1:150 diluído em PBS + 2% BSA p/v) foi adicionado à lâmina e incubado 1 h a temperatura ambiente. Após a incubação com o anticorpo primário, as amostras foram submetidas a 5 lavagens sucessivas com PBS, seguido da incubação com o anticorpo secundário, anti-IgG de camundongo conjugado à sonda *Alexa Fluor-488* (Invitrogen[®]), (1:400 diluído em PBS + 2% BSA p/v). Por último, a marcação do DNA foi realizada pela incubação (5 min, protegido da luz) com a sonda *Hoechst 33258* (Invitrogen[®]) (1:2.000). A montagem da lâmina foi concluída, pela adição de uma gota do reagente Fluoromount-G (*Southern Biotech*[®]), e a lâmina foi selada pela adição de esmalte de unhas. As lâminas foram visualizadas num microscópio de epifluorescência *Axio Imager motorized*

M.2 (Carl Zeiss[®], Alemanha) em objetivo de 100X. A sobreposição e edição das imagens foi realizada no programa *ImageJ* v1.4p (NIH) versão para *Windows* de 64-bits.

2.6.2 Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina

A digitonina é um glicosídeo, obtido a partir de uma alga (*Digitalis purpureae*), utilizado como detergente em sistemas celulares porque solubiliza lipídeos. Em *T. cruzi*, este tem sido utilizado quando pretende-se permeabilizar a membrana plasmática, mantendo a integridade das funções mitocondriais. Assim, concentrações crescentes de digitonina, permitem a liberação do conteúdo de distintas organelas. Este ensaio foi aplicado com o intuito de estabelecer a concentração de digitonina em que a enzima TcP5CDH, segundo a sua atividade enzimática e sinal no *western blot*, seria detectada. Esses dados são então comparados com o obtido para marcadores pré-estabelecidos de citosol, glicossomo e mitocôndria (MARCIANO et al., 2008; TURRENS, 1989; VERCESI et al., 1991). Para isto, foram utilizados 2×10^9 formas epimastigotas (aprox. 60 mg) no terceiro dia de crescimento, em meio LIT a 28 °C, e lavadas duas vezes com tampão PBS 1 x. O precipitado foi ressuspensão em 1 ml de tampão TSEB [20 mM Tris-HCl pH 7,6, 0,25 M sucrose, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µl de *cocktail* de inibidores de protease (Sigma[®])] suplementado com concentrações crescentes de digitonina (entre 0 – 5 mg ml⁻¹) (Sigma[®]). Os parasitas foram tratados com digitonina (5 minutos a 25 °C) e centrifugados (2 min, 18.000 x g). Os sobrenadantes (s) foram separados para posterior análise, enquanto que os precipitados (p) foram ressuspensos com 0,5 ml de tampão TSEB. Os ‘p’ foram então desagregados mediante 3 ciclos de sonicação (20 segundos a 40% de amplitude e 20 segundos incubado no gelo). As atividades enzimáticas correspondentes à piruvato quinase (EC 2.7.1.40), hexoquinase (EC 2.7.1.1) e citrato síntase (EC 4.1.3.7) foram determinadas e utilizadas como marcadores de enzimas citosólica, glicossomal e mitocôndrial, respectivamente. As medições foram feitas seguindo protocolos padrão, como descrito na secção 2.7.3 (<http://www.sigmaldrich.com/life-science/metabolomics/enzyme-explorer/learning-center/assay-library.html>). A atividade enzimática é expressa em % de atividade e comparada com o obtido para o lisado total do parasita. Para a análise por *western blot*, das frações obtidas, foram utilizados os soros policlonais obtidos contra as proteínas TcTAT, TcGAPDH, TcPRODH e utilizados como marcadores de enzimas citosólica, glicossomal e mitocôndrial, respectivamente.

2.6.3 *Preparação de vesículas mitocondriais do T. cruzi pelo método de pérola de vidro*

A separação de vesículas mitocondriais, do parasita, foi realizada seguindo o protocolo previamente descrito (FERNANDES et al., 2010). Para isto, formas epimastigotas foram crescidas em frascos de vidro com 250 ml de meio LIT (2 dias a 28 °C sob constante agitação). As células foram coletadas por centrifugação (10 min, 1.200 x g a 4 °C) e lavadas com tampão RB (0,12 M fosfato de sódio, pH 8,0, 86,3 mM NaCl e 56 mM D-glicose). O precipitado foi ressuspensão em 2 ml de tampão RB, acrescentado com 100 µl do *cocktail* de inibidores de protease (Sigma[®]) e 1 mM de PMSF fresco, e misturado com o volume correspondente a 3 ml de pérolas de vidro (estéreis e geladas) (Sigma[®]). As pérolas de vidro (0,4 – 0,5 mm diâmetro) foram equilibradas, previamente, com tampão PBS 1 x gelado. A quebra das células foi realizada pela maceração constante com as pérolas de vidro em cadinho de porcelana estéril. O rompimento das membranas foi confirmado pela visualização ao microscópio (considerando 80% de células rompidas). Em seguida, foram adicionados 4 ml de tampão HB (50 mM HEPES-NaOH, pH 7,2, 0,27 M sacarose, 1 mM EDTA e 1 mM MgCl₂), separando as pérolas do lisado por centrifugação (5 min, 600 x g a 4 °C). O sobrenadante foi coletado e centrifugado novamente (9 min, 1.200 x g a 4 °C). O sobrenadante resultante foi centrifugado (10 min, 16.000 x g a 4°C) e o precipitado obtido foi ressuspensão em 2 ml de tampão WB (tampão fosfato de potássio, pH 7,5, 0,25 M sacarose) e centrifugado (10 min, 16000 x g a 4 °C). Finalmente, o precipitado foi ressuspensão em 200 µl de tampão de reação (50 mM HEPES-NaOH, pH 7,2; 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 1 mM MgCl₂ e 2 mM K₂PO₄) e utilizado para a dosagem de proteínas pelo método de Bradford. Para a detecção da atividade enzimática TcP5CDH foram utilizados 10 mg dessa fração para serem tratados com triton X-100 1% (v/v). O material insolúvel foi separado por centrifugação (20 min, 16.000 x g a 4 °C) e o sobrenadante utilizado nos ensaios de medição de atividade enzimática na presença de 2 mM NAD(P)⁺. Como marcadores de atividade mitocondrial foram utilizados os ensaios correspondentes para as enzimas citrato sintase (marcador de matriz mitocondrial) e fumarato redutase (membrana externa mitocondrial), seguindo procedimentos previamente descritos (BOVERIS; HERTIG; TURRENS, 1986).

2.6.4 Preparação de frações mitocondriais do *T. cruzi* pelo método da lise hipotônica

Como método alternativo para a separação de uma fração enriquecida com conteúdo mitocondrial foi realizada uma extração por lise em meio hipotônico (SCHNEIDER et al., 2007). Para isto, os parasitas (1×10^9 células em fase exponencial) foram coletados por centrifugação (10 min, $1.200 \times g$ a 4°C), ressuspensos em 5 ml de tampão NET (0,15 M NaCl, 0,1 M EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) e centrifugados novamente (10 min, $16.000 \times g$ a 4°C). O precipitado foi ressuspendido em 4,5 ml de tampão DTE (1 mM Tris-HCl, pH 7,9, 1 mM EDTA), e a mistura foi passada cinco vezes através de uma seringa de 5 ml, com agulha de 25-G (BD[®]), para completar a lise. Seguido disso, foram adicionados 540 μl de sacarose 60% (p/v) ao lisado, que foi homogeneizado e centrifugado novamente (10 min, $16.000 \times g$ a 4°C). O precipitado resultante foi ressuspensão em 3 ml de tampão STM (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 2 mM MgCl_2 , 0,25 mM EDTA), acrescentado de solução de DNase (10 mM Tris-HCl, pH 7,4, 10 mM CaCl_2 , 50% glicerol (v/v) e $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ DNase-I (Fermentas[®], Lituania), e incubado por 45 min a 4°C . Após esse tempo, a reação foi parada pela adição de um volume de tampão STE (20 mM Tris-HCl, pH 7,9; 2 mM EDTA, 0,25 M sacarose). As vesículas mitocôndriais foram centrifugadas (10 min, $16.000 \times g$ a 4°C) e o precipitado foi ressuspensão em 600 μl de tampão STE para a determinação de proteína totais pelo método de Bradford. Um ciclo adicional de centrifugação (10 min, $16.000 \times g$ a 4°C) foi realizado, após da determinação do conteúdo de proteínas, sendo que o precipitado foi dissolvido em 0,75 M ácido aminocapróico (AAC), usando uma proporção do 10% (volume em μl) da quantidade de proteínas obtidas (exemplo: para 500 μg de proteínas totais dissolver a amostra em 50 μl de AAC). O volume final foi dividido em duas partes iguais e a solubilização das frações mitocôndrias foi realizada usando dois detergentes diferentes, 10% dodecil maltosido (DDM) (p/v, dissolvido em água mili-Q) ou 10% digitonina (DIG) (p/v, dissolvida em tampão com 50 mM NaCl, 50 mM imidazole, 5 mM AAC, 4 mM PMSF). Para o tratamento com DDM foi usada uma proporção de 2:1 (μl de detergente: μg de proteína) e para o caso de DIG foi usada uma proporção de 4:1. As amostras foram incubadas 5 minutos no gelo e o material solúvel foi separado por centrifugação (20 min, $16.000 \times g$ a 4°C) e coletado em um tubo novo.

2.7 Ensaios bioquímicos

Tendo em vista que o substrato da enzima TcP5CDH, o P5C, é um composto altamente instável, motivo pelo qual o único fabricante, Sigma[®], optou por descontinuí-lo, partimos para a síntese química e purificação do composto, a escala do laboratório. A obtenção do P5C permitiu a caracterização cinética da enzima, assim como, a avaliação do papel fisiológico da mesma em função da sua atividade enzimática.

2.7.1 Síntese química do substrato P5C

A síntese do P5C fresco foi realizada seguindo a o método descrito previamente (MEZL; KNOX, 1976; STRECKER, 1960). Para isto, 70 μ moles de DL-5-hidroxisina (Sigma[®]) foram oxidados com uma solução de 50 mM *m*-periodato sódico (Sigma[®]) (pH 7,0) durante 8 minutos a 4 °C. A reação foi parada pela adição de 70 μ l de 1 M glicerol e, posteriormente, foram adicionados 60 μ l de 6 M HCl. A mistura racêmica de DL-P5C resultante foi purificada pela passagem através de uma coluna contendo 2 ml de resina (empacotada) de troca iônica Dowex 50W-8X (Sigma[®]), equilibrada com 5 mM HCl (3 volumes de coluna). O DL-P5C foi então eluído com 6 ml de 1 M HCl e as frações (2 ml) foram coletadas, para posterior análise.

2.7.1.1 Quantificação do P5C sintético

A dosagem do P5C sintético foi realizada pela reação com o reagente *o*-aminobenzaldeído (*o*-AB), que forma um composto dihidroxiquinolona (DHQ), de cor amarela escura, que absorve a luz na faixa visível ($\lambda_{443 \text{ nm}}$). Para isto, foram misturados 1,5 ml de 20% ácido tricloroacético (TCA) (p/v), 1,35 ml de 0,25 M HCl, 0,15 ml de *o*-AB (Sigma[®]) dissolvido em 40% EtOH (v/v), e 34 μ l do analito. Como branco da reação foi utilizado 1 M HCl. As amostras foram incubadas em tubos de vidro, durante 40 min a temperatura ambiente, protegendo da luz. Após esse tempo, as amostras foram lidas em espectrofotômetro e a concentração do P5C foi calculada utilizando um coeficiente de extinção molar (CEM) de $2.590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, como reportado previamente (MEZL; KNOX, 1976; VOGEL; DAVIS, 1952).

2.7.1.2 Análise do P5C por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) e espectrometria de massa (MS)

O complexo DHQ pode ser analisado mediante a separação cromatográfica em HPLC. Para isto, foi utilizada uma coluna C_{18} (*Agilent, Zorbax*), como fase estacionária, e uma fase móvel composta de MetOH:H₂O (2:1). Os picos de absorvância, na faixa UV, ($\lambda_{252\text{ nm}}$), foram registrados. A determinação da massa molecular do composto sintetizado foi feita mediante a técnica de MS. Para isto, a amostra de P5C (aprox. 15 mM) foi diluída (1:2) em 1% ácido fórmico (v/v) e injetada diretamente no aparelho *Finnigan Surveyor Mass Spectrometer Quadrupole Plus-MSQ* (Thermo, Scientific).

2.7.1.3 Análise do P5C em função do pH

Considerando que o P5C encontra-se em equilíbrio, desfavorável e espontâneo, com a sua forma aberta, o γ GSA, e sabendo que este processo é dependente do pH do meio, partimos então, para a realização de um espectro de absorção ($\lambda_{190\text{ nm} - 300\text{ nm}}$) sob diferentes condições de pH. O pH do meio foi ajustado utilizando soluções com valores de pH na faixa de 2 – 12. Para isto, quatro soluções equimolbares (0,1 M) de NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, H₃PO₄ e NaOH foram utilizadas para ajustar o pH desejado. A amostra de P5C (aprox. 20 mM em 0,25 M HCl) foi diluída (1:600) na respectiva solução de pH e incubados durante 3 min até atingir o equilíbrio. A varredura de leitura no espectrofotômetro foi realizada no *Evolution 300 UV-Vis Spectrophotometer* (Thermo[®], Scientific) utilizando uma velocidade de leitura de 240 nm min⁻¹. O branco da reação foi 0,25 M HCl.

2.7.2 *Determinação dos parâmetros cinéticos da TcP5CDH*

Os parâmetros cinéticos para a enzima TcP5CDH foram determinados, tanto na enzima recombinante TcP5CDH-6xHis, quanto em preparações mitocôndrias do *T. cruzi*. Os substratos analisados foram o P5C sintético, os cofatores NAD(P)⁺ e alguns aldeídos cuja estrutura assemelhava-se ao P5C.

2.7.2.1 Cálculo da constante de afinidade (K_m), eficiência catalítica (k_{cat}) e constante de especificidade (k_{cat}/K_m)

O ensaio de atividade enzimática para a TcP5CDH permite medir a oxidação de P5C a L-glutamato utilizando NAD(P)^+ como aceptor de elétrons. O aumento da absorvância se correlaciona com o produto reduzido NAD(P)H , que por sua vez está em equilíbrio estequiométrico com o L-glutamato formado. O NAD(P)H absorve na faixa de luz UV ($\lambda_{340\text{ nm}}$), o que facilita a sua distinção do NAD^+ fornecido na reação. Tendo isso, os parâmetros cinéticos foram determinados em concentrações saturantes de um dos dois substratos, enquanto que o outro era variado até concentrações saturantes. Assim, os parâmetros cinéticos para o P5C foram calculados em tampão de reação P5C contendo: 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,2; 2 mM NAD^+ trihidratado (Sigma[®]), H_2O destilada qsp 3 ml e concentrações crescentes de P5C (10 - 800 μM). A reação foi iniciada pela adição de 5 μg de TcP5CDH-6xHis ou 300 μg de extrato mitocondrial do parasita, a 28 °C sob constante agitação. O cálculo da atividade foi realizado a partir do delta de absorvância obtido na faixa linear da leitura que foi de 5 min para a enzima recombinante ou de 15 min para a o extrato mitocondrial. O branco da reação foi 0,25 M HCl ao invés do P5C. No caso dos parâmetros cinéticos para os cofatores NAD(P)H , esses foram determinados utilizando uma concentração de 0,6 mM de P5C e variando as concentrações (10 - 2.500 μM) de NAD^+ trihidratado (Sigma[®]) ou hidrato de β -nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP^+) (Sigma[®]).

O cálculo das velocidades iniciais (V_0) foram obtidas a partir dos valores de produto formado por unidade de tempo [$\text{nmol de NAD(P)H min}^{-1}$], utilizando o $\text{CEM}_{\text{NAD(P)H}} = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os valores de V_0 foram representados no eixo-y do gráfico e plotados *versus* as concentrações do substrato (μM) eixo-x. Nos três casos, a curva resultante foi ajustada a uma hipérbole Michaeliana, utilizando o programa *OriginPro v8.0* (OriginLabTM). Os parâmetros cinéticos K_m e V_{max} foram calculados a partir da equação (4) de Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{max}[S]}{K_m + [S]}$$

O cálculo da eficiência para a enzima TcP5CDH é dado pela razão da constante de catalise (k_{cat}) e o K_m (k_{cat}/K_m). A k_{cat} é definida como o número de moléculas de substrato que uma molécula de enzima pode converter em produto, por segundo. Portanto, este valor depende diretamente do número de sítios catalíticos presentes na enzima. O cálculo da k_{cat} descreve-se na equação (5), cujo valor se expressa em unidades de tempo (s^{-1}), sendo então, a eficiência dada como: μM de produto por s^{-1} .

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T}$$

No caso particular da TcP5CDH, o valor de k_{cat} foi calculado considerando que a enzima forma um oligômero de seis unidades protoméricas. As leituras foram realizadas três vezes separadamente ($n=3$), e o desvio padrão (DP) foi calculado para cada réplica.

2.7.2.2 Especificidade de substrato

A especificidade da enzima TcP5CDH foi avaliada mediante a medição da atividade na presença de compostos aldeídicos, cuja estrutura química estaria relacionada à do P5C. Dessa forma, a reação enzimática foi medida, separadamente, utilizando o tampão de reação para TcP5CDH na presença de 0,6 mM de cada substrato. Os substratos avaliados foram: succinato semialdeído, acetaldeído, ácido malônico, ácido glutárico, ácido adípico, ácido nicotínico e ácido glutâmico, e concentrações saturantes de NAD^+ (2 mM), como descrito na secção anterior.

A dependência da enzima pelo cofator foi avaliada em condições saturantes de P5C (0,6 mM) na presença de 2 mM de NAD^+ trihidratado ou $NADP^+$. As reações foram iniciadas pela adição de enzima e os valores foram representados em um gráfico de barras considerando um $n=3$.

2.7.2.3 Dependência de pH

O efeito do pH, na reação catalisada pela enzima TcP5CDH, foi avaliado na enzima recombinante TcP5CDH-6xHis e em lisados totais do parasita. Para isto, a atividade enzimática foi medida em tampão de reação contendo 100 mM dos tampões: 2-*N*-morfolino ácido etano sulfônico (MES pH 5,0; 6,0), 3-*N*-morfolino ácido propano sulfônico (MOPS pH 6,6; 7,0), 4-(2-hidroxietil)-1- ácido piperazina etano sulfônico (HEPES pH 7,2; 7,6), fosfato de sódio (pH 7,2; 7,6), tris(hidroximetil)aminometano (Tris-HCl pH 8,0; 8,5), 2-*N*-ciclohexilamino ácido etano sulfônico (CHES pH 9,0; 9,5), 2 mM NAD^+ , e 5 μ g de enzima TcP5CDH-6xHis ou 300 μ g de lisado do parasita. As amostras foram pré-incubadas (3 min, 28 °C sob constante agitação) e a reação foi iniciada pela adição de 0,6 mM P5C.

2.7.2.4 Energia de ativação e dependência de temperatura

O efeito da temperatura na reação catalisada pela enzima TcP5CDH foi avaliado na forma recombinante (TcP5CDH-6xHis). Para isto, a atividade enzimática foi medida em tampão de reação contendo 100 mM HEPES, pH 7,2, 2 mM NAD⁺ e 5 µg de enzima TcP5CDH-6xHis. As amostras foram pré-incubadas (3 min, em temperaturas de 15 – 85 °C, sob constante agitação) e a reação foi iniciada pela adição de 0,6 mM P5C. Os valores de $\log V_{\max}$ versus $(1/T^\circ)$ foram plotados e ajustados linearmente para o cálculo da energia de ativação (E_a), segundo a equação de Arrhenius (6):

$$E_a = -RT \ln \frac{T^\circ}{A}$$

Onde, R é a constante universal para os gases ideais $8,314 \times 10^{-3} \text{ kJ mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ e A é um valor constante.

2.7.3 *Medição de outras atividades enzimáticas*

Além da atividade enzimática para a TcP5CDH, outras atividades foram medidas para serem utilizadas como marcadores bioquímicos em frações celulares do parasita. Todas as medições de atividade foram feitas através de ensaios espectrofotométricos monitorando, em tempo real, as mudanças na absorvância a 340 nm ($\lambda_{340 \text{ nm}}$).

2.7.3.1 Citrato sintase (CS)

O ensaio de atividade para a enzima CS, uma enzima da matriz mitocondrial, é baseado na detecção de NADH, acoplada à síntese de citrato a partir de oxalacetato e acetil-CoA. O ensaio foi realizado em tampão de reação contendo: 46 mM de tampão Tris-HCl pH 8,0, 6,7 mM de ácido málico, 1,7 mM de NAD⁺ (Sigma[®]), 0,13 mM de acetil-CoA, 56 U da enzima malato desidrogenase (Sigma[®]), e H₂O qsp 3 ml. A reação foi iniciada pela adição de 100 µg de extrato protéico total do parasita. O branco da reação foi a mesma preparação sem a adição de enzima. A absorvância foi monitorada (5 min a 30°C), sob agitação constante, e a V_0 calculada na região da linearidade (3 min), utilizando o $CEM_{\text{NADH}} = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7.3.2 Hexocinase (HQ)

O ensaio de atividade para a enzima HQ, uma enzima presente no glicossomo, é baseado na detecção de NADPH, acoplada à produção de 6-fosfo-D-gluconato a partir de D-glicose 6-fosfato e NADP^+ . O ensaio foi realizado em tampão de reação contendo: 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,6, 8,0 mM de D-glicose, 9,5 mM de ATP sal sódica (Amresco[®]), 19 mM NaCl, 0,1 mM de NADP^+ e 5 U da enzima glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma[®]), e H_2O qsp 3 ml. A reação foi iniciada pela adição de 100 μg de extrato protéico total do parasita. O branco da reação foi a mesma preparação sem a adição de enzima. A absorvância foi monitorada (7 min a 30 °C), sob agitação constante, e a V_o calculada na região da linearidade (5 min), utilizando o $\text{CEM}_{\text{NADPH}} = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7.3.3 Piruvato quinase (PQ)

O ensaio de atividade para a enzima PQ, uma enzima de localização citoplasmática, é baseado na detecção de NAD^+ produzido a partir da redução do piruvato em lactato. O ensaio foi realizado em tampão de reação contendo: 38 mM de tampão fosfato de potássio pH 7,6, 0,43 mM de fosfo(enol)piruvato, 0,2 mM de NAD^+ (Sigma[®]), 6,7 mM de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Sigma[®]), 1,3 mM de adenosina difosfato (ADP), 20 U de lactato desidrogenase, 1 mM de fructose 1,6-difosfato e H_2O qsp 3 ml. A reação foi iniciada pela adição de 100 μg de extrato protéico total do parasita. O branco da reação foi a mesma preparação sem a adição de enzima. A absorvância foi monitorada (5 min a 30 °C), sob agitação constante, e a V_o calculada na região da linearidade (3 min), utilizando o $\text{CEM}_{\text{NADH}} = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.7.3.4 Fumarato redutase (FMR)

O ensaio de atividade para a FMR, enzima localizada na membrana interna da mitocôndria, mas que pode ser liberada quando há um aumento na força iônica (CHRISTMAS; TURRENS, 2000; TURRENS, 1989), é baseado na redução do fumarato em succinato acoplado à oxidação de NADH. O ensaio foi realizado em tampão de reação contendo: 50 mM tampão fosfato de potássio, pH 7,4, 0,1 mM NADH, 3 mM de fumarato, e H_2O qsp 3 ml. A reação foi iniciada pela adição de 100 μg de extrato proteico total do parasita. O branco da reação foi a mesma preparação sem a adição de enzima. A absorvância

foi monitorada (5 min a 30 °C), sob agitação constante, e a V_o calculada na região da linearidade (4 min), utilizando o $CEM_{NADH} = 6.220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.8 Avaliação do papel fisiológico da enzima TcP5CDH

2.8.1 Ensaios de estresse nutricional

Para determinar se o *T. cruzi* é capaz de incorporar o P5C sintético e utilizá-lo como fonte de carbono e energia, foram feitos ensaios de estresse nutricional seguindo relatos da literatura (MAGDALENO et al., 2011). Para isso, foram utilizadas formas epimastigotas de *T. cruzi* (20×10^6 células ml^{-1}) incubadas durante 72 horas em PBS (grupo controle) ou PBS suplementado com 1 mM de cada metabólito analisado: PBS + D-glicose, PBS + L-prolina, PBS + P5C, PBS + L-glutamato e PBS + solvente do P5C (0,25 M HCl), este último como controle adicional. Para as células incubadas com P5C, e o seu controle, foi necessário equilibrar o pH da solução a 7,0 com 3 M KOH. Seguindo da incubação, a viabilidade celular foi avaliada pelo tratamento com o reagente 4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrasolium (MTT) e a razão de absorvância ($\lambda_{595-690 \text{ nm}}$) foi registrada.

2.8.2 Avaliação da citotoxicidade do P5C no *T. cruzi*

Para determinar se a presença de P5C livre no meio poderia afetar a viabilidade celular do parasita foi realizado um experimento semelhante ao de estresse nutricional. Para isso, formas epimastigotas (20×10^6 células ml^{-1}) foram lavadas duas vezes com PBS e incubadas (24 h) com concentrações crescentes de P5C sintético (0 - 300 μM) ou uma mistura de rotenona (60 μM) e antimicina A (0,5 μM) (Sigma[®]), usados como controle positivo pela sua toxicidade já conhecida. Alíquotas dos tempos 2, 4, 6, 8 e 24 horas foram retiradas para a realização do teste de viabilidade pela técnica do MTT e os valores representados em um gráfico de barras.

2.8.3 Avaliação da síntese de ATP dependente de P5C (método com luciferase)

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 adenosin trifosfato (ATP) e, portanto, pode-se utilizar como um método indireto de medição

de ATP no meio. Esta metodologia foi realizada em formas epimastigotas submetidas a inanição, o que leva a uma diminuição nos níveis de ATP sem afetar a viabilidade do parasita. No entanto, a síntese de ATP pode ser restabelecida, posteriormente, pela adição dos substratos sob análise. Para isso, as células (5×10^6 células ml^{-1}) foram incubadas em meio LIT (controle positivo), PBS (30 h a 28 °C), seguido do processo de recuperação (1 h a 28 °C) pela adição de 1 mM de D-glicose, L-prolina, P5C, L-glutamato ou PBS (controle negativo). A dosagem do ATP intracelular foi realizada, após a lise e incubação com o *kit* comercial *adenosine 5'-triphosphate (ATP) assay mix* (Sigma[®]). A detecção da emissão de luz ($\lambda_{570 \text{ nm}}$) foi realizada em luminómetro de placa. Os valores de ATP nas amostras foram extrapolados a partir de uma curva de calibração com quantidades conhecidas de ATP (Sigma[®]). A porcentagem de ATP foi calculada a partir da razão obtida em comparação com o grupo controle (LIT), considerado como 100%.

2.8.4 Obtenção e caracterização de parasitas super-expressores da *TcP5CDH*

Com o intuito de avaliar se a inserção de uma cópia ectópica da ORF *TcP5CDH*, no parasita, resultaria num fenótipo que estivesse correlacionado à bioenergética ou infectividade do parasita, partimos para a geração de mutantes super-expressores para esta enzima.

A transfecção em *T. cruzi* foi realizada com parasitas na fase exponencial do crescimento (2do dia). As células (4×10^7 parasitas por transformação) foram coletadas por centrifugação (10 min, 1.350 x g) e lavadas duas vezes com PBS estéril, seguindo as mesmas condições de centrifugação. O sedimento resultante foi ressuspensão em 400 μl de solução de eletroporação (140 mM NaCl, 25 mM HEPES, pH 6,5, 0,74 mM Na_2HPO_4) e transferido a uma cubeta de eletroporação *Gene Pulser[®] Cuvette* de 0,2 cm (*BioRad Systems[®]*, USA), previamente incubada no gelo. O DNA foi preparado a partir da construção pTEX-*TcP5CDH*, ou o vetor pTEX vazio como controle (ver secção 2.3.2.4). Para a incubação das células com o DNA de cada construção, primeiramente foram separados 100 μg de DNA para serem precipitados com 3 M acetato de sódio pH 5,2 (1/10 do vol de DNA) e EtOH absoluto (2,5 vol de DNA). A mistura foi centrifugada (10 min, 16.000 x g a 4 °C) e o precipitado foi lavado com EtOH puro até completar o volume total do tubo (1,5 ml). O DNA foi centrifugado novamente (10 min, 16.000 x g a 4 °C), o precipitado foi secado (em esterilidade) e ressuspensão em 15 μl de H_2O mili-Q estéril. Após isso, o DNA foi adicionado à suspensão

celular e a mistura foi incubada no gelo (10 min). A inserção do DNA, no parasita, foi realizada mediante dois pulsos de eletroporação (450 V e 500 μ F), e as amostras incubadas por mais 10 minutos no gelo. As células foram transferidas a garrafas de 25 cm² contendo 10 ml de meio LIT e incubadas a 28 °C para a recuperação dos transformantes. A seleção dos transformantes foi iniciada, após 48 h da eletroporação, pela adição de 250 μ g ml⁻¹ G418. Após 24 h, a concentração de G418 foi aumentada a 500 μ g ml⁻¹. Como grupo controle da transformação foi utilizado uma cultura transformada com água, ao invés de DNA. A progressão da cultura foi acompanhada por contagens sucessivas ao microscópio utilizando a câmara de Neubauer. Transcorridos 15 dias após a transformação (at), as culturas foram diluídas (1:2) em meio LIT fresco, mantendo a concentração de G418 em 500 μ g ml⁻¹. No dia 25 (at) foi feito um repique adicional em meio LIT + 500 μ g ml⁻¹ G418, para completar a seleção dos transformantes. A seleção foi finalizada no dia 36 (at), onde as células do controle estavam todas mortas, enquanto que os transformantes apresentavam células viáveis e a densidade celular aumentou. A partir daí, as células transformadas foram mantidas em meio LIT + 40 μ g ml⁻¹ G418. A presença do episomo foi verificada mediante PCR convencional. A reação de PCR foi realizada como descrito na seção 2.3.1.3, utilizando os oligonucleotídeos T7 e intGAPDH (quadro 2) e 40 ng de DNA genômico total das linhagens wt, pTEX e pTEX-*TcP5CDH*⁺⁺. Como controles foram usados 10 ng de DNA plasmidial da construção pTEX-*TcP5CDH* e do vetor pTEX vazio. Adicionalmente, foram analisados os níveis do transcrito (qRT-PCR), proteínas (*western blot*) e atividade enzimática TcP5CDH nas linhagens wt, pTEX⁺ e pTEX-*TcP5CDH*⁺⁺.

2.8.4.1 Avaliação do processo de metaciclogênese

Para determinar se a enzima TcP5CDH estaria envolvida no processo de diferenciação, *in vitro*, da forma epimastigota a tripomastigota metacíclica, os parasitas das linhagens wt, pTEX⁺ e pTEX-*TcP5CDH*⁺⁺ foram diferenciados a formas metacíclicas mediante a incubação em meio *Grace's* (Gibco[®]), durante 9 dias a 28 °C. A densidade celular foi determinada em câmara de Neubauer, sendo que o número de formas metacíclicas foi distinguido pela morfologia celular e a posição do cinetoplasto com respeito do núcleo. A razão celular (formas metacíclicas/total de parasitas) foi determinada e a porcentagem de metaciclogênese foi calculada em todos os tratamentos. As comparações foram feitas com respeito ao grupo controle (wt).

2.8.4.2 Avaliação do processo de eclosão de tripomastigotas P5C-dependente

Com o intuito de estabelecer se o P5C pode ser utilizado no processo de adesão/invasão celular, no modelo CHO-k₁, as formas tripomastigotas foram incubadas com diferentes concentrações de P5C e o número de tripomastigotas liberados ao meio de cultura foi registrado. As células foram distribuídas em placas de 24 poços (5 x 10⁴ células por poço) e incubadas durante 24 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂. Após as células se aderirem nos poços, estas foram lavadas com PBS e incubadas com formas tripomastigotas do parasita, mantendo uma proporção parasita/CHO-k₁ (40:1), durante 4 h a 37 °C. O P5C foi preparado como descrito na secção 2.7.1, e diluído, em PBS suplementado com 10% SFB (v/v) (PBS-soro), a concentrações finais de 20, 50, 100 µM. Como grupos controle foram realizados tratamentos adicionais com RPMI-10% SFB, PBS-soro, PBS-soro acrescentado do solvente para o P5C (0,25 M HCl). Todas as preparações foram realizadas em volume final de 500 µl. As infecções foram incubadas durante seis dias a 33 °C sob atmosfera de CO₂, fazendo duas trocas de meio RPMI-2% SFB (v/v). O número total de formas tripomastigotas, liberadas ao sobrenadante do meio de cultura, foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer (SILBER et al., 2002).

2.8.4.3 Determinação do consumo de oxigênio

A taxa de consumo de oxigênio foi medida polarograficamente em oxígrafo de alta-resolução (Oroboros, *Oxygraph* – O₂K). O eletrodo foi calibrado com oxigênio atmosférico, entre 0 a 100% de saturação a 28 °C. Aproximadamente 5 x 10⁷ parasitas ml⁻¹ foram adicionadas ao meio de respiração contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM de MgCl₂, 2 mM de K₂HPO₄, seguida por adições sequenciais de 5 mM de succinato (substrato para o complexo II), 500 µM de EGTA, e 30 µM de digitonina. Outras adições encontram-se detalhadas nas legendas das figuras.

2.8.4.4 Síntese de ATP (método radioativo)

A síntese de ATP foi determinada medindo-se a incorporação de ³²Pi em [γ -³²P]ATP (VERCESI et al., 1990). Estes experimentos foram realizados nas mesmas condições já descritas para o consumo de oxigênio e $\Delta\psi_m$, em um meio de reação contendo 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM de MgCl₂, 2 mM de

K_2HPO_4 , 30 U ml^{-1} de hexocinase, 20 mM de glicose e 10 mM de 5' adenosina monofosfato (AMP), seguida por adições sequenciais de 5 μM de carboxiatractilósido (CAT), 500 μM de EGTA, 30 μM de digitonina, 5 $\mu g\ ml^{-1}$ de oligomicina, 5 μM de antimicina-A e outras adições como indicado nas legendas das figuras. O volume final da reação foi de 500 μl , obedecendo a proporção do número de células pela concentração de digitonina. A reação foi iniciada com a adição de 10 μl de células, até uma concentração final de 5×10^7 células ml^{-1} . Após 30 minutos, a reação foi parada com a adição de 400 μl de molibdato. O excesso de $^{32}P_i$ não incorporado ao ATP, na presença de molibdato forma o complexo fosfomolibdato que então foi removido com o solvente orgânico acetato de butila.

2.8.4.5 Dosagem de peróxido de hidrogênio

A produção de H_2O_2 por células intactas ou permeabilizadas de *T. cruzi* foi determinada pelo método de oxidação utilizando a sonda fluorescente *Amplex Red* (Sigma[®]) na presença de peroxidase de rabanete (Sigma[®]), no qual as células são impermeáveis. Este método permite medir a liberação de H_2O_2 pela célula sob condições fisiológicas reais (VOTYAKOVA; REYNOLDS, 2004). As células (5×10^7 parasitas ml^{-1}) foram incubadas em tampão de reação: 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM de $MgCl_2$, 2 mM de K_2HPO_4 , seguida por adições sequenciais de 5 mM de succinato, 500 μM de EGTA, 30 μM de digitonina, 1,7 μM de *Amplex Red* (Invitrogen[®], USA) e 6,7 U ml^{-1} de peroxidase de rabanete. A fluorescência foi monitorada durante 30 min em espectrofotômetro de fluorescência ($\lambda_{excitação}$ 563 nm e $\lambda_{emissão}$ 587 nm). A reação foi iniciada pela adição de células. As concentrações de H_2O_2 foram obtidas a partir de uma curva-padrão através de concentrações conhecidas de H_2O_2 . Os resultados foram normalizados pelo número de células e expressos em pmol de H_2O_2 $\times 10^7$ células. Os experimentos descritos nas seções 2.8.4.3 – 2.8.4.5 foram realizados em colaboração com o laboratório do Professor José Roberto Meyer-Fernandes (UFRJ).

2.8.4.6 Análise dos níveis de TcGP82

A glicoproteína de 82 kDa é uma molécula de superfície que pertence à família das transialidases e que participa do processo de invasão do parasita na célula hospedeira (SCHENKMAN et al., 1993). Portanto, a detecção da TcGP82, com o anticorpo 3F6, pode ser

considerada como um marcador celular de moléculas que participam na adesão e invasão celular (MANQUE et al., 2003). Os níveis de TcGP82 foram então analisados por *western blot*, em formas epimastigotas e tripomastigotas metacíclicas, obtidas a partir de parasitas wt e os mutantes pTEX-*TcP5CDH*⁺⁺. Os extratos protéicos foram preparados a partir de 2×10^7 parasitas, que foram crescidos e purificados como descrito na secção 2.2.1. As proteínas foram resolvidas em um gel SDS-PAGE 12% e transferidas a membranas de nitrocelulose. O anticorpo monoclonal 3F6, produzido em camundongo (gentilmente cedido pela Prof. Dra. Nobuko Yoshida), foi diluído (1: 1.000) em PBSTL e incubado durante 16 h a 4°C, sob constante agitação. O revelado foi feito como descrito anteriormente.

2.9 Avaliação da enzima TcP5CDH como um possível alvo terapêutico

Relatos da literatura descrevem que o dissulfeto de tetraetiltiurano (DSF) age como inibidor da enzima TcP5CDH presente em células de placenta humana (FARRES; JULIA; PARES, 1988).

2.9.1 Ensaio de proliferação celular com DSF

O efeito do DSF no parasita foi avaliado mediante curvas de crescimento, em formas epimastigotas crescidas em meio LIT, na presença de concentrações crescentes de DSF (0,1 - 5 μ M). Os parasitas ($2,5 \times 10^6$ células ml^{-1}) foram misturados com as diferentes concentrações de DSF (dissolvido em DMSO/EtOH/H₂O, 10:70:20), distribuídos em placas de 96 poços e incubados a 28 °C durante sete dias. A densidade celular foi monitorada diariamente pela leitura da absorvância ($\lambda_{620 \text{ nm}}$). A concentração que reduz ao 50% o crescimento celular (IC₅₀) foi determinada no quinto dia de crescimento em todos os tratamentos e comparadas ao controle sem droga (C). Os valores de concentração celular foram convertidos a porcentagem de inibição utilizando a seguinte equação (7):

$$\% \text{ inibição} = \frac{\{[\text{células}]_{C-} - [\text{células}]_{\text{amostra}}\} * 100}{[\text{células}]_{C-}}$$

Os valores de% inibição (eixo-y) *versus* concentração de DSF (eixo-x) foram representados num gráfico e ajustados à função sigmóide usando o software *OriginPro v8.0* (Originlab[®]) para o cálculo da IC₅₀.

2.9.2 Avaliação do efeito do DSF no processo de metaciclogênese

Para determinar se o DSF poderia estar envolvido no processo de metaciclogênese, formas epimastigotas (5×10^8 células ml^{-1}) foram diferenciadas em formas metacíclicas mediante a incubação em meio *Grace's* (Gibco®), durante 9 dias a 28 °C, na presença de DSF (0, 0,5 μM , 1 μM , 2 μM). A densidade celular foi determinada em câmara de Neubauer, sendo que o número de formas metacíclicas foi distinguido pela morfologia celular e a posição do cinetoplasto com respeito do núcleo. A razão celular (formas metacíclicas/total de parasitas) foi determinada e a porcentagem de metaciclogênese foi calculada em todos os tratamentos. O grupo controle (sem droga) foi considerado como referência (100%) e o efeito na metaciclogênese foi determinado comparando-o com os outros tratamentos.

2.9.3 Avaliação do efeito de DSF na eclosão de formas tripomastigotas metacíclicas

O efeito do DSF no processo de eclosão de formas tripomastigotas, provenientes do ciclo intracelular do parasita, foi avaliado como descrito na seção 2.8.4.2. Para isto, foram testadas as concentrações de 0,5 e 1 μM de DSF dissolvido em EtOH/DMSO/H₂O (70:20:10). Como grupo controle foram utilizados: parasitas crescidos em RPMI-10% SFB, PBS-10% SFB e PBS- 10% SFB + veículo do DSF.

2.9.4 Ensaio de atividade TcP5CDH com DSF

A atividade enzimática para a TcP5CDH, de origem recombinante, foi determinada na presença de concentrações crescente do DSF (0 – 2 μM). A enzima pura (10 μg) foi incubada com o DSF durante 3 min e a reação foi iniciada pela adição do P5C. Como branco da reação foi utilizado 0,25 M HCl ao invés do substrato. A atividade específica foi calculada usando o $\text{CEM}_{\text{NADH}} = 6.220 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ e a % de inibição foi determinado em cada concentração de DSF sendo que o 100% corresponde à atividade na ausência de DSF.

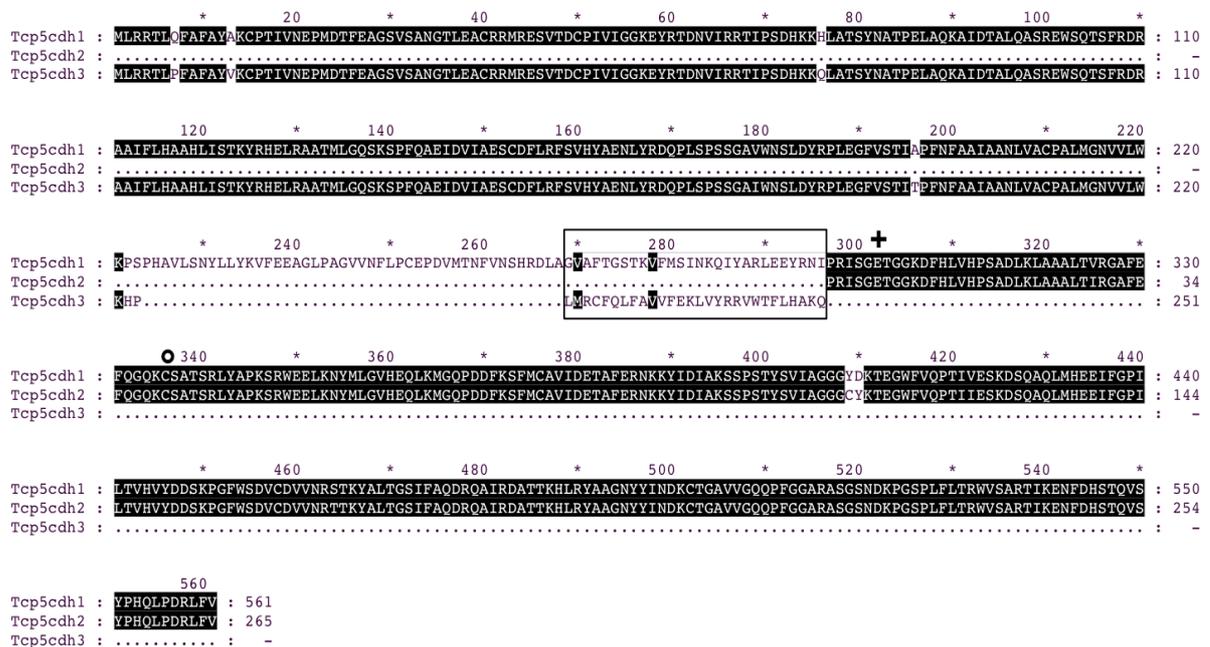
CAPITULO III
RESULTADOS

3.1 Predições *in silico*

3.1.1.1 O genoma de *T. cruzi* contém três sequências de DNA putativas para a enzima TcP5CDH

A busca na base de dados para tripanossomatídeos (TrypripDB) revelou três sequências cujo produto gênico é a enzima Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (*TcP5CDH*). Os códigos de acesso para essas sequências, no genoma de *T. cruzi* (cepa CL-Brener), são: Tc00.1047053510943.50, Tc00.1047053509351.10 e Tc00.1047053503577.9, as quais serão aqui nomeadas como: *TcP5CDH1*, *TcP5CDH2* e *TcP5CDH3*, respectivamente. A porcentagem de identidade entre as sequências previstas de aminoácidos (aa) para TcP5CDH1 (561 aa) e TcP5CDH2 (265 aa) foi de 98%, e, entre TcP5CDH1 e TcP5CDH3 (251 aa) de 86% (Figura 1).

Figura 1- Alinhamento múltiplo das sequências TcP5CDH anotadas no genoma de *T. cruzi* (tritrypdb.org)

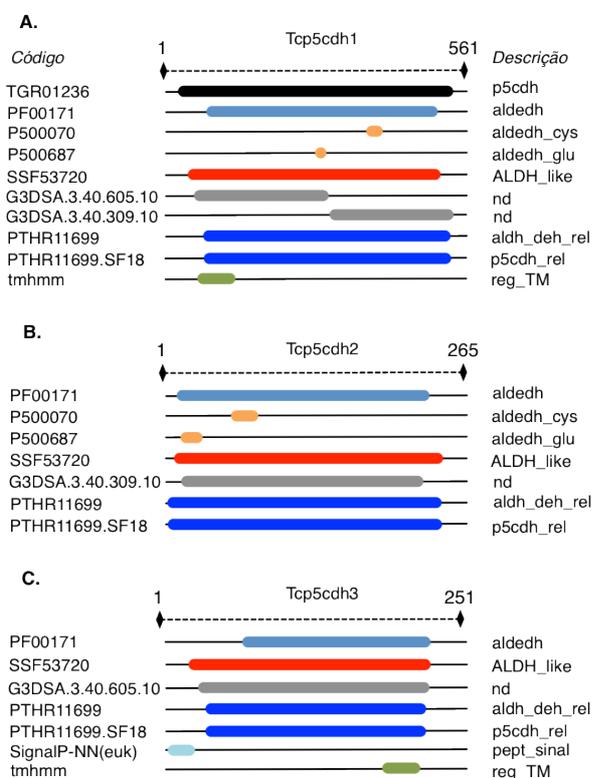


Em preto denota-se os resíduos que são idênticos, e os pontos indicam os *gaps* do alinhamento. Os resíduos putativos para o sítio catalítico indicam-se com + (glu³⁰²) e ° (cys³³⁶). No quadro indica-se a região de 28 aas (28A) que é ausente na sequência TcP5CDH1. As sequências foram alinhadas com a ferramenta *CLUSTALW2* utilizando a matriz de alinhamento ID e o método de agrupamento UPGMA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>).

Na busca de domínios funcionais para estas sequências, observou-se, claramente, que a sequência TcP5CDH1 possui todos os domínios próprios de P5CDHs e da família aldeído desidrogenase s (ALDH) (Figura 2A). Já as sequências TcP5CDH2 e TcP5CDH3 correspondem às regiões C-terminal e N-terminal, respectivamente da TcP5CDH1 (Figura 2B e 2C). A única diferença, própria da sequência TcP5CDH3, foi observada no extremo C-terminal (28 aas) (Figura 1). Quando realizada a busca para identificação do domínio 28A, este apresentava características de peptídeo sinal, segundo o algoritmo SignalP-NN (Figura 2C). Entretanto, a busca por similaridade (BLASTP) na base de dados para proteínas (UniprotKb) revelou uma identidade de 73% com o extremo N-terminal da enzima *N*-acetiltransferase de *Chlorobaculum parvum* (código de acesso B3QKZ8). Isto indica que a proteína TcP5CDH3 possui uma identidade de 86% com a sequência TcP5CDH1, mas a principal divergência está no C-terminal onde encontra-se o domínio aqui chamado 28A.

A sequência TcP5CDH3 carece dos resíduos catalíticos putativos característicos para a P5CDH (Figura 1, 2A). Porém, as sequências TcP5CDH1 e TcP5CDH2 apresentaram os dois resíduos, Glu³⁰² e Cys³³⁶ (Figura 2A e 2C), que correspondem aos sítios de ligação ao substrato, como descrito em Arqueia (INAGAKI et al., 2006).

Figura 2 - Domínios proteicos encontrados para as sequências TcP5CDHs



A busca foi realizada na base de dados *InterProscan* com as sequências completas de aas (TcP5CDH1, TcP5CDH2 e TcP5CDH3) utilizando parâmetros por defeito. Os códigos de acesso nas bases de dados Pfam (PF), *InterProscan superfamily* (SSF), CATH *superfamily* (G3DSA), *pantherdb* (PTHR) estão mostrados à esquerda. As sequências também apresentaram características de peptídeo sinal e regiões transmembrana (reg-TM), segundo os algoritmos *SignalP* e *tmhmm*. O nome dos domínios (minúscula) ou superfamílias proteicas (maiúscula) estão indicados à direita.

Análises posteriores, utilizando como referência a sequência de aas para TcP5CDH1, mostraram distintas regiões conservadas, com as suas correspondentes ortólogas, em outras espécies (Figura 3). O extremo N-terminal, por exemplo, não apresentou características de peptídeo sinal para o direcionamento à mitocôndria, segundo o observado nas três ferramentas utilizadas (TargetP, SignalP, Predotar) (Figura 3A). Nos três casos, o resultado foi ambíguo, pois apesar da TcP5CDH1 não possuir uma região de clivagem, foi observado que esta proteína pode ter uma localização citosólica ou mitocondrial com valores semelhantes. No entanto, quando esta região foi analisada em detalhe (manualmente) foram observados os motivos proteicos M/LRR e regiões ricas em Ala (FAFAYA) na sequência da TcP5CDH (Figura 3B). Estes domínios tem sido reportados como assinaturas proteicas próprias de proteínas mitocondriais para essa espécie (KRNACOVA et al., 2012).

ao sítio de clivagem, predito na posição Thr¹⁷, corresponderiam ao PDm da TcP5CDH. A Thr¹⁷ se encontra uma posição antes do sítio Asn¹⁵ (TcPRODH), como observado no alinhamento (Figura 3C). A TcPRODH é uma proteína mitocondrial, cujo extremo N-terminal foi predito como PDm pela presença de uma folha-beta, seguida de uma hélice-alfa (PAES, L. S., 2010).

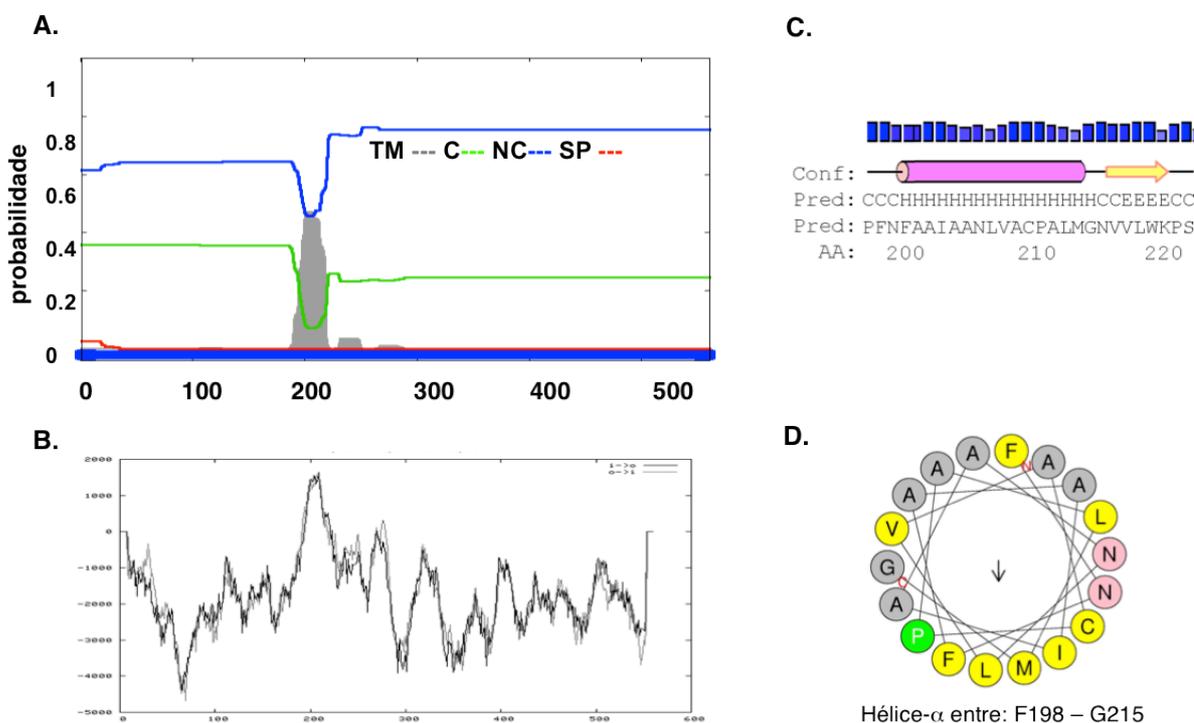
Ao compararmos a mesma região com a sequência da TbP5CDH se observaram as substituições Q7P, Y12F, A13V, C15S, T17P, I18A e A28P (Figura 3A, painel direita). Dessas substituições, a Gln⁷ e Thr¹⁷ da TcP5CDH são substituídas por Prol, nos dois casos para a TbP5CDH, e a Ala¹³ foi substituída por Val¹³ na TbP5CDH. Este último resíduo foi predito como sítio de clivagem através da ferramenta MitoProt-II.

Também foi visto que a TcP5CDH apresenta uma região com características de domínio transmembrana (hTM) (Figura 3D, 4A). A hTM apresenta algumas diferenças com a TbP5CDH, sendo ausente em LmP5CDH (Figura 3D).

Os sítios catalíticos Glu³⁰² e Cys³³⁶ estão conservados em todas as sequências alinhadas (INAGAKI et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2010; SRIVASTAVA et al., 2012) (Figura 3D).

Uma análise detalhada para a busca de domínios TM, mediante as ferramentas Phobius e TMpred, mostrou a presença de duas hTMs entre as posições Phe²⁰⁰ – Trp²²⁰ e Phe²⁶⁰ - Ile²⁸² (Figura 4A, B). Segundo o programa TMpred, as hTMs estariam orientadas do lado externo ao lado interno, sendo que o extremo N-terminal ficaria do lado de fora da membrana (Figura 4B). Quando analisadas em detalhe, constatou-se que essa região formaria uma hélice-alfa seguido de uma folha-beta (Figura 4C) compostas, principalmente, de aminoácidos hidrofóbicos (Figura 4D). A presença da Prol²¹¹ limita a probabilidade (0,5) de que esta região seja um domínio TM (Figura 4A).

Figura 4 - Análise da região predita como hélice transmembrana (hTM) para a TcP5CDH



A) Predição da localização celular para TcP5CDH mediante a ferramenta *Phobius* (ebi.ac.uk). Na esquerda mostra-se a escala de probabilidade para uma região TM, citosólica (C), não citosólica (NC) ou com peptídeo sinal (SP), sendo 1 o valor máximo de probabilidade. B) Predição de hélices transmembrana para a TcP5CDH através da ferramenta TMpred (HOFMANN; STOFFEL, 1993). C) A região destacada em rosa corresponde aos resíduos que formam a hélice-alfa (Phe²⁰⁰ - Gly²¹⁶), seguido de uma folha-beta (Val²¹⁷ - Trp²²⁰) indicada pela seta amarela no domínio hTM. A predição da estrutura secundária foi obtida através do programa PSIPRED (MCGUFFIN; BRYSON; JONES, 2000). D) O domínio predito como hTM possui uma face hidrofóbica composta de IMLFPAGVAAFAAL. O índice de hidrofobicidade foi de 0,786, e a hélice-alfa não apresenta uma carga neta = 0, como visto pelo programa *heliQuest*.

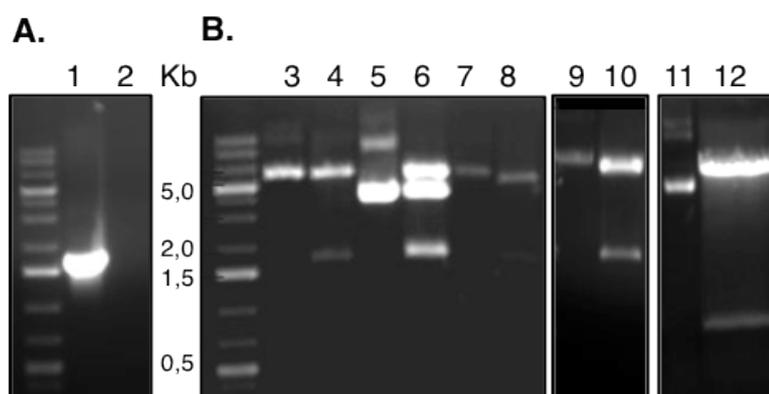
A composição dos aminoácidos para a TcP5CDH foi analisada mediante a ferramenta *ProtParam* (ExPASy.org) (GASTEIGER et al., 2005). Do total de aminoácidos para TcP5CDH1 (561 aas), os 10,7% dos resíduos são Ala. A soma dos resíduos carregados positivamente (Glu + Asp) foi de 59, enquanto que os resíduos carregados negativamente (Lys + Arg) foram 61. O ponto isoelétrico, teórico, foi de 7,95 e a massa molecular predita foi de 62.476,8 Da. O coeficiente de extinção molar calculado, assumindo que os resíduos de cisteína (10 no total) estão reduzidos, foi de 71.905 M⁻¹ cm⁻¹ a 280 nm em água. O índice de hidropaticidade (GRAVY) foi de -0,274, segundo o algoritmo reportado previamente (KYTE; DOOLITTLE, 1982).

3.2 Avaliação funcional da sequência *TcP5CDH1*

3.2.1 O genoma do parasita apresenta uma sequência de DNA (1,686 Kb) que codifica para a *TcP5CDH*

Como esperado, o produto de DNA amplificado por PCR com os oligonucleotídeos Tc1 apresentou um tamanho aproximado de 1,7 Kb (Figura 5A). Após o sequenciamento total deste fragmento, observou-se que a ORF *TcP5CDH* contém 1686 pb. A sequência de aminoácidos obtida (código de acesso: ABC123) apresentou um 99% de identidade com a depositada no genoma do *T. cruzi* (código UniProtKb: Q4DRT8). Com o produto *TcP5CDH* clonado nos diferentes vetores, procedeu-se com as correspondentes análises funcionais (Figura 5B).

Figura 5 - Fragmentos de DNA utilizados nas correspondentes clonagens



A) Amplificação por PCR para a ORF *TcP5CDH*. 1- Produto de PCR *TcP5CDH* (tamanho aprox. 1,7 Kb), 2- controle negativo da PCR. B) Digestão enzimática de fragmentos de DNA (3 - 12). 3- construção pYES-*TcP5CDH*, 4- construção pYES-*TcP5CDH* digerida com *Bam*HI - *Xho*I, 5- construção TOPO 2.1-*TcP5CDH*, 6- construção TOPO 2.1- *TcP5CDH* digerida com *Eco*RI, 7- construção pET24-*TcP5CDH*, 8- construção pET24-*TcP5CDH* digerida com *Bam*HI - *Xho*I, 9- construção pTEX-*TcP5CDH*, 10- construção pTEX-*TcP5CDH* digerida com *Bam*HI - *Xho*I, 11- construção pZJM-*Tb5'P5CDH*, 12- construção pZJM-*Tb5'P5CDH* digerida com *Sal*II - *Hind*III. O marcador de peso molecular de DNA foi o *1 Kb DNA plus ladder* (Fermentas®, Lituania). As amostras de DNA foram resolvidas em gel de agarose, coradas com BrEt e visualizadas sob luz UV.

3.2.2 A sequência *TcP5CDH* complementa a atividade enzimática em uma cepa de levedura defeituosa no gene ortólogo (*PUT2*)

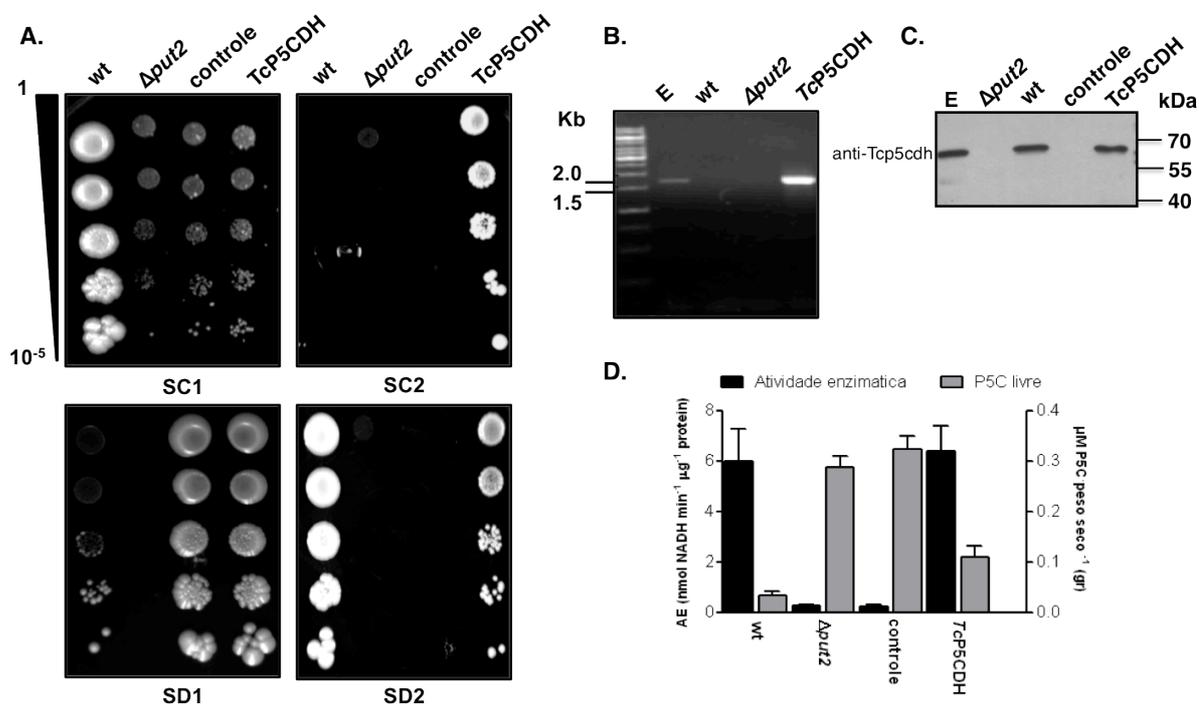
A construção pYES-*TcP5CDH* foi utilizada para a transformação da cepa de levedura aqui nomeada como controle. Esta cepa foi previamente modificada mediante a inserção das construções pYE_{p351} e pYES-*HIS3*, resultando na cepa controle Δ *PUT2 LEU2*⁺ *HIS3*⁺

(Quadro 1). Após obtido esse controle, foi realizada a inserção da ORF *TcP5CDH*. A avaliação fenotípica foi feita, inicialmente, em meios sintéticos completo (SC) e definido (SD). O meio SC contém todos os aminoácidos necessários para o crescimento da levedura em meio definido. No meio SC1, observou-se que a levedura wt cresce em maior proporção, com respeito às leveduras mutantes (Figura 6A). Já no meio SC2, um meio completo sem adição de uracila, que contém G418, e, prolina como fonte de nitrogênio, o crescimento foi restrito às leveduras carregando o gene *TcP5CDH*. Entretanto, a capacidade de crescimento também foi evidenciada no meio depletado (SD), cujos únicos requerimentos essenciais são uma fonte de enxofre, de carbono e de nitrogênio. Assim, as leveduras, mesmo mutantes, cresceram em meio SD1 contendo sulfato de amônia, usada como fonte ideal de nitrogênio (Figura 6A, SD1). Quando a fonte de nitrogênio é substituída por prolina, somente a levedura wt e a *TcP5CDH* são capazes de crescer (Figura 6A, SD2).

A confirmação dos resultados observados na avaliação fenotípica foi feita pela análise posterior dos níveis de RNA para a ORF em estudo. A partir de amostras de RNA total das leveduras utilizadas, foi amplificado o fragmento *TcP5CDH* na levedura complementada (aprox. 1,7 Kb). Observou-se também que não há amplificação cruzada com o DNA da levedura wt (Figura 6B). Posteriormente, o soro policlonal anti-TcP5CDH permitiu a detecção da proteína TcP5CDH na cepa complementada, assim como, na isoforma ScP5CDH da levedura wt (massa esperada de aprox. 64 kDa) (Figura 6C).

Para determinar a funcionalidade do produto gênico inserido na levedura mutante, foi determinada a atividade enzimática (AE) em cada uma das cepas. Como observado, a levedura wt apresentou uma AE semelhante ($5,9 \pm 1,4 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$) à apresentada pela levedura complementada ($6,4 \pm 0,9 \text{ nmol min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$), enquanto que nas cepas mutantes ΔPUT2 e controle, essa atividade é ausente (Figura 6D). Além disso, os níveis de P5C livre se mantêm normais na cepa wt. Quando o gene *PUT2* foi interferido, nas cepas mutante e controle, este aumentou, mas este consegue voltar a níveis normais quando a enzima TcP5CDH se encontra funcional (Figura 6D).

Figura 6 - Ensaio de complementação funcional em *S. cerevisiae*



A) As leveduras: wt (selvagem), $\Delta put2$, controle e TcP5CDH foram geradas, como descrito na seção materiais e métodos, e crescidas em meios mínimos definidos. Suspensões celulares crescidas em meio líquido (48 h a 28 °C) foram preparadas em água estéril realizando cinco diluições seriadas (1:10) a partir de uma solução cuja $DO_{600} = 1$. Após isso, 3 μ l de cada diluição foram transferidos a placas de meio sólido, sintético completo (SC) suplementado com: uracila (ura), sulfato de amônia (SA) e galactose (gal) (SC1) ou ura⁻, G418 e prolina (prol) (SC2). A avaliação fenotípica foi também realizada no meio sintético depletado (SD) composto de: metionina (met), ura⁻, SA, e gal (SD1) ou met, ura⁻, prol e gal (SD2). As placas de SC e SD foram incubadas durante 2 e 4 dias, respectivamente.

B) Os níveis de transcrito para a TcP5CDH foram analisados por RT-PCR utilizando cDNA, a partir de todas as amostras de levedura utilizadas, em uma reação de PCR convencional com os oligonucleotídeos Tc1, como descrito na seção 2.3.1.3 de materiais e métodos. Após a reação de PCR, 15 μ l do produto de amplificação foram aplicados em gel de agarose como indicado em cada canaleta. Como controle positivo foi usado DNA genômico de formas E de *T. cruzi*. Os fragmentos de DNA no gel foram corados com 0,5 μ g ml⁻¹ BrEt e visualizado sob luz UV.

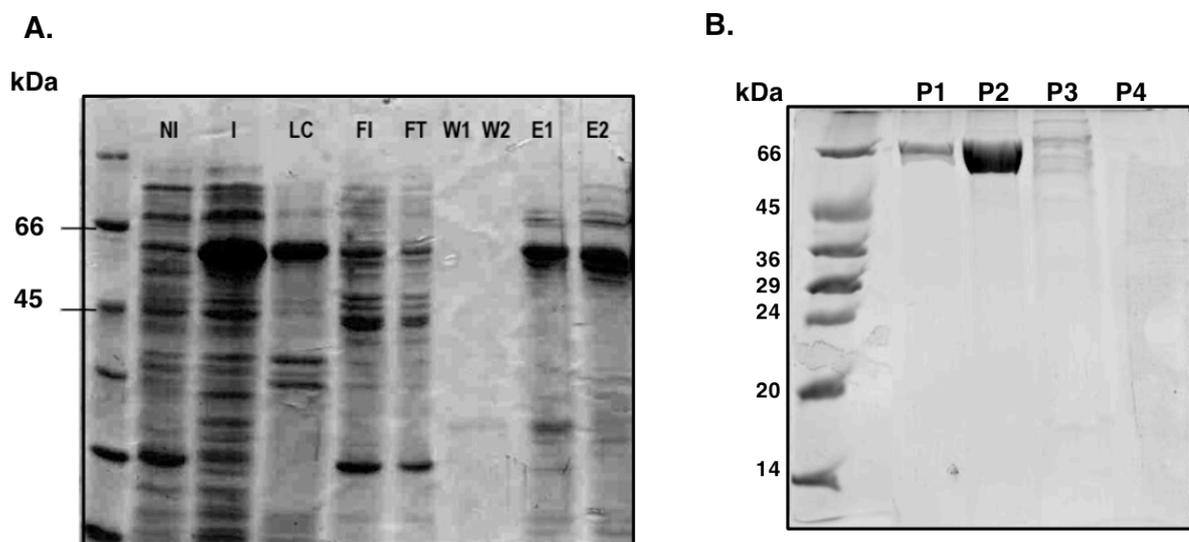
C) Detecção da proteína TcP5CDH mediante a técnica de *western blot*. Amostras proteicas foram preparadas a partir de lisados celulares de cada cepa. As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) e transferidas a membranas de nitrocelulose para a incubação com o soro policlonal anti-TcP5CDH (1:2.000).

D) A análise bioquímica da complementação foi avaliada mediante o ensaio de atividade enzimática para P5CDH, assim como, pela dosagem dos níveis intracelulares de P5C. Para a medição da atividade enzimática foi usado o tampão de reação P5C com 0,6 mM de P5C sintético e completando até 3 ml com água. A reação foi iniciada pela adição de 100 μ g de extrato proteico total de cada cepa, previamente crescidas em 500 ml de meio líquido SC1 (wt e $\Delta PUT2$) ou SC2 (controle e TcP5CDH), e o aumento na absorvância ($\lambda_{340\text{ nm}}$) foi registrado durante 5 min, a 28 °C, sob constante agitação. A dosagem do P5C livre foi realizada pela reação com o reagente *o*-aminobenzaldeído (*o*-AB OAB) e os valores foram expressos em unidade de concentração (μ M) com respeito à biomassa celular obtida (gr). O gráfico de barras indica os valores de atividade específica (AE) no eixo-y (esquerda) e os valores de concentração de P5C no eixo-y (direita) em cada cepa testada. As barras representam os valores obtidos em duas replicas do experimento (n=3) e o desvio padrão calculado pelo programa *GraphPad Prism v5.01* (*GraphPad Software, USA*).

3.2.3 A enzima recombinante TcP5CDH é uma proteína oligomérica

Diferentes tentativas de indução e purificação da TcP5CDH foram realizadas. Somente quando esta foi expressa como produto de fusão à cauda de seis histidinas no extremo C-terminal (TcP5CDH-6xHis), e utilizando a cepa de *E. coli* BL21-codon plus-pGro7, se obtiveram os melhores rendimentos (0,9 mg de proteína x l de meio LB). Dessa forma se obteve um produto de expressão com massa molecular esperada (aproximadamente 66 kDa) (Figura 7A, B) e enzimaticamente ativo. A indução da expressão de TcP5CDH-6xHis foi realizada com 200 μ M de IPTG, e recuperada na fração solúvel após a lise bacteriana (Figura 7A). Quando este lisado foi passado através da resina de Níquel-NTA observou-se uma baixa quantidade de proteína não ligada à resina que saiu na fração FT (Figura 7A). Portanto, as concentrações de imidazole foram padronizadas como 20 mM e 100 mM para os passos de lavagem e eluição, respectivamente.

Figura 7 - Expressão e purificação da enzima TcP5CDH-6xHis

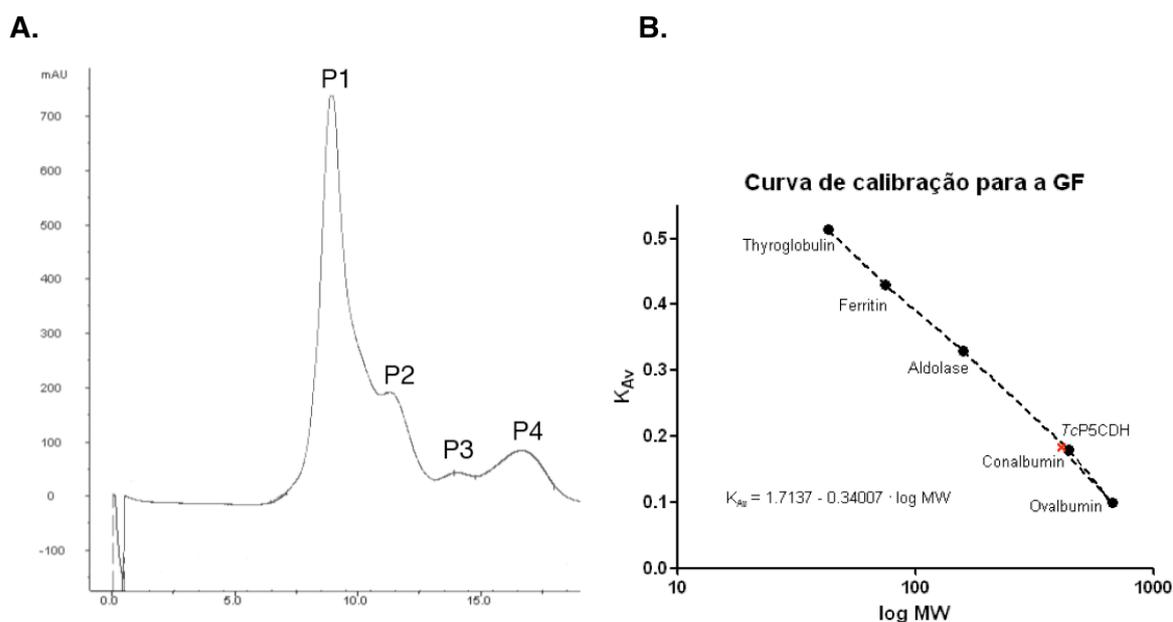


A) Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 10%) com amostras coletadas durante a purificação através da cromatografia de afinidade (Ni-NTA). 1- Marcador de peso molecular não pré-corado (Fermentas[®]), NI: alíquota de cultura não induzida (BL21 CodonPlus pGro7 pET24/TcP5CDH-6xHis), I: alíquota da cultura induzida com 200 μ M de IPTG, LC: lisado clarificado após centrifugação, FI: fração insolúvel após a lise, FT: fração coletada logo após a passagem do LC pela coluna de Níquel-NTA (Quiagen[®]), W1: fração coletada após a primeira lavagem com tampão de *binding*, W2: fração coletada após a segunda lavagem com 6 volumes de tampão de lavagem (20 mM de imidazole), E1: fração (1 ml) correspondente ao eluato 2 após a eluição com 6 volumes de tampão de eluição (100 mM imidazole), E2: fração correspondente ao eluato 3. B) Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE 12%) a partir das frações purificadas mediante a cromatografia de exclusão por tamanho molecular. Os picos P1, P2 e P3 correspondem às frações observadas na figura 8A.

Devido ao fato de que nos ensaios prévios de purificação por cromatografia de afinidade a enzima TcP5CDH era coeluída junto com proteínas contaminantes, foi necessária uma separação posterior utilizando a técnica de cromatografia de exclusão por peso molecular em gel filtração (GF).

As frações E1 e E2 de TcP5CDH-6xHis (Figura 7A) foram submetidas à GF, onde se obtiveram quatro frações nomeadas como P1 - P4 (Figura 7B). Essas frações correspondem aos picos P1, que possui um ombro (P2), e outros dois picos nomeados de P3 e P4, como indicado no cromatograma resultante ($\lambda_{280\text{ nm}}$) (Figura 8A). Os volumes de eluição de cada fração foram utilizados para o cálculo da MW, segundo as determinações feitas a partir da curva de calibração (Figura 8B) (Quadro 4).

Figura 8 - Perfil de separação da TcP5CDH-6xHis através da cromatografia de exclusão molecular em gel filtração



A) As amostras das eluições E1 e E2 foram dialisadas e concentradas em tampão 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,2 e 5% glicerol (v/v) para a sua posterior injeção na coluna de gel filtração (*Superdex 200TM 10/300 GL, Amersham, BioSciences*). O cromatograma obtido pelo monitoramento da absorvância ($\lambda_{280\text{ nm}}$) mostrou quatro picos, P1, P2 (ombro), P3 e P4, cujos volumes de eluição foram 8,92, 11,47, 13,90 e 16,66 ml, respectivamente. B) A curva de calibração foi realizada pela corrida de amostras protéicas de massa molecular conhecida (circulo preto) presentes no *High molecular weight kit for gel filtration* (G.E, *Life sciences*). A fração P2 é indicada no gráfico (x), onde se observa uma MW próxima à conalbumina. O eixo-y indica a K_{AV} que depende do volume de eluição de cada amostra. A MW foi calculada a partir da equação apresentada no gráfico, como descrito na seção 5.3.2 de materiais e métodos.

Após o cálculo da MW, também foi possível determinar o radio de Stokes em cada amostra (Tabela 1), como indicado na equação 3 (seção 5.3.2).

Com as frações purificadas na GF, essas foram submetidas ao teste enzimático para TcP5CDH. As atividades específicas determinadas foram 37 ± 3 e 65 ± 5 nmol min⁻¹ µg⁻¹ para as frações P1 e P2, respectivamente.

Tabela 1 - Análise da proteína TcP5CDH-6xHis pela técnica de GF

<i>Amostra</i>	<i>Volume de eluição (ml)</i>	<i>MW (kDa)</i>	<i>Radio de Stokes (nm)</i>
P1	8,92	1.308,2	12,83
P2	11,47	407,7	6,58
P3	13,90	134,2	4,48
P4	16,66	38	2,66

As frações correspondentes aos picos P1 – P4 (Figura 8) foram coletadas e os volumes de eluição (ml) observados na GF foram utilizados para o cálculo da massa molecular e o radio de Stokes. MW: massa molecular.

Após a separação mediante a técnica de GF, as amostras P1 e P2 foram analisadas pela técnica de espalhamento de luz dinâmica (DLS) para compararmos a MW e o radio de Stokes observados previamente. No ensaio de GF, a fração P2 mostrou uma MW consistente com o observado na técnica de DLS (Tabela 2). Já na fração P1, houve uma diferença significativa entre a MW obtida na técnica de GF (1.308,2 kDa), com respeito ao observado no DLS (776,9 kDa) (Tabelas 1 e 2).

Tabela 2 - Análise dos picos P1 e P2 pela técnica de DLS

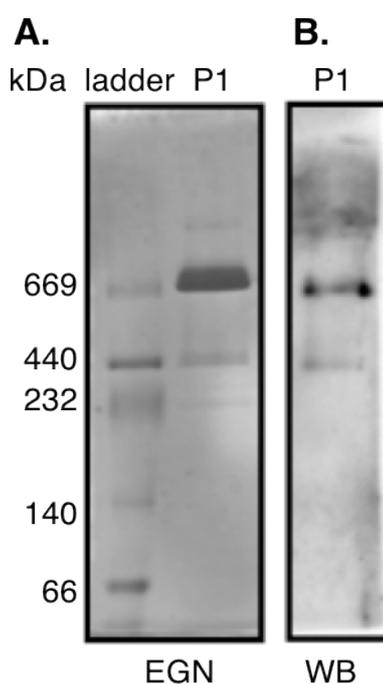
<i>Amostra</i>	<i>Volume GF (ml)</i>	<i>MW (kDa)</i>	<i>Radio de Stokes (nm)</i>	<i>Dispersidade do pico</i>
P1	8,92	776,9	10,23	Monodisperso
P2	11,47	406,1	7,75	Polidisperso

Os valores para o radio de Stokes mostraram diferenças de aproximadamente 3 unidades para P1 e 1 para o P2 (Tabelas 1 e 2). O pico observado para a amostra P1 foi monodisperso, enquanto que para o P2 foi polidisperso (Tabela 2).

A fração P1 foi resolvida em eletroforese de proteínas em gel nativo (EGN). O perfil de migração observado para essa fração mostrou quatro bandas com diferentes pesos moleculares e intensidade (Figura 9A). Dessas quatro bandas, somente duas, cuja massa

molecular aproximada foi de 669 e 440 kDa, respectivamente, mostraram reatividade positiva contra o anti-TcP5CDH (Figura 9B). Esse resultado se correlaciona com as observações para o MW, segundo o ensaio de DLS, nas frações P1 e P2 (Tabela 2). Nas condições de corrida para EGN não foi possível detectar a forma monomérica (aprox. 64 kDa) da TcP5CDH-6xHis.

Figura 9 - Análise da fração P1 sob condições não desnaturantes



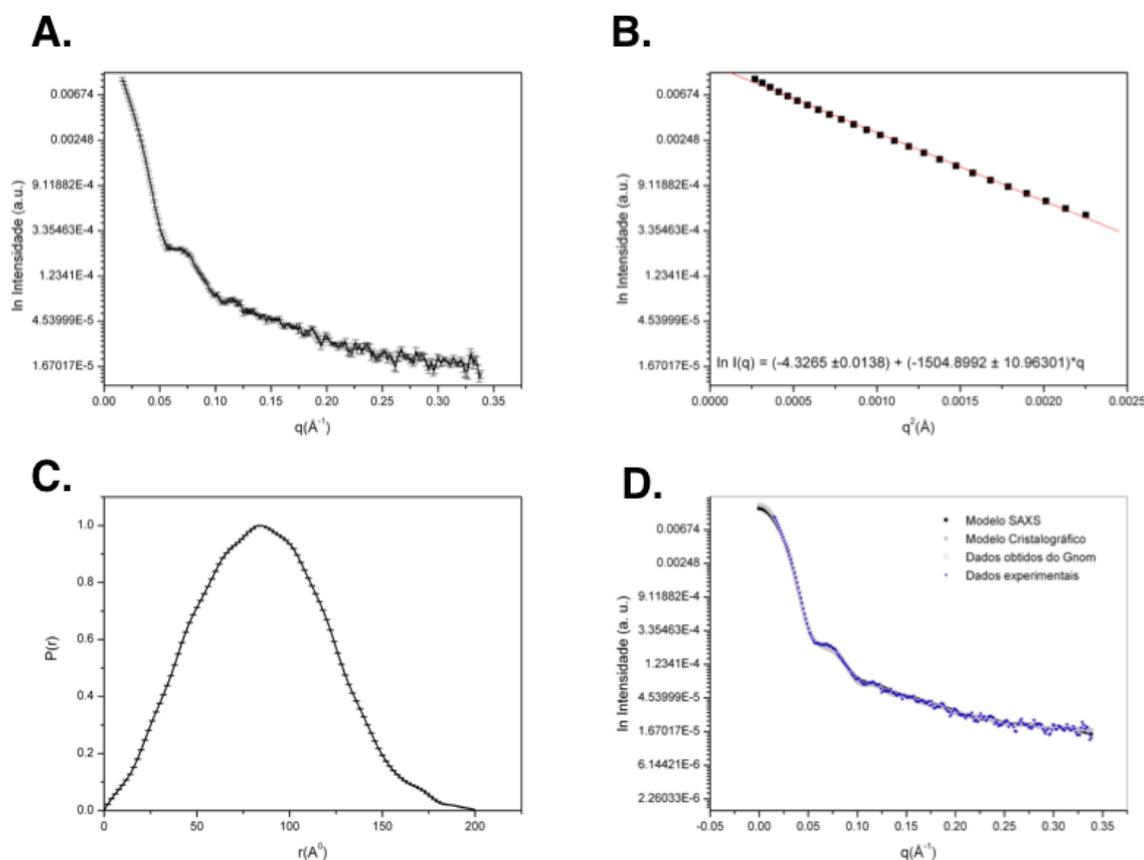
A) Eletroforese de proteínas em gel nativo (EGN). Oito μl do marcador de peso molecular *HMW native ladder* (G.E, Life Sciences) foram aplicados no gel. Cinco μg da fração P1 foram misturados com tampão de amostra para EGN (5% azul de Coomassie G-250 p/v dissolvido em 0,75 M ácido aminocapróico) e resolvidos em gel nativo de acrilamida: bis-acrilamida (gradiente 5 – 15%). B) Análise por *western blot* do P1. Após a corrida de EGN, as proteínas foram eletrotransferidas a membranas de nitrocelulose e incubadas com o anti-TcP5CDH dissolvido em PBST + 5% leite (1:3.000). O revelado foi realizado seguindo o procedimento padrão previamente descrito.

Tendo visto que tanto as frações P1 e P2 mostraram uma massa molecular própria de uma proteína oligomérica (< 440 kDa), partimos para outras análises da proteína em solução. Considerando as discrepâncias observadas com a fração P1 (GF, DLS e EGN), e visto que, o ombro dessa fração (P2) mostrou maior atividade enzimática do que P1, realizamos as análises de difração de raios-X, em solução e cristais, com a fração P2.

As medições de SAXS foram realizadas com a forma apo (P2) da proteína TcP5CDH em solução (2,5 mg ml⁻¹). As curvas de espalhamento de raios-X e o gráfico de Guinier para a

enzima na forma nativa, estão representados nas Figuras 10A e B, respectivamente. O raio de giro (R_g), calculado pela aproximação de Guinier para TcP5CDH foi de $67,19 \pm 0,15$ Å. As funções de distribuição de distâncias foram obtidas utilizando o pacote de transformação indireta GNOM. A dimensão máxima ($D_{m\acute{a}x}$) e o R_g foram calculados a partir da função de distribuição de distâncias, $P(r)$. Para a TcP5CDH nativa a $D_{m\acute{a}x}$ e o R_g foram de 200 e $(65,21 \pm 0,53)$ Å respectivamente (Figura 10C).

Figura 10 - Análise pela técnica de SAXS para a TcP5CDH em solução

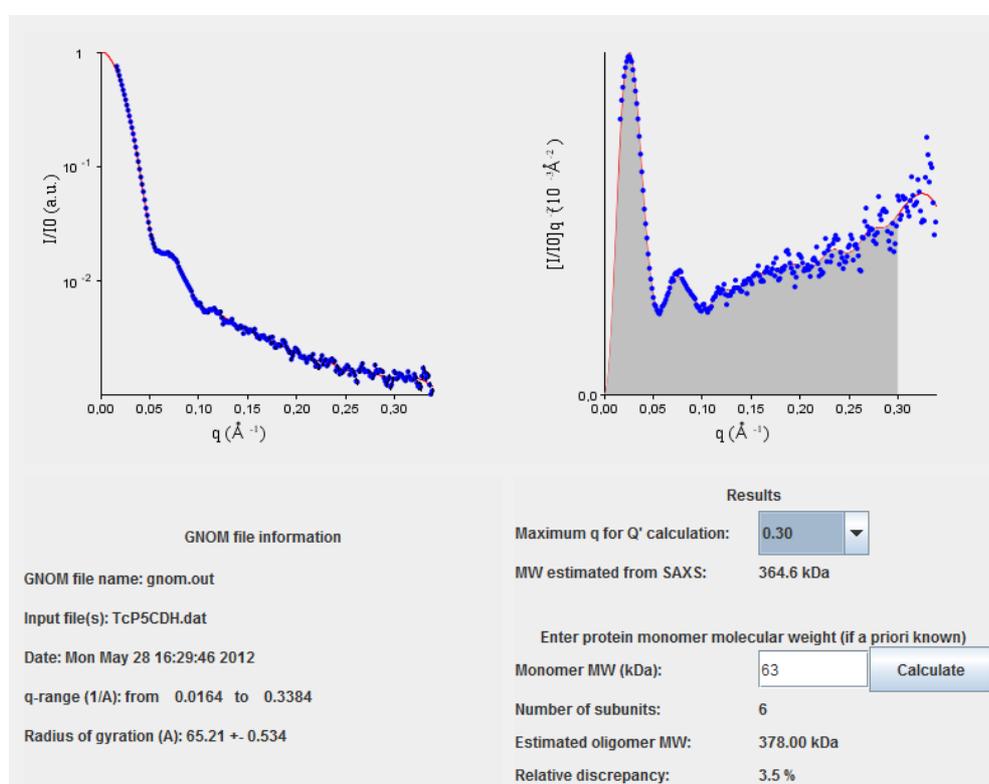


A) Curva de espalhamento para TcP5CDH em solução (2,5 mg ml⁻¹). B) Gráfico de Guinier ($\ln I$ versus q^2) para a TcP5CDH em solução utilizando 25 pontos iniciais. C) Gráfico de $P(r)$ versus r da TcP5CDH obtido pelo software GNOM. D) Sobreposição das curvas de espalhamento obtidas a partir: dos dados experimentais da TcP5CDH, da função de distribuição de distâncias, do modelo de alta resolução da proteína ortóloga em *T. thermophilus* (PDB: 1UZB) e do envelope de SAXS gerado pelo programa GASBOR.

Usando o programa SAXSMoW foi possível estimar a MW e o possível número de subunidades em solução para TcP5CDH (Figura 11). O valor de q ($0,3$ Å⁻¹), obtido na curva de espalhamento experimental, permitiu calcular a MW para o oligômero de TcP5CDH

correspondente a 364,6 kDa. Este valor mostrou uma discrepância do 3,5% com o valor calculado pelo programa, que considera, unicamente, a massa para cada monômero de TcP5CDH (63 kDa), resultando na MW para o oligômero de 378 kDa (Figura 11). De acordo com os cálculos, executados pelo SAXSMoW, para a TcP5CDH nativa, nota-se a existência de 6 subunidades em solução. Esses dados são consistente com as observações feitas, previamente, nos ensaios de GF e DLS.

Figura 11 - Determinação da massa molecular e número de subunidades para a TcP5CDH



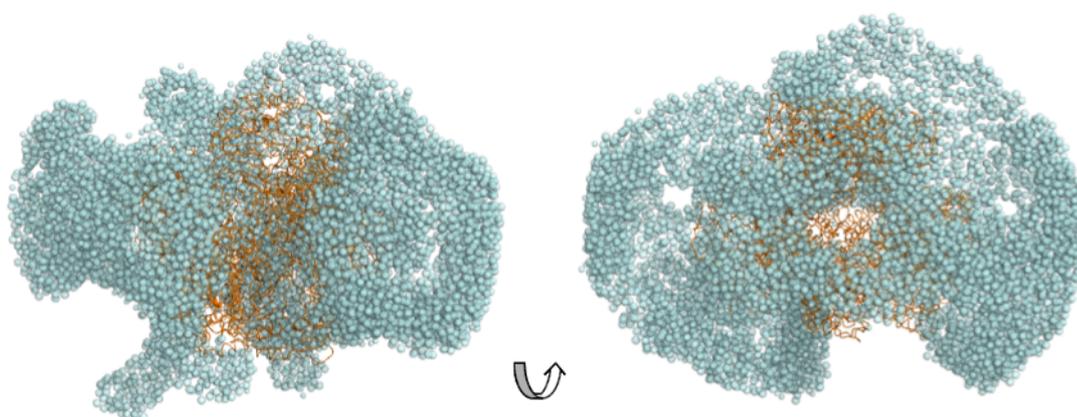
Os dados obtidos pela técnica de SAXS foram utilizados no programa *SAXSMoW* para a determinação da MW e comparados com o valor teórico considerando um oligômero de seis unidades (63 kDa c/u). A discrepância relativa entre as duas estimações para a MW do oligômero foi de 3,5%.

Na ausência de simetria, 10 modelos de átomos *dummy* foram gerados através do programa DAMMIN utilizando 5594 átomos *dummy* para a proteína nativa. O alinhamento do modelo de baixa resolução com o de alta resolução (TtP5CDH, código PDB: 1UZB) foi realizado mediante o programa SUPCOMB (KOZIN; SVERGUN, 2001).

A partir da sobreposição das curvas de espalhamento, ilustrada na Figura 10D, nota-se um bom ajuste das mesmas, indicando assim uma boa qualidade do modelo gerado. O

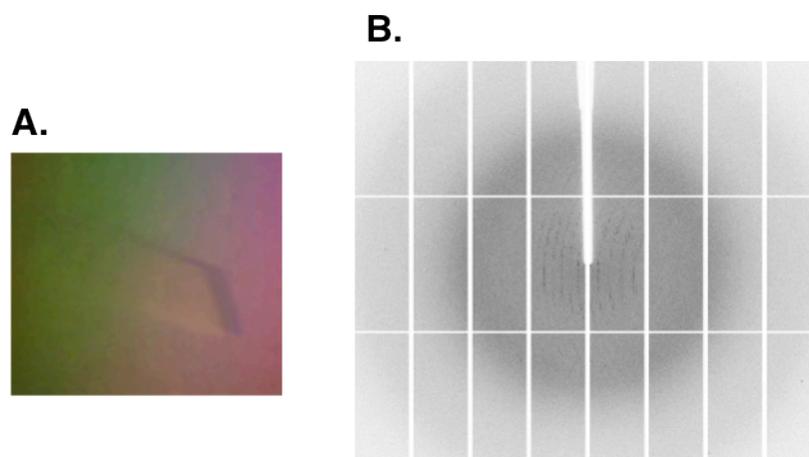
alinhamento executado pelo SUPCOMB, do modelo de alta resolução (PDB:1 UZB) com o de baixa resolução obtido pelo DAMMIN, mostrou a ausência de sobreposição de algumas regiões (Figura 12). Isso pode ser devido à baixa identidade sequencial entre TcP5CDH e o modelo cristalográfico utilizado (33%), que possivelmente, pode ter levado à formação de um arranjo estrutural diferente para ambas, produzindo assim essas regiões (Figura 12).

Figura 12 - Modelo de sobreposição para a TcP5CDH obtido pelo SAXS.



Alinhamento obtido pelo programa SUPCOMB (KOZIN; SVERGUN, 2001), do modelo de alta resolução (PDB:1 UZB), representado em *ribbon*, com o de baixa resolução (TcP5CDH-6xHis) representado pelas esferas. Os modelos foram girados em 90° com relação ao eixo-x.

As triagens para a obtenção de cristais da proteína TcP5CDH resultaram em cristais de diferente tamanho. A forma holoenzima da TcP5CDH, conjugada com o cofator NAD^+ , resultou em cristais de ideal número e tamanho (Figura 13A). As imagens de difração da TcP5CDH foram coletadas a uma resolução de 5,37 Å utilizando o cristal obtido na condição 100 mM HEPES, pH 7,5, 30% MPD (p/v), 5% PEG 4.000 (v/v) e 5 mM NAD^+ . A estatística da coleta e o processamento dos dados encontram-se sumarizados na Tabela 3. Infelizmente, a resolução da coleta não permitiu realizar inferências estruturais detalhadas dessa proteína. Atualmente, continua-se trabalhando, em colaboração com o grupo do professor Otávio H. Thiemman do Instituto de Física de São Carlos (IFSC-USP), na determinação das fases, o refinamento e a construção dos modelos tridimensionais.

Figura 13 - Cristalização da enzima TcP5CDH.

A) Imagem estereoscópica do cristal obtido na presença de NAD^+ . O tampão utilizado estava composto de: 100 mM HEPES, pH 7,5, 30% MPD (p/v), 5% PEG 4.000 v/v), 5 mM NAD^+ . B) Padrão de difração obtido a partir do cristal da TcP5CDH utilizando o detector PILATUS (DECTRIS).

Tabela 3 - Estatística da coleta e processamento dos dados de difração de raios-X para a TcP5CDH.

	TcP5CDH
Comprimento de onda (Å)	0,920
Grupo especial	P1
Parâmetros de rede (Å, 0)	a = 137.480, b = 149.940, c = 160.410 $\alpha = 112.550$ $\beta = 110.080$, $\gamma = 110.490$
Resolução (Å)	73.72 – 5.21 (24.02 – 5.37)
Reflexões únicas	89912/14491
Multiplicidade	3,0 (3,1)
Completeza (%)	94,0 (93,8)
$I/\sigma(I)$	12,4 (1,0)
R_{merge} (%)	1,115 (0,041)

3.3 Caracterização bioquímica da enzima TcP5CDH

3.3.1 Síntese química e caracterização do substrato P5C

A atividade TcP5CDH foi determinada a partir da oxidação do substrato P5C em L-glutamato, acoplada à redução do cofator $\text{NAD}^+/\text{NADP}^+$, o que é facilmente detectado pela leitura de absorvância a 340 nm.

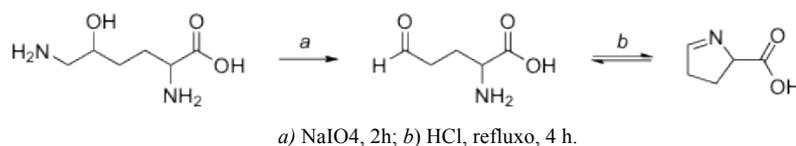
O P5C, substrato natural de enzimas P5CDHs, é um composto altamente instável, razão pela qual a companhia Sigma[®] descontinuou-o do mercado. Distintos métodos de síntese química, em colaboração com o professor Erick L. Bastos (IQ-USP), para a obtenção do P5C foram avaliados. Entre estes destacam-se:

- i) a síntese de P5C utilizando o ácido glutâmico como reagente de partida (JONES; BROQUIST, 1965; LUESCH et al., 2003; LUSCH; UZAR, 2000; ROSENTHAL et al., 1995). Esta abordagem foi atraente, entre outros motivos, pela possibilidade da obtenção do P5C marcado com C^{14} , a partir de glutamato marcado radioativamente. O ácido é esterificado seletivamente e convertido ao ácido 2-amino-5-hidroxipentanóico. A ciclização deste ácido é mediada por íons cromo (VI) e resulta na formação de P5C (HEACOCK et al., 1975; LUESCH et al., 2003). Os inconvenientes desta abordagem são os baixos rendimentos globais (8%) e o uso de metal pesado na síntese. Ainda, a presença de Cr(IV) dificulta a purificação do produto;
- ii) realizamos outra tentativa de síntese do P5C utilizando acroleína como reagente de partida (MOE; WARNER, 1948; VOGEL; DAVIS, 1952). O produto foi obtido em bom rendimento (62%), mas a toxicidade da acroleína (LO PACHIN et al., 2009) e a dificuldade em adquirir o composto são as maiores limitações da rota;
- iii) a oxidação branda de cloridrato de DL-5-hidroxisina com *m*-periodato sódico resulta no semi-aldeído correspondente, cuja ciclização em meio ácido resulta em P5C (Esquema 1) (MEZL; KNOX, 1976; RAVIKUMAR; DEVARAJU; SHETTY, 2008; STRECKER, 1960; WILLIAMS, I.; FRANK, L., 1975; WILLIAMS, IRENE; FRANK, LEONARD, 1975; WU; SEIFTER, 1985). O rendimento global desta reação foi de 37%.

Optamos também por aumentar a escala de preparação de P5C a partir de DL-5-hidroxisina (Esquema 1) e realizar a purificação do produto em HPLC preparativo. O rendimento global foi mantido (geral 34 – 42%). Contudo, não foi possível armazenar (a $-20\text{ }^\circ\text{C}$ no escuro) o P5C

durante períodos superiores a 15 dias, bem seja como sólido ou em solução. Em resumo, testamos diversas rotas sintéticas para a preparação de P5C optando pelo uso da metodologia (iii) nos ensaios posteriores.

Esquema 7 - Rota para a preparação de P5C a partir de cloridrato de DL-5-hidroxisilina.

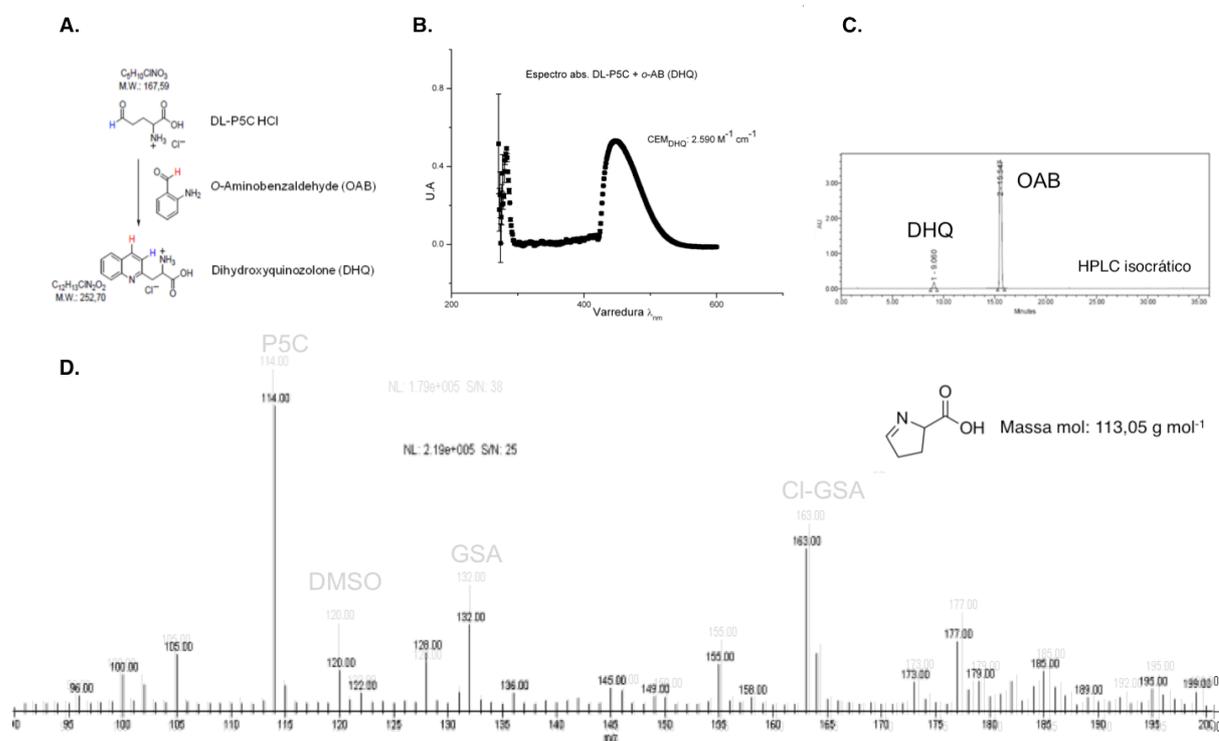


O produto da oxidação de DL-5-hidroxisilina com *m*-periodato sódico (MEZL; KNOX, 1976) resulta na mistura racémica DL-P5C que foi utilizado nos testes bioquímicos da TcP5CDH e será denominado de P5C. Após a eluição, o P5C foi mantido em meio ácido (1 M HCl) para preservar a sua estabilidade, caso contrário, em meio aquoso ou como produto liofilizado, este precipitava ou hidratava-se. Depois da síntese, a concentração do P5C foi determinada mediante a reação com *o*-AB, formando um composto amarelado, do tipo dihidroxiquinolona (DHQ) que absorve na luz branca ($\lambda_{443 \text{ nm}}$) (Figura 14A, B) (VOGEL; DAVIS, 1952). A reação incompleta do P5C com *o*-AB permitiu separar o complexo DHQ do *o*-AB, como se observa nos tempos de retenção para cada uma dessas moléculas através da técnica de HPLC (Figura 14D).

Com o intuito de observar diferenças na massa molecular do produto de síntese, este foi analisado por espectrometria de massa (MS). A forma cíclica (P5C) (código no *PubChem*: 1196) e a forma aberta (hidratada), o glutamato- γ -semialdeído (γ GSA) (código no *PubChem*: 193305) podem estar em equilíbrios diferentes segundo o pH do meio (BEARNE; WOLFENDEN, 1995; VOGEL; DAVIS, 1952). Deste modo, fizemos duas injeções separadas no MS, tentando variar as condições de pH no meio. No pH ácido (4,5) foi observado que o pico correspondente ao P5C (114,15 m/z) é mais abundante com respeito ao pico do γ GSA (132 m/z). A forma clorada do γ GSA (163 m/z) também foi observada (Figura 14C). Entretanto, quando o pH foi aumentado a pH 7,0, observou-se uma diminuição correlativa nos picos para P5C e γ GSA. A massa molecular determinada para o P5C foi de 113,05 g mol⁻¹, o que confirma a obtenção deste, através do método de síntese empregado. Contudo, o pH do meio não foi mantido devido à necessidade de dissolver a amostra em ácido

fórmico para facilitar o processo de ionização próprio da técnica. Isto foi um interferente na hora de determinar com exatidão a forma química da molécula segundo o pH do meio.

Figura 14 - Análise qualitativa do P5C sintetizado quimicamente.



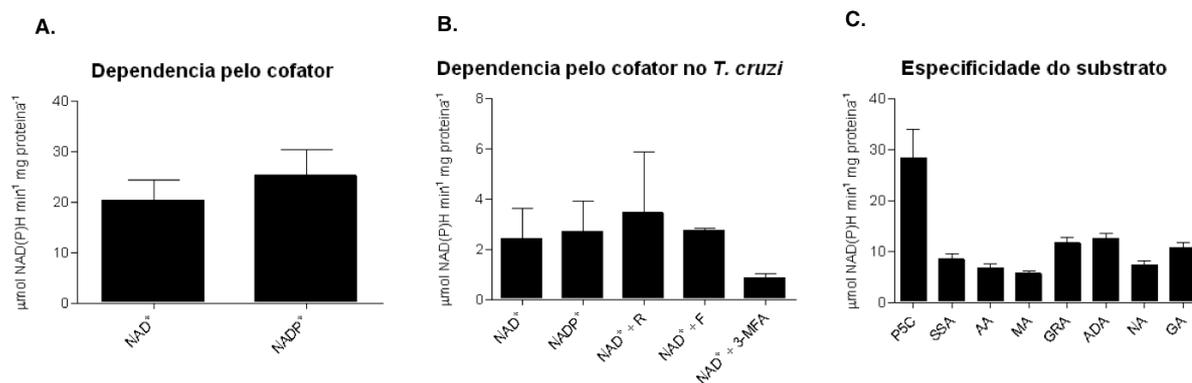
A) Proposta de reação química entre o P5C (em HCl) e o *o*-AB (Sigma®) formando o complexo DHQ. B) Varredura espectrofotométrica ($\lambda_{190} - 700 \text{ nm}$) para o complexo DHQ. A linha de base foi feita usando 0,25 M HCl e *o*-AB. A concentração do P5C obtido foi determinada utilizando o $CEM_{DHQ} = 2.590 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. C) Cromatograma obtido ($\lambda_{254} \text{ nm}$) após a corrida de HPLC isocrático usando uma coluna C18 (fase estacionária) e uma mistura de MetOH / H₂O (2:1) (fase móvel). O gráfico mostra dois picos diferentes, cujos tempos de retenção correspondem ao complexo DHQ (9 min) e o *o*-AB (15 min) que não reagiu. D) Análise por espectrometria de massa do P5C purificado. As amostras de P5C sintético foram ajustadas a pH 4,5 (cinza claro) e pH 7,0 (preto) e injetadas separadamente no aparelho. Os espectros resultantes foram sobrepostos, onde observam-se os íons correspondentes a P5C, glutamato gama-semialdeído (γ GSA) e o cloreto de γ GSA (γ GSA-Cl). Um pico contaminante correspondente a DMSO também foi observado. O espectro resultante mostra uma molécula ionizada cuja relação massa/carga 114,15 m/z, compatível com a massa esperada para o P5C (113,05 g mol⁻¹).

3.3.2 A reação catalisada pela enzima TcP5CDH é dependente de NAD⁺/NADP⁺

Após a caracterização química do P5C sintetizado, procedemos a avaliação deste substrato no ensaio enzimático para a TcP5CDH. A enzima recombinante foi utilizada para a determinação dos parâmetros cinéticos e estes foram comparados com medições feitas a partir de lisados mitocondriais do parasita.

A enzima TcP5CDH-6xHis mostrou ser ativa na presença de NAD^+ ou NADP^+ , mas não com FAD (Figura 15A). Quando comparadas, a diferença vista na atividade com NAD^+ não foi significativa com respeito ao NADP^+ (Figura 15A). Para confirmar este fato, a atividade foi medida em lisados do parasita, onde esta dependência foi também observada (Figura 15B). O ensaio enzimático baseia-se na detecção de NADH a partir de NAD^+ e P5C. Em extratos totais do parasita, o NADH produzido pode ser reoxidado pela NADH:ubiquinona oxidorreductase (complexo I da CTE). Quando a atividade TcP5CDH foi medida na presença de rotenona (inibidor do complexo I), não foi observada variação significativa na atividade enzimática (Figura 15B). No entanto, uma redução significativa da atividade foi observada na presença de 3-MFA, um composto reportado como inibidor da enzima fumarato redutase (FMR) (BOVERIS; HERTIG; TURRENS, 1986; TURRENS, 1989). A FMR é uma enzima única de tripanossomas, que produz succinato a partir de fumarato e NADH, e acredita-se que esta envolvida na reoxidação do NADH mitocondrial, devido à funcionalidade limitada do complexo I da CTE nesta espécie (CARRANZA et al., 2009).

A especificidade da enzima TcP5CDH pelo substrato carbonado foi avaliada na presença de vários compostos semelhantes estruturalmente ao P5C. A atividade enzimática foi significativamente maior na presença de P5C quando comparada com a observada para os outros substratos (Figura 15C).

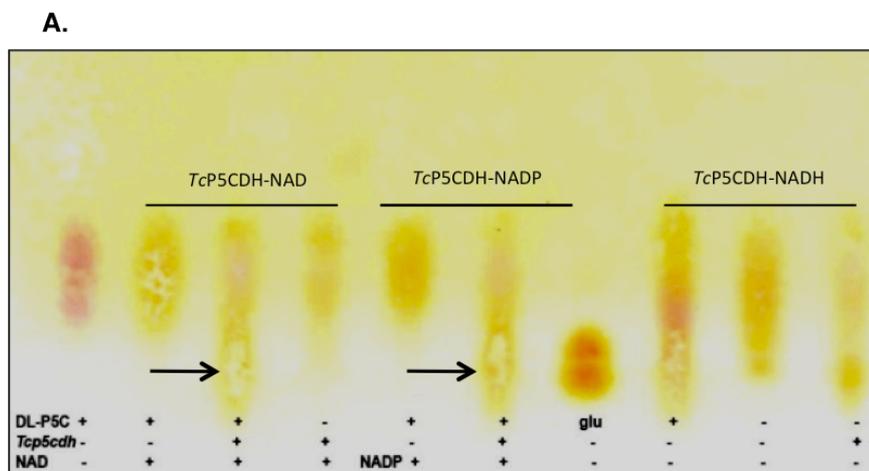
Figura 15 - Avaliação da dependência de substratos para a TcP5CDH.

A) Dependência por cofatores NAD(P)⁺ na reação catalisada pela TcP5CDH. A reação foi determinada em tampão P5C na presença de 2 mM NAD(P)⁺. A reação foi iniciada com 5 μg de TcP5CDH recombinante e a atividade calculada a partir do aumento na absorvância ($\lambda_{340\text{ nm}}$) durante 5 min (28 °C sob constante agitação). O branco da reação foi a mistura enzimática sem adição do P5C. B) Dependência por cofatores NAD(P)⁺ em lisados do parasita. A reação foi iniciada com 100 μg do lisado e a atividade medida na presença de 0,6 mM DI-P5C e: NAD(P)⁺ / NAD⁺ + 20 μM rotenona (R) / NAD⁺ + 3 mM de fumarato sódico, pH 7,0 (F) / NAD⁺ + 3 μg ml⁻¹ de ácido 3-metoxifenilacético (3-MFA). A atividade foi medida durante 15 min a 28 °C sob constante agitação. C) Comparação da especificidade do substrato para a TcP5CDH na presença de 0,4 mM de P5C / succinato semialdeído (SSA) / acetaldeído (AA) / ácido malônico (MA) / ácido glutárico (GRA) / ácido adípico (ADA) / ácido nicotínico (NA) ou ácido glutâmico (GA) + 2 mM de NAD⁺. Os substratos foram testados, separadamente, na reação ao invés do DI-P5C.

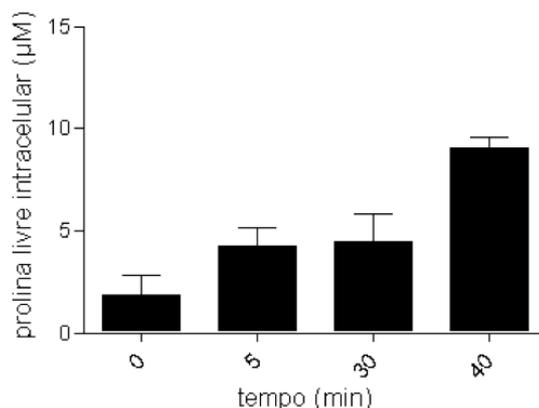
3.3.3 A atividade enzimática da TcP5CDH é irreversível

O glutamato produzido na reação catalisada pela TcP5CDH foi detectado mediante cromatografia de camada fina (TLC) na presença de NAD⁺ ou NADP⁺ (Figura 16A). O ensaio enzimático realizado na presença de glutamato, NADH e a TcP5CDH não gerou P5C detectável mediante a TLC (Figura 16A). Este último sugere que o equilíbrio da reação esta deslocado no sentido P5C - glutamato (Figura 16A) (HASLETT et al., 2004). Esse fato é suportado pela capacidade biosintética de prolina mostrada pelo *T. cruzi* utilizando glutamato e NADH como substratos (Figura 16B). As sequências de DNA para as enzimas da via de biossíntese de prolina: a P5C-sintase [EC 2.7.2.11] (código UniProtKb: K4E0F1) e a P5C-reductase [EC 1.5.1.2] (UniProtKb: K4EAX2) estão presentes no parasita, e as atividades enzimáticas dos seus produtos gênicos também. As duas enzimas são, atualmente, motivo de estudo no nosso laboratório (Esquema 2).

Figura 16 - Análise dos produtos na reação catalisada pela TcP5CDH



B. Dosagem de prolina a partir de glutamato



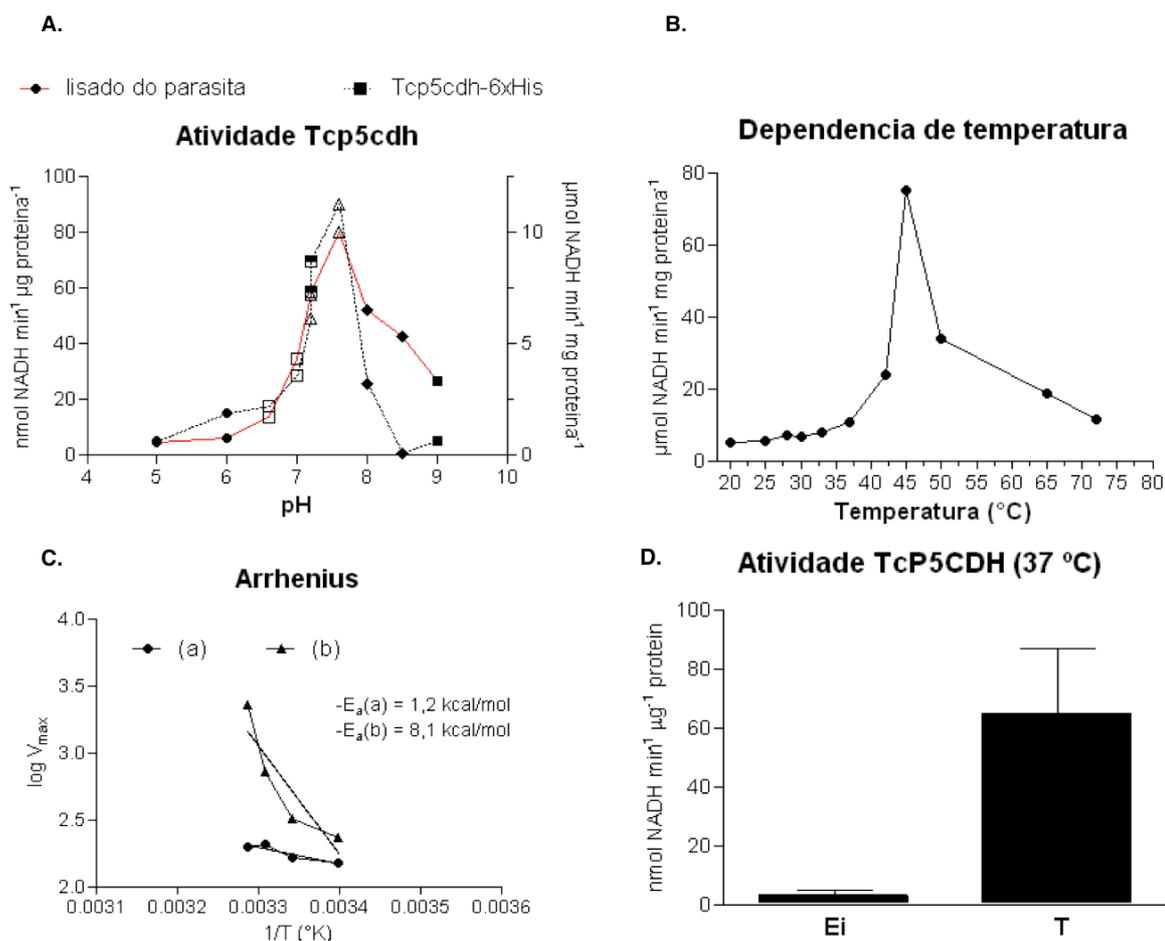
A) Cromatografia de camada delgada (TLC) em placas de celulose (fase estacionária) e uma mistura de ácido acético / ButOH/H₂O (50:10:40) (fase móvel) para a separação dos produtos de reação enzimática com a TcP5CDH. A TLC foi revelada com ninídrina (0.5% p/v em acetona) a 95 °C. A reação foi realizada em tampão contendo 90 mM Tris-HCl, pH: 7,4, 1 mM de NAD(P)⁺, 0.4 mM de P5C e a reação iniciada pela adição de 5 µg de TcP5CDH pura. A reação foi incubada (1 h a 37 °C) e parada por desnaturação térmica (5 min a 95 °C). Os produtos da reação foram extraídos por centrifugação (15 min a 16.000 x g) e 5 µL de cada sobrenadante foram aplicados na placa de TLC. Como controles da reação foram aplicados os mesmos volumes a partir de estoques 1 mM de L-glutamato sódico ou 1 mM de P5C. As setas indicam o glutamato produzido enzimaticamente na presença de NAD⁺ ou NADP⁺. Para determinar se a reação catalisada pela TcP5CDH é reversível foi realizado uma medição adicional em tampão de reação: 90 mM Tris-HCl, pH 7,4, 15 mM de glutamato, 0,35 mM de NADH, 1 mM KCl, ATP 0,5 mM e 10 µg da enzima recombinante. B) Detecção de atividade biossintética para prolina em *T. cruzi*. A atividade enzimática foi medida no sentido glutamato - prolina utilizando um *mix* contendo: 100 mM Tris-HCl, pH 7,5, 0,45 mM NADH; 15 mM L-glutamato; 1mM KCl e 200 µg de extrato proteico total de epimastigotas. A reação foi incubada a 37 °C durante 5, 30 e 40 minutos para a dosagem da prolina livre no meio (BATES, 1973).

3.3.4 Determinação dos parâmetros cinéticos para TcP5CDH

O efeito do pH na reação catalisada pela TcP5CDH mostrou que a enzima possui um pH ótimo na faixa neutra, sendo que a maior atividade específica foi observada no tampão HEPES-NaOH, pH 7,6 (Figura 17A). Esse resultado foi observado tanto em extratos totais do parasita quanto na enzima TcP5CDH-6xHis (Figura 17A).

A atividade da TcP5CDH mostrou uma dependência de temperatura, sendo que a desnaturação térmica só foi observada em temperaturas acima a 45 °C (Figura 17B). O gráfico de Arrhenius resultante para esses valores de T° ajustou a uma linha côncava. Diante disso, os valores foram ajustados a duas retas diferentes, cujos valores de E_a foram de: 1,2 e 8,1 kcal mol⁻¹ para a e b, respectivamente (Figura 17C).

Além disso, as atividades observadas nas temperaturas fisiológicas relacionadas ao ciclo de vida do parasita (28, 33, 37 °C) mostraram que a 37 °C a atividade específica é maior. Este último resultado pode se correlacionar com a atividade detectada nas formas infectivas, tripomastigotas (obtidas *in vitro* a 37 °C), e o efeito oposto em extratos feitos a partir da forma epimastigota-intracelular (obtidas *in vitro* a 33 °C) (Figura 17D).

Figura 17 - Avaliação do efeito de pH e temperatura sobre a atividade TcP5CDH

A) A atividade TcP5CDH foi medida utilizando tampão de reação contendo: 0,6 mM P5C, 2 mM NAD⁺ e 100 mM do tampão MES-NaOH (pH 5,0 e 6,0) • / MOPS-NaOH (pH 6,5 e 7,0) □ / HEPES-NaOH (pH 7,2 e 7,6) Δ / fosfato de potássio (pH 7,2, 7,6) n / Tris-HCl (8,0 e 8,5) w / CHES (9,0) n. A atividade TcP5CDH foi iniciada pela adição de 5 μg de TcP5CDH-6xHis ou 300 μg de lisado de formas epimastigotas. O eixo-y, da esquerda, corresponde às unidades para o cálculo de atividade no lisado (vermelho) e o eixo-y, da direita, indica as unidades para a TcP5CDH-6xHis (linha pontuada).

B) Determinação do efeito da temperatura sobre a atividade da TcP5CDH recombinante. A atividade TcP5CDH foi medida em tampão de reação contendo: 0,6 mM P5C, 2 mM NAD⁺ e 100 mM de tampão HEPES-NaOH, pH 7,2. A enzima TcP5CDH-6xHis (5 μg) foi pré-incubada (3 min) na temperatura indicada (25 – 82 °C), seguido pela medição da atividade enzimática. O branco da reação, subtraído para o cálculo da atividade específica, continha os mesmos componentes exceto pela adição do substrato.

C) Atividade enzimática TcP5CDH medida a 37 °C em extratos proteicos totais preparados a partir das formas epimastigota-intracelular (Ei) e tripomastigotas (T) de *T. cruzi*.

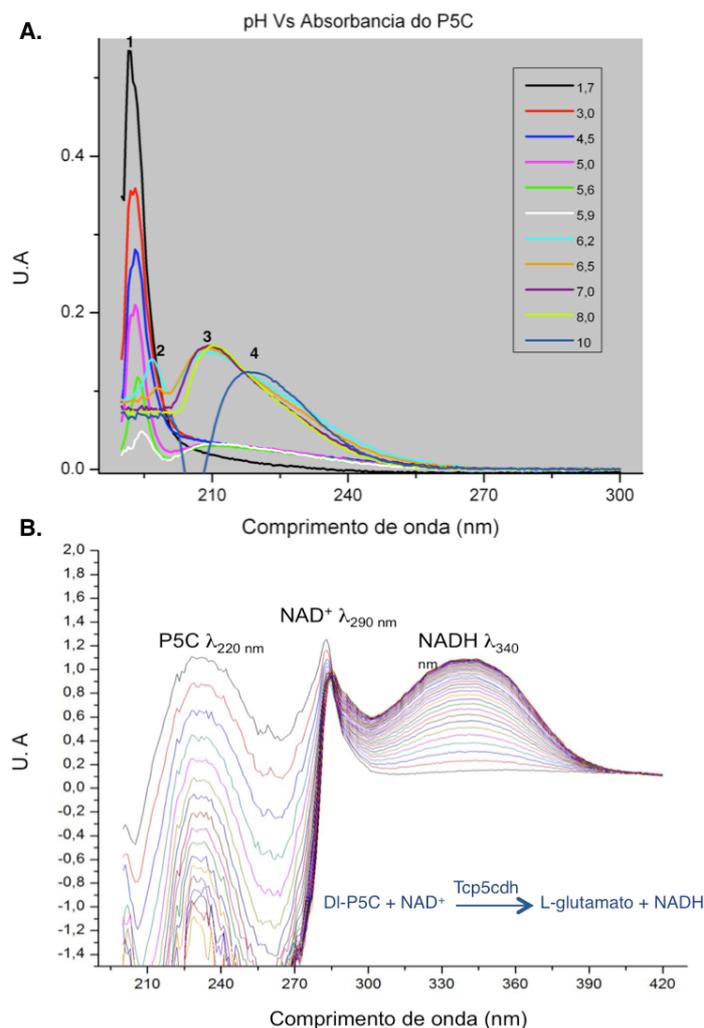
D) Gráfico de Arrhenius ajustado à função linear cuja pendente negativa corresponde à energia de ativação.

Com o intuito de avaliar o efeito do pH sobre a absorvidade do P5C, e considerando que isto esteja correlacionado com a forma química (aberta ou ciclizada) do substrato que a TcP5CDH metaboliza sob as condições avaliadas, espectros de absorvância em distintos valores de pH foram realizados.

O resultado obtido mostrou que existem variações no espectro de absorção do P5C dependendo do pH do meio. Quatro picos de absorvância (λ), na faixa de luz ultravioleta, foram observados a 193, 198, 210 e 219 nm (Figura 18A). O pico 1 ($\lambda_{193 \text{ nm}}$) diminui correlativamente com o aumento no pH do meio até um pH levemente ácido (pH 1,7 - 5,9). Quando o pH foi aumentado (pH 6,2) foram observado dois picos, o pico 2 ($\lambda_{198 \text{ nm}}$) e o pico 3 ($\lambda_{210 \text{ nm}}$). No valor de pH neutro (pH 7,0) se observa, somente, o pico 3 ($\lambda_{210 \text{ nm}}$), e quando o pH se aumentou à condição mais alcalina (pH 11), foi observado um quarto pico ($\lambda_{219 \text{ nm}}$) (Figura 18A).

Esses dados, somado ao fato de que a TcP5CDH apresentou um pH ótimo na faixa neutra (pH 7,2 - 7,6), sugerem que, sob essa condição de pH, o equilíbrio favorece à presença de uma única forma do substrato cujo máximo de absorção é $\lambda_{210 \text{ nm}}$ (ver esquema 2 para maior clareza). Nesse sentido, os substratos e produtos envolvidos na reação catalisada pela TcP5CDH também foram detectados através de espectros de absorção na faixa UV. Observou-se que um pico comparável ao observado para o P5C no ensaio de pH ($\lambda_{219 \text{ nm}}$) (Figura 18A) diminui ao longo do tempo da reação enzimática sugerindo que este foi consumido (Figura 18B). O pico de absorção do cofator NAD^+ diminuiu (valor teórico $\lambda_{259 \text{ nm}}$) em menor proporção com relação ao pico do P5C ($\lambda_{219 \text{ nm}}$) durante o ensaio (Figura 18B). O produto da reação TcP5CDH reduz o NAD^+ a partir dos elétrons cedidos pelo P5C produzindo NADH, que absorve a 340 nm, e cujos espectros de absorvância sobrepostos representam saturação enzimática (Figura 18B).

Figura 18 – Avaliação do espectro de absorção para o P5C sintético



A) O P5C foi preparado como descrito anteriormente, e diluído (1:600) em soluções de $\text{Na}^+ / \text{PO}_4^{3-}$ ajustadas a diferentes valores de pH (ver seção 2.7.1.3). A mistura foi pré-incubada (3 min) até atingir o equilíbrio. Seguindo disso, três espectros de absorção, na faixa UV, foram realizados (velocidade de leitura 240 nm min^{-1} a T° ambiente e agitação constante) e os valores de unidades de absorvância (U.A) foram registrados. Os picos encontrados através do software do equipamento (*Vision Pro, Thermo Scientific*) foram numerados como 1 - 4 e correspondem a: 193, 198, 210 e 219 nm como indicado. B) Espectro de absorvância para a mistura enzimática em tampão P5C. A reação foi iniciada pela adição de $100 \mu\text{g}$ de extrato proteico do parasita e o espectro de absorção UV foi monitorado espectrofotometricamente ($\lambda_{190 - 420 \text{ nm}}$) utilizando uma velocidade de leitura 640 nm min^{-1} , a 28°C sob agitação constante durante 30 min. O espectro mostra variações em três diferentes picos ao longo do tempo de reação.

Os parâmetros cinéticos para a enzima TcP5CDH foram determinados com a enzima recombinante TcP5CDH-6xHis e com frações enriquecidas de conteúdo mitocondrial de formas epimastigotas. A atividade TcP5CDH mostrou dependência pelo substrato P5C na presença de NAD^+ ou NADP^+ . O valor da constante que mede a afinidade (K_m) pelo P5C foi menor quando determinado nas frações mitocondriais que na enzima recombinante (Tabela

4). Com respeito aos valores de K_m para os cofatores analisados, o valor de K_m foi menor para o NAD^+ do que NADP^+ (Tabela 4), sugerindo uma maior afinidade pelo substrato NAD^+ . A eficiência catalítica observada para a TcP5CDH foi consideravelmente maior em frações mitocondriais do que na enzima recombinante, sendo a concentração saturante de P5C (0,6 mM) na presença de NAD^+ as condições onde a constante de especificidade foi maior ($2,3 \mu\text{M s}^{-1}$). Os valores de k_{cat} / K_m para cada substrato variam entre um e dois ordens de grandeza quando estas foram determinadas na TcP5CDH-6xHis, do que nas frações mitocondriais para o NAD^+ , P5C e NADP^+ (Tabela 4).

Tabela 4 - Parâmetros cinéticos para a enzima TcP5CDH

Enzima:	Lisado mitocondrial			TcP5CDH-6xHis		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($\mu\text{M s}^{-1}$)	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat} / K_m ($\mu\text{M s}^{-1}$)
Substrato						
DL-P5C	86 ± 1	$130,7 \pm 10$	$1,5 \pm 0,1$	144 ± 43	$7 \pm 0,5$	$0,05 \pm 0,01$
NAD^+	$39 \pm 3,8$	$89,2 \pm 1,6$	$2,3 \pm 0,26$	$72,3 \pm 14,1$	$7,5 \pm 0,4$	$0,10 \pm 0,03$
NADP^+	302 ± 66	$116,8 \pm 7,1$	$0,39 \pm 0,1$	342 ± 140	$1,2 \pm 0,14$	$0,003 \pm 0,001$

As determinações foram realizadas utilizando o lisado mitocondrial de epimastigotas (*L. hipotônica*) ou com a isoforma recombinante TcP5CDH-6xHis, como fontes de enzima. Os valores de k_{cat} foram calculados considerando seis sítios catalíticos para a enzima TcP5CDH, utilizando o ajuste à equação de Michaelis-Menten do programa GraphPad Prism 5.0 (*GraphPad™*).

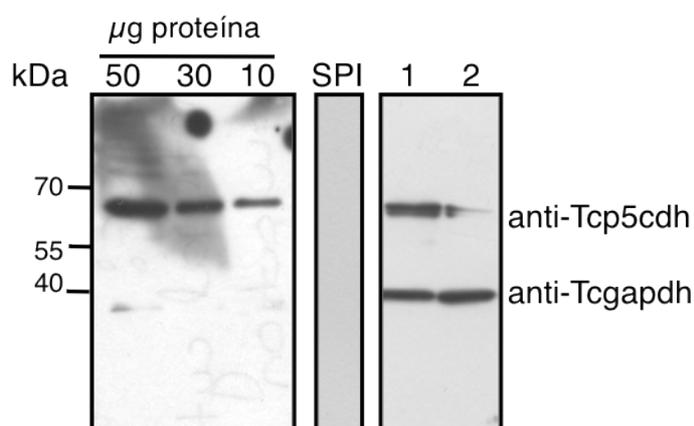
3.4 Caracterização da enzima TcP5CDH nas distintas formas do parasita

3.4.1 O soro policlonal anti-TcP5CDH é específico

Tendo visto que a enzima TcP5CDH apresentou uma região -putativa- com características de domínio transmembrana (reg-TM) e, partindo da hipótese que as enzimas de via degradativa de L-prolina teriam uma localização mitocondrial, aplicamos diferentes estratégias para avaliar a localização sub-celular da TcP5CDH.

Primeiramente, realizamos imunizações com a proteína TcP5CDH-6xHis para obtermos anticorpos específicos (anti-TcP5CDH). Como esperado, o soro policlonal anti-TcP5CDH reagiu positivamente contra uma única proteína de massa molecular aproximada de 63 kDa (Figura 19). Esse padrão de reatividade é consistente com a quantidade de proteínas totais do *T. cruzi* usadas em cada amostra. O SPI não mostrou reatividade. Quando o anti-TcP5CDH foi incubado com extratos proteicos totais de *T. cruzi*, na presença da enzima TcP5CDH pura, foi observado um sinal positivo, mas este foi reduzido devido a competição entre a enzima pura e a proteína imobilizada na membrana, pelo sítio de ligação ao anti-TcP5CDH. Assim, demonstrou-se que os anticorpos obtidos são específicos para a TcP5CDH (Figura 19).

Figura 19 - Análise por *western blot* do soro anti-TcP5CDH.



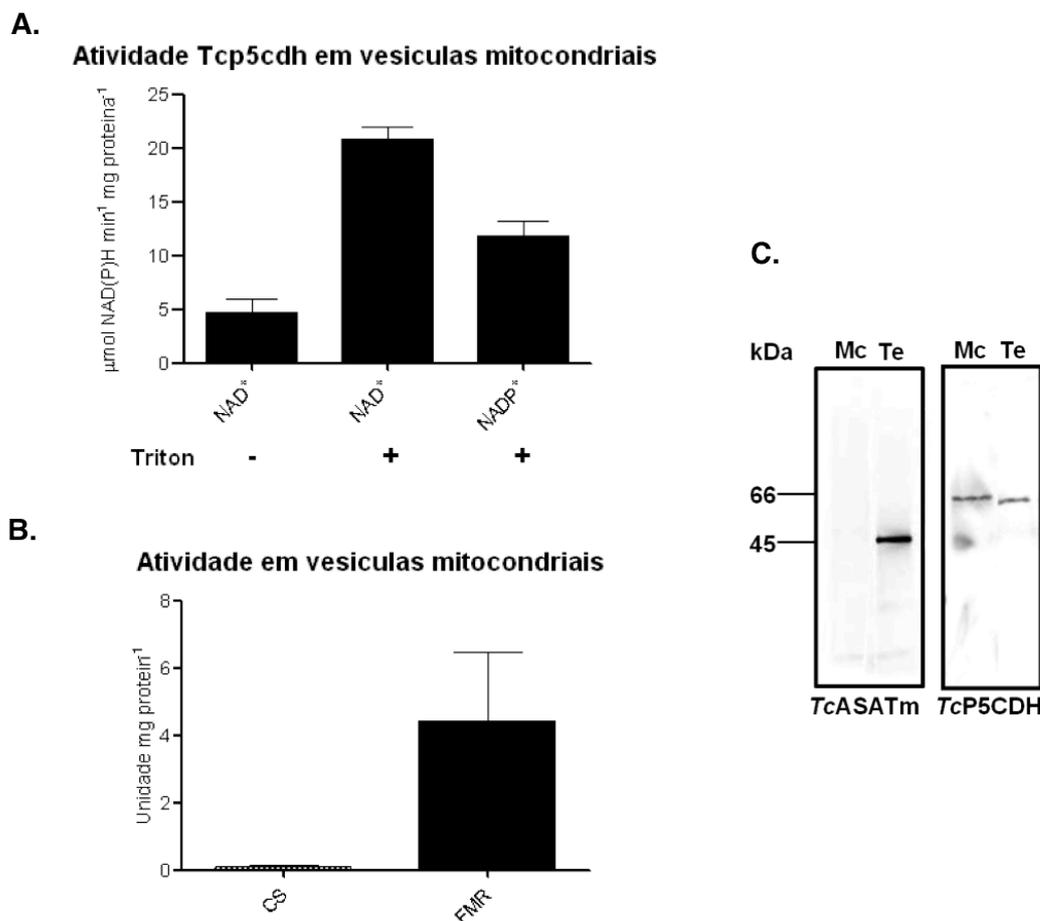
Extratos totais de formas epimastigotas de *T. cruzi* foram preparados e a dosagem proteica foi realizada pelo método de Bradford. Concentrações decrescentes de proteína foram aplicadas no gel de poli-acrilamida (12% SDS-PAGE), como indicado, e transferidas a membranas de 0,45 μm de nitrocelulose (G.E, *Life Sciences*). Após isso, as membranas foram incubadas com o soro pré-imune (SPI) de camundongo ou com o soro policlonal anti-TcP5CDH diluídos (1:2.500) em PBST + 5% leite desnatado (p/v) durante 16 h, a 4 °C sob agitação leve. Para o ensaio de competição as proteínas foram incubadas com o anti-TcP5CDH (1) e com o anti-TcP5CDH na presença de 5 μg de TcP5CDH-6xHis pura (2). Como controle da quantidade de proteínas aplicadas foi utilizado o anti-Tcgapdh (1:4.000).

3.4.2 A enzima TcP5CDH está associada à membrana mitocondrial do *T. cruzi*

A detecção da proteína TcP5CDH também foi realizada em vesículas mitocondriais que contêm, principalmente, componentes da membrana mitocondrial (FERNANDES et al., 2010). A atividade enzimática, NAD⁺-dependente, da TcP5CDH foi detectada nas vesículas isoladas ($4,7 \pm 0,5 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas) (Figura 20A). Esta atividade foi aumentada em cinco vezes ($21 \pm 2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas), na presença do detergente Tritón X-100. Porém, quando a atividade foi medida na presença de NADP⁺ a atividade aumentou apenas ao dobro ($11 \pm 1,2 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ de proteínas). Os marcadores bioquímicos utilizados, citrato sintase (enzima da matriz mitocondrial) e fumarato redutase (membrana externa mitocondrial), são evidências de que as vesículas extraídas perdem o conteúdo de matriz mitocondrial devido ao processo de resselamento que estas sofrem durante a extração (Figura 20B).

Esses dados foram confirmados utilizando um soro policlonal que reconhece a isoforma mitocondrial da enzima TcASAT_m, somente em extratos totais do parasita (Figura 19C). A TcASAT_m foi reportada como uma enzima da matriz mitocondrial (MARCIANO et al., 2008). Entretanto, a proteína TcP5CDH foi detectada nas frações mitocondriais (Mc) e no extrato total do parasita (Te). O perfil de migração da TcP5CDH no Te mostrou uma massa aparente maior da observada para a amostra Mc (Figura 20C).

Figura 20 - Análise da enzima TcP5CDH em vesículas mitocondriais do *T. cruzi*



A) Medição de atividade específica em vesículas mitocondriais de *T. cruzi* na presença (+) ou não (-) de 1,0% Tritón X-100 (v/v). A medição foi feita como descrito em materiais e métodos na presença de 2 mM de NAD(P)⁺ durante 15 minutos a 28 °C. B) Atividades enzimáticas utilizadas como controle do isolamento das vesículas mitocondriais. O ensaio para a enzima citrato sintase (CS) foi utilizado como marcador de matriz mitocondrial e o correspondente para a enzima fumarato redutase (FMR) foi usado como marcador de membrana mitocondrial. C) Análise por *western blot* das vesículas solubilizadas com Tritón X-100. As amostras proteicas foram preparadas a partir de 10 µl de extrato mitocondrial (Mc) solubilizado com Tritón x-100 (obtido a partir de 1 mg de extrato Mc) ou 40 µg de extrato proteico total a partir de formas epimastigotas (Te), resolvidas em eletroforese em gel de poliacrilamida (12% SDS-PAGE) e transferidas a membranas de nitrocelulose. Seguido disso, as membranas foram incubadas com o soro anti-TcP5CDH (1:2.500) ou com o soro policlonal contra a isoforma mitocondrial da enzima aspartato aminotransferase (TcASAT_m) (1:2.000), usada como marcador de matriz mitocondrial.

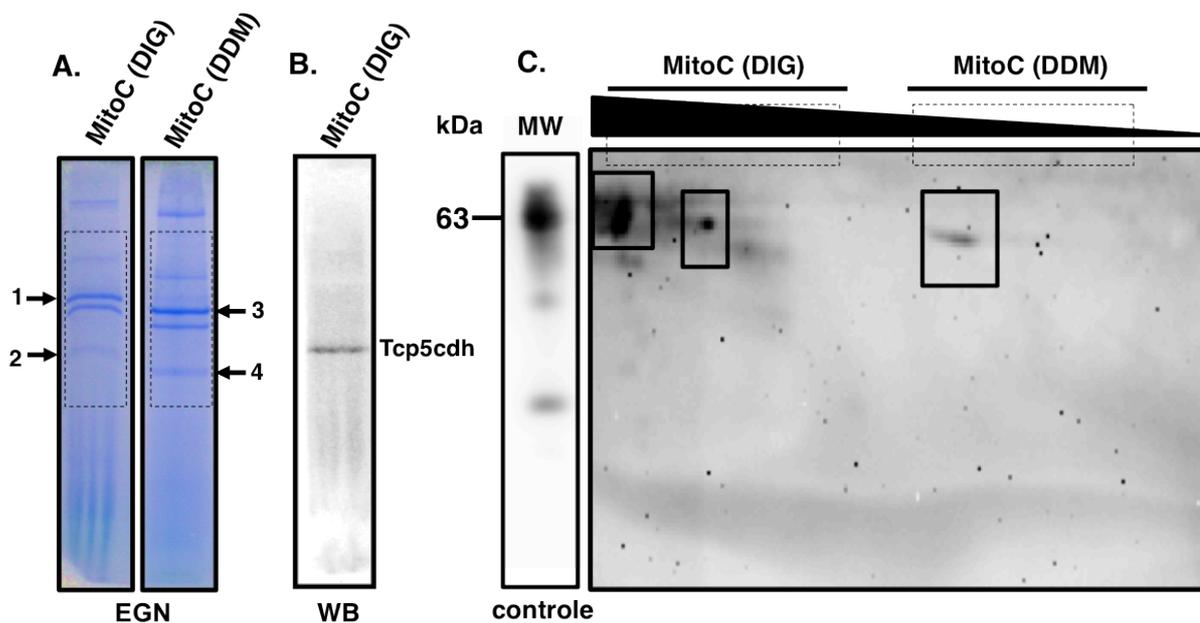
Os resultados observados em vesículas mitocondriais, obtidas pelo método com perolas de vidro, foram também analisados utilizando um método de lise hipotônica (SCHNEIDER et al., 2007). Esta metodologia permitiu a obtenção de frações ricas em conteúdo mitocondrial, onde pode-se determinar a atividade de enzimática dos complexos respiratórios em EGN (SCHAGGER, 2002; SCHAGGER; VON JAGOW, 1991). A natureza hidrofóbica do gel

favorece à migração de componentes de membranas que geralmente se encontram associados formando supercomplexos proteicos. O perfil de migração destes foi então analisado em condições nativas, seguido da identificação por MS. Dessa forma, vimos que o tratamento com dois tipos de detergentes, a digitonina (DIG) e o dodecil maltosida (DDM), solubiliza estes supercomplexos de forma diferente (Figura 21A). A DIG, por exemplo, é um detergente mais brando que mantém a estabilidade de supercomplexos proteicos, enquanto que o detergente DDM os dissocia (SCHAGGER, 2002; SCHAGGER; CRAMER; VON JAGOW, 1994). Observou-se que as bandas marcadas como 1 e 2, possuem uma massa molecular maior sob o tratamento com DIG do que com DDM, indicadas como 3 e 4 (Figura 21A). As bandas 1 e 3 correspondem ao complexo IV da CRE (citocromo *c* oxidase), enquanto que as bandas 2 e 4 correspondem ao complexo II da CRE (succinato desidrogenase), como identificado por MS (Tabela 5) (Trabalho em colaboração com o Prof. Patrício Fernandez-Silva, Universidad de Zaragoza, España). Nessa mesma análise, identificou-se a enzima TcP5CDH (5 peptídeos com 95% de *coverage*) na banda correspondente ao C-IV, cuja massa aproximada é de 650 – 700 kDa. E também na banda onde migra o C-II (4 peptídeos com 95% de *coverage*), cuja massa aproximada é de 350 - 400 kDa.

Quando utilizado o anti-TcP5CDH contra as frações solubilizadas com DIG e, resolvidos na EGN, foi detectada uma única proteína com massa semelhante à observada para o C-II (aprox. 400 kDa) (Figura 21B). Partindo deste resultado, procedeu-se com o corte da região do gel (Figura 21A, região ponteadada) onde se esperaria detectar a TcP5CDH. Esta região foi submetida a uma segunda dimensão em condições desnaturantes (SDS-PAGE) e analisada por *western blot*. Dessa forma, constatou-se que a forma monomérica da enzima TcP5CDH (62,4 kDa) forma parte de dois complexos proteicos, um de menor tamanho (aprox. 400 kDa) observado na EGN (Figura 21B), e outro maior (aprox. 700 kDa), não observado no WB a partir do EGN. Esse perfil, no entanto, também pode ser indicativo de dois graus diferentes de oligomerização que somente são evidenciáveis sob o tratamento com DIG. Esses resultados foram consistentes com o observado pela análise por MS. Já o tratamento com o detergente DDM liberou uma proteína com massa molecular compatível à do controle aplicado (TcP5CDH-6xHis) (Figura 21C, controle). Isto sugere uma solubilização incompleta com o detergente DDM ou a formação de um supercomplexo proteico com outras proteínas mitocondriais. Esses dados se correlacionam com o observado na análise estrutural da TcP5CDH, onde foi visto que a enzima apresenta uma conformação quaternária composta

de seis protómeros; processo que, possivelmente, ocorra na membrana mitocondrial do *T. cruzi*.

Figura 21 - Análise bidimensional da TcP5CDH em frações mitocondriais do *T. cruzi*



Eletoforese em gel nativo (EGN) com frações mitocôndrias do *T. cruzi* solubilizadas com digitonina (DIG) ou dodecil maltosida (DDM). Após a corrida do EGN, este foi corado com solução de azul de Coomassie G-250. Em outra preparação, as bandas proteicas (1 - 4) foram cortadas do gel, tratadas com 10 mM DTT e digeridas com tripsina (o.n a 37 °C) para a posterior identificação por espectrometria de massa (ver tabela 5). B) Membrana de nitrocelulose revelada com o anti-TcP5CDH a partir da fração MitoC (DiG). C) A região de acrilamida (quadro ponteadado de A.) foi cortada do gel e submetida, em posição horizontal, a uma segunda dimensão em gel SDS-PAGE. As proteínas foram eletrotransferidas a membrana de nitrocelulose e incubadas com o anti-TcP5CDH (1:3.000). Como controle foi utilizada uma canaleta com 1 µg da enzima TcP5CDH recombinante.

Tabela 5 - Proteínas identificadas na análise por MS das bandas 1 – 4 resolvidas por EGN.

<i>Amostra no gel</i>	<i>Nome</i>	<i>No de acesso (GI)</i>	<i>No de peptídeos</i>
1	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade IV	71667854	27
1	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade V	71412456	18
1	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade VI	71412400	15
1	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade VII	71661625	10
3	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade VIII	71405193	1
3	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade IV	71667854	32
3	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade V	71412456	14
3	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade VI	71412400	12
3	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade VII	71661625	11
4	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade IV	71667854	33
4	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade V	71412456	21
4	Citocromo <i>c</i> oxidase subunidade VII	71661625	17
2	Succinato desidrogenase	5931575	22
2	Succinato desidrogenase	71401706	10
4	Succinato desidrogenase	5931575	203
1	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	71657117	5
2	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	71657117	4
3	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	71657117	2
4	Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase	71657117	5
1	Subunidade β -peptidase de processamento mitocondrial	71655600	12
1	Subunidade β -ATPase	71661631	30
2	Piruvato fosfato diquinase	71658999	10
2	Proteína de choque térmico de 70 kDa HSP-70	50659756	10
3	Subunidade α -peptidase de processamento mitocondrial	71420779	6
3	Precursor da proteína Reiske ferro-sulfato	71655052	7
3	Calpaín-cisteína peptidase	71404593	5

Os peptídeos foram analisados pelo programa *Scaffold* e as proteínas identificadas foram validadas pelo número de peptídeos cujo *coverage* fosse maior ao 95%.

Outra ferramenta utilizada para avaliarmos a localização subcelular da TcP5CDH foi a permeabilização gradativa com o detergente digitonina. Isto é possível devido à composição lipídica de *T. cruzi*, que contém ergosterol ao invés de colesterol (DE SOUZA, 2002). Quando os parasitas são tratados com concentrações crescentes de digitonina é possível recuperar frações enriquecidas de conteúdo citoplasmático, glicossomal e mitocondrial, respectivamente (DENICOLA et al., 2002). Tendo em vista essa vantagem metodológica, e com o uso dos marcadores correspondentes, é possível analisar a presença da enzima em estudo através de ensaios bioquímicos e moleculares. Os resultados obtidos mostraram a presença da enzima TcTAT, marcador citosólico, nas frações solúveis tratadas com digitonina (0,5 – 5,0 mg ml⁻¹) (Figura 22A). A enzima TcGAPDH, reportada como glicossomal (OPPERDOES; BORST, 1977), foi detectada nas frações solúveis com concentrações intermediárias de digitonina (0,5

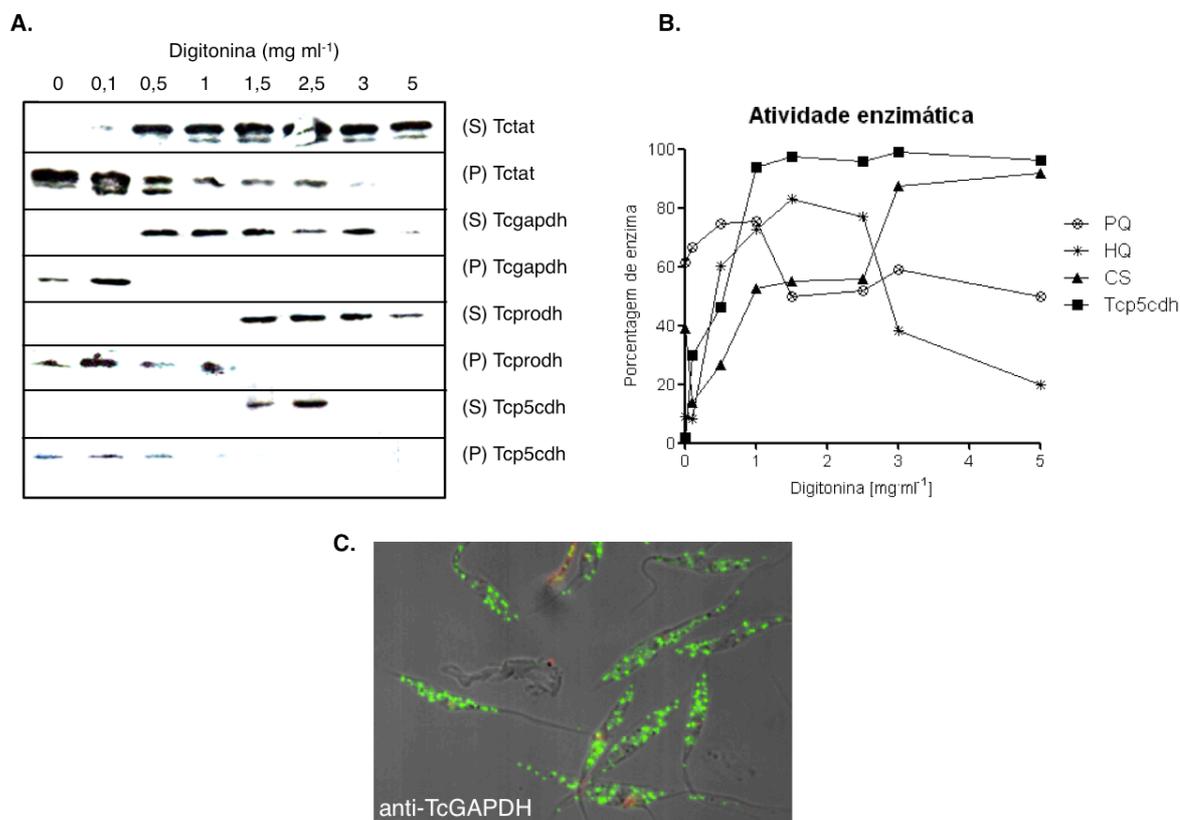
– 3,0 mg ml⁻¹) (Figura 22A). Por outro lado, dados do nosso laboratório mostraram que a enzima TcPRODH está localizada na mitocôndria do parasita (PAES, L.S et al., 2013), sendo esta liberada em concentrações maiores de digitonina (1,5 - 5 mg ml⁻¹) e insolúveis (0 – 1,0 mg ml⁻¹) (Figura 22A). Entretanto, a TcP5CDH foi liberada de forma semelhante à TcPRODH (1,5 - 2,5 mg ml⁻¹) e no precipitado (0 - 0,5 mg ml⁻¹), frações que corresponderiam ao conteúdo mitocondrial (Figura 22A).

Dado que a pureza das frações obtidas não é absoluta, as observações feitas na análise por *western blot* foram também avaliadas por medições de atividade enzimática. A atividade TcP5CDH (> 90%) foi observada em frações tratadas desde 1,0 – 5,0 mg ml⁻¹ de digitonina. Quando comparada com a atividade vista para hexocinase (HQ), usada como marcador glicosomal e que apresentou a maior atividade (82%) na presença de 1,5 mg ml⁻¹ de digitonina, observou-se atividade TcP5CDH ainda em concentrações acima de 1,5 mg ml⁻¹, enquanto a HQ diminuía (até 20%) (Figura 22B). O perfil de imunomarcção ponteados, próprio dos glicosomas, foi observado mediante o soro anti-Tcgapdh, o que difere claramente das observações feitas para a TcP5CDH, como é mostrado posteriormente (Figura 22C).

Além disso, o padrão de atividade exibido pela enzima citrato sintase (CS), uma enzima do ciclo de Krebs, usada como marcador de matriz mitocondrial, mostrou que o conteúdo de matriz é o último em ser solubilizado. Nesse caso, a atividade CS foi observada a partir de 2 mg ml⁻¹ de digitonina, sendo que a maior porcentagem (80%) foi observada com 3 mg ml⁻¹ (Figura 22B).

Esses dados, em conjunto, sugerem que a TcP5CDH estaria localizada na mitocôndria do parasita, mas a possibilidade de ser um componente da matriz mitocondrial foi descartada.

Figura 22 - Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina no *T. cruzi*.



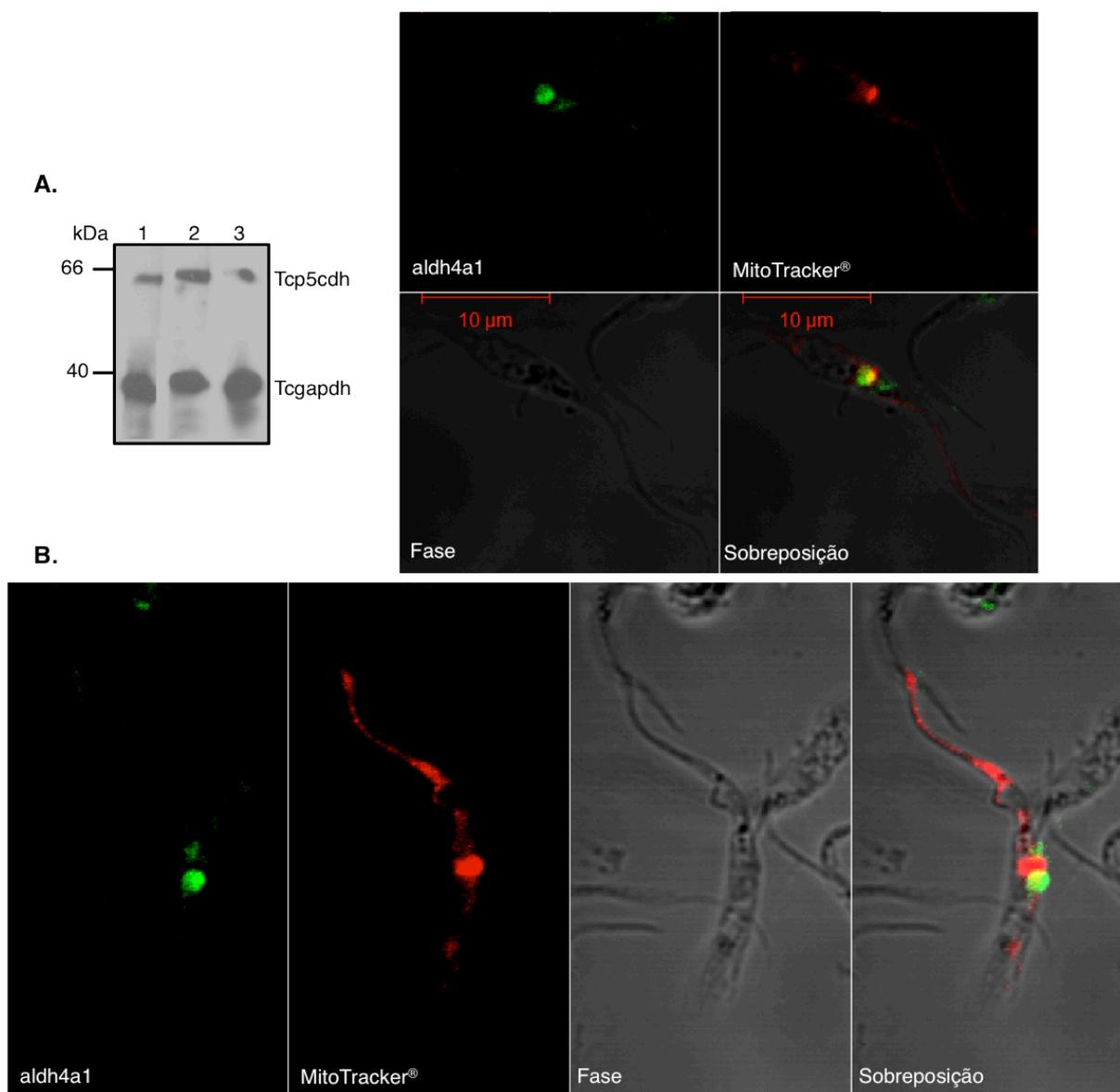
Formas epimastigotas ($6,8 \times 10^8$ células \approx 60 mg) foram tratadas com concentrações crescentes de digitonina (0 - 5 mg ml⁻¹). Após a solubilização, os sobrenadantes (S) e precipitados (P) resultantes foram separados para serem analisados mediante *western blot* e atividade enzimática. A concentração de proteínas em cada fração foi determinada pelo método de Bradford. A) Análise por *western blot* das frações obtidas após o tratamento com digitonina. Trinta μ g de proteínas em cada fração foram submetidas a eletroforese em gel de poliácridamida (12% SDS-PAGE) e transferidas a membranas de nitrocelulose. As membranas foram incubadas, separadamente, com anticorpos policlonais produzidos em camundongo, contra as proteínas TcP5CDH, TcTAT (tirosina aminotransferase), TcGAPDH (gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase) e TcPRODH (prolina desidrogenase). Estas três últimas foram usadas como marcadores de citosol, glicossoma e mitocôndria, respectivamente. B) As frações obtidas foram também avaliadas mediante ensaios de atividade para as enzimas: piruvato quinase, (EC 2.7.1.40) (PQ), hexocinase (EC 2.7.1.1) (HQ), citrato sintase (EC 4.1.3.7) (CS) foram usadas como marcadores enzimáticos de citosol, glicossoma e mitocôndria, respectivamente. Os valores representados no gráfico correspondem à razão: [atividade no (s)] / [atividade no (p) + atividade no (s)] * 100. C) Imagem de imunofluorescência de formas epimastigotas marcadas com o anti-TcGAPDH (1:100) revelado pela sonda *AlexaFluor488* (Invitrogen®) (1:600) e visualizadas sob um microscópio confocal *Nikon E600* (objetivo apocromático de Nikon 100X/1.4).

A análise de localização subcelular para a TcP5CDH foi também abordada pela técnica de imunofluorescência indireta (IFI). Inicialmente, antes de obtermos o soro anti-TcP5CDH, foi testado um anticorpo comercial anti-aldh4a1 (Abcam®, Cambridge, UK), produzido em camundongo contra a proteína ortóloga de humano (44% de identidade com a TcP5CDH). Apesar do baixo título (1:500) determinado para o uso do anti-aldh4a1 no *T. cruzi*, a

reatividade positiva foi observada contra uma proteína do tamanho esperado para a TcP5CDH (aprox. 64 kDa) (Figura 23A). A TcP5CDH foi detectada em lisados do parasita obtidos a partir de culturas crescidas em meio LIT ou meio LIT suplementado de prolina/glutamato (Figura 23A).

Utilizando o anti-aldh4a1 também foi realizada a imunomarcção do parasita. A marcação positiva com este anticorpo acentua-se na região central do parasita, próxima ao cinetoplasto (Figura 23B). Para avaliar a possível co-localização com um marcador mitocondrial, foi utilizada a sonda fluorescente *MitoTracker* (Invitrogen®). No *T. cruzi*, bem como em outros tripanossomatídeos, esta marcação não se localiza em uma única região. Este tipo de célula apresenta uma única mitocôndria que se estende ao longo do corpo do parasita (Figura 23B).

Figura 23 - Detecção da enzima TcP5CDH com um anticorpo comercial anti-ALDH4A1



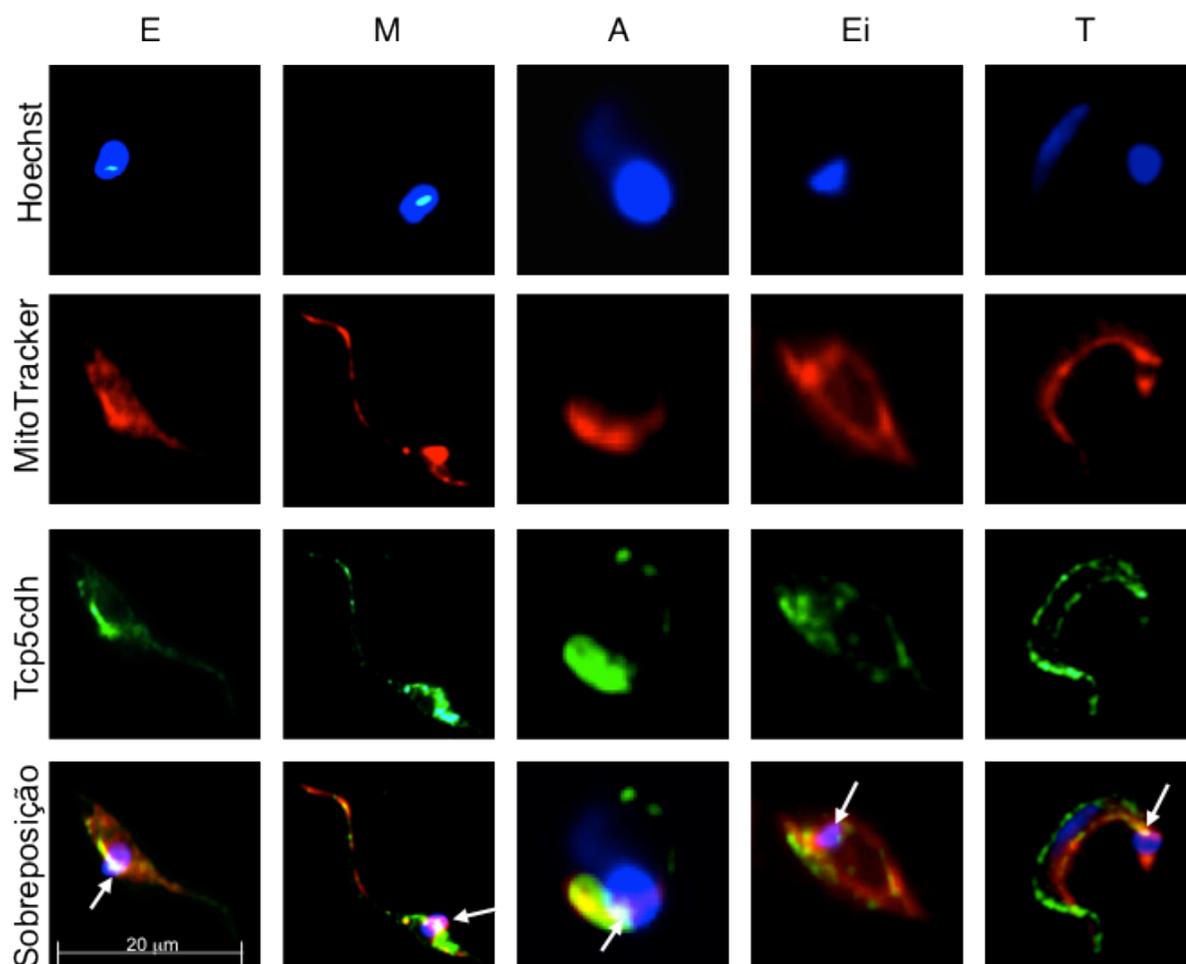
A) Análise por *western blot* da proteína TcP5CDH em lisados do parasita crescidos em meio LIT (1), LIT + 10 mM L-prolina (2) ou LIT + 10 mM L-glutamato durante quatro dias. As células (2×10^7 parasitas) foram lisadas e as proteínas totais foram resolvidas em gel de poliacrilamida (10% SDS-PAGE) e transferidas a membranas de nitrocelulose. As canaletas foram cortadas e analisadas separadamente para a titulação do anticorpo policlonal anti-aldh4a1. O título determinado para o anti-aldh4a1 foi 1:500 em PBST + 5% leite desnatado (p/v). Como normalizador foi utilizado o anti-Tcgapdh (1:2.500). B) Imunofluorescência indireta realizada com formas epimastigotas do *T. cruzi* pré-incubadas com 50 nM da sonda fluorescente *MitoTracker*[®] (vermelho) e, posteriormente, incubadas com o anticorpo primário anti-aldh4a1 (1:20). Após isso, as células foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo acoplado à sonda *AlexaFluor488* (Invitrogen[®]) (1:600). As lâminas foram visualizadas sob um microscópio confocal *Nikon E600* (objetivo apocromático de *Nikon 100/1.4*) acoplado à câmera *DXM200-Nikon* com lentes de magnificação 2.5. As imagens foram editadas no *software* *LCM v2.0* para *Windows XP*. Dois campos diferentes obtidos da mesma preparação são apresentados na figura.

Dada a disponibilidade limitada do anticorpo comercial anti-aldh4a1, o soro policlonal obtido com a proteína TcP5CDH-6xHis também foi testado em ensaios de IFI. A imunomarcação com o anti-TcP5CDH foi realizada em todas as formas de desenvolvimento do *T. cruzi* (Figura 24) e, em células CHOk₁ infectadas com formas tripomastigotas (Figura 25). As lâminas de IFI demonstram as diferenças morfológicas presentes em cada um dos estágios de desenvolvimento do parasita. Observa-se, por exemplo, que no estágio replicativo, E, o cinetoplasto está próximo ao núcleo, enquanto que no estágio infectivo, T, o cinetoplasto emerge da região anterior com respeito do núcleo (Figura 24, painéis E e T azul). O cinetoplasto é uma rede concatenada ao DNA (kDNA) que representa o DNA mitocondrial nos organismos da ordem kinetoplastida (HAJDUK; SIQUEIRA; VICKERMAN, 1986). Quando utilizada uma sonda que intercala no DNA, a intensidade de fluorescência para o kDNA é maior que aquela exibida pelo DNA nuclear (Figura 24, azul).

O sinal de fluorescência da sonda *MitoTracker*[®] depende do potencial de membrana mitocondrial, gerado na cadeia transportadora de elétrons, e se mantém retido após a fixação (Figura 24, 25 vermelho). Em todas as formas de desenvolvimento do *T. cruzi*, evidenciou-se a marcação típica da mitocôndria, que se espalha pelo corpo do parasita e se acentua na região próxima ao kDNA (Figura 24, vermelho). Este padrão também foi evidenciado nos estágios E, M, A e Ei, quando realizada a imunomarcação com o soro anti-TcP5CDH (verde), onde a região de co-localização se observa próxima ao cinetoplasto (Figura 24, amarelo). Os dois estágios infectivos (M e T) mostraram particularidades na imunomarcação com o anti-TcP5CDH. No estágio M, por exemplo, se observou claramente, uma forte co-localização (amarelo) na região posterior do parasita, que está próxima ao kDNA (Figura 24, seta branca na coluna M). Esse resultado se assemelha ao observado na marcação com o anti-aldh4a1 em E do *T. cruzi* (Figura 23).

Por outro lado, no estágio T a marcação com o anti-TcP5CDH se distribui ao redor do parasita, e somente se observa padrão de co-localização na região lateral que foi marcada com o *MitoTracker*[®] (Figura 24, painel T).

Figura 24 - Análise por IFI em todas as formas de desenvolvimento do *T. cruzi*

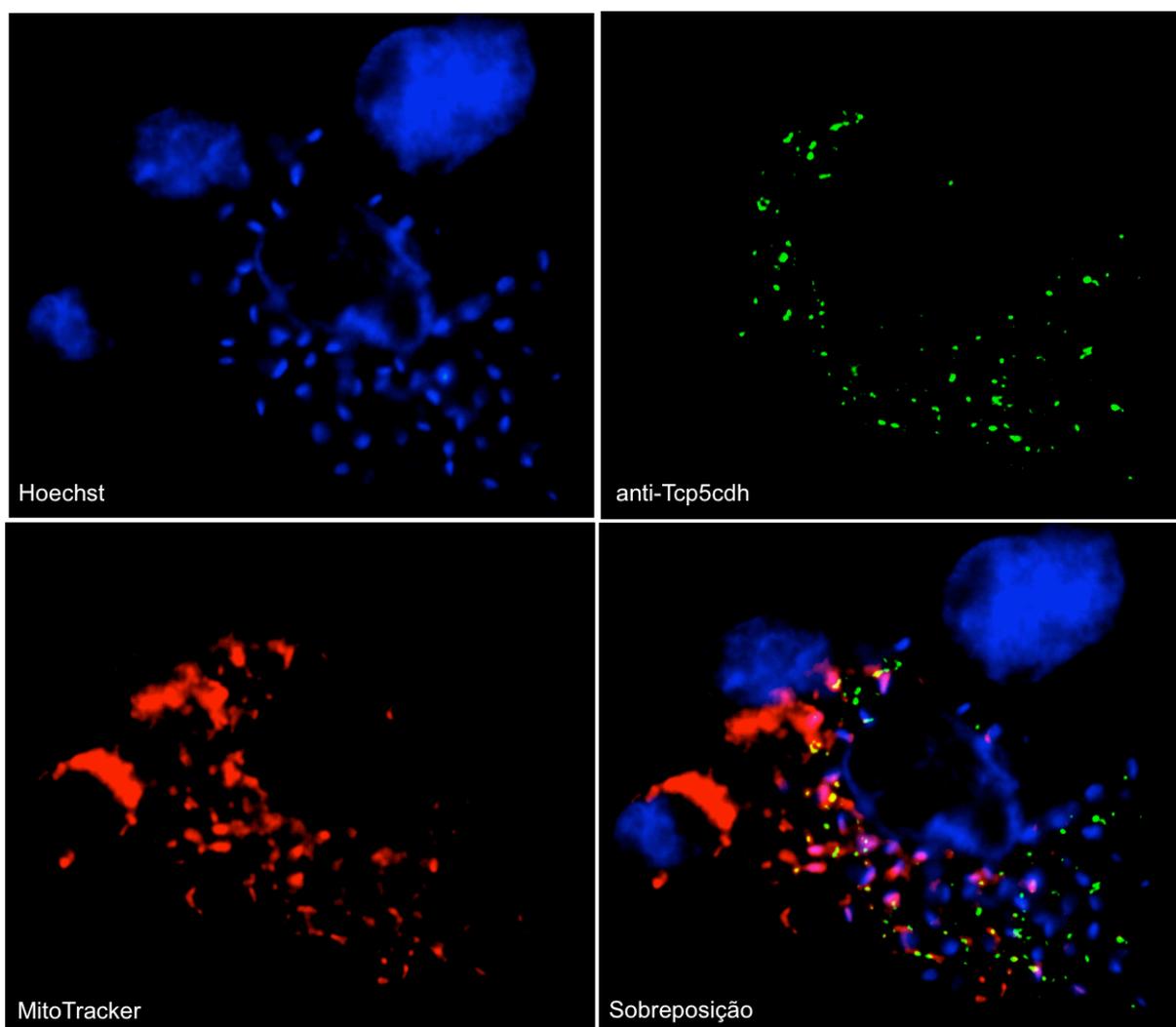


Parasitas, (5×10^6 células ml⁻¹) das formas epimastigota (E), tripomastigota metacíclico (M), amastigota (A), epimastigota intracelular (Ei) e tripomastigota derivado da infecção em CHO-k₁ (T), foram pré-incubados (30 min) com 50 nM do substrato fluorescente *MitoTracker-CMXRos* (Invitrogen[®]) dissolvido nos correspondentes meios de cultura. As células foram lavadas e aderidas a lâminas de vidro pré-tratadas com poli-lisina (1 mg ml⁻¹) (Sigma[®]), fixadas com 3% *p*-formaldeído (p/v) e permeabilizadas com 0,1% Tritón X-100 (v/v). Os parasitas foram bloqueados com PBS + 2% FCS e incubados com o soro anti-Tcp5CDH (1:150). Seguindo disso, as amostras foram incubadas com um anticorpo secundário anti-IgG de camundongo conjugado à sonda *Alexa Fluor-488* (Invitrogen[®]). O DNA foi marcado com a sonda *Hoechst 33258* (Invitrogen[®]) (1:2.000), durante 5 minutos. Todas as diluições foram realizadas em tampão PBS + 2% FCS. Uma preparação adicional, com células CHO-k₁ infectadas com T, aderidas a lamínula de vidro em placas de 24 poços, foi realizada. Após 3 dias de infecção, as células foram lavadas e as lamínulas utilizadas para realizar a IFI como descrito acima para as outras formas. A visualização das lâminas foi feita em um microscópio de fluorescência *Axio Imager motorized M.2* (Carl Zeiss[®]) em objetivo de 100X. A sobreposição e edição das imagens foi realizada no programa *ImageJ* v1.4p (NIH) versão para *Windows* de 64-bits. As setas indicam a região amarela onde se evidencia a co-localização entre a marcação com o anti-Tcp5CDH e a sonda *MitoTracker* (amarelo).

Entretanto, quando o anti-Tcp5CDH foi testado contra as formas intracelulares do *T. cruzi*, derivadas do modelo CHO-k₁, os parasitas puderam ser claramente distinguidos da

célula, tanto pela marcação exibida para o DNA, quanto na marcação com o anti-TcP5CDH. Esse dado mostra que o soro policlonal anti-TcP5CDH é específico para a isoforma TcP5CDH do parasita, nas condições aqui descritas (Figura 25).

Figura 25 - Análise por IFI de células CHO-k₁ infectadas com formas tripomastigotas do *T. cruzi*.



As células CHO_{k1} foram distribuídas em placas de 24 poços contendo uma lamínula de vidro estéril. Após aderidas, as células foram infectadas com formas T (3 h a 37 °C). Após 3 dias de infecção, as células foram lavadas e as lamínulas utilizadas para realizar a IFI como descrito na figura anterior para as outras formas do parasita.

3.4.3 A enzima TcP5CDH é regulada positivamente nos estágios infectivos do *T. cruzi*

Após observadas as diferenças no perfil de imunomarcagem para a TcP5CDH, nas distintas formas de desenvolvimento do *T. cruzi*, partimos para a análise quantitativa da

expressão dessa enzima. Para isto, avaliamos os níveis do transcrito (mRNA), proteína e atividade enzimática em cada um dos estágios do parasita.

Amostras de RNA total extraídas de cada forma de desenvolvimento do parasita foram primeiramente analisadas sob condições desnaturantes. Ali notou-se claramente as diferenças existentes entre o tamanho dos RNA ribossomais (rRNA) para *T. cruzi*, CHO_k1 e levedura (Figura 26A) (WHITE; RUDENKO; BORST, 1986).

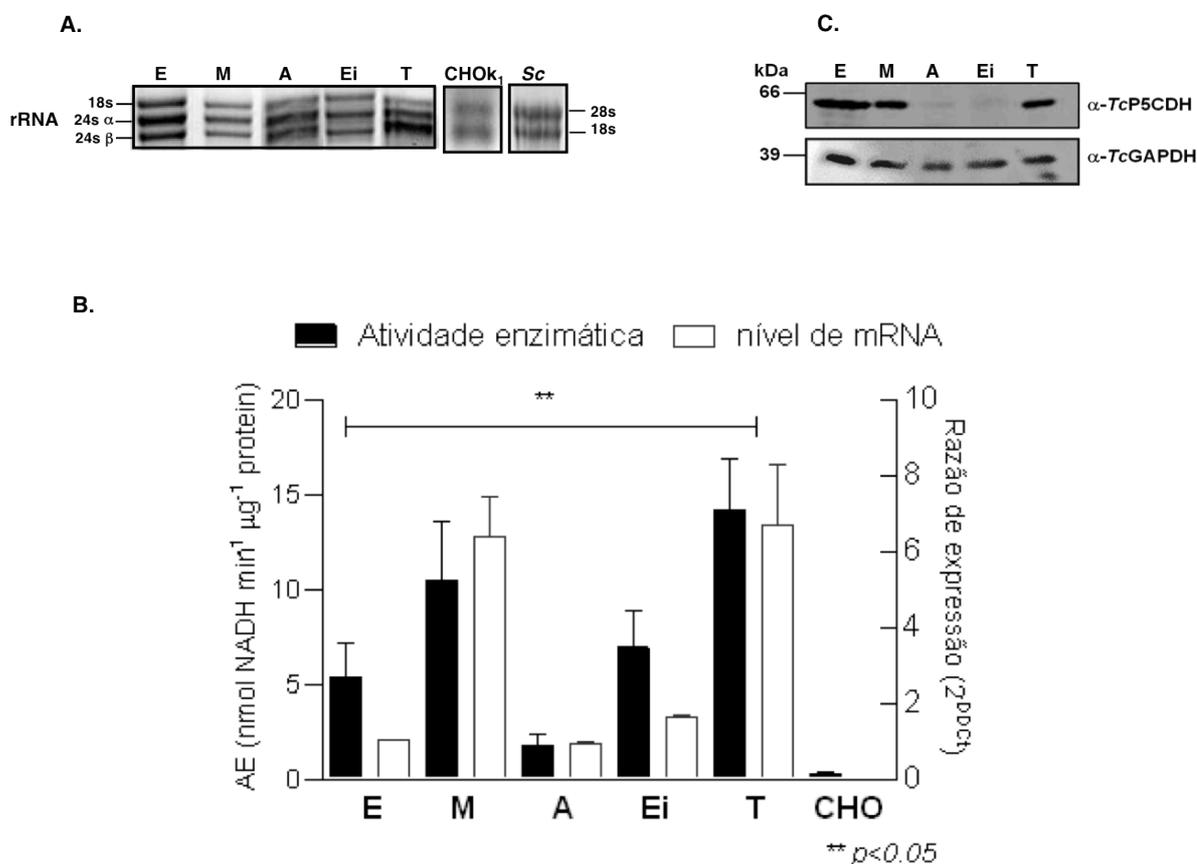
Seguido disso, a análise da abundância do mRNA para a enzima TcP5CDH foi realizada usando o estágio E como amostra referência (razão de expressão = 1). Os níveis de mRNA, nos estágios infectivos M e T, foram significativamente maiores (3-vezes) com respeito aos estágios replicativos, E e A, e ao estágio transiente Ei (valor $p < 0,05$) (Figura 26B, eixo-y direita). Os estágios intracelulares (A e Ei) não apresentaram diferenças significativas com respeito do estágio E.

Quando a expressão da TcP5CDH, dada pela atividade enzimática, foi comparada com o observado para os níveis de mRNA, se observaram diferenças significativas entre os estágios T e E, Ei e A, e, M e A (Figura 26B, eixo-y esquerda). Nos três casos a diferença foi maior (≥ 3 -ordens de grandeza) para T, Ei e M com respeito ao E e A, respectivamente. No caso de M, a atividade foi maior com respeito ao E, mas nesse caso, esta diferença não foi estatisticamente significativa, como visto ao nível de mRNA (Figura 26B).

Para verificarmos esses dados foi necessária a detecção da proteína em ensaios de *western blot*. O resultado não mostrou diferenças significativas em termos de abundância proteica, quando comparado o estágio E com os estágios M e T. No caso dos estágios intracelulares, A e Ei, a intensidade da banda foi menor com respeito dos outros (Figura 26C).

Embora não houve uma correlação absoluta com os dados do *western blot*, os dados de mRNA e atividade enzimática mostraram que a enzima TcP5CDH é regulada positivamente nos estágios infectivos (M e T) do *T. cruzi*. Esses dados (mRNA e atividade enzimática para TcP5CDH) são consistentes com as diferenças reportadas para o transcriptoma de *T. cruzi* (MINNING et al., 2009).

Figura 26 - Análise da expressão de TcP5CDH nas distintas fase de desenvolvimento do *T. cruzi*



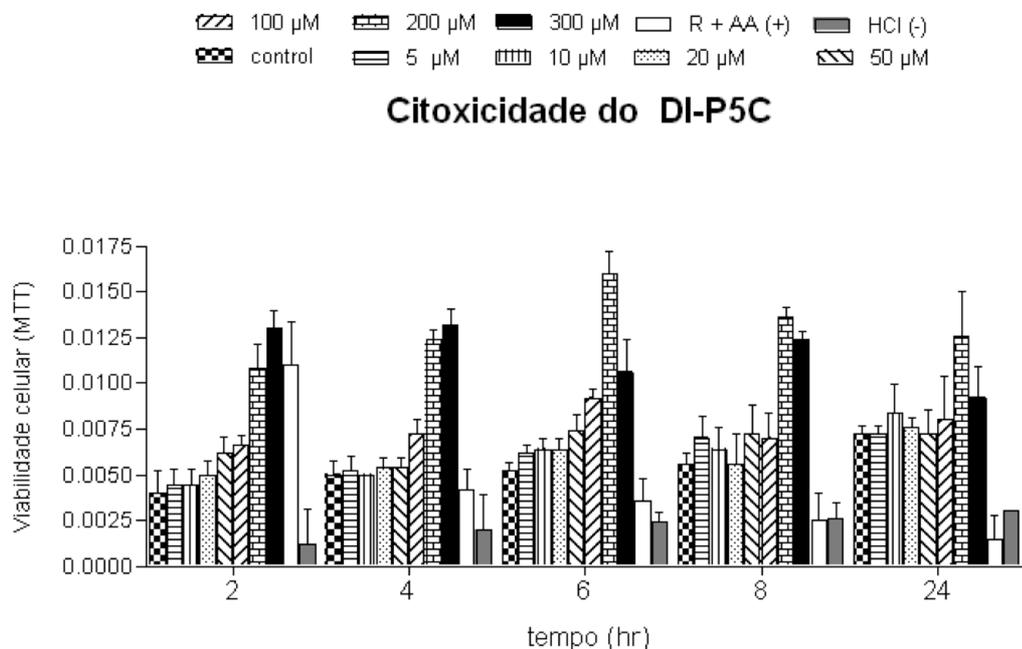
A) Eletroforese de RNA em gel de agarose sob condições desnaturantes, com amostras de RNA total extraídas a partir das principais formas de desenvolvimento do *T. cruzi*, células CHO-k₁ e da levedura *S. cerevisiae* Δ PUT2 (*Sc*). A corrida revelou as subunidades do rRNA que em tripanossomas corresponde às subunidades 18S, 24S α e 24S β sendo que para os outros eucariotas analisados (CHO-k₁ e levedura) se observam as subunidades 28S e 18S. B) Níveis de expressão para a TcP5CDH nos distintos estágios do *T. cruzi*. A determinação do mRNA foi feita através da técnica de qRT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos que amplificam um fragmento do gene *TcP5CDH*. O gene *TcGAPDH* foi utilizado como normalizador (*in-house keeping*). A razão de expressão foi calculada com respeito ao estágio E utilizando o método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, cujo valor por definição é 1. Como controle negativo foi utilizado cDNA a partir das células CHO-k₁ não infectadas. Os valores representados no gráfico são a resultante de três réplicas feitas separadamente (eixo-y direita). As diferenças entre os perfis de expressão foram comparadas utilizando o teste de ANOVA-uma via (valor $p < 0.05$). A atividade específica (AE) TcP5CDH foi também avaliada nos distintos estágios do *T. cruzi* e os valores representados no gráfico (eixo-y esquerda). A medição da atividade enzimática foi realizada como descrito previamente, para extratos do parasita. C) Ensaio de *western blot* realizado com extratos proteicos das formas de vida do *T. cruzi* (2×10^7 células/canaleta). As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida desnaturante (12% SDS-PAGE), eletro transferidas à membrana de nitrocelulose e incubadas com o soro anti-TcP5CDH (1:2.000) que reconhece uma única proteína de tamanho esperado (aprox. 64 kDa) e o anti-TcGAPDH (normalizador) (1: 2.500) que reconhece uma banda de 39 kDa. As membranas foram lavadas, e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Sigma®) (1:2.500), e reveladas por quimiluminescência com o substrato luminol ECL (Thermo®, *Life Sciences*).

3.5 Avaliação do papel fisiológico da TcP5CDH e o seu substrato (P5C)

3.5.1 O substrato P5C pode ser utilizado como fonte energética pelo *T. cruzi*

Estudos feitos em *S. cerevisiae*, mutantes para o gene *PUT2* (ortólogo do *TcP5CDH*), demonstraram que o acúmulo de P5C intracelular altera o balanço redox, o que resulta tóxico para a célula (NISHIMURA et al., 2010; NOMURA; TAKAGI, 2004). Os ensaios feitos com formas epimastigotas do *T. cruzi* mostraram que a adição externa de P5C não prejudica o parasita. De fato, concentrações de P5C acima de 100 μM , o parasita é capaz de incorporá-lo no interior da célula e utilizá-lo como fonte de carbono; preservando a viabilidade celular (Figura 27). Após 6 h, as diferenças entre a adição de P5C e os controles foram mais evidentes (Figura 27). O solvente do P5C (1 M HCl) não mostrou este mesmo perfil. Este último foi comparável com o observado no controle positivo, uma mistura de rotenona + antimicina-A, inibidores dos complexos I e III na cadeia transportadora de elétrons, respectivamente, que apresentaram um efeito letal após 4 h de incubação (Figura 27).

Figura 27 - Avaliação do efeito citotóxico de P5C em formas epimastigotas

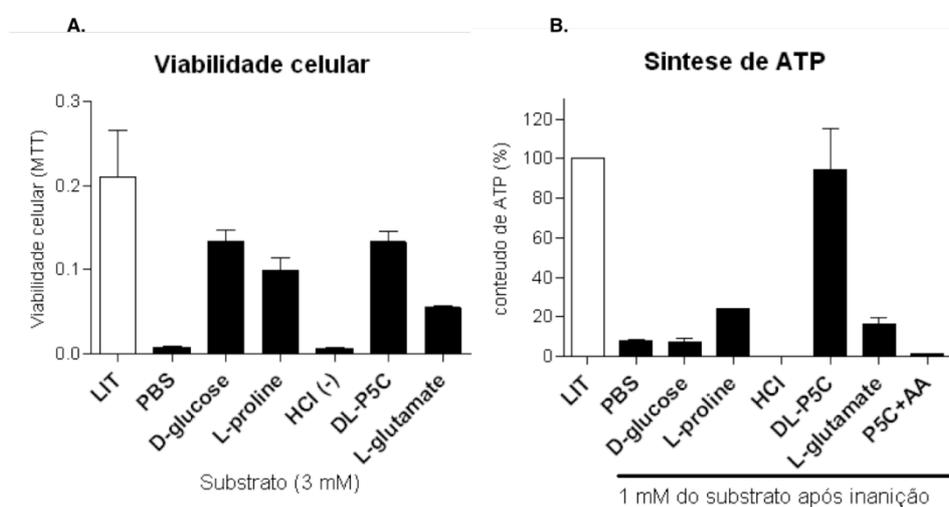


As células (2×10^7 células/tubo) foram lavadas duas vezes com PBS 1 X e incubadas com concentrações crescentes de P5C fresco dissolvido em 1 M HCl (0 - 300 μM), ou uma mistura de rotenona (60 μM), antimicina (0,5 μM) como controle positivo de viabilidade, durante 24 horas. Aliquotas dos tempos 2, 4, 6 e 8 h foram lavadas e usadas no ensaio de viabilidade pelo método do MTT (λ 595-690 nm).

Como mencionado anteriormente, a L-prolina pode restabelecer os níveis de ATP diminuídos após uma condição de estresse nutricional (MARTINS et al., 2009). Tendo visto que o P5C pode incorporar este metabólito do meio externo mantendo viabilidade celular do parasita, optamos por avaliar se este poderia estar envolvido na síntese de ATP.

Quando os parasitas foram submetidos a estresse nutricional, mediante a incubação com uma única fonte de energia, se observou que a viabilidade celular é mantida pelo P5C, como também acontece na presença de D-glicose ou L-prolina (Figura 28A). Um ensaio adicional, com parasitas submetidos a depleção nutricional (30 h) e, posteriormente, recuperados pela adição de diferentes fontes energéticas, mostrou que os níveis de ATP, P5C-dependente, foram maiores quando comparado com os outros substratos (Figura 28B). Este efeito foi revertido no tratamento com P5C na presença de antimicina-A, um inibidor da oxidação do ubiquinol (ao nível do complexo III, citocromo *c* redutase), na cadeia transportadora de elétrons (Figura 28B). O L-glutamato, no entanto, produto de reação da TcP5CDH, não mostrou esse mesmo rendimento tanto na viabilidade celular, quanto nos níveis de ATP (Figura 28A e B).

Figura 28 - Análise do efeito de P5C na viabilidade celular e síntese de ATP.

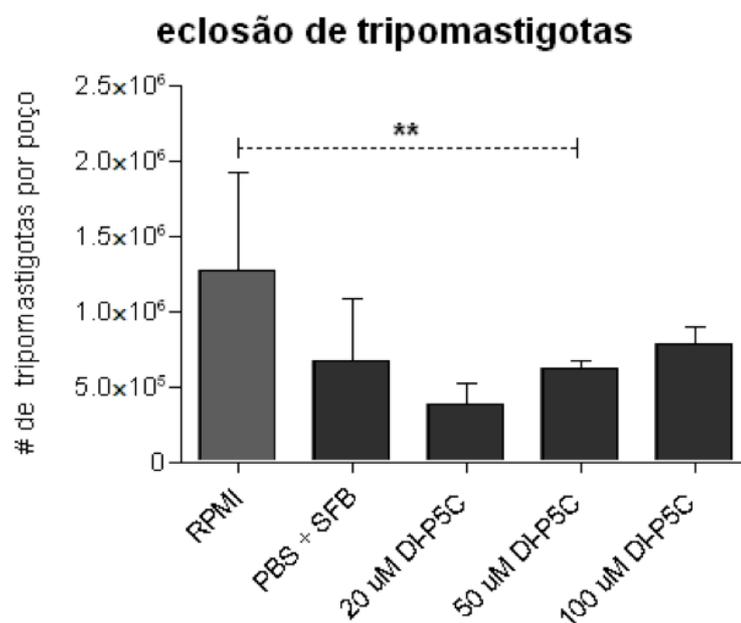


A) Ensaio de viabilidade celular em parasitas submetidos a estresse metabólico. As células (2×10^7 células/tratamento) foram incubadas durante 72 h na presença de PBS (controle positivo) ou PBS suplementado com 3 mM de cada metabólito (D-glicose / L-prolina / P5C / L-glutamato). Uma medição adicional usando o mesmo número de células mantidas em meio LIT foi também realizada (controle negativo). Outro controle na presença de 1 M HCl (solvente do P5C) foi realizado. Após a incubação, as células foram lavadas e usadas no ensaio de viabilidade pelo método de MTT ($\lambda 595-690$ nm). B) Medição dos níveis de ATP em epimastigotas após inanição. Os parasitas (5×10^6 células/tratamento) foram incubados em PBS durante 30 horas e recuperados durante 1 hora a 28 °C pela adição de 1 mM de cada metabólito (D-glicose / L-prolina / HCl / P5C / L-glutamato / P5C + 0,5

μM de antimicina-A). Para as células incubadas com P5C ou HCl foi necessário ajustar o pH da reação a 7,0 com KOH, prévio à realização do ensaio. A dosagem intracelular de ATP foi realizada seguindo procedimentos descritos pelo fabricante (Sigma®). O valor de porcentagem de ATP foi calculado a partir do dado obtido para células na condição normal (LIT), considerada como o 100%.

O modelo de infecção em células de mamífero (CHOk₁) permite a avaliação do ciclo intracelular do parasita. Considerando que a enzima TcP5CDH é regulada positivamente nos estágios infectivos, e que o processo de adesão e invasão, pelo *T. cruzi*, à célula hospedeira, depende de energia, analisamos o ciclo infeccioso em formas tripomastigotas submetidas a estresse nutricional e incubadas na presença de P5C sintético. Baseados no número de formas tripomastigotas liberadas ao sobrenadante da cultura, após a infecção (6to dia) em células CHOk₁, observamos diferenças entre os parasitas incubados em condições normais ($13 \pm 6 \times 10^5$ tripomastigotas ml^{-1} em meio RPMI + 10% SFB) com aqueles incubados com PBS suplementado com distintas concentrações de P5C ($3,8 \pm 1,4$; $6,2 \pm 0,5$; $8,2 \pm 1,2 \times 10^5$ tripomastigotas ml^{-1} em PBS + 20, 50 ou 100 μM de P5C, respectivamente) (Figura 29). Como esperado, o grupo controle mostrou uma redução pela metade, na eclosão de tripomastigotas ($6,7 \pm 4 \times 10^5$ tripomastigotas ml^{-1} em PBS + 10% SFB v/v) com respeito da condição normal em meio RPMI (Figura 29). Nesse sentido, a adição de P5C externo mostrou um efeito dose-dependente no número de parasitas liberados ao meio extracelular, sugerindo, novamente, que este composto pode ser utilizado pelas formas infectivas do parasita e facilitar a invasão celular.

Figura 29 - Efeito dose-resposta do P5C no processo de eclosão de formas tripomastigotas em células de mamífero (CHO-k1)



As células (5×10^4 células por poço) foram distribuídas em placas de 24 poços e incubadas durante 24 h (37°C sob atmosfera de 5% CO_2). Seguindo disso, os parasitas ($2,5 \times 10^5$ de formas tripomastigotas por poço) foram lavados duas vezes com PBS + 10% SFB, coletados por centrifugação (10 min, $950 \times g$) e incubados na presença de: RPMI (controle da infecção) / PBS + 10% SFB (controle negativo) / PBS + 10% SFB + diferentes concentrações de P5C (como indicado na figura), durante 3 h (37°C sob atmosfera de 5% CO_2). Os parasitas não aderidos, foram retirados com a pipeta e as células foram lavadas três vezes com PBS 1X e suplementadas com meio RPMI + 10% SFB até completar o ciclo de diferenciação intracelular (6 dias). Após este tempo, o número de tripomastigotas liberados ao sobrenadante da cultura celular foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. O gráfico representa a média ($n=6$) e o desvio padrão de cada contagem. As diferenças foram analisadas mediante o teste ANOVA-1a via, seguido do post-teste de Bonferroni, considerando o valor $p < 0,05$ (***) como estatisticamente significativo.

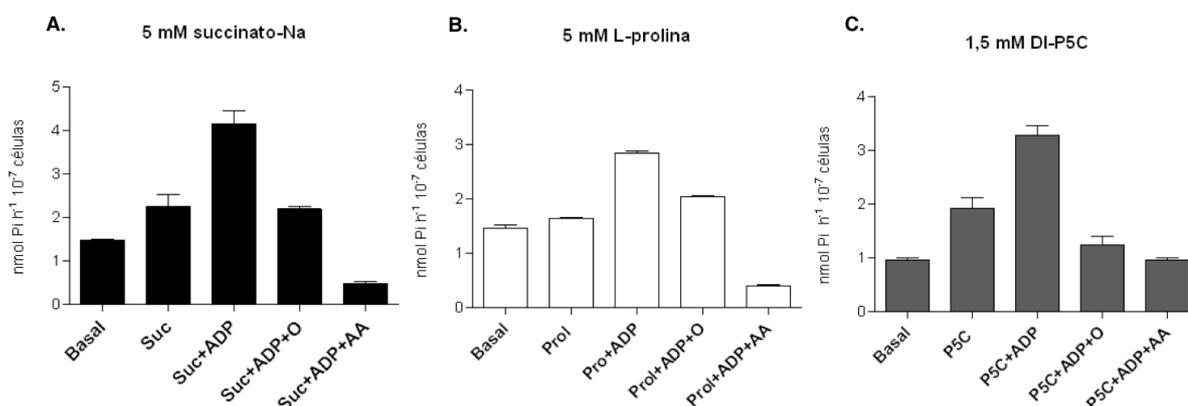
Visto que a síntese de ATP, dependente de P5C, envolveria processos oxidativos na mitocôndria, os níveis de ATP foram comparados entre diferentes substratos mitocondriais. Para isto, foi utilizado um método de quantificação do ATP que baseia-se na incorporação de ^{32}P em $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}] \text{ATP}$; reação catalisada pela enzima hexocinase que fosforila glicose a partir da hidrólise de ATP. Se de fato, a síntese é produzida na cadeia respiratória, a adição de ADP externo, estimularia a quantidade total de ATP na presença do substrato sob análise. Na presença de succinato (substrato do complexo II mitocondrial) o parasita sintetiza ATP; processo que é aumentado pela adição de ADP e revertido com oligomicina (inibidor da ATP-sintase mitocondrial). Quando adicionado antimicina-A, a síntese de ATP se reduziu notavelmente (Figura 30A). A utilização de L-prolina como substrato mitocondrial já foi

demonstrada anteriormente (PAES, L.S et al., 2013). A quantidade total de ATP, prolina-dependente, foi semelhante ao observado com succinato (Figura 30B).

No caso do P5C, usado a uma concentração dez vezes acima do K_m determinado para TcP5CDH, observou-se um aumento (1,5 vezes) na quantidade do ATP quando se adicionou ADP. Na presença de ADP e oligomicina a quantidade de ATP se reduziu à metade com respeito ao tratamento com P5C somente. A antimicina-A reverteu os níveis de ATP até o nível basal (Figura 30C).

Esses dados demonstram, novamente, que o P5C pode ser usado como substrato mitocondrial, levando à produção de ATP através do processo de fosforilação oxidativa.

Figura 30 - Dosagem de ATP sob distintos substratos mitocondriais.



Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT, coletadas após o 4to dia de crescimento (1×10^8 células ml⁻¹), lavadas em PBS (10 min, $1.500 \times g$ a $4^\circ C$) e, posteriormente incubadas (30 min) em 500 μ l de tampão de reação (125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM de MgCl₂, 2 mM de K₂HPO₄) na presença de: 5 mM succinato (preto) / 5 mM L-prolina (branco) / 1,5 mM P5C (cinza) ou substrato + 1 mM ADP / substrato + 1 mM ADP + 5 μ g ml⁻¹ oligomicina (O) / substrato + 1 mM ADP + 5 μ M antimicina-A (AA). Após esse tempo, a reação foi parada pela adição de 400 μ l de molibdato. O excesso de 32-Pi não incorporado ao ATP, na presença de molibdato, forma o complexo fosfomolibdato, que então foi removido com o solvente orgânico acetato de butila. A contagem da radiação foi realizada em cintilador, e os valores foram convertidos a nmol Pi h⁻¹ 10⁻⁷ células, como indicado no eixo-y. O gráfico representa a média (n=3) e o desvio padrão para cada medição.

3.5.2 A super-expressão da enzima TcP5CDH produz alterações morfológicas no parasita e estimula a respiração celular

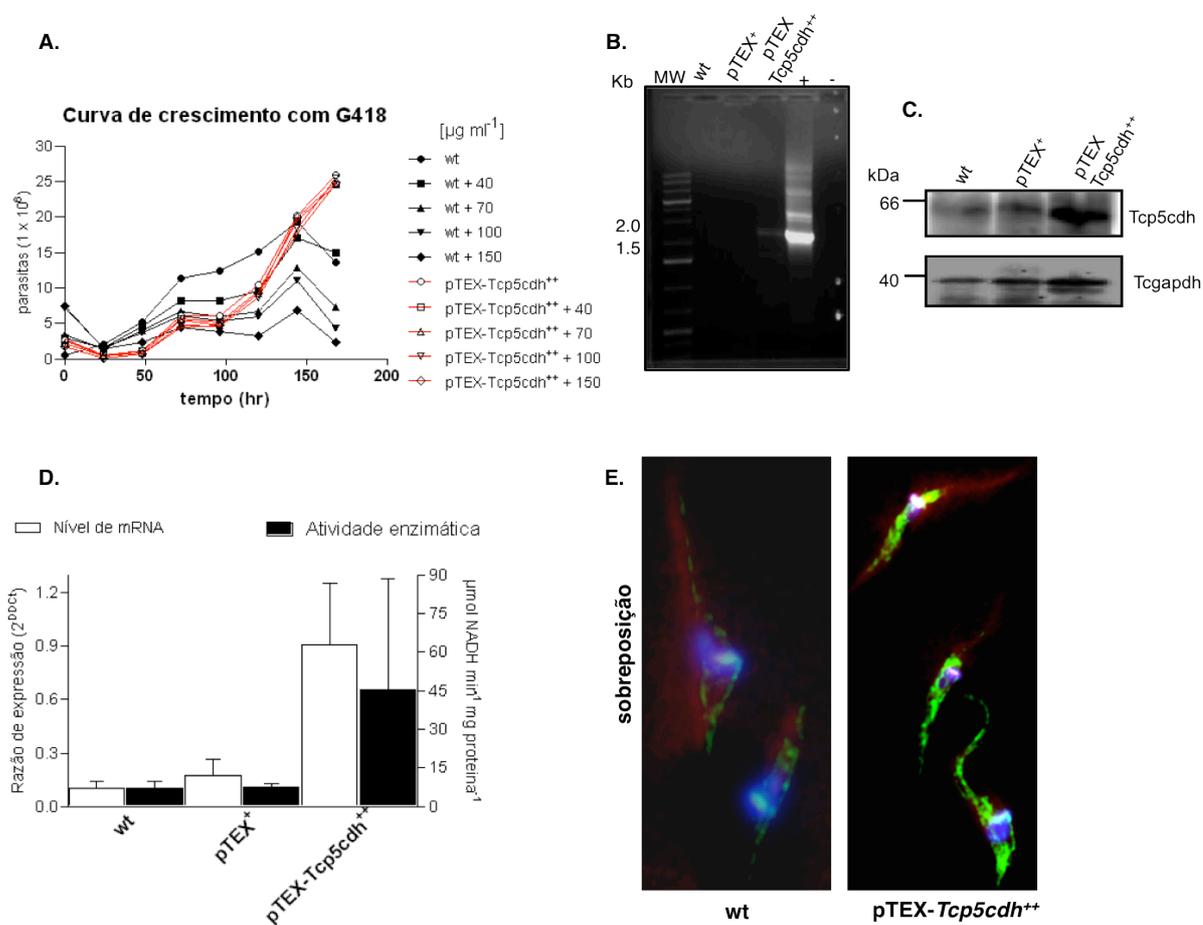
Considerando que a enzima TcP5CDH é regulada positivamente nos estágios infectivos do *T. cruzi*, partimos para avaliar alguns parâmetros decorrentes da super-expressão da TcP5CDH. O *T. cruzi* é sensível a G418 (Figura 31A). Isto pode ser alterado pela inserção do

vetor pTEX, que confere resistência a G418 permitindo o uso deste como marcador de seleção no ensaio de transfecção (Figura 31A).

As comparações foram realizadas entre parasitas do tipo selvagem (wt), parasitas controle transformados com o vetor vazio (pTEX⁺) e aqueles que apresentavam uma cópia ectópica da ORF *TcP5CDH* (1,686 Kb) (pTEX-TcP5CDH⁺⁺). A presença do epissomo foi verificada por PCR convencional a partir de DNA total das linhagens em análise. Os oligonucleotídeos usados anelam nos dois extremos do sítio múltiplo de clonagem, onde foi inserida a ORF *TcP5CDH*, pelo que o fragmento amplificado (aprox. 1,8 Kb) é específico para a construção pTEX-TcP5CDH⁺⁺ (Figura 31B).

Os níveis de proteína, para a TcP5CDH, mostraram um leve aumento na linhagem pTEX-TcP5CDH⁺⁺ com respeito aos controles. Porém, os níveis proteicos para a Tcgapdh não se mostraram constantes nas três linhagens (Figura 31C). As diferenças observadas nos níveis de mRNA e atividade enzimática para TcP5CDH para a linhagem pTEX-TcP5CDH⁺⁺, sugerem que a cópia ectópica adicional inserida (*TcP5CDH*) confere um aumento na expressão do seu produto gênico (Figura 31D). Esse dado também foi avaliado pela intensidade de fluorescência observada nos parasitas imunomarcados com o anti-TcP5CDH (Figura 31E).

Figura 31 - Avaliação das linhagens de *T. cruzi* super-expressoras para a TcP5CDH



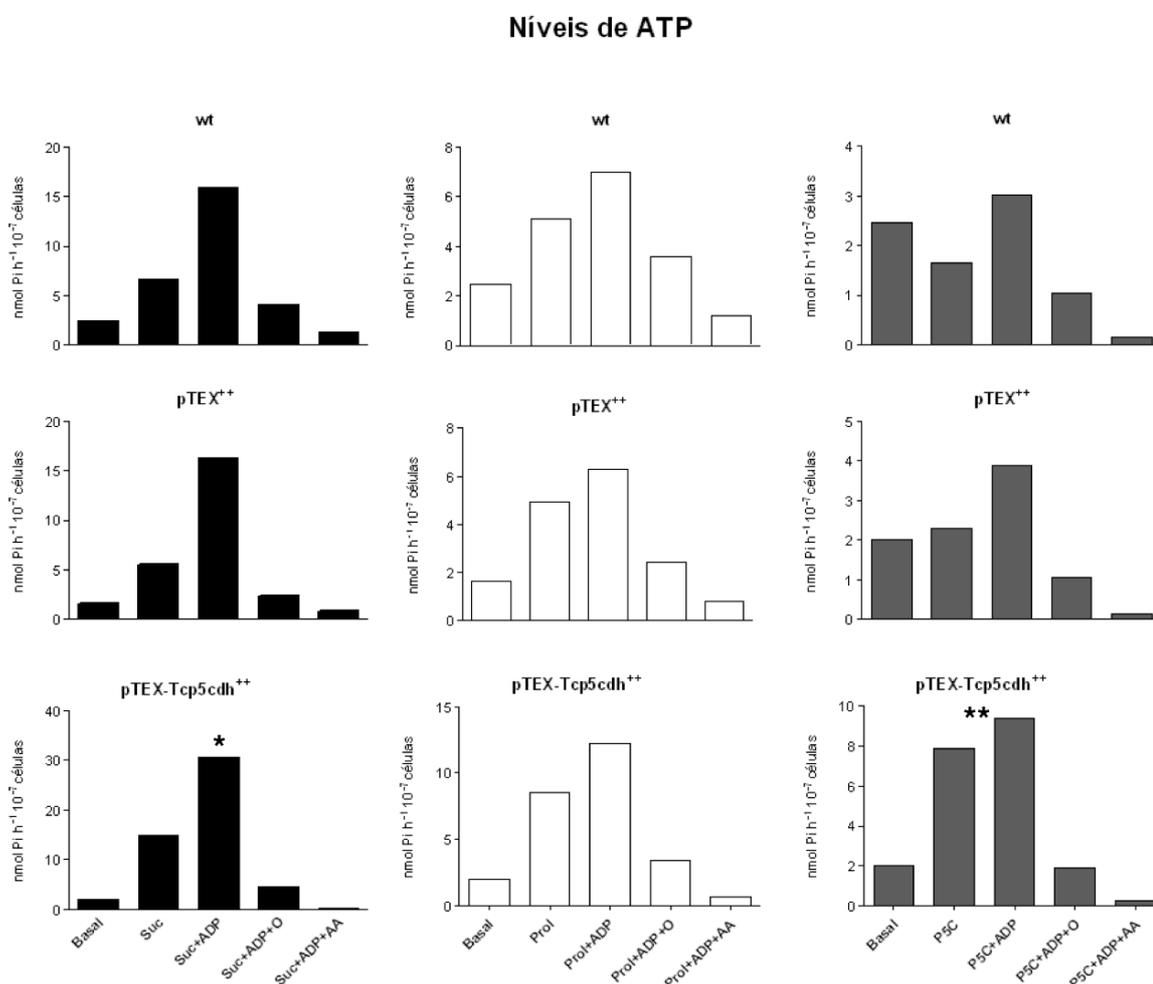
Curva de crescimento para formas epimastigotas (wt e pTEX-TcP5CDH⁺⁺) cultivadas em meio LIT (28 °C durante 8 dias) na presença de concentrações crescentes de G418 (40 – 150 µg ml⁻¹). As culturas foram iniciadas a partir de 5×10^6 células ml⁻¹ e a densidade celular foi monitorada, diariamente, segundo a mudança na absorvância ($\lambda_{600 \text{ nm}}$). Os valores de abs. foram transformados em número de células a partir de uma curva de calibração realizada com concentrações de células pré-estabelecidas. B) Análise da presença do episossomo através de PCR convencional. A reação foi realizada com oligonucleotídeos específicos para o vetor pTEX. O oligonucleotídeo *sense* (intGAPDH) anela na região 5' do sítio múltiplo de clonagem e o oligonucleotídeo *antisense* (T7 terminador) anela na região *downstream* da ORF TcP5CDH. Amostras de DNA genômico total foram extraídas e usadas (30 ng) na reação de PCR. Como controles da reação foram usados 5 ng de DNA plasmidial do clone pTEX-TcP5CDH⁺⁺ (positivo) ou água ao invés de DNA (negativo). As amostras foram resolvidas em gel de agarose (p/v) e coradas com BrEt. O produto de amplificação (aprox. 1,9 Kb) foi igual no controle positivo e na amostra pTEX-TcP5CDH⁺⁺. C) Análise por *western blot* dos níveis de proteína TcP5CDH. Os extratos foram preparados a partir de 2×10^7 células ml⁻¹ e, quantidades iguais de proteína (30 µg) foram carregadas no gel. A transferência, incubação com os anticorpos e revelado foi realizada como descrito anteriormente. D) Níveis de mRNA e atividade enzimática para TcP5CDH nas linhagens mutantes. A quantificação do transcrito TcP5CDH foi realizada mediante *qRT-PCR* como descrito na seção 2.4.5 de materiais e métodos. As leituras foram feitas em triplicata e os valores normalizados contra o gene TcGAPDH e, posteriormente contra o grupo wt ($2^{-\Delta\Delta C_t}$). Os valores no gráfico (eixo-y esquerda) representam as médias (n=3) do experimento. A atividade específica TcP5CDH foi também avaliada nas distintas linhagens do *T. cruzi* e os valores representados no mesmo gráfico (eixo-y direita). A medição da atividade enzimática foi realizada como descrito previamente, para

extratos do parasita. E) Análise por IFI em formas epimastigotas obtidas a partir das linhagens wt e pTEX-TcP5CDH++. A imunomarcção foi realizada como descrito na figura 24.

Após determinado que os parasitas mutantes apresentaram uma expressão aumentada da enzima TcP5CDH, procedemos com a análise de algumas funções mitocondriais decorrentes da atividade TcP5CDH alterada. Nesse sentido, os níveis respiratórios e a produção de ATP foram determinados na linhagem super-expressora de TcP5CDH e comparados com os controles. A síntese de ATP foi maior na presença de succinato tanto nos parasitas wt ($6,95 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$) quanto nos parasita controle (pTEX⁺) ($5,67 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$), com respeito dos outros dois substratos testados (L-prolina/P5C) (Figura 32, preto). Sob essa mesma condição, medida no mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺, os níveis de ATP se duplicaram ($14,93 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$) (Figura 32, preto). Ainda a diferença foi maior quando a síntese foi estimulada pela adição de ADP externo ($30,58 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$) (Figura 32, preto).

O mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺ mostrou os níveis de ATP aumentados sob os três substratos analisados ($14,93$; $8,5$ e $7,9 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$ para succinato, prolina e P5C, respectivamente), com respeito das duas linhagens controles. Particularmente, a síntese de ATP não foi estimulada na presença de P5C e ADP ($9,4 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$), com respeito ao P5C ($7,9 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$), no mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺ (Figura 32, cinza). Enquanto que nos grupos controles foi observado um aumento de duas vezes para o wt ($1,65$ e $3,03 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$ para os substratos P5C e P5C + ADP, respectivamente) e pTEX⁺ ($2,29$ e $3,9 \text{ nmol Pi h}^{-1} 10^7 \text{ células}^{-1}$ para os substratos P5C e P5C + ADP, respectivamente) (Figura 32, cinza). A inibição da síntese de ATP foi observada em todos os casos na presença dos inibidores mitocondriais para a ATP sintase (oligomicina) ou do complexo III da cadeia transportadora de elétrons (antimicina-A).

Figura 32 - Dosagem de ATP em parasitas mutantes e wt



Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT (wt) ou meio LIT + 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ G418 (pTEX+, pTEX-TcP5CDH++), coletadas após o 2do dia de crescimento (1×10^8 células ml^{-1}), lavadas em PBS (10 min, $1.500 \times g$ a 4°C) e, posteriormente, incubadas (30 min) em 500 μl de tampão de reação (125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM de MgCl_2 , 2 mM de K_2HPO_4) na presença de: 5 mM succinato (preto) / 5 mM L-prolina (branco) / 1,5 mM P5C (cinza) ou substrato + 1 mM ADP / substrato + 1 mM ADP + 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ oligomicina (O) / substrato + 1 mM ADP + 5 μM antimicina-A (AA). Após esse tempo, a reação foi parada pela adição de 400 μl de molibdato. O excesso de ^{32}P -Pi não incorporado ao ATP, na presença de molibdato, forma o complexo fosfomolibdato, que então foi removido com o solvente orgânico acetato de butila. A contagem da radiação foi realizada em cintilador, e os valores foram convertidos a $\text{nmol Pi h}^{-1} 10^{-7}$ células, como indicado no eixo-y. O gráfico representa os valores da média ($n=3$) para o experimento. Nas condições do ensaio, a produção de ATP, a partir de succinato, foi maior ($p < 0,05$) no mutante pTEX-TcP5CDH++ com respeito dos outros substratos (prol e P5C) e as outras linhagens (*). Na linhagem pTEX-TcP5CDH++ a síntese de ATP não é estimulada pela adição externa de ADP + P5C (**).

Os níveis de ATP determinados foram consistentes com as medições do consumo de oxigênio para as linhagens em estudo. As taxas respiratórias, determinadas em células intactas

na presença de succinato (4,58; 4,83 e 6,37 pmol de $O_2 \text{ s}^{-1} 10^{-7}$ células, para o wt, pTEX⁺ e pTEX-TcP5CDH⁺⁺, respectivamente) foram maiores no mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺ (Tabela 6). Somente na presença de succinato, a adição de ADP estimulou o consumo de oxigênio nas três linhagens testadas, (2,43; 2,76 e 3,47 pmol de $O_2 \text{ s}^{-1} 10^{-7}$ células, para o wt, pTEX⁺ e pTEX-TcP5CDH⁺⁺, respectivamente) sendo maior no mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺ (Tabela 6).

Por outro lado, nas células do tipo wt foram observadas diferenças entre os três substratos comparados, após a adição de digitonina (1,83; 2,08 e 2,46 pmol de $O_2 \text{ s}^{-1} 10^{-7}$ células, para succinato, L-prolina e P5C, respectivamente), mas estas não foram estatisticamente significativas (Tabela 6). No caso de P5C, como substrato respiratório, o consumo de oxigênio aumentou no mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺ sob as quatro condições testadas, quando comparado com o wt ou controle pTEX⁺ (Tabela 6). As diferenças encontradas nos níveis de consumo de oxigênio não apresentaram diferenças estatisticamente significativas.

Tabela 6 - Avaliação do consumo de oxigênio em parasitas mutantes e wt

Células:	WT	pTEX+	pTEX-TcP5CDH ⁺⁺
Substrato:	(pmol $O_2 \text{ s}^{-1} 10^{-7}$ parasitas)		
Succinato + DIG	1,8 ± 0,2	2,2 ± 0,3	2,8 ± 0,3
Succinato + ADP	2,4 ± 0,2	2,7 ± 0,3	3,5 ± 0,2
Succinato + Oligo	1,6 ± 0,1	1,8 ± 0,3	2,7 ± 0,3
Succinato + FCCP	3,3 ± 0,4	3,9 ± 0,5	4,1 ± 0,4
Prolina + DIG	2,1 ± 0,3	1,8 ± 0,8	2,8 ± 0,5
Prolina + ADP	2,1 ± 0,4	2,1 ± 0,7	2,6 ± 0,4
Prolina + Oligo	1,8 ± 0,5	1,8 ± 0,7	2,6 ± 0,4
Prolina + FCCP	2,2 ± 0,4	1,7 ± 0,05	3,2 ± 0,09
P5C + DIG	2,5 ± 0,4	2,2 ± 0,8	3,5 ± 0,9
P5C + ADP	2,3 ± 0,4	2,1 ± 0,7	3,3 ± 0,9
P5C + Oligo	2,2 ± 0,3	2,1 ± 0,6	2,8 ± 0,8
P5C + FCCP	2,1 ± 0,6	2,2 ± 0,7	2,5 ± 0,1

A - C) Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT (wt) ou meio LIT + 40 µg ml⁻¹ G418 (pTEX⁺, pTEX-TcP5CDH⁺⁺), coletadas após o 2do dia de crescimento (5×10^7 células ml⁻¹), lavadas em PBS (10 min, 1.500 x g a 4 °C) e, posteriormente, ressuspensas em 1000 µl de tampão de reação (125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM de MgCl₂, 2 mM de K₂HPO₄, 500 µM de EGTA). As medições de consumo de oxigênio foram realizadas em oxígrafo de alta resolução (Oroboros, *Oxygraph* – *O2K*) na presença de succinato, prolina ou P5C, seguido por adições sequenciais de: 1 mM ADP / 5 µg ml⁻¹ oligomicina (Oligo) / substrato + 1 mM ADP + 1 µM trifluorocarbonilcianeto de fenilhidrazona (FCCP). Os valores representam a media (n=3) e o desvio padrão calculados a partir de três replicas feitas em separado.

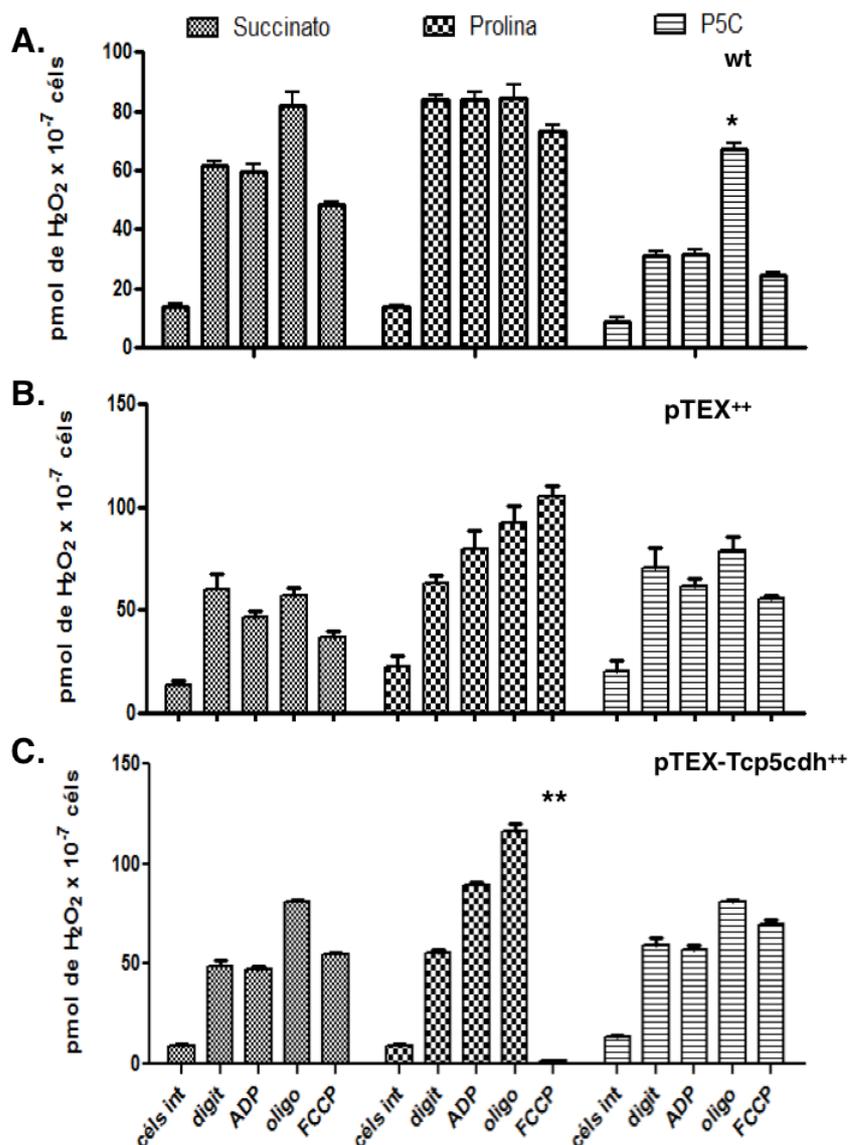
O P5C pode ser utilizado como substrato mitocondrial. A sua degradação está acoplada ao consumo de oxigênio, o que leva à síntese de ATP através do gradiente protomotriz gerado na cadeia transportadora de elétrons. A síntese de ATP foi estimulada pela adição de ADP e revertida na presença de um inibidor da ATP sintase (oligomicina).

É bem sabido que a cadeia transportadora de elétrons é uma fonte geradora de espécies reativas de oxigênio (EROs). Dependendo das condições fisiológicas e o substrato, parte do oxigênio consumido pode ser reduzido ao ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$) através de complexos respiratórios ou desidrogenase s. O $O_2^{\cdot-}$ pode ser dismutado a H_2O_2 pela ação de uma superóxido dismutase dependente de ferro (SOD-Fe) sensível a cianeto (BOVERIS; STOPPANI, 1977; ISMAIL et al., 1997).

Tendo isso, avaliamos as diferenças na geração de H_2O_2 entre as três linhagens celulares sob succinato, L-prolina ou P5C. Níveis semelhantes de H_2O_2 foram observados na presença de succinato ou L-prolina no grupo wt (Figura 33A). No caso de P5C se observaram as menores quantidades de H_2O_2 . Estas foram aumentadas significativamente ($p < 0,05$) quando se adicionou P5C + oligomicina (71 ± 4 pmol de H_2O_2 10^7 células) em comparação ao tratamento sem este inibidor ($29 \pm 2,3$ pmol de H_2O_2 10^7 células) (Figura 33A). A adição de oligomicina estimulou a produção de H_2O_2 dependente de succinato ou P5C, mas não de L-prolina, em todos os tipos celulares testados (Figura 33A - C).

Os parasitas das linhagens pTEX⁺ e pTEX-TcP5CDH⁺⁺, incubados com L-prolina, mostraram um aumento na quantidade de H_2O_2 conforme à adição sequencial dos substratos avaliados (Figura 33B). Particularmente, o mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺, apresentou uma redução completa de H_2O_2 , menor ao basal, quando a medição foi realizada na presença de L-prolina (Figura 33C). Este perfil não foi observado na presença de P5C (Figura 33C).

Figura 33 - Dosagem de peróxido de hidrogênio em parasitas mutantes e wt.



Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT (wt) ou meio LIT + 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ G418 (pTEX⁺, pTEX-Tcp5CDH⁺⁺) e coletadas por centrifugação após o 2do dia de crescimento (5×10^7 células ml⁻¹). A medição em células intactas (dosagem de peróxido liberado ao meio extracelular) foi realizada em meio de reação contendo: 100 mM de sacarose, 20 mM de KCl, 50 mM de Tris-HCl, 1,7 μM de *Amplex Red* (Invitrogen[®]) e 6,7 U ml⁻¹ de peroxidase de rabanete. A medição em células permeabilizadas (dosagem de peróxido intracelular), foi realizada em 1 ml de tampão de reação contendo: 125 mM de sacarose, 65 mM de KCl, 10 mM de HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM de MgCl₂, 2 mM de K₂HPO₄, seguido por adições sequenciais de 5 mM de succinato / 5 mM L-prolina / 1,5 mM P5C, 500 μM de EGTA, 30 μM de digitonina (digit), 1,7 μM de *Amplex Red* (Invitrogen[®]) e 6,7 U ml⁻¹ de peroxidase de rabanete e outras adições (1 mM ADP / 5 $\mu\text{g ml}^{-1}$ oligomicina / 1 μM FCCP) como indicado na figura. A fluorescência foi monitorada em comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 ± 5 nm e 587 ± 5 nm, respectivamente, por 30 minutos. A reação foi iniciada pela adição das células. As concentrações de H₂O₂ foram obtidas a partir de uma curva-padrão através de concentrações conhecidas de H₂O₂. Os resultados foram normalizados pelo número de células e expressos em pmol de H₂O₂ x 10⁻⁷ células. As barras representam os valores da média (n=3) e o desvio padrão calculados a partir de três réplicas feitas em separado.

3.5.3 O mutante *pTEX-TcP5CDH⁺⁺* apresentou mudanças na superfície celular

Como mencionado anteriormente, a expressão da enzima TcP5CDH é aumentada nos estágios infectivos (M e T). O P5C mantém a viabilidade celular em formas E e T, e neste último possibilita o processo de invasão na célula hospedeira (segundo o modelo CHO-k₁). Visto que este processo de invasão é dependente de ATP, cuja produção é estimulada no mutante *pTEX-TcP5CDH⁺⁺*, analisamos o papel da enzima TcP5CDH nos processos de diferenciação do parasita nas formas infectivas. Para isto, formas proliferativas (E) do tipo wt e *pTEX-TcP5CDH⁺⁺* foram diferenciadas *-in vitro-* e a porcentagem de formas M foi determinada. A taxa de metaciclogênese para a cepa CL-14 é baixa (HOMSY; GRANGER; KRASSNER, 1989). Os nossos dados mostraram que de um total de $12,5 \pm 5 \times 10^7$ parasitas wt, apenas o 56% destes diferenciaram-se às formas M em meio Grace (Figura 34A). Quando a diferenciação foi analisada no mutante *pTEX-TcP5CDH⁺⁺*, sob as mesmas condições de ensaio, de um total de $14 \pm 8 \times 10^7$ parasitas, foi observada uma redução ao 30% no número de formas M (Figura 34A), sendo que o restante apresentava morfologia de formas epimastigotas ‘alongados’ (Figura 34D).

Esses resultados mostraram que, apesar do grupo mutante ter níveis aumentados de TcP5CDH, o processo de metaciclogênese não foi alterado com respeito ao grupo wt. Os parâmetros morfológicos utilizados para estabelecer a porcentagem de metaciclogênese mostraram uma redução deste processo nos parasitas *pTEX-TcP5CDH⁺⁺*. Porém, a morfologia atípica apresentada nessas células, sugeriu que esses parasitas talvez seriam capazes de se aderir e invadir a célula hospedeira (CHO-k₁).

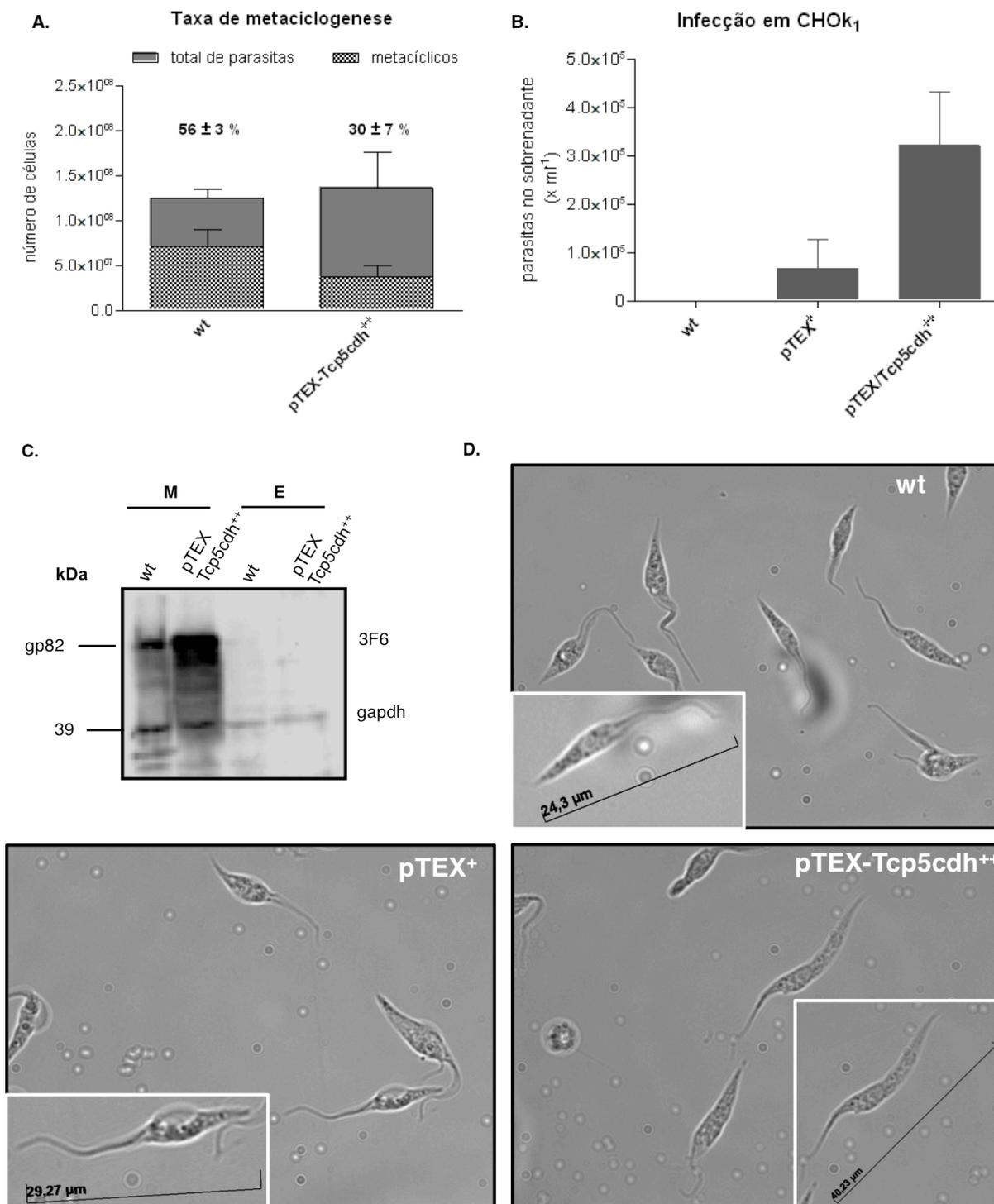
Inicialmente, vimos que formas M da cepa CL-14, obtidas *in vitro*, não infectam as células CHO-k₁ (dados não mostrados). A infecção em células CHO-k₁ somente é eficiente utilizando formas T que tem completado o seu ciclo intracelular (TONELLI et al., 2004). Contudo, testamos as formas E do tipo wt e o mutante *pTEX-TcP5CDH⁺⁺* na infecção em células CHO-k₁. O ensaio mostrou que, mesmo em períodos curtos de incubação com a célula hospedeira (1 h), os parasitas *pTEX-TcP5CDH⁺⁺* ficavam aderidos à superfície da célula CHO-k₁, enquanto que os wt era facilmente removidos pelas lavagens sucessivas (3X) com PBS. Após transcorrido o período necessário para se completar o ciclo intracelular (6 dias), foi observado um aumento significativo no número de parasitas presentes no sobrenadante da cultura (Figura 34B). Ali observou-se uma mistura de formas E com T que, provavelmente, eclodiram após completarem o ciclo intracelular. Acredita-se que as formas E provêm

daquelas que ficaram aderidas à superfície celular das CHO-k₁, sendo capazes de proliferar nas condições do ensaio (meio RPMI + 2% SFB, 33 °C, 5% CO₂).

Seguido disso, partimos para a análise molecular da glicoproteína TcGP82, uma molécula de superfície que participa nos processos de adesão e invasão do parasita na célula hospedeira (SCHENKMAN et al., 1993; TEIXEIRA; YOSHIDA, 1986). Esta proteína é diferencialmente expressa no estágio M, sendo ausente no estágio E (RAMIREZ et al., 1993). Esse dado foi confirmado na cepa CL-14, utilizando o anticorpo 3F6 que reconhece a TcGP82 em lisados de formas M (Figura 34C). Curiosamente, quando o anticorpo 3F6 foi incubado contra lisados, preparados a partir do mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺, foi observado um aumento considerável nos níveis de TcGP82 em formas M (Figura 34C). As formas M utilizadas neste ensaio foram obtidas também pela separação através de cromatografia em coluna DEAE. Nas formas E, tanto do wt quanto do pTEX-TcP5CDH⁺⁺, a proteína TcGP82 não foi detectada. Os níveis de TcGAPDH, usado como normalizador do conteúdo de proteínas, se mantiveram semelhantes nas amostras de M e E (Figura 34C).

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT (wt) ou meio LIT + 40 µg ml⁻¹ G418 (pTEX-TcP5CDH⁺⁺), coletadas após o 3ro dia de crescimento, lavadas em PBS (10 min, 1.500 x g a 4 °C) e, posteriormente, ressuspensas em 25 ml de meio Grace (pH, 6,0). A diferenciação em formas metacíclicas foi realizada durante nove dias (28 °C) em garrafas de vidro estéreis. Após esse tempo, o número total (Tot) e o número de formas metacíclicas (M) do parasita foram determinados pela contagem em câmara de Neubauer. A identificação de formas metacíclicas foi baseada na morfologia do parasita e a posição do cinetoplasto respeito do núcleo. As barras representam os valores da média para M / Tot, determinados a partir de três experimentos feitos separadamente (n=3). A porcentagem de metaciclogênese determinada se encontra na parte superior de cada barra. B) Infecção em células CHO-k₁ com formas epimastigotas do tipo wt, pTEX⁺ e pTEX-TcP5CDH⁺⁺. A incubação dos parasitas com a células hospedeira foi realizada durante 1 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂. O ciclo de infecção foi realizado durante seis dias, como descrito na figura 29. Após esse tempo, o número de parasitas no sobrenadante da cultura foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. C) Análise de expressão da glicoproteína TcGP82 em formas metacíclicas (M) e epimastigotas (E) obtidas a partir de parasitas wt e pTEX-TcP5CDH⁺⁺. Os extratos foram preparados a partir de 2 x 10⁷ células ml⁻¹ e, quantidades iguais de proteína (30 µg) foram carregadas no gel. As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida (12% SDS-PAGE), eletrotransferidas a membrana de nitrocelulose e incubadas com o anticorpo monoclonal 3F6 (1: 100), que reconhece a glicoproteína de superfície TcGP82 (82 kDa) ou o anti-TcGAPDH (normalizador) (1: 2.500), que reconhece uma proteína de 39 kDa. As membranas foram lavadas e incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de camundongo (Sigma[®]) (1:2.500) e reveladas por quimioluminescência com o substrato luminol ECL (Thermo[®], Life Science). D) Microscopia de contraste de fase em parasitas wt e mutantes após o 3ro dia de crescimento. As células foram lavadas duas vezes com vPBS e aderidas a lâminas cobertas com poli-lisina. As imagens foram obtidas no microscópio *Axio Imager motorized M.2* (Carl Zeiss[®], Alemanha) em objetivo de 100X. A régua indica o comprimento das células, o que foi determinado pelo *software* do aparelho.

Figura 34 - Análise da infectividade na linhagem mutante pTEX-Tcp5CDH⁺⁺.



3.6 O metabolismo de P5C como um alvo anti- *T. cruzi*

O dissulfeto de tetraetiltiurano (DSF) (Figura 35A) foi descrito inicialmente como uma droga que aumentava a sensibilidade ao álcool após a ingestão (HALD; JACOBSEN, 1948). O efeito inibitório de um dos seus derivados metabólicos contra a enzima ALDH2, postulou-o como uma droga efetiva para o tratamento da alcoolemia (JOHANSSON et al., 1991; VALLARI; PIETRUSZKO, 1982). Estudos enzimáticos feitos com o DSF em células de placenta humana mostraram que este composto também interferia na atividade da enzima ALDH4 (ortóloga da TcP5CDH) (FARRES; JULIA; PARES, 1988). Em outro trabalho descreveu-se o efeito do DSF na viabilidade de *T. cruzi* (LANE et al., 1996). Baseados em esses relatos prévios, optamos por avaliar o efeito do DSF nas formas de desenvolvimento da cepa CL-14 de *T. cruzi*, e na atividade da TcP5CDH.

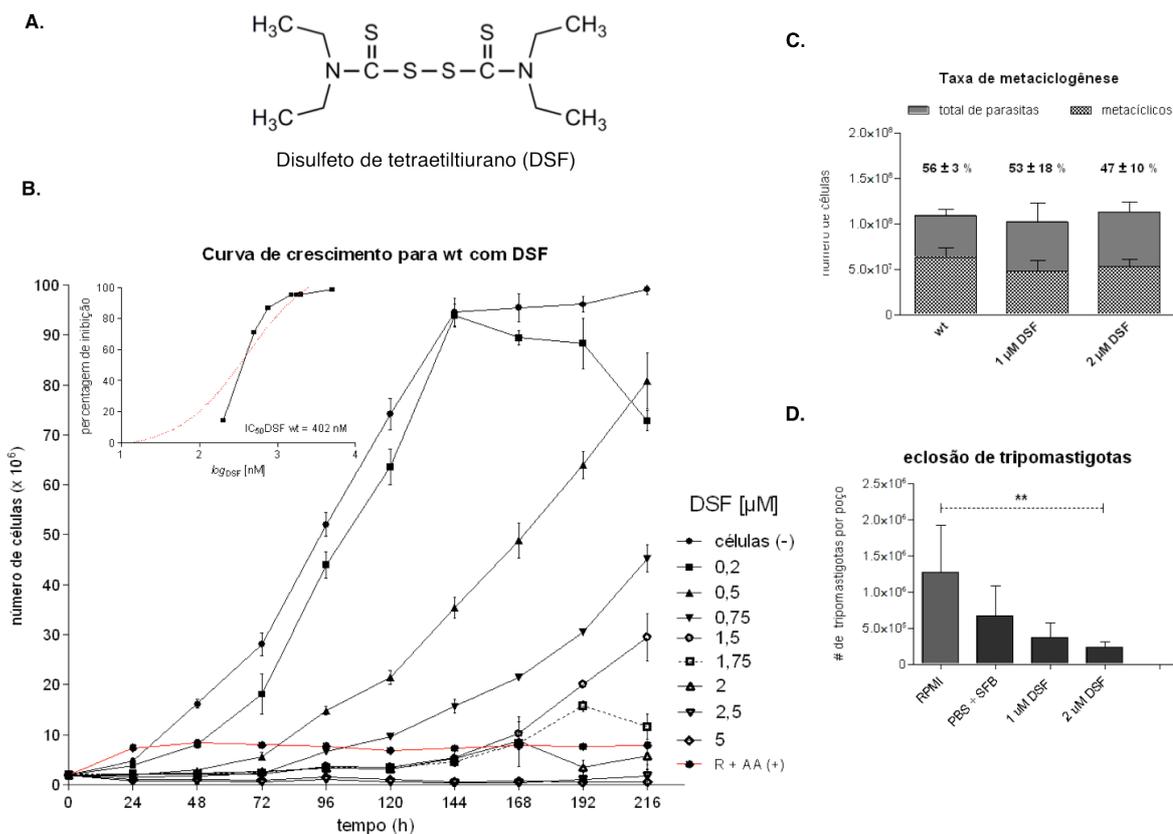
3.6.1 O DSF produz um efeito tripanocida

O DSF mostrou um efeito dependente da dose, na proliferação de formas E cultivadas em meio LIT. A CI_{50} determinada para o DSF foi de 402 nM (Figura 35B, inserto). Entretanto, quando o DSF foi avaliado no processo de metaciclogênese, as diferenças entre os parasitas tratados e o grupo controle não foram significativas (Figura 35C). Isto foi observado ainda utilizando concentrações de droga acima da CI_{80} para o DSF (1,0 e 2,0 μ M DSF). Por outro lado, formas tripomastigotas do *T. cruzi* expostas à célula hospedeira (CHO-k₁), na presença de DSF, mostraram uma redução significativa ($p < 0,05$) na quantidade de tripomastigotas que eclodem após completarem o seu ciclo intracelular com respeito do grupo não tratado (Figura 35D).

Por se tratar de uma droga bem estudada e já aprovada pelos entes reguladores (*U.S. Food and Drug Administration, Application No: 088482*), o DSF não teve efeito citotóxico contra as células CHO-k₁ sob as condições do ensaio de infecção (dados não apresentados).

foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. O gráfico representa a média (n=6) e o desvio padrão de cada contagem. As diferenças foram analisadas mediante o teste estatístico ANOVA-1a via, seguido do post-teste de Bonferroni ($p < 0,05$) (**).

Figura 35 - Avaliação do efeito de DSF no *T. cruzi*.



A) Estrutura química do DSF. B) Curva dose-resposta de DSF sob o crescimento de formas replicativas de *T. cruzi*. Os parasitas (5×10^6 células ml⁻¹) foram crescidos em meio LIT (-) ou LIT + diferentes concentrações de DSF (0,2 – 5 μM dissolvido em 10:70:20 de DMSO / água / EtOH). Como controle positivo (+) foi realizado um tratamento na presença de 10 μM rotenona + 0,5 μM antimicina-A. A densidade celular foi monitorada diariamente (durante 10 dias) mediante a leitura de absorvância ($\lambda_{600 \text{ nm}}$) em placas de 96 poços. O número de células foi calculado a partir de uma curva de calibração com concentrações de células conhecidas. Os valores representam a média e o desvio padrão de três experimentos realizados separadamente (n=6). *inserto*: A porcentagem de inibição (%in) do DSF foi determinada em cada concentração testada com respeito ao grupo controle (-). Os valores de %in ao 5to dia de crescimento foram plotados *versus* o logaritmo da concentração de DSF, e a curva resultante foi ajustada à função sigmoide para o cálculo da IC_{50} através do programa *GraphPad Prism 5.0*. C) Efeito do DSF no processo de metaciclogênese. Formas epimastigotas de *T. cruzi* (5×10^6 células ml⁻¹) foram crescidas em meio LIT, coletadas após o 3ro dia de crescimento, lavadas em PBS (10 min, 1.500 x g a 4 °C) e posteriormente, ressuspensas em 25 ml de meio Grace (pH, 6,0) ou meio Grace (pH, 6,0) na presença de 1,0 ou 2,0 μM de DSF. A análise dos dados foi realizada como detalhado anteriormente na legenda da figura 35A. D) Efeito do DSF no processo de eclusão de formas tripomastigotas em células de mamífero (CHOK₁). As células (5×10^4 células por poço) foram distribuídas em placas de 24-poços e incubadas durante 24 h (37 °C sob atmosfera de 5% CO₂). Seguido disso, os parasitas ($2,5 \times 10^5$ de formas tripomastigotas por poço) foram lavados duas vezes com PBS + 10% SFB, coletados por centrifugação (10 min, 950 x g) e incubados na presença de: RPMI (controle da infecção) / PBS + 10% SFB (controle negativo) / PBS + 10% SFB + diferentes concentrações de DSF (como indicado na figura), durante 3 h (37 °C sob atmosfera de 5% CO₂). O excesso de parasitas circulantes foram retirados com a pipeta e as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, antes da adição de meio RPMI + 2% SFB até completar o ciclo de diferenciação intracelular (6 dias). Após esse tempo, o número de tripomastigotas liberados ao sobrenadante da cultura celular

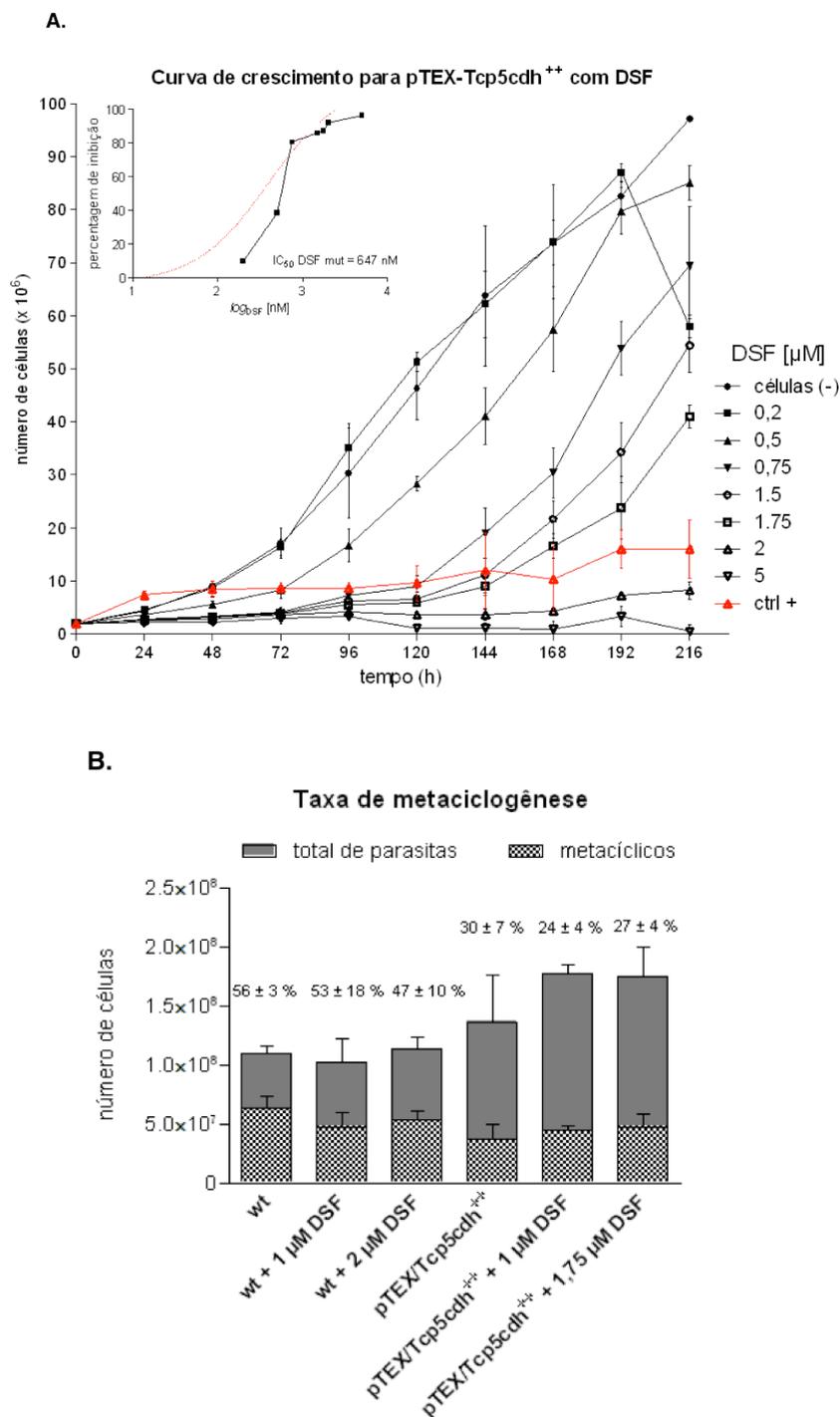
3.6.2 O mutante *pTEX-TcP5CDH⁺⁺* é mais resistente ao DSF

Para avaliarmos se a expressão aumentada da enzima TcP5CDH na linhagem mutante *pTEX-TcP5CDH⁺⁺* afetaria na sensibilidade do parasita ao DSF, realizamos alguns experimentos com essas células. A curva de proliferação também mostrou um efeito da droga dose-dependente. Porém, após o 6º dia de crescimento a densidade celular aumentou nas concentrações de 0,75 – 1,75 μM (Figura 36A). Concentrações acima de 1,75 μM resultaram numa inibição do crescimento ainda maior que a observada no controle (R+AA). O valor determinado para a CI_{50} do DSF aumentou a 647 nM nesses parasitas (Figura 37A inserto).

Quando o DSF foi testado em parasitas mutantes *pTEX-TcP5CDH⁺⁺* durante o processo de diferenciação à formas metacíclicas, observou-se uma diminuição não significativa na porcentagem de metacicloogênese entre o grupo não tratado ($30 \pm 7\%$) e na presença da droga (24 ± 4 , 27 ± 4 para 1,0 e 1,75 μM de DSF, respectivamente) (Figura 36B). A resistência aumentada ao DSF também foi observada nesse ensaio. O número total de parasitas, no grupo *pTEX-TcP5CDH⁺⁺* tratado com 1,75 μM DSF ($12,7 \pm 5,2 \times 10^7$ parasitas) aumentou o dobro com respeito dos parasitas wt tratados com 2 μM de DSF ($6,0 \pm 2,8 \times 10^7$ parasitas) (Figura 36B).

posteriormente, ressuspensas em 25 ml de meio Grace (pH, 6,0) ou meio Grace (pH, 6,0) na presença de 1,0, 1,75 ou 2,0 μM de DSF. A análise do experimento foi realizado como detalhado na legenda da figura 35.

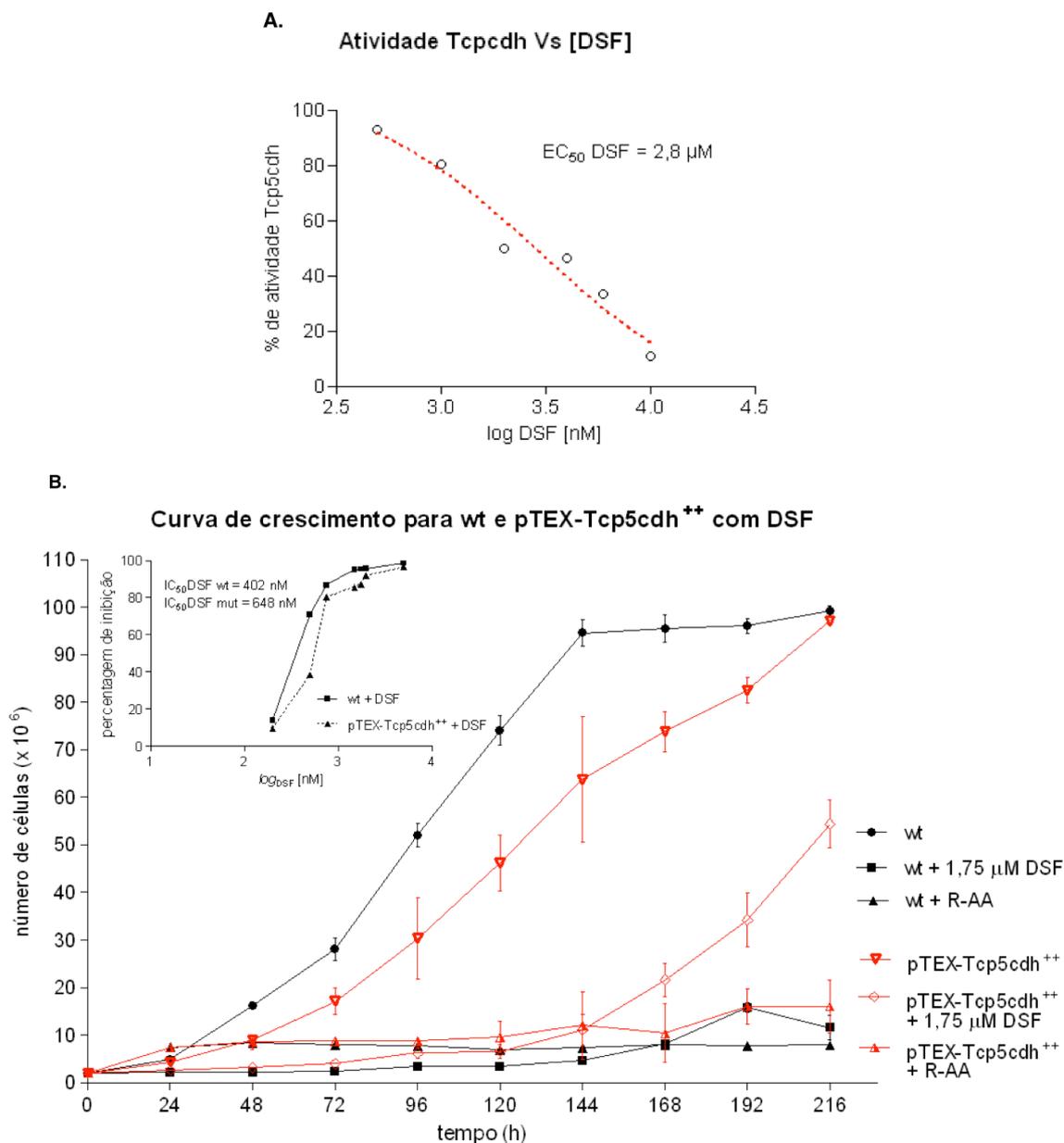
Figura 36 - Avaliação do efeito de DSF em mutantes pTEX-TcP5CDH⁺⁺ do *T. cruzi*.



A) Curva dose-resposta de DSF sob o crescimento de formas replicativas da linhagem pTEX-TcP5CDH⁺⁺. Os parasitas (5×10^6 células ml⁻¹) foram crescidos em meio LIT + 40 μg ml⁻¹ G418 (-) ou LIT + diferentes concentrações de DSF (0,2 – 5 μM dissolvido em 10:70:20 de DMSO / água / EtOH). Como controle positivo (+) foi realizado um tratamento na presença de 10 μM rotenona + 0,5 μM antimicina-A. O cálculo da IC₅₀ foi feito no 5to dia do crescimento dos parasitas, como descrito na figura anterior. B) Comparação do efeito de DSF em parasitas wt e pTEX-TcP5CDH⁺⁺ durante o processo de metaciclogênese. Formas epimastigotas de *T. cruzi* (5×10^6 células ml⁻¹) foram crescidas em meio LIT, coletadas após o 3ro dia de crescimento, lavadas em PBS (10 min, 1.500 x g a 4 °C) e

3.6.3 O DSF interfere na atividade da TcP5CDH

Após avaliado o efeito do DSF na proliferação de formas E do *T. cruzi*, este composto foi testado no ensaio de atividade enzimática para a TcP5CDH. Observou-se um efeito dose-resposta na atividade da enzima TcP5CDH. A concentração efetiva de DSF que mostrou uma redução do 50% da atividade enzimática para TcP5CDH (EC_{50}) foi de 2,8 μ M (Figura 37A). Além disso, quando analisadas, simultaneamente, as curvas de proliferação entre os parasitas wt e pTEX-TcP5CDH⁺⁺ tratados com 1,75 μ M de DSF se observou um atraso no início da fase exponencial dos parasitas mutantes, cujo início foi observado após o 6to dia de crescimento, enquanto que neste mesmo ponto os parasitas wt, não tratados, entram em fase estacionária, e os tratados com DSF se mantiveram completamente inibidos (Figura 37B). O início de uma fase estacionária típica para o *T. cruzi* não foi observada nos parasitas mutantes pTEX-TcP5CDH⁺⁺. Quando comparados os valores de IC_{50} para o DSF nos dois tipos de parasitas se observou que o wt é mais sensível ao DSF (403 nM) do que o pTEX-TcP5CDH⁺⁺ (648 nM) (Figura 37B inserto). Esses valores, não entanto, foram menores do que a EC_{50} de DSF obtida para a TcP5CDH (2,8 μ M).

Figura 37 - Avaliação do efeito de DSF na atividade da enzima TcP5CDH.

A) Curva de atividade enzimática residual versus $\log[\text{DSF}]$. A atividade enzimática foi medida na forma recombinante TcP5CDH-6xHis. O meio de reação continha: 100 mM HEPES-NaOH, pH 7,2, 2 mM NAD⁺, 10 µg de enzima e diferentes concentrações do DSF (0,2 – 10 µM). A reação foi pré-incubada (3 min a 28 °C sob constante agitação) e a medição foi iniciada pela adição de 0,6 mM P5C. O branco da reação foi o meio de reação sem DSF. Os valores de atividade específica foram calculados em todos os tratamentos e a porcentagem de atividade foi calculada a partir do total de atividade na ausência do inibidor (100%). B) Comparação das curvas de crescimentos entre parasitas wt e pTEX-TcP5CDH⁺⁺ na presença ou não de 1,75 µM. Como controle positivo da inibição foram usados os dados obtidos na presença de AA. Os valores são os mesmos apresentados nas figuras 36B e 37A, com os seus correspondentes insertos.

3.7 O papel da L-prolina na relação *T. brucei* – mosca tsé-tsé

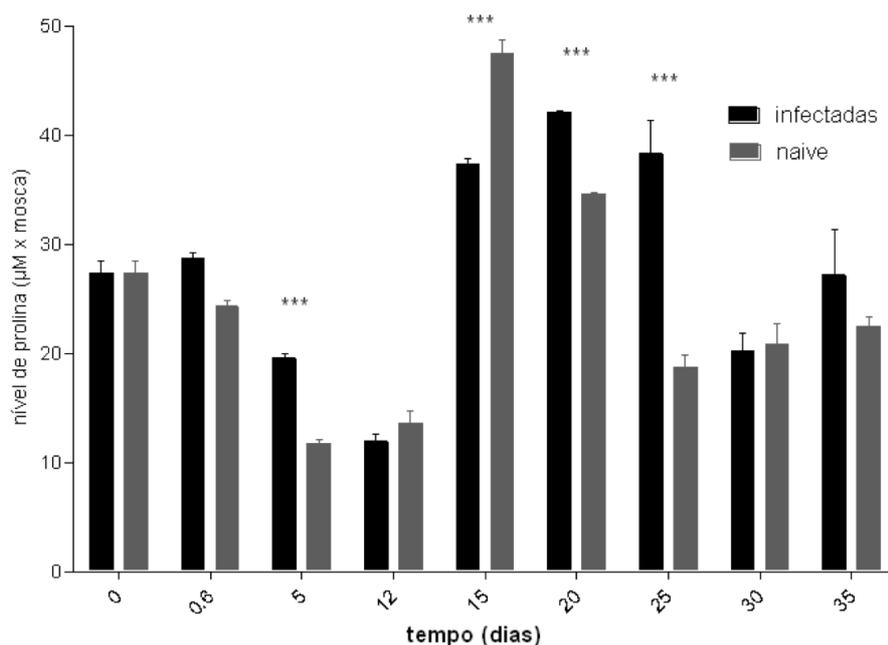
A L-prolina é um aminoácido relevante para os insetos da ordem díptera, porque constitui a principal fonte de energia para o processo de voo (HANSFORD; SACKTOR, 1970; NJAGI; OLEMBO; PEARSON, 1992). A mosca tsé-tsé (*G. Morsitans*) é um claro exemplo dessa característica e, por sua vez, é o hospedeiro invertebrado dos tripanossomas africanos que podem ser transmitidos a hospedeiros mamíferos através da picada (BURSELL, 1963; BURSELL et al., 1974). No *T. brucei*, a espécie africana que causa a doença do sono em humanos, ou a peste nagana em gado bovino, a L-prolina é a principal fonte de energia nas formas proliferativas presentes na mosca tsé-tsé (LAMOUR et al., 2005). Diferente do *T. cruzi*, o *T. brucei* é auxótrofo para prolina. Além disso, nos estágios do parasita presentes na mosca, estes apresentam um amplo repertório de moléculas de superfície, onde a prociclina EP-1 é a principal glicoproteína. Denomina-se EP-1 porque apresenta múltiplas repetições do dipeptídeo glutamato-prolina (EP) (ACOSTA-SERRANO et al., 2001). Portanto, os níveis de prolina, na sua forma livre, são determinantes no processo de colonização e multiplicação do parasita dentro do seu hospedeiro vetor.

3.7.1 Os níveis de L-prolina são alterados na hemolinfa da mosca tsé-tsé durante a infecção com o *T. brucei*

A dosagem de L-prolina foi realizada mediante um método colorimétrico altamente específico, em amostras de hemolinfa extraída a partir de moscas do tipo *naïve* (que nunca estiveram expostas ao parasita) e moscas infectadas experimentalmente com formas sanguícolas do *T. brucei*. As amostras foram coletadas em distintos pontos da infecção com o parasita durante 35 dias.

Os resultados mostraram diferenças significativas ($p < 0,05$) nos níveis de prolina livre na hemolinfa aos dias 5, 15, 20 e 25 (Figura 38). As moscas infectadas com *T. brucei* apresentaram um aumento na concentração de prolina livre ao dia 5^{to} após a infecção (a.i). Este perfil se manteve nos dias 20 e 25 após a infecção (Figura 38). No entanto, a concentração de prolina foi maior no grupo *naïve* ao dia 15 a.i, com respeito ao grupo infectado (Figura 38).

Figura 38 - Dosagem de prolina livre na hemolinfa de *Glossina morsitans*.



As moscas, indivíduos machos no período *teneral* (que ainda não receberam o 1º repasto sanguíneo), foram alimentadas com sangue desfibrinado de cavalo contendo formas sanguícolas do *T. brucei* e mantidas a 26 °C sob 65 - 70% de umidade relativa. As infecções foram verificadas pela dissecação das moscas, seguido da visualização ao microscópio. O número de indivíduos infectados com o parasita foi registrado (grupo infectado) e o mesmo número foi considerado para as coletas de hemolinfa no grupo não infectado experimentalmente (grupo *naïve*). As amostras foram coletadas no tempo zero e 4 h (após da infecção), durante 35 dias, como indicado no gráfico. A dosagem de prolina foi realizada pelo método de Bates (BATES, 1973), como descrito na seção 2.7.1.4. Os valores de concentração de prolina (μM) foram determinados a partir de uma curva de calibração realizada com concentrações conhecidas de prolina. O cálculo dos valores de prolina foi feito considerando o número de indivíduos dissecados. Os valores representam a média e o desvio padrão de dois experimentos realizados separadamente ($n=3$). As diferenças na concentração de prolina entre o grupo infectado e o grupo *naïve* foram comparadas pelo teste estatístico ANOVA-uma via, seguido do post-teste de Bonferroni. Os asteriscos (***) indicam as amostras cuja diferença foi significativa ($p < 0,05$).

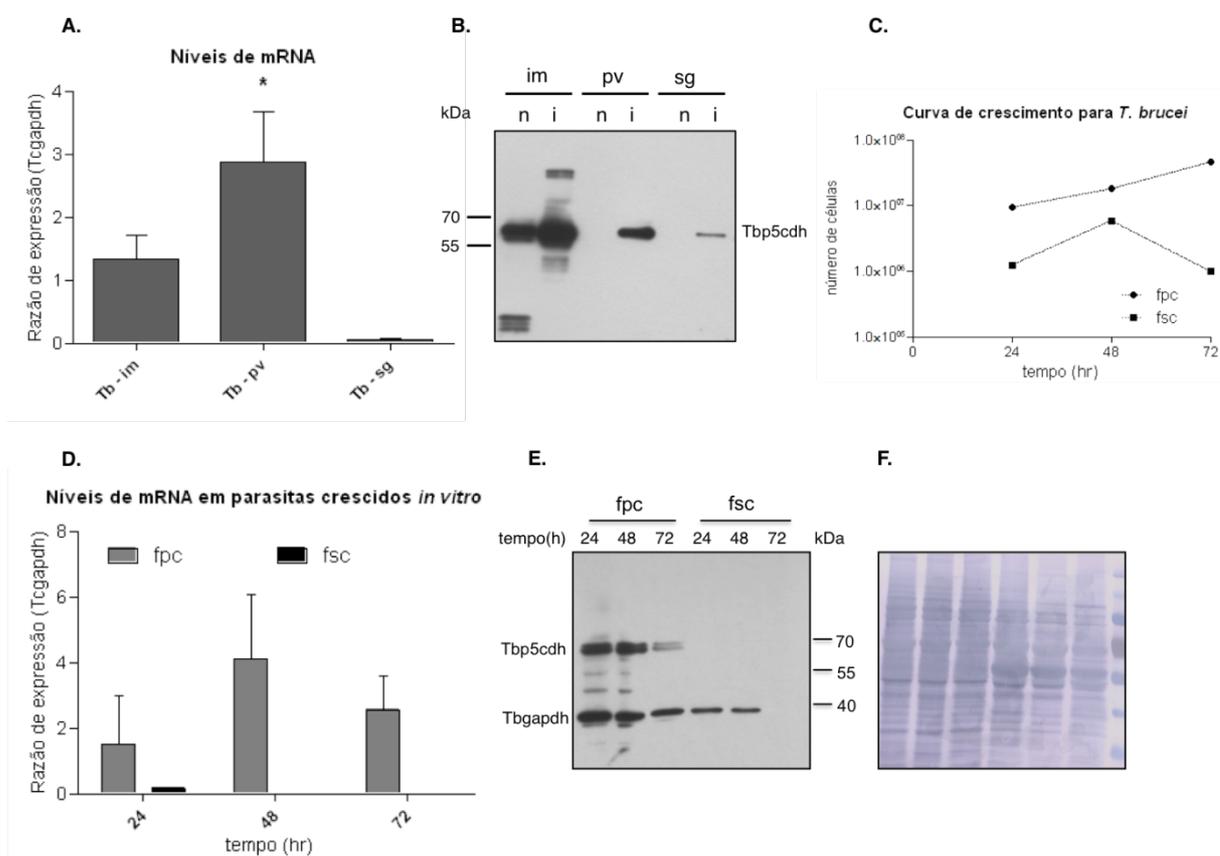
3.7.2 *A TbP5CDH apresenta uma expressão diferencial nos diferentes estágios de desenvolvimento do T. brucei*

A expressão da enzima TbP5CDH foi analisada nas formas de desenvolvimento do *T. brucei* presentes durante o seu ciclo infeccioso na mosca tsé-tsé, bem como, em formas procíclicas e sanguícolas cultivadas *in vitro*. Os níveis de mRNA para TbP5CDH apresentaram níveis maiores nos parasitas isolados a partir do pro ventrículo (pv) com respeito ao observado em aqueles presentes no intestino médio (im) ou glândulas salivares (gs) da mosca tsé-tsé (Figura 39A). Ao verificarmos a abundância proteica nesses parasitas e nos seus correspondente tecidos em moscas *naïve*, observamos que o soro anti-TcP5CDH

reconhece uma proteína com massa compatível para a TbP5CDH nas amostras do im para moscas *naïve* (Figura 39B). Um sinal maior foi observado nesse mesmos tecidos infectados com o *T. brucei*. Além disso, uma proteína com massa maior (aprox. 85 kDa) foi reconhecida, unicamente, nos tecidos infectados (Figura 39B). Nos parasitas obtidos do pv e im, a reatividade do anti-TcP5CDH é específica, sendo maior na amostra do pv do que naqueles presentes nas gs (Figura 39B).

Como esperado, as formas procíclicas (fpc) e formas sanguícolas (fsc) cultivadas *in vitro* mostraram diferenças nas taxas de crescimento (Figura 39C). As fsc, por exemplo, tem uma multiplicação limitada que, em cultura axênica, não ultrapassa 30 h. Os níveis de mRNA nos distintos intervalos de tempo mostraram que o transcrito para TbP5CDH é expresso, unicamente, no estágio fpc (Figura 39D). Este último foi verificado pelos níveis proteicos para a TbP5CDH utilizando o anti-TcP5CDH (Figura 39E). Sob essas condições do ensaio, a TbP5CDH não foi detectada nas fsc, apesar das quantidades de proteínas totais carregadas no gel serem as mesmas (Figura 39F).

Figura 39 - Perfil de expressão da TbP5CDH nas diferentes formas de desenvolvimento do *T. brucei*.



A) Quantificação dos níveis de transcrito para TbP5CDH nas formas do parasita presentes em distintos tecidos da mosca tsé-tsé. Amostras de RNA total foram extraídas a partir de parasitas isolados do intestino médio (im), proventrículo (pv) ou glândulas salivares (gs) de moscas infectadas experimentalmente. Os níveis de mRNA foram determinados mediante a técnica de *qRT-PCR* utilizando oligonucleotídeos específicos contra as sequências do parasita. O perfil de expressão foi calculado pela razão de expressão entre TbP5CDH e o Tbgapdh, utilizado como gene normalizador. As barras representam os valores da média e desvio padrão para três leituras feitas separadamente ($n=3$). B) Análise por *western blot* da enzima TbP5CDH em extratos proteicos preparados a partir dos tecidos de moscas *naïve* (n) mencionados acima, e, lisados celulares de formas do parasita presentes nos mesmos tecidos de moscas infectadas (i) com *T. brucei*. Os soros policlonais anti-TbP5CDH (1:3.000) e anti-Tcgapdh (1:5.000) foram utilizados para o ensaio com *T. brucei*. C) Curva de crescimento para as formas procíclicas (fpc) e formas sanguícolas (fsc) de *T. brucei* mantidas *in vitro* em meios de cultura específicos. A densidade celular foi determinada durante três dias através da contagem em câmara de Neubauer. D) Os níveis de mRNA foram determinados mediante a técnica de *qRT-PCR* em amostras de fpc ou fsc mantidas *in vitro* a diferentes intervalos de tempo. E) Análise por *western blot* da enzima TbP5CDH em amostras de fpc ou fsc, como descrito para D. F) Verificação da quantidade de proteínas transferidas à membrana de PVDF usada no ensaio de *western blot* referido na figura E. As proteínas foram coradas com uma solução ao 5% de nigrosina p/v em água.

3.7.3 A indução do RNA dupla fita (dsRNA) diminui os níveis de transcrito para a enzima *TbP5CDH*, mas os níveis proteicos permanecem estáveis

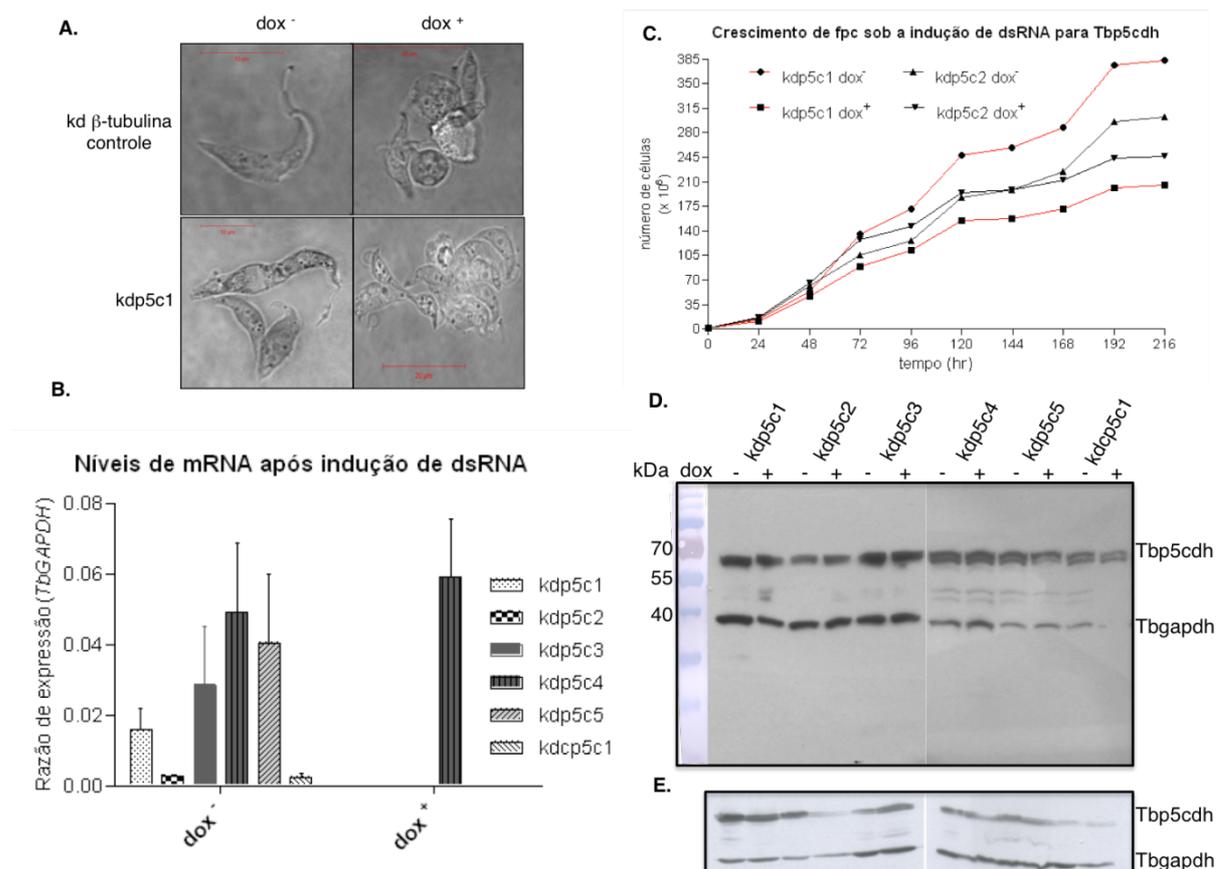
A técnica de RNA de interferência (RNAi) através da produção de dsRNA, permite o silenciamento de genes específicos ao nível pós-transcricional em *T. brucei* (NGO et al., 1998). O vetor pZJM possui duas regiões promotoras T7 (dependentes de tetraciclina) posicionadas de forma oposta ao gene de interesse, o que resulta na produção de dsRNA, que posteriormente é substrato da maquinaria de degradação do RNA (WANG et al., 2000). Visto que a prolina é essencial em *fpc* do *T. brucei*, e que a expressão da *TbP5CDH* é regulada diferencialmente nos estágios do parasita presentes na mosca tsé-tsé, partimos para a avaliação de parasitas cuja capacidade oxidativa de prolina encontrava-se bloqueada via-*TbP5CDH*. Para isto, *fpc* do *T. brucei* foram transfectadas com o vetor pZJM contendo fragmentos das regiões 5' ou 3' da ORF *TbP5CDH*. O dsRNA foi induzido pela adição de doxiciclina e os níveis de mRNA, proteína e capacidade proliferativa foram avaliados em diferente clones.

O silenciamento do gene para a proteína β -tubulina (controle positivo) resultou, como esperado, num fenótipo facilmente distinguível ao microscópio pela presença de células gordas (*fat cells*) (WANG et al., 2000) (Figura 40A). Esse fenótipo foi observado após 48 h da adição de doxiciclina (dox) sugerindo que a técnica funcionou corretamente nas condições seguidas.

Com o gene *TbP5CDH* usamos dois fragmentos diferentes para induzir o dsRNA. Diferentes linhagens celulares resistentes a fleomicina (marcador de seleção em *T. brucei*) foram obtidas. Cinco delas (nomeadas como *kdp5c1* – *kdp5c5*) apresentariam o dsRNA a partir do fragmento 5'-*TbP5CDH*, e uma dessas (*kdp5c1*) seria a partir do fragmento 3'-*TbP5CDH*. Todas elas foram então selecionadas para a análise detalhada de mRNA e proteína para a *TbP5CDH*. Após três dias, todas as linhagens, exceto pela *kdp5c4*, induzidas com dox apresentaram uma redução significativa nos níveis de transcrito para a *TbP5CDH* (Figura 40B). Quando comparadas as curvas de crescimento para *kdp5c1* e *kdp5c2*, observou-se que após 72 h da adição de dox houve uma redução do 33% no crescimento celular com respeito ao controle (dox). Após o oitavo dia essa diferença aumentou ao 57% (Figura 40C). No caso do clone *kdp5c2*, cujos valores de mRNA não apresentaram diferenças entre a cultura não induzida e induzida, também não houve diferenças na curva de proliferação celular (Figura 40C). Entretanto, os níveis proteicos para *TbP5CDH* não apresentaram variações

consideráveis entre as culturas não induzidas e induzidas após o 3ro (Figura 40D) ou 7mo dia de tratamento com dox (Figura 40E).

Figura 40 - Ensaio de RNAi para o gene *TbP5CDH* em formas procíclicas de *T. brucei*



A) Análise microscópica em fpc normais (dox⁻) e fpc interferidos (*knocked down; kd*), pela adição de 0,5 μg ml⁻¹ de doxiciclina (dox⁺) que induz a síntese de dsRNA, para o gene da β-tubulina (kd β-tubulina) usado como controle positivo, ou para o gene *TbP5CDH* (kdp5c1). Os parasitas foram fixados com 3% *p-formaldeído* v/s e visualizados sob contraste de fase em aumento de 40 X de um microscópio confocal Zeiss® LSM 510. B) Análise dos níveis de mRNA em seis clones usados nos ensaios de RNAi para o gene *TbP5CDH*. Os clones kdp5c1 – kdp5c5 foram transformados com a construção pZJM-*Tb5'P5CDH*, e o clone kdcp5c1 com a construção pZJM-*Tb3'P5CDH*. O dsRNA foi induzido durante 3 dias e o RNA total de cada clone foi extraído. A quantificação do mRNA foi realizada mediante qRT-PCR utilizando oligonucleotídeos específicos, como descrito anteriormente. A razão de expressão para *TbP5CDH* foi calculada com respeito à expressão de *TbGAPDH*, utilizado como gene normalizador. Os valores no gráfico representam a média e desvio padrão (n=3) observados para cada clone. C) Curva de crescimento para fpc dos clones kdp5c1 e kdp5c2 cultivados durante nove dias na presença ou ausência de dox. As células foram mantidas mediante passagens sucessivas (cada 48 h) em meio SDM-79 +/- doxiciclina. D) Análise por *western blot* dos clones obtidos no ensaio de RNAi. Os parasitas foram cultivados em meio SDM-79 +/- doxiciclina e os lisados foram preparados após três dias de indução do dsRNA. As proteínas foram resolvidas em gel de poliacrilamida ao 12% e eletrotransferidas a membranas de PVDF (G.E, Life Sciences) onde foram incubadas com o soro anti-TcP5CDH (1.3000) e o soro anti-Tcgapdh (1:5.000) a 4°C durante 16 h sob constante agitação. E) Análise por *western blot* em parasitas após sete dias da indução de dsRNA.

CAPITULO IV
DISCUSSÃO

4.1 Correlação dos dados *in silico* com a função e localização celular da TcP5CDH

A L-prolina é um aminoácido não essencial, cujas enzimas da via degradativa ou de biossíntese diferem nos distintos domínios de organismos. Em eucariotas, estas enzimas estão localizadas na mitocôndria, podendo participar em outros processos redox que acontecem dentro dessa organela (TANNER, 2008). As proteínas mitocondriais são codificadas no DNA nuclear e, posteriormente, sintetizadas nos ribossomos. O produto proteico, na forma de precursor, é então importado do citoplasma à mitocôndria pela presença de um peptídeo de direcionamento mitocondrial (PDm) (SCHNEIDER, G. et al., 1998). O PDm é removido pela ação de peptidases mitocondriais, enquanto que enzimas do tipo translocases presentes na MEM, ou na MIM quando a proteína é importada até a matriz mitocondrial, facilitam o recrutamento dessas proteínas à mitocôndria (SCHNEIDER, A.; BURSAC; LITHGOW, 2008). Na maioria dos casos, o PDm conforma uma hélice anfipática com resíduos positivos (Arg, Ser, Ala) na extremidade clivada e aminoácidos hidrofóbicos do outro lado (VON HEIJNE, 2002). No *T. brucei*, por exemplo, este mecanismo de importe está mediado pela ação das proteínas ATOM e pAETOM36 que formam um poro translocador hidrofílico na MEM (HARSMAN et al., 2012; PUSNIK et al., 2012).

A TcP5CDH é uma enzima altamente conservada em tripanossomatídeos. O motivo MLRR, presente no extremo N-terminal, corresponde a uma etiqueta específica de proteínas mitocondriais identificada em protozoários flagelados (filo: euglenozoa) (KRNACOVA et al., 2012). Este motivo é seguido também pelo motivo FAFAYA, considerado como outra assinatura protéica para este tipo de PDm devido a presença de repetições de Ala (KRNACOVA et al., 2012) (Figura 3B). Quando analisada a possível estrutura secundária dos primeiros 18 aas para TcP5CDH, observaram-se características de uma hélice-alfa com três resíduos carregados positivamente (Arg^{3,4}, Lys¹⁶) e um face hidrofóbica (PALAL) (Figura 3B). A região com carga positiva estaria exposta à face solúvel da mitocôndria, enquanto que o domínio PALAL poderia mediar a interação com as membranas mitocondriais. Apesar do sítio putativo de clivagem Thr¹⁷ não apresentar uma Arg na posição -2, -3 ou -10, o que também é próprio dessas sequências (PAES, L.S et al., 2013; SCHNEIDER, G. et al., 1998), considera-se que esta região participa do processo de importação da TcP5CDH à mitocôndria do *T. cruzi*, como foi observado para a TcPRODH (PAES, L.S et al., 2013) ou pelas predições feitas para a TbP5CDH.

Nesse sentido, consideramos que a TcP5CDH não possui um PDm, canônico, facilmente predito mediante as configurações padrão das ferramentas de bioinformática

disponíveis. Contudo, o processo de importação à mitocôndria pode estar mediado pela sequência PDm aqui sugerida, mas a clivagem e remoção deste peptídeo ainda é desconhecido. Além disso, a banda reativa para a TcP5CDH em amostras mitocondriais (tratadas com DIG) teve um aumento na massa molecular com respeito daquela observada no lisado total (tratado com Tritón X-100) (Figura 20C). Se o peptídeo sinal é clivado na mitocôndria, a migração da TcP5CDH deveria ser menor que no lisado total. Como estas observações indicam o contrário, sugere-se eventos de maturação ou modificações pós-traducionais quando a TcP5CDH encontra-se dentro da mitocôndria.

Por outro lado, a importação mitocondrial da TcP5CDH através de mecanismos alternativos não deve ser totalmente desconsiderada. Um exemplo disto, é a subunidade VI do complexo citocromo *c* oxidase (COX), localizado na MIM de *T. brucei* (TASKER et al., 2001). O complexo COX é importado à mitocôndria mediante dois passos que envolvem, primeiramente, um processo de translocação através da MEM, seguido da ligação ao grupo heme e inserção na MIM, o que é dependente do potencial de membrana mitocondrial (PRIEST; HAJDUK, 2003). Isto significa que o mecanismo de importação para COX não envolve a atuação e clivagem de PDm.

A análise dos dados disponíveis no genoma para a enzima TcP5CDH revelou uma identidade de 98% entre as sequências *TcP5CDH1* e *TcP5CDH2*. Ambas sequências encontram-se anotadas no mesmo locus do genoma (Cromossoma 36). Também, o produto amplificado na reação de PCR e a detecção de uma única banda proteica do tamanho esperado para TcP5CDH (aprox. 63 kDa) correspondem a sequência anotada como *TcP5CDH1*. Portanto, consideramos que estas duas sequências não correspondem a genes distintos. Já a sequência *TcP5CDH3* difere das outras duas pela existência da região 28A identificada como domínio *N*-acetiltransferase. *TcP5CDH3* não possui os domínios catalíticos da TcP5CDH, mas uma eventual atuação dessa proteína em processos regulatórios ou modificações pós-traducionais não foi completamente descartada. Evidências sobre a ocorrência de processos desse tipo já foram descritas em *S. cerevisiae* e *T. brucei*. Em leveduras, por exemplo, foi descrita a existência e funcionalidade da enzima MPR1-acetiltransferase. Esta enzima catalisa a acetilação (a partir da AcetilCoA) do P5C, mais exatamente da sua forma aberta γ GSA (NOMURA; TAKAGI, 2004). Além disso, foi visto que a MPR1 tem um papel regulador em resposta ao dano oxidativo provocado pelo aumento de P5C intracelular em leveduras Δ PUT2 (NISHIMURA et al., 2010; NOMURA; TAKAGI, 2004). Na busca de sequências putativas para a atividade acetiltransferase, relacionadas ao metabolismo do P5C, foram encontradas

duas sequências de DNA no genoma do *T. cruzi*. Uma delas (TrytripDB: Tc00.1047053504867.40) está localizada corrente acima da sequência *TcP5CDH1*, e a outra (TrytripDB: Tc00.1047053511813.10) foi achada no genoma, após uma busca de similaridade BLAST utilizando a sequência MPR1 da levedura (UniprotKb: E9P8D2) como entrada.

Por outro lado, foi reportado que a enzima TBP5CDH do *T. brucei* sofre um evento de palmitoilação, que envolve a tioacilação em resíduos específicos de cisteína (EMMER et al., 2011); a TcP5CDH possui 10 resíduos de cisteína na sequência primária. Este processo é sugerido como uma modificação pós-traducional, própria de proteínas de membrana. No entanto, este tipo de evidências devem ser confirmadas mediante testes bioquímicos que determinem se o P5C pode ser substrato de outras enzimas ou se a TcP5CDH sofre modificações pós-traducionais.

A disrupção do gene $\Delta PUT2$ interfere no rota prolina – glutamato. Além disso, os níveis de P5C intracelular aumentam e, apesar da redução de P5C ser um mecanismo que evita a acumulação, a viabilidade celular é afetada (NISHIMURA et al., 2010; NOMURA; TAKAGI, 2004). Isto foi observado no nosso ensaio de complementação funcional em levedura. Neste último, observou-se que o mutante $\Delta PUT2$ foi incapaz de crescer em meio com prolina como única fonte de nitrogênio, provavelmente, pelo aumento de P5C intracelular. Entretanto, quando a enzima TcP5CDH foi inserida e expressa na levedura $\Delta PUT2$, este fenótipo foi revertido. Isto indica que a oxidação do P5C em glutamato é mediada pela atividade da enzima TcP5CDH no sistema heterólogo. Embora não hajam evidências exatas sobre a localização da TcP5CDH expressa na levedura, acreditamos que o processo de importação mitocondrial seja compatível ao da isoforma nativa (PUT2) de levedura (BRANDRISS; KRZYWICKI, 1986).

4.2 Estrutura quaternária da TcP5CDH e sua interação com as membranas mitocondriais

Os dados estruturais disponíveis para proteínas P5CDHs de outras espécies, mostraram que, na forma de apoenzima, esta forma um oligômero cujo número de unidades protoméricas varia entre duas, seis e oito, como visto para humano (PDB: 3V9G), arqueia (PDB: 1UZH) e bactéria (PDB: 3RJL), respectivamente (INAGAKI et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2012). Particularmente, em *Bradyrhizobium japonicum*, uma proteobactéria microsimbionte que fixa nitrogênio em raízes de tubérculos, a enzima prodh (N-terminal) forma um complexo (putA)

com a enzima P5CDH (C-terminal) (PDB: 3HAZ). O complexo bifuncional putA é um tetrâmero, em forma de anel, onde acontece a conversão sequencial de prolina em glutamato através de um mecanismo de canalização do P5C (SRIVASTAVA et al., 2010).

Em *S. cerevisiae*, a inserção do extremo N-terminal da enzima PUT2 na enzima β -galactosidase resultou na importação desta última à matriz mitocondrial (BRANDRISS; KRZYWICKI, 1986). Isto foi baseado no fato que a atividade galactosidase seguia uma atividade comparável a enzima fumarase (que converte fumarato em malato) nas distintas frações mitocondriais analisadas. No entanto, esta atividade também foi observada em frações mitocondriais e mitoplastos (frações mitocondriais cujas membranas externas foram rompidas e que carecem do conteúdo solúvel do espaço intermembrana) que foram solubilizadas com detergente (Tritón x-100). A partir disso, concluiu-se que a enzima PUT2 poderia ter uma localização distinta à matriz, podendo se tratar da face interna da membrana externa mitocondrial (FiMEM) ou da face externa da membrana interna mitocondrial (FeMIM) (BRANDRISS; KRZYWICKI, 1986). É provável que algo semelhante aconteça no *T. cruzi*, pois nos ensaios com vesículas mitocondriais, livres do conteúdo matricial, a atividade TcP5CDH foi estimulada (5-vezes) após a adição de Tritón x-100. Considerando que o NAD^+ difunde livremente através da MEM, mas não da MIM (ERNSTER; KUYLENSTIERNA, 1970), se a enzima TcP5CDH localiza-se na FiMEM ou FeMIM, a sua atividade enzimática (NAD^+ - dependente) poderia ser detectada em vesículas mitocondriais na ausência de detergente. Este último foi observado segundo a atividade basal na presença de NAD^+ , mas o fato de esta ser aumentada, significativamente pela adição de detergente, sugere que a TcP5CDH interage com a MIM.

Além disso, nos ensaios de solubilização gradativa com DIG, a TcP5CDH foi liberada em concentrações menores as usadas para solubilizar a CS (matriz). O perfil mostrado se assemelhou ao observado pela enzima hexocinase (glicossoma). A possibilidade de uma localização nessa última organela foi descartada pelas observações feitas mediante microscopia confocal para a Tcgapdh. Apesar das diferenças no perfil de imunomarcção para TcP5CDH e Tcgapdh, a atividade desta última foi também detectada fora do glicossoma (JOICE et al., 2012). Nesse sentido, sugere-se que a enzima TcP5CDH interage com a MIM e, provavelmente, o seu sítio catalítico estaria exposto à matriz mitocondrial.

Esta particularidade, em torno a localização subcelular atípica para algumas proteínas do *T. cruzi*, assemelha-se com relatos prévios para a enzima FMR de *T. cruzi* (CHRISTMAS; TURRENS, 2000). A atividade da FMR, usada também como controle do nosso ensaio,

mostrou uma atividade maior do que a CS, sugerindo que a FMR e a TcP5CDH tenham localizações compatíveis. FMR é uma enzima da membrana mitocondrial de tripanossomatídeos que reduz o fumarato em succinato, acoplado a oxidação de NADH (BOVERIS; HERTIG; TURRENS, 1986; DENICOLA-SEOANE et al., 1992). Estudos com vesículas mitocondriais intactas demonstraram que a atividade FMR é separada da enzima SDH (CHRISTMAS; TURRENS, 2000). Em amostras mitocondriais cuja força iônica foi aumentada (300 mM KCl), observou-se atividade FMR na fração solúvel das membranas, enquanto que a atividade SDH permanecia ainda ligada a estas (CHRISTMAS; TURRENS, 2000). Quando realizado o ensaio de solubilização gradativa com digitonina, a FMR mostrou um perfil de atividade, aparentemente, extra-mitocondrial, comparável com o perfil de solubilização para uma enzima localizada no glicossoma (DENICOLA et al., 2002). O papel da FMR em processos redox na mitocôndria do tripanossoma, somado a sua localização celular dual (DENICOLA-SEOANE et al., 1992; MRACEK et al., 1991), se assemelham as nossas observações com a TcP5CDH. Estas evidências demonstram as particularidades da mitocôndria desses organismos.

O *T. cruzi* apresenta uma única mitocôndria por célula que contém ramificações ao longo do corpo da célula. Essas ramificações estão distribuídas sob os microtúbulos e estão dilatadas em regiões, onde o kDNA está presente (PAES, L.S. et al., 2011). Adicionalmente, de acordo com a forma de vida do parasita, o estado metabólico da célula varia, portanto, a morfologia em termos de densidade e quantidade de cristas também [revisado por (DE SOUZA; ATTIAS; RODRIGUES, 2009)]. Outra evidência da localização mitocondrial, para a TcP5CDH, foi a imunomarcação observada com o anti-TcP5CDH. Esta marcação é típica de marcações mitocondriais, que se estende pelo corpo do parasita e acentua-se na região perto ao cinetoplasto. Este último foi mais evidente quando foi usado um anticorpo comercial anti-aldh4a1, que também reconhece a enzima TcP5CDH. A marcação observada no estágio T difere dos outros estágios pelo fato de ter regiões que não co-localizam totalmente com a sonda mitocondrial usada. Esta região se estende ao redor do parasita e parece estar relacionada com marcação para membranas. Contudo, este tipo de ensaio não permite discernir entre uma marcação para a membrana mitocondrial ou plasmática.

A associação entre a enzima TcP5CDH e as membranas mitocondriais foi abordada mediante a análise de lisados mitocondriais sob condições não desnaturantes. Observamos que a enzima TcP5CDH se encontra, na sua forma hexamérica (aprox. 380 kDa), em amostras mitocondriais tratadas com DIG. No entanto, a presença de duas subunidade monoméricas da

TcP5CDH com distintos padrões de migração, na análise bidimensional, sugerem a existência de um rearranjo estrutural de maior massa (aprox. 760 kDa) à observada para o hexâmero. Isto plantea duas hipóteses: i) a enzima TcP5CDH apresenta um estado oligomérico maior (aprox. 12 subunidades), o que por sua vez é concordante com o padrão de migração para a fração P1 obtida através da GF (Figura 9A e B); ou ii) a TcP5CDH interage com outras proteínas na mitocôndria. Sendo que a dita interação não é completamente solubilizada pelo tratamento com digitonina nas condições do nosso ensaio. Também, é possível que a transferência de proteínas, resolvidas mediante eletroforese em gel nativo, seja incompleta ou que o epítipo reconhecido pelo anti-TcP5CDH não esteja exposto quando a enzima apresenta este tipo de associação.

Dados da literatura descrevem que a enzima TbP5CDH se localiza em membranas mitocondriais. Uma análise proteômica em *T. brucei* detectou a TbP5CDH em frações correspondentes a MIM (ACESTOR et al., 2009; PANIGRAHI et al., 2008) e quando analisadas as interações protéicas presentes nos complexos respiratórios foi vista uma copurificação da TbP5CDH com a citocromo *c* oxidase (complexo IV da CRE), sugerindo então uma eventual associação entre essas duas proteínas (ACESTOR et al., 2011). A associação com o complexo IV mitocondrial é coincidente com a identificação por espectrometria de massa da banda protéica com atividade citocromo *c* oxidase, a partir de lisados mitocondriais do *T. cruzi* testado no ensaio de atividade enzimática no gel.

Os dados estruturais com a isoforma recombinante TcP5CDH-6xHis mostraram que a atividade enzimática se mantém intacta na conformação hexamérica. A presença de um oligômero com massa aproximada de 700 kDa, segundo o gel nativo (Figura 5A), com atividade específica reduzida sugere a falta de estabilidade deste oligômero, provavelmente, pela ausência de interação com componentes de membrana, como provavelmente ocorre dentro da MIM. Embora a estrutura tridimensional para a TcP5CDH não foi ainda resolvida, o modelo gerado a partir das medições de SAXS mostrou regiões assimétricas no hexâmero da TcP5CDH. Essas regiões poderiam ser os sítios responsáveis pela interação com componentes de membrana ou pela formação de complexos com outras proteínas.

A estrutura tridimensional da HsP5CDH revelou os dois domínios que participam no processo de oligomerização. Um dos domínios é uma estrutura bipartida formada por um grampo-beta (do inglês: *β -hairpin*) saindo do domínio de ligação ao NAD^+ (posições: 183 - 198), e o outro domínio é representado pelos últimos 20 resíduos do extremo C-terminal (543 - 562). Estes domínios formam uma folha-beta que se combina com a estrutura do grampo-

beta da forma antiparalela, o que assemelha-se a uma aba (SRIVASTAVA et al., 2012). Os resíduos 23 – 182 da HsP5CDH também constituem parte do domínio que interage com NAD^+ . Como mencionado acima, o extremo C-terminal (543 – 562) participa do processo de oligomerização na proteína de humano, sugerindo que a etiqueta 6xHis posicionada no extremo C-terminal da TcP5CDH não afeta esse processo. Porém, quando a etiqueta de 6xHis foi posicionada no extremo N-terminal da TcP5CDH houve dificuldades para purificá-la. Isto sugere que nesta conformação a 6xHis não fica exposta e, portanto, interfere no correto enovelamento ou oligomerização da TcP5CDH.

Os nossos dados de atividade enzimática, somado a algumas predições *in silico*, sustentam a hipótese de que a enzima TcP5CDH seja uma enzima que interage com membranas. Esta interação pode estar mediada pela presença de uma estrutura secundária altamente hidrofóbica, do tipo hélice-alfa, que poderia interagir com a MIM (hTM) (Figura 4). O motivo IMLFPAGVAAAFAL seria o responsável pela dita interação com as membranas, devido ao seu alto índice de hidrofobicidade. Porém, a presença da Prol²¹¹ diminui a probabilidade de que este seja um domínio que atravessa completamente a MIM. A Prol é um alfa-aminoácido, cujo nitrogênio não pode formar uma ponte de hidrogênio; ligação essencial na formação de hélices-alfa (RICHARDSON, 1981). Portanto, é comum ver a Prol como um resíduo disruptor nesse tipo de estruturas.

4.3 Caracterização bioquímica da TcP5CDH

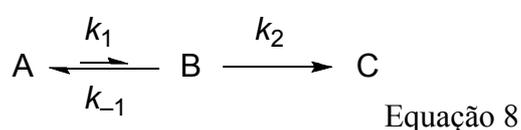
Em eucariotas e bactérias a rota de interconversão de prolina em glutamato consta de duas reações de oxidorredução, que envolvem aceptores de elétrons como FAD, NAD(P)^+ ou o citocromo *c* (TANNER, 2008). No *T. cruzi*, esta rota é mediada pela ação das enzimas TcPROD_H e TcP5CDH, sequencialmente (PAES, L.S. et al., 2011). A TcPROD_H é uma enzima dimérica que transfere os elétrons da prolina ao FAD formando o P5C. Esses elétrons podem ser transferidos à coenzima Q e, posteriormente, reduzir o citocromo *c* na cadeia respiratória (PAES, L.S. et al., 2013). O P5C produzido a partir de prolina apresenta é convertido espontaneamente a γ GSA que, posteriormente é oxidado a glutamato pela ação da enzima TcP5CDH acoplado à redução de NAD(P)^+ . Além disso, nós observamos que a atividade enzimática da TcP5CDH é irreversível, sendo o *T. cruzi* capaz de sintetizar prolina a partir de glutamato (Figura 16B); conversão esta que é dependente de NADPH e gasto de ATP (ARAL et al., 1996).

A massa molecular do P5C sintetizado quimicamente ($113,05 \text{ g mol}^{-1}$) corresponde ao produto metabólico da oxidação de L-prolina. Tendo isso, foi possível realizar as determinações de atividade enzimática para a TcP5CDH. O P5C é um iminoácido, que em meio aquoso e dependendo do pH, se encontra em equilíbrio espontâneo com a sua forma aberta, o γ GSA (MEZL; KNOX, 1976; WILLIAMS, I.; FRANK, L., 1975). Este processo foi confirmado nos nossos ensaios através das mudanças no espectro de absorção do P5C-sintético em função do pH. Em pH alcalino (pH: 10,0) observou-se um pico que corresponderia à forma reduzida do P5C, a hidroxinorvalina, um intermediário que pode-se reduzir formando prolina (MEZL; KNOX, 1976). Em pH neutro (7,0) observou-se um único pico para o P5C-sintético ($\lambda_{210\text{nm}}$) (Figura 18A). Este pico na presença da enzima TcP5CDH diminui ao longo do tempo, sugerindo que este seja o substrato da enzima, acoplado à redução do NAD^+ (Figura 18B). Estudos prévios utilizando espectroscopia de RMN mostraram que a pH 7,4 (substituindo o H^+ por Deutério ^2H na preparação) a forma imina (P5C) é mais abundante que a forma hidratada (γ GSA). Quando o valor de pH diminui a 6,2 é possível encontrar as duas formas P5C e γ GSA, onde o equilíbrio começa a favorecer para a forma aberta conforme o pH continua diminuindo. Essa transição corresponde, provavelmente, ao estado ionizável no grupo pirrolínico do P5C (BEARNE; WOLFENDEN, 1995). Segundo isso, os valores de pK_a , reportados para o grupo imino e carbóximo da forma ciclizada (P5C) foram de 6,7 (BEARNE; WOLFENDEN, 1995) e 1,8, respectivamente (LEWIS et al., 1993).

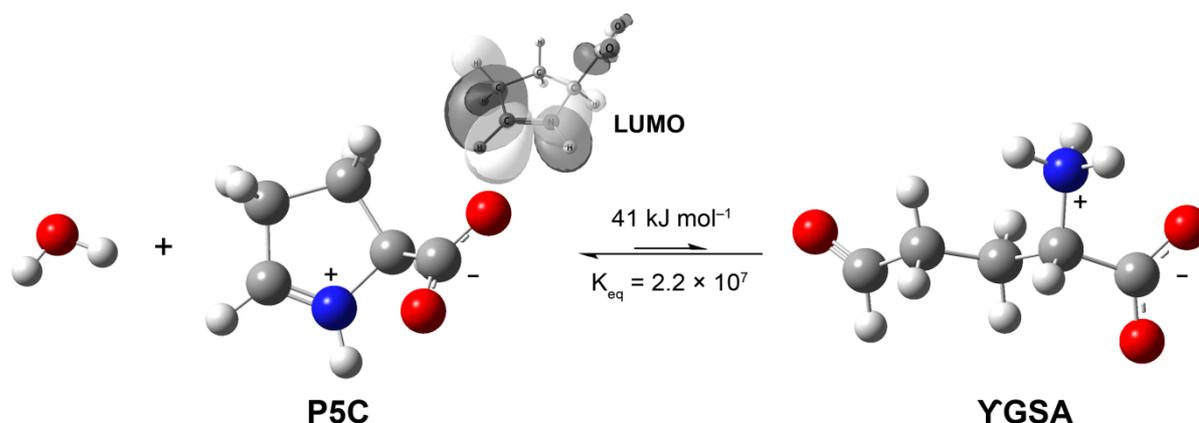
Por outro lado, baseados na interação do L-glutamato com o sítio ativo da enzima TtP5CDH, e cuja estrutura química é semelhante à do γ GSA, a Cys³³⁶ foi reportada como resíduo que interage no processo de catálise. Sugeriu-se que a Cys³³⁶ faz um ataque nucleofílico sobre o carbono aldeídico do γ GSA, se formando um intermediário hemiacetal tetraédrico (INAGAKI et al., 2006). Isto é seguido pela transferência de um hidrato ao NAD^+ com a produção de uma tioacilenzima que é hidrolisada em H_2O , rendendo glutamato como produto final (INAGAKI et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2012). Além disso, não foi observada alguma interação do NADH com o sítio ativo da enzima (INAGAKI et al., 2006), pelo que se sugere que o passo reverso não seja mediado pela TcP5CDH.

Cálculos teóricos realizados em colaboração com o Prof. Erick Bastos (IQ-USP) indicam que a forma cíclica (P5C) é preferencial, sob o ponto de vista termodinâmico (41 kJ mol^{-1} , $K = 2,2 \cdot 10^7$), e a abertura do anel depende do ataque nucleofílico da água ao carbono imínico (C5). Este processo é favorecido pela ativação da imina em meio ácido, i.e., a protonação do nitrogênio imínico aumenta a eletrofilicidade do carbono 5 e o torna mais

reativo frente à hidrólise (Esquema 3). Os dados teóricos estão de acordo com os resultados experimentais obtidos por espectroscopia de RMN que indica um pD (pK_{aH}) de 6,7 para o nitrogênio imínico (BEARNE; WOLFENDEN, 1995). Contudo, resultados de análise cristalográfica indicam que o substrato da TtP5CDH é o γ GSA (INAGAKI et al., 2006). Estes resultados aparentemente conflitantes poder ser interpretados considerando o equilíbrio de ciclização de P5C em γ GSA e a conseguinte oxidação a ácido glutâmico no sistema como apresentado na equação 8. Ou seja, embora o equilíbrio esteja amplamente deslocado no sentido do P5C, a formação de Glu ocorrerá via γ GSA se o processo de oxidação enzimática for rápido e irreversível. Em outras palavras, a concentração de B (e.g., γ GSA) será sempre muito baixa quando k_2 e k_{-1} forem muito maiores do que k_1 .



Esquema 8 - Representação estrutural do processo de conversão da forma aberta P5C ao γ GSA em meio aquoso



Estruturas otimizadas em nível SMD-B3LYP/6-311++G(d,p) e valores de energia livre de ciclização e respectiva constante de equilíbrio. O orbital molecular desocupado de mais baixa energia (LUMO) indica os possíveis sítios de interação com espécies nucleofílicas.

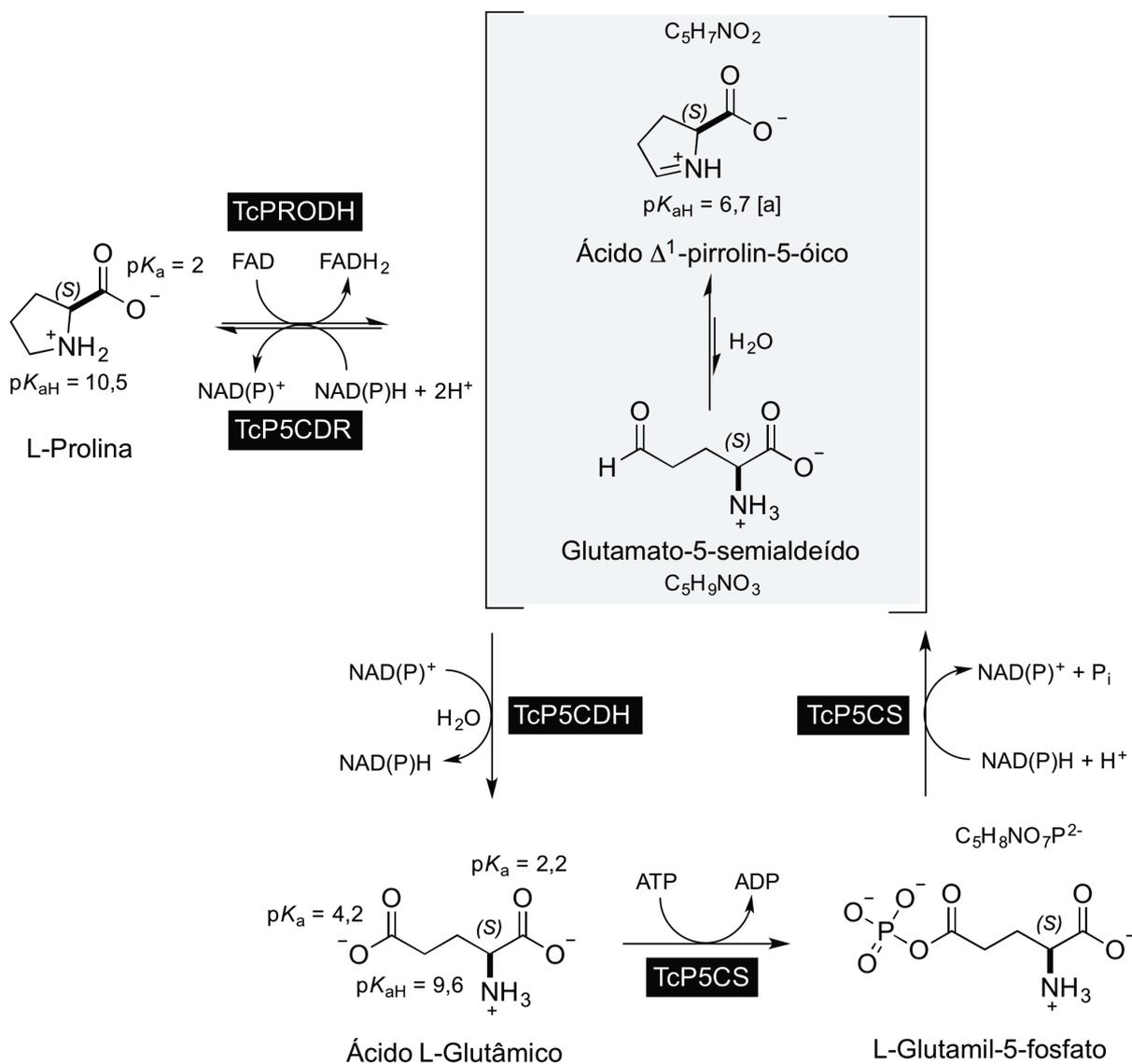
Dessa forma, e considerando o valor de pH ótimo determinado para a enzima TcP5CDH (pH = 7,2 - 7,6) é possível dizer que, embora o equilíbrio favorece à presença do P5C, a velocidade da conversão do γ GSA é maior. Portanto, esta é a forma química que predomina na oxidação enzimática em Glu (VOGEL; DAVIS, 1952). Os valores de pH ótimo, reportados para P5CDHs de outras espécies, foram semelhantes (FORTE-MCROBBIE; PIETRUSZKO,

1986; INAGAKI et al., 2006; SRIVASTAVA et al., 2012). Estes valores são concordantes com o valor de pH intracelular determinado para as formas A e T do *T. cruzi* (pH = 7,3) (VAN DER HEYDEN; DOCAMPO, 2000).

As outras vias, enzimáticas, de formação de P5C são a partir de ornitina ou glutamato. A transaminação de ornitina pela enzima OAT (PHANG et al., 1982) não ocorre em *T. cruzi*, bem como a não funcionalidade do ciclo da ureia em *T. cruzi* (YOSHIDA; CAMARGO, 1978). Já a produção de P5C a partir de glutamato em *T. cruzi* vimos que, mesmo sob concentrações excessivas de este aminoácido (15 mM) (Figura 16A), esta não ocorre através da TcP5CDH. Para isto, o γ GSA somente pode ser gerado por via enzimática a partir da fosforilação de Glu e posterior redução de Glu-PO_3^- , processo catalisado pela enzima bifuncional TcP5CS (Esquema 4).

A oxidação do γ GSA em glutamato, catalisada pela TcP5CDH, mostrou ser um processo dependente de NAD^+ ou NADP^+ . Os valores de K_m se mantiveram semelhantes nas medições realizadas com as frações mitocondriais do parasita (Tabela 4). No entanto, a afinidade pelo NAD^+ , na enzima pura, foi significativamente maior ($K_m = 72,3 \pm 14,1 \mu\text{M}$) com respeito daquela calculada para o NADP^+ ($342 \pm 140 \mu\text{M}$). Além disso, a eficiência enzimática observada para o NADP^+ (dada pela razão k_{cat}/K_m) foi menor nas duas situações. Isto significa que a enzima TcP5CDH, na mitocôndria do parasita, produz equivalentes reduzidos (NADH , NADPH) de forma constante que podem ser utilizados em outros processos bioquímicos, como discutido posteriormente. As diferenças observadas na afinidade para o P5C, onde esta é menor na enzima pura ($144 \pm 43 \mu\text{M}$) do que em mitocôndrias ($86 \pm 1 \mu\text{M}$), diz respeito sobre a incidência da eventual associação da TcP5CDH com membranas mitocondriais, o que, talvez, favorece a uma melhor interação com o substrato. Isto é suportado pelo valor determinado para a k_{cat} (P5C) que foi maior no lisado mitocondrial ($130,7 \pm 10 \text{ min}^{-1}$), possivelmente pela presença das enzimas que reduzem o glutamato em P5C. De fato, a eficiência da enzima foi maior (2-ordens de grandeza) nas frações mitocondriais do que na enzima purificada. Os valores de K_m determinados para o P5C são comparáveis com os valores reportados para P5CDHs de outras espécies (arqueia: $37 \mu\text{M}$; rato: $90 \mu\text{M}$; humano: $170 \mu\text{M}$) (INAGAKI et al., 2006; SMALL; JONES, 1990).

Esquema 9 - Rota de interconversão entre prolina e glutamato em *T. cruzi*



A via prolina – glutamato em *T. cruzi* funciona nos dois sentidos. As enzimas envolvidas nesta via indicam-se em quadros pretos. As setas indicam o sentido onde o equilíbrio da reação é favorecido. O equilíbrio espontâneo entre as formas ciclizada (P5C) e aberta (γ GSA), em meio aquoso, é um processo dependente do pH do meio. Relatos prévios reportaram que o valor experimental de pK_{aH} (ácido conjugado da amina desprotonada) corresponde a pD: 6,7 [a] (BEARNE; WOLFENDEN, 1995). Os outros valores, de pK_a são os já determinados para Prol e Glu. A enzima TcP5CS é bifuncional, catalisando tanto a fosforilação do glutamato quanto a redução em γ GSA.

A atividade enzimática TcP5CDH mostrou-se dependente da T^o da reação. O gráfico de Arrhenius ajustava, inicialmente, a uma linha concáva, sendo necessário ajustá-lo separadamente. No primeiro intervalo de T^o (acima de 45 °C), onde provavelmente começa a ocorrer a denaturação térmica, a atividade se reduz drasticamente e a E_a (8,1 kcal mol⁻¹) aumenta. Na faixa de valores compatíveis com as T^o fisiológicas (20 - 42 °C) a E_a foi apenas

de $1,2 \text{ kcal mol}^{-1}$ (Figura 17C). Este perfil pode ser o resultado de um processo cuja atividade depende de dois substratos (P5C e NAD^+), onde a denaturação térmica varia dependendo do tipo de interação com o substrato (Figura 17B, C). A temperatura ótima para TcP5CDH foi de $45 \text{ }^\circ\text{C}$, o que não corresponde às temperaturas enfrentadas pelo parasita no seu transito pelos distintos hospedeiros ($28, 33, 37 \text{ }^\circ\text{C}$), mas é comum para muitas enzimas devido à que a velocidade da reação é incrementada com a T° , enquanto esta não seja afetada pelo processo de denaturação. Nos estágios intracelulares (A, Ei, T), a atividade TcP5CDH (medida a $28 \text{ }^\circ\text{C}$) foi maior nas formas T (Figura 26B). Essa diferença foi maior quando a temperatura da reação foi aumentada a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ (Figura 17D), sugerindo que este processo seria regulado pela temperatura. Particularmente, o clone 14 da cepa CL de *T. cruzi* é uma cepa termo-sensível (BRENER et al., 1976) que completa seu ciclo infectivo a $33 \text{ }^\circ\text{C}$ (T° permissiva), sendo que a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ o ciclo intracelular acontece de forma restrita (temperatura restritiva) (TONELLI et al., 2004). Portanto, é esperado que no estágio Ei, onde a prolina é essencial para o processo de diferenciação à forma T (TONELLI et al., 2004), a enzima TcP5CDH seja ativa. De fato, esta atividade foi observada nas nossas determinações, mas no estágio T esta foi maior do que no Ei (Figura 26B). No estágio Ei, o transporte e atividade da TcPRODH são maiores do que nos outros estágios (PAES, L.S et al., 2013; TONELLI et al., 2004), o que resultaria num aumento dos níveis de P5C. Nesse sentido, sugere-se que no estágio Ei, a biossíntese, ou incorporação de prolina, é maior (TONELLI et al., 2004), onde uma parte desta é acumulada e, após a eclosão das formas T fora da célula hospedeira, o P5C produzido é então metabolizado. Isto último favorece ao processo de invasão em novas células, o que também pode ser estimulado sob um aumento na temperatura.

O glutamato, produto da oxidação enzimática do P5C, é também um aminoácido relevante em outros processos bioquímicos do parasita. Sob condições fisiológicas (pH 7,3) o glutamato se encontra na sua forma desprotonada, o que pode interferir no seu passo através das membranas (DANBOLT, 2001). De fato, o pH ótimo do transporte de glutamato em *T. cruzi* ocorre em meio ácido (pH = 5,0) (SILBER et al., 2006). Portanto, acreditamos que o transporte de glutamato à mitocôndria pode ser restrito. Assim, o Glu deve ser gerado, principalmente, por via enzimática. Além da conversão a partir de P5C, o glutamato pode se produzir por transaminação de Ala ou Asp (MARCIANO et al., 2008; MARCIANO et al., 2009), deaminação de Gln ou aminação redutiva de α -CG (CALDAS et al., 1980). Este último processo, catalisado pela enzima glutamato desidrogenase dependente de NADP^+ , é reversível, produzindo α -CG (CAZZULO; JUAN; SEGURA, 1977; JUAN; SEGURA;

CAZZULO, 1978). O α -CG é um intermediário do ciclo de Krebs, sendo esta uma rota alternativa para a produção de NADH, CO₂ e ATP através da fosforilação ao nível do substrato (via succinil-CoA sintetase) (BOCHUD-ALLEMANN; SCHNEIDER, 2002).

4.4 O papel fisiológico da TcP5CDH

O P5C é um substrato altamente reativo (WILLIAMS, IRENE; FRANK, LEONARD, 1975) que pode se tornar tóxico quando acumulado intracelularmente, alterando o estado redox da célula (FARRANT et al., 2001; NOMURA; TAKAGI, 2004). Portanto, a funcionalidade das enzimas responsáveis pela conversão de P5C em prolina ou glutamato é crucial na manutenção da viabilidade celular. Nós constatamos que parasitas expostos a diferentes concentrações de P5C externo, não exibem efeito citotóxico. Pelo contrário, em formas E a viabilidade celular se mantém, mostrando que o P5C é incorporado ao interior da célula produzindo ATP (Figura 27). O processo de invasão celular depende, estritamente, da hidrólise de ATP pelo parasita (SCHENKMAN; ROBBINS; NUSSENZWEIG, 1991). Quando formas M foram carenciadas dos níveis de ATP, a adição de L-prolina reestabeleceu a síntese de ATP, favorecendo também o processo de invasão em células de mamífero (MARTINS et al., 2009). O ensaio de infecção com T, na presença de P5C, mostrou que este último pode sustentar a invasão celular, onde o ciclo de diferenciação celular se completa. Este comportamento pode estar ligado com a expressão diferencial exibida para TcP5CDH nos estágios M e T. Fato que, de certa forma, sugere a ocorrência de outros processos mediados pela enzima distintos à síntese de ATP.

A transcrição em tripanosomas é mediada pela RNA polimerase I, sendo que a expressão gênica é regulada ao nível pós-traducional (CLAYTON, 2002). A abundância nos níveis de transcrito ou proteína são regulados diferencialmente durante o ciclo de vida do *T. cruzi* (ATWOOD et al., 2005; MINNING et al., 2009). No caso específico da TcP5CDH, os níveis detectados no ensaio de *western blot* não foram totalmente correlativos com o observado para o mRNA ou atividade enzimática, nas distintas formas do ciclo de vida. Nos estágios infectivos (M e T), os níveis proteicos foram semelhantes ao estágio E. Isto diz sobre a importância na estabilidade da proteína ou a degradação da mesma, como processos que podem incidir nos níveis expressos de proteína mediante a técnica de *western blot* (SCHWANHAUSSER et al., 2011). Dado que a TcP5CDH forma um hexâmero, os níveis da forma monomérica no gel SDS-PAGE podem ser residuais, sem haver uma estrita correlação

entre a atividade enzimática e a abundância da proteína na forma monomérica (63 kDa). Isto foi observado nos ensaios com mutantes pTEX-*TcP5CDH*⁺⁺, onde os níveis de mRNA e atividade TcP5CDH estiveram aumentados, mas no *western blot* essas diferenças não foram tão evidentes (Figura 31C). Por outro lado, os ensaios de silenciamento da TbP5CDH usando a técnica de RNAi mostraram que a indução do dsRNA diminuiu os níveis de mRNA, mas os níveis proteicos da TbP5CDH permaneceram inalterados (Figura 41). Embora não houve uma correlação simultânea entre mRNA, proteína e atividade enzimática, as nossas determinações de mRNA e função da TcP5CDH sugerem que esta enzima é expressa diferencialmente nos estágios infectivos do parasita. Contudo, pode-se dizer que a participação da enzima TcP5CDH não deve ser apenas restrita à geração de energia, e que portanto, outros processos estariam envolvidos na infecção pelo *T. cruzi*.

A atuação de enzimas em processos fisiológicos do parasita, diferentes aos processos metabólicos canônicos, não é um assunto novo. Como exemplos disto, o *T. cruzi* secreta uma prolina racemase, que embora os seus parâmetros cinéticos não correspondem às concentrações fisiológicas do seu substrato natural (D-prolina), o seu papel como mitógeno de células B é consistente (CHAMOND et al., 2003; REINA-SAN-MARTIN et al., 2000). A enolase, que participa da conversão de 2-fosfoglicerato em fosfoenolpiruvato, e a arginase que converte L-arginina em L-ornitina, também possuem funções alternativas, além da sua atividade enzimática por si só (AVILAN et al., 2011; BALANA-FOUCE et al., 2012). No entanto, estas enzimas ou seus produtos metabólicos precisam ser expostos ou secretados para atuarem como moléculas efetoras nestes processos. A possibilidade que a enzima TcP5CDH se localize na membrana plasmática do estágio T foi considerada, uma vez que o seu perfil de imunomarcagem se acentuava ao redor do corpo do parasita (Figura 24). Também, a aparente mudança no processo de adesão celular em parasitas pTEX-*TcP5CDH*⁺⁺, somado ao aumento nos níveis de TbGP82, poderiam ser atribuídas ao processo em menção. Porém, a participação do P5C em processos mitocondriais e a localização subcelular observada em outras formas fazem com que essa hipótese seja validada somente com a realização de ensaios futuros.

4.5 Correlação da atividade TcP5CDH e a bioenergética do *T. cruzi*

Dependendo da disponibilidade de substratos, íons, pH e T°, o metabolismo energético do parasita varia (PAES, L.S. et al., 2011). Nas formas E, a síntese de ATP acontece pela via glicolítica, através do processo de fosforilação ao nível do substrato (CAZZULO, 1992). A

exaustão deste metabólito promove uma mudança no metabolismo oxidativo de L-prolina, levando a síntese de ATP através do processo de fosforilação oxidativa (SILBER et al., 2005). Nos dois casos, o succinato é um metabólito intermediário chave que pode doar seus elétrons à coenzima Q na mitocôndria ou, ser secretado ao meio extracelular sob condições anaeróbicas (DENICOLA-SEOANE et al., 1992; TURRENS, 1989). Prolina, glutamato, glicina e alanina constituem o 75% dos aminoácidos livres em extratos celulares do *T. cruzi* (O'DALY; SERRANO; RODRIGUEZ, 1983). Particularmente, os níveis de L-prolina predominam na hemolinfa do inseto vetor *R. Prolixus* (BARRETT; FRIEND, 1975) e a sua concentração é maior na urina, onde acontece o processo de metaciclologênese (KOLLIEN; SCHAUB, 2000). Este processo é estimulado na presença de L-prolina, como acontece no meio artificial (TAU) que mimetiza a composição da urina do barbeiro (CONTRERAS et al., 1985). Nos estágios intracelulares, a prolina favorece à diferenciação do estágio Ei na forma T (TONELLI et al., 2004). No estágio T, os níveis de prolina livre intracelular são menores do que no estágio A, no entanto, estes são maiores do que no Ei (SILBER et al., 2009). Isto indica que tanto nos estágios M e T, onde a demanda de prolina é maior, devido à expressão diferencial da TcP5CDH, há geração de P5C oxidável. Outra possibilidade, perante uma eventual escassez deste iminoácido, é a obtenção de prolina a partir da ação proteolítica. A prolina constitui o 25% dos resíduos que compõem o colágeno, a proteína mais abundante em massa no corpo humano (DIXIT; SEYER; KANG, 1977). Em processos inflamatórios, o colágeno pode ser degradado pela ação de metaloproteases da matriz extracelular, que liberam os dipeptídeo PP ou PG. Seguido disto, a enzima prolidase catalisa a liberação de prolina ou hidroxiprolina, que ficam na sua forma livre (PHANG et al., 2008). O *T. cruzi* secreta uma protease de 80 kDa com atividade colagenase (SANTANA et al., 1997). Essas evidências sugerem que nos estágios infectivos do *T. cruzi* haveriam fontes alternativas geradoras de P5C, que podem ser utilizadas pela TcP5CDH e em outros processos onde a prolina esteja involucrada.

É sabido que substratos como D-glicose, L-prolina ou succinato estimulam o consumo de oxigênio em *T. cruzi* (DENICOLA-SEOANE et al., 1992; SYLVESTER; KRASSNER, 1976). As taxas respiratórias observadas para succinato, L-prolina e P5C não apresentaram diferenças em *T. cruzi*. A respiração dependente de NADH é insensível a antimicina-A, rotenona e cianeto, mas sensível a catalase ou fumarato (DENICOLA-SEOANE et al., 1992; ROGERSON; GUTTERIDGE, 1979). Visto que no *T. cruzi*, o succinato estimula a respiração, acoplado à síntese de ATP cuja via de entrada é o C-II da CTE (succinato

desidrogenase) (DENICOLA-SEOANE et al., 1992; MORALES et al., 2009), e que o C-I (NADH: ubiquinona oxidoredutase) possui uma atividade limitada, a transferência dos elétrons que provêm do NADH, à forma oxidada da Coenzima Q, não parece operar como em outros eucariotas (CARRANZA et al., 2009). Dessa forma, sugeriu-se que a FMR é a enzima responsável pela reoxidação do NADH, sendo também uma fonte adicional para a geração de succinato e H_2O_2 (DENICOLA-SEOANE et al., 1992).

Nos ensaios de atividade TcP5CDH (baseados na detecção de NADH) em lisados totais do parasita, a produção de NADH, a partir de NAD^+ e P5C, foi levemente aumentada na presença de 20 μM de rotenona (inibidor do C-I). Esta atividade se manteve similar quando adicionado fumarato (Figura 15B). Entretanto, quando a atividade TcP5CDH foi medida na presença de 3-MFA, reportado como inibidor da atividade FMR (TURRENS, 1989), observou-se uma redução significativa na produção de NADH (Figura 15B). Isto mostra que o 3-MFA não inibe a reoxidação do NADH pela FMR, como descrito por Turrens, provocando um efeito deletério que afeta outras enzimas incluídas a TcP5CDH. Os nossos dados, junto com as informações disponíveis para o metabolismo mitocondrial no *T. cruzi*, sugerem que a enzima TcP5CDH se localiza na membrana interna mitocondrial, gerando-se NADH, e cujos elétrons são transferidos à CRE, provavelmente através da FMR, e cujo succinato gerado leva à síntese de ATP.

A síntese de ATP, dependente de P5C, é estimulada pela adição externa de ADP (estado III da respiração celular) e inibida pela antimicina-A. Isto indica que os elétrons do NADH são, de alguma forma, transferidos ao C-III da CTE, o que é acompanhado pelo bombeamento de prótons da matriz mitocondrial ao espaço intermembrana. O gradiente de prótons gerado favorece a reentrada destes à matriz mitocondrial através da ATP-sintase, que utiliza essa força protomotriz gerada para fosforilar ADP (CHANCE et al., 1955). Este processo foi confirmado pela inibição na síntese de ATP quando adicionado oligomicina (inibidor da subunidade F_0 do complexo ATP-sintase) (LARDY; CONNELLY; JOHNSON, 1964; NEUBERT; LEHNINGER, 1962). Além disso, vimos que nos parasitas pTEX-TcP5CDH⁺⁺, a síntese total de ATP foi duplicada, nos três substratos testados e sob o estímulo com ADP. Curiosamente, quando usado o P5C, os níveis de ATP se mantiveram semelhantes ao tratamento não estimulado com ADP (Figura 32). Isto pode-se atribuir a que no mutante pTEX-TcP5CDH⁺⁺, os altos níveis de ATP regulam negativamente o importe de ADP à mitocôndria, processo mediado por um trocador ATP/ADP presente na MIM (PENA-DIAZ et al., 2012).

A fosforilação oxidativa é um processo, que normalmente está acoplado à respiração celular rendendo ATP e H₂O. Isto também foi observado nos nossos ensaios com P5C, onde foi visto que este substrato estimula o consumo de oxigênio. Neste caso, vimos que as taxas respiratórias também foram estimuladas nos parasitas pTEX-TcP5CDH⁺⁺. Cabe destacar que o desacoplamento no transporte do elétrons na CTE não afeta drasticamente o consumo de oxigênio, contrário ao que acontece na síntese de ATP. O FCCP é um composto desacoplador que permeabiliza o passo de prótons através da MIM, gerando uma diminuição no potencial de membrana (BAKKER; VAN DEN HEUVEL; VAN DAM, 1974). Isto pode resultar na formação de EROs, como é a redução do O₂ em H₂O₂. O *T. cruzi* produz H₂O₂ na presença de L-prolina e FCCP, provavelmente, ao nível dos citocromos (BOVERIS; STOPPANI, 1977). Porém, nas células pTEX-TcP5CDH⁺⁺ a produção de H₂O₂ dependente de L-prolina foi completamente revertida. Isto sugere que o aumento nas taxas respiratórias mediado pela super-expressão da atividade TcP5CDH poderia diminuir as tensões de oxigênio que possam reagir na formação de H₂O₂. Assim, os elétrons produzidos na oxidação de L-prolina devem ser transportados na CTE e, quando ocorre o desacoplamento estes reduzem O₂ em água. Além disso, o papel da prolina na resistência ao estresse oxidativo em *T. cruzi* já foi observado previamente (MAGDALENO et al., 2009; PAES, L.S. et al., 2011). Recentemente, foi relatado que a L-prolina em células de mamífero protege a célula do efeito causado pelo H₂O₂, onde a enzima PRODH favorece a síntese de ATP, de NADPH e participa de sinalização intracelular envolvendo proteínas tipo mTORC1 mTORC2 (NATARAJAN et al., 2012).

4.6 A TcP5CDH como um alvo tripanocida

O DSF mostrou um efeito semelhante ao descrito em células de placenta humana (FARRES; JULIA; PARES, 1988). Os nossos dados mostraram que o 50% desta inibição é atingida sob uma concentração que excede em quatro vezes o valor da CI₅₀ determinada na forma epimastigota (402 nM). Diante disso, sugere-se que hajam outros possíveis alvos envolvidos no efeito inibitório exibido pelo DSF. Também, a resistência ao DSF, observada durante o processo de metaciclogênese, pode-se atribuir a diferenças no perfil de expressão dessas proteínas alvo. No genoma do parasita há quatro sequências anotadas com o domínio de aldeído desidrogenase (UniprotKb: Q4DVV3, Q4DIU8, Q4DYS1, Q4DRT8). Sendo uma destas a TcP5CDH (Q4DRT8), que é específica para o γ GSA. Visto que a expressão de

TcP5CDH é maior no estágio M e T, e, que a resistência ao DSF foi aumentada nos parasitas pTEX-TcP5CDH⁺⁺, sugere-se que esta enzima seja um dos alvos afetados. Nesse caso, o efeito seria mediado pelo DSF diretamente, ao invés, de um produto de degradação metabólica do DSF. O efeito do DSF em alcoólatras é mediado pelo *S*-metil-*N,N*-dietiltiocarbamato, produto de oxidação do DSF no fígado (JOHANSSON, 1992; LIPSKY; SHEN; NAYLOR, 2001). Talvez, uma degradação semelhante ocorra nas células CHO-k₁, resultando na inibição da eclosão das formas T (Figura 36). O efeito mediado pelo DSF afeta principalmente as formas replicativas E e T derivados da infecção em CHO-k₁, onde vimos que a TcP5CDH é expressa diferencialmente. Por outro lado, a estrutura do DSF sugere que a redução dos grupos sulfetos levaria a uma inibição do seu efeito. Portanto, na presença de DTT, este efeito poderia ser revertido (GROVER; LATIES, 1981).

Como mencionado anteriormente, a inibição da enzima TcP5CDH pode alterar os níveis de P5C e, em consequência produzir efeitos sobre outros processos. Entre estes destacam-se: i) desbalanço redox ao nível mitocondrial, ii) inibição química da vitamina B6 (piridoxal-5-fosfato) pelo P5C (FARRANT et al., 2001) ou iii) inibição da enzima glucosamina-6-fosfato sintase pelo γ GSA (BEARNE; WOLFENDEN, 1995). Todos estes processos tem importância bioquímica no *T. cruzi*, e uma alteração nestes afetaria drasticamente a viabilidade do parasita.

Considerando que o DSF possui uma alta afinidade por metais como, o cobre e o ferro (MORRISON et al., 2010), este poderia interferir na atividade de enzimas metalodependentes. Este tipo de enzimas são de grande importância no *T. cruzi*. Entre essas destacam-se a superóxido dismutase dependente de ferro (PIACENZA et al., 2007), citocromo *c* oxidase (AFFRANCHINO; SCHWARCZ DE TARLOVSKY; STOPPANI, 1986) ou metalopeptidases (NOGUEIRA DE MELO et al., 2010). A resistência aumentada em parasitas pTEX-TcP5CDH⁺⁺ sugere múltiplas hipótese. Uma delas pode estar relacionada a uma maior eficiência nos mecanismos de detoxificação a EROs, mediado pela tripanotona redutase NADPH-dependente (KRAUTH-SIEGEL et al., 1993). Apesar do baixo K_m para o NADP⁺, a enzima TcP5CDH também pode ser uma fonte geradora de NADPH no *T. cruzi*.

Em síntese, a enzima TcP5CDH é crucial nos processos redox do parasita quando a prolina é a fonte nutricional. O desbalanço na atividade TcP5CDH e, portanto, nos níveis de P5C ou seus intermediários metabólicos, resultam em efeitos letais para o parasita. Esses dados postulam este passo enzimático como um evento importante na manutenção da viabilidade celular pelo *T. cruzi*.

4.7 A prolina e sua relação entre o *T. brucei* e o seu hospedeiro vetor

Semelhante às observações em *T. cruzi*, o papel da L-prolina na relação parasita – hospedeiro invertebrado é relevante na biologia da espécie africana, o *T. brucei*. Este parasita não apresenta um ciclo intracelular necessário para sua replicação no hospedeiro vertebrado (HILL et al., 1978). Dentro deste, o metabolismo de prolina é praticamente nulo, pois a glicólise é a principal fonte energética do parasita (CROSS; KLEIN; LINSTED, 1975). Este último condiz com os baixos níveis de expressão observados para TbP5CDH em fsc mantidas *in vitro* (Figura 40D, E), sugerindo que a via prolina é praticamente inativa nos estágios de desenvolvimento presentes no hospedeiro vertebrado. Portanto, a importância da prolina é restrita aos eventos que acontecem dentro do seu hospedeiro vetor.

A L-prolina, como mencionado anteriormente, é a principal fonte oxidável em mitocôndrias do músculo de voo na mosca tsé-tsé (BURSELL, 1963; HANSFORD; SACKTOR, 1970). A alta afinidade do transportador deste metabólito, somado à rápida conversão em ATP, fazem deste um aminoácido essencial na biologia destes insetos (NJAGI; OLEMO; PEARSON, 1992). Particularmente, na espécie *Glossina morsitans* existe um ciclo alternado de conversão entre alanina e prolina quando o inseto voa ou está em repouso. Dessa forma se garante a disponibilidade de prolina de forma constante (BURSELL et al., 1973). Neste ciclo, a prolina é oxidada na mitocôndria do músculo de voo e, depois regenerada no abdômen a partir de alanina (HARGROVE, 1976), sendo então transportada, de volta, através da hemolinfa (BURSELL, 1963). No processo de colonização do im pelo *T. brucei* estes ficam aderidos a este tecido sem atravessar diretamente pela hemolinfa (LEHANE; AKSOY; LEVASHINA, 2004). No entanto, achamos que a disponibilidade de prolina pode variar quando a mosca está infectada pelo parasita devido ao processo de compensação e transporte de prolina que ocorre nos distintos tecidos da mosca.

A diminuição nos níveis de prolina observada no grupo naïve, após o 5º dia de infecção, não se manteve durante o período inteiro do experimento. Somente no dia 15 a.i., observou-se uma diminuição da prolina livre em hemolinfa que poderia se atribuir à infecção pelo parasita (Figura 39). As formas do parasita que predominam neste período da infecção correspondem às formas que emigram do im ao pv. A TcP5CDH mostrou níveis de expressão (mRNA e proteína) aumentados nos parasitas extraídos a partir do pv. Porém, no tecido im houve uma banda reativa em abundância, cuja massa molecular corresponde à TbP5CDH. O

que também pode indicar reatividade positiva do soro anti-TcP5CDH contra a isoforma da mosca (GmP5CDH) (Figura 40A, B) No entanto, as diferenças observadas sugerem que a TbP5CDH é diferencialmente expressa nos três principais estágios de desenvolvimento dentro da mosca. Essa característica pode estar relacionada às características das formas presentes no pv. Dentro do pv, um órgão que fica na junção com o esôfago, im e o duto *crop*. O pv age como uma válvula regulando o fluxo direcional do sangue. Este também é o responsável pela produção da matriz peritrófica e, é nessa organela, onde os parasitas apresentam uma alongação celular ($\approx 40 - 60 \mu\text{m}$) previa à formação das formas tripomastigotas mesocíclicas (SHARMA et al., 2008). Estes se dividem assimetricamente formando as formas epimastigotas que migram às glândulas salivares, onde são posteriormente transmitidas [revisado em (WALSHE et al., 2009)].

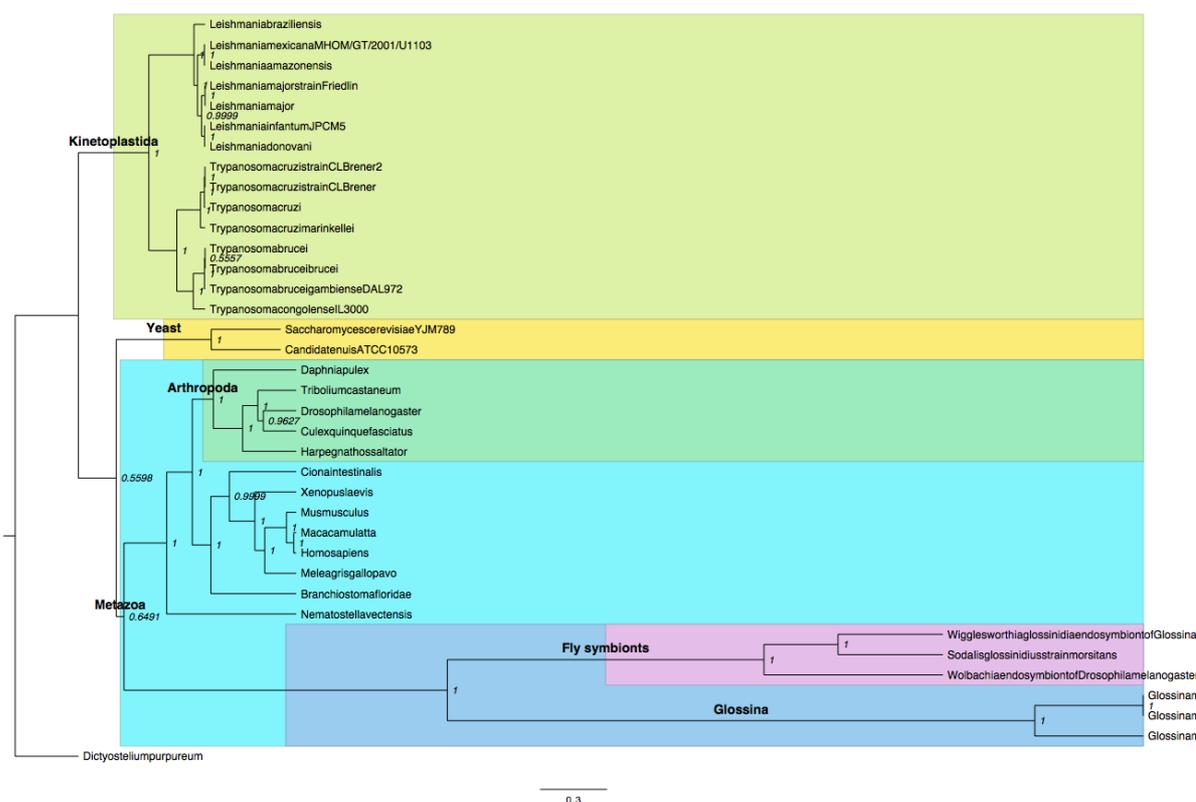
Considerando que o *T. brucei* não sintetiza prolina, pode-se dizer que a disponibilidade deste aminoácido é restrita à prolina livre nos tecidos da mosca. O transportador de prolina do parasita possui uma afinidade maior ($K_m = 19 \mu\text{M}$) do que o transportador do músculo de voo na mosca tsé-tsé ($K_m = 85 \mu\text{M}$) (L'HOSTIS; GEINDRE; DESHUSSES, 1993; NJAGI et al., 1992). Portanto, acreditamos que os indivíduos suscetíveis à infecção pelo parasita possam apresentar uma diminuição nos estoques de prolina livre, podendo inclusive, afetar outros processos como o voo.

As formas do parasita presentes na mosca produzem acetato, succinato e alanina a partir de glicose, mas não geram CO_2 via ciclo de Krebs. O succinato pode ser gerado desde a prolina e depois usado pelo C-II da CTE para a geração de ATP (VAN HELLEMOND; OPPERDOES; TIELENS, 2005). Outro papel fisiológico importante na utilização de prolina é a síntese de moléculas de superfície. Como é sabido, *T. brucei* apresenta um amplo repertório de moléculas de superfície relevantes na resistência ao ataque por proteases. Estes possuem uma grande quantidade de glicoproteínas associadas a GPI na superfície celular, conhecidas como procíclinas (ACOSTA-SERRANO et al., 2001). As formas presentes no pv expressam em abundância a prociclina EP-1, cujo nome deriva-se da extensas repetições de EP (Glu Prol). Isto significa que neste estágio (pv) há uma demanda extra de prolina, além dos requerimentos energéticos prolina-dependentes já mencionados, com respeito dos outros como mg e sg. Dessa forma, os processos de transporte, degradação e biossíntese de moléculas de superfície devem estar estritamente ligados e, caso haja uma desregulação neste processo a viabilidade celular pode-se afetar drasticamente. A aparente diminuição na capacidade proliferativa no clone *kdp5cdh2*, após a indução do dsRNA para a TbP5CDH

(Figura 40 B,C), sugere, novamente, que a diminuição nos níveis de mRNA possa ter um efeito na funcionalidade da proteína, levando à interferência no metabolismo de prolina.

A enzima P5CDH é altamente conservada entre organismos do gênero kinetoplastida (Esquema 10). Os tripanossomas africanos se agrupam em um clado diferente dos tripanossomas de importância na América, mas a proteína é altamente conservada. Em leveduras, onde vimos que a TcP5CDH complementa a atividade da cepa $\Delta PUT2$ e o anti-TcP5CDH reconhece a isoforma da levedura, observa-se também que a P5CDH é conservada. Curiosamente, entre o filo arthropoda onde agrupam-se os insetos do tipo *Glossina*, *Drosophila* e *Culex*, entre outros, houve uma marcada variabilidade ao compararmos a enzima P5CDH. No caso específico da mosca tsé-tsé, a GmP5CDH é mais conservada com o seu homólogo nas baterias endosimbiontes que se hospedam no im. Local que também é compartilhado com os tripanossomas e cuja divergência também foi notável. Este fenômeno pode ser um moderado indicio de que a evolução destas proteínas, não necessariamente, depende de processos co-adaptativos entre um organismo e outro que atua como hospedeiro.

Esquema 10 – Árvore filogenética baseada em sequências de P5CDH para outras espécies.



As sequências foram alinhadas com o programa MUSCLE e árvore foi realizada pelo método de inferência Bayesiana, como explicado na seção 2.1.2. Os táxons foram agrupados de acordo com: ordem Kinetoplastida (*Leishmania*, *Trypanosoma*), Yeast (*Saccharomyces*, *Candida*), Filo: Arthropoda (*Daphnia*, *Tribolium*, *Drosophila*, *Culex*, *Harpegnathos*) Genêro: *Glossina*, Reino: Metazoa (*Xenopus*, *Cionialis*, *Mus*, *Homo*, *Macaca*, *Branchiostoma*, *Nematostella*), *Fly symbiont* (*Wigglesworthia*, *Sodalis*, *Wolbachia*).

5 CONCLUSÕES

Neste trabalho demonstrou-se que a TcP5CDH é uma enzima funcionalmente expressa no protozoário causador da doença de Chagas, o *T. cruzi*. A TcP5CDH forma um hexâmero, tanto na forma apoenzima como em frações mitocondriais do *T. cruzi*. Este oligômero é direcionado à mitocôndria do parasita mediante um PDM. O produto maturo da TcP5CDH permanece ligado à membrana interna mitocondrial, possivelmente através de uma hélice-alfa, onde a face catalítica da enzima parece estar orientada à matriz mitocondrial. A atividade da TcP5CDH é um processo dependente do pH do meio, onde em condições fisiológicas, o equilíbrio favorece à conversão efetiva e irreversível da forma aldeídica do P5C, o γ GSA. Este processo está acoplado à concomitante produção de equivalentes reduzidos do tipo

NADPH e NADH. Os produtos de reação da TcP5CDH, glutamato e NADH participam de processos enzimáticos que levam à geração de energia. Isto último pode acontecer por fosforilação ao nível do substrato, via ciclo de Krebs ou pela fosforilação oxidativa na CTE. Nos dois casos, o succinato é um intermediário chave que pode ser gerado no ciclo de Krebs (succinil-CoA sintetase) ou pela TcFMR que reoxida o NADH mitocondrial (P5C-dependente) e cujos elétrons podem entrar na CTE via C-II produzindo ATP. Além disso, vimos que tanto P5C como prolina estimulam o consumo de O₂. Em *T. brucei* a prolina é um metabólito chave na relação parasita – hospedeiro. Onde a TbP5CDH também é diferencialmente expressa durante o processo de colonização e desenvolvimento na mosca tsé-tsé. Tanto TcP5CDH como a TbP5CDH são proteínas altamente conservadas cuja regulação da expressão parece estar mediada por eventos pós-traducionais ou interações com outros componentes lipídicos, ou proteicos, presentes na MIM como o C-IV ou o C-II.

A enzima TcP5CDH é diferencialmente expressa nos estágios infectivos do *T. cruzi* e a sua participação nos processo infecciosos do *T. cruzi* não parece estar ligada somente à geração de ATP. Por outro lado, o efeito observado com uma droga, econômica e atualmente disponível no mercado, que interfere na atividade TcP5CDH leva a um efeito tripanocida dose-dependente. Portanto, achamos relevante continuar desvendando os papéis secundários nos quais a TcP5CDH possa estar envolvida, o que fornecerá mais evidências sobre a importância do metabolismo de P5C em tripanossomas.

REFERÊNCIAS*

ACESTOR, N. et al. Protein composition of *Trypanosoma brucei* mitochondrial membranes. **Proteomics**, v. 9, n. 24, p. 5497-5508, 2009.

ACESTOR, N. et al. *Trypanosoma brucei* mitochondrial respiratome: composition and organization in procyclic form. **Mol. Cell. Proteomics**, v. 10, n. 9, p. M110 006908, 2011.

ACOSTA-SERRANO, A. et al. The surface coat of procyclic *Trypanosoma brucei*: programmed expression and proteolytic cleavage of procyclin in the tsetse fly. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 98, n. 4, p. 1513-1518, 2001.

ADAMS, E.; FRANK, L. Metabolism of proline and the hydroxyprolines. **Annu. Rev. Biochem.**, v. 49, p. 1005-1061, 1980.

AFFRANCHINO, J. L.; SCHWARCZ DE TARLOVSKY, M. N.; STOPPANI, A. O. Terminal oxidases in the trypanosomatid *Trypanosoma cruzi*. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 85, n. 2, p. 381-388, 1986.

ANDREWS, N. W. Living dangerously: how *Trypanosoma cruzi* uses lysosomes to get inside host cells, and then escapes into the cytoplasm. **Biol. Res.**, v. 26, n. 1-2, p. 65-67, 1993.

ARAL, B. et al. Database cloning human delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase (P5CS) cDNA: a bifunctional enzyme catalyzing the first 2 steps in proline biosynthesis. **C R Acad. Sci. III**, v. 319, n. 3, p. 171-178, 1996.

ATWOOD, J. A. et al. The *Trypanosoma cruzi* proteome. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 473-476, 2005.

AVILAN, L. et al. Enolase: a key player in the metabolism and a probable virulence factor of trypanosomatid parasites-perspectives for its use as a therapeutic target. **Enzyme Res.**, v. 2011, p. 932549, 2011.

BAKKER, E. P.; VAN DEN HEUVEL, E. J.; VAN DAM, K. The binding of uncouplers of oxidative phosphorylation to rat-liver mitochondria. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 333, n. 1, p. 12-21, 1974.

BALANA-FOUCE, R. et al. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 181, n. 2, p. 85-93, 2012.

BARRETT, F. M.; FRIEND, W. G. Differences in the concentration of free amino acids in the haemolymph of adult male and female *Rhodnius prolixus*. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 52, n. 3, p. 427-431, 1975.

*De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023**: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BARRETT, F. M. Changes in the concentration of free amino acids in the haemolymph of *Rhodnius prolixus* during the fifth instar. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 48, n. 2, p. 241-250, 1974.

BATES, L.S.; WALDREN, R.P., TEARE, I.D. Rapid determination of free proline for water-stress studies. **Plant Soil**, v. 39, p. 205-207, 1973.

BAUDIN, A. et al. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nucleic Acids Res.**, v. 21, n. 14, p. 3329-3330, 1993.

BEARNE, S. L.; WOLFENDEN, R. Glutamate gamma-semialdehyde as a natural transition state analogue inhibitor of *Escherichia coli* glucosamine-6-phosphate synthase. **Biochemistry**, v. 34, n. 36, p. 11515-11520, 1995.

BLASER, M. J. *Helicobacter pylori* and the pathogenesis of gastroduodenal inflammation. **J. Infect. Dis.**, v. 161, n. 4, p. 626-633, 1990.

BLATTNER, J. et al. Glycosome assembly in trypanosomes: variations in the acceptable degeneracy of a COOH-terminal microbody targeting signal. **J. Cell. Biol.**, v. 119, n. 5, p. 1129-1136, 1992.

BOCHUD-ALLEMANN, N.; SCHNEIDER, A. Mitochondrial substrate level phosphorylation is essential for growth of procyclic *Trypanosoma brucei*. **J. Biol. Chem.**, v. 277, n. 36, p. 32849-32854, 2002.

BODLEY, A. L.; SHAPIRO, T. A. Molecular and cytotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase I inhibitor, on trypanosomes and *Leishmania*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 92, n. 9, p. 3726-3730, 1995.

BOOKOUT, A. L.; CUMMINS, C. L.; MANGELSDORF, D. J. High-throughput real-time quantitative reverse transcription PCR. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R. et al. (Ed.). **Current protocols in Molecular Biology**. Cambridge: Jhon Wiley & Sons, Inc, 2003. v. 1. cap. 15.8, p.15.18.11-15.18.21.

BOSCARDIN, S. B. et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **J. Cell. Mol. Med.**, v. 14, n. 6B, p. 1373-1384, 2010.

BOVERIS, A.; STOPPANI, A. O. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 33, n. 10, p. 1306-1308, 1977.

BOVERIS, A.; HERTIG, C. M.; TURRENS, J. F. Fumarate reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 19, n. 2, p. 163-169, 1986.

BRACHMANN, C. B. et al. Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. **Yeast**, v. 14, n. 2, p. 115-132, 1998.

- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248-254, 1976.
- BRANDRISS, M. C.; KRZYWICKI, K. A. Amino-terminal fragments of delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase direct beta-galactosidase to the mitochondrial matrix in *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 6, n. 10, p. 3502-3512, 1986.
- BRANDRISS, M. C. Proline utilization in *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of the cloned PUT2 gene. **Mol. Cell. Biol.**, v. 3, n. 10, p. 1846-1856, 1983.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. [Morphological Variations Observed in Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*]. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 5, p. 220-224, 1963.
- BRENER, Z. et al. Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. **J. Protozool.**, v. 23, n. 1, p. 147-150, 1976.
- BRUCE, D.; NABARRO, D.; GRIEG, E. **Further report of sleeping sickness in Uganda. Report of the Sleeping Sickness Commission.** 1903. p. 3-87.
- BRUCE, D. **Preliminary report on the tsetse fly disease or nagana in Zululand.** 1895
- BRYAN, M. A.; NORRIS, K. A. Genetic immunization converts the *trypanosoma cruzi* B-Cell mitogen proline racemase to an effective immunogen. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 2, p. 810-822, 2010.
- BUCHENSKY, C. et al. The *Trypanosoma cruzi* proteins TcCox10 and TcCox15 catalyze the formation of heme A in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 312, n. 2, p. 133-141, 2010.
- BURSELL, E. et al. Metabolism of the bloodmeal in tsetse flies (a review). **Acta Trop.**, v. 31, n. 4, p. 297-230, 1974.
- BURSELL, E. et al. The supply of substrates to the flight muscle of tsetse flies. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 67, n. 2, p. 296, 1973.
- BURSELL, E. Aspects of the metabolism of aminoacids in the tsetsefly, *Glossina* (Diptera). **J. Insect Physiol.**, v. 9, n. 4, p. 439-452, 1963.
- _____. Development of mitochondrial and contractile components of the flight muscle in adult tsetse flies, *Glossina morsitans*. **J. Insect Physiol.**, v. 19, n. 5, p. 1079-1086, 1973.
- BUSCHIAZZO, A. et al. Crystal structure, catalytic mechanism, and mitogenic properties of *Trypanosoma cruzi* proline racemase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 103, n. 6, p. 1705-1710, 2006.
- CALDAS, R. A. et al. Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, v. 66, n. 2, p. 213-216, 1980.

- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in Trypanosoma Cruzi. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 12, p. 93-100, 1964.
- CANNATA, J. J.; CAZZULO, J. J. Glycosomal and mitochondrial malate dehydrogenases in epimastigotes of Trypanosoma cruzi. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 11, p. 37-49, 1984.
- CANNATA, J. J. et al. Two forms of 'malic' enzyme with different regulatory properties in Trypanosoma cruzi. **Biochem. J.**, v. 184, n. 2, p. 409-419, 1979.
- CARRANZA, J. C. et al. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in Trypanosoma cruzi isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. **J Bioenerg. Biomembr.**, v. 41, n. 3, p. 299-308, 2009.
- CAZZULO, J. J.; JUAN, S. M.; SEGURA, E. L. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in Trypanosoma cruzi. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 56, n. 3, p. 301-303, 1977.
- CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FASEB J**, v. 6, n. 13, p. 3153-3161, 1992.
- CAZZULO, J. J. Energy metabolism in Trypanosoma cruzi. **Subcell. Biochem.**, v. 18, p. 235-257, 1992.
- _____. Intermediate metabolism in Trypanosoma cruzi. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 26, n. 2, p. 157-165, 1994.
- CAZZULO, J. J. et al. Amino acid and carbohydrate composition of a lysosomal cysteine proteinase from Trypanosoma cruzi. Absence of phosphorylated mannose residues. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 38, n. 1, p. 41-48, 1990.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., agente etiologico de nova entidade morbida do homem. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159-218, 1909.
- CHAMOND, N. et al. Proline racemases are conserved mitogens: characterization of a Trypanosoma vivax proline racemase. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 165, n. 2, p. 170-179, 2009.
- CHAMOND, N. et al. Biochemical characterization of proline racemases from the human protozoan parasite Trypanosoma cruzi and definition of putative protein signatures. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 18, p. 15484-15494, 2003.
- CHANCE, B. et al. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. V. A mechanism for oxidative phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v. 217, n. 1, p. 439-451, 1955.
- CHAVALI, A. K. et al. Metabolic network analysis predicts efficacy of FDA-approved drugs targeting the causative agent of a neglected tropical disease. **BMC Syst. Biol.**, v. 6, p. 27, 2012.

CHRISTMAS, P. B.; TURRENS, J. F. Separation of NADH-fumarate reductase and succinate dehydrogenase activities in *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol. Lett.**, v. 183, n. 2, p. 225-228, 2000.

CLARK, S. M. et al. Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an *Arabidopsis* gamma-aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. **J. Exp. Bot.**, v. 60, n. 6, p. 1743-1757, 2009.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **EMBO J.**, v. 21, n. 8, p. 1881-1888, 2002.

CONTRERAS, V. T. et al. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 16, n. 3, p. 315-327, 1985.

CORTEZ, C. et al. Differential infectivity by the oral route of *Trypanosoma cruzi* lineages derived from Y strain. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 10, p. e1804, 2012.

CORTEZ, M. et al. *Trypanosoma cruzi* surface molecule gp90 downregulates invasion of gastric mucosal epithelium in orally infected mice. **Microbes Infect.**, v. 8, n. 1, p. 36-44, 2006.

COUTINHO, L. et al. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* proline racemase affects host-parasite interactions and the outcome of in vitro infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1055-1062, 2009.

COVARRUBIAS, C. et al. Interaction with host factors exacerbates *Trypanosoma cruzi* cell invasion capacity upon oral infection. **Int. J. Parasitol.**, v. 37, n. 14, p. 1609-1616, 2007.

COX, F. E. History of sleeping sickness (African trypanosomiasis). **Infect. Dis. Clin. North Am.**, v. 18, n. 2, p. 231-245, 2004.

CROSS, G. A.; KLEIN, R. A.; LINSTEAD, D. J. Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. **Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 311-326, 1975.

CUNHA-E-SILVA, N. L. et al. Isolation and characterization of a reservosome fraction from *Trypanosoma cruzi*. **FEMS Microbiol Lett.**, v. 214, n. 1, p. 7-12, 2002

DANBOLT, N. C. Glutamate uptake. **Prog. Neurobiol.**, v. 65, n. 1, p. 1-105, 2001.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Curr. Pharm. Des.**, v. 8, n. 4, p. 269-285, 2002.

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, v. 41, n. 10, p. 2069-2080, 2009.

- DEITRICH, R. A.; ERWIN, V. G. Mechanism of the inhibition of aldehyde dehydrogenase in vivo by disulfiram and diethyldithiocarbamate. **Mol. Pharmacol.**, v. 7, n. 3, p. 301-307, 1971.
- DENICOLA, A. et al. Extramitochondrial localization of NADH-fumarate reductase in trypanosomatids. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 133, n. 1, p. 23-27, 2002.
- DENICOLA-SEOANE, A. et al. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 54, n. 1, p. 43-50, 1992.
- DEUSCHLE, K. et al. A nuclear gene encoding mitochondrial Delta-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase and its potential role in protection from proline toxicity. **Plant J.**, v. 27, n. 4, p. 345-356, 2001.
- DIEKERT, K. et al. Isolation and subfractionation of mitochondria from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Methods Cell Biol.**, v. 65, p. 37-51, 2001.
- DIXIT, S. N.; SEYER, J. M.; KANG, A. H. Covalent structure of collagen: amino-acid sequence of chymotryptic peptides from the carboxyl-terminal region of alpha2-CB3 of chick-skin collagen. **Eur. J. Biochem.**, v. 81, n. 3, p. 599-607, 1977.
- DOCAMPO, R.; MORENO, S. N. Acidocalcisome: A novel Ca²⁺ storage compartment in trypanosomatids and apicomplexan parasites. **Parasitol. Today**, v. 15, n. 11, p. 443-448, 1999
- DOCAMPO, R.; STOPPANI, A. O. [Mechanism of the trypanocidal action of nifurtimox and other nitro-derivatives on *Trypanosoma cruzi*]. **Medicina (B Aires)**, v. 40 Suppl 1, p. 10-16, 1980.
- DONALD, S. P. et al. Proline oxidase, encoded by p53-induced gene-6, catalyzes the generation of proline-dependent reactive oxygen species. **Cancer Res.**, v. 61, n. 5, p. 1810-1815, 2001.
- DOYLE, P. S.; HSIEH, I.; ENGEL, J. C. *Trypanosoma cruzi*: of man, kissing-bugs, and frogs. **Exp. Parasitol.**, v. 95, n. 1, p. 71-74, 2000.
- ELTHON, T. E.; STEWART, C. R. Submitochondrial Location and Electron Transport Characteristics of Enzymes Involved in Proline Oxidation. **Plant Physiol.**, v. 67, n. 4, p. 780-784, 1981.
- EMMER, B. T. et al. Global analysis of protein palmitoylation in African trypanosomes. **Eukaryot. Cell.**, v. 10, n. 3, p. 455-463, 2011.
- ENGEL, J. C. et al. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.**, v. 188, n. 4, p. 725-734, 1998.

ERNSTER, L.; KUYLENSTIERNA, B. Outer membranes of mitochondria. In: RACKER, R. (Ed.). **Membranes of mitochondria and chloroplasts**. New York: Van Nostrand Reinhold Co, 1970.

FARRANT, R. D. et al. Pyridoxal phosphate de-activation by pyrroline-5-carboxylic acid. Increased risk of vitamin B6 deficiency and seizures in hyperprolinemia type II. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 18, p. 15107-15116, 2001.

FARRES, J.; JULIA, P.; PARES, X. Aldehyde oxidation in human placenta. Purification and properties of 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. **Biochem. J.**, v. 256, n. 2, p. 461-467, 1988.

FERELLA, M. et al. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*--localization of novel proteins to various organelles. **Proteomics**, v. 8, n. 13, p. 2735-2749, 2008.

FERNANDES, M. P. et al. Mechanism of *Trypanosoma cruzi* death induced by *Cratylia mollis* seed lectin. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 42, n. 1, p. 69-78, 2010.

FISCHER, H. et al. Determination of the molecular weight of proteins in solution from a single small-angle X-ray scattering measurement on a relative scale. **Journal of Applied Crystallography**, v. 43, p. 101-109, 2010.

FORTE-MCROBBIE, C. M.; PIETRUSZKO, R. Purification and characterization of human liver "high Km" aldehyde dehydrogenase and its identification as glutamic gamma-semialdehyde dehydrogenase. **J. Biol. Chem.**, v. 261, n. 5, p. 2154-2163, 1986.

FOURNET, A. et al. Efficacy of the bisbenzylisoquinoline alkaloids in acute and chronic *Trypanosoma cruzi* murine model. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 13, n. 3, p. 189-195, 2000.

GARCIA, S. et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 49, n. 4, p. 1521-1528, 2005.

GROVER, S. D.; LATIES, G. G. Disulfiram inhibition of the alternative respiratory pathway in plant mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 68, n. 2, p. 393-400, 1981.

GASTEIGER, E. et al. Protein identification and analysis tools on the ExPASy server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The proteomics protocols handbook**. New Jersey: Humana Press, 2005. p. 571 - 607.

GAUTIER, R. et al. HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific alpha-helical properties. **Bioinformatics**, v. 24, n. 18, p. 2101-2102, 2008.

GIETZ, R. D.; SCHIESTL, R. H. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. **Nat. Protoc.**, v. 2, n. 1, p. 31-34, 2007.

GODARD, P. et al. Effect of 21 different nitrogen sources on global gene expression in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Mol. Cell. Biol.**, v. 27, n. 8, p. 3065-3086, 2007.

- GONCALVES, R. L. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **J. Bioenerg Biomembr**, v. 43, n. 6, p. 651-661, 2011.
- GROVER, S. D.; LATIES, G. G. Disulfiram inhibition of the alternative respiratory pathway in plant mitochondria. **Plant Physiol.**, v. 68, n. 2, p. 393-400, 1981.
- HAJDUK, S. L.; SIQUEIRA, A. M.; VICKERMAN, K. Kinetoplast DNA of *Bodo caudatus*: a noncatenated structure. **Mol. Cell. Biol.**, v. 6, n. 12, p. 4372-4378, 1986.
- HALD, J.; JACOBSEN, E. A drug sensitizing the organism to ethyl alcohol. **Lancet**, v. 2, n. 6539, p. 1001-1004, 1948.
- HALD, J.; JACOBSEN, E. The Formation of Acetaldehyde in the Organism after Ingestion of Antabuse (Tetraethylthiuramdisulphide) and Alcohol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 4, n. 3-4, p. 305-310, 1948.
- HAMMERSLEY, A. P. **FIT2D: V9.129 reference manual V3.1. REPORT**, E. I. 1998.
- HANSFORD, R. G.; SACKTOR, B. The control of the oxidation of proline by isolated flight muscle mitochondria. **J. Biol. Chem.**, v. 245, n. 5, p. 991-994, 1970.
- HARGROVE, J. W. Amino acid metabolism during flight in tsetse flies. **J. Insect Physiol.**, v. 22, n. 2, p. 309-313, 1976.
- HARRINGTON, J. S. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* I. Analysis of the haemolymph. **Parasitology**, v. 51, p. 309-318, 1961.
- HARSMAN, A. et al. Bacterial origin of a mitochondrial outer membrane protein translocase: new perspectives from comparative single channel electrophysiology. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 37, p. 31437-31445, 2012.
- HASLETT, M. R. et al. Assay and subcellular localization of pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase in rat liver. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1675, n. 1-3, p. 81-86, 2004.
- HEACOCK, A. M. et al. Delta 1-Pyrroline-5-carboxylate and Delta 1-pyrroline-3-hydroxy-5-carboxylate. Chromatography on the amino acid analyzer. **Anal. Biochem.**, v. 64, n. 2, p. 593-600, 1975.
- HERNANDEZ, F. R.; TURRENS, J. F. Rotenone at high concentrations inhibits NADH-fumarate reductase and the mitochondrial respiratory chain of *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 93, n. 1, p. 135-137, 1998.
- HILL, G. C. et al. Growth of infective forms of *Trypanosoma rhodesiense* in vitro, the causative agent of African trypanosomiasis. **Science**, v. 202, n. 4369, p. 763-765, 1978.
- HILL, G. C. Electron transport systems in kinetoplastida. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 456, n. 2, p. 149-193, 1976.

HILL, J. E. et al. Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites. **Yeast**, v. 2, n. 3, p. 163-167, 1986.

HOFMANN, K.; STOFFEL, W. TMbase - a database of membrane spanning proteins segments. **Biol. Chem. Hoppe-Seyler**, v. 374, p. 166, 1993.

HOMSY, J. J.; GRANGER, B.; KRASSNER, S. M. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool**, v. 36, n. 2, p. 150-153, 1989.

HU, C. A.; LIN, W. W.; VALLE, D. Cloning, characterization, and expression of cDNAs encoding human delta 1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. **J. Biol. Chem.**, v. 271, n. 16, p. 9795-9800, 1996.

INAGAKI, E. et al. Crystal structure of *Thermus thermophilus* Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. **J. Mol. Biol.**, v. 362, n. 3, p. 490-501, 2006.

ISMAIL, S. O. et al. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 86, n. 2, p. 187-197, 1997.

JOHANSSON, B. et al. Dose-effect relationship of disulfiram in human volunteers. II: A study of the relation between the disulfiram-alcohol reaction and plasma concentrations of acetaldehyde, diethyldithiocarbamic acid methyl ester, and erythrocyte aldehyde dehydrogenase activity. **Pharmacol. Toxicol**, v. 68, n. 3, p. 166-170, 1991.

JOHANSSON, B. A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of disulfiram and its metabolites. **Acta. Psychiatr. Scand. Suppl.**, v. 369, p. 15-26, 1992.

JOHNSON, B. J. et al. The maxicircle of *Trypanosoma brucei* kinetoplast DNA hybridizes with a mitochondrial gene encoding cytochrome oxidase subunit II. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 5, n. 6, p. 381-390, 1982

JONES, E. E.; BROQUIST, H. P. Saccharopine, an intermediate of the amino adipic acid pathway of lysine biosynthesis. II. Studies in *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biol. Chem.**, n. 6, p. 2531-2536, 1965.

JOICE, A. C. et al. Extra-glycosomal localisation of *Trypanosoma brucei* hexokinase 2. **Int. J. Parasitol.**, v. 42, n. 4, p. 401-409, 2012.

JUAN, S. M.; SEGURA, E. L.; CAZZULO, J. J. Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Biochem.**, v. 9, n. 6, p. 395-400, 1978.

KAKIUCHI, H. et al. Rare frequency of activation of the Ki-ras gene in rat colon tumors induced by heterocyclic amines: possible alternative mechanisms of human colon carcinogenesis. **Mol. Carcinog.**, v. 8, n. 1, p. 44-48, 1993.

KARL, B. N.; NICHOLAS, H. B. **GeneDoc**: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. 1997.

KELLY, J. M. et al. A shuttle vector which facilitates the expression of transfected genes in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*. **Nucleic Acids Res.**, v. 20, n. 15, p. 3963-3969, 1992.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol. Today**, v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.

KOZIN, M. B.; SVERGUN, D. I. Automated matching of high- and low-resolution structural models. **J. Appl. Crystallogr.**, v. 34, p. 33-41, 2001.

KRAUTH-SIEGEL, R. L. et al. Crystallization and preliminary crystallographic analysis of trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease. **FEBS Lett.**, v. 317, n. 1-2, p. 105-108, 1993.

KRNACOVA, K. et al. *Euglena gracilis* and Trypanosomatids possess common patterns in predicted mitochondrial targeting presequences. **J. Mol. Evol.**, v. 75, n. 3-4, p. 119-129, 2012.

KYTE, J.; DOOLITTLE, R. F. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. **J. Mol. Biol.**, v. 157, n. 1, p. 105-132, 1982.

L'HOSTIS, C.; GEINDRE, M.; DESHUSSES, J. Active transport of L-proline in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. **Biochem. J.**, v. 291, pt. 1, p. 297-301, 1993.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-685, 1970.

LAMOUR, N. et al. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. **J. Biol. Chem.**, v. 280, n. 12, p. 11902-11910, 2005.

LANE, J. E. et al. In vitro trypanocidal activity of tetraethylthiuram disulfide and sodium diethylamine-N-carbodithioate on *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 3, p. 263-266, 1996.

LARDY, H. A.; CONNELLY, J. L.; JOHNSON, D. Antibiotic Studies. Ii. Inhibition of Phosphoryl Transfer in Mitochondria by Oligomycin and Aurovertin. **Biochemistry**, v. 3, p. 1961-1968, 1964.

LAURIA-PIRES, L.; TEIXEIRA, A. R. Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 3, p. 304-310, 1996.

LEHANE, M. J.; AKSOY, S.; LEVASHINA, E. Immune responses and parasite transmission in blood-feeding insects. **Trends Parasitol.**, v. 20, n. 9, p. 433-439, 2004.

LEMEY, P. et al. Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. **Mol. Biol. Evol.**, v. 27, n. 8, p. 1877-1885, 2010.

- LEWIS, M. L. et al. The effect of pH on the solution structure of Δ^1 -Pyrroline-2-carboxylic acid as revealed by NMR and electrospray mass spectroscopy. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, p. 1193-1196, 1993.
- LIENDO, A.; LAZARDI, K.; URBINA, J. A. In-vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. **J. Antimicrob. Chemother.**, v. 41, n. 2, p. 197-205, 1998.
- LIPSKY, J. J.; SHEN, M. L.; NAYLOR, S. In vivo inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram. **Chem. Biol. Interact.**, v. 130-132, n. 1-3, p. 93-102, 2001a.
- LIPSKY, J. J.; SHEN, M. L.; NAYLOR, S. Overview--in vitro inhibition of aldehyde dehydrogenase by disulfiram and metabolites. **Chem. Biol. Interact.**, v. 130-132, n. 1-3, p. 81-91, 2001.
- LIU, P. et al. Cytotoxic effect of disulfiram/copper on human glioblastoma cell lines and ALDH-positive cancer-stem-like cells. **Br. J. Cancer**, v. 107, n. 9, p. 1488-1497, 2012.
- LO PACHIN, R. M. et al. Molecular mechanisms of 4-Hydroxy-2-nonenal and Acrolein toxicity: nucleophilic targets and adduct formation. **Chem. Res. Toxicol.**, v. 22, n. 9, p. 1499-1508, 2009.
- LUESCH, H. et al. Biosynthesis of 4-Methylproline in Cyanobacteria: Cloning of nosE and nosF Genes and Biochemical Characterization of the Encoded Dehydrogenase and Reductase Activities. **J. Org. Chem.**, v. 68, n. 1, p. 83-91, 2003.
- LUNDBLAD, V.; STRUHL, K. Yeast manipulations. In: AUSUBEL, F. M.; BRENT, R., *et al* (Ed.). **Current protocols in Molecular Biology**. Cambridge: Jhon Wiley & Sons, Inc., v.1, 2003. cap. 13, p.13.10.11-13.10.13.
- LUSCH, H.; UZAR, H. C. New access to the synthetic building block L-aspartic acid beta -semialdehyde via Grignard reaction. **Tetrahedron Asymmetry**, v. 11, n. 24, p. 4965-4973, 2000.
- MA, J.; PTASHNE, M. Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. **Cell**, v. 48, n. 5, p. 847-853, 13 1987.
- MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, 1998.
- MAGDALENO, A. et al. The involvement of glutamate metabolism in the resistance to thermal, nutritional and oxidative stress in *Trypanosoma cruzi*. **Enzyme Research**, v. article in press, 2011.
- MANNERS, D. J. et al. The structure of a beta-(1--6)-D-glucan from yeast cell walls. **Biochem. J.**, v. 135, n. 1, p. 31-36, 1973.

MANQUE, P. M. et al. Cell adhesion and Ca²⁺ signaling activity in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. **Infect. Immun.**, v. 71, n. 3, p. 1561-1565, 2003.

MARCIANO, D. et al. Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 161, n. 1, p. 12-20, 2008.

MARCIANO, D. et al. Functional characterization of stage-specific aminotransferases from trypanosomatids. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 166, n. 2, p. 172-182, 2009.

MARTINS, R. M. et al. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infect. Immun.**, v. 77, n. 7, p. 3023-3032, 2009.

MARTINS-MELO, F. R. et al. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 6, n. 2, p. e1508, 2012.

MCDONNELL, N. B. et al. Zinc ejection as a new rationale for the use of cystamine and related disulfide-containing antiviral agents in the treatment of AIDS. **J. Med. Chem.**, v. 40, n. 13, p. 1969-1976, 1997.

MCGUFFIN, L. J.; BRYSON, K.; JONES, D. T. The PSIPRED protein structure prediction server. **Bioinformatics**, v. 16, n. 4, p. 404-405, 2000.

MEZL, V. A.; KNOX, W. E. Properties and analysis of a stable derivative of pyrroline-5-carboxylic acid for use in metabolic studies. **Anal. Biochem.**, v. 74, n. 2, p. 430-440, 1976.

MILLER, G. et al. Unraveling delta1-pyrroline-5-carboxylate-proline cycle in plants by uncoupled expression of proline oxidation enzymes. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 39, p. 26482-26492, 2009.

MINNING, T. A. et al. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. **BMC Genomics**, v. 10, p. 370, 2009.

MIXSON, A. J.; PHANG, J. M. The uptake of pyrroline 5-carboxylate. Group translocation mediating the transfer of reducing-oxidizing potential. **J. Biol. Chem.**, v. 263, n. 22, p. 10720-10724, 1988.

MOE, O. A.; WARNER, D. T. 1,4-Addition reactions. I. The addition of acylaminomalonates to acrolein. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 70, p. 2763-2765, 1948.

MOHAMED, S. A. et al. *Fasciola gigantica*: enzymes of the ornithine-proline-glutamate pathway--characterization of delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase. **Exp. Parasitol.**, v. 118, n. 1, p. 47-53, 2008.

MONTALVETTI, A. et al. Bisphosphonates are potent inhibitors of *Trypanosoma cruzi* farnesyl pyrophosphate synthase. **J. Biol. Chem.**, v. 276, n. 36, p. 33930-33937, 2001.

- MONTEMARTINI, M. et al. Purification and partial structural and kinetic characterization of tyrosine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. J.**, v. 292, pt. 3, p. 901-906, 1993.
- MONZOTE, L.; GILLE, L. Mitochondria as a promising antiparasitic target. **Curr. Clin. Pharmacol.**, v. 5, n. 1, p. 55-60, 2010.
- MORALES, J. et al. Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. **J. Biol. Chem.**, v. 284, n. 11, p. 7255-7263, 2009.
- MORRISON, B. W. et al. Disulfiram induces copper-dependent stimulation of reactive oxygen species and activation of the extrinsic apoptotic pathway in melanoma. **Melanoma Res.**, v. 20, n. 1, p. 11-20, 2010.
- MORTIMER, R. K.; JOHNSTON, J. R. Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. **Genetics**, v. 113, n. 1, p. 35-43, 1986.
- MOSELEY, V.; MILLER, H. South American trypanosomiasis (Chagas' disease). **Arch. Intern. Med. (Chic.)**, v. 76, p. 219-229, 1945.
- MRACEK, J. et al. A soluble fumarate reductase in *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. **J. Protozool.**, v. 38, n. 6, p. 554-558, 1991.
- NAGATA, K. et al. L-Serine, D- and L-proline and alanine as respiratory substrates of *Helicobacter pylori*: correlation between in vitro and in vivo amino acid levels. **Microbiology**, v. 149, n. Pt 8, p. 2023-2030, 2003.
- NAKAJIMA-SHIMADA, J.; HIROTA, Y.; AOKI, T. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* growth in mammalian cells by purine and pyrimidine analogs. **Antimicrob. Agents Chemother**, v. 40, n. 11, p. 2455-2458, 1996.
- NATARAJAN, S. K. et al. Proline dehydrogenase is essential for proline protection against hydrogen peroxide-induced cell death. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 53, n. 5, p. 1181-1191, 2012.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Oxidative phosphorylation and photophosphorylation. In: AHR, K. (Ed.). **Lehninger, Principles of Biochemistry**. third. New York: Freeman W.H., 2008. cap. 19, p.691-714.
- NEUBERT, D.; LEHNINGER, A. L. The effect of oligomycin, gramicidin and other antibiotics on reversal of mitochondrial swelling by adenosine triphosphate. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 62, p. 556-565, 1962.
- NGO, H. et al. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 25, p. 14687-14692, 1998.

NISHIMURA, A. et al. An antioxidative mechanism mediated by the yeast N-acetyltransferase Mpr1: oxidative stress-induced arginine synthesis and its physiological role. **FEMS Yeast Res.**, v. 10, n. 6, p. 687-698, 2010.

NJAGI, E. N.; OLEMBO, N. K.; PEARSON, D. J. Proline transport by tsetse fly *Glossina morsitans* flight muscle mitochondria. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 102, n. 3, p. 579-584, 1992.

NOGUEIRA DE MELO, A. C. et al. Detection of matrix metalloproteinase-9-like proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, v. 125, n. 3, p. 256-263, 2010.

NOMURA, M.; TAKAGI, H. Role of the yeast acetyltransferase Mpr1 in oxidative stress: regulation of oxygen reactive species caused by a toxic proline catabolism intermediate. **Proc Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 101, n. 34, p. 12616-12621, 2004.

NOWICKI, C. et al. Recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*: structural characterization and site directed mutagenesis of a broad substrate specificity enzyme. **Biochim Biophys Acta**, v. 1546, n. 2, p. 268-281, 2001.

O'DALY, J. A.; SERRANO, L. E.; RODRIGUEZ, M. B. Free amino acid pool and proteolytic enzymes in *Trypanosoma cruzi* cultured in vitro. **Int. J. Parasitol.**, v. 13, n. 5, p. 433-440, 1983.

OPPERDOES, F. R.; MICHELS, P. A. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? **Trends Parasitol.**, v. 24, n. 7, p. 310-317, 2008.

OPPERDOES, F. R.; BORST, P. Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. **FEBS Lett.**, v. 80, n. 2, p. 360-364, 1977.

PAES, L. S. **Caracterização molecular e bioquímica da prolina desidrogenase de *Trypanosoma cruzi*, um possível alvo terapêutico.** 2010. 151 p. Ph. D. thesis (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

PAES, L. S. et al. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. **Curr. Pharm. Des.**, v. 17, n. 20, p. 2074-2099, 2011.

PAES, L. S. et al. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PLoS ONE**, 2013. In press.

PAINDAVOINE, P. et al. The use of DNA hybridization and numerical taxonomy in determining relationships between *Trypanosoma brucei* stocks and subspecies. **Parasitology**, v. 92, pt. 1, p. 31-50, 1986.

PANIGRAHI, A. K. et al. Mitochondrial complexes in *Trypanosoma brucei*: a novel complex and a unique oxidoreductase complex. **Mol. Cell Proteomics**, v. 7, n. 3, p. 534-545, 2008.

- PENA-DIAZ, P. et al. Functional characterization of TbMCP5, a conserved and essential ADP/ATP carrier present in the mitochondrion of the human pathogen *Trypanosoma brucei*. **J. Biol. Chem.**, v. 287, n. 50, p. 41861-41874, 2012.
- PEREIRA, C. A. et al. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 49, n. 1, p. 82-85, 2002.
- PEREZ-MOLINA, J. A.; NORMAN, F.; LOPEZ-VELEZ, R. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. **Curr. Infect. Dis. Rep.**, v. 14, n. 3, p. 263-274, 2012.
- PHANG, J. M. et al. The metabolism of proline, a stress substrate, modulates carcinogenic pathways. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 681-690, 2008.
- PHANG, J. M. et al. Stimulation of the hexosemonophosphate-pentose pathway by pyrroline-5-carboxylate in cultured cells. **J. Cell Physiol.**, v. 110, n. 3, p. 255-261, 1982.
- PIACENZA, L. et al. Mitochondrial superoxide radicals mediate programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*: cytoprotective action of mitochondrial iron superoxide dismutase overexpression. **Biochem. J.**, v. 403, n. 2, p. 323-334, 2007.
- POLLARD, V. W.; HARRIS, M. E.; HAJDUK, S. L. Native mRNA editing complexes from *Trypanosoma brucei* mitochondria. **EMBO J.**, v. 11, n. 12, p. 4429-4438, 1992.
- PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, v. 1, n. 2, p. 92-100, 2001.
- PRIEST, J. W.; HAJDUK, S. L. *Trypanosoma brucei* cytochrome c1 is imported into mitochondria along an unusual pathway. **J. Biol. Chem.**, v. 278, n. 17, p. 15084-15094, 2003.
- PUSNIK, M. et al. An essential novel component of the noncanonical mitochondrial outer membrane protein import system of trypanosomatids. **Mol. Biol. Cell**, v. 23, n. 17, p. 3420-3428, 2012.
- RAMIREZ, M. I. et al. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. **Infect. Immun.**, v. 61, n. 9, p. 3636-3641, 1993.
- RAVIKUMAR, H.; DEVARAJU, K. S.; SHETTY, K. T. Effect of pH on spectral characteristics of P5C-ninhydrin derivative: Application in the assay of ornithine amino transferase activity from tissue lysate. **Indian J. Clin. Biochem.**, v. 23, n. 2, p. 117-122, 2008.
- REINA-SAN-MARTIN, B. et al. A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. **Nat. Med.**, v. 6, n. 8, p. 890-897, 2000.

RICHARDSON, J. The anatomy and taxonomy of proteins. In: RICHARDSON, J. S.; DAVID, C. (Ed.). **Advances in Protein Chemistry**. North Carolina: Academic Press, 1981. v. 34, p. 167-339.

RIOU, G.; DELAIN, E. Abnormal circular DNA molecules induced by ethidium bromide in the kinetoplast of *Trypanosoma cruzi*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 64, n. 2, p. 618-625, 1969.

ROGERSON, G. W.; GUTTERIDGE, W. E. Oxidative metabolism in mammalian and culture forms of *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Biochem.**, v. 10, n. 12, p. 1019-1023, 1979.

ROSENTHAL, G. A. et al. Insecticidal properties of some derivatives of L-canavanine. **J. Agric. Food. Chem.**, v. 43, n. 10, p. 2728-2734, 1995.

SAMBROOK, P. M.; RUSSELL, D. **Molecular Cloning: a laboratory manual**. 3rd ed. New York: CSHL, 2001.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, 1977.

SANTANA, J. M. et al. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. **Biochem. J.**, v. 325, pt. 1, p. 129-137, 1997.

SCHAGGER, H. Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1555, n. 1-3, p. 154-159, 2002.

SCHAGGER, H.; CRAMER, W. A.; VON JAGOW, G. Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. **Anal. Biochem.**, v. 217, n. 2, p. 220-230, 1994.

SCHAGGER, H.; VON JAGOW, G. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. **Anal. Biochem.**, v. 199, n. 2, p. 223-231, 1991.

SCHENKMAN, S. et al. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 59, n. 2, p. 293-303, 1993.

SCHENKMAN, S.; ROBBINS, E. S.; NUSSENZWEIG, V. Attachment of *Trypanosoma cruzi* to mammalian cells requires parasite energy, and invasion can be independent of the target cell cytoskeleton. **Infect Immun.**, v. 59, n. 2, p. 645-654, 1991.

SCHMUNIS, G. A. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102 Suppl 1, p. 75-85, 2007.

SCHNEIDER, A.; BURSAC, D.; LITHGOW, T. The direct route: a simplified pathway for protein import into the mitochondrion of trypanosomes. **Trends Cell Biol.**, v. 18, n. 1, p. 12-18, 2008.

- SCHNEIDER, A. et al. Isolation of mitochondria from procyclic *Trypanosoma brucei*. **Methods Mol. Biol.**, v. 372, p. 67-80, 2007.
- SCHNEIDER, G. et al. Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. **Proteins**, v. 30, n. 1, p. 49-60, 1998.
- SCHWANHAUSSER, B. et al. Global quantification of mammalian gene expression control. **Nature**, v. 473, n. 7347, p. 337-342, 2011.
- SHARMA, R. et al. Asymmetric cell division as a route to reduction in cell length and change in cell morphology in trypanosomes. **Protist.**, v. 159, n. 1, p. 137-151, 2008.
- SILBER, A. M. et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 168, n. 1, p. 102-108, 2009.
- SILBER, A. M. et al. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Parasitol.**, v. 36, n. 2, p. 157-163, 2006.
- SILBER, A. M. et al. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. **Curr. Drug Targets Infect Disord.**, v. 5, n. 1, p. 53-64, 2005.
- SILBER, A. M. et al. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. **J. Eukaryot. Microbiol.**, v. 49, n. 6, p. 441-446, 2002.
- SILVA, T. M. et al. O₂ consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. **J. Bioenerg. Biomembr.**, v. 43, n. 4, p. 409-417, 2011.
- SKROTT, Z.; CVEK, B. Diethyldithiocarbamate complex with copper: the mechanism of action in cancer cells. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 12, n. 12, p. 1184-1192, 2012.
- SMALL, W. C.; JONES, M. E. Pyrroline 5-carboxylate dehydrogenase of the mitochondrial matrix of rat liver. Purification, physical and kinetic characteristics. **J. Biol. Chem.**, v. 265, n. 30, p. 18668-18672, 1990.
- SOARES, M. J.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **J. Cell. Sci**, v. 102 (Pt 1), p. 157-167, 1992.
- SOUZA, D. H. et al. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS Lett.**, v. 424, n. 3, p. 131-135, 13 1998.
- SRIVASTAVA, D. et al. Crystal structure of the bifunctional proline utilization A flavoenzyme from *Bradyrhizobium japonicum*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 107, n. 7, p. 2878-2883, 16 2010.

- SRIVASTAVA, D. et al. The three-dimensional structural basis of type II hyperprolinemia. **J. Mol. Biol.**, v. 420, n. 3, p. 176-189, 13 2012.
- STEVENS, J. R.; GIBSON, W. C. The evolution of pathogenic trypanosomes. **Cad. Saude Publica**, v. 15, n. 4, p. 673-684, 1999.
- STOLIC, I. et al. Effect of 3,4-ethylenedioxy-extension of thiophene core on the DNA/RNA binding properties and biological activity of bisbenzimidazole amidines. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 17, n. 6, p. 2544-2554, 2009.
- STOPPANI, A. O. [The chemotherapy of Chagas disease]. **Medicina (B. Aires)**, v. 59, p. 147-165, 1999. Suppl 2.
- STOPPANI, A. O. et al. Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth. **Mol. Biochem. Parasitol**, v. 2, n. 1, p. 3-21, 1980.
- STRECKER, H. J. The interconversion of glutamic acid and proline. II. The preparation and properties of delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid. **J. Biol. Chem.**, v. 235, p. 2045-2050, 1960.
- STUDIER, F. W.; MOFFATT, B. A. Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. **J. Mol. Biol.**, v. 189, n. 1, p. 113-130, 1986.
- SVERGUN, D. I.; PETOUKHOV, M. V.; KOCH, M. H. Determination of domain structure of proteins from X-ray solution scattering. **Biophys. J.**, v. 80, n. 6, p. 2946-2953, 2001.
- SVERGUN, D. I. Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria. **Journal of Applied Crystallography**, v. 25, p. 495-503, 1992.
- SYLVESTER, D.; KRASSNER, S. M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comp. Biochem. Physiol. B.**, v. 55, n. 3B, p. 443-447, 1976.
- TABERNER, P. V.; BARNETT, J. E.; KERKUT, G. A. Preparation of succinic semialdehyde: its colorimetric estimation as an assay for GABA aminotransferase. **J. Neurochem.**, v. 19, n. 1, p. 95-99, 1972.
- TANNER, J. J. Structural biology of proline catabolism. **Amino Acids**, v. 35, n. 4, p. 719-730, 2008.
- TASKER, M. et al. Cytochrome oxidase subunit VI of *Trypanosoma brucei* is imported without a cleaved presequence and is developmentally regulated at both RNA and protein levels. **Mol. Microbiol.**, v. 39, n. 2, p. 272-285, 2001.
- TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 18, n. 3, p. 271-282, 1986.
- THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J.; CLUSTAL, W. improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-

specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Res.**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TIELENS, A. G.; VAN HELLEMOND, J. J. Differences in energy metabolism between trypanosomatidae. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 7, p. 265-272, 1998.

TOLMAN, R. C. Statistical mechanics applied to chemical kinetics **Journal of the American Chemical Society** v. 42, n. 12, p. 2506-2528, 1920.

TONELLI, R. R. et al. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cell. Microbiol.**, v. 6, n. 8, p. 733-741, 2004.

TURRENS, J. F. The role of succinate in the respiratory chain of *Trypanosoma brucei* procyclic trypomastigotes. **Biochem. J.**, v. 259, n. 2, p. 363-368, 1989.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, n. 5-6, p. 472-481, 2001.

URBINA, J. A. Specific treatment of Chagas disease: current status and new developments. **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 14, n. 6, p. 733-741, 2001.

URBINA, J. A. et al. In vitro antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. **Antimicrob. Agents. Chemother.**, v. 44, n. 9, p. 2498-2502, 2000.

VALLARI, R. C.; PIETRUSZKO, R. Human aldehyde dehydrogenase: mechanism of inhibition of disulfiram. **Science**, v. 216, n. 4546, p. 637-639, 1982.

VAN DER HEYDEN, N.; DOCAMPO, R. Intracellular pH in mammalian stages of *Trypanosoma cruzi* is K⁺-dependent and regulated by H⁺-ATPases. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 105, n. 2, p. 237-251, 2000.

VAN HELLEMOND, J. J.; OPPERDOES, F. R.; TIELENS, A. G. Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 95, n. 6, p. 3036-3041, 1998.

VERCESI, A. E. et al. Digitonin permeabilization does not affect mitochondrial function and allows the determination of the mitochondrial membrane potential of *Trypanosoma cruzi* in situ. **J. Biol. Chem.**, v. 266, n. 22, p. 14431-14434, 1991.

VERCESI, A. E. et al. Calcium inhibition of the ATP in equilibrium with [32P]Pi exchange and of net ATP synthesis catalyzed by bovine submitochondrial particles. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1020, n. 1, p. 101-106, 1990.

VERCESI, A. E.; MORENO, S. N.; DOCAMPO, R. Ca²⁺/H⁺ exchange in acidic vacuoles of *Trypanosoma brucei*. **Biochem. J.**, v. 304 (Pt 1), p. 227-233, 1994.

VOGEL, H. J.; DAVIS, B. D. Glutamic gamma -semialdehyde and Delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid, intermediates in the biosynthesis of proline. **J. Am. Chem. Soc.**, v. 74, p. 109-112, 1952.

VON HEIJNE, G. Targeting sequences. DALBEY, R. E.; VON HEIJNE, G. **Protein targeting, transport and translocation**. New York: Academic Press: 2002. p. 35-40.

VOTYAKOVA, T. V.; REYNOLDS, I. J. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 431, n. 1, p. 138-144, 2004.

WALSHE, C. et al. The Enemy Within: Interactions Between Tsetse, Trypanosomes and Symbionts. **Advances in Insect Physiology**, v. 37, p. 119-175, 2009. Chapter 3.

WANG, Z. et al. Inhibition of *Trypanosoma brucei* gene expression by RNA interference using an integratable vector with opposing T7 promoters. **J. Biol. Chem.**, v. 275, n. 51, p. 40174-40179, 2000.

WHITE, T. C.; RUDENKO, G.; BORST, P. Three small RNAs within the 10 kb trypanosome rRNA transcription unit are analogous to domain VII of other eukaryotic 28S rRNAs. **Nucleic Acids. Res.**, v. 14, n. 23, p. 9471-9489, 1986.

WHO. **Research Priorities for Chagas Disease, Human African Trypanosomiasis and Leishmaniasis**. Italy, p.25-27. 2012

WILKINSON, S. R. et al. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.**, v. 105, n. 13, p. 5022-5027, 2008.

WILLIAMS, I.; FRANK, L. Improved chemical synthesis and enzymic assay of Delta 1-pyrroline-5-carboxylic acid. **Anal. Biochem.**, v. 64, n. 1, p. 85-97, 1975.

WIRTZ, E. et al. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 99, n. 1, p. 89-101, 1999.

WU, G. Y.; SEIFTER, S. Periodate oxidation products of hydroxylysine in the synthesis of 5-substituted prolines. **Anal. Biochem.**, v. 147, n. 1, p. 103-107, 1985.

YOSHIDA, N.; CAMARGO, E. P. Ureotelism and ammonotelism in trypanosomatids. **J. Bacteriol.**, v. 136, n. 3, p. 1184-1186, 1978.

ZELADA, C. et al. Purification and partial structural and kinetic characterization of an alanine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 79, n. 2, p. 225-228, 1996.

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

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v. 117, p. 129-152, 1985.