

Flávia Silva Damasceno

Papel da glutamina na biologia do *Trypanosoma cruzi*  
e *Trypanosoma brucei*.

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

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

São Paulo  
2017

## RESUMO

Damasceno, FS. Papel da glutamina na biologia do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei*. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

*Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei* são os agentes etiológicos da doença de Chagas e da doença do sono, respectivamente. A doença de Chagas acomete pessoas, principalmente da América Latina, sendo conhecida também como tripanossomíase americana. A doença do sono, também conhecida como tripanossomíase africana, acomete pessoas de diferentes regiões da África subsaariana. Ambos agentes etiológicos são tripanossomatídeos e apresentam um ciclo de vida que alterna entre os hospedeiros mamíferos e os hospedeiros invertebrados. *T. cruzi* e *T. brucei* apresentam um metabolismo baseado no consumo de aminoácidos e/ou glicose, dependendo da disponibilidade de nutrientes no ambiente. Os aminoácidos são metabólitos relevantes para vários processos biológicos necessários para manutenção e viabilidade dos parasitas. Neste trabalho foi demonstrada a importância da glutamina (Gln) em diferentes aspectos da biologia do *T. cruzi* e a relevância da Gln e da enzima glutamina sintetase (GS) para formas sanguíneas de *T. brucei*. A Gln é transportada pelo *T. cruzi* e pelo *T. brucei* a partir do meio extracelular. Em *T. cruzi* foi demonstrado que esse transporte é realizado por um único sistema, saturável, específico, dependente de ATP e do gradiente de H<sup>+</sup> da membrana citoplasmática do parasita. O transporte é regulado ao longo do ciclo de vida do parasita, sendo complementado pela atividade da enzima GS no suprimento da quantidade de Gln requerida pelo parasita. Também foi demonstrado que a Gln é importante para a replicação das formas amastigotas e epimastigotas, além de promover o processo de metaciclogênese. Tratamento com análogos estruturais da Gln diminuiu a atividade da enzima glucosamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA), diminuindo também a proliferação do estágio epimastigota e a diferenciação para tripomastigota metacíclica. Além disso, células infectadas e tratadas com os análogos apresentaram redução do número de tripomastigotas que eclodiram das células, demonstrando que a Gln também é importante para os estágios intracelulares. Em formas sanguíneas de *T. brucei*, a enzima GS é ativa, mas é incapaz de suprir por si só a demanda de Gln do parasita, fazendo com que seja completamente dependente do transporte a partir do meio externo mesmo quando a biossíntese *de novo* acontece. A Gln é importante para a proliferação das formas sanguíneas e correta progressão do ciclo celular. Em meio sem Gln os parasitas são incapazes de manter a proliferação normalmente, sendo que este processo é dependente da concentração de Gln no meio externo. Também foi demonstrado que a Gln participa de um processo de modificação pós-traducional da tubulina, a glutamilação. Conclui-se portanto que a Gln é um aminoácido fundamental para sobrevivência do *T. cruzi* e do *T. brucei*.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma brucei*. Glutamina. Doença de Chagas. Aminoácidos. Poliglutamilação.

## ABSTRACT

Damasceno, FS. Role of glutamine in the biology of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. [Ph. D. Thesis (Parasitology)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2017.

*Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei* are the etiologic agent of Chagas' disease and sleeping sickness, respectively. Chagas' disease affects people mostly in Latin America and is known as American Trypanosomiasis. Sleeping sickness, known as African Trypanosomiasis, affects people and animals in sub-Saharan Africa countries. Both parasites are trypanosomatids that have a complex life cycle, which alternates among a mammalian hosts and insect vectors. *T. cruzi* and *T. brucei* are able to use carbohydrates and amino acids as energy sources, depending on the availability of nutrients in the different environments that parasites face during their life cycle. The amino acids are relevant to many biological processes that are important to viability and maintenance in trypanosomatids. In this work we demonstrate that glutamine (Gln) is an important metabolite that participates in many biological processes in *T. cruzi*, as well as the relevance of the enzyme glutamine synthetase and Gln in bloodstream forms of *T. brucei*. *T. cruzi* and *T. brucei* are able to uptake Gln from the extracellular medium. *T. cruzi* incorporates Gln through a single and saturable transport system. Gln uptake system is dependent on ATP intracellular levels and H<sup>+</sup> gradient at the cytoplasmic membrane level, being a highly specific system. Gln uptake is developmentally regulated and is a complement of the Gln biosynthesis to supply the parasite Gln requirements. Also we showed that Gln is important for the replicative stages amastigote and epimastigote, and promotes the metacyclogenesis differentiation process. The treatment of the parasites with Gln analogs inhibiting the the glucosamine fructose-6-phosphate impaired the epimastigote replication and the differentiation from epimastigote to trypomastigote metacyclic. Moreover, analogs treatment in the infected cells decreased the number of trypomastigotes released from the cells, suggesting that Gln is important for the intracellular development of *T. cruzi*. This work also demonstrates that the enzyme glutamine synthetase is active in bloodstream forms of *T. brucei*, but its activity is not enough to fulfill the Gln requirements of the parasite. *T. brucei* bloodstream forms are strictly dependent on Gln uptake from the extracellular medium even when its *de novo* biosynthesis is operating. The proper proliferation rate and correct cell cycle progression are dependent on Gln concentration in the medium. Moreover we showed here that Gln participates in a relevant post-translational modification of tubulin in bloodstream forms: its glutamylation. This post-translational modification is important for the microtubules dynamics and cytokinesis process. We conclude that Gln is a fundamental amino acid for the survival and maintenance of *T. cruzi* and *T. brucei*.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*. *Trypanosoma brucei*. Glutamine. Chagas disease. Amino acids. Poliglutamylation.

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

---

## 1.1 Tripanossomíases

### 1.1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Esta doença foi descoberta há mais de um século pelo médico brasileiro Carlos Chagas (Chagas, 1909), que descreveu não só o parasita mas também o inseto vetor e os hospedeiros mamíferos. A doença de Chagas acomete pessoas principalmente na América Latina (Figura 1), estima-se que 8 milhões de pessoas estão infectadas em todo mundo, e que ocorram 10 mil novos casos a cada ano, sendo que aproximadamente 25 milhões de pessoas vivem em áreas de risco da infecção. As áreas de risco estão localizadas principalmete em 21 países da América Latina compreendendo países do México até a Argentina. Estudos recentes apontam para a edemicidade da doença de Chagas também no sul dos Estados Unidos. É considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma doença negligenciada (WHO, 2017). Inicialmente a doença de Chagas acometia a população somente da América Latina, mas devido a migrações das pessoas da área rural para as cidades e também das áreas endêmicas para outros países em diferentes continentes, a doença de Chagas atualmente é um problema mundial. Há relatos de casos em países não endêmicos como Canadá, Austrália, Japão, França, Itália, Suécia, Suíça, Inglaterra e Espanha, sendo que na Espanha se concentra o maior número de imigrantes infectados, que são majoritariamente oriundos do Equador, Argentina, Bolívia e Peru (Gascon, Bern et al., 2010) revisado por (Rassi, Rassi et al., 2012) e por (Perez-Molina, Molina, 2017).

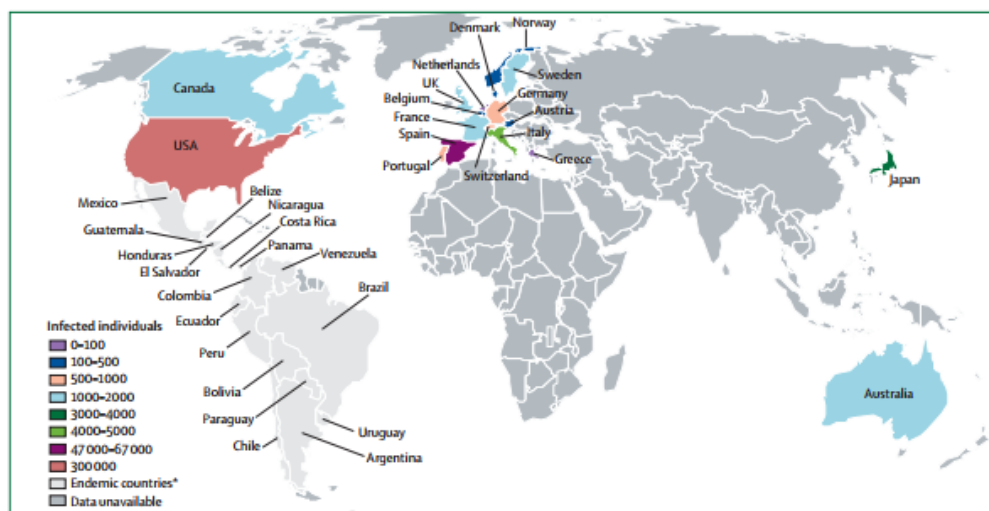


Figura 1 - Distribuição geográfica da doença de Chagas no mundo. Fonte: (Rassi, Marin-Neto, 2010).

A doença de Chagas é uma zoonose que tem como reservatório natural uma ampla variedade de mamíferos no continente americano. O *T. cruzi* é transmitido por várias espécies de três gêneros de insetos triatomíneos hematófagos: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Na Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai, Uruguai e Peru o vetor mais encontrado é o *Triatoma infestans*, já na Colômbia, Venezuela e América Central é o *Rhodnius prolixus*, sendo o *T. dimidiata* encontrado no Equador e também na América Central, o *R. pallens* é principalmente encontrado no Panamá. Nos Estados Unidos os dois principais vetores são *T. sanguisuga* e *T. gerstaecken* (Silber, Colli et al., 2005; Kribs-Zaleta, 2010; Rassi, Rassi et al., 2012; Coura, 2013; PAHO, 2017; Perez-Molina, Molina, 2017).

Além da transmissão vetorial, principal forma de transmissão nas áreas endêmicas, a doença de Chagas também pode ser transmitida por outras vias, como a via oral, de forma congênita da mãe infectada para filho, por transplantes de órgãos, transfusão sanguínea e por acidentes em laboratórios. A transmissão congênita se estima que é responsável por 4,7% dos casos, sendo que este número pode ser maior em áreas endêmicas. Já a transmissão por transfusão sanguínea e transplante de órgãos representam de 10-25% dos casos. A transmissão por via oral ocorre em áreas endêmicas, por ingestão de alimentos contaminados com o parasita e causa surtos de infecção aguda. A transmissão por acidentes em laboratórios que trabalham com o parasita ocorrem mais raramente (Bern, Verastegui et al., 2009; Rassi, Marin-Neto, 2010; Perez-Molina, Molina, 2017).

A doença de Chagas pode ser dividida em uma fase aguda e uma fase crônica. Ambas as fases da doença são tipicamente assintomáticas. A fase aguda ocorre logo após a infecção, podendo durar de 4 a 8 semanas. Essa fase é caracterizada pela alta parasitemia e uma baixa taxa de anticorpos, quando há sintomas são inespecíficos como febre, inflamação e edema no local da picada do inseto vetor (chamado de sinal de Romana) (Docampo, 2001; Silber, Colli et al., 2005; Rassi, Rassi et al., 2012). Nos últimos anos tem sido observado um aumento de casos resultantes da transmissão oral da doença de Chagas, em que o parasita é ingerido juntamente com algum alimento, geralmente suco de frutas, causando uma infecção aguda severa com alta mortalidade, e manifestações clínicas mais intensas do que as causadas pela transmissão vetorial. As manifestações clínicas da fase aguda causada pela infecção oral podem ser: febre prolongada, miocardite aguda e em alguns casos meningoencefalites. A mortalidade nesses casos pode chegar a 33% dos pacientes, (revisado por (Yoshida, Tyler et al., 2011; Filigheddu, Gorgolas et al., 2017)). A fase aguda, quando não leva a óbito, evolui para a fase crônica, que é caracterizada por uma parasitemia geralmente indetectável pelos métodos convencionais e altas taxas de anticorpos específicos, tem início de 2 a 3 meses

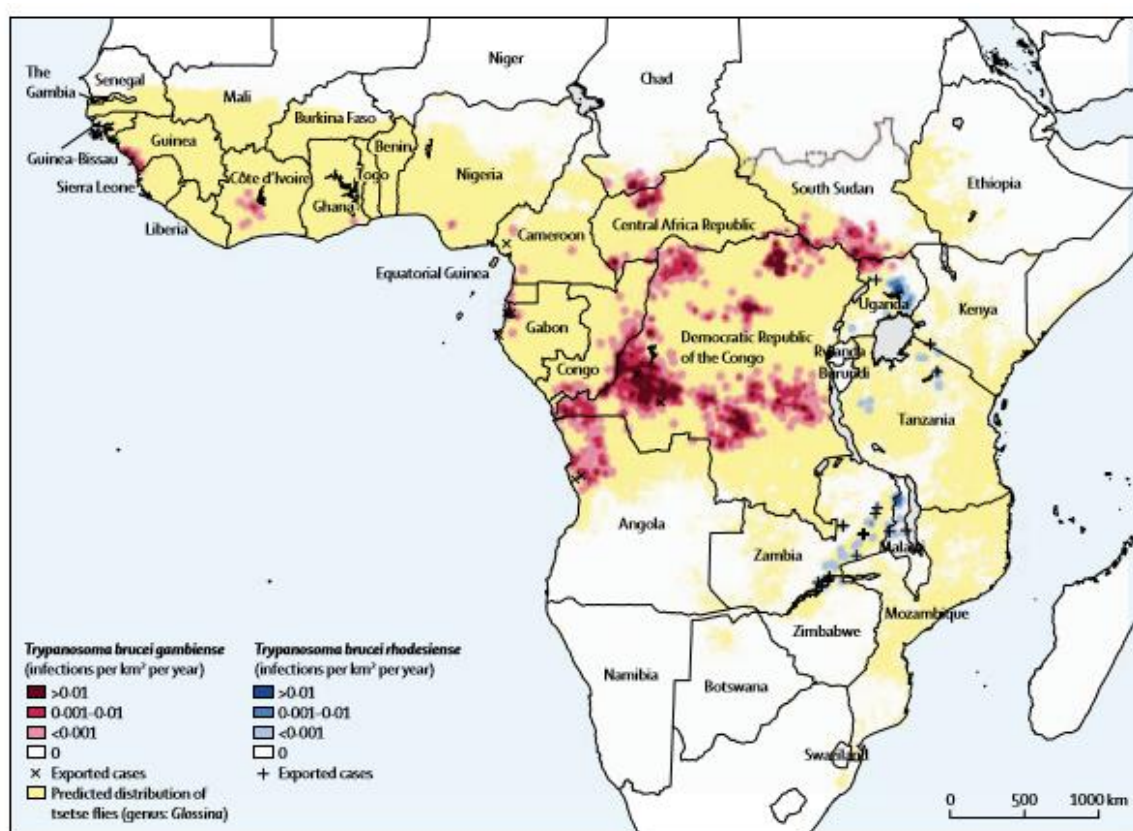
depois da infecção. Cerca de 60% a 70% dos pacientes apresentam a forma assintomática ou indeterminada da doença, que é caracterizada pela ausência de sinais e sintomas. Entre 30% a 40% dos pacientes chagásicos crônicos podem evoluir para alguma das formas sintomáticas da doença, e desenvolver problemas cardíacos e/ou digestivos, como cardiomiopatia e megacolon, megaesôfago ou ambos, o que ocorre normalmente entre 10 e 30 anos após a infecção aguda (Rassi, Rassi et al., 2012; Perez-Molina, Molina, 2017).

O tratamento da doença de Chagas disponível atualmente é insatisfatório e é baseado em apenas duas drogas que começaram a ser usadas há aproximadamente 50 anos: o Nifurtimox e o Benzonidazol. Ambas as drogas são as únicas ferramentas disponíveis para o tratamento. As duas drogas apresentam sérios efeitos colaterais e já há relato de surgimento de cepas resistentes (revisado por (Urbina, 2010)). Se o tratamento dos pacientes ocorrer na fase aguda, as duas drogas são efetivas para diminuir ou eliminar o parasita na maioria dos casos, evitando a soroconversão dos pacientes. Já na fase crônica, quando a maior parte dos pacientes é diagnosticada, o tratamento nem sempre é eficaz, sendo indispensável o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas (Boscardin, Torrecilhas et al., 2010; Paes, Mantilla et al., 2011; Perez-Molina, Molina, 2017). Há uma grande discussão na comunidade científica quanto ao tratamento na fase crônica da doença de Chagas, muitos pesquisadores defendem que os pacientes devem ser tratados antes do início do aparecimento dos sinais e sintomas, pois este tratamento pode prevenir ou atrasar o aparecimento dos sintomas (Paes, Mantilla et al., 2011; Chatelain, 2017; PAHO, 2017; Rassi, Marin et al., 2017). A eficácia do tratamento depende de vários fatores, tais como idade e estado imunológico do paciente, cepa do parasita, tempo de infecção dentre outros (Silber, Colli et al., 2005; PAHO, 2017). A busca por novos fármacos enfrenta vários obstáculos, tais como a falta de investimentos em pesquisa e desenvolvimento de novas estratégias de combate a doença de Chagas.

### ***1.1.2 Aspectos gerais da tripanossomíase africana***

A tripanossomíase humana africana (HAT do inglês: *Human African Trypanosomiasis*), também conhecida como doença do sono, é causada pelo protozário flagelado *Trypanosoma brucei*. Assim como a doença de Chagas também é considerada, pela OMS, como uma doença negligenciada.

A doença do sono acomete a população de regiões mais pobres, de aproximadamente 36 países na África subsaariana (Figura 2). Dados da OMS reportam que aproximadamente 20.000 pessoas estão infectadas e que mais de 65 milhões vivem em áreas de risco de infecção. O número de novos casos reportados a cada ano tem apresentado uma redução significativa, devido a esforços conjuntos da OMS e organizações não governamentais para o controle da doença. Em 2009 foram reportados 10.000 casos, já em 2015 esse número foi reduzido para 2.804 casos. Espera-se que a doença do sono seja eliminada como um problema de saúde pública até 2020 (Buscher, Cecchi et al., 2017; WHO, 2017).



**Figura 2 - Distribuição geográfica de casos de tripanossomíase africana reportados entre 2010-2014.**  
Fonte: (Buscher, Cecchi et al., 2017).

A doença do sono é transmitida pelas moscas *tsetse* (*Glossina* sp.) que adquiriram o parasita de pessoas ou animais infectados pelo *T. brucei*. Duas sub-espécies do *T. brucei* acometem as pessoas em diferentes regiões da África. O *T. b. gambiense* é encontrado em 24 países do centro e oeste africano, é responsável por 97% dos casos reportados, e *T. b. rhodisiense* que acomete pessoas de 13 países do leste e sul da África, sendo responsável por aproximadamente 3% dos casos reportados a cada ano. Apenas Uganda apresenta as duas formas



da doença, mas em diferentes regiões do país. Outra sub-espécie, o *T. b. brucei*, causa a tripanossomíase africana em animais, incluindo o rebanho bovino, nos quais a doença é chamada Nagana. A nagana é um obstáculo para o desenvolvimento econômico nas áreas rurais afetadas (WHO, 2017). Além da transmissão vetorial, a mais importante do ponto visto epidemiológico, a doença do sono também pode ser transmitida congenitamente, da mãe infectada para o filho, visto que o *T. brucei* pode atravessar a barreira placentária e infectar o feto. Também pode ser transmitida por acidentes em laborários que trabalham com o parasita e também por contato sexual (Buscher, Cecchi et al., 2017).

As manifestações clínicas da doença do sono se apresentam em dois estágios: no primeiro estágio, o parasita se multiplica no tecido subcutâneo, adiposo, sangue ou sistema linfático, causando dores de cabeça, febre e dores nas articulações (Buscher, Cecchi et al., 2017; Tanowitz, Scherer et al., 2017). No segundo estágio o parasita atravessa a barreira hematoencefálica e infecta o sistema nervoso central, causando mudanças de comportamento, confusão e distúrbios sensoriais, além da perturbação do ciclo do sono, sintoma este que dá nome a doença (Buguet, Bourdon et al., 2001; Njamnshi, Seke Etet et al., 2012). O *T. b. gambiense*, causa a infecção crônica, na qual a pessoa infectada pode ficar meses ou anos sem apresentar sinais e sintomas da doença. Os sintomas aparecem em um estado avançado da doença, quando o sistema nervoso já está afetado. Enquanto que o *T. b. rhodisiense* é responsável pela infecção aguda. Na fase aguda os primeiros sinais e sintomas podem aparecer poucas semanas após a infecção. A doença se desenvolve rapidamente atingindo o sistema nervoso central (Buguet, Bourdon et al., 2001; Buscher, Cecchi et al., 2017).

Há cinco drogas disponíveis para o tratamento da doença do sono. A escolha depende do estágio da doença e do agente causador. Drogas utilizadas no primeiro estágio não são efetivas no segundo estágio, visto que no segundo estágio, a droga necessita atravessar a barreira hematoencefálica. No primeiro estágio é usada a pentamidina para tratar infecções pelo *T. b. gambiense* e a suramina para tratar as pessoas acometidas pelo *T. b. rhodisiense*. No segundo estágio, os fármacos disponíveis para o tratamento são o melarsoprol, que pode ser usado para o tratamento de infecções por ambos os parasitas. No entanto, essa droga causa efeitos colaterais gravíssimos podendo causar a morte do paciente em até 10% dos casos. Uma alternativa ao melarsoprol, para tratar infecções causadas pelo *T. b. gambiense* é utilizar uma combinação de eflornitina e nifurtimox (Buscher, Cecchi et al., 2017).

## 1.2 Parasitas

O *T. cruzi* e o *T. brucei* pertencem ao reino protista, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae, gênero *Trypanosoma* (Adl, Simpson et al., 2012).

### 1.2.1 *T. cruzi*

Dentro da espécie *T. cruzi* ocorreram várias recombinações genéticas que dificultam as subdivisões filogenéticas, além do mais algumas linhagens podem apresentar um genoma híbrido. Desta forma as diferentes linhagens sub-específicas do *T. cruzi* são atualmente classificadas pela maior similaridade genética em seis *discrete typing units* (DTUs). As DTUs foram denominadas TcI a TcVI, o que permite um melhor entendimento e uma melhor comunicação dentro da comunidade científica (Zingales, Miles et al., 2012). De forma geral, os isolados, cepas e clones dentro de cada DTU compartilham algumas características biológicas como tropismo, presença em determinadas regiões geográficas, virulência e preferência pelo hospedeiro mamífero.

O *T. cruzi* apresenta um ciclo de vida complexo, visto que pode alternar entre dois hospedeiros completamente diferentes: hospedeiros vertebrados e invertebrados. Além do mais apresenta vários estágios durante o seu ciclo de vida com características morfológicas e bioquímicas diferentes. Nos hospedeiros mamíferos, dentre os quais o homem está incluído, são descritos três estágios principais com base em critérios morfológicos como a forma fusiforme, a posição do cinetoplasto (estrutura contendo o DNA da única mitocôndria presente no parasita) relativo ao núcleo e a região onde emerge o flagelo (Silber, Colli et al., 2005). Os estágios encontrados no hospedeiro mamífero são:

#### 1.2.1.1 *Amastigota*

Estágio intracelular replicativo, caracterizado pela forma arredondada, mede de 2-6 µm de diâmetro, apresenta um incipiente flagelo e são encontradas no citoplasma da célula do hospedeiro vertebrado.

#### 1.2.1.2 *Tripomastigota*

É um estágio infectivo, não replicativo, encontrado na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, mede aproximadamente 18  $\mu\text{m}$  de comprimento, incluindo o extremo livre do flagelo de aproximadamente 6  $\mu\text{m}$ , e 2-3  $\mu\text{m}$  de largura.

#### 1.2.1.3 *Epimastigota intracelular*

É um estágio transitente entre o amastigota e o tripomastigota, encontrado no citoplasma da célula do hospedeiro mamífero, também com capacidade replicativa, mede aproximadamente 5,4  $\mu\text{m}$  e apresenta um pequeno flagelo. O epimastigota intracelular compartilha várias características morfológicas e bioquímicas com o epimastigota encontrado no inseto vetor (Almeida-de-Faria, Freymuller et al., 1999).

No hospedeiro invertebrado, os insetos hematófagos da família Reduviidae, encontram-se principalmente dois estágios do *T. cruzi*:

#### 1.2.1.4 *Epimastigota*

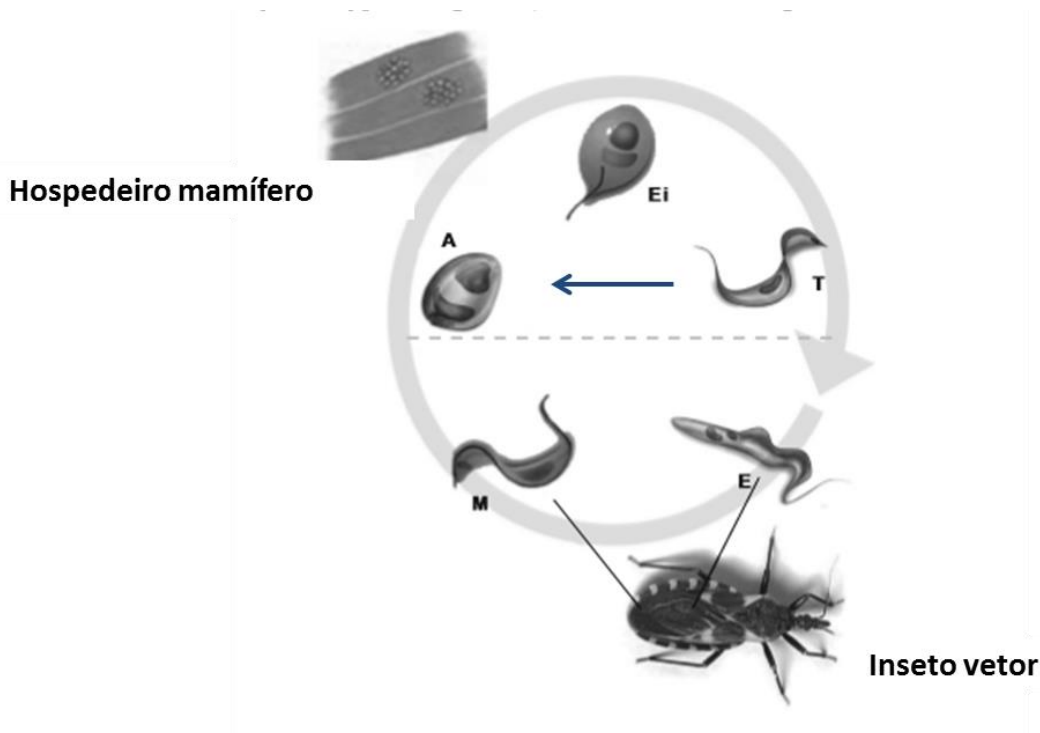
Estágio replicativo, flagelado, mede aproximadamente 20-40  $\mu\text{m}$  de comprimento e 2-5  $\mu\text{m}$  de largura, e está presente no intestino médio do hospedeiro invertebrado.

#### 1.2.1.5 *Tripomastigota metacíclico*

Estágio não replicativo, infectivo, resultante da diferenciação de formas epimastigotas, presente na porção final do intestino do inseto vetor. Mede aproximadamente 18  $\mu\text{m}$ , incluindo o flagelo. Este estágio é excretado juntamente com as fezes do inseto vetor, causando a infecção no hospedeiro mamífero.

Didaticamente, pode-se assumir que o ciclo de vida do parasita (Figura 3), tem início quando formas tripomastigotas, presentes na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, são ingeridas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo. No intestino do inseto, essas formas se diferenciam em epimastigotas, e na porção terminal do intestino, essas formas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Quando o inseto pica o hospedeiro vertebrado e

inicia um novo repasto sanguíneo, concomitantemente elimina as formas tripomastigotas metacíclicas junto das fezes e urina. Uma vez em contato com o hospedeiro mamífero, os tripomastigotas metacíclicos são internalizados através de pequenas lesões na pele, causadas pelo próprio hospedeiro. Os tripomastigotas para sobreviverem e estabelecerem a infecção precisam obrigatoriamente invadir as células do hospedeiro mamífero. Dentro das células, os parasitas diferenciam para formas amastigotas. Após aproximadamente 96 h os amastigotas começam a se diferenciar para tripomastigotas, passando transientemente pelo estágio epimastigota intracelular. Uma vez novamente diferenciado para tripomastigotas, esses parasitas são liberados na corrente sanguínea pela ruptura da célula, e podem invadir novas células no mesmo hospedeiro mamífero ou serem ingeridos pelo vetor durante o seu repasto sanguíneo, continuando assim o seu ciclo de vida (De Souza, 2002; Silber, Colli et al., 2005; Paes, Mantilla et al., 2011; Rassi, Rassi et al., 2012; Bern, 2015; Perez-Molina, Molina, 2017).

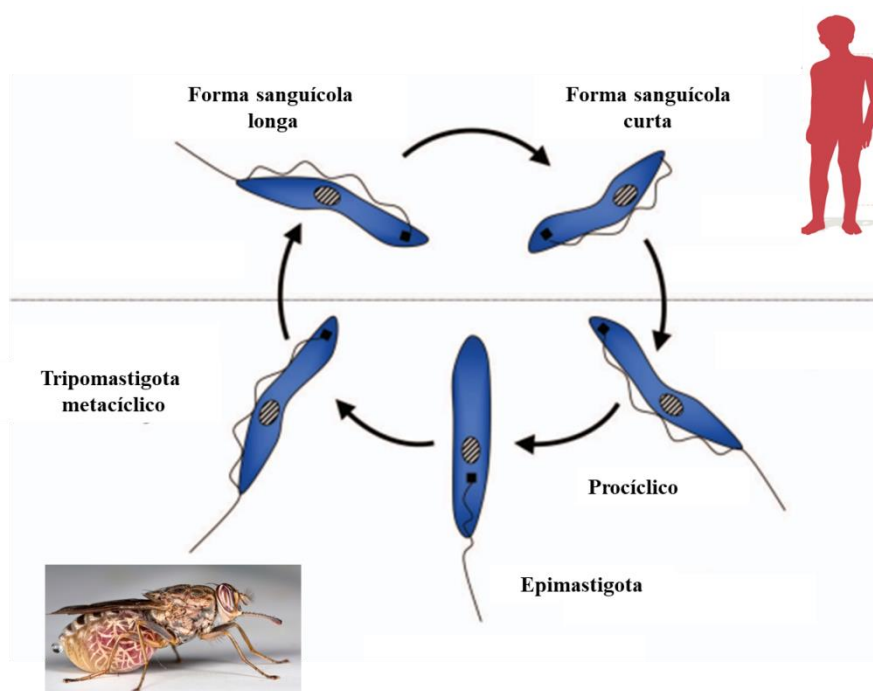


**Figura 3 - Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*.** O ciclo de vida do parasita alterna entre um hospedeiro mamífero e um inseto vetor. Formas encontradas no hospedeiro mamífero: **A**- amastigota, **EI**- epimastigota intracelular, **T**- tripomastigota. Formas encontradas no inseto vetor: **E**- epimastigota e **M**- tripomastigota metacíclico. Adaptado de (Paes, Mantilla et al., 2011).

### 1.2.2 *T. brucei*

A espécie *T. brucei* inclui três subespécies: o *T. brucei brucei* que acomete animais domésticos e selvagens, o *T. brucei rhodesiense* e *T. brucei gambiense* que afetam os seres humanos.

O ciclo de vida deste parasita alterna também entre dois hospedeiros: um hospedeiro mamífero e um inseto vetor, hospedeiro intermediário, que transmite a infecção para um novo hospedeiro mamífero. O *T. brucei* é um parasita extracelular em ambos os hospedeiros. A infecção começa quando formas metacíclicas, presente nas glândulas salivares da mosca, são injetadas no hospedeiro mamífero durante a picada do inseto. Uma vez na corrente sanguínea se diferenciam para as formas tripomastigotas sanguícolas longas (*long slender*), que são formas replicativas, e se disseminam pela corrente sanguínea e sistema linfático podendo se infiltrar em tecidos e órgãos, chegando a atingir o sistema nervoso central. Alguns tripanossomas sanguícolas se diferenciam para uma forma curta, não replicativa (*short stumpy*). Ambas as formas são ingeridas pela mosca *tsetse* juntamente com o sangue durante o repasto sanguíneo do inseto. Porém no intestino da mosca, só as formas *stumpy* sobreviverão e se diferenciarão para as formas procíclicas (replicativas), seguida da diferenciação para formas epimastigotas (também replicativas), que colonizam as glândulas salivares. Nesse local, após multiplicação, os parasitas se diferenciarão novamente para tripomastigotas metacíclicos, que serão transmitidos para um novo hospedeiro mamífero em um novo repasto sanguíneo, continuando assim o ciclo de vida (Bringaud, Riviere et al., 2006; Duszenko, Ginger et al., 2011; Mogk, Bosselmann et al., 2017).



**Figura 4 - Ciclo de vida do *Trypanosoma brucei*.** O ciclo de vida do parasita alterna entre um hospedeiro mamífero e um inseto vetor. Formas encontradas no hospedeiro mamífero: formas sanguíneas longas e curtas. Formas encontradas no inseto vetor: tripomastigota procíclico; epimastigota e tripomastigota metacíclico. Adaptado de (Duszenko, Ginger et al., 2011).

### 1.3 Papel dos aminoácidos em *T. cruzi* e *T. brucei*

#### 1.3.1 *T. cruzi*

O *T. cruzi*, durante o ciclo de vida adapta o seu metabolismo de acordo com a disponibilidade de nutrientes nos diferentes ambientes pelos quais transita. Os diferentes estágios transitam em ambientes ricos em Glicose (Glc), como a corrente sanguínea do hospedeiro mamífero, e ambientes apenas com a disponibilidade de aminoácidos como fonte de energia e carbono, como a porção terminal do trato digestivo do inseto vetor (Silber, Colli et al., 2005). Estudos *in vitro* mostram que as formas epimastigotas preferencialmente catabolizam glicose durante a fase exponencial de crescimento, e quando exposta a estresse nutricional ocorre uma mudança para o metabolismo baseado no consumo de aminoácidos, com produção de amônia (Cazzulo, 1994; Barison, Rapado et al., 2017). De fato, no intestino do inseto vetor o parasita enfrenta mudanças como a escassez progressiva de nutrientes a

medida que estes são retirados pelas células epiteliais. Como resultado da sua adaptação a esta variável, os parasitas entrariam em fase estacionária de crescimento. Foi mostrado que nessa fase, os parasitas apresentam uma mudança no perfil metabólico quando comparado com a fase exponencial, mudanças estas relacionadas ao seu metabolismo energético (aminoácidos, carboidratos e intermediários do ciclo de Krebs) assim como em relação ao balanço redox (Cazzulo, 1994; Tetaud, Bringaud et al., 1994; Barison, Rapado et al., 2017).

Além da participação como fonte de energia e carbono, os aminoácidos estão envolvidos em processos biológicos importantes para outros estágios do ciclo de vida do parasita. Já foi descrita a participação do glutamato (Glu), Prolina (Pro) e aspartato (Asp) na metaciclologênese, ou seja, na diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas (Contreras, Salles et al., 1985; Homsy, Granger et al., 1989). Como também já foi descrito que a adição dos aminoácidos leucina (Leu) e isoleucina (Ile) no meio de diferenciação *in vitro*, inibem a metaciclologênese promovida pela Pro. Estes aminoácidos são descritos como inibidores do catabolismo da Pro (Homsy, Granger et al., 1989). A Pro também está envolvida no processo de diferenciação das formas epimastigotas intracelulares para tripomastigotas. Além do mais foi demonstrado que no ciclo intracelular ocorre uma mudança de metabolismo, de um metabolismo baseado no consumo de Glc em formas tripomastigotas para um metabolismo baseado no consumo de Pro em formas amastigotas (Tonelli, Silber et al., 2004; Silber, Tonelli et al., 2009). Também já foi mostrado que a Pro é importante para a proliferação dos parasitas como também tem uma participação relevante na resistência ao estresse oxidativo e nutricional (Magdaleno, Ahn et al., 2009; Paes, Suarez Mantilla et al., 2013; Saye, Miranda et al., 2014). Recentemente foi descrita a participação da Pro e do seu intermediário metabólico pirrolina-5-carboxilato (P5C), como substratos mitocondriais e também a sua participação na invasão celular pelo parasita e o efeito de proteção do mesmo quando exposto a estresse oxidativo (Paes, Suarez Mantilla et al., 2013; Mantilla, Paes et al., 2015). Pro, glicina (Gly), alanina (Ala) e Glu são descritos como importantes nos processos de osmorregulação e controle do volume celular (Rohloff, Rodrigues et al., 2003; Rohloff, Montalvetti et al., 2004).

Outro caso de interesse é o do metabolismo de arginina (Arg) que participa da administração dos recursos energéticos do parasita. A enzima arginina quinase cataliza a reação reversível de transfosforilação entre ATP e Arg, rendendo ADP e fosfoarginina. Isso permite a reciclagem do nucleotídeo sem perder a união de alta energia, de forma análoga ao que acontece com a fosforilação de creatina pela creatina quinase em mamíferos (Pereira, Alonso et al., 2000; Pereira, Alonso et al., 2002). A superexpressão da arginina quinase em *T.*

*cruzi* aumenta a resistência dos parasitas a condições de estresse nutricional e pH, além de aumentar a proliferação em relação ao controle, o que sugere que a arginina quinase é importante para a adaptação do parasita a mudanças no ambiente (Pereira, Alonso et al., 2003).

Um aspecto importante da função dos aminoácidos em *T. cruzi* é a sua função como fontes oxidáveis para a produção de energia. Tem sido demonstrado que Pro, Glu e Asp são utilizados pelo *T. cruzi* como fonte energética e de obtenção de outros metabólitos (Sylvester, Krassner, 1976). Leu, Ile, glutamina (Gln) e asparagina (Asn) tem participação no metabolismo energético e acredita-se que esses aminoácidos podem ser convertidos a Asp ou Glu e incorporados ao Ciclo de Krebs, após deaminação na mitocôndria. O Glu também pode ser convertido a  $\alpha$ -cetogluturato pela ação da enzima glutamato desidrogenase (Zelada, Montemartini et al., 1996).

A participação da histidina (His) na bioenergética e na recuperação de formas epimastigotas após longos períodos de estresse nutricional foi descrita recentemente (Barison, Damasceno et al., 2016). Neste mesmo trabalho também foi demonstrado que a His é oxidada completamente com produção de CO<sub>2</sub>, aumentando o potencial de membrana mitocondrial, estimulando o consumo de O<sub>2</sub>, sustentando a produção de ATP. Em síntese, nota-se a grande importância dos múltiplos papéis dos aminoácidos e conseqüentemente de seus reguladores em vários processos biológicos importantes para todos os estágios do *T. cruzi*, tais como proliferação, diferenciação, infectividade e resistência a diferentes tipos de estresse.

Para que os aminoácidos sejam metabolizados pelos parasitas, os mesmos devem ser obtidos por meio da biossíntese a partir de precursores metabólicos ou obtidos pelo transporte a partir do meio extracelular (Silber, Colli et al., 2005). A incorporação de vários aminoácidos pelo *T. cruzi* tem sido descrita na literatura. O transporte de Pro apresenta dois sistemas de incorporação: o sistema A, de alta afinidade é dependente do gradiente de prótons, e o sistema B de baixa afinidade, é dependente de ATP (Silber, Tonelli et al., 2002). O transporte de Glu também já foi descrito e foi demonstrado que o mesmo é dependente do pH extracelular, sendo observada uma maior incorporação do aminoácido em pH 5,0 (Silber, Rojas et al., 2006). Leu, Ile e valina (Val) são transportados por um único sistema que é capaz de reconhecer os três aminoácidos ramificados, sendo energizado pelo gradiente de H<sup>+</sup> (Manchola, Rapado et al., 2016). O transporte de His também já foi caracterizado demonstrando que o parasita é capaz de internalizar esse aminoácido por um transportador específico, sendo um transporte ativo dependente dos níveis de ATP do parasita (Barison, Damasceno et al., 2016). Já a Arg pode ser transportada por dois sistemas, sendo um de alta



afinidade (Pereira, Alonso et al., 1999) e outro de baixa afinidade (Canepa, Silber et al., 2004). Lys também pode ser incorporada pelo *T. cruzi* a partir do meio extracelular (Pereira, Alonso et al., 1999), enquanto que o transporte de Asp é dependente de H<sup>+</sup> (Canepa, Bouvier et al., 2005).

### **1.3.2 *T. brucei***

A participação dos aminoácidos no metabolismo energético de *T. brucei* tem sido descrita para as formas procíclicas, presentes no hospedeiro invertebrado, mas não participam do metabolismo energético nas formas sanguícolas, visto que o ciclo de Krebs não é funcional nestas formas (Bienen, Hammadi et al., 1981). Formas sanguícolas dependem da glicólise para produção de ATP, que é essencial para manutenção da sua viabilidade e proliferação (Ryley, 1962; Hannaert, Michels, 1994; Michels, Hannaert, 1994; Mazet, Morand et al., 2013). Formas procíclicas de *T. brucei* utilizam tanto Glc quanto aminoácidos como fonte de energia, aminoácidos como treonina (Thr), Glu e Pro são utilizados pelo parasita, que excreta Ala, succinato e piruvato como produtos resultantes do seu metabolismo (Cross, Klein et al., 1975; Lamour, Riviere et al., 2005; Bringaud, Barrett et al., 2012).

Uma análise do genoma de *T. brucei* mostrou que o parasita é provavelmente auxotrófico para os aminoácidos tirosina (Tyr), Gly, triptofano (Trp), fenilalanina (Phe), lisina (Lys), Arg, His, Leu, Val e Ile. A análise também mostrou que há diferenças em vias metabólicas importantes em comparação com as vias presentes em humanos, por exemplo, o parasita tem possibilidade de converter Asp em metionina (Met) ou Thr, diminuindo a dependência desses metabólitos no meio externo. Chama atenção também que aparentemente o parasita não apresenta as vias de conversão de Asn para Asp; Phe para Tyr e nem de serina (Ser) para Gly (Chaudhary, Roos, 2005).

O transporte de Arg e Lys já foi caracterizado em *T. brucei*. Esses transportadores são específicos, de alta afinidade, funcionais tanto em formas procíclicas quanto em formas sanguícolas (Mathieu, Macedo et al., 2017). O transporte de Pro em formas procíclicas de *T. brucei* também já foi caracterizado: é um único sistema de transporte ativo, dependente de ATP e pode ser inibido principalmente por Ala (51%) e cisteína (Cys) (35%), (L'Hostis, Geindre et al., 1993). O transporte de Met em *T. b. brucei* e *T. b. rhodesiense* foi caracterizado e foi demonstrado que a incorporação da Met em proteínas é maior em *T. b. brucei* do que em *T. b. rhodesiense* (Goldberg, Rattendi et al., 2000).

Recentemente foi demonstrado que o metabolismo de Pro é essencial para a sobrevivência das formas procíclicas no hospedeiro invertebrado. Parasitas *knockdown* para enzima pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (P5CDH), segunda enzima da via de degradação da Pro, não foram capazes de colonizar o intestino do inseto vetor (Bringaud, Barrett et al., 2012; Mantilla, Marchese et al., 2017), demonstrando assim a importância desse aminoácido para as formas procíclicas.

De forma geral, nota-se que os aminoácidos tem uma relevante importância também para o *T. brucei*, tanto para os estágios presentes no hospedeiro invertebrado como para os estágios presentes no hospedeiro mamífero.

#### **1.4 Glutamina e glutamina sintetase**

A L-glutamina é a isoforma funcional do aminoácido Gln que é metabolizado por muitos organismos. Trabalhos distintos propõem que, em praticamente todos os seres vivos, a Gln participa no controle da utilização de nitrogênio dentro das células, sendo essa sua principal função em *Saccharomyces cerevisiae* (Soberon, Gonzalez, 1987) e em integrantes do filo Cyanobacteria (Ames, Breaker, 2011). Em *Escherichia coli* a enzima glutamina sintetase (GS) é considerada a responsável pelo equilíbrio entre Gln e  $\alpha$ -cetoglutarato na célula (Hart, Madar et al., 2011). Em células proliferativas, como células tumorais, Glc e Gln são as duas fontes primárias de carbono para produção de ATP e biossíntese. Gln também serve como um doador essencial de nitrogênio para a síntese de nucleotídeos, alguns outros aminoácidos e nicotinamida, além de participar também da síntese de proteínas. O destino metabólico da Gln pode ser dividido em reações que usam o  $\gamma$ -nitrogênio (síntese de nucleotídeos e hexosaminas) e a reações que usam  $\alpha$ -nitrogênio ou o esqueleto de carbono (reações que usam o Glu resultante da primeira reação que utilizou Gln como substrato, e não a própria Gln) (DeBerardinis, Cheng, 2010). Gln é o aminoácido livre mais abundante no plasma e no músculo esquelético, com uma concentração extracelular de Gln é aproximadamente 0,7 mM (enquanto que a de Glu é aproximadamente 20  $\mu$ M). No entanto dentro da célula a concentração de Glu é maior do que a concentração de Gln, sendo reportado entre 2 e 20 mM, devido a ação da enzima glutaminase que converte Gln a Glu logo que entra na célula. Em alguns tecidos como o fígado e o músculo esquelético, Glu e  $\text{NH}_4^+$  são utilizados para a síntese de Gln pela ação da enzima GS, que atua na detoxificação da amônia (Newsholme, Lima et al., 2003; Xi, Jiang et al., 2011). No cérebro, a enzima GS está envolvida com a regulação da quantidade de Glu, visto que, quando o mesmo está em excesso é prejudicial

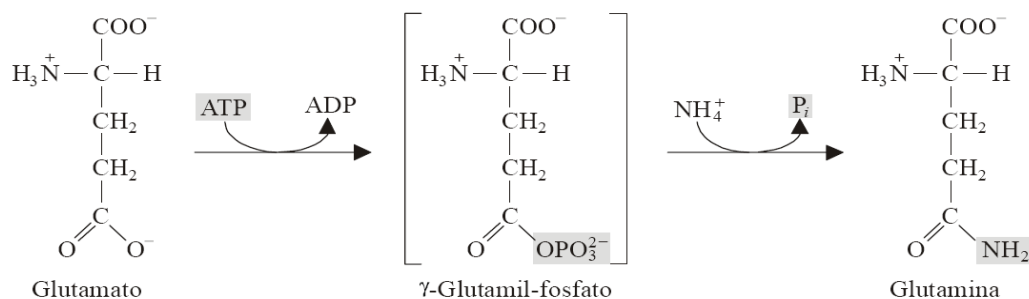
para a função cerebral. De fato a GS é fundamental para a rápida retirada de Glu dos espaços intersinápticos nas sinapses glutamatérgicas mediante a sua conversão para Gln, o que permite a re-sensibilização da sinapse depois de cada estímulo (Suarez, Bodega et al., 2002; Mates, Segura et al., 2009). Em células tumorais, a Gln é o substrato mitocondrial primário e é necessário para a manutenção do potencial de membrana e consequentemente da integridade mitocondrial (Mates, Segura et al., 2009; Szeliga, Obara-Michlewska, 2009; DeBerardinis, Cheng, 2010; Wise, Thompson, 2010). A expressão do gene de GS em *Escherichia coli* é altamente regulada pela necessidade de nitrogênio. A Gln ainda pode ser utilizada como base para síntese de moléculas ricas em nitrogênio, tais como nucleotídeos e aminoácidos, essenciais para a manutenção celular (Goodsell, 2002). A Gln também participa da via de hexosaminas pela ação da enzima glucosamina: frutose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA) que é responsável pela transferência do grupo amida da Gln para a frutose-6-fosfato formando glucosamina-6-fosfato que é precursor de reações de glicosilação como *N-linked* e *O-linked* (DeBerardinis, Cheng, 2010). Gln também é importante para *Toxoplasma gondii*, parasita intracelular obrigatório, participando da replicação, viabilidade e manutenção da infecção em células dendríticas (Lee, Evans et al., 2014), como também é catabolizada de forma canônica pelo ciclo de Krebs em *Plasmodium falciparum*, tanto no estágio sexual como no asexual (MacRae, Dixon et al., 2013).

Em *T. cruzi* e *T. brucei*, durante a degradação de aminoácidos ocorre um acúmulo de  $\text{NH}_4^+$  na célula, como sub-produto da sua deaminação (Cross, Klein et al., 1975; Cazzulo, 1994). Uma via clássica para processar o excesso de  $\text{NH}_4^+$  produzido metabolicamente é a sua detoxificação através do ciclo da ureia. Porém, foi demonstrado que o ciclo da ureia não é operativo em *T. cruzi* (Yoshida, Camargo, 1978) e não há predições de sequências codificantes para enzimas deste ciclo em *T. brucei*. Foi observado que o excesso de  $\text{NH}_4^+$  pode ser excretado para o meio extracelular ou o  $\text{NH}_4^+$  também pode ser transferido ao  $\alpha$ -cetogluturato formando Glu mediante a ação das enzimas glutamato desidrogenases citoplásmicas e mitocondriais (Caldas, Araujo et al., 1980; Duschak, Cazzulo, 1991). A reciclagem do  $\alpha$ -cetogluturato acontece por transaminação, processo no qual o Glu funciona como doador do grupo  $-\text{NH}_2$  a piruvato, formando alanina, um dos principais subprodutos do metabolismo de aminoácidos de *T. cruzi* e *T. brucei* (Cross, Klein et al., 1975; Cazzulo, 1994).

As formas sanguícolas de *T. brucei* e as formas tripomastigotas sanguícolas de *T. cruzi* utilizam preferencialmente a Glc, que é abundante nos fluídos de seus hospedeiros vertebrados (Besteiro, Barrett et al., 2005; Silber, Tonelli et al., 2009). Já as formas amastigotas de *T. cruzi*, estágio replicativo, encontradas no citoplasma das células do

hospedeiro mamífero, ambiente pobre em Glc, usam a Pro e talvez outros aminoácidos, como fonte de carbono e energia. As formas amastigotas apresentam uma maior quantidade de Pro intracelular quando comparadas com as formas tripomastigotas (Tonelli, Silber et al., 2004; Magdaleno, Ahn et al., 2009). Aminoácidos como Thr, Gln, Glu e Pro são utilizados pelo *T. brucei*, que excreta Ala, succinato e piruvato como produtos do metabolismo (Cross, Klein et al., 1975; Mantilla, Marchese et al., 2017).

Considerando que a configuração do metabolismo de *T. cruzi* e *T. brucei* leva à produção de  $\text{NH}_4^+$ , que em grandes quantidades é tóxico para a célula, e que os mecanismos de detoxificação conhecidos são limitados, pois exigem o consumo de metabólitos reduzidos como piruvato e  $\alpha$ -cetoglutarato, fica evidente a necessidade do parasita utilizar vias alternativas e/ou complementares para a detoxificação, reciclagem ou redistribuição da amônia. Uma das vias alternativas para detoxificação de  $\text{NH}_4^+$ , que tem sido explorada no laboratório é a amidação de Glu para produzir Gln, reação irreversível catalizada pela enzima *TcGS* (Figura 5) que utiliza Glu,  $\text{NH}_4^+$  e ATP como substratos.



**Figura 5 - Representação da reação catalizada pela enzima glutamina sintetase.** A reação ocorre com fosforilação do Glu pelo ATP formando o intermediário  $\gamma$ -Glutamil-fosfato, que reage com  $\text{NH}_4^+$  formando fosfato inorgânico ( $\text{P}_i$ ) e Gln.

Dados ainda não publicados demonstram que em *T. cruzi* a enzima GS é ativa e sintetiza Gln a partir de Glu, ATP e  $\text{NH}_4^+$ , sendo mais expressa no estágio amastigota, que é intracelular. Também foi demonstrado que o tratamento de células CHO-K<sub>1</sub>, infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi*, com o inibidor da enzima GS, metionina sulfoximine (MS), inibiu a evasão dos parasitas do vacúolo parasitóforo e diminuiu a eclosão das formas tripomastigotas, de forma dose-dependente ( $\text{EC}_{50} = 20,02 \pm 0,91 \mu\text{M}$ ), quando comparado

com o controle. Além do mais a inibição da GS com a MS em formas epimastigotas, estágio encontrado no inseto vetor, faz com que os parasitas sejam mais sensíveis à presença de amônia extracelular. Isto revela que a enzima GS participa da detoxificação de amônia nestes parasitas (Crispim et al\*).

Outro fato interessante referente ao metabolismo de Gln e Glu, tanto em *T. cruzi* como em *T. brucei*, é que não há predição de sequências putativas referentes à enzimas envolvidas na conversão direta de Gln para Glu, ou seja, para a enzima glutaminase. No entanto, há predição para que a reciclagem de Glu ocorra mediante todas as reações que utilizam Gln como substrato, fazendo deste metabólito um doador do grupo  $-NH_2$  para outras vias importantes para sobrevivência dos parasitas. Dentre essas vias, já foi demonstrada a participação da Gln na síntese de pirimidinas em *T. cruzi* (Nara, Hashimoto et al., 2012).

Em *T. brucei* foi sugerido que a inibição da enzima citidina trifosfato sintetase (CTP sintetase), que cataliza a formação de CTP a partir de UTP, ATP e Gln, pode ser um importante alvo terapêutico (Tamborini, Pinto et al., 2012; Oliveira de Souza, Dawson et al., 2017). Também já foi descrito que a proliferação de formas sanguíneas de *T. brucei* é inibida de forma dose-dependente quando tratadas com um inibidor da enzima GMP sintase (Li, Leija et al., 2015), enzima esta que também utiliza Gln como um dos seus substratos e tem Glu como um dos seus produtos.

Todos estes dados demonstram que a Gln tem um papel relevante para vários tipos celulares e que a enzima GS tem um papel fundamental na detoxificação de amônia em vários organismos, incluindo o *T. cruzi*. Estas informações levam a hipótese de que a enzima GS pode apresentar um papel relevante na detoxificação de amônia também em *T. brucei*, e que a Gln pode ter uma participação fundamental em processos biológicos importantes para manutenção e viabilidade do *T. cruzi* e do *T. brucei*, levando-nos a propor os seguintes objetivos:

---

\* Crispim, M.; Damasceno, F.S.; Hernández, A.; Barisón, M.J.; Sauter, I.P.; Pavani, R.S.; Moura, A.S.; Pral, E.M.F.; Cortez, M.; Elias, M.C.; Silber, A.M.; The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is required for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. Submitted.

## **CAPÍTULO 5: CONCLUSÕES**

---

Considerando todos os resultados apresentados neste trabalho, pode-se concluir que:

- A incorporação de Gln pelo *T. cruzi*, desde o meio extracelular, é realizada por um sistema de transporte único, saturável, dependente de ATP e do gradiente de prótons da membrana do parasita, sendo mais ativo nas formas epimastigotas presentes tanto do hospedeiro mamífero, quanto no hospedeiro invertebrado.
- O transporte de Gln é compensatório da atividade da enzima TbGS, sendo necessários os dois processos para fornecer ao parasita a quantidade de Gln requerida ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*, dependendo da disponibilidade da Gln no meio extracelular e/ou das necessidades metabólicas da célula.
- Gln participa do metabolismo energético do *T. cruzi*, sendo capaz de manter os níveis de ATP intracelular e a viabilidade celular.
- A Gln é capaz de promover o processo de diferenciação de formas epimastigotas para tripomastigotas metacíclicas, resultando em parasitas viáveis capazes de estabelecer a infecção nas células do hospedeiro mamífero e completarem o ciclo intracelular.
- O tratamento de formas epimastigotas com análogos estruturais da Gln (ACV, AZA e DPA) inibe a proliferação de forma dose-dependente e induz a morte dos parasitas com características de necrose e apoptose.
- Os análogos estruturais de Gln também interferem no ciclo intracelular do parasita, demonstrando que a Gln tem uma participação relevante neste processo.
- A enzima GF6PA de *T. cruzi* foi inibida completamente pelo análogo AZA e de forma parcial pelos análogos ACV e DPA, demonstrando que Gln efetivamente participa desta via no parasita.
- *T. brucei* apresenta a capacidade de incorporar Gln a partir do meio externo.
- A enzima TbGS é ativa em formas sanguícolas de *T. brucei*, mas não é capaz de suprir a quantidade de Gln requerida pelo parasita.
- Gln é um metabólito fundamental para a proliferação das formas sanguícolas de *T. brucei*.
- Gln participa do processo de poliglutamilação da tubulina de *T. brucei*.

- Mecanismos envolvidos no processo de citocinese das formas sanguíneas de *T. brucei* são dependentes da concentração de Gln no meio extracelular.

Gln é um aminoácido extremamente importante para os tripanossomatídeos *T. cruzi* e *T. brucei*, principalmente para processos relacionados à proliferação dos parasitas. Resultados apresentados neste trabalho sugerem que as vias metabólicas dependentes de Gln apresentam potencial para serem exploradas como possíveis alvos terapêuticos.



## REFERÊNCIAS\*

Adl SM, Simpson AG, Lane CE, Lukes J, Bass D, Bowser SS, Brown MW, Burki F, Dunthorn M, Hampl V, Heiss A, Hoppenrath M, Lara E, Le Gall L, Lynn DH, Mcmanus H, Mitchell EA, Mozley-Stanridge SE, Parfrey LW, Pawlowski J, Rueckert S, Shadwick L, Schoch CL, Smirnov A, Spiegel FW. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol.* 2012;59(5):429-93.

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

Ames TD, Breaker RR. Bacterial aptamers that selectively bind glutamine. *RNA Biol.* 2011;8(1).

Barison MJ, Damasceno FS, Mantilla BS, Silber AM. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. *J Bioenerg Biomembr.* 2016;48(4):437-49.

Barison MJ, Rapado LN, Merino EF, Furusho Pral EM, Mantilla BS, Marchese L, Nowicki C, Silber AM, Cassera MB. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Biol Chem.* 2017;292(21):8964-77.

Bern C. Chagas' Disease. *N Engl J Med.* 2015;373(5):456-66.

Bern C, Verastegui M, Gilman RH, Lafuente C, Galdos-Cardenas G, Calderon M, Pacori J, Del Carmen Abastoflor M, Aparicio H, Brady MF, Ferrufino L, Angulo N, Marcus S, Sterling C, Maguire JH. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis.* 2009;49(11):1667-74.

Besteiro S, Barrett MP, Riviere L, Bringaud F. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei*: metabolism in flux. *Trends Parasitol.* 2005;21(4):185-91.

Bienen EJ, Hammadi E, Hill GC. *Trypanosoma brucei*: biochemical and morphological changes during in vitro transformation of bloodstream- to procyclic-trypomastigotes. *Exp Parasitol.* 1981;51(3):408-17.

Boscardin SB, Torrecilhas AC, Manarin R, Revelli S, Rey EG, Tonelli RR, Silber AM. Chagas' disease: an update on immune mechanisms and therapeutic strategies. *J Cell Mol Med.* 2010;14(6B):1373-84.

Bringaud F, Barrett MP, Zilberstein D. Multiple roles of proline transport and metabolism in trypanosomatids. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:349-74.

---

\* 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>.

Bringaud F, Riviere L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;149(1):1-9.

Buguet A, Bourdon L, Bouteille B, Cespuglio R, Vincendeau P, Radomski MW, Dumas M. The duality of sleeping sickness: focusing on sleep. *Sleep Med Rev.* 2001;5(2):139-53.

Buscher P, Cecchi G, Jamonneau V, Priotto G. Human African trypanosomiasis. *Lancet.* 2017.

Caldas RA, Araujo EF, Felix CR, Roitman I. Incorporation of ammonium in amino acids by *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol.* 1980;66(2):213-6.

Canepa GE, Bouvier LA, Urias U, Miranda MR, Colli W, Alves MJ, Pereira CA. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;247(1):65-71.

Canepa GE, Silber AM, Bouvier LA, Pereira CA. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236(1):79-84.

Cazzulo JJ. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 1994;26(2):157-65.

Chagas C. Neue Trypanosomen. Vorläufige Mitteilung *Arc. Schiff. Tropenhyg.* 1909;13:120-22.

Chatelain E. Chagas disease research and development: Is there light at the end of the tunnel? *Comput Struct Biotechnol J.* 2017;15:98-103.

Chaudhary K, Roos DS. Protozoan genomics for drug discovery. *Nat Biotechnol.* 2005;23(9):1089-91.

Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.* 1985;16(3):315-27.

Coura JR. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(8):962-7.

Cross GA, Klein RA, Linstead DJ. Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. *Parasitology.* 1975;71(2):311-26.

De Souza W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Pharm Des.* 2002;8(4):269-85.

Deberardinis RJ, Cheng T. Q's next: the diverse functions of glutamine in metabolism, cell biology and cancer. *Oncogene.* 2010;29(3):313-24.

Docampo R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas disease. *Curr. Pharm. Des.* 2001;7(12):1157-64.

Duschak VG, Cazzulo JJ. Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol. Lett.* 1991;67(2):131-5.

Duszenko M, Ginger ML, Brennan A, Gualdrón-Lopez M, Colombo MI, Coombs GH, Coppens I, Jayabalasingham B, Langsley G, De Castro SL, Menna-Barreto R, Mottram JC, Navarro M, Rigden DJ, Romano PS, Stoka V, Turk B, Michels PA. Autophagy in protists. *Autophagy.* 2011;7(2):127-58.

Filigheddu MT, Gorgolas M, Ramos JM. Orally-transmitted Chagas disease. *Med Clin (Barc).* 2017;148(3):125-31.

Gascon J, Bern C, Pinazo MJ. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 2010;115(1-2):22-7.

Goldberg B, Rattendi D, Lloyd D, Yarlett N, Bacchi CJ. Kinetics of methionine transport and metabolism by *Trypanosoma brucei brucei* and *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Arch Biochem Biophys.* 2000;377(1):49-57.

Goodsell DS. Glutamine Synthetase. 2002.

Hannaert V, Michels PA. Structure, function, and biogenesis of glycosomes in kinetoplastida. *J Bioenerg Biomembr.* 1994;26(2):205-12.

Hart Y, Madar D, Yuan J, Bren A, Mayo AE, Rabinowitz JD, Alon U. Robust control of nitrogen assimilation by a bifunctional enzyme in *E. coli*. *Mol Cell.* 2011;41(1):117-27.

Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool.* 1989;36(2):150-3.

Kribs-Zaleta C. Estimating contact process saturation in sylvatic transmission of *Trypanosoma cruzi* in the United States. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4(4):e656.

L'hostis C, Geindre M, Deshusses J. Active transport of L-proline in the protozoan parasite *Trypanosoma brucei brucei*. *Biochem. J.* 1993;291 ( Pt 1):297-301.

Lamour N, Riviere L, Coustou V, Coombs GH, Barrett MP, Bringaud F. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei* is down-regulated in the presence of glucose. *J. Biol. Chem.* 2005;280(12):11902-10.

Lee IP, Evans AK, Yang C, Works MG, Kumar V, De Miguel Z, Manley NC, Sapolsky RM. *Toxoplasma gondii* is dependent on glutamine and alters migratory profile of infected host

bone marrow derived immune cells through SNAT2 and CXCR4 pathways. PLoS One. 2014;9(10):e109803.

Li Q, Leija C, Rijo-Ferreira F, Chen J, Cestari I, Stuart K, Tu BP, Phillips MA. GMP synthase is essential for viability and infectivity of *Trypanosoma brucei* despite a redundant purine salvage pathway. Mol Microbiol. 2015;97(5):1006-20.

Macrae JI, Dixon MW, Dearnley MK, Chua HH, Chambers JM, Kenny S, Bottova I, Tilley L, Mcconville MJ. Mitochondrial metabolism of sexual and asexual blood stages of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. BMC Biol. 2013;11:67.

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).

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.

Manchola NC, Rapado LN, Barison MJ, Silber AM. Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. J Eukaryot Microbiol. 2016;63(3):299-308.

Mantilla BS, Marchese L, Casas-Sanchez A, Dyer NA, Ejeh N, Biran M, Bringaud F, Lehane MJ, Acosta-Serrano A, Silber AM. Proline Metabolism is Essential for *Trypanosoma brucei* Survival in the Tsetse Vector. PLoS Pathog. 2017;13(1):e1006158.

Mantilla BS, Paes LS, Pral EM, Martil DE, Thiemann OH, Fernandez-Silva P, Bastos EL, Silber AM. Role of Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2015;290(12):7767-90.

Mates JM, Segura JA, Campos-Sandoval JA, Lobo C, Alonso L, Alonso FJ, Marquez J. Glutamine homeostasis and mitochondrial dynamics. Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(10):2051-61.

Mathieu C, Macedo JP, Hurlimann D, Wirdnam C, Haindrich AC, Suter Grotemeyer M, Gonzalez-Salgado A, Schmidt RS, Inbar E, Maser P, Butikofer P, Zilberstein D, Rentsch D. Arginine and Lysine Transporters Are Essential for *Trypanosoma brucei*. PLoS One. 2017;12(1):e0168775.

Mazet M, Morand P, Biran M, Bouyssou G, Courtois P, Daulouede S, Millerioux Y, Franconi JM, Vincendeau P, Moreau P, Bringaud F. Revisiting the central metabolism of the bloodstream forms of *Trypanosoma brucei*: production of acetate in the mitochondrion is essential for parasite viability. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(12):e2587.

Michels PA, Hannaert V. The evolution of kinetoplastid glycosomes. J Bioenerg Biomembr. 1994;26(2):213-9.

Mogk S, Bosselmann CM, Mudogo CN, Stein J, Wolburg H, Duszenko M. African trypanosomes and brain infection - the unsolved question. *Biol Rev Camb Philos Soc.* 2017;92(3):1675-87.

Nara T, Hashimoto M, Hirawake H, Liao CW, Fukai Y, Suzuki S, Tsubouchi A, Morales J, Takamiya S, Fujimura T, Taka H, Mineki R, Fan CK, Inaoka DK, Inoue M, Tanaka A, Harada S, Kita K, Aoki T. Molecular interaction of the first 3 enzymes of the de novo pyrimidine biosynthetic pathway of *Trypanosoma cruzi*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012;418(1):140-3.

Newsholme P, Lima MMR, Procopio J, Pithon-Curi TC, Doi SQ, Bazotte RB, Curi R. Glutamine and glutamate as vital metabolites. *Braz J Med Biol Res.* 2003;36(2).

Njamnshi AK, Seke Etet PF, Perrig S, Acho A, Funsah JY, Mumba D, Muyembe JJ, Kristensson K, Bentivoglio M. Actigraphy in human African trypanosomiasis as a tool for objective clinical evaluation and monitoring: a pilot study. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012;6(2):e1525.

Oliveira De Souza J, Dawson A, Hunter WN. An Improved Model of the *Trypanosoma brucei* CTP Synthetase Glutaminase Domain-Acivicin Complex. *ChemMedChem.* 2017;12(8):577-79.

Paes LS, 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. *Curr Pharm Des.* 2011;17(20):2074-99.

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

Paho PaHO. General information - Cagas Disease. 2017.

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

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

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

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

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

Perez-Molina JA, Molina I. Chagas disease 2017.

Rassi A, Jr., Marin JaN, Rassi A. Chronic Chagas cardiomyopathy: a review of the main pathogenic mechanisms and the efficacy of aetiological treatment following the BENznidazole Evaluation for Interrupting Trypanosomiasis (BENEFIT) trial. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2017;112(3):224-35.

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

Rassi A, Marin-Neto. Chagas disease. *The Lancet.* 2010;375(9723):1388-402.

Rohloff P, Montalvetti A, Docampo R. Acidocalcisomes and the contractile vacuole complex are involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *J. Biol. Chem.* 2004;279(50):52270-81.

Rohloff P, Rodrigues CO, Docampo R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. *Mol. Biochem. Parasitol.* 2003;126(2):219-30.

Ryley JF. Studies on the metabolism of the protozoa. 9. Comparative metabolism of blood-stream and culture forms of *Trypanosoma rhodesiense*. *Biochem J.* 1962;85:211-23.

Saye M, Miranda MR, Di Girolamo F, De Los Milagros Camara M, Pereira CA. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. *PLoS One.* 2014;9(3):e92028.

Silber A, Tonelli R, Martinelli M, Colli W, Alves M. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2002;49(6):441-6.

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;5(1):53-64.

Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr. Drug. Targets. Infect. Disord.* 2005;5(1):53-64.

Silber AM, Rojas RL, Urias U, Colli W, Alves MJ. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. *Int. J. Parasitol.* 2006;36(2):157-63.

Silber AM, Tonelli RR, Lopes CG, Cunha-E-Silva N, Torrecilhas AC, Schumacher RI, Colli W, Alves MJ. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2009;168(1):102-8.

Soberon M, Gonzalez A. Glutamine degradation through the omega-amidase pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. J Gen Microbiol. 1987;133(1):9-14.

Suarez I, Bodega G, Fernandez B. Glutamine synthetase in brain: effect of ammonia. Neurochem Int. 2002;41(2-3):123-42.

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

Szeliga M, Obara-Michlewska M. Glutamine in neoplastic cells: focus on the expression and roles of glutaminases. Neurochem Int. 2009;55(1-3):71-5.

Tamborini L, Pinto A, Smith TK, Major LL, Iannuzzi MC, Cosconati S, Marinelli L, Novellino E, Lo Presti L, Wong PE, Barrett MP, De Micheli C, Conti P. Synthesis and biological evaluation of CTP synthetase inhibitors as potential agents for the treatment of African trypanosomiasis. ChemMedChem. 2012;7(9):1623-34.

Tanowitz HB, Scherer PE, Mota MM, Figueiredo LM. Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites? Trends Parasitol. 2017;33(4):276-84.

Tetaud E, Bringaud F, Chabas S, Barrett MP, Baltz T. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(17):8278-82.

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;6(8):733-41.

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

Urbina JA. Specific chemotherapy of Chagas disease: relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop. 2010;115(1-2):55-68.

Who WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). 2017.

Who WHO. Trypanosomiasis, human African (sleeping sickness). 2017.

Wise DR, Thompson CB. Glutamine addiction: a new therapeutic target in cancer. Trends Biochem Sci. 2010;35(8):427-33.

Xi P, Jiang Z, Zheng C, Lin Y, Wu G. Regulation of protein metabolism by glutamine: implications for nutrition and health. *Front Biosci.* 2011;16:578-97.

Yoshida N, Camargo EP. Ureotelism and ammonotelism in trypanosomatids. *J Bacteriol.* 1978;136(3):1184-6.

Yoshida N, Tyler KM, Llewellyn MS. Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. *Trends Parasitol.* 2011;27(10):459-66.

Zelada C, Montemartini M, Cazzulo JJ, Nowicki C. Purification and partial structural and kinetic characterization of an alanine aminotransferase from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1996;79(2):225-8.

Zingales B, Miles MA, Campbell DA, Tibayrenc M, Macedo AM, Teixeira MM, Schijman AG, Llewellyn MS, Lages-Silva E, Machado CR, Andrade SG, Sturm NR. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. *Infect Genet Evol.* 2012;12(2):240-53.