ROSANA BEATRIZ DUQUE ARAUJO

Papel da asparagina em diferentes processos na biologia de
Trypanosoma cruzi

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

São Paulo
2014

ROSANA BEATRIZ DUQUE ARAUJO

**Papel da asparagina em diferentes processos na biologia de
*Trypanosoma cruzi***

Dissertação 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 Mestre em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Versão original

São Paulo
2014

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

© reprodução total

Araujo, Rosana Beatriz Duque.

Papel da asparagina em diferentes processos na biologia de
Trypanosoma cruzi / Rosana Beatriz Duque Araujo. -- São Paulo, 2014.

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de São Paulo. Instituto de
Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de
concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de
pesquisa: Potenciais alvos para a quimioterapia da doença de Chagas.
Estresse oxidativo.

Versão do título para o inglês: The asparagine role in different
biological processes in the *Trypanosoma cruzi*.

1. *Trypanosoma cruzi* 2. Asparagina 3. Aspartato 4. Estresse
nutricional 5. Estresse oxidativo I. Silber, Prof. Dr. Ariel Mariano II.
Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas.
Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-
Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB074/2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Rosana Beatriz Duque Araujo.

Título da Dissertação: Papel da asparagina em diferentes processos na biologia de *Trypanosoma cruzi*.

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

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da **Dissertação de Mestrado**,
em sessão pública realizada a/...../....., considerou

() Aprovado(a)

() Reprovado(a)

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – CEP. 05508-000 São Paulo, SP Brasil
Telefone (55) (011) 3091.7733 – e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo registrado sob nº **130** nas fls. **134** do livro **02** para uso de animais em experimentação, sob a responsabilidade do Prof(a) Dr(a) **Ariel Mariano Silber**, Coordenador (a) da Linha de pesquisa "*Caracterização bioquímica e molecular da Asparagina sintetase Trypanosoma cruzi*" do qual participam o(s) aluno(s) **Rosana Beatriz Duque Araújo**, está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e foi aprovado pela **COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)** em **18.09.2012, com validade de 4 anos.**

São Paulo, 19 de setembro de 2012.

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

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

À minha família, que sempre foi minha pedra firme,
ainda que à distância, e a Mária Duchicela Velásquez
Olivares (*mi pequena gran Duchi*).

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ariel Mariano Silber, por me aceitar no seu grupo de pesquisa, pela orientação e paciência ao longo do percurso. Por me ensinar a como fazer ciência e também que sempre é possível ser melhor. Agradeço imensamente.

À Elizabeth Pral, técnica do laboratório, por todo o suporte técnico, pela paciência e bons momentos compartilhado .

À Flávia Zimbres e Brian Suarez, pelo apoio, compreensão e amizade. Sem vocês o começo teria sido muito difícil.

À María Julia Barísón, pela amizade, pela ajuda e por me ensinar uma das mais importantes lições na minha experiência no Brasil: a confiar em mim mesma. *Muchisimas gracias amiga.*

Ao Marcell Cripim, pela parceria não só nos momentos bons, mas também nos momentos difíceis. Por sempre estar presente ao meu lado desde o começo até o fim. Muito obrigada Marcelcito.

À Flavia Damasceno, pela ajuda, pela paciência, pela amizade, e sobre tudo por me servir de exemplo de constância e disciplina.

Aos demais integrantes do UDD, o Prof. Carsten, Gustavo, Raíssa, Jasmin, Thales, Carolina, Ludimila, Kamila, Letícia, e especialmente a Higo, Sandra e Soraya. Por fazer do laboratório, um lugar a onde se tem vontade de ir a trabalhar. E aos novos integrantes Richard, Nathalia e Claudia.

À minha família, meus pais e irmãos, por estarem sempre presentes ainda que distantes. Especialmente à minha irmã, Patricia Duque, por ser minha melhor amiga, modelo a seguir e estar todos os dias atenta a mim.

À Sandra Kalil, por me mostrar o lado bom de São Paulo, pela boa amizade e pelo seu apoio sobretudo nestas últimas etapas.

À Anna Beatriz Marthino, por se converter na minha família aqui no Brasil.

Aos meus amigos, Frank Sauer, Ismael Sauter, Andre Boock de Figueiredo, Felipe Carvalho, Lica Assis, Jessica Saad, Alberto Coralli, Angela Betancourth, Diego Rosi, Soraya Bosh, Adrian Gonzales, pela amizade e bons momentos.

A Leticia Marchese e Kamila Meissner, por terem tido a coragem de morar conmigo.

Ao Laboratório do professor Gerd Wunderlich, especialmente a Wesley Luzetti Fotoran, pela ajuda nos experimentos de citometria.

Ao Laboratório da professora Silvia Uliana, especialmente a Cristiana Trinconi Tronco e Jordana Critina, pela ajuda nos ensaios de quantificação de ATP.

À todos os professores, funcionários e colegas do Departamento de Parasitologia (ICB-USP) pelo apoio e convivência.

Às agências financiadoras CNPq, FAPES, INBEQMeDI e à USP pelo suporte financeiro durante o trabalho.

Trabalho realizado com auxílios financeiros cedidos pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças Infecciosas (INBEQMeDI) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

*“...Confía en el tiempo, que suele dar dulces
salidas a muchas amargas dificultades...”*

Don Quijote de la Mancha – Miguel de Cervantes Saavedra

RESUMO

Araujo RD. Papel da asparagina em diferentes processos na biologia de *Trypanosoma cruzi*. [dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e afeta aproximadamente 10 milhões de pessoas em áreas endêmicas que vão do sul dos Estados Unidos, até a Patagônia argentina e chilena. A quimioterapia disponível atualmente limita-se a dois compostos: Nifurtimox[®] e o Benzonidazol[®]. Ambos os fármacos reduzem os sintomas da doença e a mortalidade das pessoas infectadas, quando utilizadas na fase aguda, mas sua eficácia na fase crônica é controversa. O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo alternando entre um hospedeiro invertebrado, e um hospedeiro vertebrado. O sucesso da sobrevivência deste parasita nos diferentes ambientes pelos quais transita ao longo do seu ciclo de vida, em parte depende de sua capacidade de catabolizar diferentes substratos para a obtenção de energia. O *T. cruzi* é capaz de utilizar carboidratos e aminoácidos como fonte de energia e carbono. Os aminoácidos têm um papel relevante em vários processos biológicos do parasita, e algumas rotas metabólicas são particularmente importantes sob essas situações de estresse. A modo de exemplo, a prolina, o glutamato e o aspartato são utilizados como fonte de carbono e energia, a glicina, a alanina, a prolina e o glutamato estão envolvidos na osmoregulação, controle do volume celular e resistência ao estresse oxidativo, dentre outros, e a arginina esta envolvida na administração dos recursos energéticos da célula. No contexto da importância dos aminoácidos na biologia do *T. cruzi*, nos propomos estudar relevância da L-asparagina no metabolismo, diferenciação e resistência a diferentes estresses em *T. cruzi*. Os resultados apresentados neste trabalho demonstram que a asparagina esta envolvida na sobrevivência do parasita diante o estresse nutricional e oxidativo das formas epimastigotas, além de influenciar positivamente no processo da metaciclogênese. Mostramos também que a asparagina é capaz de sustentar a síntese de ATP, possivelmente servindo como fonte de energia para esses processos. Finalmente, observou-se que na carência de este aminoácido é afetada a proliferação das formas replicativas do parasita (formas epimastigotas e amastigotas). Estes dados em conjunto sugerem o envolvimento do metabolismo da asparagina na proteção do parasita perante diferentes condições de estresse e no sustento energético de processos críticos no ciclo de vida do parasita tais como divisão celular e diferenciação.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Asparagina. Aspartato. Estresse nutricional. Estresse oxidativo.

ABSTRACT

Araujo RD. The asparagine role in different biological processes in the *Trypanosoma cruzi* [Masters thesis (Host-Pathogen Relationship Biology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2014.

Chagas disease, also known as American trypanosomiasis, is caused by the flagellated protozoan *Trypanosoma cruzi*, and affects about 10 millions of people in the endemic areas that goes from Southern USA to Argentina and Chile and Patagonia. The chemotherapy currently available is restricted to two compounds: Nifurtimox[®] and Benznidazol[®]. Both drugs reduced the symptoms of the disease and mortality of infected people when used in the acute phase, but their efficacy in the chronic phase is still controversial. Moreover, these drugs have several side effects. The life cycle of *T. cruzi* is complex happening among invertebrate and vertebrate hosts. The successful survival of the parasite in the different environments throughout its life cycle, mainly depends on its ability to catabolise different substrates to obtain energy. *T. cruzi* is able to use carbohydrate and amino acids as carbon and energy sources. The amino acids have an important role in several biological processes of this parasite, and some metabolic pathways are particularly important upon stress conditions. For example proline, glutamate and aspartate, are used as energy sources as well as glycine, alanine, proline and glutamate which are involved in osmoregulation, cell volume control and oxidative and nutritional stress resistance. In the context of the amino acids importance in the biology on *T. cruzi*, we propose to study the asparagine relevance in the metabolism, differentiation and stress resistance on the *T. cruzi*. Our results show that epimastigote forms of *T. cruzi* use asparagine as carbon source, and that this metabolite contributes with the resistance to nutritional and oxidative stress. In addition, asparagine also showed a positive influence in metacyclogenesis. We also showed that asparagine is able to support the ATP synthesis. Finally, we showed that in the absence of asparagine the proliferation of the replicative forms of *T. cruzi* (epimastigote and amastigote) was affected. All of these data suggest the involvement of the asparagine metabolism in the protection of *T. cruzi* when submitted to different stress conditions, and in the energetically support of critical processes of its life cycle such as proliferation and differentiation.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Asparagine. Aspartate. Stress.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Panorama mundial da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	19
Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	23
Figura 3: Representação esquemática do metabolismo de aspartato no <i>T. cruzi</i>	27
Figura 4: Construção de AS recombinante	35
Figura 5: Reação enzimática da ASr usando como substrato a NH_2OH, para a produção do análogo de asparagina	37
Figura 7: Participação da asparagina nos níveis intracelulares de ATP em formas epimastigotas submetidas ao estresse nutricional	46
Figura 8: Avaliação do período de diferenciação <i>in vitro</i> das formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i>, cepa CL14 em meio TAU 3AAG	47
Figura 9: Avaliação do efeito da asparagina na diferenciação <i>in vitro</i> das formas epimastigotas do <i>T. cruzi</i> cepa CL14 para tripomastigotas metacíclicos	48
Figura 10: Porcentagem de diferenciação de epimastigotes do <i>T. cruzi</i> para tripomastigotas metacíclicos, em médio TAU enriquecido com diferentes aminoácidos	48
Figura 11: Viabilidade celular das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidas a estresse oxidativo	49
Figura 12: Viabilidade celular das formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> submetidas a estresse térmico	50
Figura 13: Curva de crescimento de epimastigotas tratados com ácido L-cistein-sulfínico	52
Figura 14: Curva de crescimento de epimastigotes tratados com hidroxilamina	53
Figura 15: Produção do análogo da asparagina	54
Figura 16: Avaliação da proliferação das formas epimastigotas detectadas pela marcação com CFSE, submetidas ao tratamento com hidroxilamina	55
Figura 17: Representação da análise por citometria de fluxo para detecção do tipo de morte celular no terceiro dia	56
Figura 18: Representação da análise por citometria de fluxo para detecção do tipo de morte celular no quinto dia	57
Figura 19: Resumo da detecção do tipo de morte celular para os dois dias de análise ...	57
Figura 20: Formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>: Formas epimastigotas no quinto dia de tratamento com hidroxilamina	58
Figura 21: Viabilidade das células CHO-K₁	59
Figura 22: Efeito do tratamento com hidroxilamina após a invasão dos parasitas nas células CHO-K₁	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Inicidiadores específicos para <i>TcAS-A</i>	32
Tabela 2 – Condições de sobreexpressão da <i>Asr</i>.	35
Tabela 3 – Efeito da Prolina, aspartato e asparagina, na porcentagem de formas metacíclicas no <i>T. cruzi</i> cepa CL14, em meio TAU, no quinto dia de diferenciação.	48

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALAT – Alanina aminotransferase
AMP – Adenosina monofosfato
ASAT – Asparatatoaminotransferase
Asn– Asparagina
Asp – Aspartato
ASr – Asparagina sintetase recombinante
ATP – Adenosina trifosfato
Bz – Benznidazol
CFSE – Carboxifluoresceinasuccinimidilester
CSA – AcidoLcisteinsulfínico
CHO-K₁ – linhagem proveniente de hamster de ovário chinês
DNA –Ácidodesoxirribonucléico
dNTP – Deoxiribonucleosideotrifosfatado
EC – *Enzyme commission nomenclature*
E.coli– *Escherichia coli*
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético
ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* / imunoensaio enzimático
EROs – Espécies reativas de oxigênio
FITC – Isotiocianato de fluoresceína
Glic – Glicose
HEPES– *4- (2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid*
His – Histidina
HRP – *Horseadish peroxidase*
IgG – Imunoglobulina G
IPTG – Isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo
LB – Meio de cultura Luria-Bertani
LIT – liverinfusion – tryptose
MES – Tampão contendo ácido 2- (N-morfolino) etanosulfônico
MTT –*3- (4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NCBI –*National center for biotechnology and information*
NH₃– Amônia
NH₄⁺– Amônio

NF– Nifurtimox

NTA – Ácido nitrilotriacético

PBS – Tampão fosfato salino

PBS-T – PBS suplementado com 0,3% de tween 20

PCR –*Polymerase chain reaction*

PMSF – *Phenylmethysulfonyl fluoride*

Pro – Prolina

RPMI – Meio de cultivo para células de mamífero: Roswell Park Memorial Institute

SDS – Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE – Eletroforese desnaturante de proteínas em gel poliacrilamida

SFB – Soro fetal bovino

TAE – Tampão Tris Acetato EDTA

TAT – Tirosina aminotransferase

TAU – *Artificial Triatomine Urinemedium*

Tris – Tris (hidroximetil) aminometano

tRNA – RNA de transferência

TSB – Tampão de extratos proteicos

UV – Ultravioleta

V – Volumem

X-gal – 5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosideo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
1.1 A doença de Chagas aspectos gerais	19
1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	22
1.3 <i>T. cruzi</i> e o metabolismo dos aminoácidos	23
1.4 Asparagina, aspartato e os aspectos gerais de seu metabolismo	24
1.5 Metabolismo de asparagina e aspartato no <i>Trypanosoma cruzi</i>	26
2 OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos	29
3 MATERIAIS E MÉTODOS	30
3.1 Manutenção e crescimento das células e microorganismos utilizados no trabalho	31
3.1.1 Bactérias	31
3.1.1.1 Manutenção das bactérias	31
3.1.3 <i>Trypanosoma cruzi</i>	31
3.1.3.1 Formas epimastigotas	31
3.1.3.2 Formas tripomastigotas	32
3.2 Avaliação da produção do β -aspartilhidroxamanto, análogo da asparagina	32
3.2.1 Produção da asparagina sintetase recombinante (ASr)	32
3.2.1.1 Clonagem do gene putativo da AS-A de <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.2.1.2 Amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)	33
3.2.1.3 Sequenciamento de DNA	33
3.2.1.4 Preparação de bactérias quimiocompetentes	33
3.2.1.5 Transformação de bactérias competentes	34
3.2.1.6 Subclonagem no vector de expressão pET-28 a (+)	34
3.2.1.7 Expressão das proteínas recombinantes em <i>E.coli</i>	34
3.2.1.8 Purificação da AS recombinante	35
3.2.1.9 Western blotting	36
3.2.2 Produção do análogo da asparagina	37
3.3 Avaliação da proliferação celular	37
3.3.1 Curvas de crescimento de epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
3.3.2 Avaliação da divisão celular em formas epimastigotas	38
3.4 Avaliação do tipo de morte celular em parasitas tratados	38
3.4.1 Avaliação da exposição de fosfatidilserina na membrana do parasita	38
3.5 Análises do efeito dos compostos no ciclo intracelular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
3.5.1 Toxicidade em células de mamíferos	39
3.5.2 Análise do efeito da hidroxilamina durante o ciclo intracelular	39

3.6 Resistência a diferentes tipos de estresse	40
3.6.1 Ensaio de estresse nutricional em formas epimastigotas	40
3.6.2 Ensaio de estresse térmico em formas epimastigotas	40
3.6.3 Ensaio de estresse oxidativo em formas epimastigotas	40
3.7 Avaliação do papel da asparagina na recuperação dos níveis de ATP intracelular em formas epimastigotas	41
3.8 Efeito da asparagina sobre a metaciclogênese	41
3.8.1 Diferenciação in vitro	41
3.8.2 Análise da influência da asparagina na metaciclogênese por citometria de fluxo	42
3.9 Análises estatísticas	43
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	44
4.1 Importância da asparagina em processos celulares de epimastigotas do Trypanosoma cruzi	45
4.1.1 Estresse nutricional	45
4.1.2 Asparagina é capaz de recuperar os níveis de ATP intracelular após jejum	46
4.1.3 Avaliação do efeito da asparagina na metaciclogênese	46
4.1.4 Estresse oxidativo	49
4.1.5 Estresse térmico	50
4.2 Avaliações de análogos na produção da asparagina	52
4.2.1 Curvas de crescimento de epimastigotas de T. cruzi, submetidos ao tratamento com ácido L-cistein-sulfinico	52
4.2.2 Efeito da produção do análogo da asparagina nas curvas de crescimento de epimastigotas de Trypanosoma cruzi	53
4.2.3 Avaliação da hidroxilamina na produção do análogo da asparagina	54
4.2.4 Avaliação do efeito do análogo da asparagina na proliferação de Trypanosoma cruzi	55
4.2.5 Avaliação do efeito do análogo da asparagina na viabilidade do Trypanosoma cruzi	56
4.3 Efeito do análogo da asparagina no ciclo intracelular do Trypanosoma cruzi	59
4.4 Considerações finais	61
5 CONCLUSÕES	62
REFERENCIAS	64

1.1 A doença de Chagas aspectos gerais

A doença de Chagas, ou Tripanossomíase Americana, foi descoberta em 1909 pelo médico brasileiro Carlos Chagas (chagas 1909). Esta doença é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Classicamente, o *Trypanosoma cruzi* era classificado na família Trypanosomatidae, agrupação que reúne protozoários com cinetoplasto em forma de rede e que apresentam um único flagelo unido ao corpo. Em 2005, Adl e colaboradores propuseram uma nova taxonomia para protistas, e sob este novo esquema de classificação conformou-se o supergrupo Excavata, contendo o grupo Euglenozoa, que inclui o subgrupo Kinetoplastea no que encontra-se o agrupamento Metakinetoplastina. Dentro de Metakinetoplastina, localiza-se o subgrupo Trypanosomatida, que inclui os mesmos organismos que a família Trypanosomatidae na taxonomia tradicional (1).

O *T. cruzi* possui uma extensa variedade genética, consequência da grande diversidade biológica, associada à sua distribuição geográfica, ao amplo número de mamíferos que podem infectar, e à diferença das manifestações clínicas. Baseado na análise das sequências dos genes de RNA ribossômico observou-se que *T. cruzi* podia ser classificado em seis grupos denominados Unidades de Determinação Taxonômicas (UDTs), numerados com algarismos romanos de I a VI (2).

Existem aproximadamente 10 milhões de pessoas infectadas nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos ao sul da Argentina e Chile, e estima-se que um 30 a 40% desenvolvem os sintomas mais graves desta enfermidade (3). Cerca de 25 milhões de pessoas estão morando em áreas de risco de infecção, e correm por ano aproximadamente 40 mil novos casos e, 12 mil mortes devido a complicações cardíacas e digestivas (4), representando um grave problema de saúde pública para as áreas endêmicas.

Figura 1: Panorama mundial da infecção pelo *T. cruzi*. (5, 6).

A doença de Chagas é transmitida principalmente por via vetorial, sendo os vetores insetos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. A transmissão acontece pelo contato da pele e mucosas com fezes ou urina desses insetos infectados pelo *T. cruzi*. Existem mais de 130 espécies de triatomíneos potencialmente capazes de transmitir a infecção por *T. cruzi*, porém as espécies de maior importância epidemiológica são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (7). Acredita-se que a transmissão vetorial é responsável por 80% dos casos, e estaria estritamente relacionada às condições sócias, econômicas e culturais da população em risco (8). Também existem outras fontes de transmissão, por exemplo, a transmissão por via oral, através de ingestão de alimentos contaminados com fezes do vetor infectado, a qual tornou-se uma rota de transmissão de grande importância epidemiológica no Brasil (9, 10). Outras vias de transmissão incluem a transfusão sanguínea, os transplantes de órgãos, a transmissão congênita e os acidentes de laboratório (11-14).

A infecção pelo *T. cruzi* apresenta uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda é caracterizada por uma parasitemia evidente, com presença do parasita em praticamente todos os órgãos e tecidos do organismo e pela ausência de resposta imune humoral. A fase aguda normalmente é descrita como assintomática. Porém, pode apresentar uma sintomatologia discreta e geralmente inespecífica, que na maioria dos casos passa despercebida pelo paciente. Quando a infecção aguda apresenta sintomas, aparecem uma ou duas semanas após a exposição ao triatomíneo infectado ou poucos meses após a transfusão com sangue contaminado (3). Os sintomas mais frequentes são febre prolongada, mal-estar, distensão do fígado, baço e linfonodos. Pode haver também edema subcutâneo localizado ou generalizado. No caso particular de transmissão vetorial pode-se apresentar um sinal da porta de entrada (chagoma) ou via mucosa ocular (sinal de Romana). As manifestações da fase aguda se resolvem espontaneamente em aproximadamente 90% dos indivíduos infectados, mesmo sem o tratamento com drogas tripanocidas. Porém, em aproximadamente 10% dos casos os sintomas podem ser severos podendo levar o paciente a óbito (15). A maioria dos indivíduos sobrevive à fase aguda e evolui para a fase crônica (16), a qual é caracterizada pelos altos títulos de anticorpos no sangue do paciente e pelo fato de que a parasitemia é inaparente. A fase crônica apresenta-se principalmente nas formas, indeterminada, cardíaca (cardiopatia chagásica crônica) e digestiva. A forma indeterminada ou assintomática é caracterizada pela ausência evidente de lesões teciduais ou mau funcionamento de órgãos. Essa forma da doença pode durar vários meses ou perdurar por toda a vida do paciente. A patologia cardíaca é caracterizada pela miocardite crônica que leva à cardiomegalia, insuficiência cardíaca

congestiva, arritmias e tromboembolismos (17, 18). A forma digestiva consiste na dilatação do esôfago e/ou cólon (megaesôfago e/ou megacólon). Cerca de 70% dos indivíduos infectados apresentam a forma crônica indeterminada, já os 30% restantes desenvolvem uma das formas crônicas sintomáticas da doença (cardíaca e digestiva), as quais podem levar à morte. Assim, a maioria dos indivíduos infectados permanece assintomática durante toda a vida, e somente uma percentagem da população desenvolve os sintomas severos da doença (15, 19). As características de cada fase, assim como o curso da infecção, dependem de diversos fatores ligados ao parasito e ao hospedeiro. Dentre os fatores relacionados ao parasito, podem-se citar a variabilidade genética das cepas, inóculo e virulência; já os fatores relacionados ao hospedeiro são a rota de transmissão, o estado imunológico, idade, sexo e ambiente (20, 21).

Atualmente após mais de 100 anos da sua descoberta, a doença de Chagas ainda representa um desafio no cenário da saúde pública de vários países endêmicos. A quimioterapia disponível para o tratamento da doença esta baseada nas mesmas drogas descobertas há aproximadamente 40 anos atrás: Nifurtimox (NF), distribuído no Brasil com o nome comercial de Lampit® e Benznidazol (Bz), distribuído no Brasil com o nome comercial de Rochagan®. O NF atua via redução do grupo nitro a um radical nitro anion instável, que reage para produzir ânions superóxido altamente tóxicos e peróxido de hidrogênio (22). O Bz parece atuar via modificação de macromoléculas por união covalente de intermediários nitro reduzidos (23). O uso dessas drogas está sujeito a limitações: embora elas sejam claramente efetivas na fase aguda, a atividade antiparasitária na fase crônica ainda é ainda motivo de controvérsia. Além disso, esses compostos mostram efeitos secundários tais como anorexia, náusea, vômito, polineuropatias e raramente convulsões. Também foi descrito que com certa frequência o tratamento induz alergia (usualmente em volta do nono dia) e leucopenia, revisado em (24).

A principal forma de controle da doença faz-se através de ações de combate químico sistemático aos insetos vetores e/ou melhorias habitacionais, complementadas por rigorosa seleção de doadores de sangue. Não há ainda uma forma de prevenir a transmissão do parasito por via congênita, sendo consenso que para esta modalidade a melhor estratégia é a detecção precoce do caso e seu pronto tratamento (25, 26). Devido a que as drogas existentes são insatisfatórias para o tratamento da doença, portanto é necessário validar novos alvos e desenvolver novas drogas terapêuticas que permitam um tratamento mais eficaz da enfermidade.

1.2 O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* apresenta diferentes estágios ao longo do seu ciclo biológico, os quais são caracterizados de acordo as particularidades morfológicas e bioquímicas. Há quatro formas clássicas descritas na literatura: **epimastigota** (forma flagelada, replicativa e não infectiva encontrada majoritariamente no intestino do hospedeiro invertebrado, medem aproximadamente 20-40 µm de comprimento e 2-5 µm de largura), **tripomastigota metaciclíco** (forma flagelada, não replicativa e infectiva que se encontra no hospedeiro invertebrado), **amastigota** (forma aflagelada, que se desenvolve no interior da célula do hospedeiro vertebrado) e **tripomastigota** (forma flagelada, infectiva presentes na circulação sanguínea dos hospedeiros mamíferos) (27). Outras formas evolutivas intermediárias também têm sido descritas ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*. No sangue periférico do mamífero, pode existir uma população pleomórfica de tripomastigotas, constituída de uma mistura de duas morfologias básicas descritas como *slenderebroad* (28). A forma **epimastigota intracelular**, detectada no citoplasma das células infectadas do hospedeiro vertebrado e em culturas de tecidos, aparece de maneira transiente entre os estágios amastigota e tripomastigota (29). Além disso, no intestino médio do inseto, as formas tripomastigotas sanguíneas, durante sua diferenciação em epimastigotas, passam por uma forma intermediária descrita como **esferomastigota** (30, 31).

O ciclo de vida do *T. cruzi* é complexo e, como mencionado, alterna entre um hospedeiro invertebrado, e um hospedeiro vertebrado, (hospedeiro definitivo). O ciclo de vida inicia-se quando os parasitas, presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado infectado, passam ao inseto vetor durante o repasto sanguíneo. No intestino do inseto, estas formas se diferenciam em formas epimastigotas (32), que após multiplicação por fissão binária colonizam a porção terminal do intestino e se diferenciam novamente em tripomastigotas metacíclicos. Quando o inseto infectado pica o hospedeiro vertebrado e inicia o repasto sanguíneo, concomitantemente elimina as formas tripomastigotas metacíclicos junto com as fezes e urina. Uma vez em contato com a pele ou mucosas do hospedeiro mamífero, os tripomastigotas são internalizados através de pequenas lesões na pele, causadas pelo próprio hospedeiro (33). Os tripomastigotas invadem as células do hospedeiro mamífero e se diferenciam em formas replicativas denominadas amastigotas, estabelecendo assim a infecção. Após aproximadamente 96 horas, os amastigotas começam a se diferenciar em tripomastigotas, passando pela forma intermediária epimastigota intracelular. Estas formas tripomastigotas são liberadas na corrente sanguínea podendo invadir novas células ou serem

ingeridas pelo inseto vetor em um novo repasto sanguíneo, fechando assim o seu ciclo de vida. O esquema do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi* está representado na **figura 2**.

Figura 2: Representação esquemática do ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. O ciclo de vida que alterna entre um hospedeiro invertebrado (hemípteros hematófagos da família Reduviidae) e um hospedeiro vertebrado. Formas descritas no ciclo: tripomastigota; epimastigota; tripomastigota metacíclico; amastigota; *epimastigota-like*. Adaptado de (34).

O sucesso da sobrevivência deste parasita nos diferentes ambientes pelos quais transita ao longo do seu ciclo de vida (o trato digestivo do inseto vetor, a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, e o citoplasma das células), depende de sua habilidade de manter a homeostase intracelular de íons e nutrientes e, da sua capacidade de catabolizar diferentes substratos para a obtenção de energia. Por tanto a atividade dos transportadores para a captação de solutos através da membrana citoplasmática do parasita e, do metabolismo de diferentes nutrientes são processos cruciais para a sua sobrevivência.

1.3 *T. cruzi* e o metabolismo dos aminoácidos

Sabe-se que os tripanossomatídeos são capazes de metabolizar tanto hidratos de carbono quanto aminoácidos, neste último caso com produção de amônio (35). Tem sido demonstrado que a prolina, o glutamato e o aspartato, são utilizados pelo *T. cruzi* como fonte

energética e de obtenção de outros metabólitos (36-39). Leucina e isoleucina, glutamina e asparagina tem participação também no metabolismo energético (40, 41), sendo que esses aminoácidos podem ser convertidos a aspartato ou glutamato e incorporados ao Ciclo de Krebs, após deaminação, na mitocôndria (42).

Os aminoácidos desempenham um papel relevante e participam no metabolismo dos tripanosomatídeos. A arginina atua na administração dos recursos energéticos da célula ao ser substrato da enzima arginina quinase, de forma análoga à participação da creatina e a creatina quinase em mamíferos (43, 44). Outros aminoácidos como a glicina, alanina, prolina e glutamato foram propostos como participantes na regulação do volume da célula, evitando desajustes osmóticos (45). Sabe-se ainda que a prolina, o glutamato e o aspartato são aminoácidos promotores da metaciclogênese em *T. cruzi* (46). Têm-se relatado diferentes funções da prolina na biologia do parasita, dentre eles a capacidade de induzir a diferenciação de formas intracelulares de *T. cruzi* (39). O acúmulo desse aminoácido está relacionado com a resistência ao estresse oxidativo (38) e também como fonte de energia para os tripomastigotas metacíclicos durante o processo de invasão das células do hospedeiro mamífero (37, 47). Em síntese nota-se a importância dos múltiplos papéis dos aminoácidos e consequentemente de seus reguladores na manutenção e sobrevivência do *T. cruzi*. Diante disso, torna-se visível a necessidade da caracterização das vias metabólicas envolvidas nos processos de síntese, degradação e regulação dos aminoácidos, assim como seu papel nos diferentes processos biológicos ao longo do ciclo de vida do parasita, possibilitando o entendimento da biologia do mesmo e, possibilitar a abordagem de novas estratégias terapêuticas de maneira mais eficiente e direcionada.

1.4 Asparagina, aspartato e os aspectos gerais de seu metabolismo

A L-Asparagina foi o primeiro aminoácido a ser detectado e isolado em forma de cristal. A asparagina é um α aminoácido não essencial, que pode ser sintetizado a partir de intermediários de uma rota metabólica principal, e.g., a partir de aspartato. Portanto, este aminoácido está diretamente relacionado à asparagina, uma vez que, é facilmente hidrolizada e convertida a aspartato. A asparagina é importante na síntese de proteínas, dado que a partir da sua cadeia lateral podem-se formar ligações de hidrogênio com o esqueleto peptídico das mesmas. Os resíduos da asparagina, em geral, encontram-se no início e ao final da estrutura das α hélices, e estão envolvidas ou presas em lamina β . Tal conformação contribui com a formação das ligações de hidrogênio, portanto, acredita-se que a asparagina tem um papel

relevante na estrutura terciária das proteínas, "*capturando*" o hidrogênio. A asparagina também fornece pontos-chave para a modificação e glicosilação das proteínas (48). Em geral, existem duas fontes de asparagina nos organismos: através da incorporação do meio extracelular ou através da sua biossíntese. A biossíntese acontece pela atividade da enzima asparagina sintetase (AS). Em células eucarióticas, os mecanismos pelos quais é regulada a síntese, utilização e degradação da L-asparagina são chave para o crescimento e o desenvolvimento das células. Em plantas, especialmente em legumes, sua síntese, transporte e degradação apresentam um papel na fixação e assimilação do N_2 e é responsável pela translocação de 50 a 70 % do amônio através de canais de transporte (49). Em células de mamífero, os processos que envolvem a indução e continuidade da mitose são inibidos, ou atrasados, pela ausência da L-asparagina. O fato de que a expressão de AS é modulada em resposta a diferentes tipos de estresse, incluindo, o estresse salino, a exposição a herbicidas tóxicos e a infecção por bactérias, permite inferir a participação dessa enzima e/ou seus produtos na resposta celular a esses desafios (50). Em células de mamíferos, assim como em plantas, foi demonstrado também, que a AS está envolvida na resistência ao estresse nutricional (51). Encontram-se dois tipos de AS, AS-A e AS-B, codificadas pelos genes *asnA* e *asnB*, respectivamente. AS-A tem sido reportada em archaea (52), procariotos (53), no protozoário *Leishmania* (54), e recentemente nos parasitas *Trypanosoma brucei*, e *T. cruzi* (55). Os dois tipos de AS catalisam a conversão, dependente de ATP, do aspartato à asparagina. AS-A utiliza estritamente o amônio como doador de nitrogênio (56). Esta enzima existe em forma de dímero, no qual cada monômero tem um núcleo de oito folhas β flanqueado por hélices α semelhantes aos domínios classe II aminoacil-tRNA sintetases, e sintetiza a asparagina em dois passos: o grupo β -carboxilato do aspartato, primeiramente é ativado pelo ATP para a formação do aminoacil-AMP, seguido pela aminação através do ataque nucleofílico do íon amônio (52). Entre tanto, a AS-B codifica para as sequências que estão presentes em procariotos (57), e também em alguns eucariotos, incluindo mamíferos (58), leveduras (59), algas (60) e plantas superiores (61). A AS-B pode usar tanto amônio como glutamina como doadores de nitrogênio (56). Esta enzima também encontra-se em forma de dímero, mas cada monômero possui dois domínios diferentes; cada um com um sítio catalítico. O extremo N-terminal catalisa a liberação do amônio da glutamina, necessário para que a reação ocorra, enquanto o aspartato reage junto com o ATP no sítio C-terminal, gerando o intermediário β -aspartil-AMP (62, 63). Semelhante às amidotransferases dependentes de glutamina, o amônio é liberado no domínio N-terminal da enzima viajando através de um túnel intramolecular que conecta os sítios ativos (64).

1.5 Metabolismo de asparagina e aspartato no *Trypanosoma cruzi*

Como mencionado anteriormente, o aspartato é metabolizado por *T. cruzi* (41), podendo fornecer -NH_2 para a síntese de glutamato via transaminação, rendendo oxaloacetato e dessa forma ser processado pelo Ciclo de Krebs (65). Essa reação de transaminação do aspartato para o α -cetoglutarato é catalisada pela aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1), originando glutamato e oxaloacetato (66). Essa reação é um dos passos fundamentais no equilíbrio entre aminoácidos e intermediários do ciclo de Krebs na célula, revisado por (42). Mais recentemente, Marciano e col. 2008 (65), através de clonagem e expressão heteróloga, demonstraram que existem duas isoformas da aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1) em *T. cruzi*, a citoplasmática que é expressa constitutivamente e é capaz de transaminar aminoácidos aromáticos e dicarboxílicos, e a mitocondrial que é expressa nas fases presentes no hospedeiro vertebrado e apresenta uma especificidade para o substrato L-aspartato/2-oxoglutarato. Devido à reversibilidade das reações de transaminação, toda fonte de glutamato (como por exemplo, prolina ou histidina), poderá render aspartato. A captação de L-aspartato foi relatada em formas epimastigotas e tripomastigotas acontecendo através de um sistema de transporte de alta afinidade bioquimicamente similar ao de epimastigotas (67).

Embora seja reconhecida a relevância do metabolismo de aspartato para a biologia de *T. cruzi*, poucas enzimas dessa via tem sido clonadas e caracterizadas até agora: a aspartato carbamoiltransferase (EC 2.1.3.2), que produz aspartato a partir de carbamoil fosfato e L-aspartato, reação constitui o segundo passo na síntese *de novo* de pirimidinas, e a asparagina sintetase (EC:6.3.1.1), que catalisa a conversão do aspartato a asparagina usando amônio como fonte de nitrogênio. Por outro lado, têm sido descritas outras duas enzimas relacionadas com o metabolismo de aspartato em *T. cruzi*: a aspartato aminotransferase (EC 2.6.1.1), que representa o passo final do reciclado de metionina; e a adenilsuccinato sintetase (EC 6.3.4.4), que catalisa a condensação de aspartato com IMP para render adenilsuccinato (68), revisado (67).

A pesar de não existirem dados bioquímicos sustentando a presença de uma asparaginase, tem se encontrado duas ORFs no genoma de *T. cruzi*, que codificam para uma asparaginase putativa (*T. cruzi* genome initiative at the Sanger Center systematic names Tc00.1047053504147.110 and Tc00.1047053510823.80), enzima catalisa a conversão de asparagina ao aspartato.

ASPARTATE METABOLISM

Figura 3:Representação esquemática do metabolismo de aspartato no *T. cruzi*. Os números de EC correspondem a: aspartato carbamoiltransferase (2.1.3.2), aspartato aminotransferase (2.6.1.1), asparaginase (3.5.1.1), adenilsuccinato liase (4.3.2.2), aspartato–amonialiasa (asparagina sintetase) (6.3.1.1) e adenilsuccinato sintetase (6.3.4.4) (67).

Nas últimas décadas, avanços significativos em relação aos processos moleculares e bioquímicos do *T. cruzi* vêm sendo realizados, contribuindo assim para uma melhor elucidação dos mecanismos próprios de sua biologia. Porém, a doença de Chagas é ainda considerada uma das grandes doenças negligenciadas, tornando-se crucial uma melhor compreensão de suas vias metabólicas para propor novos alvos terapêuticos. A partir das informações apresentadas, e os dados relatados na literatura referente aos diferentes papéis biológicos da asparagina em diferentes organismos, propõe-se que a asparagina poderia assumir múltiplas funções ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*.

2.1 Objetivo geral

Estudar a relevância da L-asparagina no metabolismo, diferenciação e resistência a diferentes estresses em *Trypanosoma cruzi*.

2.2 Objetivos específicos

- Determinar o papel da L-asparagina na resistência aos estresses térmico, nutricional e oxidativo em formas epimastigota do *Trypanosoma cruzi*;
- analisar a relevância da L-asparagina no metabolismo das formas epimastigotas e, na sua diferenciação de para formas tripomastigotas metacíclicos;
- avaliar o efeito da produção dos análogos selecionados sobre a proliferação das formas epimastigota do *Trypanosoma cruzi*, na progressão do ciclo de vida nos diferentes estágios parasitários, com ênfase nos estágios correspondentes ao ciclo de infecção em mamíferos (amastigotas e tripomastigotas).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Manutenção e crescimento das células e microrganismos utilizados no trabalho

3.1.1 Bactérias

As cepas de *E.coli* utilizados foram XL1 Blue para as clonagens, e BL21-codon plus para a expressão da proteína recombinante.

3.1.1.1 Manutenção das bactérias

As bacterias utilizadas foram crescidas a 37 °C em meio LB (triptona 10 g/L, extrato de levedura 5g/L e NaCl 10 g/L, com pH de 7,5) líquido ou sólido, suplementadas quando necessário com os antibióticos kanamicina (30 mg/mL) e tetraciclina (5 mg/ml) para seleção de colônias portadoras de plasmídeo com os genes de resistência correspondentes, 20 µg/mL de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil β-galactopiranosídeo) e 1 mM de IPTG (Isopropil β-galactopiranosídeo) para seleção de colônias pelo método da avaliação da integridade do gene da β-galactosidase (colônicas brancas vs. azuis).

3.1.2 Células hospedeiras

Células da linhagem CHO-K₁ (*Chinese Hamster Ovary*).

3.1.2.1 Manutenção das células hospedeiras

Células da linhagem CHO-K₁, foram cultivadas a 37 °C em meio RPMI 1640 (*Roswell Park Memorial Institute*), acrescido com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), 0,15% (m/v) de NaHCO₃, sob atmosfera úmida a 5% de CO₂ (39).

3.1.3 Trypanosoma cruzi

Ao longo do trabalho foi utilizada a cepa CL, clone 14 (69).

3.1.3.1 Formas epimastigotas

As formas epimastigotas foram mantidas em fase exponencial de crescimento por passagens sucessivas (cada 48 horas) em meio LIT (*Liver Infusion-Tryptose*) que contém

infusão de fígado 5,0 g/L, Triptose 5,0 g/L, NaCl 4,0 g/L, KCL 0,4 g/L, Na₂HPO₄ 8,0 g/L, glicose 2 g/L, hemina 10 g/L suplementado com 10% de SBF, pH 7,2; a 28 °C (70).

3.1.3.2 Formas tripomastigotas

As células CHO-K₁ foram infectadas com 3.0×10^7 tripomastigotas por garrafa (75 cm²) em meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB. Os parasitas ficaram em contato com as células durante 4 horas, mantidas a 37 °C, sob atmosfera úmida com 5% de CO₂, como descrito por (39). Após esse período as células foram lavadas duas vezes com PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e acrescidas de meio RPMI 1640 contendo 10% de SFB e incubadas a 37 °C. Após 12 horas as células foram lavadas com PBS, acrescidas de meio RPMI 1640 (2% SFB) e incubadas a 33 °C. Os parasitas foram coletados no quinto, sexto e sétimo dia pós-infecção, contados na câmara de Neubauer e utilizados em experimentos posteriores.

3.2 Avaliação da produção do β-aspartilhidroxamanto, análogo da asparagina

3.2.1 Produção da asparagina sintetase recombinante (ASr)

3.2.1.1 Clonagem do gene putativo da AS-A de *Trypanosoma cruzi*

A sequência do gene putativo da AS-A encontra-se depositada no banco de dados do genoma de *T. cruzi* do Sanger Center (www.genedb.org). Duas sequências apresentando fases de leitura abertas compatíveis com outras AS-As (números sistemáticos: Tc00.1047053503625.10 e Tc00.1047053503899.90) foram selecionadas para análise. Ambas resultaram idênticas quanto ao conteúdo de aminoácidos; portanto escolheu-se, aleatoriamente a primeira delas. Com base na sequência gênica da AS-A encontrada, foram desenhados e sintetizados oligonucleotídeos incluindo os codons de início e fim da tradução, assim como sítios de clivagem para as endonucleases de restrição *Hind III* e *Xho I* (**Tabela 1**).

Tabela 1: Iniciadores específicos para TcAS-A.

<i>Iniciadores</i>	<i>Sequências</i>
ASdireto	5'- TTAAGCTTGCATGACATCGGGAGATCCTGCG -3'
AS reverso	5'- TTCTCGAGTCACAGCAAGGGATAATTCTGG -3'

3.2.1.2 Amplificação de DNA por reação em cadeia da polimerase (PCR)

Nas PCRs foram usados 100 ng de DNA, 10 mM dNTPs, 2,0 mM MgCl₂ e 1 U da enzima Taq DNA polimerase (*Fermentas*®). As condições de amplificação compreenderam 34 ciclos, com desnaturação inicial por 3 minutos, desnaturação a 95°C por 1 minuto, anelamento a 65,8°C por 1 minuto e extensão a 72°C por 40 segundos, além de uma extensão final a 72°C durante 10 minutos. O produto de PCR obtido foi precipitado com 2 volumes de etanol absoluto e 2% de LiCl 5M, para posteriormente ser clonado em vetor pGEM-T Easy® (*PROMEGA*), segundo indicações do fabricante. As construções obtidas foram confirmadas por sequenciamento.

3.2.1.3 Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo Método de Sanger (71), utilizando os oligonucleotídeos T7 e M13 direto e reverso, e o kit de sequenciamento de DNA BigDye™ 3.1 (*Applied Biosystems*) segundo instruções do fabricante. As reações foram resolvidas num sequenciador automático ABI 3100 (*Applied Biosystems*). Os alinhamentos e comparações entre as sequências foram realizados mediante o uso dos programas, BLAST versão 2.2.29 (NCBI), BioEdit versão 7.0.0 e Multiple Sequence Alignment Clustal W2, utilizando os parâmetros padrão.

3.2.1.4 Preparação de bactérias quimiocompetentes

Uma colônia isolada de bactéria (*E. coli* XL1 Blue ou BL21-Codon Plus (DE3)) foi inoculada em 3 mL de meio LB na ausência de antibiótico e mantida a 37 °C por 12 horas com agitação (150 rpm). Após 12 horas, a cultura crescida foi diluída 1:100 em meio LB e incubada nas mesmas condições anteriores até atingir uma densidade óptica a 600 nm entre 0,5 e 0,6. As células foram então coletadas por centrifugação a 4.000 RPM (rotor A-4-62 *epENDORF 5810 R*) por 10 minutos a 4 °C. O sedimento obtido foi homogeneizado em 50 mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1 M e incubado por aproximadamente 1 hora em gelo. Logo após a suspensão celular foi centrifugada a 4.000 RPM (rotor A-4-62 *epENDORF 5810 R*), por 15 minutos a 4 °C e o sedimento homogeneizado com 2 mL de solução gelada de CaCl₂ 0,1 M. As células competentes foram usadas imediatamente ou estocadas a -80 °C em glicerol 20% (v/v) Modificado do (72).

3.2.1.5 Transformação de bactérias competentes

As células competentes foram incubadas com o DNA plasmidial ou produtos de ligações por 30 minutos. Em seguida as células foram submetidas a choque térmico (42 °C por 2 minutos) e imediatamente incubadas em gelo por mais 15 minutos. Após a recuperação das células em meio SOC por 1 hora a 37 °C sob agitação (150 rpm) (72), as bactérias foram plaqueadas em meio LB sólido contendo o respectivo antibiótico e/ou IPTG e X-gal para seleção das colônias recombinantes.

Os DNAs plasmidiais dos clones obtidos nas transformações de *E. coli*, foram extraídos e purificados seguindo as recomendações do fabricante, utilizando kit comercial (*PureLink™ Quick Plasmid Miniprep; Invitrogen®*). A integridade do DNA foi confirmada mediante eletroforese em gel de agarose 1% .

3.2.1.6 Subclonagem no vector de expressão pET-28 a (+)

As reações de digestão do DNA foram realizadas com as endonucleases de restrição adequadas segundo as especificações e tampões recomendados pelos fabricantes (*Fermentas®*). Nas reações foram utilizadas 1 unidade de enzima para cada µg de DNA. A mistura de reação foi incubada por 2 horas a 37 °C e posteriormente as enzimas foram inativadas por calor a 60 °C durante 20 min. A purificação de fragmentos de DNA obtidos foi realizada mediante precipitação com 2% LiCL 5 Mm e etanol absoluto (72). Nas reações de ligação foram usados o vetor e o fragmento de DNA digeridos com enzimas compatíveis, empregando-se uma razão molar inserto:vetor de 4:1, e 1U/µl de T4 DNA ligase (*Fermentas®*). A mistura de ligação foi incubada a temperatura ambiente por 5 a 20 minutos.

3.2.1.7 Expressão das proteínas recombinantes em *E. coli*

O gene da AS-A foi subclonado no vetor pET-28a (+) para expressão em *E. coli* linhagem BL21-codon plus. Para isso, as bactérias contendo o plasmídeo foram crescidas a 37 °C em meio LB com kanamicina (30 mg/ml) e tetraciclina (5 mg/ml) por 16 horas, diluído 1:100 no mesmo meio, e incubado a 37 °C sob agitação (150 rpm) até uma densidade óptica (DO) de 0,5. Em testes preliminares, em um volume de 25 ml, a expressão da proteína recombinante foi induzida com 0,5 mM IPTG a 20 °C por 16 horas, a 30 °C por 5 horas e a 37 °C por 5 horas. Após centrifugação, as amostras foram suspensas em 100 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE 1X (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2,3%, glicerol 10%, azul de

bromofenol 0,01%, 20 mM mercaptoetanol). As amostras foram aquecidas à 90°C por 10 minutos e aplicadas em gel SDS-PAGE 10% como descrito. Os géis foram corados com uma solução de *Coomassie Brilliant Blue* por 30 minutos e descorados em ácido acético 10% por 30 minutos. Com base nos resultados dos testes preliminares e com o objetivo de otimizar a expressão da proteína em forma solúvel, padronizou-se a expressão da seguinte maneira:

Tabela2: Condições de sobreexpressão da ASr.

Volumen de cultura	1000 ml
Temperatura	20 °C
Tempo de indução	16 horas
Agitação	170 rpm
Concetração de IPTG	0,5 mM

3.2.1.8 Purificação da AS recombinante

As construções realizadas foram desenhadas para se obter proteínas recombinantes possuindo 6-histidinas no extremo N-terminal (vetor pET-28a (+)).

Figura 4: Construção de AS recombinante. A Esquema da construção de expressão pET28/asn, B. Esquema da AS recombinante.

Isso permite a purificação dessas proteínas num único passo em coluna de afinidade de Ni-NTA agarose (*Qiagen*®). Os procedimentos de purificação foram realizados a partir de extratos provenientes de culturas de bactérias crescidas e induzidas nas condições

mencionadas acima. As culturas pós-indução foram centrifugadas a 4.000 RPM (rotor JA-14 *Beckman*) por 15 minutos à 4 °C e os sedimentos homogeneizados em tampão de ligação 1X (Tris-HCL 20 mM; 500 mM NaCl e 5 mM de imidazol pH 7,9), acrescidos de 1 mg/ml de lisozima, e os inibidores de proteasas: E-64 0,04 mM, PMSF 1 mM e TLCK 10 µg/ml. Em seguida, as células foram submetidas à lise por sonicação em gelo com 5 pulsos de 30 segundos a 20% de potência com intervalos de descanso de 30 segundos entre os pulsos. Após a sonicação, foi realizada a centrifugação a 12.000 RPM (rotor 5424R *Eppendorf*) por 30 minutos à 4 °C, separando-se a fração solúvel (sobrenadante) da insolúvel (precipitado). A fração solúvel foi utilizada para dar continuidade à purificação. A coluna foi previamente equilibrada com 5 volumes de coluna (V) de tampão de *binding* 1X. O sobrenadante foi então aplicado à coluna, seguido de lavagem com 10 V de tampão de *binding* 1X e 6V de tampão de lavagem 1X (Tris-HCL 20 mM; 500 mM NaCl e 60 mM de imidazol pH 7,9) . A proteína recombinante foi eluída com 6 V de tampão de eluição (Tris-HCL 20 mM; 100 mM NaCl e 100 mM de imidazol pH 7,9). As proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (73), e posteriormente, as frações obtidas foram analisadas em gel SDS-PAGE 12%.

3.2.1.9 Western blotting

As frações proteicas obtidas no item 3.2.1.7 foram separadas eletroforéticamente em géis de poliacrilamida 12% (SDS-PAGE), foram transferidas para membranas de nitrocelulose (*Supported Nitrocellulose Membrane, Bio-Rad*) utilizando o sistema Trans-Blot Semi-Dry Transfer Cell (*Bio-Rad*) (74). Após a transferência, as membranas foram coradas com Ponceau S (0,1% diluído em ácido acético 10%) e descoradas com água para verificação da eficiência do processo de transferência. As membranas foram bloqueadas por 1 hora em solução PBS 1X-Tween-20 0,3% contendo 5% de leite desnatado. Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com o anticorpo primário *anti-His* feito em camundongo (1:1.000) sob leve agitação, por 90 minutos à temperatura ambiente e depois lavadas três vezes por 5 minutos com PBS-T. Procedeu-se então as incubações durante 45 minutos com o anticorpo secundário, conjugado a HRP (1:15.000) (*horseradish peroxidase-GE Healthcare*), seguido de nova lavagem como acima descrito. Após as lavagens, os ensaios foram revelados por quimiluminescência usando o reagente *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific*, de acordo com o manual do fabricante.

3.2.2 Produção do análogo da asparagina

A enzima responsável pela produção da asparagina é a asparagina sintetase (AS), que fornece asparagina pela aminidação do aspartato, usando o NH_4^+ , como fonte de nitrogênio. A partir da AS recombinante foi avaliada a utilização da NH_2OH como precursor do análogo da asparagina, o β -Aspartilhidroxamato, como se indica na seguinte reação (56).

Figura 5: Reação enzimática da ASr usando como substrato a NH_2OH , para a produção do análogo de asparagina.

3.3 Avaliação da proliferação celular

3.3.1 Curvas de crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizadas formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial (5.0 a 6.0×10^7 células mL^{-1}). As células foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos ou não (controle negativo). Como controle positivo de inibição foi utilizado uma combinação de Rotenona ($60 \mu\text{M}$) e Antimicina ($0,5 \mu\text{M}$). As formas ($2,5 \times 10^6$ células mL^{-1}) foram transferidas para placas de cultura de 96 poços ($200 \mu\text{l}$ /poço). As placas foram mantidas na estufa a 28°C . A proliferação celular foi estimada por leitura da absorbância da densidade ótica (DO) em λ 620 nm durante 8 dias. A absorbância foi transformada em valores de densidade celular (células/mL) usando uma equação de regressão linear que foi obtida previamente sob as mesmas condições. A concentração do fármaco que inibiu 50% da proliferação dos parasitas (IC_{50}) foi determinada na fase exponencial de crescimento (quinto dia) mediante ajuste dos dados na curva dose-resposta com a equação clássica sigmóide (75). Cada composto foi avaliado em quadruplicata em cada experimento, sendo que os resultados apresentados correspondem a três experimentos independentes.

3.3.2 Avaliação da divisão celular em formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial (5.0 a 6.0×10^7 células mL^{-1}) foram tratadas com a concentração correspondente ao IC_{50} de hidroxilamina, ou não (controle negativo). As formas ($2,5 \times 10^6$ células mL^{-1}), foram transferidas a garrafas de 15 mL , incubadas com $1,5 \text{ mM}$ de carboxifluoresceína succinimidil ester (CFSE) (CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit Live technologies™), a 28°C , protegidas da luz. O estado de divisão celular foi estimado por leitura da fluorescência emitida pela CFSE no primeiro, terceiro e quinto dia de tratamento, conforme instruções do fabricante. Brevemente, foram analisadas 1×10^6 células de cada dia do ensaio, as quais foram lavadas duas vezes com PBS 1X e resuspensas em $500 \mu\text{L}$ do mesmo tampão, para prosseguir as leituras por citometria de fluxo, no equipamento Guavacytometer (General Electric).

3.4 Avaliação do tipo de morte celular em parasitas tratados

3.4.1 Avaliação da exposição de fosfatidilserina na membrana do parasita

Formas epimastigota (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram cultivadas em meio LIT a 28°C e tratadas com a concentração correspondente ao IC_{50} de hidroxilamina, determinado nas curvas de crescimento dos parasitas. Parasitas tratados com estaurosporina ($1 \mu\text{M}$), 16 horas antes da realização do ensaio, foram utilizados como controle positivo para apoptose. O controle positivo para necrose foi realizado incubando os parasitas durante 30 minutos na presença de $150 \mu\text{M}$ de digitonina e $1 \mu\text{g/mL}$ de iodeto de propídio (IP). No quinto dia após o início do tratamento 1.0×10^6 células mL^{-1} de cada tratamento, como também dos controles, foram lavadas uma vez com o tampão de anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e $2,5 \text{ mM}$ CaCl_2 , pH 7.4) e resuspensos em $50 \mu\text{L}$ do mesmo tampão. Os parasitas foram incubados em gelo e protegidos da luz, por 15 minutos, na presença de anexina-V FITC (Invitrogen®, Eugene, Oregon, USA), conforme instruções do fabricante, e IP ($1 \mu\text{g/mL}$). Após esse período os parasitas foram lavados uma vez com o tampão de anexina e resuspensos em $500 \mu\text{L}$ do mesmo tampão, os parasitas foram analisados por citometria de fluxo, no equipamento Guavacytometer (General Electric) (76).

3.5 Análises do efeito dos compostos no ciclo intracelular do *Trypanosoma cruzi*

3.5.1 Toxicidade em células de mamíferos

A toxicidade da hidroxilamina em células de mamíferos foi avaliada incubando células CHO-K₁ ($5,0 \times 10^5$ células por poço) em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com SFB (10%) na presença de diferentes concentrações do composto ou não (controle). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada 48 horas após o início do tratamento utilizando-se o método de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tretazoliobromide) (77). As células foram lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se em cada poço 300 µl de PBS e 60 µl MTT (5 mg/mL). As placas foram incubadas a 37 °C durante 3 horas (protegidas da luz). A reação foi interrompida com a adição de 200 µl de SDS 10%. A viabilidade das células foi observada mediante o aparecimento da cor azul de formazan. As placas foram lidas em espectofotômetro de placa utilizando-se λ 595 nm e como referência λ 690 nm. O valor IC₅₀ foi determinado pelo ajuste dos dados em uma equação sigmoidal dose-resposta.

3.5.2 Análise do efeito da hidroxilamina durante o ciclo intracelular

Células CHO-K₁ ($5,0 \times 10^4$ células por poço) foram mantidas em placas de 24 poços em meio RPMI 10% SFB a 37 °C. Após 24 horas, quando já estavam aderidas à placa, as células foram infectadas com formas tripomastigotas ($2,5 \times 10^6$ por poço). Os parasitas ficaram em contato com as células por um período de quatro horas. Após esse período os parasitas que ainda estavam no sobrenadante foram removidos. As células foram lavadas duas vezes com PBS, adicionou-se meio RPMI 10% SFB e diferentes concentrações de hidroxilamina ou não (controle). A placa foi mantida na estufa a 37 °C por 16 horas. Após esse período o meio RPMI 10% foi substituído por RPMI 2% de SFB e a temperatura alterada de 37 °C para 33 °C. A placa foi mantida a 33 °C e no quinto dia pós-infecção os tripomastigotas que estavam no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer.

3.6 Resistência a diferentes tipos de estresse

3.6.1 Ensaio de estresse nutricional em formas epimastigotas

Para avaliar a participação da asparagina, no estresse nutricional, os parasitas foram lavados duas vezes com PBS, ressuspensos em 1mL de PBS e tratados com os diferentes metabólitos a 3 mM de concentração final, ou não (controle negativo). Como controle positivo de viabilidade foi utilizado glicose e prolina, e posteriormente foram incubados por 24 horas a 28 °C. Após esse tempo a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o método de MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tretazolio bromide) (77). Os parasitas foram lavados duas vezes com PBS, transferidos para placa de 96 poços, (100 µl por poço) e então adicionou-se 20 µl MTT (5mg/mL) a cada poço. As placas foram incubadas a 28°C durante 3 horas (protegidas da luz). A reação foi interrompida com a adição de 100 µl de SDS 10%. A viabilidade das células foi observada mediante o aparecimento da cor azul formazan. As placas foram lidas em espectrofotômetro de placa utilizando-se λ 595 nm e como referência λ 690 nm.

3.6.2 Ensaio de estresse térmico em formas epimastigotas

Os ensaios foram realizados conforme descrito na seção 3.5.1, modificando-se apenas a temperatura de incubação. As placas foram mantidas na estufa a 28 °C, 33 °C e 37 °C (38).

3.6.3 Ensaio de estresse oxidativo em formas epimastigotas

Inicialmente foi determinado o valor de IC₅₀ para H₂O₂ nas formas epimastigotas de *T. cruzi*. Para isso, os parasitas (3.0×10^7 parasitas mL⁻¹) foram lavados duas vezes com PBS e incubados em PBS com diferentes concentrações de H₂O₂ (10 a 100 µM) durante 60 minutos a 28 °C, sob agitação constante. Após esse tempo, a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o método de MTT (77), e foi então calculado o valor correspondente a o IC₅₀, o qual foi utilizado posteriormente nos ensaios de estresse oxidativo. A fim de avaliar um possível efeito protetivo da asparagina e do aspartato no parasita sob estresse oxidativo, os parasitas foram lavados duas vezes com PBS, ressuspensos em PBS com a concentração de H₂O₂ correspondente ao IC₅₀ determinado anteriormente, e incubados por 1 hora a 28 °C, em agitação constante. Em seguida foram centrifugados, ressuspensos em 1mL de PBS e incubados com os diferentes metabólitos a 3 mM de concentração final. Como controle

positivo de viabilidade foi utilizado glicose e meio LIT. Posteriormente os parasitas foram incubados por 24 horas a 28 °C. Então, após esse período de incubação a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o método de MTT (77).

3.7 Avaliação do papel da asparagina na recuperação dos níveis de ATP intracelular em formas epimastigotas

Formas epimastigotas de *T. cruzi* em fase de crescimento exponencial (5.0 a 6.0×10^7 células mL^{-1}), foram mantidos em PBS por 24h a 28°C. Após esse período os parasitas foram incubados na presença de prolina, glicose, ácido L-aspártico, L-asparagina (3 mM concentração final), PBS ou LIT. Para avaliar os níveis de ATP intracelular, utilizamos o kit bioluminescente para células somáticas, da Sigma-Aldrich (*Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA*) conforme instruções do fabricante. Brevemente, 50 μL de PBS foram adicionados a 100 μL do reagente de lise e acrescentou-se 50 μL da suspensão de parasitas contendo 5.0×10^6 células mL^{-1} . A concentração de ATP foi determinada pela curva padrão realizada com diferentes concentrações do mesmo. A luminescência foi obtida pela reação entre a luciferase e o ATP que foi liberado após a lise celular, sendo determinada pela utilização do luminômetro, a uma leitura de λ 570 nm (47). Os dados obtidos foram normalizados pela concentração de proteínas em cada amostra.

3.8 Efeito da asparagina sobre a metaciclogênese

3.8.1 Diferenciação *in vitro*

Formas epimastigotas (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram cultivadas em meio LIT a 28 °C e após quatro dias, foram lavadas duas vezes em meio TAU (*Artificial Triatomine Urinemedium*), (190 mM NaCl, 8 mM tampão fosfato pH 6.0, 17 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 2 mM MgCl_2) (46), e incubadas no mesmo meio por duas horas a 28 °C. Em seguida, os parasitas foram transferidos para meio TAU 3AAG (meio TAU suplementado com 10 mM glicose, 2 mM ácido aspártico, 50 mM ácido glutâmico, e 10 mM L-prolina). A determinação das formas metacíclicas foi feita por contagem diária na câmara de Neubauer ao longo dos seis dias.

Calculado o ponto máximo de diferenciação, prateou-se a avaliar o efeito dos diferentes aminoácidos em este processo. Para isto as formas epimastigotas (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram novamente cultivadas em meio LIT a 28 °C e após quatro dias, foram lavadas

duas vezes em meio TAU e incubadas no mesmo meio por duas horas a 28 °C. Em seguida, os parasitas (5.0×10^6 células mL^{-1}) foram transferidos para placas de 24 poços contendo meio TAU suplementado com diferentes aminoácidos em ensaios isolados (L-prolina, ácido aspártico ou L-asparagina), na concentração final de 10 mM. Como controle positivo da diferenciação foi utilizado o meio TAU 3AAG. A diferenciação foi avaliada no quinto dia (ponto máximo de diferenciação). A porcentagem de formas metacíclicas em relação ao número total de parasitas (formas epimastigotas + formas metacíclicas) foi avaliada, por citometria de fluxo, analisando a exposição da molécula gp82 nas formas metacíclicas.

3.8.2 Análise da influência da asparagina na metaciclogênese por citometria de fluxo

Os tripomastigotas metacíclicos de diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi* expressam diferentes moléculas de superfície para a invasão das células do hospedeiro. A família das gp82 são um grupo de moléculas de adesão celular, que tem um papel chave no processo de invasão celular (78). Em a cepa CL de *T. cruzi* a molécula de superfície gp82 é estágio específica, presente só nas formas tripomastigotas metacíclicas, e é identificada pelo anticorpo monoclonal 3F6 (MAb 3F6) (79) revisado por (80).

Baseados em estas informações, partiu-se ao análise da expressão do antígeno gp82, para assim conseguir distinguir as formas epimastigotas, das formas tripomastigotas metacíclicas a través da detecção da expressão diferencial desta molécula. Para isso células provenientes dos ensaios de diferenciação *in vitro* acima descritos (5×10^6 células mL^{-1}), foram lavadas duas vezes com PBS 1X (*Phosphate Buffered Saline*), posteriormente bloqueadas em de BSA 2%-PBS 1X por 60 minutos a 4°C, após de duas lavagens com PBS 1X as células foram incubadas com o anticorpo primário anti gp82 (MAb 3F6, gentilmente cedido pela professora Nobuko Yoshida, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo) feito em camundongo (1:100) por 60 minutos à 4°C, e depois de lavadas duas vezes com PBS 1X, procedeu-se as incubações durante 60 minutos a 4°C com o anticorpo secundário coelho anti-IgG de camundongo conjugado a fluoresceína (1:200) (*Invitrogen* Alexa® fluor 488), seguido de nova lavagem como acima descrito. Após as lavagens, os parasitas foram resuspenso em PBS 1X, e foram analisados por citometria de fluxo, no equipamento Guavacytometer.

3.9 Análises estatísticas

O programa *Excel 2007* foi utilizado para calcular média e desvio padrão das réplicas dos ensaios. Os programas *Origin Pro8* e *Graph Pad Prism 5* foram utilizados para os ajustes não lineares e posterior construção dos gráficos. O método *ANOVA* de uma via seguido do post-teste de *Tukey* foi utilizado nas análises dos tratamentos em relação ao controle (um a um). Para analisar a diferenças entre os tratamentos independentes foi realizado o teste de *ANOVA* de duas vias, e o teste do *Kruskal-Wallis* foi utilizado para determinar se o grupo dos dados analisados nos ensaios possuem a mesma distribuição. O valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Importância da asparagina em processos celulares de epimastigotas do *Trypanosoma cruzi*

4.1.1 Estresse nutricional

Ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*, um dos estresses aos quais o parasita é submetido é o estresse nutricional. Em particular, está bem descrito que os epimastigotas são submetidos ao estresse nutricional durante a colonização da porção final do intestino do vector (46). Como já mencionado, epimastigotas do *T. cruzi* são capazes de utilizar a prolina, o glutamato e o aspartato como fonte de energia (36). Porém, outros aminoácidos metabolicamente relacionados poderiam também estar envolvidos na sobrevivência destas formas nessas condições. Nesse sentido, avaliou-se se a asparagina e/ou o aspartato poderiam também ser utilizados como fonte de energia e se participariam na sobrevivência do parasita quando submetido a estresse nutricional. Submeteram-se epimastigotas em fase exponencial de crescimento a incubação por 24 horas na presença de glicose, prolina, (controles positivos), PBS (controle negativo), ou aspartato ou asparagina. A viabilidade dos parasitas foi avaliada através da atividade mitocondrial medida pelo ensaio do MTT. Como esperado, a glicose e a prolina mostraram-se capazes de manter a maior viabilidade celular (86% e 81%, respectivamente). Interessantemente, a asparagina mostrou ser o terceiro metabólito enquanto à sua capacidade de estender a sobrevivência das células (64%) (**figura 6**), tendo resultado mais eficiente do que o aspartato. Isto sugere que diante deste tipo de estresse, a asparagina poderia estar sendo metabolizada e utilizada como fonte energética, garantindo assim a viabilidade dos epimastigotas.

Figura 6: Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* submetidas a estresse nutricional. Os epimastigotas de *T. cruzi* foram incubados por 24 horas em PBS, ou em PBS enriquecido com 3 mM dos diferentes metabólitos: Glc, Pro, Asn e Asp. Os resultados são apresentados média da porcentagem de viabilidade. *, $P < 0.05$.

4.1.2 Asparagina é capaz de recuperar os níveis de ATP intracelular após jejum

Diante do perfil observado na resposta de sobrevivência dos parasitas em condições de estresse nutricional na presença da asparagina, resolveu-se avaliar a contribuição desse aminoácido na produção intracelular de ATP. Parasitas submetidos a jejum foram recuperados na presença dos mesmos metabólitos avaliados no experimento anterior. Como observado na **figura 7**, após 24 horas de incubação em PBS (jejum), os parasitas conseguem restaurar os níveis de ATP quando acrescentado asparagina, em nível semelhante à recuperação observada com prolina, glicose ou meio LIT, o que mostra o envolvimento deste aminoácido na geração de energia. Interessantemente, novamente o aspartato não se mostrou como uma fonte de energia eficiente, não tendo aumentado significativamente os níveis de ATP intracelular com respeito ao controle de PBS. Isto é relevante, visto que este aminoácido é capaz de sustentar a viabilidade do parasita em situações de estresse, além de promover outros processos cruciais na biologia do parasita.

Figura 7: Participação da asparagina nos níveis intracelulares de ATP em formas epimastigotas submetidas ao estresse nutricional. Formas epimastigotas foram desafiadas por estresse nutricional e incubadas com diferentes metabólitos por 2 horas. Após a recuperação, os níveis de ATP intracelular foram quantificados através do ensaio da luciferase. *, $P < 0.05$.

4.1.3 Avaliação do efeito da asparagina na metaciclogênese

Está relatado que após o estresse nutricional ocorre a diferenciação das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese), e que aminoácidos como a prolina, o glutamato e o aspartato são a principal fonte de energia para sustentar este processo de diferenciação no parasita (46). Baseado nos resultados observados nas figuras 6 e 7, e em relatos da literatura no contexto da diferenciação induzida por estresse

nutricional (81), decidiu-se avaliar o efeito da asparagina na metaciclologênese *in vitro*, induzida por esse estresse. Para isto, inicialmente se determinou o ponto máximo de diferenciação das formas epimastigotes para as formas tripomastigotas metacíclicas, no período de seis dias. Avaliou-se inicialmente a porcentagem das formas metacíclicas em parasitas mantidos em meio TAU-3AAG (**figura 8**), como controle. No dia cinco após o início da diferenciação, registrou-se o maior valor na porcentagem das formas metacíclicas. Avaliou-se então de forma comparada o efeito da asparagina em relação ao do aspartato e da prolina na diferenciação. Incubaram-se formas epimastigotas em meio TAU suplementado com 10 mM dos aminoácidos prolina, aspartato ou asparagina. Foi utilizado como controle positivo o meio TAU-3AAG (46). A porcentagem de diferenciação das formas metacíclicas, foi determinada por análise da expressão da proteína gp82, por citometria de fluxo no quinto dia do ensaio (**Figura 9**). Observou-se que (como esperado) não houve diferenças na capacidade de diferenciação entre os parasitas mantidos em meio TAU-3AAG (controle positivo), ou TAU-Prolina. Interessantemente, também não foram registradas diferenças significativas entre esses parasitas e aqueles incubados em médio TAU-Asparagina. Porém, novamente, quando comparados estes tratamentos com o tratamento com aspartato, observou-se uma queda na porcentagem de diferenciação de aproximadamente duas vezes (**Tabela 3**). Isto sugere que, na diferenciação estimulada pelo estresse nutricional e posterior recuperação com metabólitos específicos, a asparagina tem um papel relevante. A semelhança encontrada no perfil de recuperação energética e na diferenciação, reforçam a ideia de que estes fenômenos estão ligados.

Figura 8: Avaliação do período de diferenciação *in vitro* das formas epimastigotas do *T. cruzi*, cepa CL14 em meio TAU 3AAG. Após de um período de incubação em meio TAU por 2 horas, os parasitas foram transferidos a médio TAU 3AAG. A determinação das formas metacíclicas foi feita por contagem diária na câmara de Neubauer ao longo dos seis dias.

Figura 9: Avaliação do efeito da asparagina na diferenciação *in vitro* das formas epimastigotas do *T. cruzi* cepa CL14 para tripomastigotas metacíclicos. Após de um período de incubação em meio TAU por 2 horas, os parasitas foram transferidos para meio TAU 3AAG ou TAU enriquecido com 10 mM dos diferentes aminoácidos: Pro, Asn e Asp. A determinação das formas metacíclicas foi feita por análise da expressão da molécula estágio específica gp82, por citometria de fluxo.

Figura 10: Porcentagem de diferenciação de epimastigotes do *T. cruzi* para tripomastigotas metacíclicos, em médio TAU enriquecido com diferentes aminoácidos. TAU-3AAG, TAU-prolina, TAU-asparagina e TAU-aspartato.

Tabela 3: Efeito da Prolina, aspartato e asparagina, na porcentagem de formas metacíclicas no *T. cruzi* cepa CL14, em meio TAU, no quinto dia de diferenciação.

Meio	% Formas metacíclicas
TAU-3AAG	39,19± 5,48
TAU- Prolina	32,10 ± 4,29
TAU- Asparagina	38,63± 9,24
TAU-Aspartato	19,50± 5,16

4.1.4 Estresse oxidativo

Como mencionado anteriormente o estresse oxidativo é umas das diversas condições pelas que o *T. cruzi* atravessa durante seu ciclo de vida. É bem sabido que este parasita pode gerar espécies reativas de oxigênio (EROs) como consequência do seu próprio metabolismo além da resposta imune do hospedeiro que ele desencadeia. Como é bem descrito na literatura, as EROs podem gerar ruptura de membranas, inativação de enzimas essenciais, mutações e danos na maquinaria de reparo do DNA (82). Considerando estes prejuízos nas células, decidiu-se avaliar o possível papel protetor da asparagina nas formas epimastigotes de *T. cruzi*. Para isso, desafiaram-se epimastigotes na fase exponencial de crescimento com uma concentração equivalente a uma IC_{50} de H_2O_2 (IC_{50} $68,85 \pm 2,02 \mu M$, como previamente calculada a partir de uma curva dose resposta), para posteriormente submete-los à recuperação por 24 horas na presença de prolina ou glicose (controles positivos), PBS (controle negativo) e asparagina. Também foi avaliada a capacidade do aspartato de estimular a recuperação de células submetidas ao mesmo tipo de estresse. A recuperação dos parasitas em PBS incubados na presença de glicose (85,5%), prolina (72,9%) ou asparagina (79,7%) não teve diferenças significativas (**Figura 11**). Não entanto nos parasitas recuperados em aspartato, a viabilidade foi significativamente menor (33,14%). Estes dados indicam que a asparagina poderia contribuir com a resistência do *T. cruzi* a condições de estresse oxidativo com tanta eficiência quanto prolina ou glicose. Sendo assim, sugere-se que a asparagina poderia ter um papel protetor diante este tipo de estresse.

Figura 11: Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* submetidas a estresse oxidativo. Após de submeter os parasitas a estresse por exposição a IC_{50} de peróxido de hidrogênio $68,85 \mu M$, incubaram-se para sua recuperação com 3 mM dos diferentes metabólitos: Glc, Pro, Asn e Asp. Os resultados são apresentados média da porcentagem de viabilidade. *, $P < 0.05$.

4.1.5 Estresse térmico

Durante seu ciclo de vida, *T. cruzi* está exposto a mudanças de temperatura, devido a que o inseto vetor não tem a capacidade de regular sua temperatura corporal. Adicionalmente, há alterações térmicas na passagem do estágio do parasita no intestino do inseto barbeiro à célula do mamífero. Portanto, o parasita está sujeito às faixas de variações de temperatura ambiental, assim como também está exposto a altas temperaturas do hospedeiro mamífero ($\geq 37^\circ\text{C}$) (75). Em vista disso, foi avaliada a capacidade da asparagina conferir a epimastigotas de *T. cruzi* resistência a estresse térmico. Os epimastigotas foram incubados a 28°C , 33°C ou 37°C na presença de glicose ou prolina (controle positivo), PBS (controle negativo) ou de aspartato ou asparagina. Diferentemente, do observado na presença dos outros metabólitos testados, notou-se nos parasitas mantidos na presença de asparagina uma queda significativa na porcentagem de viabilidade celular. De fato, tanto aspartato quanto asparagina mostraram um perfil semelhante ao do controle negativo (PBS), descartando-se desta forma uma contribuição destes aminoácidos à resistência às variações térmicas às que está exposto o parasita.

Figura 12: Viabilidade celular das formas epimastigotas de *T. cruzi* submetidas a estresse térmico. Os epimastigotas de *T. cruzi* foram incubados por 24 horas em PBS, ou em PBS enriquecido com 3 mM dos diferentes metabólitos : Glc, Pro, Asn e Asp, e avaliada a viabilidade celular em três temperaturas diferentes, as quais tentaram mimetizar as variações térmicas do ciclo de vida do *T. cruzi* (a glicose foi usado como controle interno do experimento). Os resultados apresentados são a média da porcentagem de viabilidade. *, $P < 0.05$

E bem conhecido que os aminoácidos tem um papel relevante em diferentes processos biológicos do *T. cruzi*. Como já mencionado, a prolina, o glutamato e o aspartato são usados como fonte de carbono e energia, fornecendo intermediários do ciclo de Krebs. Esses

aminoácidos são capazes de manter a sobrevivência do parasita após o do estresse nutricional e estimular diretamente o consumo de oxigênio (36). Além disso, esta relatada a sua participação na indução e desenvolvimento da metaciclogênese do *T. cruzi* (46, 83), também a diferenciação em *T. congolense* (84).

Como observado até aqui, foi demonstrada a participação da asparagina em diferentes processos biológicos do *T. cruzi*. Mostramos que esse aminoácido é uma fonte de energia em epimastigotas (visto sua capacidade de promover a síntese de ATP). Além disso, foi mostrado que a asparagina é capaz de fornecer a energia suficiente para garantir a viabilidade do parasita sob condições de estresse nutricional. Finalmente, mostramos que esse aminoácido é capaz de sustentar processos de alto requerimento energético, como a metaciclogênese disparada por estresse nutricional.

Esta bem descrito na literatura que, em geral, a asparagina é oxidada via a sua conversão em aspartato. Essa conversão ocorre pela ação da L-asparaginase (85). No caso de *T. cruzi* observamos que essa atividade esta presente em extratos livres de células (dados não mostrados). O aspartato gerado desta forma, pode ser substrato da aspartato aminotransferase (ASAT, (86)), rendendo glutamato e oxaloacetato. O glutamato, por sua vez pode ser substrato da glutamato desidrogenase ou da tirosina aminotransferase, rendendo α -cetoglutarato (87). Portanto, a asparagina, pode gerar dois intermediários do ciclo de Krebs, mas em ambos os casos mediante a sua conversão a aspartato. Por outro lado, o aspartato pode ser convertido a asparagina pela asparagina sintetase (55). As observações de que a asparagina apresenta uma melhor eficiência na geração de energia, na manutenção da viabilidade das células submetidas a estresse metabólico, e na metaciclogênese do que o aspartato, parece contraditório com o fato dela ser metabolizada mediante a sua conversão a aspartato. Porém, isto poderia se dever a uma maior eficiência na incorporação da asparagina, com respeito ao aspartato.

Interessantemente, observou-se que a asparagina também contribui com a sobrevivência de parasitas submetidos a estresse oxidativo. O padrão de sobrevivência dos parasitas diante estas condições foi semelhante aos tratados com prolina. Tem sido reportado o efeito protetor da prolina frente ao estresse oxidativo (75, 88, 89), e como visto nos resultados obtidos, a asparagina tem também essa capacidade com tanta eficiência quanto prolina e glicose (**Figura 11**). Desta forma, sugere-se que esse aminoácido pode ter um efeito semelhante à prolina quando os epimastigotes são expostos a essas condições.

Finalmente, nos parasitas submetidos a estresse térmico não houve diferenças significativas quando tratados com asparagina. A diferença dos dados relatados por

Magdaleno e col em 2009, os epimastigotas mostraram uma maior viabilidade quando cultivados a 28°C, na presença de prolina, o que concorda com o reportado por Catala S 1995 (90). Mas, quando foi aumentada a temperatura, notou-se uma queda da viabilidade de todos os parasitas desafiados, evidenciando que a asparagina não está implicada em mecanismos de proteção diante mudanças de temperatura.

4.2 Avaliações de análogos na produção da asparagina

4.2.1 Curvas de crescimento de epimastigotas de *T. cruzi*, submetidos ao tratamento com ácido L-cistein-sulfinico

Tem sido relatado que o ácido L-cistein-sulfinico é um inibidor competitivo da enzima asparagina sintetase de *T. cruzi*, evitando a produção da asparagina, interferindo na ligação do ATP com um IC_{50} de 100 μ M da atividade enzimática (55). Este composto é um substrato parcial da enzima que age como um nucleófilo fornecendo um análogo sulfurado do aminoacil-AMP ou do β -aspartil-AMP, no caso da AS-A e AS-B, respectivamente. Estes análogos são subsequentemente hidrolisados de volta para ácido L-cistein-sulfinico e AMP, em um ciclo fútil (91). Sobre a base da sua capacidade inibitória na produção de asparagina, avaliamos a capacidade inibitória deste composto no crescimento de epimastigotas. Neste caso, não foi observada inibição do crescimento dos epimastigotas, já que o composto não diminui a proliferação parasitária em nenhuma das concentrações testadas (**Figura 14**).

Figura 13: Curva de crescimento de epimastigotas tratados com ácido L-cistein-sulfinico. Os parasitas foram incubados na ausência (controle negativo) ou presença de diferentes concentrações de ácido L-cistein-sulfinico (na escala de μ M). Como controle positivo de inibição foi utilizado uma combinação de rotenona (60 μ M) e antimicina (0,5 μ M).

4.2.2 Efeito da produção do análogo da asparagina nas curvas de crescimento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Tem sido descrita a ação inibitória da AS-A de *E. coli* por parte da hidroxilamina (NH_2OH). Esta molécula age substituindo o amônio como fonte de nitrogênio, resultando na síntese do β -aspartilhidroxamato, um análogo da asparagina (56). Como resultado dessa ação inibitória, a disponibilidade da asparagina diminui possivelmente influenciando nos processos de divisão celular, já que é bem conhecido o envolvimento deste aminoácido na indução e continuidade da mitose em outros organismos (50). Baseado nessas observações decidimos demonstrar o envolvimento deste composto na proliferação de formas epimastigotas do parasita, (em concentrações de 400-1000 μM). Observou-se que efetivamente existe um perfil de inibição no crescimento dos parasitas a partir de 500 μM aproximadamente, obtendo um IC_{50} de $(785,44 \pm 1,33 \mu\text{M})$ (**Figura 15**).

Figura 14: Curva de crescimento de epimastigotes tratados com hidroxilamina. Os parasitas foram cultivados em meio LIT, pH 7,5, em diferentes concentrações de hidroxilamina, (400 a 1000 μM) ou não (controle negativo). Como controle positivo de inibição foi utilizado uma combinação de Rotenona (60 μM) e Antimicina (0,5 μM). O valor de IC_{50} determinado foi $785,44 \pm 1,33 \mu\text{M}$.

4.2.3 Avaliação da hidroxilamina na produção do análogo da asparagina

Como já foi mencionado, a NH_2OH é um análogo da amônia capaz de fornecer nitrogênio para a síntese de asparagina, catalisada pela asparagina sintetase e resultando como produto o β -aspartilhidroxamato. Para avaliar a produção desse composto pela AS do *T. cruzi*, primeiramente foi feita a clonagem da sequência gênica relatada no genoma do parasita no vetor de expressão pET-28a (+). Após o sequenciamento da construção, foram feitos ensaios de indução e purificação da enzima a qual foi conferida por ensaios de *western blot*, para posteriormente avaliar a formação do β -aspartilhidroxamato (**Figura 16A**). Como observa-se (**Figura 16B**), houve uma proporcionalidade entre a concentração de proteína recombinante no ensaio e a quantidade de β -aspartilhidroxamato produzidos. Isto indica que a asparagina sintetase do *T. cruzi* esteja reagendo com a hidroxilamina em condições *in vitro*, substituindo assim a biossíntese da asparagina pela biossíntese de β -aspartilhidroxamato por parte desta enzima. A partir destes dados achamos interessante avaliar o efeito da possível produção desse análogo de asparagina pelo próprio *T. cruzi*.

Figura 15: Produção do análogo da asparagina. **A.** Purificação da proteína ASr por afinidade em resina de Ni^{2+} -NTA agarose. Eletroforese em gel SDS-PAGE 12%, usando como marcador de peso molecular o *Unstained Protein Molecular Weight Marker* (Thermo), a eluição da proteína foi feita com 100mM de imidazol, e conferida por western blotting com o anticorpo primário *mouse anti-Histag*. **B.** Avaliação da produção do β -aspartidroxamato a partir da ASr.

4.2.4 Avaliação do efeito do análogo da asparagina na proliferação de *Trypanosoma cruzi*

A proliferação das formas epimastigotes tratadas ou não com hidroxilamina ao longo de cinco dias foi determinada por citometria de fluxo, usando como indicador de proliferação o composto CFSE. O CFSE é um composto fluorescente, que é internalizado pelas células. A medida que estas se dividem, o composto é transferido às células filhas em concentrações menores, de forma tal que a fluorescência por célula vai diminuindo de geração em geração. Os resultados dos tratamentos apresentam-se em um gráfico tipo *overlay*, a fim de mostrar o decaimento da intensidade na fluorescência emitida pelo CFSE ao passo do tempo (**Figura 17**). Nos parasitas controle, observa-se uma queda progressiva no valor de fluorescência registrado ao longo dos dias avaliados (dias zero, três e cinco), indicando uma divisão celular em andamento, contrastando com o observado nos padrões de fluorescência dos parasitas tratados. Isto indica que nas formas epimastigotas tratadas com hidroxilamina ocorre um atraso na proliferação celular como consequência do tratamento, sugerindo um efeito tripanostático por parte do composto.

Figura 16: Avaliação da proliferação das formas epimastigotas detectadas pela marcação com CFSE, submetidas ao tratamento com hidroxilamina. Representação gráfica de um dos três ensaios independentes.

4.2.5 Avaliação do efeito do análogo da asparagina na viabilidade do *Trypanosoma cruzi*

Tendo mostrado que o tratamento com hidroxilamina tem um possível efeito tripanostático, avaliou-se a possibilidade desse efeito também pudesse interferir na viabilidade das formas epimastigotes do parasita (efeito tripanocida), desencadeando a morte. Para isso foi feita uma análise por citometria de fluxo, avaliando tanto a exposição de fosfatidilserina na fase externa da membrana citoplásmica do parasita (com anexina V-FICT) quanto a reatividade com iodeto de propídio (IP), como indicadores de morte por apoptose e de morte tipo necrose, respectivamente. Os ensaios foram feitos em parasitas mantidos durante cinco dias, em presença ou ausência do tratamento com hidroxilamina (dose única correspondente ao IC₅₀). As análises foram feitas no terceiro e no quinto dia de tratamento com a finalidade de avaliar um incremento na porcentagem de células mortas, se houver.

Figura 17: Representação da análise por citometria de fluxo para detecção do tipo de morte celular no terceiro dia. **A.** Controle positivo para apoptose: parasitas tratados com estaurosporina no dia anterior ao ensaio e marcados com anexina; **B.** Controle positivo para necrose: parasitas não tratados, permeabilizados com digitonina e marcados com IP; **C.** Parasitas não tratados marcados com anexina e IP e **D.** Parasitas no terceiro dia de tratamento com hidroxilamina, marcados com anexina e IP.

Figura 18: Representação da análise por citometria de fluxo para detecção do tipo de morte celular no quinto dia. **A.** Controle positivo para apoptose: parasitas tratados com estaurosporina no dia anterior ao ensaio e marcados com anexina; **B.** Controle positivo para necrose: parasitas não tratados, permeabilizados com digitonina e marcados com IP, **C.** Parasitas não tratados marcados com anexina e IP e **D.** Parasitas no quinto dia de tratamento com hidroxilamina, marcados com anexina e IP.

Figura 19: Resumo da detecção do tipo de morte celular para os dois dias de análise. **A e B.** Parasitas não tratados marcados com anexina e IP, analisados no terceiro e quinto dia do ensaio respectivamente. **C e D.** Parasitas tratados com hidroxilamina marcados com anexina e IP, no terceiro e quinto dia ensaio respectivamente. **E.** Representação gráfica das três replicas independentes.

Os parasitas controle (parasitas não tratados) apresentaram em média 0,3% de positividade para exposição de fosfatidilserina, enquanto que os parasitas tratados com hidroxilamina apresentaram 15,81% para o terceiro dia e 17,37% para o quinto dia de tratamento (**Figura 20**). Estes dados junto à marcação negativa para o iodeto de propídeo sugerem que a hidroxilamina induz um mecanismo de morte celular com características de apoptose. Sugere-se que este tratamento tenha um duplo efeito, não só tripanostático como mencionado, mas também tripanocida, desencadeando em uma subpopulação dos parasitas tratados uma morte compatível com a apoptose. O possível processo apoptótico foi sustentado também mediante observação microscópica das células. Foi observada uma mudança na morfologia dos parasitas tratados com hidroxilamina, exibindo formas arredondadas (**Figura 21B e 21D**), em relação ao controle (**Figura 21A e 21C**). Esta morfologia arredondada é uma característica também descrita para células que sofrem morte por apoptoses (92, 93).

Figura 20: Formas epimastigotas de *T. cruzi*: Formas epimastigotas no quinto dia de tratamento com hidroxilamina. A e C Parasitas sem tratamento (controle), B e D Parasitas tratados com hidroxilamina (785,44 μ M). Coloração: Panótico. Resolução: A e B 40X; C e D 100X.

Foram relatadas várias evidências de morte celular programada (MCP) em eucariotos unicelulares, incluindo tripanossomatídeos dos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* (94-96). Esta MCP tem como características: a despolarização da membrana mitocondrial, liberação de citocromo C, ativação de proteases, exposição de fosfatidilserina, encolhimento ou arredondamento das células, manutenção da integridade da membrana e fragmentação de DNA (92, 95, 97). Além do anterior, tem sido demonstrado que formas epimastigotas cultivadas por mais de uma semana no mesmo meio se diferenciam a formas metacíclicas ou morrem apresentando características de apoptose (98). Os motivos pelos quais os tripanossomatídeos sofrem MCP ainda não estão bem esclarecidos, mas alguns autores

sugerem que apesar das células viverem de forma independente, competem por nutrientes e fatores de crescimento. Este seria um mecanismo de sobrevivência relacionado com a regulação da proliferação célula (95, 99). Neste trabalho, mostramos que o tratamento com hidroxilamina produz a morte celular em uma porcentagem da população por mecanismos compatíveis com a apoptose (indicado pela exposição de fosfatidilserina e pelas mudanças morfológicas características observadas nas culturas tratadas) (92, 93, 96, 98-100). Assim, podemos sugerir que os efeitos da hidroxilamina nos epimastigotes do *T. cruzi*, podem ser consequências da diminuição intracelular da asparagina e provavelmente, pela interferência na biossíntese de outros nutrientes que estejam relacionados ao amônio como fonte de nitrogênio.

4.3 Efeito do análogo da asparagina no ciclo intracelular do *Trypanosoma cruzi*

Para avaliar o efeito da hidroxilamina ao longo da infecção em células de mamíferos, inicialmente foi avaliada a toxicidade do composto em células CHO-K₁, modelo de infecção utilizado por nosso grupo. As células CHO-K₁ foram incubadas ou não por 48 horas na presença de diferentes concentrações (50 μ M a 2000 μ M) do composto, conforme descrito em materiais e métodos. Como se pode observar na **figura 22A**, a hidroxilamina é bem tolerada pelas células CHO-K₁ nas concentrações utilizadas, pois nas concentrações inferiores a 200 μ M não apresenta diferença em relação ao controle. Foi determinado o IC₅₀ da hidroxilamina (360,23 μ M) e com base neste resultado realizamos os ensaios de infecção tratando com concentrações de hidroxilamina não tóxicas para as células CHO-K₁, em diferentes períodos da infecção.

Figura 21: Viabilidade das células CHO-K₁. **A.** Células tratadas com diferentes concentrações de hidroxilamina (50 a 200 μ M), incubadas por 48 horas, a viabilidade celular foi avaliada utilizando-se o método de MTT. **B.** Curva dose-resposta da toxicidade em células CHO-K₁. O valor do IC₅₀ determinado foi 360,23 $\pm$ 3,7 μ M.

As células CHO-K₁, foram infectadas com formas tripomastigotas, e após a invasão celular pelos parasitas, iniciou-se o tratamento com diferentes concentrações de hidroxilamina (10 a 200 μ M), conforme descrito em materiais e métodos. Como observado (**Figura 22**), não houve uma diminuição estatisticamente significativa no número de formas tripomastigotas eclodidos, até concentrações de 100 μ M. Unicamente as maiores concentrações (150 e 200 μ M) tiveram uma diminuição estatisticamente significativa no número de tripomastigotas liberados comparados ao controle. Nota-se que o efeito não é um efeito dose dependente.

Figura 22: Efeito do tratamento com hidroxilamina após a invasão dos parasitas nas células CHO-K₁. Foi avaliada a eclosão de formas tripomastigotas no quinto dia pós-infecção, por contagem dos parasitas no sobrenadante em câmara de Neubauer. * $p < 0,05$.

Nossos resultados mostram que a hidroxilamina interfere com o ciclo infectivo do *T. cruzi*, diminuindo o número de formas tripomastigotas que eclodem no quinto dia após a infecção nas concentrações de 150 e 200 μ M. Porém, o tratamento não tem um efeito dose dependente, pelo que não foi possível determinar o valor de IC₅₀. Apesar disso, foi possível evidenciar que efetivamente as formas amastigotas também são susceptíveis ao tratamento com hidroxilamina. Visto que as formas amastigotas (único estágio replicativo do ciclo intracelular) catabolizam preferencialmente os aminoácidos (101), a disponibilidade intracelular dos mesmos é crucial para o sucesso na sobrevivência do parasita dentro das células do hospedeiro mamífero. Nesse ambiente os parasitas estão expostos a condições de estresse como estresse oxidativo e nutricional, condições nas que já foi demonstrada a participação da asparagina no estágio epimastigota. Sugerimos então que quando a disponibilidade intracelular de asparagina é comprometida, observa-se um efeito negativo não só na proliferação das formas epimastigotas, mas também nas formas amastigotas do *T. cruzi*.

4.4 Considerações finais

Apesar do aspartato ser reconhecido como um metabólito central na biologia do *T. cruzi*, seu metabolismo ainda não está profundamente estudado. Como discutido anteriormente, já foi analisada a sua participação na geração de intermediários do ciclo de Krebs, assim como a sua influência na metaciclologênese, e na manutenção dos parasitas em condições de estresse (36, 46). Em eucariotas a oxidação da asparagina acontece via aspartato e posterior processamento através do ciclo de Krebs. Está comprovado que *T. cruzi* está equipado com as atividades enzimáticas que lhe viabilizam esta rota metabólica. A partir desses fatos, seria esperável que a eficiência de asparagina e do aspartato seja semelhante em termos dos processos biológicos dos quais participam. Porém, nosso trabalho, mostra que a asparagina não só é mais eficiente que o aspartato na manutenção dos parasitas em condições de estresse, mas também mostrou ter uma maior influência nos processos de diferenciação. Finalmente, mostramos que a carência da asparagina compromete a viabilidade das formas replicativas do parasita. Diante do exposto sugerimos que a diferença da eficiência metabólica destes aminoácidos, advém dos processos de transporte dos mesmos.

- A asparagina esta envolvida na viabilidade do *T. cruzi* diante situações de estresse nutricional, sendo ésta uma fonte de energia vista sua participação na síntese de ATP;
- a asparagina participa na proteção de epimastigotas do *T. cruzi* submetidos a estresse oxidativo. Porém não contribui na resistência a mudanças térmicas;
- a presença de asparagina participa no processo de diferenciação celular, processo que requiere um grande investimento de energia;
- a hidroxilamina reage com a asparagina sintetase de *T. cruzi* e produz o análogo da asparagina, o β -aspartilhidroxamato. A hidroxilamina apresenta uma inibição na proliferação dos epimatigostes de *T. cruzi* , com um IC₅₀ de 785,44 μ M;
- o tratamento com hidroxilamina tem um duplo efeito: tripanostático, atrasando a divisão celular, e tripanocida, desencadeando uma morte celular compatível com apoptose;
- a exposição do *T. cruzi* a análogos de asparagina, afeta fases que requerem energia: estágios replicativos (amastigota e epimastigota).

REFERENCIAS*

1. Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, et al. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *The Journal of eukaryotic microbiology*. 2005 Sep-Oct;52 (5):399-451.
2. Zingales B, Andrade SG, Briones MR, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009 Nov;104 (7):1051-4.
3. Rassi A, Marin-Neto JA. Chagas disease. *The Lancet*. 2010 17 abr. 2010;375 (9723):1388-402.
4. World Health O. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and leishmaniasis. World Health Organization technical report series. 2012 (975):v-xii, 1-100.
5. Schmunis GA. Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: the role of international migration. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2007 Oct 30;102 Suppl 1:75-85.
6. Perez-Molina JA, Norman F, Lopez-Velez R. Chagas disease in non-endemic countries: epidemiology, clinical presentation and treatment. *Current infectious disease reports*. 2012 Jun;14 (3):263-74.
7. Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, et al. The trypanosomiasis. *Lancet*. 2003 Nov 1;362 (9394):1469-80.
8. Dias JC. [Globalization, inequity and Chagas disease]. *Cadernos de saude publica*. 2007;23 Suppl 1:S13-22. Globalizacao, iniquidade e doenca de Chagas.
9. Coura JR. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2006;39 Suppl 3:113-7. Transmissao da infeccao chagastica por via oral na historia natural da doenca de Chagas. por.
10. Dias JP, Bastos C, Araujo E, Mascarenhas AV, Martins Netto E, Grassi F, et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2008 May-Jun;41 (3):296-300.
11. Ribeiro RD, Rissato e Garcia TA, Bonomo WC. [Mechanisms of transmission of the etiological agent of Chagas' disease]. *Revista de saude publica*. 1987 Feb;21 (1):51-4. Contribuicao para o estudo dos mecanismos de transmissao do agente etiologico da doenca de Chagas.

* De acordo com:

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

12. Bittencourt AL. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. 1992 Sep-Oct;34 (5):403-8.
13. Moncayo A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. 1999;94 Suppl 1:401-4.
14. Dias LC, Dessoy MA, Silva JJN, Thiemann OH, Oliva G, Andricopulo AD. Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. *Quím Nova*. 2009;32.
15. Moncayo A, Yanine MIO. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* [Internet]. 2006 20 mar. 2006; 100:[663-77 pp.].
16. Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. *International journal of cardiology*. 2007 Feb 14;115 (3):279-83.
17. Pinto Dias JC. [Chagas cardiomyopathy: a myth and a challenge]. *Archivos del Instituto de Cardiologia de Mexico*. 1990 Mar-Apr;60 (2):119-20. *Cardiopatia chagastica: mito y desafio*.
18. Prata A. Chagas' disease. *Infectious disease clinics of North America*. 1994 Mar;8 (1):61-76.
19. Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, et al. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2010 Jun;14 (6B):1373-84.
20. Brener Z. [Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease]. *Annales de la Societe belge de medecine tropicale*. 1985;65 Suppl 1:9-13. *Relacoes parasita-hospedeiro na doenca de Chagas: mecanismos de infeccao e doenca*.
21. Andrade LO, Machado CR, Chiari E, Pena SD, Macedo AM. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol*. 2002 Apr;100 (4):269-75.
22. Docampo R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-biological interactions*. 1990;73 (1):1-27.
23. Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*. 2003 Nov;19 (11):495-501.
24. Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005 Mar;5 (1):53-64.
25. Dias JC. Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias. In: José CR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias* 2005.

26. Ministerio da Saude. Secretaria de Vigilancia em S. [Brazilian Consensus on Chagas disease]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 2005;38 Suppl 3:7-29. Consenso brasileiro em doenca de chagas.
27. Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu Rev Microbiol. 1973;27:347-82.
28. Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. International journal for parasitology. 2001 May 1;31 (5-6):472-81. PubMed PMID: 11334932. Epub 2001/05/04. eng.
29. Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp Parasitol. 1999 Aug;92 (4):263-74.
30. Brack C. [Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector rhodnius prolixus]. Acta tropica. 1968;25 (4):289-356. Elektronenmikroskopische Untersuchungen zum Lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi* Unter besonderer Beruecksichtigung der Entwicklungsformen im Ubertrager Rhodnius prolixus.
31. de Souza W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. International review of cytology. 1984;86:197-283.
32. De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Current pharmaceutical design. 2002;8 (4):269-85.
33. Alves MJ, Colli W. Role of the gp85/trans-sialidase superfamily of glycoproteins in the interaction of *Trypanosoma cruzi* with host structures. Sub-cellular biochemistry. 2008;47:58-69.
34. Alves MJ, Colli W. *Trypanosoma cruzi*: adhesion to the host cell and intracellular survival. IUBMB life. 2007 Apr-May;59 (4-5):274-9.
35. Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Journal of bioenergetics and biomembranes. 1994 Apr;26 (2):157-65. PubMed PMID: 8056782. Epub 1994/04/01. eng.
36. Sylvester D, Krassner SM. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Comp Biochem Physiol B. 1976;55 (3B):443-7.
37. Paes LS, Suarez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EM, Diogo de Melo P, Tahara EB, et al. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. PloS one. 2013;8 (7):e69419.
38. Magdaleno A, Ahn I-Y, Paes LS, Silber AM. Actions of a Proline Analogue, L-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. PloS one. 2009;4 (2).
39. Tonelli RR, Silber AM, Almeida-de-Faria M, Hirata IY, Colli W, Alves MJ. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Microbiol. 2004 Aug;6 (8):733-41.

40. Mancilla R, Naquira C, Lanas C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. 1967 Oct;21 (2):154-9.
41. Zeledon R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. J Parasitol. 1960 Oct;46:541-51.
42. Lisvane Silva P, Mantilla BS, Barison MJ, Wrenger C, Silber AM. The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. Current pharmaceutical design. 2011;17 (20):2074-99.
43. Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN, et al. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. J Biol Chem. 2000 Jan 14;275 (2):1495-501.
44. Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, Torres HN, et al. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. FEBS letters. 2003 Nov 6;554 (1-2):201-5.
45. Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitology. 2008.
46. Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. Mol Biochem Parasitol. 1985 Sep;16 (3):315-27.
47. Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. Infection and immunity. 2009 Jul;77 (7):3023-32.
48. Fares FA, Gruener N, Kraiem Z. The role of the asparagine-linked oligosaccharides of the alpha-subunit in human thyrotropin bioactivity. Endocrinology. 1996 Feb;137 (2):555-60.
49. Atkins CA, Pate JS, Sharkey PJ. Asparagine metabolism-key to the nitrogen nutrition of developing legume seeds. Plant physiology. 1975 Dec;56 (6):807-12.
50. Scotti C, Sommi P, Pasquetto MV, Cappelletti D, Stivala S, Mignosi P, et al. Cell-cycle inhibition by *Helicobacter pylori* L-asparaginase. PloS one. 2010;5 (11):e13892.
51. Greco A, Gong SS, Ittmann M, Basilico C. Organization and expression of the cell cycle gene, ts11, that encodes asparagine synthetase. Molecular and cellular biology. 1989 Jun;9 (6):2350-9.
52. Blaise M, Frechin M, Olieric V, Charron C, Sauter C, Lorber B, et al. Crystal structure of the archaeal asparagine synthetase: interrelation with aspartyl-tRNA and asparaginyl-tRNA synthetases. J Mol Biol. 2011 Sep 23;412 (3):437-52.

53. Sugiyama A, Kato H, Nishioka T, Oda J. Overexpression and purification of asparagine synthetase from *Escherichia coli*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 1992 Mar;56 (3):376-9.
54. Gowri VS, Ghosh I, Sharma A, Madhubala R. Unusual domain architecture of aminoacyl tRNA synthetases and their paralogs from *Leishmania major*. *BMC genomics*. 2012;13:621.
55. Loureiro I, Faria J, Clayton C, Ribeiro SM, Roy N, Santarem N, et al. Knockdown of asparagine synthetase A renders *Trypanosoma brucei* auxotrophic to asparagine. *PLoS neglected tropical diseases*. 2013 Dec;7 (12):e2578.
56. Cedar H, Schwartz JH. The asparagine synthetase of *Escherichia coli*. II. Studies on mechanism. *J Biol Chem*. 1969 Aug 10;244 (15):4122-7.
57. Humbert R, Simoni RD. Genetic and biomedical studies demonstrating a second gene coding for asparagine synthetase in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 1980 Apr;142 (1):212-20.
58. Andrulis IL, Chen J, Ray PN. Isolation of human cDNAs for asparagine synthetase and expression in Jensen rat sarcoma cells. *Molecular and cellular biology*. 1987 Jul;7 (7):2435-43.
59. Ramos F, Wiame JM. Two asparagine synthetases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 1980 Jul;108 (2):373-7.
60. Merchant SS, Prochnik SE, Vallon O, Harris EH, Karpowicz SJ, Witman GB, et al. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*. 2007 Oct 12;318 (5848):245-50.
61. Coruzzi GM. Primary N-assimilation into Amino Acids in *Arabidopsis*. The *Arabidopsis* book / American Society of Plant Biologists. 2003;2:e0010.
62. Boehlein SK, Stewart JD, Walworth ES, Thirumoorthy R, Richards NG, Schuster SM. Kinetic mechanism of *Escherichia coli* asparagine synthetase B. *Biochemistry*. 1998 Sep 22;37 (38):13230-8.
63. Luehr CA, Schuster SM. Purification and characterization of beef pancreatic asparagine synthetase. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1985 Mar;237 (2):335-46.
64. Huang X, Holden HM, Raushel FM. Channeling of substrates and intermediates in enzyme-catalyzed reactions. *Annual review of biochemistry*. 2001;70:149-80.
65. Marciano D, Llorente C, Maugeri DA, de la Fuente C, Oppendoes F, Cazzulo JJ, et al. Biochemical characterization of stage-specific isoforms of aspartate aminotransferases from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2008 Sep;161 (1):12-20.
66. Cazzulo JJ, Juan SM, Segura EL. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry*. 1977;56 (3):301-3.

67. Canepa GE, Bouvier LA, Urias U, Miranda MR, Colli W, Alves MJ, et al. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 2005 Jun 1;247 (1):65-71.
68. Spector T, Berens RL, Marr JJ. Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*, Specificity studies with potential chemotherapeutic agents. Biochemical pharmacology. 1982 Jan 15;31 (2):225-9.
69. Brener Z, Chiari E. Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1963 Sep-Oct;19:220-4.
70. Camargo EP. Growth and Differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of Metacyclic Trypanosomes in Liquid Media. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1964 May-Jun;12:93-100.
71. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc Natl Acad Sci U S A. 1977 Dec;74 (12):5463-7.
72. J. Sambrook DWR. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Harbor CS, editor. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour; 2001.
73. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry. 1976 May 7;72:248-54.
74. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76 (9):4350-4.
75. Magdaleno A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. PloS one. 2009;4 (2):e4534.
76. Jimenez V, Paredes R, Sosa MA, Galanti N. Natural programmed cell death in T. cruzi epimastigotes maintained in axenic cultures. Journal of cellular biochemistry. 2008 Oct 15;105 (3):688-98.
77. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. Journal of immunological methods. 1983 Dec 16;65 (1-2):55-63.
78. Ramirez MI, Ruiz Rde C, Araya JE, Da Silveira JF, Yoshida N. Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. Infection and immunity. 1993 Sep;61 (9):3636-41.
79. Araya JE, Cano MI, Yoshida N, da Silveira JF. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Molecular and biochemical parasitology. 1994 May;65 (1):161-9.

80. Atayde VD, Cortez M, Souza R, da Silveira JF, Yoshida N. Expression and cellular localization of molecules of the gp82 family in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes. *Infection and immunity*. 2007 Jul;75 (7):3264-70.
81. Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. *J Parasitol*. 2000 Dec;86 (6):1213-8.
82. Paes MC, Cosentino-Gomes D, de Souza CF, Nogueira NP, Meyer-Fernandes JR. The Role of Heme and Reactive Oxygen Species in Proliferation and Survival of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of parasitology research*. 2011;2011:174614.
83. Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of protozoology*. 1989 Mar-Apr;36 (2):150-3.
84. Ross CA. *Trypanosoma congolense*: differentiation to metacyclic trypanosomes in culture depends on the concentration of glutamine or proline. *Acta tropica*. 1987 Sep;44 (3):293-301.
85. Cooney DA, Handschumacher RE. L-asparaginase and L-asparagine metabolism. *Annual review of pharmacology*. 1970;10:421-40.
86. Cazzulo JJ. Protein and amino acid catabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative biochemistry and physiology B, Comparative biochemistry*. 1984;79 (3):309-20.
87. Caldas RA, Araujo EF, Felix CR, Roitman I. Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*. 1980 Apr;66 (2):213-6.
88. Chen C, Wanduragala S, Becker DF, Dickman MB. Tomato QM-like protein protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress by regulating intracellular proline levels. *Appl Environ Microbiol*. 2006 Jun;72 (6):4001-6.
89. Krishnan N, Becker DF. Oxygen reactivity of PutA from *Helicobacter* species and proline-linked oxidative stress. *J Bacteriol*. 2006 Feb;188 (4):1227-35.
90. Asin S, Catala S. Development of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: influence of temperature and blood consumption. *J Parasitol*. 1995 Feb;81 (1):1-7.
91. Boehlein SK, Nakatsu T, Hiratake J, Thirumoorthy R, Stewart JD, Richards NG, et al. Characterization of inhibitors acting at the synthetase site of *Escherichia coli* asparagine synthetase B. *Biochemistry*. 2001 Sep 18;40 (37):11168-75.
92. Kaczanowski S, Sajid M, Reece SE. Evolution of apoptosis-like programmed cell death in unicellular protozoan parasites. *Parasites & vectors*. 2011;4:44. 63.
93. Smirlis D, Duszenko M, Ruiz AJ, Scoulica E, Bastien P, Fasel N, et al. Targeting essential pathways in trypanosomatids gives insights into protozoan mechanisms of cell death. *Parasites & vectors*. 2010;3:107. PubMed PMID: 21083891.

94. Welburn SC, Barcinski MA, Williams GT. Programmed cell death in trypanosomatids. *Parasitology today*. 1997 Jan;13 (1):22-6..
95. Debrabant A, Lee N, Bertholet S, Duncan R, Nakhasi HL. Programmed cell death in trypanosomatids and other unicellular organisms. *International journal for parasitology*. 2003 Mar;33 (3):257-67.
96. Damasceno FS, Barison MJ, Pral EM, Paes LS, Silber AM. Memantine, an antagonist of the NMDA glutamate receptor, affects cell proliferation, differentiation and the intracellular cycle and induces apoptosis in *Trypanosoma cruzi*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2014 Feb;8 (2):e2717.
97. Figarella K, Uzcategui NL, Beck A, Schoenfeld C, Kubata BK, Lang F, et al. Prostaglandin-induced programmed cell death in *Trypanosoma brucei* involves oxidative stress. *Cell death and differentiation*. 2006 Oct;13 (10):1802-14.
98. Ameisen JC, Idziorek T, Billaut-Mulot O, Loyens M, Tissier JP, Potentier A, et al. Apoptosis in a unicellular eukaryote (*Trypanosoma cruzi*): implications for the evolutionary origin and role of programmed cell death in the control of cell proliferation, differentiation and survival. *Cell death and differentiation*. 1995 Oct;2 (4):285-300.
99. Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC. Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends in parasitology*. 2006 Nov;22 (11):536-42.
100. Al-Olayan EM, Williams GT, Hurd H. Apoptosis in the malaria protozoan, *Plasmodium berghei*: a possible mechanism for limiting intensity of infection in the mosquito. *International journal for parasitology*. 2002 Aug;32 (9):1133-43.
101. Silber AM, Tonelli RR, Lopes CG, Cunha-e-Silva N, Torrecilhas AC, Schumacher RI, et al. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology*. 2009 Nov;168 (1):102-8.