

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 parcial

São Paulo
2013

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. 115 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 (TcPROD) 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. 115 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.

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).

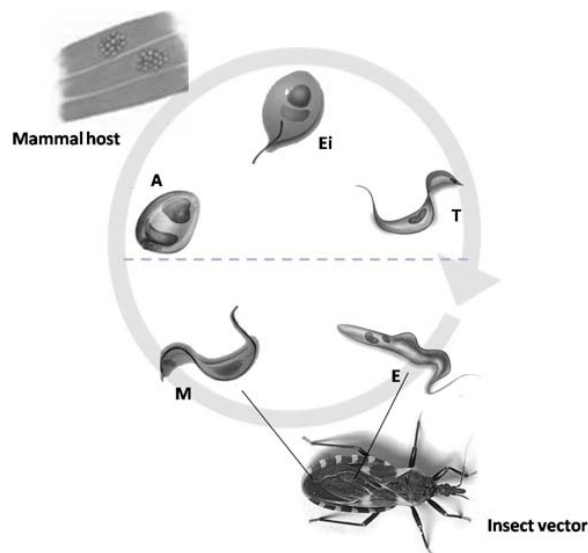
A outra espécie havia sido descoberta alguns anos atrás pelo médico escocês David Bruce, o *T. brucei* (1894) (BRUCE, 1895). Bruce descobriu que este parasita era transmitido na saliva da mosca tsé-tsé após a picada, causando a peste nagana em gado bovino, equino, entre outros. Anos mais tarde (1903) 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)].

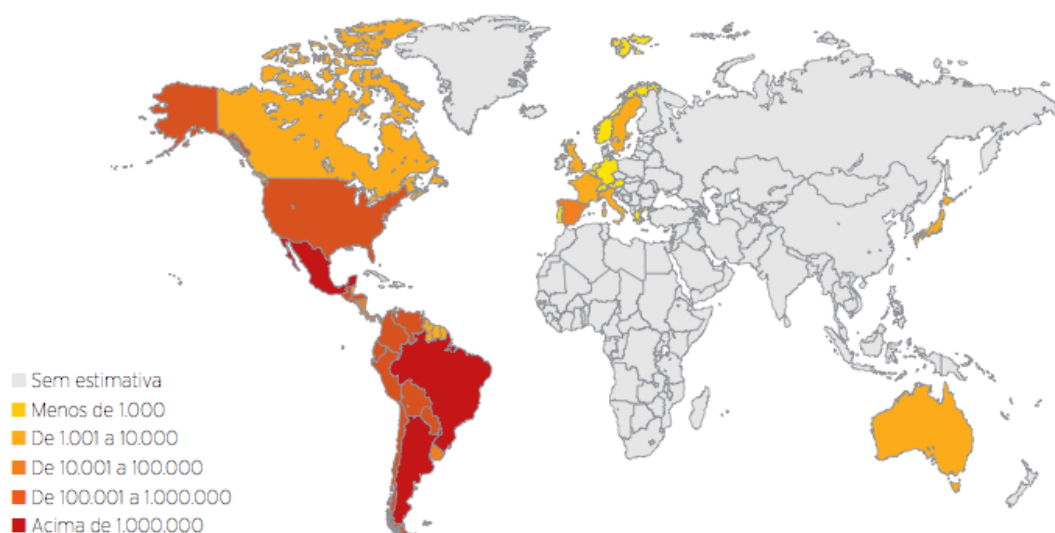
1.1.4 *Panorama epidemiológico atual*

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

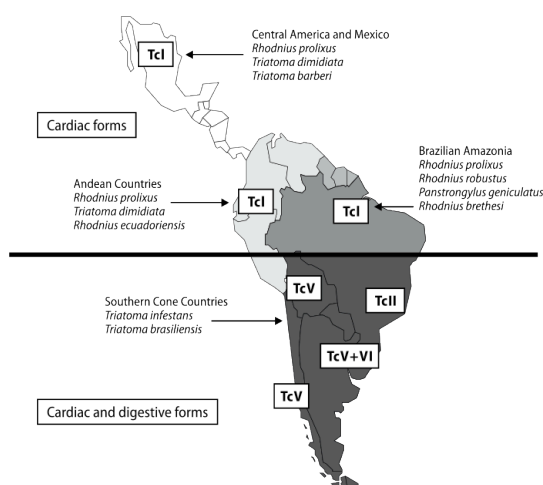
Há quase quarenta anos que a doença de Chagas é tratada com dois compostos, conhecidos como Benznidazole® (Bz) e Nifurtimox® (DOCAMPO; STOPPANI, 1980). Esses compostos são considerados pró-drogas, porque precisam da ativação enzimática catalisada por uma nitro-redutase presente no parasita (WILKINSON 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).

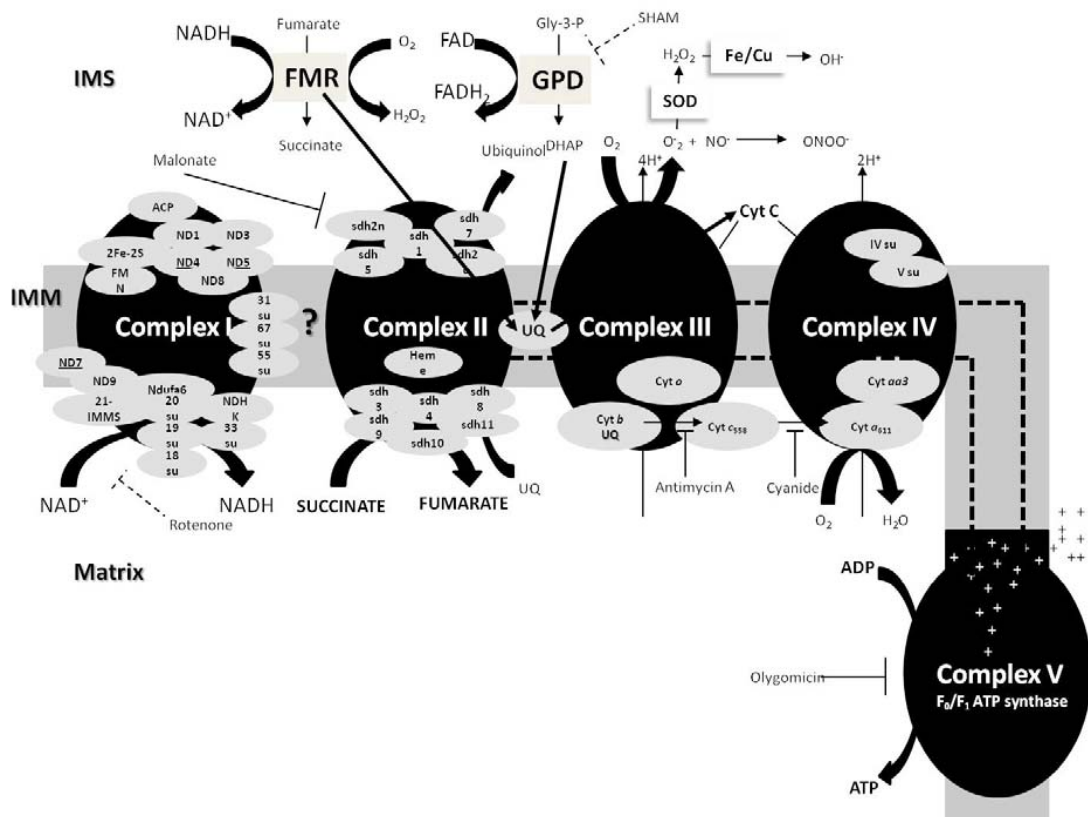
Em *T. brucei* e *T. cruzi* tem sido demonstrado que a atividade mitocondrial alterna entre um estado altamente ativo e outro parcial, o que é regulado durante o ciclo de desenvolvimento do parasita. Dados do genoma e experimentais têm mostrado a presença e funcionalidade dos complexos C-II e C-V, entanto 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 TbPROD. Nessa espécie, a prolina é o único aminoácido capaz de manter a capacidade replicativa sob ausência de glicose. Quando o gene codificante para a TbPROD 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^+ .

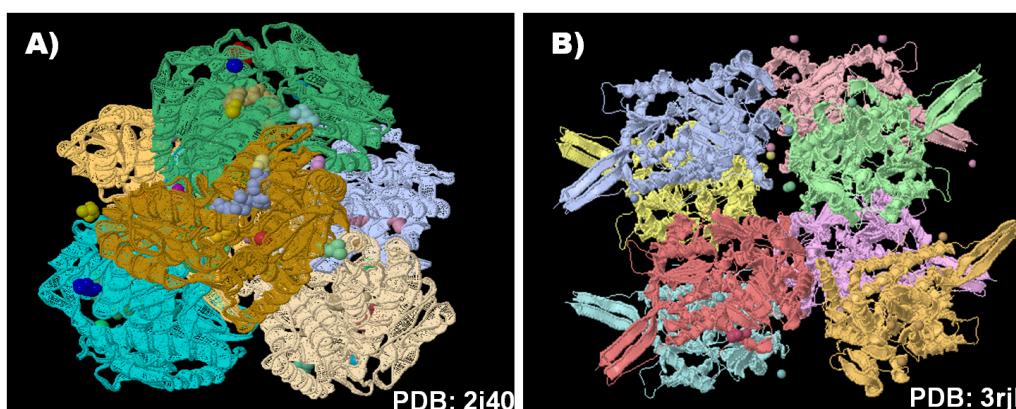
1.3.1 Características das enzimas P5CDHs

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



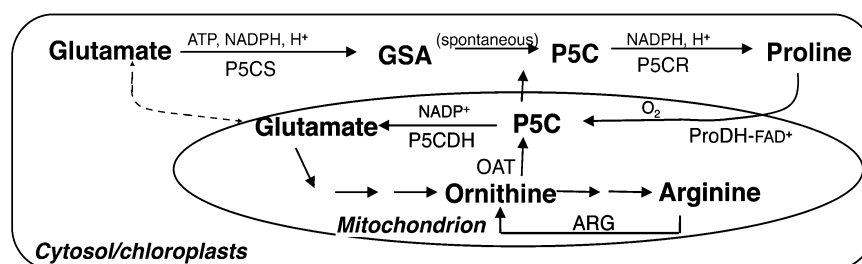
Estruturas quaternárias resolvidas pela técnica de difração por raios-X para as proteínas P5CDH das espécies *T. thermophilus* (A) e *B. liqueniformis*, formando um hexâmero ou um octâmero, respectivamente (B). Os números de acesso indicam-se em cada estrutura. Fonte: (INAGAKI et al., 2006).

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.

4 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.