

MARCELL CRISPIM

Metabolismo de hexosaminas do *Trypanosoma cruzi*

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

São Paulo
2018

MARCELL CRISPIM

Metabolismo de hexosaminas do *Trypanosoma cruzi*

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

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro

Orientador: Prof. Dr. Ariel Mariano Silber

Versão original

São Paulo
2018

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Marcell Crispim

Título da Tese: Metabolismo de Hexosaminas do *Trypanosoma cruzi*

Orientador: Ariel Mariano Silber

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)** () **Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

Ao Maycon, Bruna, Luísa e Ruan

AGRADECIMENTOS

Ao Ariel pelos anos compartilhados, emoções vividas e etapas superadas, juntos.

Aos integrantes e ex-integrantes do LabTryps que me ajudaram em tantos momentos ao longo dessa caminhada.

À Cindy Vilas Boas pelo esforço incomensurável de percorrer três cidades para fazer a iniciação científica. Seu exemplo me inspira até hoje.

Ao Richard e ao Mayke por sempre estarem comigo, é sempre bom saber que se pode contar com o melhor amigo.

Aos grupos do Prof. Mauro Cortez, Prof. Carol Elias e Prof. Alejandro Katzin pelas colaborações em experimentos e ideias.

Aos apoios técnicos e por vezes psicológicos de Beth e Alexandre.

Aos meninos da UniqueFor2 por me abrirem a mente.

Aos colegas de departamento.

Aos meus queridos amigos e familiares.

Ao apoio financeiro da CAPES, CNPq e FAPESP.

Este trabalho foi desenvolvido com apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). Durante parte do tempo de duração deste trabalho, o laboratório pertenceu ao Instituto Nacional de Biotecnologia Estrutural e Química Medicinal em Doenças infecciosas (INBEQMeDI) e foi auxiliado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). Este trabalho também teve financiamento da FAPESP.

“De Joseps, Joans i ases n'hi ha a totes les cases.”

Provérbio catalão



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

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

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Papel funcional da glucosamina-6-fosfato sintase na via de biossíntese de nucleotídeos-açúcares e na infectividade de Trypanosoma cruzi*", registrado sob o protocolo nº **54/2015**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **23/11/2015** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais tem validade de **04 (quatro) anos** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Ariel Mariano Silber**

- Membros da Equipe: *Marcell Crispim (Pós-graduando), Manoel Aparecido Peres (Técnico de Laboratório)*

Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Functional role of glucosamine-6-phosphate synthase in the nucleotide sugar biosynthesis and infectivity of Trypanosoma cruzi*", protocol nº **54/2015**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for scientific research purposes, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8th, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **11/23/2015** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **04 (four) years** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Ariel Mariano Silber**

- Team members: *Marcell Crispim (Graduate student), Manoel Aparecido Peres (Laboratory Technician)*

If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	Balb/c	Macho/Male	45 dias/day	35

Profa. Dra. Luciane Valéria Sita
Vice-Coordenadora CEUA-ICB/USP

Eliane Aparecida G. M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

RESUMO

CRISPIM, M. **Metabolismo de hexosaminas do *Trypanosoma cruzi***. 2018. 118 p. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Ao longo do seu ciclo biológico, o *Trypanosoma cruzi* percorre diversos ambientes que exigem a utilização de carboidratos, aminoácidos e lipídeos para a obtenção de energia e para a síntese de outros metabólitos. Nesse contexto encontra-se a via de biossíntese de hexosaminas (HBP), uma via de quatro passos enzimáticos que culmina na formação de UDP-GlcNAc, metabólito crucial para a biossíntese de glicoconjugados e para eventos de glicosilação. Adicionalmente à biossíntese *de novo*, hexosaminas podem ser obtidas a partir do meio extracelular; seu potencial papel como fonte de carbonos ocorreria por uma via catabólica que se conecta à glicólise após dois passos enzimáticos específicos (*nagA* e *nagB*). Nesse trabalho são apresentadas as evidências da existência de HBP em *T. cruzi*, através da caracterização cinética dos primeiros dois passos da via (*TcGF6PA* e *TcGNA*), assim como as intervenções de inibidores dessas enzimas na proliferação e ciclo intracelular do parasita. Ademais o transporte a partir do meio extracelular e parte do catabolismo de hexosaminas são compartilhados com o da glicose. As hexosaminas são moléculas finalmente oxidadas na mitocôndria e estimulam uma respiração celular acoplada a fosforilação oxidativa, culminando em uma biossíntese de ATP intracelular. A comparação entre a síntese e degradação das hexosaminas indica que o *T. cruzi* apresenta uma maior dependência da HBP nas formas infectivas. Em contrapartida, epimastigotas mostraram ser mais dependentes de hexosaminas extracelulares. Portanto, propõe-se: (i) a HBP é um bom alvo para futuras intervenções de drogas, afetando formas presentes nos hospedeiros mamíferos e (ii) GlcNAc é uma fonte de carbono e energia para formas do *T. cruzi* presentes no inseto vetor, contribuindo para a colonização de epimastigotas e diferenciação em formas metacíclicas.

Palavras-chave: Doença de Chagas. *Trypanosoma*. Metabolismo. Glicose. Hexosamina.

ABSTRACT

CRISPIM, M. **Hexosamine metabolism of *Trypanosoma cruzi***. 2018. 118 p. Thesis (PhD in Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2018.

Throughout its biological cycle, *Trypanosoma cruzi* course through several environments that require the utilization of carbohydrates, amino acids and lipids to obtain energy and for metabolic biosynthesis. An example is the Hexosamine Biosynthesis Pathway (HBP), a 4-step enzymatic pathway that culminates in UDP-GlcNAc formation, crucial metabolite for glycoconjugate biosynthesis and glycosylation. In addition to de novo biosynthesis, hexosamines can be obtained from the extracellular medium; its potential role as a carbon source would occur via a catabolic pathway connected to glycolysis after 2 specific enzyme steps (*nagA* and *nagB*). In this work the evidence of HBP in *T. cruzi* is presented, through the kinetic characterization of the first two steps of the pathway (TcGF6PA and TcGNA), as well as the effects of enzymatic inhibitors in epimastigote proliferation and intracellular cycle progression. In addition, the hexosamines transport from the extracellular environment and part of their catabolism was shared with glucose. The hexosamines are molecules finally oxidized in the mitochondria and stimulate a cellular respiration coupled to OxPhos, culminating in ATP biosynthesis. The comparison between hexosamine synthesis and degradation of hexosamines indicates that infective forms present a greater dependence of the HBP. Otherwise epimastigotes have been shown to be more dependent on extracellular hexosamines. Therefore, it is proposed: (i) HBP is a good target for future drug interventions, affecting parasite forms in mammalian host and (ii) GlcNAc is a source of carbon and energy for *T. cruzi* insect stages, being able to contribute for epimastigote colonization and parasite differentiation.

Keywords: Chagas Disease. *Trypanosoma cruzi*. Metabolism. Glucose. Hexosamine.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	20
Figura 2. Representação das organelas da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	23
Figura 3. Representação da fosforilação oxidativa considerada padrão para os organismos aeróbios.	25
Figura 4. Processos relacionados ao metabolismo de hexosaminas.	32
Figura 5. Reações para medição de atividade de quinase.....	42
Figura 6. Esquema para captura de ¹⁴ CO ₂	54
Figura 7. Alinhamento das sequências de nucleotídeos putativas codificantes das GNA presentes em <i>Trypanosoma cruzi</i> cepa CL Brener.....	58
Figura 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos das GF6PA e GNA presentes em tripanossomatídeos.	59
Figura 9. Alinhamento das sequências de aminoácidos das GF6PA e GNA presentes em distintos eucariotas.	60
Figura 10. Esquema representando os domínios preditos para a TcGF6PA e TcGNA...	62
Figura 11. Clonagem de TcGF6PA e TcGNA.....	65
Figura 12. Perfil de expressão e purificação.	66
Figura 13. Caracterização bioquímica da TcGF6PA.....	67
Figura 14. Caracterização bioquímica da TcGNA.....	69
Figura 15. Inibição da atividade de TcGF6PA e TcGNA.	71
Figura 16. Avaliação do efeito de inibidores da via HBP na proliferação de formas epimastigotas.....	73
Figura 17. Avaliação do efeito de GAGMH e FDI no ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i>	75
Figura 18. Cinética de incorporação de hexosaminas em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	78
Figura 19. Ensaio de competição no transporte.....	79
Figura 20. Comparativo do metabolismo de hexosaminas ao longo do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	81
Figura 21. Fosforilação das hexosaminas em extratos de epimastigotas.....	82
Figura 22. Hexosaminas e a viabilidade de epimastigotas.....	84
Figura 23. Oxidação mitocondrial das hexosaminas.....	86
Figura 24. Taxas de respiração em formas epimastigotas.....	89
Figura 25. Biossíntese intracelular de ATP em formas epimastigotas.	90
Figura 26. Efeito das hexosaminas na metaciclo-gênese <i>in vitro</i>	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- ≈E: capacidade respiratória potencialmente disponível para OxPhos
- ≈R: respiração de rotina livre / respiração de rotina acoplada a OxPhos
- 2-DOG: 2-deoxi-D-glicose
- Ama: amastigota
- BZ: Benzonidazol
- CHO-k₁: Linhagem celular, *Chinese hamster ovary*, auxotrófica para prolina
- CMP-Sia: Citidina monofosfato N-acetilneuraminato.
- CoA: Coenzima A.
- CPM: Cintilações por minuto
- CytC: Citocromo C
- DALYs: Anos de vida ajustados por incapacidade
- DC: doença de Chagas
- DO: densidade óptica
- DTNB: Reagente de Ellman / ácido 5,5-ditio-bis-(2-nitrobenzólico)
- E: capacidade máxima
- E64: trans-epoxisuccinil-L-leucilamido(4-guanidino)butane
- EC₅₀: concentração efetiva correspondente a 50%
- EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético
- Epi: epimastigota
- Epi-like: Epimastigota intracelular
- ETS: Sistema de transporte de elétrons
- F: Fluorescência após adição de FCCP
- F_i: Fluorescência inicial
- Fru: frutose
- Fru-6-P: Frutose-6-fosfato
- G 1,3 BP: gliceraldeído-1,3-bifosfato.
- Gal: galactose
- GalNAc: N-acetilgalactosamina.
- GF6PA: glutamina fructose-6-fosfato aminotransferase
- Glc: glicose
- Glc-1-P: glicose-1-fosfato
- Glc-6-P: glucose-6-fosfato

GlcN: glucosamina
GlcN-6-P: glucosamina-6-fosfato
GlcNAc: N-acetilglucosamina
GlcNAc-1-P: N-acetilglucosamina-1-fosfato
GlcNAc-6-P: N-acetilglucosamina-6-fosfato
Gln: glutamine
Glu: glutamate
GNA: glucosamine-6-fosfato-N-acetiltransferase
GPIs: Glicosilphosphatidilinositol.
HBP: *Hexosamine biosynthesis pathway* / Via de biossíntese de hexosaminas
HDP: *Hexosamine degradation pathway* / Via de degradação de hexosaminas
HK: Hexoquinase
IC₅₀: concentração inibitória correspondente a 50%
 $J_{\sim E}$: capacidade respiratória potencialmente disponível e acoplada a OxPhos
 $J_{\sim R}$: eficiência de acoplamento da respiração de rotina (R)
kDNA: DNA do cinetoplasto / DNA mitocondrial de membros do clado Kinetoplastida
K_i: Constante de inibição
K_M: Constante de Michaelis-Menten
LB: *Lysogen Broth*
LDH: lactato desidrogenase
LIT: *Liver Infusion Tryptose*
Man: manose
Man-1-P: manose-1-fosfato
MDHg: Malato desidrogenase glicosomal.
MDHm: Malato desidrogenase mitocondrial.
Meta: tripomastigota metacíclico
MRC: Tampão de respiração
MTT: 1-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan
nagA: N-acetilglucosamina-6-fosfato deacetilase
nagB: glucosamina-6-fosfato desaminase
NFX: Nifurtimox
OMS: Organização Mundial da Saúde
OPAS: Organização Pan-americana de saúde
ORF: *Open Reading Frame* / Fases abertas de leitura

OxPhos: fosforilação oxidativa
PAGM: fosfoacetilglucosamina mutase
PEP: phosphoenolpiruvato.
PEPCK: PEP carboxiquinase.
PFR: *Paraflagelar rod*
PK: piruvato quinase
PMSF: fenilmetanesulfonil fluoride
R: respiração de rotina
RPMI: Meio *Roswell Park Memorial Institute*
SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida desnaturante
SFB: Soro fetal bovino
TAU: *Triatomine Artificial Urine*
TCA: ciclo tricarboxílico.
TLCK: Tosil-L-lisil-clorometane hidrocloreto
Tripo: tripomastigota
TS: transialidase
UAP: UDP-N-acetilglucosamina pirofosforilase
UDP-GlcNAc: Uridina difosfato N-acetilglucosamina.
V₀: velocidade inicial
V_{MAX}: velocidade máxima

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO	15
1.1 Doença de Chagas	16
1.1.1 Aspectos gerais	16
1.1.2 Desafios no tratamento da Doença de Chagas.....	17
1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2.2 Ciclo de vida.....	19
1.2.1 Estruturas celulares únicas do <i>T. cruzi</i> e outros tripanossomatídeos.....	20
1.2.2 A mitocôndria e respiração celular de <i>T. cruzi</i>	23
1.3 Metabolismo de hexoses em <i>T. cruzi</i>	25
1.4 Biossíntese de nucleotídeos-açúcares em <i>T. cruzi</i>	29
1.5 Passos enzimáticos relacionados às hexosaminas	30
CAPÍTULO 2: OBJETIVOS	34
2.1 Objetivo geral	35
2.2 Objetivos Específicos	35
CAPÍTULO 3: MATERIAIS E MÉTODOS	36
3.1 Microorganismos utilizados e condições de crescimento	37
3.1.1 <i>Escherichia coli</i>	37
3.1.2 <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
3.1.2.1 Formas epimastigotas	37
3.1.2.2 Tripomastigotas metacíclicos	38
3.1.2.3 Formas tripomastigotas derivados de células.....	38
3.2 Caracterização do transporte de hexosaminas em <i>Trypanosoma cruzi</i>	39
3.2.1 Transporte em formas epimastigotas	39
3.2.2 Dependência do transporte em relação ao tempo, V_{max} e K_M	40
3.2.3 Transporte de hexosaminas em competição com glicose	40
3.2.4 Transporte em formas tripomastigotas metacíclicas	41
3.2.5 Transporte utilizando estágios do <i>T. cruzi</i> presentes no hospedeiro mamífero.....	41
3.3 Avaliação da importância das hexosaminas para o <i>T. cruzi</i>	41
3.3.1 Atividade quinase de hexose/hexosaminas em extratos de formas epimastigotas	41
3.3.2 Viabilidade de formas epimastigotas.....	42
3.3.2.1 Método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoliobromida).....	42
3.3.2.2 Método de Resazurina	43

3.3.3 Ensaio de recuperação de proliferação	43
3.3.4 Avaliação dos níveis de ATP intracelular	43
3.3.6 Importância das hexosaminas na metaciclo gênese.....	44
3.4 Identificação dos genes putativos para enzimas do metabolismo de hexosaminas no genoma de <i>T. cruzi</i>	44
3.4.1 Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	44
3.4.2 Amplificação e clonagem de TcGF6PA e TcGNA de <i>T. cruzi</i>	45
3.4.3 Sequenciamento de DNA	46
3.4.4 Expressão e purificação de TcGF6PA e TcGNA recombinantes em <i>E. coli</i>	46
3.4.5 Eletroforese de proteínas em gel desnaturante (SDS-PAGE)	47
3.4.6 Preparo de extrato proteico de <i>T. cruzi</i> para medição das atividades enzimáticas de GF6PA e GNA	47
3.5 Ensaio de atividade enzimática	48
3.5.1 Atividade de GF6PA	48
3.5.2 Atividade de GNA	48
3.5.3 Verificação do pH ótimo para as enzimas	49
3.6 Efeito de possíveis inibidores das enzimas da HBP no <i>T. cruzi</i>	49
3.6.1 Análogos utilizados	49
3.6.2 Inibição da atividade de TcGF6PA e TcGNA.....	50
3.6.3 Efeito na proliferação de epimastigotas.....	50
3.6.4 Toxicidade em células CHO-K ₁	51
3.6.5 Efeito dos inibidores no ciclo intracelular.....	51
3.7 Bioenergética	52
3.7.1 Medida do consumo de oxigênio.....	52
3.7.2 Parâmetros em respirometria de células intactas.....	52
3.7.3 Medidas da produção de CO ₂	53
3.7.3 Medida do potencial de membrana mitocondrial	54
CAPÍTULO 4: RESULTADOS.....	56
4.1 Via de Biossíntese de Hexosaminas (HBP): caracterização cinética e papel funcional das primeiras duas enzimas	57
4.1.1 Análises <i>in silico</i>	57
4.1.2 Amplificação e clonagem dos genes TcGF6PA e TcGNA	62
4.1.3 Expressão e purificação das TcGF6PA e TcGNA recombinantes	65
4.1.4 Caracterização cinética e bioquímica da TcGF6PA.....	66
4.1.5 Caracterização cinética e bioquímica da TcGNA.....	68

4.1.6 TcGF6PA e TcGNA recombinantes podem ser inibidas.....	70
4.1.7 GAGMH, FDI, ADT e ABZ afetam a proliferação de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> porém G3S não	72
4.1.8 GAGMH e FDI afetam o ciclo intracelular do <i>T. cruzi</i>	73
4.2 Hexosaminas: transporte e bioenergética.....	76
4.2.1 Cinética do transporte de GlcN e GlcNAc	76
4.1.3 Análise da atividade de GF6PA e GNA vs transporte de GlcN e GlcNAc em diferentes formas do ciclo biológico de <i>T. cruzi</i>	80
4.2.2 Epimastigotas possuem uma atividade quinase de GlcNAc.....	82
4.2.3 Atividade mitocondrial e viabilidade de <i>T. cruzi</i> sustentada por hexosaminas.....	83
4.2.4 Consumo de oxigênio de <i>T. cruzi</i> estimulado por hexosaminas	87
4.2.5 Conteúdo intracelular de ATP	90
4.2.6 Hexosaminas sustentam a metaciclogênese <i>in vitro</i>	91
Capítulo 5: DISCUSSÃO	92
5.1 Importância da HBP no <i>T. cruzi</i>.....	93
5.2 Hexosaminas como moléculas oxidáveis por formas epimastigotas	94
5.3 Uso de GlcNAc por epimastigotas	96
CAPÍTULO 6: Conclusões.....	99
6.1 Via de biossíntese de hexosaminas	100
6.2 Hexosaminólise	100
REFERÊNCIAS	101
ANEXOS	118

1.1 Doença de Chagas

1.1.1 Aspectos gerais

Caracterizada inicialmente em 1909 pelo pesquisador brasileiro Carlos Chagas (Chagas, 1909), a Tripanossomíase Americana ou Doença de Chagas (DC) é hoje uma das doenças tropicais mais negligenciadas do mundo. A DC é endêmica nas Américas do Norte, Central Continental e do Sul, e nas zonas rurais dessas regiões a falta de estrutura nas moradias favorece a infestação pelo vetor. Historicamente a transmissão e a morbidade se concentraram na região endêmica, porém a migração de pessoas cronicamente infectadas para outras regiões transformou a DC em um problema de saúde com impactos globais. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS) em sua última atualização sobre a DC em 2017, essa doença afeta entre 6 e 7 milhões de pessoas e cerca de 25 milhões de pessoas vivem sob o risco de infecção (World Health Organization, 2018). O número estimado de mortes diminuiu de cerca de 50.000 por ano para 12.500 por ano (Moncayo e Silveira, 2017; World Health Organization, 2012); e o impacto estimado da DC em termos de anos de vida ajustados por incapacidade (DALYs) diminuiu de 2,7 milhões em 1990 (Musgrove, 1993) para 586 000 em 2001 (Mathers, Lopez e Murray, 2006). Dentre as pessoas infectadas com DC, 30 a 40% padecem dos sintomas mais graves desta enfermidade (Rassi e Marin-Neto, 2010), representando um grave problema de saúde pública para as áreas endêmicas.

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da DC, tem como reservatório natural uma ampla variedade de mamíferos no continente americano e é transmitido por várias espécies de três gêneros de insetos tratomíneos hematófagos: *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius*. Na Argentina, Brasil, Bolívia, 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 que o *Triatoma diminuta* é encontrado no Equador e também na América Central, o *Rhodnius pallescens* é encontrado principalmente no Panamá e nos EUA os dois principais vetores são o *Triatoma sanguisuga* e *Triatoma gerstaecken* (Coura, 2013; Kribs-Zaleta, 2010; Perez-Molina *et al.*, 2017; Rassi *et al.*, 2012; Silber *et al.*, 2005).

Na década de 1950, o governo brasileiro implementou campanhas de controle de vetores em algumas regiões do país; sendo que na década de 1980 essas campanhas se estenderam por todo o território brasileiro. Ao mesmo tempo, os países da América do Sul, onde se concentram dois terços dos casos de DC nas Américas (Argentina, Brasil, Chile, Uruguai, Paraguai, Bolívia e Peru) iniciaram um programa de cooperação internacional, a

Iniciativa Cone Sul, cujo objetivo foi controlar a transmissão vetorial e por transfusão sanguínea (Moncayo e Silveira, 2009; Moraes-Souza, 1999; Silveira e Pimenta Jr., 2011). O sucesso das campanhas de erradicação de vetores, levou ao Uruguai (1997), Chile (1999) e Brasil (2006) a obter o certificado da Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) que declara uma área livre do *Triatoma infestans*. Vale ressaltar que esse certificado não significa completa interrupção da transmissão vetorial (Abad-Franch *et al.*, 2013; Fitarelli e Horn, 2009; Moraes-Souza e Ferreira-Silva, 2011). Além disso, melhorias nas condições socioeconômicas da população na América Latina nas últimas décadas contribuíram para a redução da transmissão vetorial, favorecendo o controle dessa doença. É importante ressaltar que outra meta alcançada pela Iniciativa Cone Sul foi a triagem obrigatória de bancos de sangue, incluindo 100% dos bancos de sangue públicos e 80% dos bancos privados de sangue na Argentina, e todos os bancos de sangue no Brasil, Chile e Uruguai. Por outro lado, Paraguai, Bolívia e Peru continuaram com problemas no controle da doença em bancos de sangue, não atingindo as metas do programa até então (Moncayo e Silveira, 2009).

1.1.2 Desafios no tratamento da Doença de Chagas

As pesquisas sobre o tratamento da Doença de Chagas se consolidaram a partir da década de 1960, quando a quimioterapia se baseou em estudos com derivados de nitrofurazona (Dias *et al.*, 2009). Entre finais dessa década e começos da seguinte, dois compostos surgiram representando uma nova perspectiva no tratamento da doença, visto que a eficácia na fase aguda destes compostos era maior em relação à das até então utilizadas. Estes novos compostos foram o nifurtimox (hoje no Brasil de nome comercial Lampit®, da Bayer), 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino)tetra-hidro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido, e o benzonidazol (hoje no Brasil de nome comercial Rochagan®, da Roche), N-benzyl-2-nitroimidazol acetamida. Ainda hoje a quimioterapia contra a doença está baseada nessas drogas que, apesar das vantagens descritas previamente, acarretaram alta toxicidade em pacientes durante o tratamento. Brevemente, o Nifurtimox (NFX) é um nitrofurano e foi o primeiro composto utilizado no tratamento de pacientes com DC. Packchanian foi o primeiro a demonstrar experimentalmente que os nitrofuranos eram promissores nesse contexto (Packchanian, 1957). Mais tarde, Brener utilizou nitrofurazona no tratamento de camundongos cronicamente infectados (Brener, 1961). Embora tenham sido relatados resultados importantes em relação a essa proposta, (Rodrigues Coura *et al.*, 2002) os efeitos colaterais e a alta toxicidade que desencadeavam, desfavoreceram a continuação dos estudos

com essas drogas. Ensaios clínicos com NFX foram iniciados em 1965; notou-se uma marcada diferença na efetividade de NFX contra DC em diferentes fases da doença, assim como em relação à duração do tratamento, à idade do paciente e à área geográfica estudada (referência de 1965). Os melhores resultados foram obtidos para tratamentos durante a fase aguda e em crianças em geral (Castro, Mecca, e de Bartel, 2006; Rodriques Coura *et al.*, 2002). A eficácia do tratamento em pacientes adultos com doença crônica foi baixa, com uma taxa de cura de 7 a 8% na fase crônica indeterminada; entretanto, em crianças <14 anos de idade na fase crônica assintomática, a taxa de cura foi significativamente maior, chegando a 85,7% (Rodriques Coura *et al.*, 2002; Streiger *et al.*, 2004). Já o Benzonidazol (BZ) foi inicialmente estudado por Grunberg *et al.* que demonstraram pela primeira vez sua atividade contra o *T. cruzi* (Grunberg *et al.*, 1967). O BZ mostrou ter eficácia semelhante à nitrofurazona nas fases aguda e crônica, mas com menos efeitos tóxicos. Posteriormente, vários resultados de tratamentos experimentais e clínicos de pacientes com CD usando BZ foram publicados, demonstrando a eficácia significativa desse fármaco durante a fase aguda (todos os testes sorológicos e parasitológicos tiveram até 80% de cura na referida fase) (Andrade, Magalhaes e Pontes, 1985; Cançado e Cançado, 2002). Embora vários relatos tenham demonstrado a utilidade do BZ, a sua principal limitação é a baixa taxa de cura durante a fase crônica. Em 2002, Cançado observou cura em 76% dos pacientes cursando a fase aguda de DC (13 a 21 anos de seguimento) e apenas 8% dos pacientes em fase crônica de DC (6 a 18 anos de seguimento), corroborando os estudos prévios na demonstração do reduzido efeito durante a fase crônica (Cançado e Cançado, 2002).

1.2 O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um organismo eucariota, protozoário, pertencente ao supergrupo dos *Excavata* que abarca protozoários de vida livre e simbiótica, e também inclui alguns importantes parasitas de seres humanos. Dentro dos *Excavata*, *T. cruzi* pertence ao grupo monofilético *Kinetoplastida*. Pelo menos um estágio no ciclo de vida de todos os membros deste grupo é representado por uma célula delgada e altamente flexível, equipada com um ou dois flagelos, que emergem de uma bolsa flagelar. Outra característica registrada é a presença de um denso DNA mitocondrial, denominado cinetoplasto (Cavalier-Smith, 2016).

1.2.2 Ciclo de vida

O *Trypanosoma cruzi* possui um ciclo de vida digenético, alternando entre um hospedeiro invertebrado e um vertebrado mamífero entre os quais se encontra o homem. Quatro estágios de desenvolvimento principais foram classicamente descritos em *T. cruzi*: amastigota intracelular (Ama: forma replicativa e não infectiva) e tripomastigota sanguíneo (Tripo: ativa e não infectiva), encontrados nos hospedeiros vertebrados; e epimastigota (Epi: forma replicativa, não infectiva) e tripomastigota metacíclico (Meta: forma não replicativa, mas infectiva) encontrados nos hospedeiros invertebrados (Brenner, 1973). Em 1999, uma forma intermediária entre os estágios Ama e Tripo foi descrita, e devido às semelhanças morfológicas e bioquímicas com a forma epimastigota foi denominada epimastigota intracelular (Epi-like) (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999).

Durante um repasto sanguíneo, o triatomíneo pode ingerir formas Tripo junto ao sangue do hospedeiro mamífero infectado. Algumas horas após a ingestão, no estômago do triatomíneo, ocorre a diferenciação para Epi, coincidindo com a indução da expressão de genes TcMUC I e II, responsáveis pela expressão de mucinas e proteínas associadas (Buscaglia *et al.*, 2006; El-Sayed *et al.*, 2005). Com o auxílio de tais moléculas, no intestino médio dos triatomíneos, os Epis se aderem às membranas perimicrovilares (PMM) secretadas pelas células epiteliais do intestino médio subjacentes (Alves *et al.*, 2007; Gonzalez *et al.*, 1998, 1999; Nogueira *et al.*, 2007). Os Epis se dividem repetidamente por fissão binária, colonizando o intestino. No intestino posterior, uma parte da população parasitária se adere à cutícula retal por meio de interações hidrofóbicas e se diferencia em Metas; Epis e Metas são liberados juntamente com as fezes e urina durante o próximo repasto sanguíneo (Garcia e Azambuja, 1991; Kleffmann, Schmidt e Schaub, 1998; Schaub *et al.*, 1998; Schmidt, Kleffmann e Schaub, 1998), porém somente os Metas possuem a capacidade de sobreviver em mamíferos, e os epimastigotas são lisados pelo sistema complemento (Diego *et al.*, 2014). Os Metas só serão capazes de estabelecer a infecção no novo hospedeiro se invadirem as suas células e diferenciarem a uma forma replicativa. A invasão das células hospedeiras dos mamíferos é um processo dependente de ATP (Martins *et al.*, 2009; Schenkman, Robbins e Nussenzweig, 1991) e que envolve o recrutamento de lisossomos para formar um vacúolo parasitóforo (Burleigh, 2005). Uma vez no interior das células, alguns dados da literatura sugerem que o baixo pH desencadeia a diferenciação de tripomastigotas em Amas (Crispim *et al.*, 2018; Souza, de Carvalho, e de Barrias, 2010) e favorece a atividade de enzimas hidrolíticas, permitindo a liberação de Ama no citoplasma para iniciar sua

replicação (Andrews *et al.*, 1990; Andrews e Whitlow, 1989; Hall *et al.*, 1992; Ley *et al.*, 1990). Após um número variável de divisões celulares, os Amas se diferenciam na forma transitória replicativa Epi-like. Ao fim do ciclo intracelular ocorre a diferenciação para Tripos, os quais lisam as células e podem ter três destinos: i) infectar células vizinhas; ii) alcançar a corrente sanguínea, podendo alcançar e infectar outros tecidos; iii) Serem ingeridos por um triatomíneo que realiza um repasto sanguíneo, podendo infectar um novo hospedeiro invertebrado, que transmitirá o parasita para novos hospedeiros mamíferos (Souza, de Carvalho, e de Barrias, 2010).

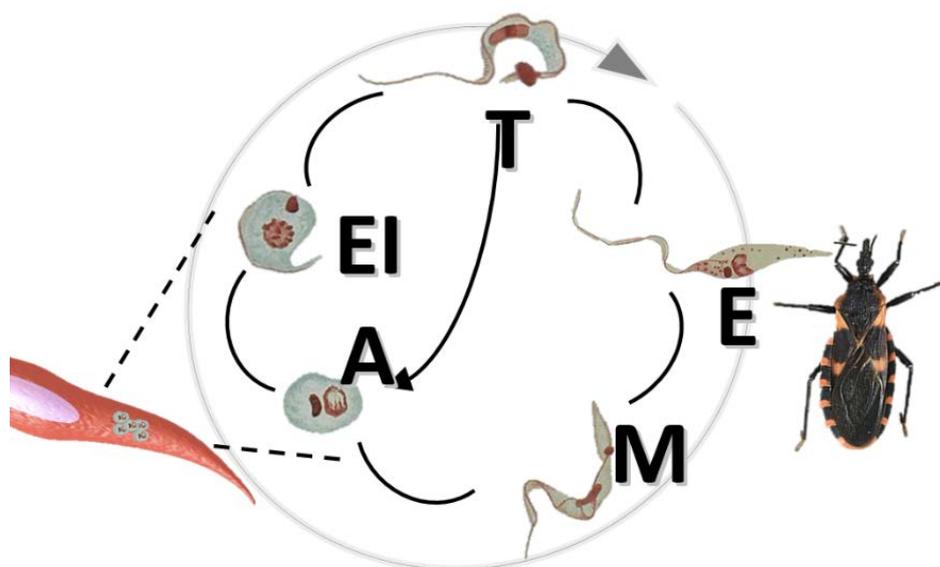


Figura 1. Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*. Formas encontradas no hospedeiro mamífero: A, amastigota; Ei, epimastigota intracelular; T, tripomastigota sanguíneo. Formas presentes no hospedeiro invertebrado: E, epimastigotas; M, tripomastigota metacíclico. Figura construída a partir de imagens originais do artigo de (Chagas, 1909).

1.2.1 Estruturas celulares únicas do *T. cruzi* e outros tripanossomatídeos

O *T. cruzi*, assim como os outros tripanossomatídeos são organismos que apresentam estruturas e organelas únicas. Dentre elas pode-se mencionar:

1. Citoesqueleto: Uma das características do clado *Trypanosomatidae* é a presença de um citoesqueleto constituído por uma camada de microtúbulos subjacentes à membrana plasmática e designados como microtúbulos subpeliculares. Observou-se que os microtúbulos estão conectados entre si e à membrana plasmática por filamentos curtos conformando uma estrutura semelhante a uma gaiola. Esta estrutura é indicada como motivo da resistência desse grupo de organismos à lise celular por meios mecânicos. Cortes transversais através de diferentes porções celulares da forma Tripo de *T. cruzi* mostram que os microtúbulos são

regularmente espaçados, com uma distância de 44 nm (centro a centro). Observou-se que o número de microtúbulos está relacionado ao diâmetro celular (Souza, 2002a). Na maioria das células eucarióticas, filamentos com um diâmetro de 4 a 7 nm são formados por actina. Eles podem ser observados livres no citoplasma, principalmente no córtex celular ou em feixes formando as chamadas fibras de estresse. Filamentos com um diâmetro de 8-9 nm são filamentos intermediários. Sua composição varia. Filamentos de 10 a 12 nm são compostos por miosina (Hardin, Bertoni e Kleinsmith, 2015). Há pouca informação sobre microfilamentos nos *Trypanosomatidae*, mas se sabe que em todos os tripanossomatídeos existem filamentos mais curtos (6 nm de espessura) que conectam os microtúbulos sub-peliculares entre si e estes com a membrana plasmática de (Souto-Padrón, Souza, e de Heuser, 1984). Em alguns tripanossomatídeos, uma estrutura microfibrilar tem sido observada na região de fixação do flagelo ao corpo celular (Souza, 2002c). Os microfilamentos nunca foram observados no citoplasma. A actina foi detectada bioquimicamente em tripanossomatídeos, mas teve um comportamento incomum de ligação de DNase-I quando comparado com a actina de outros eucariotos (Mortara, 1989). Ao longo do lado do axonema do flagelo dos tripanossomatídeos, há uma haste paraxial filamentosa semelhante a uma rede.

2. Paraflagellar rod: é uma estrutura que emerge de uma invaginação na membrana plasmática na parte posterior dos parasitas e se estende paralela ao flagelo. A *paraflagellar rod* (PFR) é formada por um filamento em forma de treliça que se apresenta ao lado do axonema ao qual se conecta (Cachon *et al.*, 1988). A PFR é restrita aos membros do grupo *Euglenozoa* e está presente em todos os representantes *Kinetoplastida*. Sua estrutura e função permaneceram enigmáticas, embora detalhes estejam começando a surgir, indicando papéis estruturais e regulatórios. O PFR é essencial para a viabilidade de *T. brucei* (Bastin, Sherwin e Gull, 1998), mas não de *Leishmania* (Santrich *et al.*, 1997) e é necessária para a motilidade em ambos os organismos. Ela impõe restrições estruturais ao batimento axonemal e poderia atuar como uma mola biomecânica para absorver e transmitir energia produzida pelo batimento e torção do flagelo (Hughes *et al.*, 2012).

3. Mitocôndria: Os flagelados da ordem *Kinetoplastida* possuem uma única mitocôndria por célula e que abrange cerca de 30% do corpo celular e é distribuída em ramos sob os microtúbulos sub-reticulares. Essa mitocôndria é composta por uma membrana externa, espaço intermembranar, uma membrana mitocondrial interna que forma os enrolamentos conhecidos como cristas mitocondriais e a matriz mitocondrial. Dependendo dos recursos ambientais e nutricionais disponíveis, a mitocôndria pode ocupar uma

quantidade variável do volume celular total (Paes *et al.*, 2011; Souza, Attias e Rodrigues, 2009).

4. Cinetoplasto: é uma estrutura contendo o genoma mitocondrial (kDNA), a mais complexa estrutura de DNA mitocondrial da natureza. O kDNA, componente majoritário do cinetoplasto, está organizado como uma rede de DNA concatenado, composto de aproximadamente 5.000 a 20.000 minicírculos e 50 cópias de maxicírculos. Esta estrutura está localizada próximo ao corpo basal e perpendicular ao eixo do flagelo (Dantas, Barbosa e Castro, De, 2003; Souza, 2002a) (revisão em (Lukes *et al.*, 2002; Souza, 2008)). Esta é a mais proeminente característica do clado Kinetoplastida.

4. Glicossomos: São organelas consideradas “peroxissomos especializados”, onde se localizam a maior parte das enzimas glicolíticas (no *T. cruzi*, as sete primeiras enzimas glicolíticas, as quais participam da conversão da glicose em 1,3-bifosfato de gliceraldeído) (Bakker *et al.*, 2000; Opperdoes, Fred R, 1987b). Foi mostrado que por exemplo, em *T. brucei*, 90% do teor de proteína da matriz glicossomal corresponde às enzimas glicolíticas (Misset, Bos e Opperdoes, 1986; Opperdoes, 1987b). Estão localizadas também nessa organela as enzimas da via das pentoses fosfato, de biossintéticas da pirimidinas (Gao *et al.*, 1999), de éter-lipídios (Heise e Opperdoes, 1997; Opperdoes *et al.*, 1984), de esteróis (Concepcion *et al.*, 2001), a oxidação de ácidos graxos (Wiemer *et al.*, 1996) e da via de resgate de purinas (Opperdoes, F R, 1987). Níveis elevados da fosfato dikinase de piruvato também foram encontrados recentemente nesta organela, sendo atribuída a essa enzima um papel da manutenção do balanço ATP/ADP intra-glicossomal (Bringaud, Baltz e Baltz, 1998; Deramchia *et al.*, 2014). Os glicossomas estão envoltos por uma única membrana que abriga canais formadores de poros responsáveis pela troca de metabólitos entre a matriz glicossomal e o citosol, necessárias para importar pequenos metabólitos sintetizados *de novo* para a matriz da organela (Gualdron-López *et al.*, 2012).

5. Reservossomos: são organelas ligadas à membrana, encontradas na região posterior de formas Epis de *T. cruzi* (Soares, 1999; Souza, 2002a; Souza, de *et al.*, 2000). Essas estruturas foram inicialmente descritas como corpos multivesiculares (Souza, de *et al.*, 1978) e análises citoquímicas posteriores revelaram que os reservossomos apresentam, de fato, uma matriz protéica eletrodensa com inclusões lipídicas (Soares e Souza, De, 1988). Estudos utilizando proteínas imunomarcadas com ouro demonstraram que os nutrientes absorvidos através do citóstomo e da bolsa flagelar são direcionados aos reservossomos (Porto-Carreiro *et al.*, 2000; Soares, Souto-Padrón e Souza, De, 1992; Soares e Souza, de, 1991), mostrando assim que essas organelas são compartimentos da via endocítica. Em Epi, os reservossomos

ocupam cerca de 6% do volume total celular (Soares e Souza, De, 1988), mas essas estruturas gradualmente desaparecem em culturas antigas e durante a diferenciação de epimastigotas para tripomastigotas metacíclicos (Figueiredo, Rosa e Soares, 2000; Soares *et al.*, 1989).

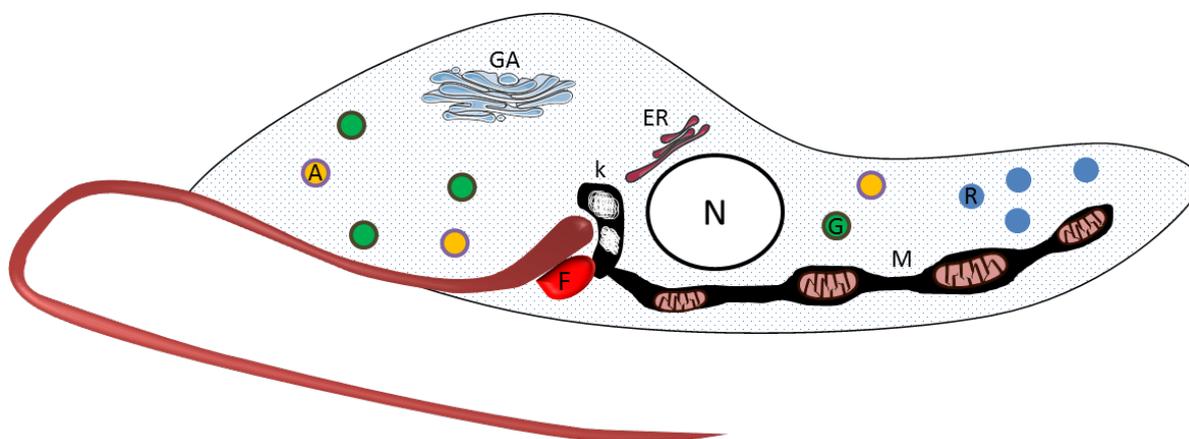


Figura 2. Representação das organelas da forma epimastigota de *T. cruzi*. estão demonstrados A (acidocalcissoma), GA (Complexo de Golgi), F (bolsa flagelar), G (glicossomo), K (cinetoplasto), M (mitocôndria), N (núcleo) e R (reservossomo).

1.2.2 A mitocôndria e respiração celular de *T. cruzi*

Uma das primeiras observações da respiração em *T. cruzi* ocorreu em 1946 (Brand, von, Johnson e Rees, 1946). Nesse trabalho foi demonstrado que a respiração de formas epimastigotas é sensível a KCN, o que, desde o conhecimento atual de bioquímica pode ser interpretado como um dos primeiros indícios de que o parasita possui um complexo IV ativo na ETS. Diferentemente de *T. brucei*, o *T. cruzi* mantém a funcionalidade mitocondrial (incluindo a OXPHOS) ativa nas formas: (i) epimastigota, onde a produção de ATP por essa via é essencial para a sua sobrevivência, uma vez que respiração deste parasita se mostrou sensível a inibidores específicos do segmento b-c1 do complexo III, mesmo quando em meio de cultura rico em glicose (Stoppani e Boiso, De, 1973); (ii) amastigota, em um relato recente de uso da glutamina como fonte oxidável (Shah-Simpson *et al.*, 2017)

Em relação à ETS, os tripanossomatídeos apresentam várias diferenças com os mamíferos. Brevemente, existe uma ETS na qual vários complexos enzimáticos transferem equivalentes reduzidos ao par ubiquinol/ubiquinona, que transporta os elétrons para a oxidase terminal (Tielens e Hellemond, Van, 1998) reduzindo o O₂ (aceptor final dos elétrons) a H₂O (Fig. 2).

Serão apresentadas algumas informações sobre complexos mitocondriais:

1. Na maioria dos organismos o complexo I da ETS (NADH desidrogenase; NADH quinona oxireductase) está localizado na membrana interna mitocondrial e catalisa a transferência de elétrons do NADH para a coenzima Q (ubiquinona) (Baranova, Holt e Sazanov, 2007; Hirst, 2005; Lenaz *et al.*, 2006). A transferência de elétrons é simultânea à extrusão de prótons para o espaço intermembrana mitocondrial, gerando o gradiente de eletroquímico transmembrantar. Em relação aos tripanossomatídeos, em *T. brucei* foi constatado que a complexo I possui 19 subunidades e uma massa de aproximadamente 660 kDa. Apesar de alguns relatos na literatura afirmarem a presença de uma atividade correspondente ao complexo I em *T. cruzi* (Beattie e Howton, 1996; Bienen *et al.*, 1993; Tielens e Hellemond, Van, 1998), essa atividade ainda é motivo de especulação, sendo que alguns autores afirmam que não está diretamente envolvido com a extrusão de prótons e sim com a regeneração de NAD^+ mitocondrial (Opperdoes e Michels, 2008), podendo essa ser uma das causas da baixa sensibilidade da respiração celular à rotenona (Hernandez e Turrens, 1998). Ademais, Carranza e col. indicaram que algumas cepas de *T. cruzi* já apresentam deleções naturais de genes codificantes de algumas subunidades do complexo I (ND5, ND6 e ND7) e que esse fato não interfere na bioenergética mitocondrial, se comparado a cepas que continham todas as subunidades (Carranza *et al.*, 2009).
2. O complexo II (succinato: ubiquinona redutase ou succinato desidrogenase) transfere equivalentes reduzidos da oxidação de succinato diretamente para a quinona da ETS. Em *T. cruzi* este complexo apresenta 12 subunidades e cerca de 550 kDa, sendo, portanto, quatro vezes maior que a enzima bovina ou de levedura (aproximadamente 150 kDa) (Fig 2) (Morales *et al.*, 2009). Neste complexo, o succinato é oxidado na subunidade A, reduzindo FAD a FADH_2 . Os elétrons transferidos a FAD são direcionados por um mecanismo de tunelamento ao o cluster $[\text{3Fe-4S}]$ da subunidade B do complexo e posteriormente são transferidos para uma molécula de ubiquinona, previamente ligada ao seu sítio ativo nas subunidades C e D. A ubiquinona reduzida (semiquinona denominada ubiquinol), que difunde livremente pela membrana, pode então ser utilizada no próximo complexo enzimático.
 - ✓ O substrato do complexo II, o succinato, é uma molécula central no metabolismo do *T. cruzi*, sendo produzido no glicossomo e na

mitocôndria. Acreditava-se que a produção de succinato na mitocôndria seria mediada pela reação reversa da succinato desidrogenase do ciclo de Krebs, porém Christmas e Turrens (2000) demonstraram que *T. cruzi* produz o succinato mitocondrial através de uma fumarato redutase dependente de NADH (NADH-FRD). Este fato é compartilhado com outros organismos, como *S. cerevisiae* (Camarasa, Faucet e Dequin, 2007). O modelo geral mais bem definido de produção de succinato mitocondrial por algum tripanossomatídeo provém dos estudos com *T. brucei*: o piruvato produzido pela glicólise é convertido em malato, que é transportado para a mitocôndria e é convertido em succinato pela NADH-FRD mitocondrial, sendo excretado pelo parasita em situações de excesso de equivalentes reduzidos produzidos pela célula (Bringaud, Rivière e Coustou, 2006).

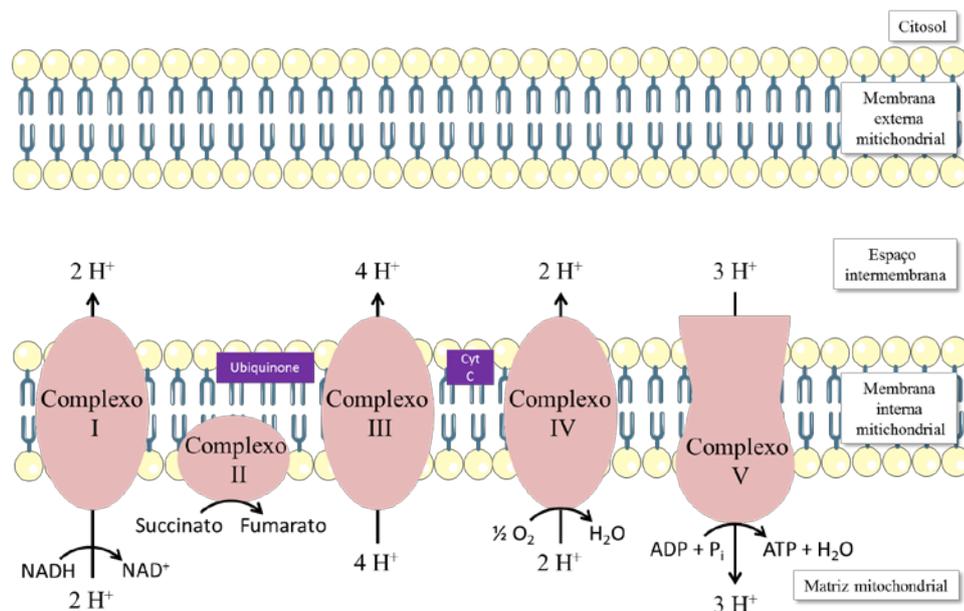


Figura 3. Representação da fosforilação oxidativa considerada padrão para os organismos aeróbios.

1.3 Metabolismo de hexoses em *T. cruzi*

A fim de estabelecer seu ciclo de vida e garantir sua sobrevivência ao longo dos diferentes ambientes pelos quais transita, o *T. cruzi* necessita de metabólitos tanto para manter a homeostase osmótica, bem como para o catabolismo e consequente obtenção de energia. (Silber *et al.*, 2005). Nesse sentido, está bem estabelecido que os tripanossomatídeos são capazes de transportar e metabolizar D-glicose (Glc), aminoácidos e ácidos graxos como fontes de energia (Cazzulo, 1992; Opperdoes, 1987b; Silber *et al.*, 2005; Wood, 1975).

O primeiro relato de utilização de Glc, assim como de D-frutose (Fru) por *T. cruzi* se deu no ano de 1947 por Chang e colaboradores, onde os autores demonstram o estímulo no consumo de O₂ na presença de tais metabólitos (Chang e Negherbon, 1947). É interessante ressaltar que os tripanossomatídeos estão entre as células com maior taxa de consumo da Glc, o que está associado ao fato altamente raro de produzirem e excretarem, mesmo em condições aeróbicas, compostos reduzidos (Ex.: Succinato e alanina), em detrimento à sua completa oxidação em CO₂ e H₂O (Brand, Von e Tobie, 1949; Cazzulo, 1992). Em 1960, Zeledón demonstrou que *T. cruzi* é capaz de metabolizar diversos outros carboidratos, incluindo galactose (Gal), manose (Man) e glucosamina (GlcN), ao também demonstrar consumo de O₂ nessas condições. Este foi o primeiro indício de catabolismo de hexosaminas em *T. cruzi* (Zeledón, 1960). Em 1994 ocorreu o primeiro relato de um ensaio de transporte de Glc diretamente em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Além disso, foi demonstrado que a Glc é transportada por difusão facilitada, através de uma proteína transportadora de hexoses (*TcHT*), com alta afinidade por Glc (Tetaud *et al.*, 1994, 1996), fatos estes previamente observados em outros tripanossomatídeos (Kulle, *ter.*, 1993; Parsons e Nielsen, 1990; Zilberstein e Dwyer, 1985). É importante relatar, porém, que nesses trabalhos a afinidade de outras hexoses foi determinada de maneira indireta, não estimando valores de K_M, mas calculando-se a constante de inibição (K_i) de cada hexose referente ao transporte de Glc. Mais especificamente, Tetaud e colaboradores observaram que, em oócitos de *Xenopus* injetados com RNA de *TcHT*, D-frutose (Fru), D-manose (Man) e D-glucosamina (GlcN) inibem o transporte de glicose em porcentagens acima de 40%, revelando que essas moléculas interagem com *TcHT* e sugerindo que são transportadas por essa proteína em *T. cruzi*. Finalmente, foi mostrado que a D-galactose não é capaz de inibir o transporte de Glc e que os parâmetros cinéticos do transporte de 2-deoxi-glicose (2-DOG) possuem diferenças significativas em comparação com os da Glc, desaconselhando o uso desta molécula como modelo de estudo cinético (Tetaud *et al.*, 1994). Em um trabalho posterior, o mesmo grupo caracterizou o transporte de D-frutose em *T. cruzi* e revelou ainda que outras moléculas e metabólitos podem inibir o transporte de Glc, dentre eles N-Acetil-D-glucosamina (GlcNAc), que apresentou um K_i cerca de 10 vezes menor que a GlcN (Tetaud *et al.*, 1996). Esses resultados também apontaram que GlcNAc pode ser transportado por *TcHT*. Vale ressaltar, que neste trabalho de 1996, Tetaud e colaboradores utilizaram como modelo de estudo células CHO que expressavam heterologicamente *TcHT* e não diretamente epimastigotas. Toda a literatura até então postulava características do transporte de Glc em formas epimastigotas, presentes no inseto vetor. Porém, em 2009 foi demonstrado que as formas tripomastigotas de

T. cruzi possuem a maior taxa de transporte de Glc dentre as formas presentes no hospedeiro vertebrado e que formas amastigotas não transportam Glc e sequer expressam *TcHK* (Silber *et al.*, 2009). Recentemente Shah-Simpson e colaboradores sugeriram a possibilidade de formas que utilizarem glicose como fonte de carbono intracelular, porém uma análise cuidadosa dos resultados apresentados pelos autores e a análise bibliográfica não embasam essas afirmações (Shah-Simpson *et al.*, 2017).

Uma vez no citoplasma, as hexoses são transportadas para os glicosomos por mecanismo desconhecido, onde podem ser substrato da enzima hexoquinase, cuja atividade foi cogitada por Warren e colaboradores em 1967 e caracterizada em extratos de formas epimastigotas em trabalhos posteriores (Adroher, Osuna e Lupiáñez, 1990; Taylor *et al.*, 1980; Urbina e Crespo, 1984; Warren e Guevara, 1964). Racagni *et al.* chegaram inclusive a estimar parâmetros cinéticos no extrato de epimastigotas relacionados à fosforilação não só da Glc, substrato preferencial da hexoquinase (HK), como também da Man, Fru, GlcN, GlcNAc e manosamina. Porém o valor de K_M relacionado à GlcNAc foi estimado com base em ensaio de inibição da fosforilação de Glc, sendo portanto uma avaliação indireta (Racagni e Machado de Domenech, 1983). Em 2003 Cáceres *et al.* identificaram o gene responsável pela codificação da HK em *T. cruzi* (*TcHK*). Nesse trabalho os autores verificaram a cinética e localização glicosomal da enzima *TcHK* (Cáceres *et al.*, 2003). Em 2007 este mesmo grupo identificou e caracterizou outra enzima quinase, específica para Glc (*TcGlcK*) (Cáceres *et al.*, 2007).

Como dito anteriormente, os representantes do clado Kinetoplastida apresentam como característica a compartimentalização da glicólise no glicosomo (Haanstra *et al.*, 2016; Opperdoes, 1987b; Opperdoes e Borst, 1977). Os primeiros 6 passos enzimáticos ocorrem nessa organela e destaca-se o fato de que, nos membros *Trypanosomatidae*, as enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase não são reguladas da maneira alostérica clássica (Aguilar e Urbina, 1986; Racagni e Machado de Domenech, 1983; Taylor e Gutteridge, 1987; Urbina e Crespo, 1984). Ainda nessa perspectiva, em *T. cruzi* a presença de oxigênio na primeira etapa da via glicolítica não é capaz de suprimi-la em um fenômeno similar ao Efeito Warburg que ocorre em células cancerígenas. Classicamente, a transição da anaerobiose para a aerobiose, em muitos organismos, é acompanhada por uma rápida diminuição da glicólise; esta inibição é conhecida como “Efeito Pasteur” e *T. cruzi* carece deste fenômeno (Cannata e Cazzulo, 1984; Heyneman, 1980). Existe a hipótese de que a própria compartimentalização dos passos iniciais da via glicolítica poderia ser um fator de regulação nesses organismos, visto que o

fluxo glicolítico poderia ser controlado pelo transporte de hexoses para o glicosomo e pelo equilíbrio entre os níveis de ATP/ADP intraglicosossomais (Bakker *et al.*, 2000).

Uma vez no glicosomo, caso a hexose inicial seja a Glc, esta é rapidamente convertida em duas moléculas de gliceraldeído-1,3-bisfosfato (G 1,3 BP) pelas enzimas glicolíticas presentes na organela. O G 1,3 BP formado é transportado para o citoplasma por um sistema até então desconhecido e é convertido em fosfoenolpiruvato (PEP), que pode seguir por duas diferentes vias: (i) conversão a piruvato devido a atividade do complexo piruvato kinase citosólico, parte do qual é transportado para a mitocôndria para ser oxidado via ciclo tricarboxílico (TCA) e parte é convertido em alanina por transaminação, no citosol ou mitocôndria, via alanina aminotransferase ou tirosina aminotransferase (ALAT e TAT respectivamente) (Cannata e Cazzulo, 1984; Cazzulo, 1992) (ii) transportado de volta para o glicosomo, seguido pela carboxilação do PEP em oxaloacetato, via ação da enzima PEP carboxiquinase (PEPCK) (Acosta *et al.*, 2004). O oxaloacetato resultante é convertido em malato por uma enzima malato desidrogenase glicososomal (MDHg), o qual deixa o glicosomo e é convertido novamente para piruvato por uma enzima málica citoplasmática. O malato pode ainda ser transportado para a mitocôndria, onde pode ser convertido em piruvato pela enzima málica mitocondrial e oxidado via ciclo de Krebs [revisado por (Silber *et al.*, 2005)

Nesse sentido, quando uma alta concentração de malato atinge a matriz mitocondrial, o destino do mesmo depende da atividade das enzimas do TCA. Se a operação do ciclo for baixa (um caso extremo seria em anaerobiose), parte do oxaloacetato produzido pela malato desidrogenase mitocondrial (MDHm), irá se acumular e inibir a enzima málica mitocondrial, fazendo com que a maioria do malato seja convertido a succinato via fumarato redutase. Se o ciclo estiver trabalhando ativamente, os níveis de oxaloacetato serão mantidos baixos e a enzima málica mitocondrial vai estar ativa. Assim, parte do malato será convertido a piruvato, que pode se ligar à coenzimaA (CoA) para formar acetil-CoA, liberando CO₂, reação catalisada pelo complexo piruvato desidrogenase. De fato, evidências recentes corroboraram que essas duas ramificações no ciclo de Krebs está presente tanto em *T. cruzi*, como em *T. brucei* (Cannata *et al.*, 1979; Cannata e Cazzulo, 1984; Cazzulo, 1994). Até o momento não foram mostradas evidências da existência de reserva de carboidrato, como glicogênio ou amido, no *Trypanosoma cruzi*. Além disso, não existem evidências diretas de uma gliconeogênese operativa, porém afirmações na literatura (Maugeri, Cannata e Cazzulo, 2011) e resultados positivos para a atividade das enzimas específicas da gliconeogênese: piruvato fosfato diquinase (PPDK; 2.7.9.1; (Acosta *et al.*, 2004; Bringaud, Baltz e Baltz, 1998)),

piruvato carboxilase (PC; 6.4.1.1; (Acosta *et al.*, 2004)), fosfoenolpiruvato carboxiquinase (PEPCK; 4.1.1.3; (Acosta *et al.*, 2004)), Frutose-1,6-bifosfatase (FBP; EC 3.1.3.11; (Adroher, Osuna e Lupiáñez, 1987)) e glicose-6-fosfatase (G6Pase; 3.1.3.9; (Avila *et al.*, 1979; Zingales *et al.*, 1979)) tem indicado a presença desse processo.

1.4 Biossíntese de nucleotídeos-açúcares em *T.cruzi*

Hexosaminas ou amino-açúcares são hexoses que contêm em sua estrutura um grupo amino em detrimento a um grupo hidroxila. São moléculas intrinsecamente ligadas ao metabolismo de hexoses e aminoácidos e são essenciais para a formação de nucleotídeos-açúcares. Estes, por sua vez, são os doadores ativados de açúcares nas reações de glicosilação. Comumente, a síntese destes compostos ocorre no citoplasma, com exceção de CMP-ácido siálico (CMP-Sia), que é sintetizado no núcleo da célula (Nakata *et al.*, 2001).

O nucleotídeo-açúcar UDP-GlcNAc é um importante metabólito, uma vez que a ligação de GlcNAc para resíduos de Asn, na N-glicosilação, representa a ligação mais amplamente distribuída de carboidratos a peptídeos. Em *T. cruzi*, O UDP-GlcNAc produzido é direcionado para o complexo de Golgi (Baptista *et al.*, 2015) para a formação do oligossacarídeo precursor para a N-glicosilação, que será posteriormente adicionado a um resíduo de asparagina. Além disso, o UDP-GlcNAc participa da síntese de um precursor que será destinado aos eventos de O-glicosilação, que, em *T. cruzi*, tem início com a transferência de N-acetilglucosamina (GlcNAc) para um resíduo de serina ou treonina, enquanto que em outros organismos, incluindo os hospedeiros do parasita, o grupo transferido é o N- acetilgalactosamina (GalNAc), pelo UDP-GalNAc (Koeller *et al.*, 2014)

No processamento de N-glicanos, GlcNAc ainda é utilizado para a formação de uma grande variedade de oligossacarídeos complexos (Spiro, 2002). UDP-GlcNAc também é um precursor de vários glicoconjugados, ácido hialurônico (Vigetti *et al.*, 2012), GPIs (Watanabe *et al.*, 1998) e mucinas (Monti *et al.*, 2004). A síntese de ácido hialurônico ocorre através da O-GlcNAcetilacção, processo que ocorre no citoplasma de diversas células e que utiliza UDP-GlcNAc como substrato para a elaboração da glicosaminaglicana (Vigetti *et al.*, 2012).

Em *Trypanosoma* sp. o primeiro passo na síntese das mucinas corresponde à adição de GlcNAc a resíduos de treonina da cadeia peptídica, em uma reação catalisada pela O-GlcNAc transferase, que utiliza diretamente UDP-GlcNAc como substrato (Roper e Ferguson, 2003). As glicoproteínas mais abundantes na superfície do *T. cruzi* são as Tc-mucinas, mucinas associadas a proteínas de superfície (ou, mucin-associated surface proteins- MASP) e os

membros da família trans-sialidase (TS) (Todeschini *et al.*, 2009). Estima-se ainda que cerca de 6% dos genes preditos de *T. cruzi* codificam para a síntese de mucinas, enfatizando a importância dessas moléculas. (Buscaglia *et al.*, 2006). Ainda é importante ressaltar que a incorporação de ácido siálico através da superfície pelo parasita, mediada pela TS, é um evento central para o estabelecimento da infecção. (Coustou *et al.*, 2008; Milewski, Gabriel e Olchoway, 2006; Previato *et al.*, 1994)

1.5 Passos enzimáticos relacionados às hexosaminas

A fosforilação das moléculas GlcN e GlcNAc por hexoquinase (EC 2.7.1.1) pode ser considerada a **mais provável** porta de entrada para ambos metabólitos no metabolismo do *T. cruzi*, visto que não existem sequências putativas para glucosamina quinase (EC 2.7.1.8) ou N-acetilglucosamina quinase (EC 2.7.1.59) no genoma de Tripanossomatídeos. Em seguida, pode-se dividir o metabolismo de hexosaminas em duas partes; uma catabólica e outra anabólica. De modo geral a via catabólica, denominada *Hexosamine Degradation Pathway* (HDP), é composta de dois passos enzimáticos: (i) GlcNAc é fosforilado no glicosomo, formando N-acetil-glucosamina-6-fosfato (GlcNAc-6-P) e posteriormente desacetilação pela enzima N-acetilglucosamina 6-fosfato desacetilase (nagA; EC 3.5.1.25), produzindo glucosamina-6-fosfato (GlcN-6-P) e acetato; (ii) GlcN-6-P seria então convertido em fructose 6-fosfato (Fru-6-P) e amônia pela ação da enzima glucosamina 6-fosfato desaminase, (nagB; EC 3.5.99.6), no que seria o passo final na via de utilização de GlcN/GlcNAc específica, ficando assim determinado o seu destino metabólico (Vincent, Davies e Brannigan, 2005; Yadav *et al.*, 2011) após esse passo a cadeia carbônica seria processada em reações pertencentes à glicólise.

Já a via anabólica, denominada *Hexosamine Biosynthesis Pathway* (HBP), é composta de quatro passos enzimáticos. Inicialmente, a enzima glutamina fructose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA EC 2.6.1.16), que utiliza L-glutamina (Gln) como fonte de nitrogênio e Fru-6-P como estrutura carbônica para formar os produtos L-glutamato (Glu) e GlcN-6-P. As propriedades bioquímicas e físicas da enzima GF6PA foram extensivamente estudadas em organismos procaríotas (Badet *et al.*, 1987; Teplyakov *et al.*, 2001, 2002). No entanto, pouco se sabe sobre suas ortólogas eucarióticas. A extração e purificação de GF6PA de eucariotas é uma tarefa difícil devido aos baixos níveis em que está expressa, além de ser uma proteína de grande massa molecular e de formar complexas estruturas quaternárias. Portanto, a estratégia mais utilizada para se avaliar o papel biológico de GF6PA foi a

superexpressão. Um exemplo dessa abordagem foi o trabalho de Sachadyl e colaboradores em *C. albicans*, (Sachadyn *et al.*, 2000). Em diferentes organismos está reportado que a reação da GF6PA é unidirecional e que não é dependente de cofatores. (Calcagno *et al.*, 1971; Chmara e Zahner, 1984; Ikeda e Tsuiki, 1972; McKnight *et al.*, 1992). Em 2008, Naderer e Co. demonstraram que *Leishmania major* se torna auxotrófica para hexosaminas quando o gene responsável pela expressão de GF6PA é deletado. Os autores também afirmam nesse trabalho que a enzima é essencial para a viabilidade de formas promastigotas e amastigotas. (Naderer, Wee e McConville, 2008). No segundo passo da via, atua a enzima glucosamina-6-fosfato-N-acetiltransferase (GNA; EC 2.3.1.4). Em eucariotos, a GNA catalisa a transferência do grupo acetil do acetil-CoA para a GlcN-6-P, produzindo GlcNAc-6-P e co-enzima A (CoA). A presença de íons bivalentes, especialmente Mg^{2+} , contribui positivamente para a atividade da enzima, mas aparentemente esses cátions não desempenham papel catalítico *per se* (Milewski, Gabriel e Olchoway, 2006). Em *Saccharomyces cerevisiae*, a GNA apresenta-se como um dímero, cujo monômero consiste de um núcleo central constituído por cinco folhas β -antiparalelas de cadeia mista rodeadas por quatro α -hélices, e uma fita (strand) β_6 na extremidade COOH-terminal, que se projeta para longe do núcleo central. O mecanismo molecular da reação catalisada pela enzima envolve um ataque nucleofílico direto do grupo amino da GlcN-6-P na carbonila do Acetil-CoA, seguida da formação de um intermediário tetraédrico (Peneff, Mengin-Lecreulx e Bourne, 2001). A GNA também tem sido estudada em *T. brucei*; seus parâmetros cinéticos e localização glicosossomal foram definidos após os estudos de Mariño e colaboradores. Os valores de K_M obtidos para GlcN-6P ($144 \pm 11 \mu M$) e acetil-CoA ($243 \pm 44 \mu M$) (Marino *et al.*, 2011) são similares aos valores já relatados para esta enzima em outros organismos (Kato *et al.*, 2005; Nishitani *et al.*, 2006). Além disso, Mariño e colaboradores verificaram que o gene *TbGNA* é essencial em *T. brucei*. Mariño ainda verificou que a GNA de *T. brucei* assemelha-se à encontrada em humanos quanto à especificidade por substratos, atividade e modo de dimerização, no entanto, guarda diferenças quanto ao sítio ativo da enzima (Marino *et al.*, 2011). No terceiro passo da via, atua a enzima fosfoacetilglucosamina mutase (PAGM; EC 5.4.2.3) que catalisa a reação de interconversão de GlcNAc-6-P em N-acetil-glucosamina-1-fosfato (GlcNAc-1-P). A reação da PAGM é dependente de íons divalentes, em especial Mg^{+2} e em muitos organismos foi relatada como uma enzima promíscua, por exercer eventualmente as catálises de conversão entre Glicose-6-fosfato (Glc-6-P) e Glicose-1-fosfato (Glc-1-P) e entre Manose-6-fosfato (Man-6-P) e Manose-1-fosfato (Man-1-P) (Boles *et al.*, 1994; Fernandez-Sorensen e Carlson, 1971; Hofmann, Boles e Zimmermann, 1994). De fato, a proteína de *T. brucei* homóloga às PAGMs

de outros organismos, demonstrou catalisar a reação de mutase tanto de Glc-6-P quanto de GlcNAc-6-P. Neste mesmo trabalho os parâmetros cinéticos relacionados ao substrato GlcNAc-6-P foram estipulados (Bandini *et al.*, 2012); Finalmente, o quarto passo enzimático da HBP é catalisada pela enzima UDP- N-acetilglucosamina pirofosforilase (UAP; EC 2.7.7.23). UAP catalisa a conversão de UTP e GlcNAc-1-P, em UDP-N-acetil-D-glucosamina (UDP-GlcNAc) e pirofosfato. Esta enzima pertence à família das transferases, especificamente aquelas que transferem grupos nucleotídicos fosfatados (nucleotidiltransferases). Em 2008 Strokes e colaboradores identificaram uma sequência de UAP no genoma de *T. brucei*, caracterizaram a cinética correspondente e verificaram a sua essencialidade. Em 2010 Urbanick e col foram capazes de obter um cristal de TbUAP recombinante e utilizá-la como ferramenta para a seleção de inibidores (Urbaniak *et al.*, 2013)

Os trabalhos que descrevem os passos enzimáticos de HDP e HBP demonstraram sua essencialidade em tripanossomatídeos, especialmente em *T. brucei*. Isto denota a necessidade de se aprofundar os estudos sobre HBP e no caso de *T. cruzi*, iniciar sua caracterização cinética e a verificação e a participação em processos biológicos do parasita.

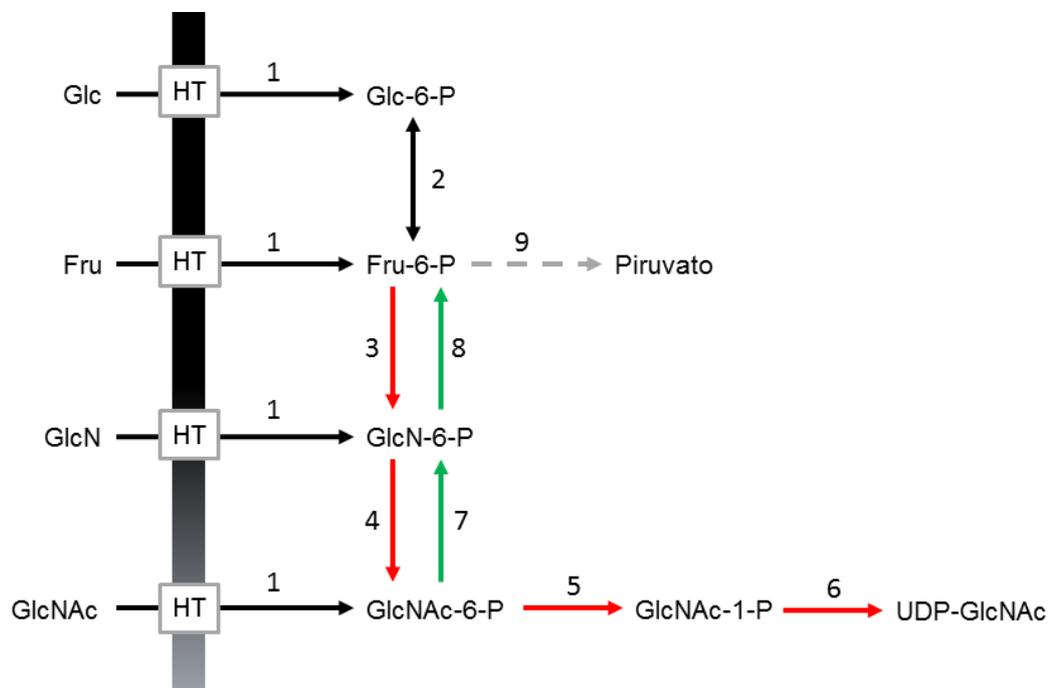


Figura 4. Processos relacionados ao metabolismo de hexosaminas. HT: Transportador de hexoses. (1) Hexoquinase (HK; EC 2.7.1.1; Q4D3P5); (2) glicose-6-fosfato isomerase (PGI; EC 5.3.1.9; Q4E5N1); (3) glucosamina-frutose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA; EC 2.6.1.16; Q4DZ02); (4) glucosamina-6-fosfato-N-acetiltransferase (GNA; EC 2.3.1.4; Q4DX16); (5) fosfoacetilglucosamina mutase (PAGM; EC 5.4.2.3; Q4DA33); (6) UDP- N-acetilglucosamina pirofosforilase (UAP; EC 2.7.7.23; Q4E2R5); (7) N-acetilglucosamina 6-fosfato desacetilase (nagA; EC 3.5.1.25; Q4CZT5); (8) glucosamina 6-fosfato desaminase (nagB; EC 3.5.99.6; Q4DD39); (9) subsequentes passos enzimáticos da glicólise.

2.1 Objetivo geral

Avaliar a existência e a relevância do metabolismo de hexosaminas na biologia do *T. cruzi*.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a caracterização bioquímica da TcGF6PA e TcGNA e avaliar o seu papel na biologia do *T. cruzi*.
- Caracterizar a cinética do transporte das hexosaminas para o interior das células.
- Avaliar o papel das hexosaminas na bioenergética de *T. cruzi*

3.1 Microorganismos utilizados e condições de crescimento

3.1.1 *Escherichia coli*

As cepas bacterianas utilizadas são descritas a seguir, sendo a primeira utilizada para clonagem do DNA de interesse e a segunda para expressão da proteína recombinante, respectivamente: *E. coli* cepa **XL1-Blue**: *recA1 endA1 gyrA96 thi⁻¹ hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI^qZAM15 Tn10 (Tet^r)*] e *E. coli* cepa **BL21-Codon Plus (DE3)-RIPL**: F' *ompT hsdS (r_B⁻ m_B⁻) dcm⁺ Tet^r gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Cam^r]*. Os genes listados significam alelos mutantes. Os genes no episoma F', no entanto, são de tipo selvagem, a menos que indicado de outra forma.

Para a cultura de cepas bacterianas foi utilizado o meio Lysogeny broth (LB) (Bertani, 1951), cuja composição é: 10 g de peptona de carne, 5 g de extrato de levedura e 10 g de NaCl, por litro de meio preparado. De acordo com a cepa e/ou do plasmídeo usado na transformação bacteriana, o meio foi suplementado com antibióticos específicos: ampicilina (100 µg/mL), tetraciclina (5 µg/mL) ou canamicina (30 µg/mL). Para a preparação de meios sólidos, foi adicionado ágar bacteriológico na concentração final de 1,5% p/v. Os clones selecionados foram conservados em uma solução de LB suplementada com 15% de glicerol (v/v) para serem armazenados a - 80°C.

3.1.2 *Trypanosoma cruzi*

3.1.2.1 *Formas epimastigotas*

Foi utilizada cepa CL, clone 14 de *T. cruzi* (Brenner e Chiari, 1965). Os epimastigotas foram mantidos por passagens sucessivas (a cada 48 h) a 28 °C em meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*) cuja composição é: 5 g de infusão de fígado, 5 g de triptose, 4 g de NaCl, 0,4 g de KCl e 8 g de Na₂HPO₄ por litro de meio preparado; o pH utilizado foi 7.4. Em seguida foi adicionada hemina ao meio na concentração final (Cf) de 0,01 mg/mL. Após autoclavagem o meio foi suplementado com soro fetal bovino estéril (Cf = 10%) e glicose estéril (Cf = 0,2%) (Camargo, 1964).

3.1.2.2 *Tripomastigotas metacíclicos*

Para diferenciação *in vitro* das formas epimastigotas em formas tripomastigotas metacíclicas, foi usado meio TAU (do inglês *Triatomine Artificial Urine* ou urina artificial de triatomíneo, cuja composição é 190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM tampão fosfato de sódio pH 6)) (Contreras *et al.*, 1985). Inicialmente, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento (5×10^7 parasitas mL⁻¹) foram transferidas para meio LIT na concentração de $0,5 \times 10^7$ p/mL. Decorridos quatro dias de crescimento, a fim que se atingisse a fase estacionária de crescimento, após lavagens com PBS (tampão fosfato-salino, pH 7,4), as células (5×10^7 mL⁻¹), transferidas para meio TAU no qual foram incubados por duas horas a 28 °C. Após esse tempo, as células foram transferidas para o meio TAU-3AAG (TAU suplementado com 10 mM Glc, 2 mM Asp, 50 mM Glu, 10 mM Pro) e incubados a 28 °C por sete dias.

De acordo com o objetivo do experimento, quando necessário, as formas metacíclicas foram purificadas utilizando uma matriz de troca iônica (DEAE-celulose, Sigma, Saint Louis, MO, EUA®), como descrito previamente (Teixeira e Yoshida, 1986). Brevemente, os parasitas foram lavados duas vezes com PBS e ressuspensos em 3-5 mL de PBS-glicose 5,4% (PBS-G). Posteriormente foram aplicados na coluna de DEAE-celulose previamente equilibrada com cinco volumes PBS-G. A eluição de tripomastigotas metacíclicos foi avaliada mediante coleta de alíquotas de aproximadamente 2 mL e observação por microscopia de luz. As frações contendo parasitas foram coletadas até a detecção de formas epimastigotas. Todas as frações seguintes a aquela onde foram detectados epimastigotas foram descartadas. As frações contendo tripomastigotas metacíclicos purificados foram morfológica e quantitativamente analisadas mediante a contagem em câmara de Neubauer e utilizados em experimentos posteriores.

3.1.2.3 *Formas tripomastigotas derivados de células*

Foram utilizadas células da linhagem CHO-K₁, linhagem derivada de ovário de hamster chinês. As células CHO-K₁ foram mantidas em meio RPMI-1640 (Vitrocell™) suplementado com 10% SFB (v/v), 0,15% NaHCO₃ (p/v), 100 U mL⁻¹ penicilina, 100 µg mL⁻¹ estreptomicina e incubadas a 37 °C sob atmosfera úmida de 5% de dióxido de carbono (CO₂).

Assim, 5×10^5 células.mL⁻¹ foram semeadas em garrafas de cultivo e, após adesão à superfície, foram infectadas com formas tripomastigotas a uma multiplicidade de infecção (moi) de 50. As células e os parasitas foram incubados durante 3 h a 37 °C sob atmosfera de CO₂, lavados duas vezes com PBS estéril, seguido pela adição de meio RPMI suplementado com 10% SFB (v/v). Após 24 h de incubação a 37 °C, as células foram lavadas duas vezes com PBS e ressuspensas em meio RPMI suplementado com 2% SFB (v/v); as garrafas foram transferidas a 33 °C sob atmosfera de 5% CO₂. As formas tripomastigotas de cultura foram coletadas do sobrenadante de garrafas infectadas após o quarto, quinto e/ou sexto dia pós infecção, tempo esse referente à duração de um ciclo de infecção até ruptura das células hospedeiras.

3.2 Caracterização do transporte de hexosaminas em *Trypanosoma cruzi*

A caracterização do transporte de GlcN e GlcNAc foi realizada em formas epimastigotas de *T. cruzi*, utilizando metodologia descrita em (Silber *et al.*, 2002, 2009). A incorporação das hexosaminas também foi verificada em outros dois estágios do ciclo de vida do parasita: tripomastigotas oriundos de infecção em células de mamífero e tripomastigota metacíclico. Como controle e para futuras comparações, o ensaio de transporte de Glc também foi avaliado.

3.2.1 Transporte em formas epimastigotas

O cultivo de formas epimastigotas foi iniciado com uma densidade celular de 1×10^7 mL⁻¹ e mantido por 48 h para atingirem a fase exponencial de crescimento (4 a 6×10^7 parasitas/mL). As células foram lavadas duas vezes em PBS (1.600 x g, 5 min, 4°C) e ressuspensos no mesmo tampão a uma densidade final de 2×10^8 parasitas/mL. A suspensão de parasitas foi distribuída em alíquotas de 100 µL (2×10^7 parasitas). O transporte foi iniciado pela adição de 100 µL de Glc, GlcN ou GlcNAc em PBS, concentração final 3 mM, na presença de 1,6 µCi de D-[U-¹⁴C]-Glucose, D-[U-¹⁴C]-glucosamine ou D-[1-¹⁴C]-GlcNAc (ARC Inc., Saint Louis, MO, USA). A menos que outra informação seja especificada, a incorporação foi medida a 28 °C, por um minuto, na presença de 3 mM do metabólito radioativamente marcado. A interrupção do transporte foi feita pela adição de excesso 800 µL do metabólito sendo avaliado pre-incubado em gelo (50 mM em PBS) e os tubos foram colocados em gelo imediatamente após a adição dessa solução. Os parasitas

foram lavados duas vezes por centrifugação (10.000 x g, 2 min, 4 °C) ressuspensos em 100 µL de PBS e transferidos para tubos com 1 mL de líquido de cintilação. Para cada condição foi analisada a associação de marcação radiativa a células incubadas por 0 minuto (tempo zero), pela adição simultânea da solução de metabólito marcado e solução de parada com metabólito frio. Este dado foi utilizado para o cálculo das CPMs (cintilações por minuto) incorporadas durante 1 min. As amostras foram analisadas no detector de cintilação Perkin Elmer Tri-carb 2910 TR.

3.2.2 Dependência do transporte em relação ao tempo, V_{\max} e K_M

A incorporação de hexosaminas em relação ao tempo foi medida utilizando a mesma concentração do substrato (3 mM) e diferentes tempos de incubação dos parasitas (0 a 3 h). Dos dados obtidos foi estabelecido o tempo inicial no qual era possível medir V_0 (janela de tempo na qual pode se assumir que o substrato transportado em função do tempo segue uma função linear). Também foi avaliado o transporte de hexoses em relação à concentração do substrato, para isso a incorporação foi medida em função da concentração externa de hexosaminas. Os dados obtidos foram utilizados para ajuste da função hiperbólica que descreve o modelo cinético de Michaelis-Menten, sendo determinados os valores de V_{\max} e K_M .

3.2.3 Transporte de hexosaminas em competição com glicose

A possibilidade de o transporte de hexosaminas ocorrer via transportador de Glc foi avaliada utilizando os metabólitos radioativamente marcados (como descrito em 3.3.1), em ensaios de competição independentes e nas concentrações correspondentes à K_M dos transportadores, previamente estabelecidas (Concentrações utilizadas: Glc = 0,18; GlcN = 0,84; GlcNAc = 0,06 mM). Deste modo seis ensaios foram desenhados, em cada um se variou a concentração de um substrato e ao fim foi possível calcular o IC_{50} correspondente a cada interação. Como controle negativo avaliamos o transporte sem competição e como controle positivo de inibição foram utilizados Glc, GlcN ou GlcNAc frios na concentração correspondente a 10 vezes o valor da sua própria K_M .

3.2.4 Transporte em formas tripomastigotas metacíclicas

Formas tipomastigotas metacíclicas, obtidas como descrito anteriormente, foram utilizadas para o transporte de hexosaminas. Os parasitas foram incubados na presença de hexosaminas marcadas radioativamente. O transporte foi realizado conforme descrito para formas epimastigotas.

3.2.5 Transporte utilizando estágios do *T. cruzi* presentes no hospedeiro mamífero

O transporte de hexosaminas também foi avaliado em formas do parasita presentes no hospedeiro mamífero: tripomastigotas oriundos de infecções em células CHO-K₁, obtidas conforme descrito anteriormente; as quais foram incubadas na presença de hexosaminas radioativamente marcada por 1 e 10 min. O transporte foi realizado conforme descrito para formas epimastigotas.

3.3 Avaliação da importância das hexosaminas para o *T. cruzi*

3.3.1 Atividade quinase de hexose/hexosaminas em extratos de formas epimastigotas

Formas epimastigotas em fase exponencial de proliferação foram usadas para a obtenção de extratos, procedimento descrito com mais detalhes em 3.4.4. Para a avaliação da atividade de quinase de hexose/hexosaminas nestes extratos foi utilizado o sistema clássico de acoplamento com as enzimas piruvato quinase e lactato desidrogenase para a quantificação do ADP derivado da fosforilação da hexose/hexosamina:

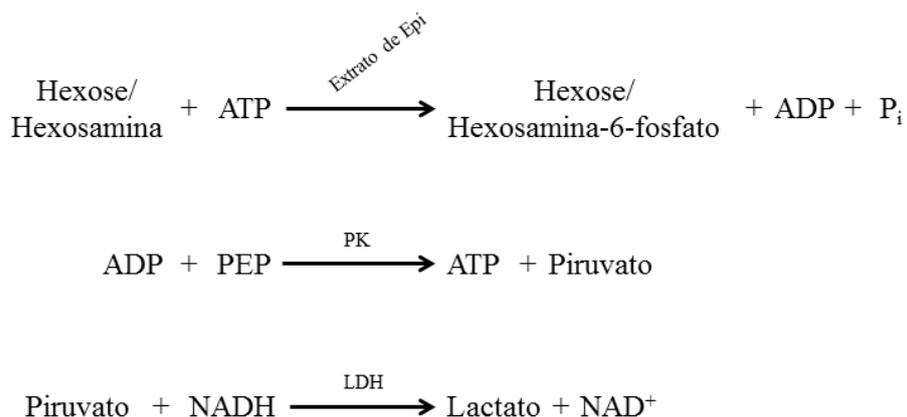


Figura 5. Reações para medição de atividade de quinase. A atividade no extrato foi medida por espectrofotometria a 340 nm observando-se a oxidação do NADH (substrato da enzima LDH). A reação enzimática foi medida, modificando-se o protocolo previamente padronizado por (Crispim *et al.*, 2018), para atividade enzima glutamina sintetase de *T. cruzi*: (34,1 mM tampão imidazol; 3 mM Glc ou Hexosamina; 1 mM ATP; 18,9 mM KCl; 1 mM MgCl₂; 0,25 mM NADH; 1,1 mM fosfoenolpirurato; 1 U PK/LDH). Para iniciar a reação foi utilizado extrato de epimastigotas em diferentes concentrações (25, 50 e 100 µg) em cada medição ou sem extrato como um dos controles negativos. O outro controle negativo utilizado no ensaio consistiu na reação de atividade sem Hexose/Hexosamina e na presença de todos os outros reagentes, incluindo a quantidade máxima de extrato utilizada no experimento (100 µg).

3.3.2 Viabilidade de formas epimastigotas

3.3.2.1 Método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazoliobromida)

Epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes com PBS (10 min, 1.100 x g, 4 °C). O precipitado foi ressuspendido em PBS, a amostra foi contada em câmara de Neubauer e foram feitas soluções com a concentração final de 30 x 10⁶ parasitas/mL. As amostras foram então suplementadas com 3 mM de Glc, GlcN, GlcNAc ou apenas PBS (controle). Após 24, 48 e 72 horas a viabilidade celular dos parasitas foi avaliada utilizando-se os métodos de redução de Mosmann (González-Pinzón, Haggerty e Myrold, 2012; Mosmann, 1983). As amostras foram lavados uma vez com PBS, os precipitados foram ressuspendido em 300 µL de PBS e distribuídos em triplicata em placa de 96 poços, 100 µL por poço. Logo após, foram adicionados 20 µL de MTT (5 mg/mL) e a placa foi incubada a 28°C, protegida da luz, por 3 horas. A reação foi interrompida com a adição de 100 µL de SDS 10%. As placas foram lidas em espectrofotômetro de placa utilizando-se λ 595 nm e como referência λ 690 nm. A viabilidade das células foi observada mediante o aparecimento da cor azul do formazan homogêneo “thiazolidin”. O mecanismo de redução do MTT parece envolver a atividade enzimas mitocondriais NAD(P)H dependentes (Berridge e Tan, 1993).

3.3.2.2 Método de Resazurina

Epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes com PBS (10 min, 1.100 x g, 4 °C). O precipitado foi ressuspenso em PBS. As amostras foram contadas em câmara de Neubauer e foram feitas soluções com a concentração final de 20×10^6 parasitas/mL. As amostras foram então suplementadas com 3 mM de Glc, GlcN, GlcNAc ou apenas PBS (controle). Posteriormente as culturas foram distribuídas em triplicata em placa de 96 poços, 100 µL por poço. Logo após, a placa foi incubada, protegida da luz a 28°C. A solução de Resazurin foi adicionada (10 µL por poço, Cf = 0,125 µg/µL), 2 h antes dos tempos de incubação desejados, a saber, 24, 48, 72 e 96 h. Os parâmetros de leitura no fluorímetro foram excitação: λ 544 nm e emissão: λ 570 nm. A Resazurina é um indicador redox que quando reduzido a resoforina nas mitocôndrias, torna-se rosa e fluorescente.

3.3.3 Ensaio de recuperação de proliferação

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes com PBS (10 min, 1.100 x g, 4 °C). Os parasitas, 50×10^6 parasitas/mL, foram ressuspendidos em PBS suplementado com 5 mM de Glc, GlcN, GlcNAc ou apenas PBS (controle). Após 24, 48, 72 ou 96 horas de incubação os parasitas foram lavados 2 vezes em PBS, contados e ressuspendidos em meio LIT ($2,5 \times 10^6$ parasitas/mL). A proliferação celular foi estimada por leitura da absorbância da densidade ótica (DO) em 620 nm. A absorbância foi convertida em valores de densidade celular (parasitas/ml) usando uma equação de regressão linear que foi obtida de epimastigotas mantidos em meio LIT em diferentes concentrações.

3.3.4 Avaliação dos níveis de ATP intracelular

Para avaliar os níveis de ATP intracelular em formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi utilizado o *kit* bioluminescente para células somáticas, Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Parasitas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes em PBS e incubados por 24 h em PBS. Após esse período foi adicionado 3 mM de Glc, GlcN ou GlcNAc, PBS foi usado como controle. Após diferentes tempos incubação por um período máximo de 24 horas, nos diferentes metabólitos, 1×10^7 parasitas foram lavados em PBS (10.000 x g, 2 min, 4°C) e ressuspendidos em 200 µL de tampão de lise + 200 µL de PBS. O lisado foi distribuído em triplicata em placa de 96 poços (50 µL por poço) e adicionado a enzima luciferase. A concentração de ATP foi determinada utilizando-se uma curva de

calibração com concentrações conhecidas de ATP. No ensaio, 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 *Spectramax i3*, *Molecular Devices*, utilizando-se um λ 570 nm (Martins *et al.*, 2009). A normalização foi feita com a quantificação das proteínas totais do lisado, utilizando-se o método de Bradford (Bradford, 1976).

3.3.6 Importância das hexosaminas na metaciclologênese

Formas epimastigotas em fase exponencial de proliferação (50×10^6 parasitas.mL⁻¹), foram distribuídas em garrafas na concentração final de 5×10^6 parasitas mL⁻¹ em meio LIT. Os parasitas foram incubados por 4 dias a 28 °C, atingindo a fase estacionária, seguindo a configuração padrão de proliferação do *T. cruzi*, cepa CL 14 como demonstrada no Anexo 1. Após esse período, os parasitas foram contados utilizando câmara de Neubauer. Foram considerados em fase estacionária culturas em concentração acima de 80×10^6 parasitas/mL, também demonstrada no Anexo 1. A cultura foi lavada duas vezes com PBS (5 min, 1.600 x g, 4 °C) e ressuspensa em meio TAU. Em seguida a amostra foi distribuída em placa de 24 poços e incubada por 2 horas a 28 °C. Após esse tempo, foram suplementados, em diferentes os metabólitos de estudo (10 mM Glc, 10 mM GlcN, 10 mM GlcNAc ou 10 mM GlcN + 5 mM dos aminoácidos Pro, Asp e Glu) ou o controle positivo de diferenciação, o meio padrão TAU 3AAG (10 Mm Glc + 5 mM dos aminoácidos Pro, Asp e Glu) A porcentagem de diferenciação foi monitorada a cada dia por contagem em câmara de Neubauer dos parasitas liberados para o sobrenadante dos poços,. Em alguns experimentos, como nas atividades enzimáticas ou ensaios de transporte foi utilizado somente o tratamento no meio TAU 3AAG e no sexto dia de diferenciação os parasitas foram purificados em coluna de DEAE-celulose.

3.4 Identificação dos genes putativos para enzimas do metabolismo de hexosaminas no genoma de *T. cruzi*

3.4.1 Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

A obtenção de DNA genômico de *T. cruzi* foi feita a partir de formas epimastigotas e a extração do mesmo foi feita com o uso de um *kit* comercial (DNeasy® Blood & Tissue Kit; Qiagen), de acordo com as recomendações do fabricante. A quantificação do DNA foi realizada mediante utilização do NanoDrop 2000 Spectrophotometer (*Thermo Scientific*).

3.4.2 Amplificação e clonagem de TcGF6PA e TcGNA de *T. cruzi*

Com base na sequência gênica de TcGF6PA (TcCLB.510303.200) e TcGNA (TcCLB.508831.120), foram desenhados e sintetizados oligonucleotídeos com sítios de clivagem para endonucleases de interesse, possibilitando o desenvolvimento das metodologias detalhadas nesse trabalho. A amplificação do fragmento de DNA de interesse foi realizada mediante a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). Para isso, foram preparadas reações contendo: 100 ng de DNA genômico extraído de formas epimastigotas da cepa CL, clone 14 de *T. cruzi*, 1 x de tampão para Taq DNA Polimerase (+KCl, -MgCl₂) (Fermentas®), 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada oligonucleotídeo, 2,5 U da enzima Taq DNA polimerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA®) e H₂O mili-Q para 25 µL. Como controle negativo foi usado água ao invés de DNA na amostra. As condições de amplificação, em linhas gerais, foram as seguintes: desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguida por 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1 minuto, anelamento dos oligos ao DNA molde a 62 °C por 1 minuto e 30 segundos e extensão da cadeia nucleotídica a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, além de uma extensão final adicional a 72 °C durante 10 minutos. Os produtos de PCR obtidos foram purificados a partir do gel de agarose utilizando o kit GeneJET® (Thermo®) segundo as indicações do fabricante.

Para a verificação da amplificação e do tamanho do fragmento de DNA correspondente a ORF de TcGF6PA ou TcGNA, as amostras foram resolvidas sob eletroforese em gel de agarose. Para isto, o gel foi preparado em 1% (p/v) de agarose dissolvida em tampão TAE (40 mM Tris, 1 mM EDTA pH 8 ajustado com ácido acético), acrescentado de 0,5 µg/mL brometo de etídio. Aliquotas de DNA foram diluídas em tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol p/v, 0,25% xileno cianol p/v e 20% glicerol v/v) e aplicadas no gel. Como padrão de peso molecular foi utilizado o 1Kb DNA ladder (Fermentas®). A corrida eletroforética foi realizada aplicando uma voltagem de 115 V e os fragmentos de DNA foram visualizados sob a luz ultravioleta utilizando um transiluminador Benchtop UV transiluminator (UVP).

Os amplicons obtidos foram precipitados com 10% (do volume da PCR) de acetado de sódio 3 M pH 5,2 e três volumes de etanol absoluto gelado e mantidos a -20 °C. Após a precipitação, a reação foi centrifugada a 12.000 xg por 10 min a 4 °C, o sedimento foi lavado com etanol 70%, e o DNA seco e ressuspenso em água ultrapura.

Seguindo indicações do fabricante, as sequências amplificadas foram digeridas com as enzimas de restrição correspondentes e clonadas no vetor pET28a₍₊₎ (NOVAGEM®),

conferindo possibilidade de expressão das proteínas recombinantes fusionadas a uma etiqueta de 6xHis no N-terminal ou em ambas extremidades da proteína.

3.4.3 Sequenciamento de DNA

As reações de sequenciamento foram realizadas pelo Método de Sanger (Sanger, Nicklen e Coulson, 1977), utilizando os oligonucleotídeos T7 *sense* e *antisense*, e o kit de sequenciamento de DNA BigDye™ 3.1 (Applied Biosystems) segundo instruções do fabricante. As reações ocorreram no sequenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Os alinhamentos e comparações entre as sequências foram realizados mediante o uso dos programas Align versão 6.2.0, MUSCLE BLAST versão 2.2.19, BioEdit versão 7.0.0 e outros disponíveis.

3.4.4 Expressão e purificação de TcGF6PA e TcGNA recombinantes em *E. coli*

Os genes putativos codificantes das proteínas GF6PA e GNA foram clonados em pET-28a₍₊₎ para expressão em *E. coli* linhagem BL21-códon plus. As bactérias contendo o plasmídeo proliferaram em um pré-inóculo à 37°C em meio LB com kanamicina e tetraciclina por 16 horas. O pré-inóculo foi diluído 1:100 no mesmo meio e incubado à 37°C, sob agitação até a cultura atingir uma densidade óptica (DO) de 0,6, quando seguiu-se variando a temperatura de expressão para otimizar a solubilidade da proteína, usando 0,5 mM IPTG como indutor. Após centrifugação, as amostras foram suspensas em 100 µl de tampão de amostra para Eletroforese de proteínas em gel de poliacrilamida desnaturante (SDS-PAGE) 1X e aplicadas em gel SDS-PAGE 10% (descrito em 3.4.5).

As construções realizadas foram desenhadas para se obter proteínas recombinantes possuindo 6-histidinas no extremo N-terminal (esses resíduos são codificados pelo vetor pET-28a₍₊₎). Isso permite a purificação dessas proteínas num único passo em coluna de afinidade de níquel Ni-NTA agarose (Qiagen®). As culturas pós-indução com IPTG foram centrifugadas (5000 x g por 15 min a 4 °C) os sedimentos foram homogeneizados em tampão de lise, acrescidos de 10 µL de coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich / P8849). Em seguida, as células foram submetidas à lise por sonicação e, após, foi realizada a centrifugação (12000 x g por 30 min a 4 °C), separando-se o lisado clarificado da fração insolúvel (precipitado). O lisado clarificado foi utilizado para dar seguimento à purificação em coluna de resina de níquel (Ni-NTA agarose Qiagen®). Inicialmente a coluna foi equilibrada com 3 volumes de tampão de ligação (20 mM Tris HCl; 500 mM NaCl; **5 mM**

Imidazol; pH = 7,9). O lisado foi então passado três vezes através da coluna. Logo em seguida a coluna foi lavada sequencialmente com 10 volumes de tampão de ligação e 6 volumes de tampão de lavagem (20 mM Tris HCl; 500 mM NaCl; **60 mM Imidazol**; pH = 7,9). Ao fim as proteínas recombinantes foram eluídas com tampão de eluição (20 mM Tris HCl; 500 mM NaCl; **500 mM Imidazol**; pH = 7,9). As amostras eluídas foram quantificadas (método de (Bradford, 1976)) e analisadas em gel SDS-PAGE 10%.

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

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

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

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

3.4.6 Preparo de extrato proteico de *T. cruzi* para medição das atividades enzimáticas de GF6PA e GNA

Os ensaios de atividade das enzimas em estudo, assim como a detecção de TcGNA por western blotting, foram realizados em lisados celulares do parasita. Cada lisado foi preparado a partir de 2×10^7 parasitas, de diferentes formas do ciclo de vida, cultivadas como descrito na seção 3.3.2. No caso das células CHO-K₁, foram usadas 1×10^6 células. O material foi

coletado por centrifugação (10 min a 1.500 xg a 4 °C) e lavado duas vezes com PBS. O precipitado foi ressuspensionado em tampão de extração [20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 100 mM NaCl, 0,25 M sacarose, 1 mM EDTA, 0,1% Triton X-100 (v/v), 1 mM de *Phenylmethylsulfonyl fluoride* (PMSF), dissolvido em Etanol puro, 1 mM de *Tosyl-L-lysyl-chloromethane hydrochloride* (TLCK) e 10 µM de *N-trans-epoxysuccinyl-L-leucine-4-guanidinobutylamide* (E64)]. As células foram lisadas por sonicação através de quatro ciclos de 20% de potência e 30 s de duração com intervalos de 1 min em gelo entre cada um dos ciclos. O lisado foi clarificado por centrifugação (15 min, 16.000 x g a 4 °C). uma alíquota do sobrenadante foi usado para a determinação da concentração proteica (Bradford, 1976).

3.5 Ensaios de atividade enzimática

Os ensaios de atividade foram utilizados tanto para o estudo das enzimas recombinantes obtidas quanto para a verificação de atividade em extratos de *T. cruzi*

3.5.1 Atividade de GF6PA

O princípio da atividade de glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase é que o L-glutamato, produto da reação é diretamente proporcional à atividade enzimática. Para quantificar essa molécula, foi acoplada à reação uma glutamato desidrogenase comercial (Sigma-Aldrich®) e a redução de NAD⁺ e o conseqüente aumento de absorbância a 340 nm foram aferidos. Através desta estratégia foram determinados os parâmetros K_m e V_{max} e foram testados possíveis inibidores da enzima em questão.

3.5.2 Atividade de GNA

Duas metodologias foram aplicadas para a verificação da atividade de GNA, uma para a enzima recombinante e outra para os extratos protéicos de *T. cruzi*, respectivamente:

(i) Método A: utiliza-se do reagente ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB). Para a medição da atividade, 500 µM GlcN-6P e 500 µM de acetil-CoA foram dissolvidos em Tris-HCl 150 mM de NaCl 25 mM, pH 7,2, num volume total de 50 µl. As reações foram iniciadas por adição de 2, 5 ou 50 ng de TcGNA proveniente de purificação com coluna de Ni-NTAagaroseQiagen®. A reação foi interrompida com adição de 50 µl de uma solução contendo 25 mM bis-tris-propano, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA e 6,4 M cloreto de guanidina, pH 7,5. Adicionou-se então 50 µl de solução reveladora (DTNB a 1 mM em 0,1% de

dimetilsulfóxido contendo Tris-HCl 25 mM, NaCl 250 mM e EDTA 2 mM, pH 7,5). Ao final, a coenzima-A resultante da acetilação da GlcN-6-P pela GNA reage com o DTNB, gerando 2-nitro-5-tiobenzoato, e a sua absorvância foi medida a 412 nm. A absorvância foi quantificada em espectrofotômetro Spectra Max 340 PC (Molecular Devices).

(ii) Método B: empregando extrato total de formas epimastigotas e os reagentes a seguir - 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA, 1 mM GlcN-6-P e 0,5 mM de Acetil-CoA. O início da leitura no espectrofotômetro se deu com a adição de Acetil-CoA, cujo consumo é verificado no comprimento de onda de 230 nm (Marino *et al.*, 2011).

3.5.3 Verificação do pH ótimo para as enzimas

Concentrações saturantes para os substratos foram mantidas nas reações, porém foi estabelecido um gradiente do potencial hidrogeniônico da reação (pH de 5 a 9) nos tampões MES e Tris HCl e então medida a atividade da enzima, utilizando como fonte de enzimas o as enzimas recombinantes ou extratos de epimastigotas.

3.5.4 Verificação da temperatura ótima e cálculo da Energia de ativação (Ea)

Concentrações saturantes dos substratos foram mantidas nas reações das enzimas recombinantes TcGF6PA ou TcGNA, porém foi variada a temperatura de incubação da reação (de 10 à 60 °C). Os valores de atividade foram utilizados na fórmula de Arrhenius para o cálculo da Energia de Ativação (Ea).

$$[\ln(k) = \frac{-E_a}{R} \frac{1}{T} + \ln(A)]$$

3.6 Efeito de possíveis inibidores das enzimas da HBP no *T. cruzi*

3.6.1 Análogos utilizados

Cinco moléculas relatadas na literatura como inibidoras da atividade de GF6PA foram utilizadas nesse estudo: **GAGMH** (Gama-Glutamil hidroxamato; CID: 449178 (Chmara e Zahner, 1984), **FDI** (Formamidina Disulfito; CID:386008; (Chmara, Andruszkiewicz e Borowski, 1984), **ABZ** (L-Albizziin; CID: 92891; (Chmara e Zahner, 1984), **66DDA** (Ácido 6,6'-Ditiodinicotínico; CID: 85040 (Chmara, Andruszkiewicz e Borowski, 1984) e **ADT**

(Aldrithiol™-4; 4,4'-Dithiodipyridine; CID: 75846 (Huynh, Gulve e Dian, 2000). Em contrapartida não existe nenhum relato sobre molécula inibidora da atividade de GNA, porém utilizamos um análogo estrutural de um dos substratos da enzima (G3S) na tentativa de obter essa ferramenta.

3.6.2 Inibição da atividade de TcGF6PA e TcGNA

Foi verificado o efeito dos análogos GAGMH, FDI, ABZ, 66DDA e AMT na atividade de GF6PA na enzima recombinante TcGF6PA. Para isso a enzima TcGF6PA foi purificada e utilizada em ensaio de atividade como descrito em 3.5.1, porém em cada reação de atividade foi adicionada 100 μ M de inibidor, possibilitando avaliar a influência estritamente sobre a enzima em questão. Os inibidores que apresentaram efeito na concentração relatada foram testados novamente e diferentes concentrações.

No caso da TcGNA, o ensaio de atividade se seguiu como o descrito em 3.5.2 e visto que somente foi estudado um possível inibidor dessa enzima, o G3S, partimos diretamente para o teste em diferentes concentrações.

Em todos os casos, os substratos foram adicionados nas reações em concentração correspondentes à saturação das enzimas.

3.6.3 Efeito na proliferação de epimastigotas

Para avaliar o efeito dos inibidores em formas epimastigotas, parasitas em fase de proliferação exponencial (4 a 6×10^7 parasitas/mL) foram utilizados. As células ($2,5 \times 10^6$ parasitas/mL) foram tratadas com diferentes concentrações dos análogos, como controle negativo parasitas foram cultivados sem tratamento e como controle positivo os parasitas foram tratados com rotenona (60μ M) e antimicina ($0,5 \mu$ M). Os parasitas, tratados e controle, foram cultivadas em placas de 96 poços, a 28°C . A proliferação celular foi estimada por leitura da absorbância da densidade ótica (DO) em 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 composto que inibiu 50% da proliferação dos parasitas (IC_{50}) foi determinada na fase exponencial de crescimento (4º dia) mediante ajuste dos dados na curva dose-resposta com a equação clássica sigmóide (Damasceno *et al.*, 2014; Girard *et al.*, 2016; Magdaleno *et al.*, 2009).

3.6.4 Toxicidade em células CHO-K₁

A toxicidade dos compostos em células de mamíferos foi avaliada incubando células CHO-K₁ (5×10^5 células por poço) em placas de 24 poços em meio RPMI suplementado com SFB (10%) na presença de diferentes concentrações dos compostos ou não (controle). As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂, sob atmosfera úmida por 24h. Em seguida as células foram lavadas uma vez com PBS e incubadas com RPMI suplementado com SFB (2%), novamente na presença ou não dos compostos. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂. A viabilidade celular foi avaliada 5 dias após o início do tratamento utilizando-se o método de MTT (Mosmann, 1983). Nesse momento as células foram lavadas duas vezes com PBS e foram adicionados 200 µL de PBS e mais 50 µL de MTT (5 mg/mL) e foram incubadas a 37 °C por 3 horas. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de SDS 10%. As placas foram lidas em espectrofotômetro de placa utilizando-se λ 595 nm e como referência λ 690 nm.

3.6.5 Efeito dos inibidores no ciclo intracelular

Após a análise da toxicidade dos análogos em células CHO-K₁, concentrações consideradas não tóxicas para as células foram utilizadas para avaliar o efeito dos mesmos no ciclo intracelular do parasita. Células CHO-K₁ (5×10^4 por poço) foram mantidas em placas de 24 poços em 500µL de meio RPMI 10% SFB. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C, 5% de CO₂, sob atmosfera úmida por 24h até sua aderência à superfície da placa. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com PBS e foi adicionado 500µL de meio RPMI 10% SFB e formas tripomastigotas (moi 50), na presença de diferentes concentrações dos análogos por 4 h. Em seguida os poços foram lavados duas vezes com PBS e foi adicionado novamente meio RPMI 10% SFB, com diferentes concentrações dos análogos. As placas foram mantidas a 37 °C por 24 h. Após esse período, o meio de cultura foi removido e foi adicionado meio RPMI 2% SFB, com diferentes concentrações dos análogos, e as placas foram incubadas a 33 °C. Do 4° ao 6° dia pós-infecção, os tripomastigotas que estavam no sobrenadante foram contados em câmara de Neubauer. Em paralelo a todos os tratamentos com os análogos foi utilizada uma cultura não tratada como controle.

3.7 Bioenergética

3.7.1 Medida do consumo de oxigênio

Parasitas estressados nutricionalmente (5×10^7 parasitas/mL) por 16 h foram tomados da cultura e centrifugados ($1500 \times g$, 10 min, 4°C). Desprezado o sobrenadante, o *pellet* foi resuspendido em tampão de respiração (MRC: 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM HEPES-NaOH, pH 7,2, 1 mM MgCl_2 , 2 mM K_2HPO_4), ajustados à concentração de 1×10^9 parasitas mL^{-1} . Como controle positivo de respiração, os parasitas estressados, foram recuperados em His (5 mM) por 30 minutos à 28°C , os demais testes com Glc, GlcN e GlcNAc ou sem nenhum tratamento (PBS, Controle negativo) foram realizados mesmo tempo e temperatura do controle positivo. De cada teste, alíquotas de 50 μL (Cf na câmara: 5×10^7 parasitas/mL) foram incubadas nas câmaras do Oxígrafo de alta resolução (OROBOROS, *Oxygraph - O₂K*, Innsbruck, AU) contendo tampão de respiração suplementado com 5 mM do correspondente metabólito testado (ou nenhum no caso do controle negativo) e tiveram sua taxa de respiração de Rotina aferidas. Em seguida, a taxa de respiração foi inibida pela adição de 1,25 mg mL^{-1} de Oligomicina A (Oligo), um potente inibidor da porção Fo da ATP sintase, diminuindo a passagem de H^+ pra matriz mitocondrial, que se acumulará no espaço intermembranas, inibindo a ação das bombas de prótons e consequente diminuição do consumo de nutrientes e consumo de O_2 [revisado por: (Jastroch *et al.*, 2010)], Oligo é usada para induzir um estado em que só será aferido o consumo de oxigênio não acoplado à cadeia de transporte eletrônica. Logo em seguida a respiração foi estimulada pela adição Carbonilcianuro-*p* trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP, 0,5 μM), um potente ionóforo que age desacoplando o gradiente eletroquímico levando prótons (H^+) do espaço intermembranas para a matriz mitocondrial, fazendo com que a cadeia transportadora de elétrons funcione em sua capacidade máxima, oxidando nutrientes para manter o potencial de membrana interna mitocondrial ($\Delta\psi_m$), elevando assim os níveis de consumo de O_2 ao máximo independente da fosforilação oxidativa (*OxPhos*). Manipulando a administração desses agentes com ação mitocondrial, é possível avaliar não só parâmetros bioenergéticos, como inferir sobre o estado funcional e fisiológico da mitocôndria.

3.7.2 Parâmetros em respirometria de células intactas

L (leak respiration/ nonphosphorylating LEAK respiration): A vazão de prótons é uma propriedade da membrana interna mitocondrial, e pode ser mensurada pela taxa de respiração após a inibição da ATP sintase (State 4_{Omy}). *Proton leaks*, dissipam a energia de translocação de H⁺ a partir da fase de membrana positiva (Intermembranar) para fase de membrana negativa (matriz mitocondrial) ao passo que deslizamento de prótons previne completa translocação de prótons através da membrana interna mitocondrial (Uma propriedade das bombas de prótons).

R (Routine respiration): É a capacidade respiratória regulada de acordo com com a concentração não saturante de ADP fisiológico, e modulada pela quantidade de metabólitos potencialmente oxidáveis disponíveis fisiologicamente para a célula naquele momento.

≈R (Free Routine activity): É a taxa de respiração de rotina (R) corrigida pela taxa da *Leak Respiration* (L ou LP). A **R** é a atividade respiratória acoplada à fosforilação do ADP ao ATP (**≈R = R-L**).

J_{≈R} (Routine coupling efficiency): É a fração da respiração de rotina acoplada em células intactas. O Fator de controle de fluxo (**J_{≈R}**) é a *Free Routine activity* (**≈R**), normalizada pelo estado de referência R. L é o estado de fundo, e a variável do controle de fluxo é a estimulação de R pela renovação fisiologicamente controlada do ATP em células intactas. **j_{≈R} = ≈R/R** ou **(R-L)/R** ou **1-L/R**.

E (ETS capacity): é a capacidade respiratória máxima do sistema de transferência de elétrons, que em células intactas é obtida por titulação protonóforos (tratamento com FCCP). Em outras palavras, o consumo de oxigênio acontece de forma descontrolada.

≈E (Free ETS capacity): É a capacidade respiratória máxima (E) induzida pelo ETS na presença de um protonóforos corrigida pela *Leak Respiration* (**≈E = E-L**) potencialmente disponível para o transporte de íons e para fosforilação do ADP à ATP.

J_{≈E} (ETS coupling efficiency): é uma estimativa da eficiência de acoplamento da ETS a OxPhos. É obtida pelo aferimento sequencial de L e E, que pode ser obtida em células intactas. **J_{≈E}** é então expressa por: **J_{≈E} = ≈E/E** ou **(E-L)/E** ou **E=1-L/E**. **J_{≈E}** é = 0.0 quando o acoplamento é zero (**L=E**) e 1.0 no limite de um sistema totalmente acoplado (**L=0**).

3.7.3 Medidas da produção de CO₂

Epimastigotas em fase exponencial de proliferação foram contados e 20 x10⁶ parasitas foram incubados com soluções 3 mM traçadas com [U-¹⁴C]-Glc, [U-¹⁴C]-GlcN ou [1-¹⁴C]-GlcNAc em diferentes tempos. O ¹⁴CO₂ resultante da oxidação foi “capturado” usando papel

filtro embebido em 2M KOH; a abordagem desse experimento encontra-se esquematicamente detalhada na Figura 6. A quantidade de ^{14}C recuperada como $^{14}\text{CO}_2$, foi medida após 0, 1 e 4 horas de incubação a 28 °C.

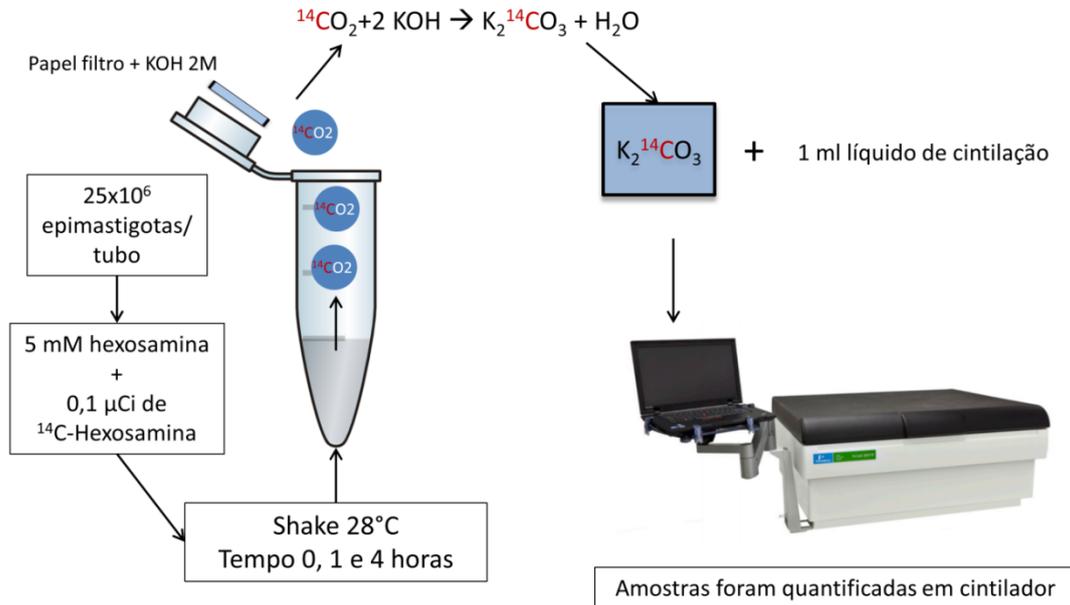


Figura 6. Esquema para captura de $^{14}\text{CO}_2$.

3.7.3 Medida do potencial de membrana mitocondrial

A fim de se avaliar a capacidade das hexosaminas de energizar a mitocôndria reestabelecendo o $\Delta\Psi_m$, parasitas em fase exponencial de proliferação foram submetidos a 16 h de estresse nutricional em PBS a 28 °C. Após esse período a cultura foi contada e ajustada a $2,5 \times 10^7$ parasitas/mL e recuperados 30 min a 28 °C em: tampão MRC como controle negativo (125 mM Sacarose; 65 mM KCl; 10mM HEPES; 1 mM MgCl₂; 2.5mM K₂HPO₄; pH = 7.2), MRC suplementado com 3 mM His (controle positivo), 3 mM Glc, 3 mM GlcN ou 3 mM GlcNAc. Em seguida, foi adicionado 250 nM de Rhodamina 123 em todas as amostras e incubado por 20 min a 28 °C. As amostras foram lavadas duas vezes em MRC (*spin down*, em Labnet Prism™ Mini Centrifuge por 20 segundos a temperatura ambiente). Cada amostra foi ressuspensa em 50 µL de MRC e foram incubadas nas câmaras do Oxígrafo de alta resolução (OROBOROS, *Oxygraph - O₂K*, Innsbruck, AU), neste momento acoplado ao acessório O2k-Fluo, com os filtros correspondentes (Oroboros 44323-01). Sabe-se que a adição de células/mitocôndrias um sistema ativo de regeneração de ADP é capaz de induzir um rápido quenching de Rh-123, reduzindo sua fluorescência no sistema. A adição posterior de um protoionóforo, restauraria a fluorescência do sistema devido à quebra do potencial de membrana mitocondrial. Deste modo, após à adição das amostras no Oroboros, foi titulado o

protoionóforo FCCP (0,25 μM por adição). A razão entre as fluorescências F e F_i foi utilizada como estimativa do potencial de membrana mitocondrial como descrito em (Baracca *et al.*, 2003).

4.1 Via de Biossíntese de Hexosaminas (HBP): caracterização cinética e papel funcional das primeiras duas enzimas

Nesse capítulo serão apresentados os resultados da busca e caracterização cinética das duas primeiras enzimas da via de biossíntese de hexosaminas. As enzimas glutamina frutose-6-fosfato aminotransferase (GF6PA) e glucosamina-6-fosfato-N-acetiltransferase (GNA), essas enzimas foram também utilizadas como modelo para teste de inibidores com atividade contra o *T. cruzi*. Nenhum outro estudo prévio relatou a presença dessas enzimas em *T. cruzi*.

Sendo assim, foi de nosso interesse identificar e caracterizar esses genes e seus produtos proteicos.

4.1.1 Análises *in silico*

A busca por sequências dos genes putativos de GF6PA e GNA foi realizada no banco de dados específico para tripanossomatídeos, **TriTrypDB** (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>). Uma vez que os trabalhos experimentais foram realizados com a cepa CL clone 14, adotamos a sequência de TcGF6PA e TcGNA proveniente da cepa CL Brener como referência.

Foram encontradas anotações correspondentes a ambas as enzimas na cepa CL Brener [GF6PA: *Non-Esmeraldo-like* (TcCLB.510303.200); GNA: *Esmeraldo-like* (TcCLB.508831.120) e *Non-Esmeraldo-like* (TcCLB.511671.70)]; bem como em DM28 [GF6PA: TCDM_01902; GNA: TCDM_14202], porém a cepa Sylvio X10/1 [GF6PA: TcSYL_0079020], assim como na subespécie *Trypanosoma cruzi* marinkellei cepa B7 [GF6PA: Tc_MARK_680] apresentam anotações somente relacionadas à GF6PA.

Quando as duas sequências nucleotídicas correspondentes à GNA são alinhadas entre si, verifica-se uma similaridade de 97% (Fig7), deste modo nos experimentos seguintes foi utilizada a sequência com número sistemático TcCLB.508831.120

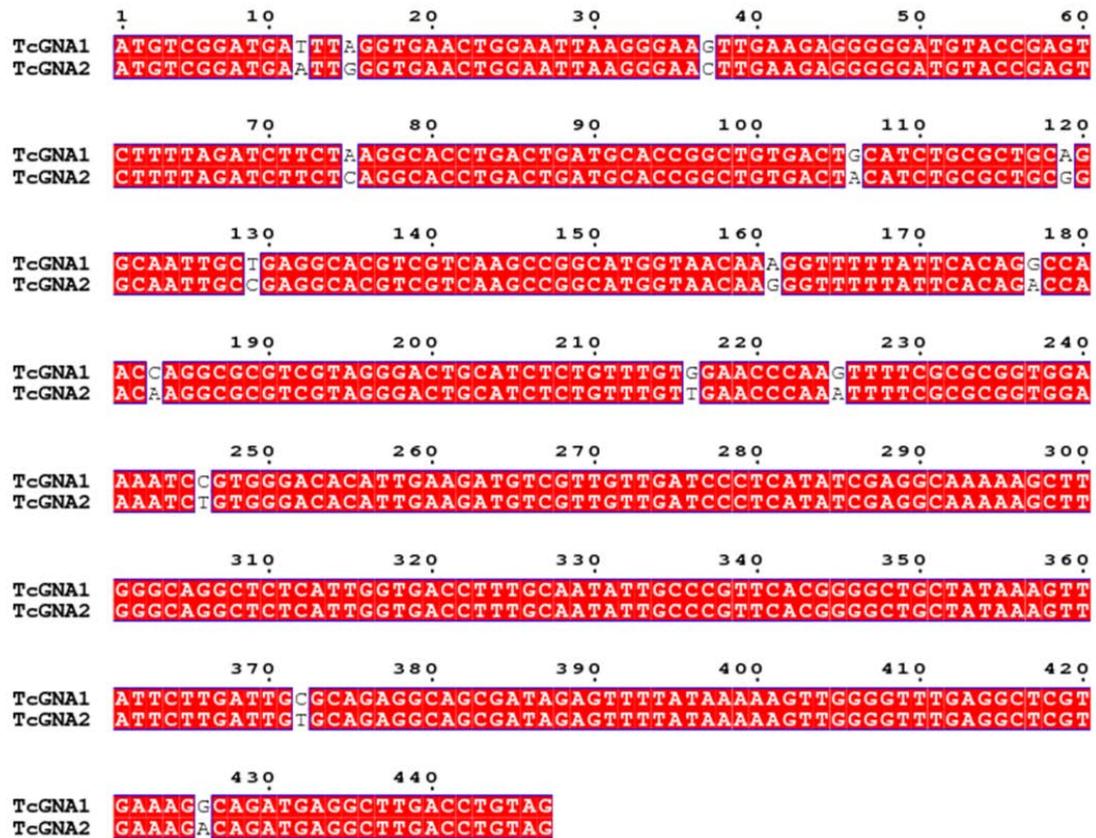


Figura 7. Alinhamento das seqüências de nucleotídeos putativas codificantes das GNA presentes em *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener. Em vermelho se indicam os aminoácidos idênticos. TcGNA1: TcCLB.510303.200 / Q4DX16; TcGNA2: TcCLB.511671.70 / Q4DGL9

Em relação a outros tripanossomatídeos, identificamos seqüências putativas em todos os membros do grupo com genoma sequenciado. Algumas dessas seqüências foram tomadas como base para a realização de alinhamentos múltiplos usando a plataforma **BioEdit** e a ferramenta Clustal W tanto relativos a GF6PA como para GNA (Fig8). Os alinhamentos obtidos foram inspecionados e editados manualmente usando o software **ESPrpt3.0**. (<http://esprpt.ibcp.fr/ESPrpt/cgi-bin/ESPrpt.cgi>).

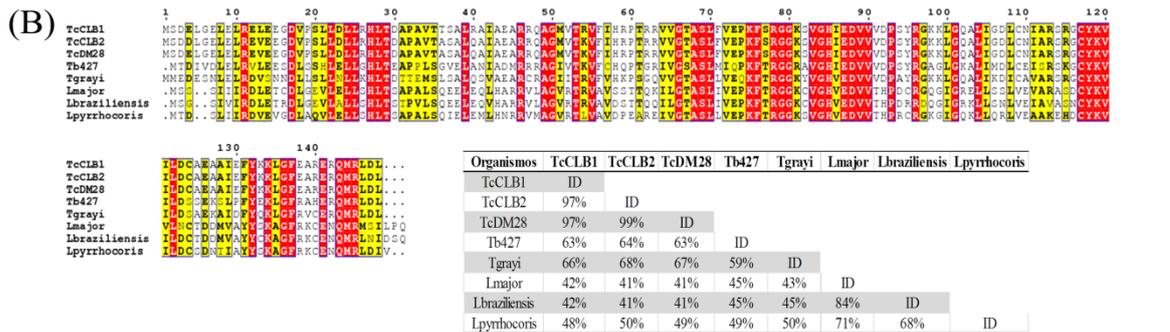
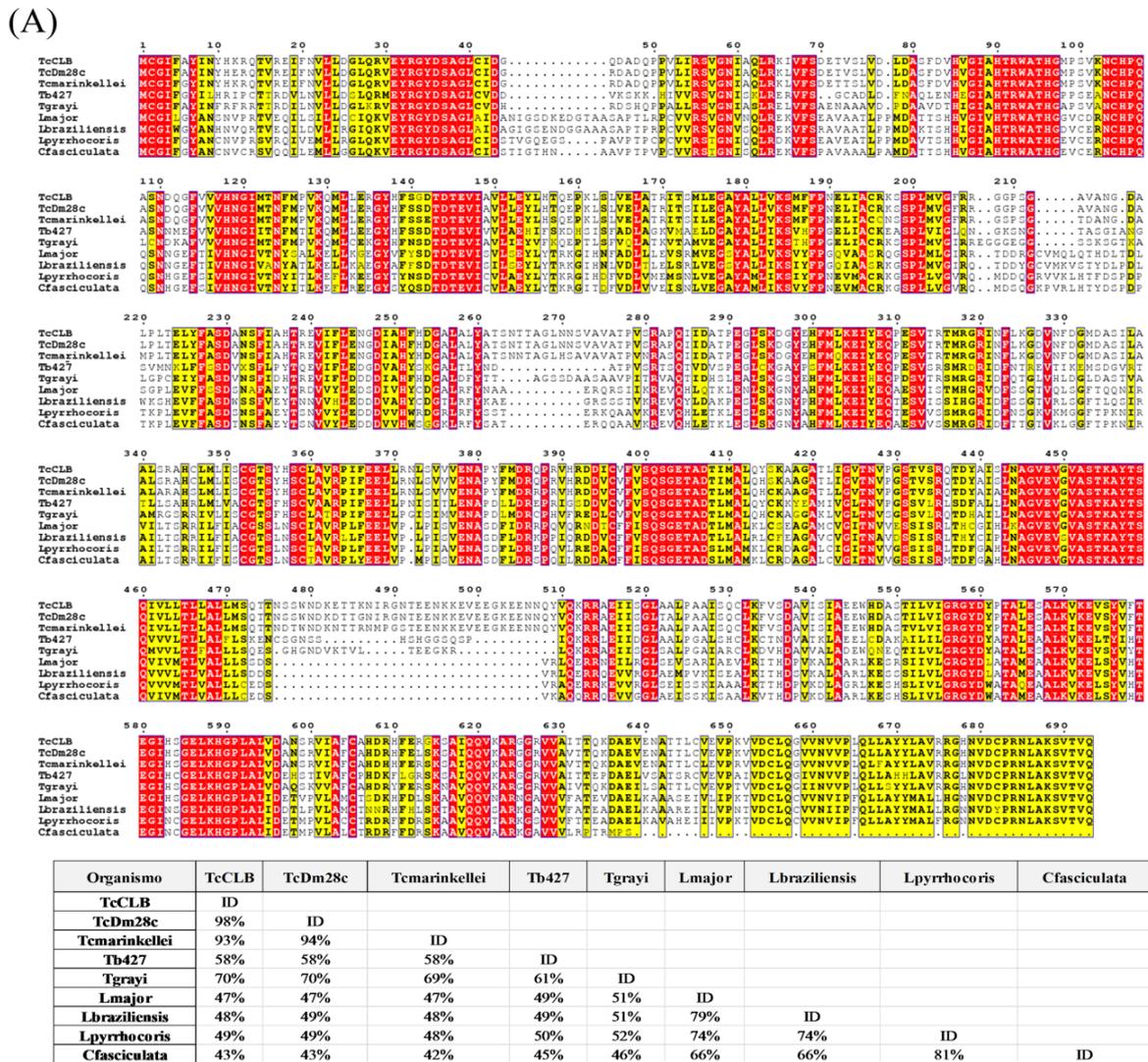
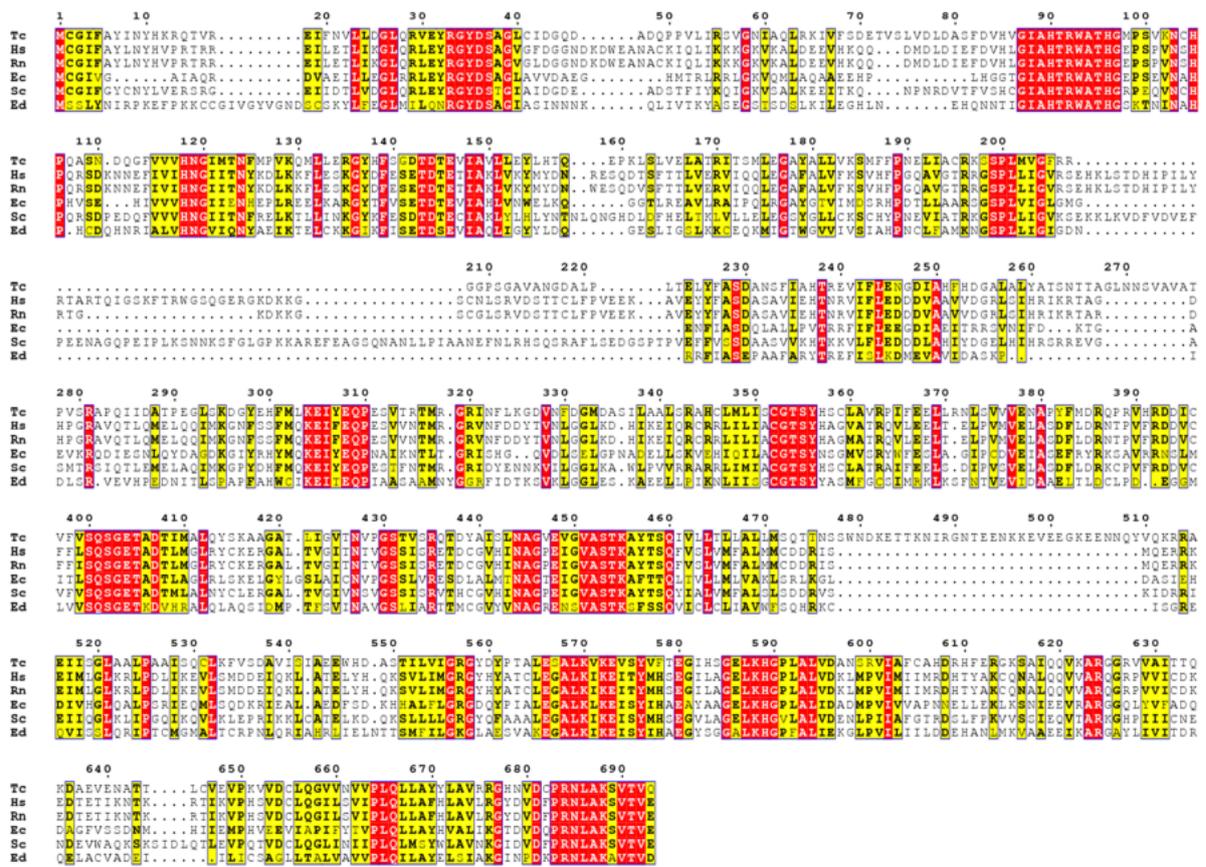


Figura 8. Alinhamento das sequências de aminoácidos das GF6PA e GNA presentes em tripanossomatídeos. (A) Sequências de aminoácidos anotadas como GF6PA no genoma depositado no banco de dados TritypDB foram alinhadas. Em vermelho se indicam os aminoácidos idênticos entre as nove sequências e em amarelo os aminoácidos que apresentam similaridades funcionais. TcCLB: *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener; TcDm28: *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28 (TCDM_01902); Tcmarinkellei: *Trypanosoma cruzi* marinkellei; Tb427: *Trypanosoma brucei* brucei cepa 427; Tgrayi: *Trypanosoma grayi*; Lmajor: *Leishmania major*; Lbraziliensis: *Leishmania braziliensis*; Lpyrrhocoris: *Leptomonas pyrrhocoris*; Cfasciculata: *Crithidia fasciculata*. Abaixo: Matriz com a porcentagem de identidade entre as sequências. Sequências anotadas como GNA no genoma depositado no banco de dados TritypDB foram alinhadas. Em vermelho se indicam os aminoácidos idênticos entre as nove sequências e em amarelo os aminoácidos que apresentam similaridades funcionais. TcCLB1: *Trypanosoma cruzi* cepa CL Brener haplótipo Esmeraldo-like; TcCLB2: *Trypanosoma*

cruzi cepa CL Brener haplótipo Non-Esmeraldo-like; TcDm28: *Trypanosoma cruzi* cepa Dm28; Tb427: *Trypanosoma brucei* *brucei* cepa 427; Tgrayi: *Trypanosoma grayi*; Lmajor: *Leishmania major*; Lbraziliensis: *Leishmania braziliensis*; Lpyrrhocoris: *Leptomonas pyrrhocoris*. Abaixo: Matriz com a porcentagem de identidade entre as seqüências.

As seqüências de aminoácidos da GF6PA e da GNA de *T. cruzi* foram ainda comparadas com as seqüências homólogas de diferentes organismos modelos (Fig9); ambas se mostraram conservadas dentre os eucariotas, com porcentagens de identidade acima de 40%.

(A)



Organismos	TcCLB	Hs	Rn	Ec	Sc	Ed
TcCLB	ID					
Hs	42%	ID				
Rn	43%	96%	ID			
Ec	35%	36%	37%	ID		
Sc	40%	54%	54%	35%	ID	
Ed	27%	28%	29%	32%	28%	ID

Figura 9. Alinhamento das sequências de aminoácidos das GF6PA e GNA presentes em distintos eucariotas. (A) Foram alinhadas sequências de aminoácidos anotadas como GF6PA, as quais estão depositadas no banco de dados Uniprot. Em vermelho estão destacados os aminoácidos idênticos entre as seis sequências e em amarelo os aminoácidos que apresentam similaridades funcionais. Tc: *Trypanosoma cruzi* CL Brener (Q4DZ020); Hs: *Homo sapiens* (Q06210); Rn: *Rattus norvegicus* (P82808); Ec: *Escherichia coli* (P17169); Sc: *Saccharomyces cerevisiae* (P14742); Ed: *Entamoeba dispar* (B0EQI9). (B) Foram alinhadas sequências de aminoácidos anotadas como GNA, as quais estão depositadas no banco de dados Uniprot. Em vermelho se indicam os aminoácidos idênticos entre as nove sequências e em amarelo os aminoácidos que apresentam similaridades funcionais. Tc: *Trypanosoma cruzi* CL Brener, Q4DZ020; Hs: *Homo sapiens*, Q06210; Rn: *Rattus norvegicus*, P82808; Ec: *Escherichia coli*, P17169; Sc: *Saccharomyces cerevisiae* P43577 ; Ed: *Entamoeba dispar*, B0EQI9. *Abaixo*: Matriz com a porcentagem de identidade entre as sequências.

Segundo os preditores online InterProScan e Pfam, a sequência TcGF6PA apresenta os domínios: (i) *Glutamine amidotransferase type2*: domínio que confere às enzimas a capacidade de catalisar a remoção do grupo amônia da glutamina e posterior transferência para algum substrato a fim de formar um novo grupamento carbono-nitrogênio; (ii) *Sugar isomerase*: domínio que confere às enzimas a capacidade de ligação e isomerização de algum carboidrato fosforilado isomerização, passo essencial em para a formação de GlcN-6-P pela enzima GF6PAs uma vez que unicamente a amidação do substrato dessa enzima (Fru-6-P) geraria Frutosamina-6-fosfato. Já em relação à GNA, InterProScan predizeu um domínio mais genérico, *Acetyltransf-1*, mas também compartilhado com outras GNAs da natureza. (Fig10). Utilizando as ferramentas Phobios e TMHMM não foram preditos domínios transmembranares ou peptídeos sinal nas sequências.

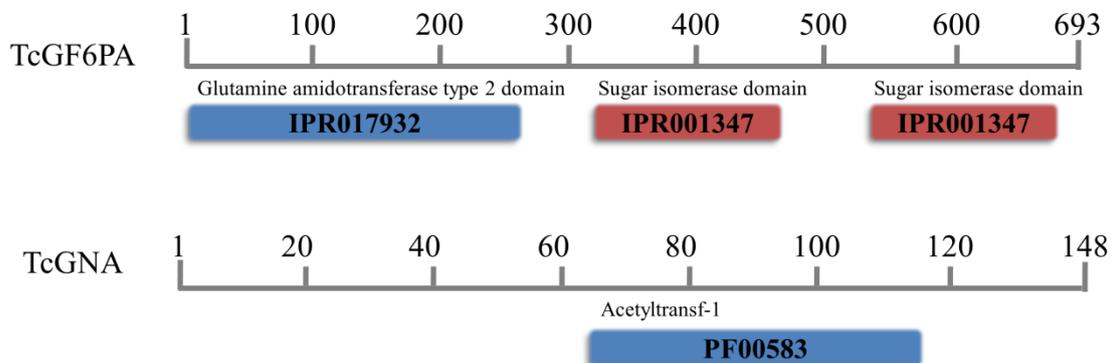


Figura 10. Esquema representando os domínios preditos para a TcGF6PA e TcGNA. Os domínios foram encontrados através da base de dados InterProscan. Os códigos de acesso na InterProscan superfamily (SSF), estão mostrados nas caixas azuis e vermelhas da figura. Acima das caixas estão os nomes de cada domínio conservado.

4.1.2 Amplificação e clonagem dos genes TcGF6PA e TcGNA

As sequências putativas para TcGF6PA (TcCLB.510303.200) e TcGNA (TcCLB.508831.120) foram amplificadas por PCR usando DNA genômico da cepa CL clone 14 de *T. cruzi* (Fig5 A). Após a obtenção e purificação dos produtos de PCR, os fragmentos correspondentes a TcGF6PA e TcGNA foram clonados em vetor pET28a₍₊₎ (Novagen®) usando as enzimas de restrição adequadas. Esse vetor permite a expressão da proteína de

interesse fusionada a seis resíduos de His nos extremos N- ou C-terminal. Na clonagem de TcGF6PA, o códon de parada do gene foi preservado, resultando numa construção na qual a alça de His só foi fusionada no N-terminal da proteína. Diferentemente, na clonagem de TcGNA, o códon de parada do gene foi removido, resultando em construções nas quais alça de His foi fusionada em ambas as extremidades, N- e C-terminal, .

Após a transformação de bactérias *E. coli* XL1Blue com as construções em questão, vários clones foram analisados por PCR a partir de colônia (Fig5 B e E) e por PCR a partir de plasmídeo purificado (Fig11 C e F). Os clones que resultaram positivos para a presença de amplicons do tamanho compatível com o inserto foram analisados por corte com enzimas de restrição (no caso de TcGF6PA) ou por PCR com iniciadores de regiões do plasmídeo adjacentes ao sítio de clonagem, ou uma combinação desses iniciadores e os específicos do fragmento (no caso de TcGNA) (Fig11 D e G).

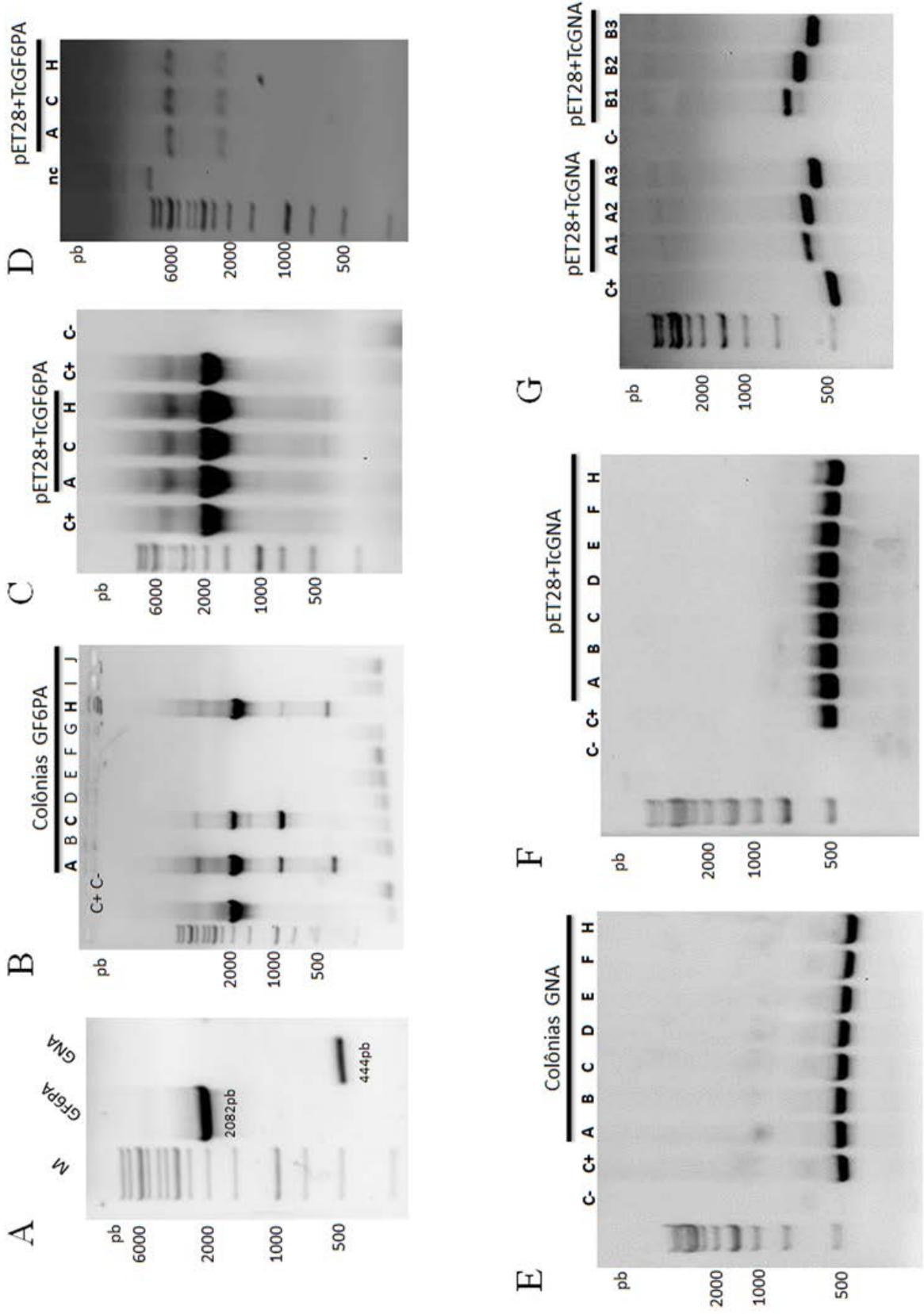


Figura 11. Clonagem de TcGF6PA e TcGNA. (A) Gel de agarose com os produtos obtidos na amplificação por PCR a partir do DNA genômico da cepa CL 14. Em cada caso foram observados amplificados com os tamanhos esperados para cada gene: TcGF6PA (aproximadamente 2000 pb) e TcGNA (aproximadamente 450 pb). (B) Resultado de uma PCR utilizando colônias de bactérias *Escherichia coli XL1blue* após transformação com a construção pET28+TcGF6PA; (C+) PCR com DNAg de epimastigotas; (C-) reação de PCR sem DNA. (C) Resultado de uma PCR utilizando as construções plasmidiais pET28+TcGF6PA derivadas das colônias positivas (A, C e H); (C+) PCR com DNAg de epimastigotas; (C-) reação de PCR sem DNA. (D) Resultado de um ensaio de digestão utilizando as construções plasmidiais pET28+TcGF6PA PCR positivas (A, C e H), com exclusão de nc (plasmídeo não cortado) os plasmídeos foram digeridos com as enzimas *BamHI* e *XhoI*, gerando produtos de aproximadamente 2000 pb. (E) Resultado de uma PCR utilizando colônias de bactérias *Escherichia coli XL1blue* após transformação com a construção pET28+TcGNA; (C+) PCR com DNAg de epimastigotas; (C-) reação de PCR sem DNA. (F) Resultado de uma PCR utilizando as construções plasmidiais pET28+TcGNA, neste caso todas foram positivas; (C+) PCR com DNAg de epimastigotas; (C-) reação de PCR sem DNA. (G) Sabendo que o plasmídeo pET28 possui regiões de anelamento para os iniciadores T7 promoter e T7 terminator e que estas regiões flanqueiam o sítio múltiplo de clonagem, foram realizados ensaios de PCR utilizando combinações de iniciadores T7-GNA. Em A1 e B1 foi utilizada a combinação de iniciadores: T7 promoter e TcGNA Rv. Em A2 e B2 foi utilizada a combinação de iniciadores T7terminator e TcGNAFw. Em A3 e B3 a combinação de iniciadores foi TcGNAFw e TcGNARv. O controle positivo contém esta mesma combinação, porém foi utilizado DNAg de epimastigotas. Em todos os casos foram utilizados géis de agarose 1% corado com brometo de etídio 0,5 µg/mL.

4.1.3 Expressão e purificação das TcGF6PA e TcGNA recombinantes

Para a expressão das proteínas recombinantes TcGF6PA (TcGF6PA_r) e TcGNA (TcGNA_r), foram transformadas células de *E. coli* cepa BL21 códon plus (CP) com as construções pET28-TcGF6PA e pET28-TcGNA. Inicialmente foram avaliadas as condições ótimas de expressão, modificando variáveis como temperatura e tempo de crescimento, após a adição de 0,5 mM de IPTG: 37 °C durante 3 horas, 33 °C durante 5 horas e 25 ou 20 °C por 16 h. A expressão das proteínas recombinantes foi avaliada por SDS-PAGE. Foram comparados os extratos protéicos totais dos clones transformantes, sem induzir e após a indução com IPTG. TcGF6PA se mostrou majoritariamente expressa em frações insolúveis e escolhemos a condição de 25 °C por 16 h de incubação por apresentar ligeiro incremento na expressão solúvel (Fig12A). TcGNA se mostrou majoritariamente expressa em frações solúveis e escolhemos a condição de 37 °C por 3h por apresentar o maior nível de expressão da enzima solúvel (Fig12B). Uma vez padronizadas as condições de indução de TcGF6PA e TcGNA recombinantes nas frações solúveis, partimos para os testes de purificação das enzimas por cromatografia de afinidade. O *scale up* utilizado para a produção de TcGF6PA para experimentos posteriores foi de 500 mL para 3L).

A quantidade de TcGF6PA recombinante total no eluato concentrado variava consideravelmente, não havendo uma homogeneidade no rendimento total (Fig 6C). Em contrapartida TcGNA foi obtida facilmente de maneira pura e com alto rendimento de expressão (Fig 12D). A quantidade de TcGNA recombinante total nos eluatos variou entre 1,5

a 5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Em geral obtemos entre 10 a 30 mg de proteína recombinante por litro de cultura induzida nas condições estabelecidas acima.

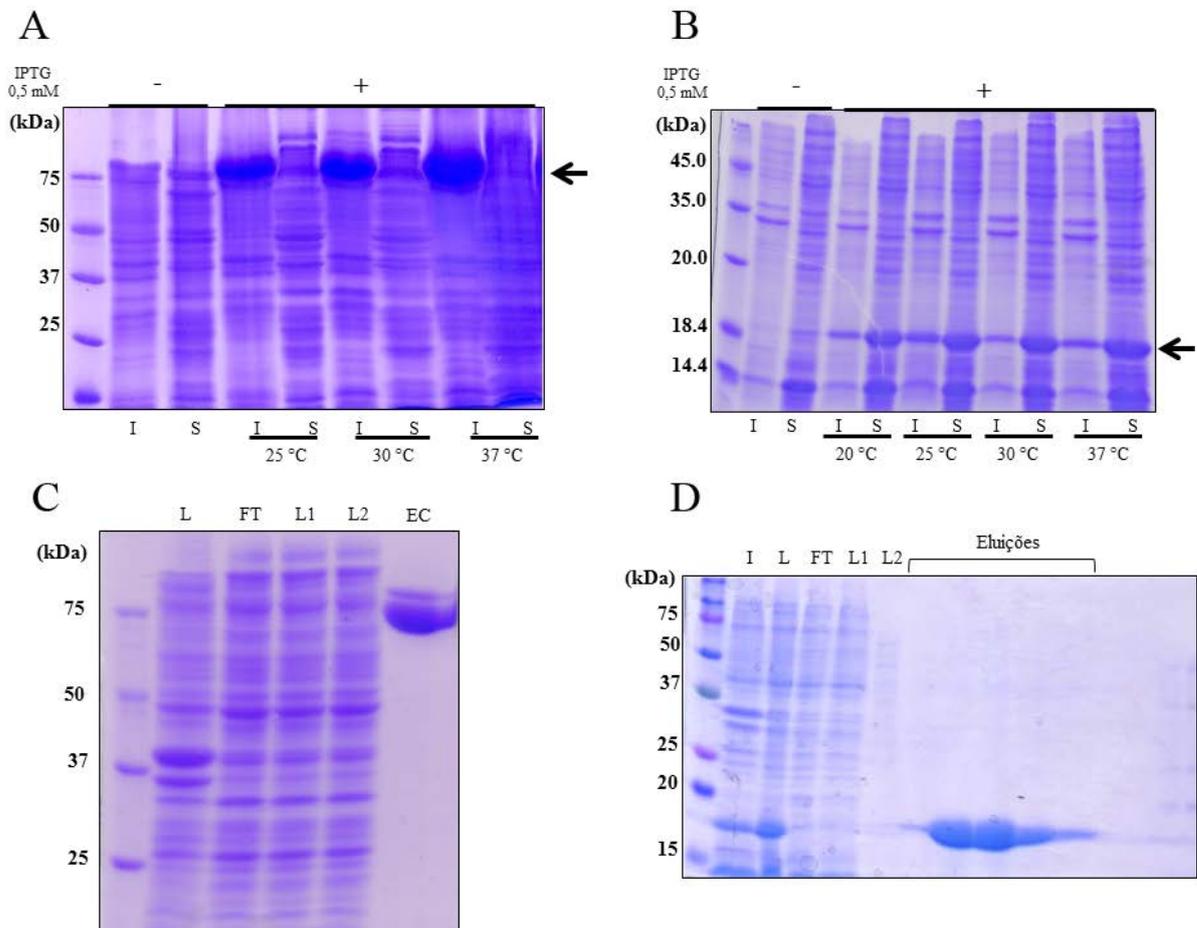


Figura 12. Perfil de expressão e purificação. Expressão da TcGF6PA (A) e TcGNA (B) em *E. coli*. Foi realizada uma análise por SDS-PAGE a partir de extratos protéicos obtidos na expressão das proteínas recombinantes nas diferentes condições avaliadas, assim como os controles sem indução. A seta indica a posição da proteína superexpressa com a massa molecular esperada, aproximadamente 77 kDa para TcGF6PA e 18 kDa. S: fração solúvel; I: fração insolúvel. Purificação da TcGF6PA (C) e TcGNA (D). Também foi realizada SDS-PAGE das diferentes frações obtidas na purificação das enzimas. I: Fração insolúvel, L: lisado clarificado após centrifugação do extrato protéico induzido com IPTG, FT: fração coletada após a passagem do lisado clarificado pela coluna de Ni^{2+} -agarose, L1: fração coletada após a primeira lavagem com tampão de ligação, L2: fração coletada após a segunda lavagem com tampão de lavagem. Eluições: Frações obtidas após o processo de eluição. EC: Frações obtidas após o processo de eluição e concentradas utilizando coluna Amicon Ultra-15®.

4.1.4 Caracterização cinética e bioquímica da TcGF6PA

A partir do produto proteico recombinante obtido, foi medida a atividade GF6PA. Os resultados obtidos demonstram que a TcGF6PA apresenta uma cinética ajustável ao modelo hiperbólico de Michaelis-Menten (Fig 13A). Os valores de v_{max} , K_M e K_{cat} calculados para a enzima recombinante encontram-se na Tabela 1

Uma vez realizada a caracterização da cinética em relação aos substratos, foi avaliada a dependência de pH e temperatura da TcGF6PA recombinante. Observamos que TcGF6PA possui uma atividade maior numa faixa de pH próximo da neutralidade, entre 6,5 e 8 (Fig 13B), e que sua atividade tem uma relação positiva e linear com a temperatura, entre 10 e 37 °C e negativa a partir da temperatura de 40 °C (Fig 9C). A partir dessas medições, foi calculada a energia de ativação (E_a consulte Tabela 1) utilizando a equação de Arrhenius (Fig 13C *inset*) e o coeficiente de temperatura (Q_{10}), parâmetro que representa a variação da atividade da enzima por cada 10 °C de aumento da temperatura.

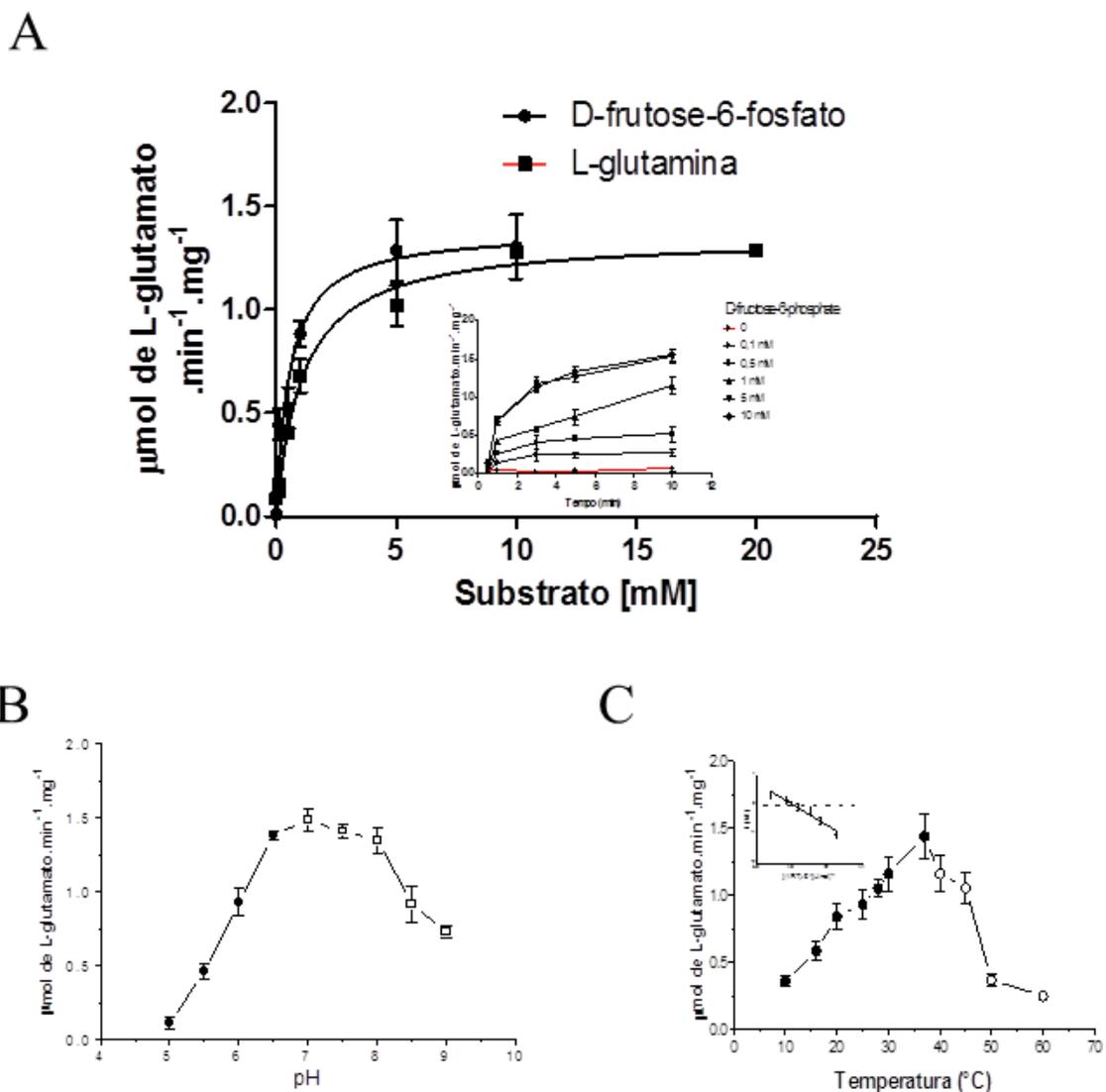


Figura 13. Caracterização bioquímica da TcGF6PA. As medições de atividade foram realizadas a partir de ensaios espectrofotométricos de ponto final, quantificando-se o glutamato formado a partir da atividade da GF6PA. Para tal foi utilizada enzima glutamato desidrogenase de *Bos taurus* (Sigma-Aldrich), monitorando o aumento da absorbância a 340 nm, referente à redução de NAD^+ . A reação para TcGF6PA contém: 50 mM de

tampão Tris-HCl pH = 7,3; 5 mM de L-glutamina; 5 mM de frutose-6-fosfato; 1 mM de EDTA. **(A)** A reação foi iniciada pela adição da enzima recombinante TcGF6PA purificada e concentrada. O branco da reação consistiu da mesma combinação de reagentes sem a adição da enzima. A reação ocorreu a 28 °C, com agitação contínua. Após diferentes tempos, a reação foi parada adicionando-se uma solução de 20% TCA e em seguida as amostras foram centrifugadas por 2 minutos a 10.000 x g. A: A velocidade inicial da reação (V_0) foi calculada na região de linearidade (exemplo de progressão temporal em *inset*), utilizando o coeficiente de extinção molar para o NAD^+ ($\text{CEM}_{340\text{nm}} = 6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Obtendo V_0 em diferentes concentrações de substrato, foi possível verificar um perfil ajustável à equação de Michaelis-Menten. Os parâmetros cinéticos V_{max} e K_M foram obtidos para ambos os substratos da enzima. **(B)** Dependência de TcGF6PA recombinante com o pH. Foram utilizados como tampões de reação MES (4-Morpholineethanesulfonic acid; pH 5 a 6; círculos fechados) e Tris-HCl (pH 7 a 9; quadrados abertos). **(C)** Dependência da TcGF6PA recombinante com a temperatura. A atividade da TcGF6PA foi medida na faixa de temperaturas entre 10 e 60 °C. O valor de energia de ativação foi calculado a partir do gráfico de Arrhenius (*inset*).

4.1.5 Caracterização cinética e bioquímica da TcGNA

A partir do produto proteico recombinante obtido, foi medida a atividade GNA. Os resultados obtidos demonstram que a TcGNA apresenta uma cinética ajustável ao modelo hiperbólico de Michaelis-Menten (Fig 14A). Os valores de V_{max} , K_M e K_{cat} calculados para a enzima recombinante encontram-se na Tabela 1. Os valores de K_M referentes a ambos os substratos da TcGNA (Fru-6-P e Gln) Uma vez realizada a caracterização cinética em relação aos substratos, foi avaliada a dependência de pH e temperatura da TcGNA recombinante. Observamos que a enzima possui atividade em uma ampla faixa de pH sendo esta atividade um pouco mais elevada, entre o pH 6,5 e 9 (Fig 14B), e que sua atividade tem uma relação positiva e linear com a temperatura, entre 10 e 60 °C (Fig 14C), não foi observada desnaturação térmica até a temperatura de 60 °C. A partir dessas medições, foi calculada E_a (Tabela 1) utilizando a equação de Arrhenius (Fig 14C *inset*) e Q_{10}

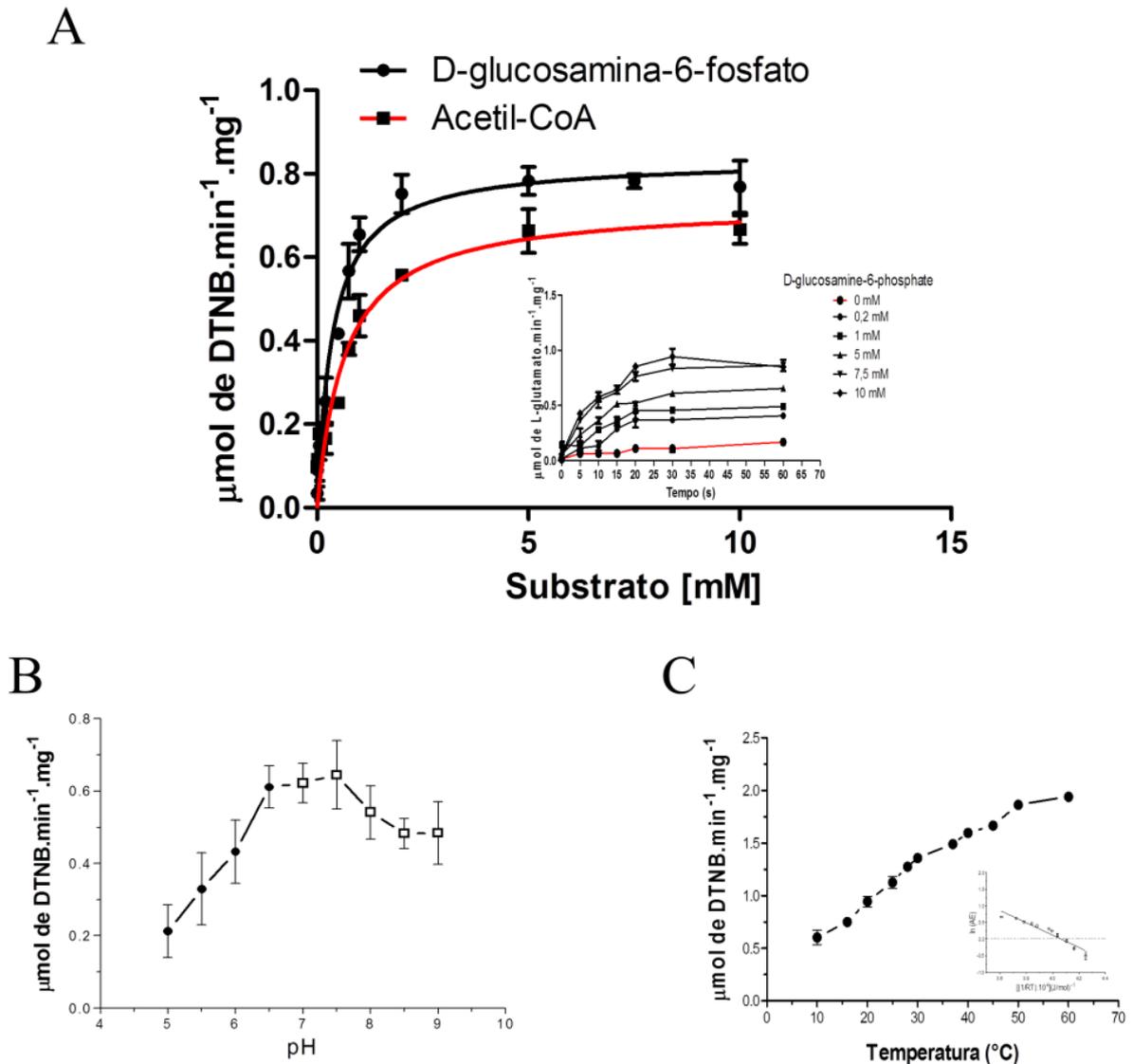


Figura 14. Caracterização bioquímica da TcGNA. As medições de atividade foram realizadas a partir de ensaios espectrofotométricos de ponto final, 500 μM GlcN-6P e 500 μM acetil-CoA foram dissolvidos em 150 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, pH 7,2, num volume total de 50 μl . As reações foram iniciadas por adição de 2, 5 ou 50 ng de TcGNA proveniente de purificação com coluna de Ni-NTAagarose Qiagen®. A reação foi interrompida com adição de 50 μl de uma solução contendo 25 mM bis-tris-propano, 250 mM NaCl, 2 mM EDTA e 6,4 M cloreto de guanidina, pH 7,5. Adicionou-se então 50 μl de solução reveladora (DTNB a 1 mM em 0,1% de dimetilsulfóxido contendo Tris-HCl 25 mM, NaCl 250 mM e EDTA 2 mM, pH 7,5). Ao final, a coenzima-A resultante da acetilação da GlcN-6-P pela GNA reage com o DTNB, gerando 2-nitro-5-tiobenzoato, e o aumento da absorvância foi medida a 412 nm. A absorvância foi quantificada em espectrofotômetro Spectra Max 340 PC (Molecular Devices). **(A)** A velocidade inicial da reação (V_0) foi calculada na região de linearidade (exemplo de progressão temporal em *inset*), utilizando o coeficiente de extinção molar para o NAD^+ ($\text{CEM}_{420\text{nm}} = 14150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). Obtendo V_0 em diferentes concentrações de substrato, foi possível verificar um perfil de ajustável à equação de Michaelis-Menten. Os parâmetros cinéticos V_{max} e K_M foram obtidos para ambos os substratos da enzima. **(B)** Dependência de TcGNA recombinante com o pH. Foram utilizados como tampões de reação MES (4-Morpholineethanesulfonic acid; pH 5 a 6; círculos fechados) e Tris-HCl (pH 7 a 9; quadrados abertos). **(C)** Dependência da TcGNA recombinante com a temperatura. A atividade da TcGNA foi medida na faixa de temperaturas entre 10 e 60 $^{\circ}\text{C}$. O valor de energia de ativação foi calculado a partir do gráfico de Arrhenius (*inset*).

	Substrato	V_{max}^1	K_M^2	K_{cat}^3	E_a^4	pH ótimo	Q_{10}
TcGF6PA	Fru-6-P	1,39 ± 0,08	0,56 ± 0,13	277,10 ± 15,89	36,36 ± 2,60	6,5 a 8,0	1,38
	Gln	1,35 ± 0,04	1,11 ± 0,13	270,70 ± 7,19			
TcGNA	GlcN-6-P	0,835 ± 0,021	0,373 ± 0,043	166,90 ± 4,20	18,60 ± 1,05	6,5 a 9,0	1,44
	Acetil-CoA	0,729 ± 0,038	0,661 ± 0,119	145,80 ± 7,63			

¹ $\mu\text{mol de glutamato} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} / \mu\text{mol de DTNB} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$.

² mM

³ s^{-1}

⁴ $\text{KJ} \cdot \text{mol}^{-1}$

Tabela 1. Resumo da caracterização cinética das enzimas TcGF6PA e TcGNA.

4.1.6 TcGF6PA e TcGNA recombinantes podem ser inibidas

A TcGF6PA se mostrou sensível a diversas moléculas, análogas de glutamina e a FDI, um inibidor previamente relatado de GF6PA de outros organismos (Fig15A) (Chmara, 1985; Chmara e Zahner, 1984). Em particular, GAGMH, uma análogo estrutural da glutamina, gerou um perfil de inibição dose-dependente da enzima TcGF6PA, com um $IC_{50} = 135.1 \pm 2.4 \mu\text{M}$ (Fig15B e C). Como mencionado previamente (secção 3.6.1, Materiais e Métodos) não existem inibidores da enzima GNA relatados na literatura. Contudo o análogo de GlcN-6-P denominado G3S foi avaliado contra a enzima TcGNA e, observou-se também um perfil de inibição enzimática dose-dependente, com um $IC_{50} = 159.3 \pm 4.6 \mu\text{M}$ (Fig 15D e E).

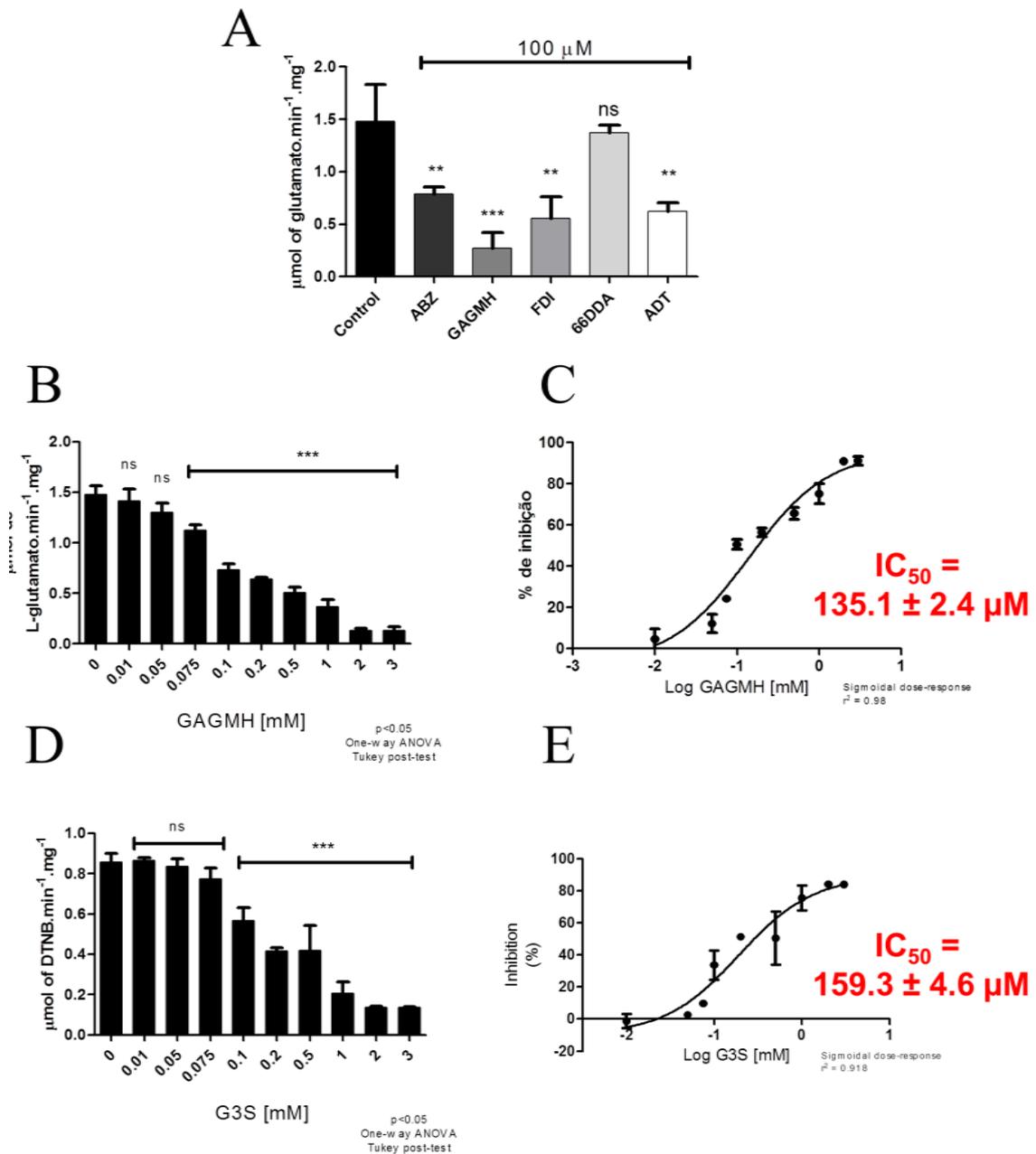


Figura 15. Inibição da atividade de TcGF6PA e TcGNA. (A) TcGF6PA recombinante foi utilizada em ensaios de atividade na presença de 100 μM de cada composto: ABZ, GAGMH, FDI e 66DDA. Em (B) diferentes concentrações de GAGMH foram utilizadas, revelando um perfil dose dependente que se ajusta a uma função sigmoidal em (C), de onde foi calculado o IC_{50} ; em (D) TcGNA recombinante foi utilizada em ensaios de atividade na presença de diferentes concentrações de G3S revelando um perfil dose dependente que se ajusta a uma função sigmoidal em (E), de onde foi calculado o IC_{50} .

4.1.7 GAGMH, FDI, ADT e ABZ afetam a proliferação de epimastigotas de *T. cruzi* porém G3S não

Todos os compostos propostos como possíveis inibidores das atividades enzimáticas, de TcGF6PA ou de TcGNA, foram avaliados em relação à sua atividade antiproliferativa em formas epimastigotas de *T. cruzi*. Somente os compostos que inibiram a enzima TcGF6PA afetaram a proliferação dos epimastigotas, e o fizeram de maneira dose dependente, ou seja, somente os compostos 66DDA (que não se mostrou inibidor de TcGF6PA) e G3S (inibidor de TcGNA) não foram efetivos até 1 mM. Os valores de EC₅₀ foram calculados e todos os compostos apresentaram um efeito em doses supramicromolar (Fig 16B e D).

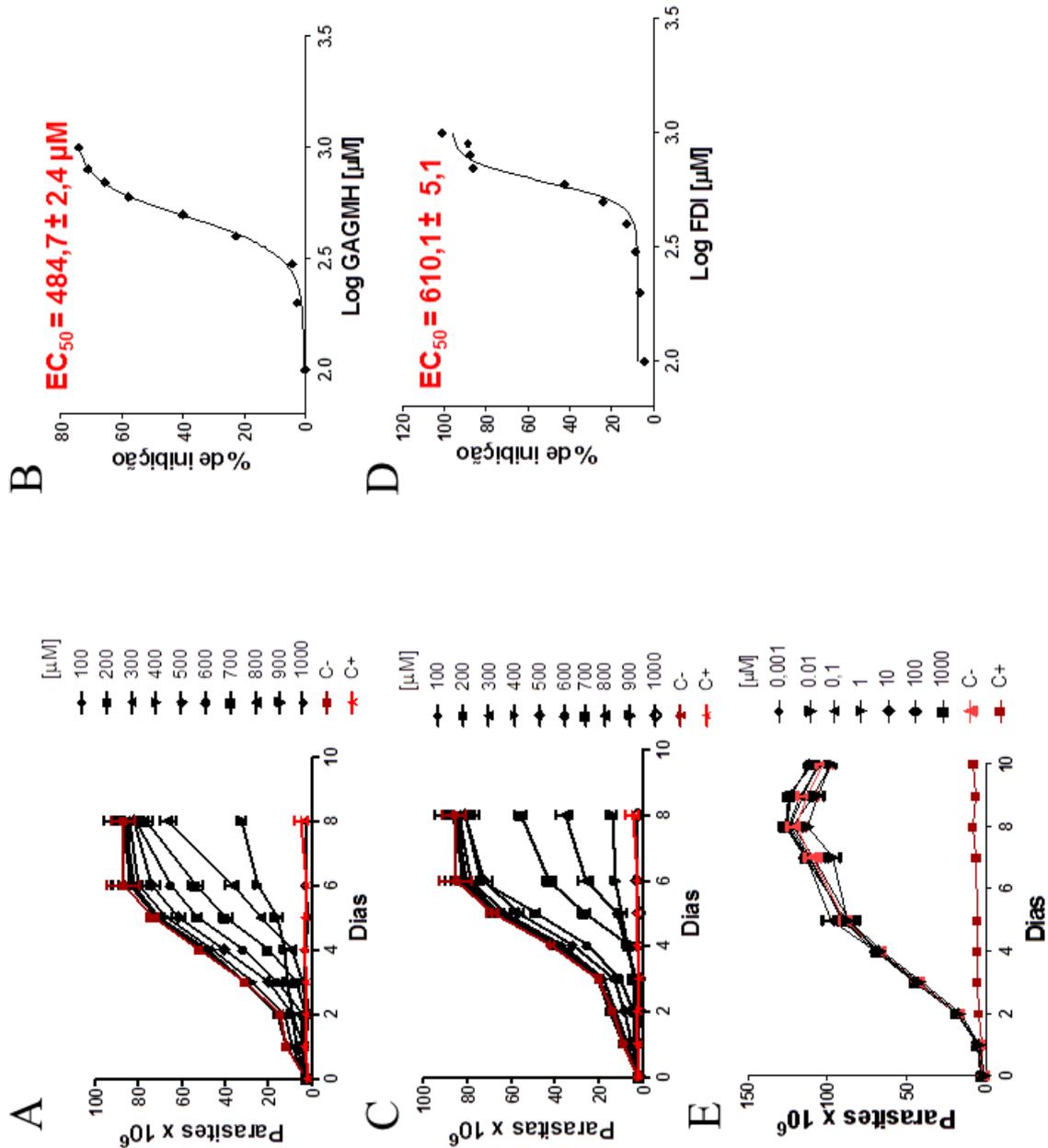


Figura 16. Avaliação do efeito de inibidores da via HBP na proliferação de formas epimastigotas. Os inibidores GAGMH e FDI foram avaliados nas concentrações entre 100 e 1000 µM, já o inibidor G3S foi avaliado nas concentrações entre 0,01 e 1000 µM. Os parasitas foram mantidos a 28 °C, cultivados em meio LIT pH 7,2. O controle negativo (C-) foi realizado sem adição de composto na cultura. Para o controle de inibição (C+) foi utilizada uma combinação de antimicina (0,5 µM) e rotenona (60 µM). (A, C e E) curvas de proliferação durante o período observado. (B e D) EC₅₀ correspondente a cada tratamento.

4.1.8 GAGMH e FDI afetam o ciclo intracelular do *T. cruzi*

Os dois compostos mais efetivos contra a proliferação de formas epimastigotas (GAGMH e FDI) também foram utilizados em testes no ciclo intracelular do *T. cruzi*. Inicialmente nos ensaios de toxicidade em células apresentados na Figura 17 A e D, nota-se

que os compostos são capazes de inibir a viabilidade de células CHO-K₁ de maneira dose-dependente ($EC_{50} \text{ GAGMH} = 681,7 \pm 4,7 \mu\text{M}$; $EC_{50} \text{ FDI} = 763 \pm 2,3 \mu\text{M}$). Tomando em conta esse resultado, testamos as drogas na infecção com formas CDT com no máximo 500 μM . Posteriormente, nos ensaios de infecção propriamente ditos, nota-se um efeito de redução dose-dependente na liberação de CDT nos dias 4 a 6 pós infecção (Fig 17 B e E), nesse caso, ao fim do primeiro ciclo infectivo, tanto nos tratamentos com o composto GAGMH como com o FDI ($EC_{50} \text{ GAGMH} = 3.95 \pm 0.4 \mu\text{M}$; $EC_{50} \text{ FDI} = 131.4 \pm 3.1 \mu\text{M}$). Tendo em mãos tais resultados, foi possível o cálculo do índice de seletividade dos compostos no ciclo intracelular de *T. cruzi* (GAGMH \equiv 173; FDI \equiv 8), demonstrando que GAGMH é o composto mais efetivo dentre todos os testados nesse trabalho.

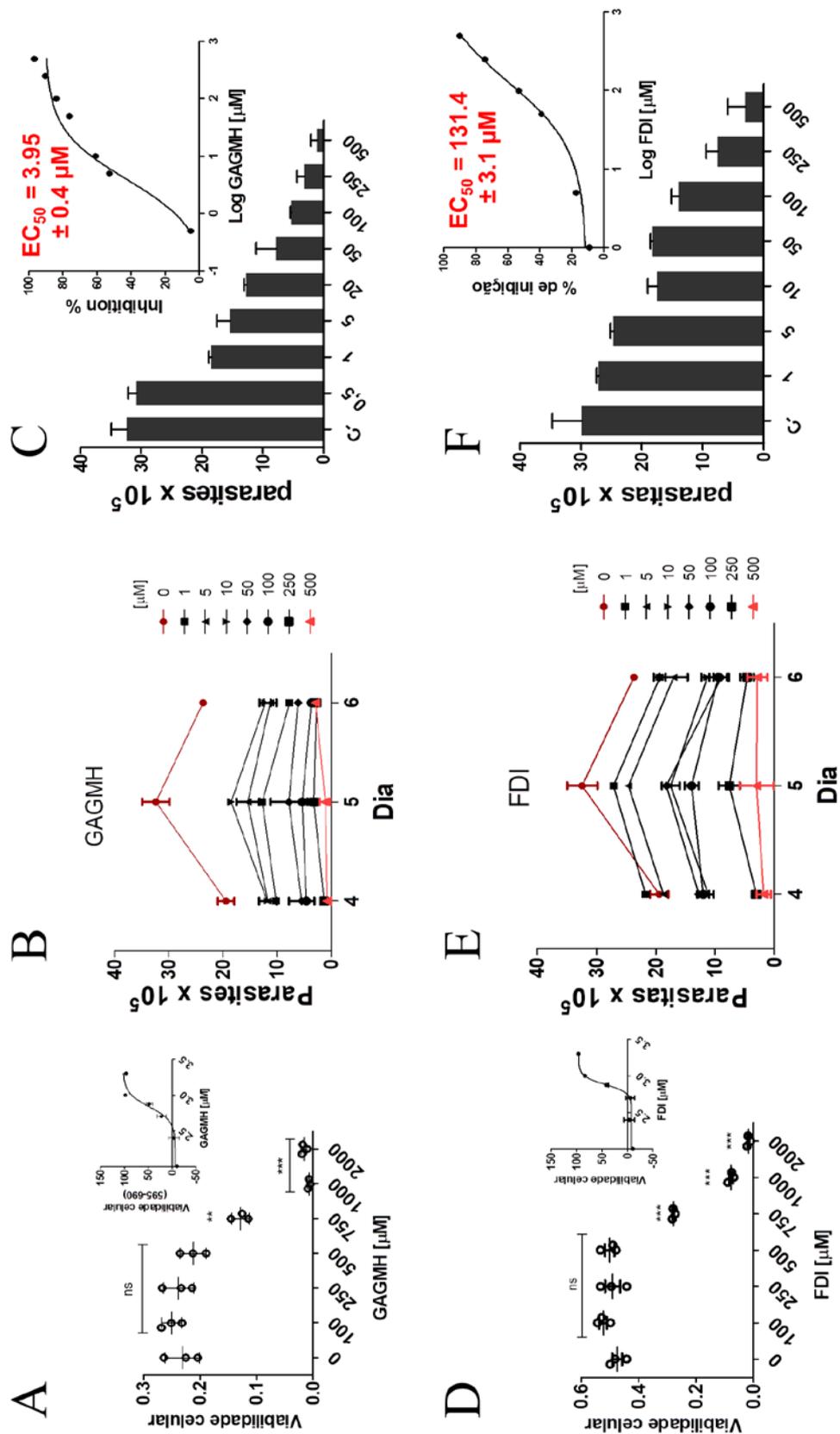


Figura 17. Avaliação do efeito de GAGMH e FDI no ciclo intracelular do *T. cruzi*. Em A e D, células CHO-K₁ não infectadas foram tratadas com os inibidores GAGMH ou FDI a concentrações entre 100 e 2000 μM . A

viabilidade das células foi acessada pelo método de MTT. Visto o efeito dose-dependente na viabilidade das células, calculou-se o EC_{50} para ambos os compostos. $EC_{50 \text{ GAGMH}} = 681,7 \pm 4,7 \mu\text{M}$; $EC_{50 \text{ FDI}} = 763 \pm 2,3 \mu\text{M}$. Após a infecção de células CHO-K₁ com CDT, foi realizado o tratamento com GAGMH ou FDI a concentrações entre 1 e 500 μM ao longo de todo o ciclo intracelular. Ao fim do primeiro ciclo intracelular a liberação de CDT foi acompanhada, mais especificamente entre o 4º e 6º dia pós-infecção (B e E). Em C e F nota-se o efeito dos inibidores no 5º dia pós-infecção, dia do pico máximo de eclosão de CDT. (*insets*) EC_{50} calculados no 5º dia pós-infecção para ambos os inibidores: GAGMH $\cong 4 \mu\text{M}$; FDI $\cong 130 \mu\text{M}$. Os índices de seletividade de GAGMH e FDI são de cerca de 173 e 6 respectivamente, revelando que GAGMH é o composto mais efetivo e promissor dentre os testados nesse trabalho.

4.2 Hexosaminas: transporte e bioenergética

Apesar das hexosaminas poderem ser obtidas a partir da biossíntese derivada do metabolismo de aminoácidos e glicose, cujas primeiras enzimas foram caracterizadas nesse trabalho, existe a possibilidade de obtenção de hexosaminas livres a partir do meio extracelular. Nesse capítulo, será descrito o transporte das hexosaminas e sua relação com o transporte de Glc além da possibilidade dessas moléculas serem uma fonte oxidável para o *T. cruzi*.

4.2.1 Cinética do transporte de GlcN e GlcNAc

Para iniciar a caracterização do processo de transporte das hexosaminas utilizaram-se concentrações iniciais presumivelmente saturantes (3 mM). Essa concentração foi escolhida a partir da hipótese levantada por Tetaud e colaboradores, propondo que o transportador de glicose seria capaz de transportar também outros açúcares, dentre eles hexosaminas. (Silber *et al.*, 2009; Tetaud *et al.*, 1994, 1996). Para ambos os substratos avaliados, GlcN e GlcNAc, a progressão temporal do transporte para o meio intracelular pôde ser ajustada a uma função de decaimento exponencial ($r^2_{\text{GlcN}} = 0,979$; $r^2_{\text{GlcNAc}} = 0,988$), característica de um fenômeno mediado por transportadores de membrana (Fig 18 A e C). O transporte de GlcN se mostrou aproximadamente linear durante 10 min e o de GlcNAc durante 15 min (Fig 18 A *inset* e C *inset*). Deste modo, escolheu-se uma janela de tempo de 60 segundos para medir a velocidade inicial (V_0).

Para obter os valores de K_M e V_{max} , a V_0 foi avaliada em função da concentração extracelular do substrato, utilizando diferentes concentrações entre 0 e 3 mM no caso de GlcN e entre 0 e 2 mM no caso de GlcNAc. Os dados permitem inferir que as hexosaminas são transportadas por um sistema único, saturável e que se ajusta ao modelo cinético de Michaelis-Menten. Os valores das constantes cinéticas foram obtidos constam na Tabela 2.

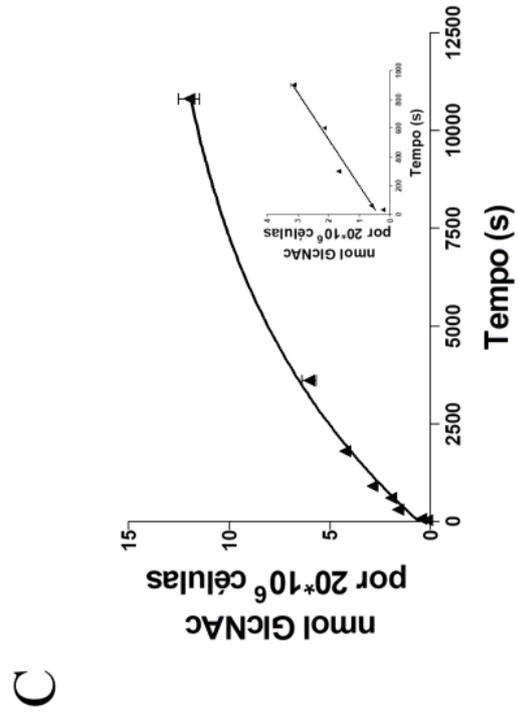
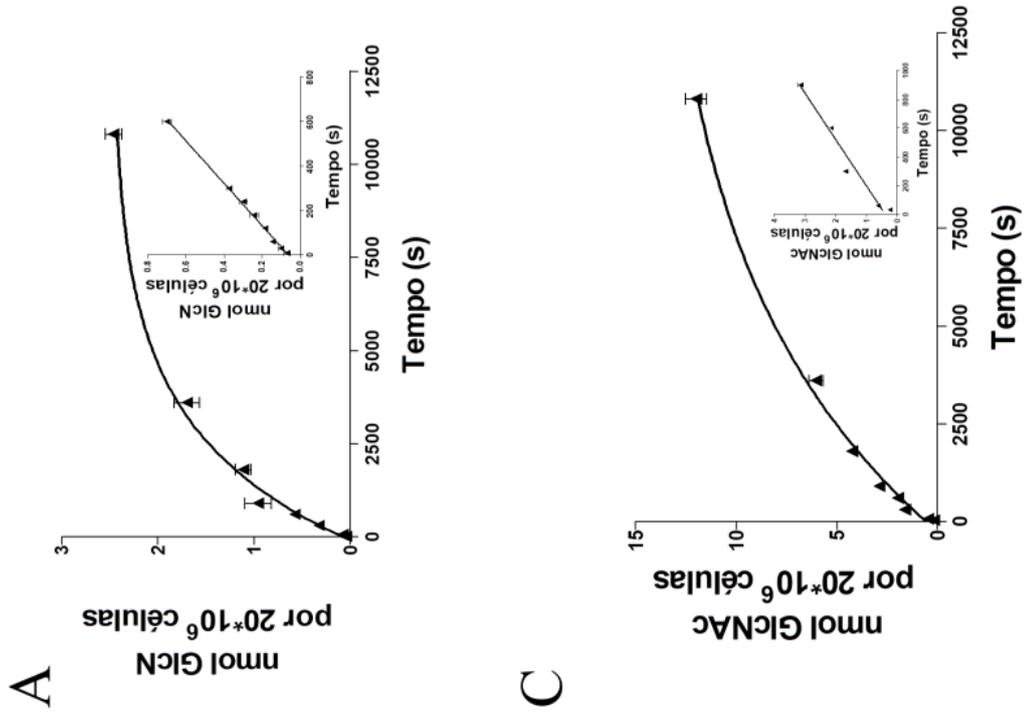
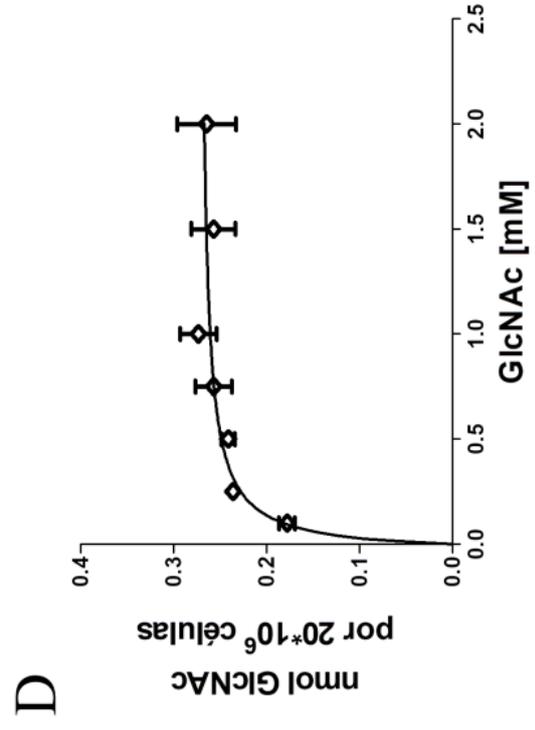
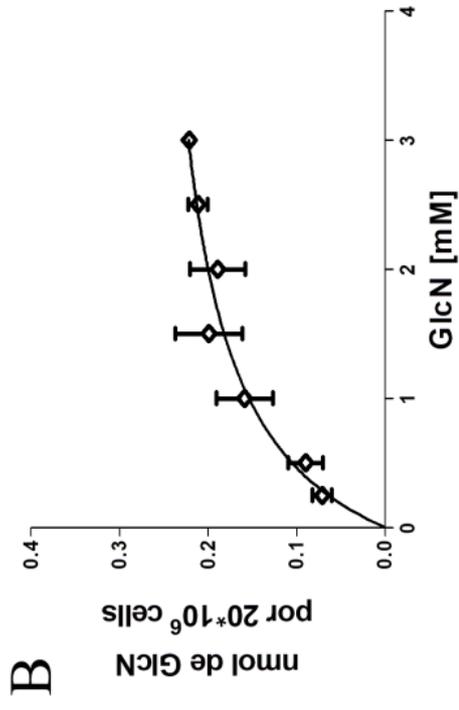


Figura 18. Cinética de incorporação de hexosaminas em epimastigotas de *T. cruzi*. (A e C) Incorporação tempo-dependente de 3 mM GlcN traçada com L- [¹⁴C (U)] - GlcN ou GlcNAc traçada com L- [¹⁴C (1)] - GlcNAc. *Insets*: A incorporação é linear até 5 min em ambos os casos. (B e D) Efeito da concentração do substrato: a velocidade inicial de transporte (V_0), estimada utilizando a faixa de incorporação linear do metabólito, foi medida como função da concentração extracelular de GlcN ou GlcNAc.

	V_{max}	K_M	IC ₅₀ Glc	IC ₅₀ GlcN	IC ₅₀ GlcNAc	K_i Glc	K_i GlcN	K_i GlcNAc
Glc	60.57±2.56*	0.18 ± 0.02	-	1,24 ± 0,29	1,27 ± 0,09	-	0,62	0,63
GlcN	0.18 ± 0.02	1.01 ± 0.17	1,01 ± 0,24	-	0,2 ± 0,05	0,5	-	0,43
GlcNAc	0.27 ± 0.05	0.05 ± 0.01	1,24 ± 0.07	1,27 ± 0,03	-	0,62	0,63	-

seção de materiais e métodos.

* nmol. min⁻¹.mg⁻¹ (Silber 2009)

¹ nmol. min⁻¹.20x10⁶ células⁻¹

²mM

³ s⁻¹

⁴ KJ.mol⁻¹

Tabela 2. Resumo da caracterização cinética do transporte de Glc e Hexosaminas.

Em seguida, experimentos foram realizados na tentativa de confirmar os indícios prévios de que hexosaminas são transportadas por TcHT (Tetaud *et al.*, 1994). Assim, foram realizados ensaios de competição cruzada do transporte de hexosaminas e glicose. Desta forma foram verificadas: i. a já descrita capacidade das hexosaminas de inibirem o transporte de Glc (Fig 19A); ii. a capacidade (até agora desconhecida) de Glc e GlcNAc inibirem o transporte de GlcN (Fig 19B); iii. a capacidade (até agora desconhecida) de Glc e GlcN inibirem o transporte de GlcNAc (Fig 19C). Em síntese, verificou-se uma inibição do transporte e de maneira dose-dependente em todas as combinações. Os valores foram ajustados a uma função sigmóide e os valores de IC₅₀ foram estimados (Fig 19 *insets*.; valores abaixo dos gráficos).

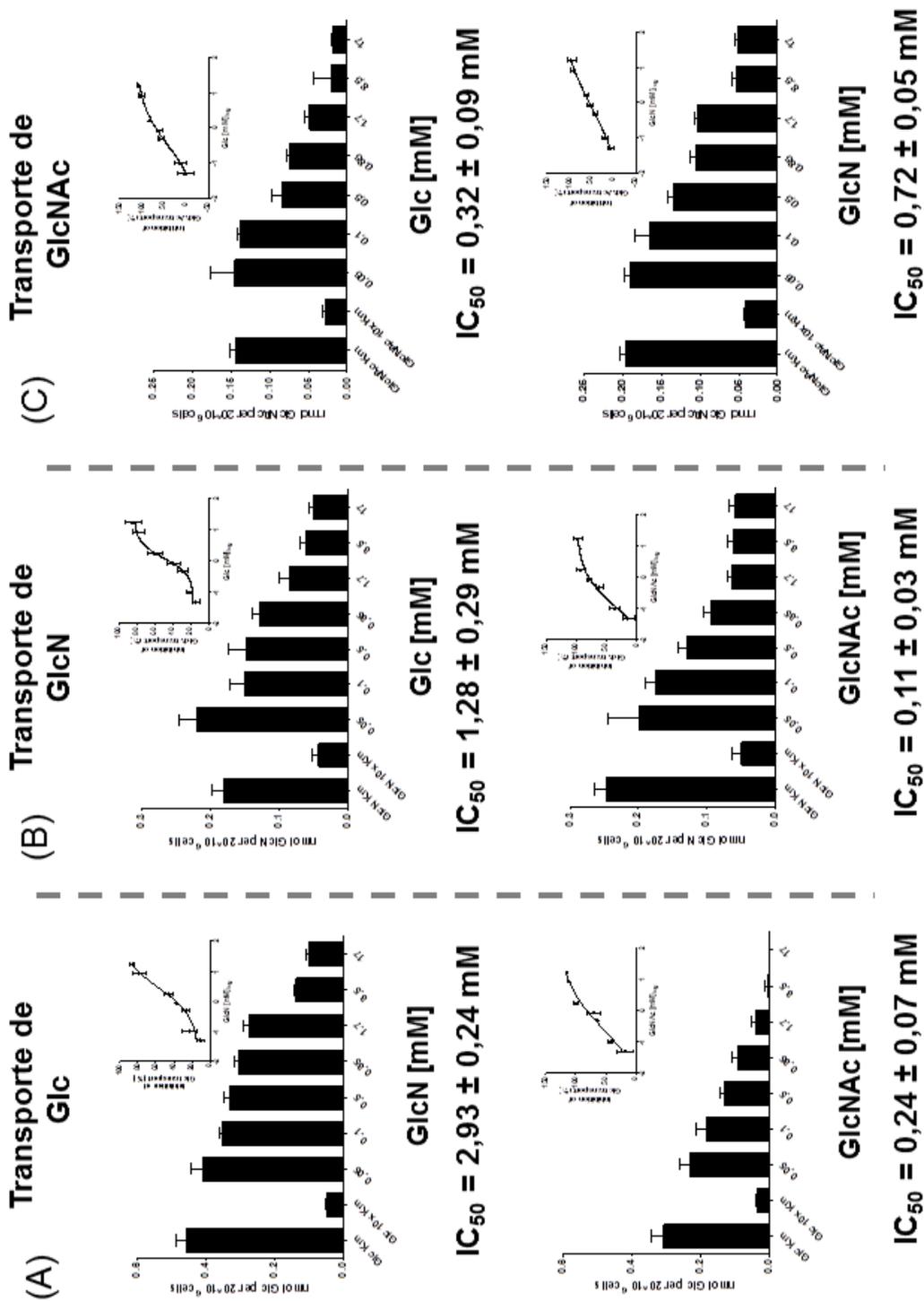


Figura 19. Ensaios de competição no transporte. (A) o transporte de Glc na presença de diferentes concentrações de hexosaminas. (B) Transporte de GlcN na presença de diferentes concentrações de Glc ou GlcNAc. (C) Transporte de GlcNAc na presença de diferentes concentrações de Glc ou GlcN. (*insets*) O efeito dose dependente foi observado em todos os casos e os valores de IC_{50} foram estimados.

4.1.3 Análise da atividade de GF6PA e GNA vs transporte de GlcN e GlcNAc em diferentes formas do ciclo biológico de *T. cruzi*

Uma vez que o *T. cruzi* percorre diferentes microambientes ao longo de seu ciclo biológico, é razoável pensar que as diferentes formas do *T. cruzi* poderiam apresentar mecanismos distintos para a aquisição das hexosaminas. Aliás, formas Epi, ao colonizarem o intestino médio dos triatomíneos, pode face um ambiente pobre em glicose porem com GlcNAc livre, possivelmente derivado da quitina e dos glicoconjugados da PMM: camadas glicídicas passíveis de degradação. Em contrapartida formas que interagem com a corrente sanguínea dos hospedeiros mamíferos, especialmente formas Tripo, estariam em um ambiente rico em Glc e Gln, precursores da via HBP. Deste modo, foi comparado o transporte de hexosaminas com a atividade das enzimas da HBP de formas Epi, Meta e Tripo . Foram utilizados parasitas intactos para a realização de ensaios de transporte e extratos totais para a medição das atividades enzimáticas. Foi verificado que tanto a atividade de GF6PA quanto a de GNA estão cerca de 2 vezes mais elevadas nas formas infectivas M e CDT (Fig 20 A). Nota-se o oposto quando se avalia o transporte de hexosaminas nessas formas, sendo que a forma E apresenta os maiores níveis de transporte (Fig 20 B).

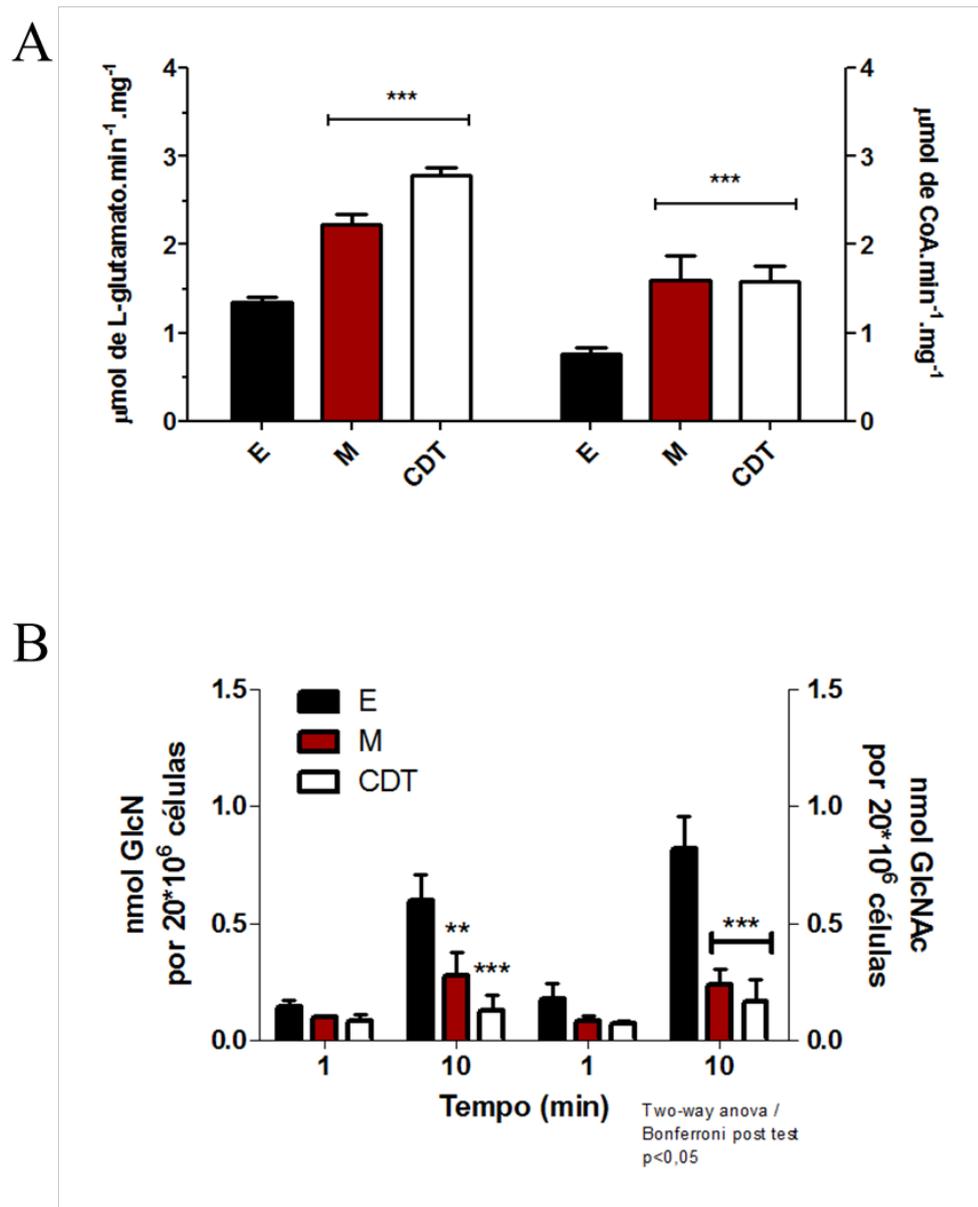


Figura 20. Comparativo do metabolismo de hexosaminas ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*. (A) Atividade das enzimas TcGF6PA e TcGNA. Foram utilizadas extratos totais das formas E, M e CDT; a atividade específica foi estimada utilizando concentrações saturantes para os substratos das enzimas. (B) aO transporte de GlcN ou GlcNAc foi realizado na concentração de 3 mM nos tempos de 1 e 10 minutos. Foram utilizadas formas E, M e CDT íntegras, obtidas como descrito em materiais e métodos.

4.2.2 Epimastigotas possuem uma atividade quinase de GlcNAc

Uma vez transportadas para o citosol, o primeiro passo para o catabolismo das hexosaminas é a sua fosforilação. Racagne e col., em 1983, sugeriram a capacidade de a HK utilizar outros substratos além da Glc, dentre eles GlcN e GlcNAc. Porém, essa afirmação não é consistente, uma vez que os dados foram baseados em ensaios indiretos (de inibição competitiva) (Racagni e Machado de Domenech, 1983). Efetivamente, nenhuma atividade hexosamina quinase foi medida diretamente. Neste trabalho, verificamos tanto uma atividade GlcN quinase (Fig 21 B) quanto uma atividade GlcNAc quinase (Fig 21 C), utilizando Glc como controle positivo (Fig 21 A) As atividades foram dependentes da quantidade de extrato de Epi. Como esperado, os controles negativos (ausência de substrato ou extrato) não apresentaram atividade .

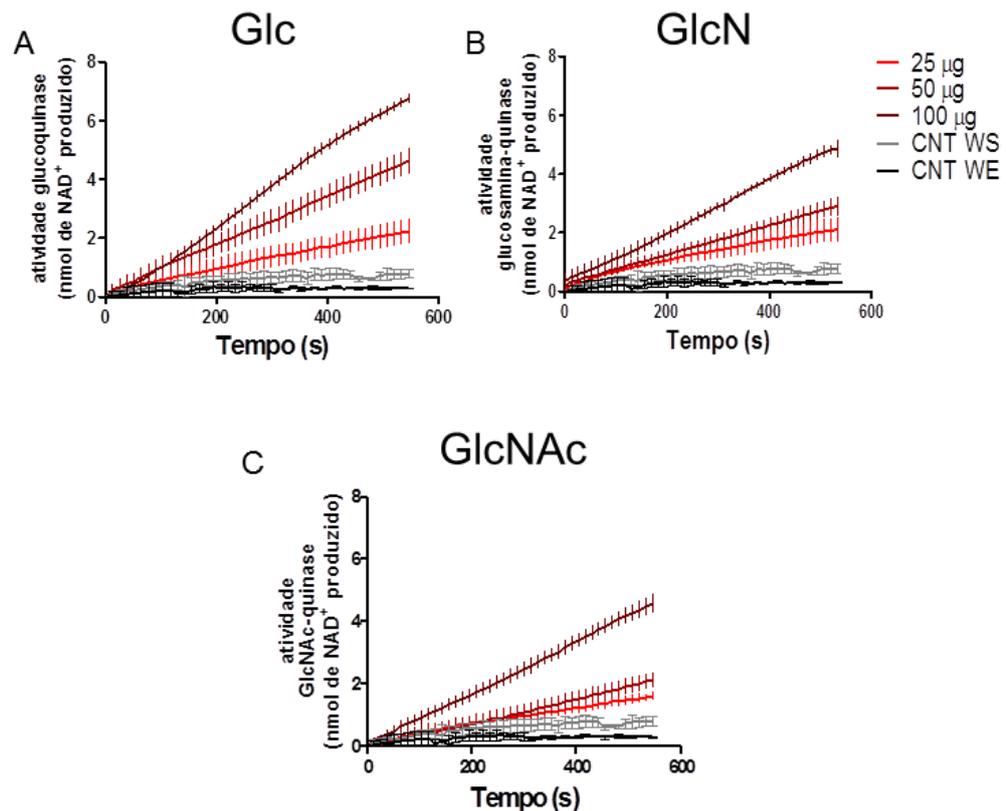


Figura 21. Fosforilação das hexosaminas em extratos de epimastigotas. Utilizando-se da atividade das enzimas comerciais piruvato quinase e lactato desidrogenase (PK/LDH enzymes from rabbit muscle – Sigma Aldrich), foi possível quantificar o ADP gerado pela fosforilação da (A) Glc, (B) GlcN e (C) GlcNAc. Controles sem substrato (CNT WS) e sem extrato (CNT WE) foram utilizados.

4.2.3 Atividade mitocondrial e viabilidade de *T. cruzi* sustentada por hexosaminas

Como apresentado nos tópicos anteriores, as hexosaminas são transportadas e fosforiladas pelas formas Epi, indicando que essas moléculas são metabolizadas pelo *T. cruzi*. Assim como outros carboidratos, espera-se que um possível catabolismo de hexosaminas seja capaz de contribuir com a formação de intermediários do TCA de onde os elétrons desses metabólitos seriam mobilizados a coenzimas, as reduzindo. Portanto, existe a possibilidade das hexosaminas fornecerem substratos mitocondriais oxidáveis, que estão envolvidos no equilíbrio redox mitocondrial, o qual pode ser aferido por metodologias baseadas na conversão de sais tetrazólicos solúveis (por exemplo, MTT e Resazurin) para seus respectivos estados reduzidos. Esta conversão vem sendo atribuída à atividade de redutases mitocondriais e transportadores de elétrons; de fato, tais metodologias são consideradas indicadoras da atividade mitocondrial e vem sendo utilizadas por diversos autores como um marcador de viabilidade do *T. cruzi* (Damasceno *et al.*, 2014; Muelas-Serrano, Nogal-Ruiz e Gómez-Barrio, 2000).

Foram utilizadas ambas as metodologias em formas Epi, submetidas previamente a um estresse nutricional de 24 h a fim de depletar as concentrações intracelulares de nutrientes e ATP (Manchola *et al.*, 2016). Foi verificado que na ausência de nutrientes (incubação em PBS não suplementado) a viabilidade mitocondrial diminui linearmente em função do tempo em ambos os protocolos. Quando tratados com Glc ou hexosaminas a viabilidade mitocondrial dos Epi mantém mais elevada, sugerindo que hexosaminas podem ser oxidadas (Fig 22 A e B). A fim de confirmar a capacidade das hexosaminas de manter a viabilidade celular, os parasitas do tempo de 96h de estresse, em seus respectivos tratamentos com PBS, PBS+Glc, PBS+GlcN ou PBS+GlcNAc, foram ainda reincubados em meio LIT e a proliferação dos parasitas avaliada. A proliferação após a reincubação ocorreu de maneira muito similar aos parasitas controle (mantidos todo o tempo em LIT) exceto pelos parasitas mantidos somente em PBS, os quais apresentam atraso na proliferação.(Fig 22 C).

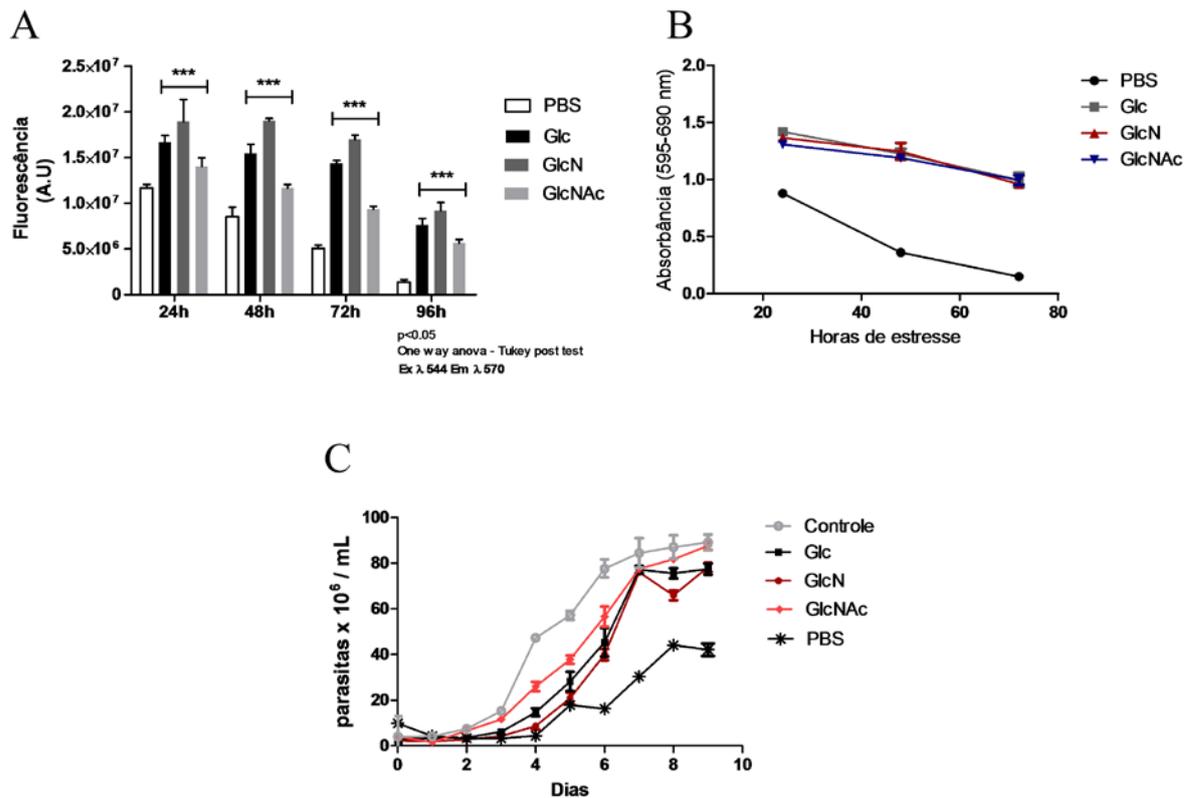


Figura 22. Hexosaminas e a viabilidade de epimastigotas. (A e B) Formas epimastigotas previamente cultivadas em meio LIT foram lavadas e incubadas com PBS suplementado com 5 mM de GlcN ou GlcNAc como única fonte de nutriente. Controles sem nutriente (PBS) e com PBS suplementado com 5 mM de Glicose (Glc) foram utilizados. A viabilidade foi acessada pela técnica de Resasurina (A) e MTT (B), em diferentes tempos de incubação, como descrito em 2.3.1. (C) Após 96h de incubação nas condições descritas, as amostras foram lavadas novamente e retornadas a um meio LIT novo. A proliferação dos parasitas foi aferida diariamente por leituras de densidade óptica a 620 nm e os valores de absorbância foram convertidos em concentração de parasitas utilizando uma calibração com concentrações conhecidas de parasita. Foi utilizado como controle, parasitas mantidos todo o tempo em meio LIT.

4.2.4 Hexosaminas: metabólitos oxidáveis pelo *T. cruzi*

Dado que as hexosaminas se mostraram capazes de manter a viabilidade celular, que são fosforiladas e que existem genes putativos que codificariam para as enzimas de conversão das hexosaminas em Fru-6-P, inferimos que possivelmente essas moléculas são metabolizadas na via glicolítica que, em última instância, fornece substratos oxidáveis para o TCA (Piruvato e Acetil-CoA). Uma consequência lógica derivada da inferência relatada é que os átomos de carbono constituintes das hexosaminas seriam oxidados até CO₂. Deste modo avaliamos a produção de CO₂ a partir do tratamento com hexosaminas utilizando metabólitos uniformemente marcados com ¹⁴C (exceto GlcNAc, este estava marcado em seu carbono 1). Nota-se em Fig 23A que em todos os tratamentos ocorreu a produção de ¹⁴CO₂, essa produção se incrementou entre 1 e 4 h e a geração de ¹⁴CO₂ a partir de GlcNAc foi cerca de 2,5 vezes

maior que a produção a partir de Glc ou GlcN, indicando que quando na mesma concentração, a oxidação de GlcNAc é mais eficiente.

Uma vez que foi comprovado que o destino metabólico dos carbonos das hexosaminas pode ser a formação de CO₂, é razoável propor que este deriva da formação de acetil-CoA e piruvato, que mediante a sua oxidação no TCA rendem equivalentes reduzidos e succinato, capazes de alimentar a cadeia de transporte de elétrons (ETS). Sendo assim, as hexosaminas deveriam ser capazes de sustentar o transporte de prótons através da membrana mitocondrial interna, gerando o gradiente de pH e potencial elétrico neste compartimento. Foi então investigada a capacidade das hexosaminas de manterem o potencial de membrana mitocondrial de formas Epi (Fig 23 B-G). Para isso Epis foram tratados com MRC suplementado com Glc, GlcN ou GlcNAc, incubados com Rh123 e foi avaliada a razão F/F_i , sendo essa proporcional ao potencial de membrana mitocondrial. Foi verificado que tanto Glc quanto as hexosaminas são capazes de manter o potencial de membrana, acima dos valores do controle negativo (parasitas incubados somente com MRC). Epis tratados com His, metabólito previamente descrito como substrato oxidável pelo *T. cruzi* apresentam os maiores valores de F/F_i (Barisón *et al.*, 2016).

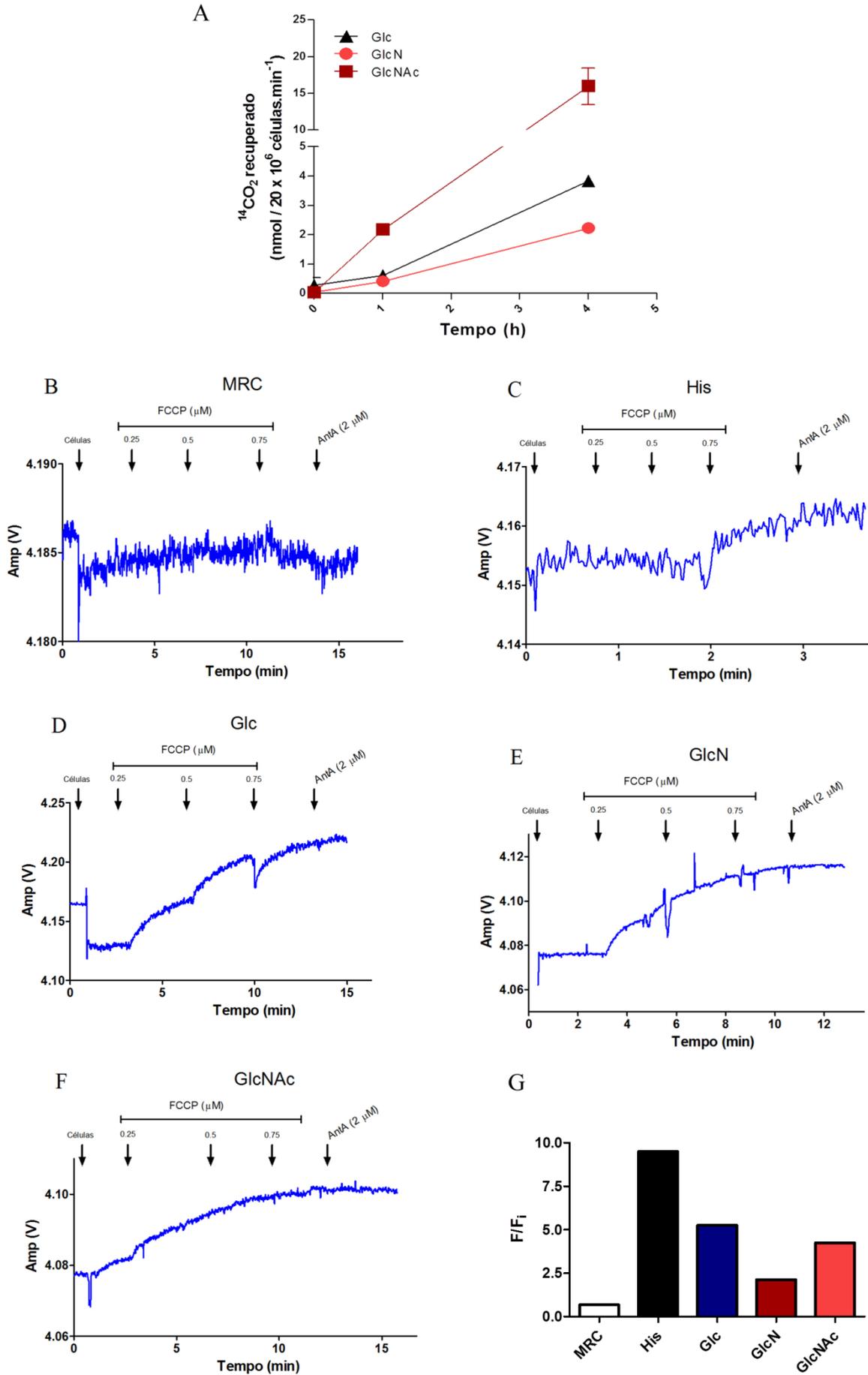


Figura 23. Oxidação mitocondrial das hexosaminas. (A) Produção de $^{14}\text{CO}_2$ por epimastigotas tratados com Glc, GlcN ou GlcNAc radioativos. A diferentes tempos pós incubação com os metabólitos marcados (T0, 1h e 4h), o $^{14}\text{CO}_2$ produzido foi capturado em papéis filtro embebidos com solução de 2 M de KOH. (n=3) (B-F) As linhas azuis indicam a fluorescência detectada pelo acessório O2k-Fluo. Em todos os casos foi adicionado 2,5 μM de FCCP, desacoplando o potencial de membrana mitocondrial e alterando o *quenching* da Rh123 previamente incorporada. (G) Representação das razões F/F_i das amostras.

4.2.4 Consumo de oxigênio de *T. cruzi* estimulado por hexosaminas

Tendo em vista que: (i) o padrão do efeito das hexosaminas observado nos experimentos anteriores demonstrou a capacidade do parasita de se manter viável, de manter de se recuperar após estresse e (ii) parte da via glicolítica em *T. cruzi* é citosólica, foram realizados ensaios de respirometria de alta resolução em formas epimastigotas intactas avaliando, conseqüentemente, o comportamento do controle respiratório (RCR – *Respiratory Control Ratio*). O consumo de oxigênio de formas epimastigotas submetidas a estresse nutricional e recuperados por 30 min em 5 mM de Glc, GlcN ou GlcNAc foi comparado ao de parasitas recuperados por 30 min em 5 mM de His, aminoácido reportado como estimulador da síntese de ATP através da *OxPhos* e consumo de O_2 na mitocôndria de *T. cruzi* (Barisón *et al.*, 2016).

Assim, buscou-se avaliar o comportamento mitocondrial em função das taxas respiratórias do parasita em cada condição de estresse/recuperação. A análise da capacidade respiratória se deu pela avaliação da taxa de respiração de rotina em células intactas (*R* – *Routine respiration*) e mediante administração de agentes desacoplantes (Oligomicina A (*Leak respiration* – *L*) – *State 4_{Omy}*) e protonóforos (FCCP (*E /ETS capacity* – *Electron Transfer Capacity*) - *State 3_{FCCP}*), em cada condição (estressados nutricionalmente em PBS e recuperados com His). Os traçados resultantes podem ser analisados em (Fig 24 A-E). Os dados de três replicas biológicas referentes à *R*, *L* e *ETS* encontram-se graficados em (Fig 24 F). Notam-se diferenças significativas entre *R* e *L* em todos os casos exceto nos Epis que não foram recuperados e permaneceram no tampão de respiração (MRC).

Verifica-se, em um primeiro momento, que os valores de *R* de epimastigotas recuperados em GlcN ou GlcNAc estão em valores similares aos de parasitas recuperados com Glc ou His parasitas MRC mostraram valores significativamente menores de *R* (Fig 24 F).

Sabendo que parte da respiração de rotina pode não estar acoplada a *OxPhos*, foram descontados de *R* os valores de consumo de oxigênio referente ao *Leak* respiratório de cada tratamento (*L*), obtendo conseqüentemente a respiração de rotina livre ($\approx R$) de cada condição. Verifica-se que $\approx R$ também é similar entre os tratamentos e que o valor de $\approx R$ dos parasitas

MRC foi significativamente baixo quando em comparação com parasitas recuperados em His, Glc, GlcN ou GlcNAc, ademais, cerca de 90% do consumo de oxigênio dos parasitas MRC corresponde a *Leak respiration* (Fig 24 G). Por conseguinte, ao ser calculada a eficiência de acoplamento da respiração de rotina ($J_{\sim R}$) o mesmo padrão se mantém: Os parasitas recuperados com metabólitos apresentam níveis de acoplamento respiratório, significativamente maiores que parasitas não recuperados (Fig 24H), indicando que tais metabólitos estimulam a síntese de ATP pela ATP sintase vinculado ao consumo de O_2 .

Ao ser adicionado FCCP nas amostras previamente tratadas com Oligo, obteve-se o consumo de oxigênio correspondente à capacidade máxima da ETS em concentrações fisiológicas dos metabólitos (E); nessa condição de inibição da ATP sintase, não ocorre OxPhos e, portanto, ocorre a limitação cinética da ATP sintase no sistema. Quando o parâmetro E é analisado, nota-se que His foi o metabólito mais efetivo em estimular ETS, mas que Glc, GlcN e GlcNAc, de maneira similar entre eles, também o fizeram (Fig 23 F).

Sabendo que E corresponde ao fluxo respiratório máximo, ao se descontar desse parâmetro o valor de L , obtém-se o valor de fluxo máximo, potencialmente disponível a Phos ($\approx E$). Os parasitas recuperadas em Glc, GlcN, GlcNAc ou His se mostraram com valores de $\approx E$ mais elevados que parasitas MRC, sendo que o controle em His apresentou valores ainda maiores (Fig 24 I). Normalizando os dados de $\approx E$ pelos valores de E obtém-se a potencial eficiência de acoplamento de da ETS a OxPhos ($J_{\sim E}$). Nota-se que a recuperação com His, Glc ou hexosaminas foi capaz elevar a capacidade de acoplamento de ETS de epimastigotas cerca de 4 vezes acima dos valores de parasitas não recuperados (Fig 24 J), indicando que tais metabólitos estimulam o transporte de elétrons por ETS.

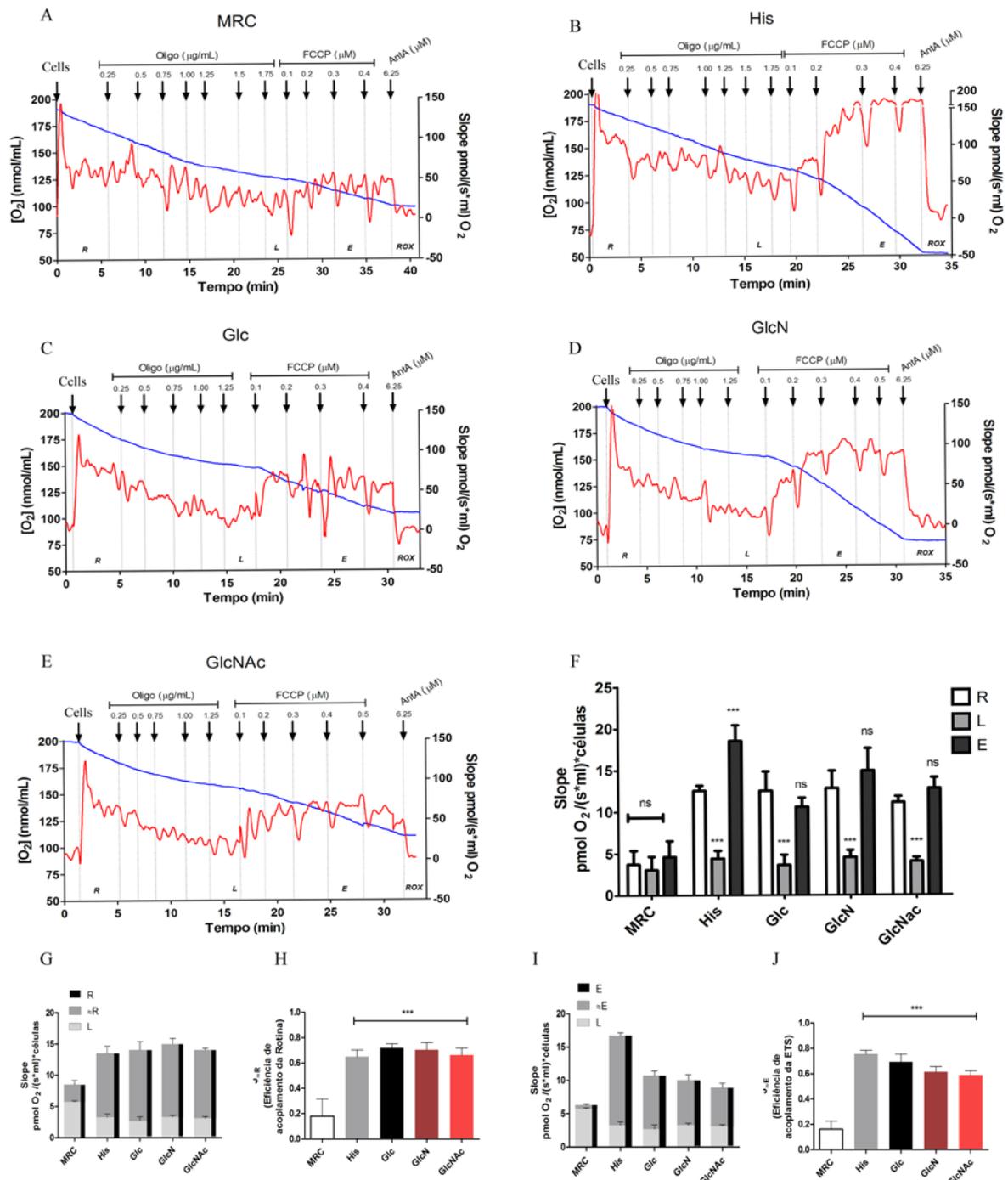


Figura 24. Taxas de respiração em formas epimastigotas. (A) Consumo de oxigênio em células estressadas por 16 horas que não foram recuperadas e que foram recuperadas em (B) 5 mM de His, (C) Glc, (D) GlcN ou (E) GlcNAc. Com linhas azuis indica-se a variação na concentração de oxigênio em função do tempo (eixos esquerdos), enquanto que com linhas vermelhas indica-se o fluxo de oxigênio (eixo direito); R: Respiração de rotina; L: *Leak respiration*; E: Capacidade máxima da ETS; ROX: Consumo de oxigênio residual. (F). Taxas de respiração medidas durante cada estado respiratório. (G e H) Parâmetros respiratórios referentes à respiração de rotina. (I e J) Parâmetros respiratórios referentes à capacidade máxima de ETS. (n=7)

4.2.5 Conteúdo intracelular de ATP

A demonstração de que as hexosaminas são moléculas oxidadas pela OxPHOS e possivelmente metabolizadas através da via glicolítica (processos que tem como uma de suas funções biológicas a produção de ATP), indicou ser relevante avaliar a participação das hexosaminas na biossíntese de ATP. Para tal, formas epimastigotas foram submetidas a um estresse nutricional em PBS a fim de reduzir o conteúdo intracelular de ATP e em seguida recuperados com Glc ou hexosaminas. Verificou-se após 5h de recuperação com as hexosaminas um incremento do conteúdo intracelular de ATP (Fig 25), além disso, os níveis de ATP se mantêm mais elevados que os de parasitas na ausência de fontes de carbono durante todos os tempos avaliados (Fig 25 inset).

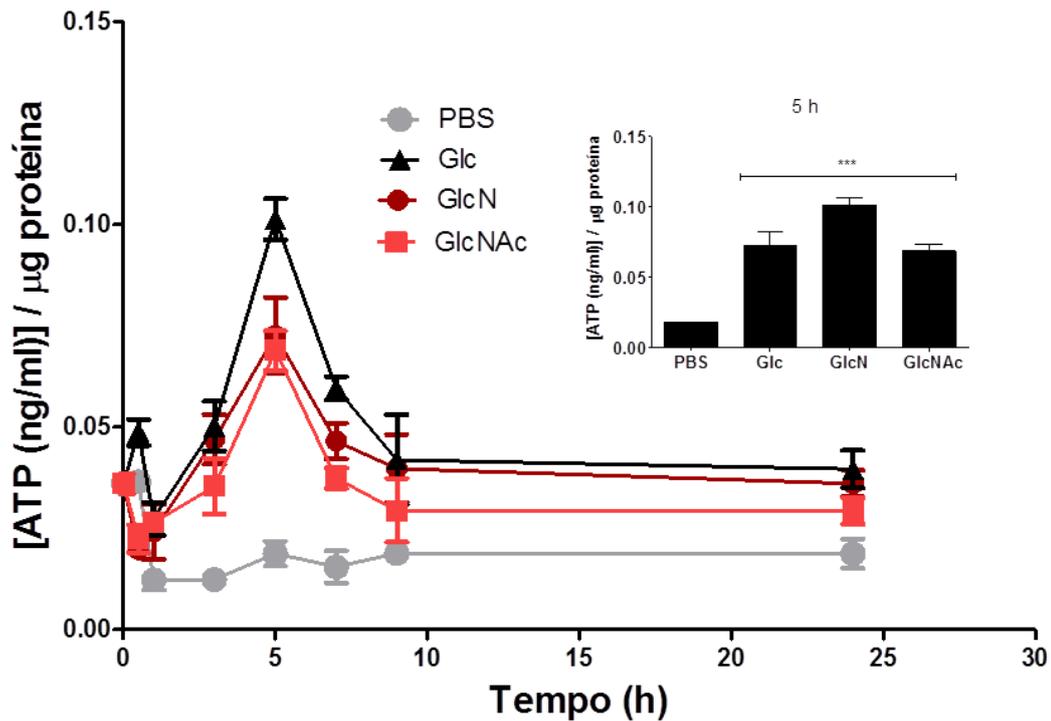


Figura 25. Biossíntese intracelular de ATP em formas epimastigotas. Formas Epi foram tratadas com PBS suplementado com 5 mM de Glc, GlcN ou GlcNAc (Controle negativo: parasita mantidos em PBS). *Inset:* Comparação dos níveis intracelulares de ATP 5 horas após os tratamentos com os metabólitos. (n=3)

4.2.6 Hexosaminas sustentam a metaciclo gênese *in vitro*

Tendo em vista que: (i) as formas Epi e Meta são capazes de incorporar hexosaminas a partir do meio extracelular, (ii) que as hexosaminas são metabólitos oxidáveis que estimulam a produção de ATP pelo epimastigota, (iii) formas Meta necessitam metabólitos capazes de sustentar a síntese de ATP, como a prolina ou glutamato, para tal objetivo (Contreras *et al.*, 1985), foi considerado relevante avaliar a participação das hexosaminas no processo de diferenciação de formas Epi para Meta (metaciclo gênese). Verifica-se que todos os tratamentos induziram a metaciclo gênese *in vitro*, sendo que o tratamento somente com aminoácidos Pro, Glu e Asp (3AA) apresentou uma ligeira diminuição no perfil de diferenciação e o tratamento com TAUGlcNAc um aumento e adiantamento da diferenciação, em comparação com o controle tratado com TAU3AAG.

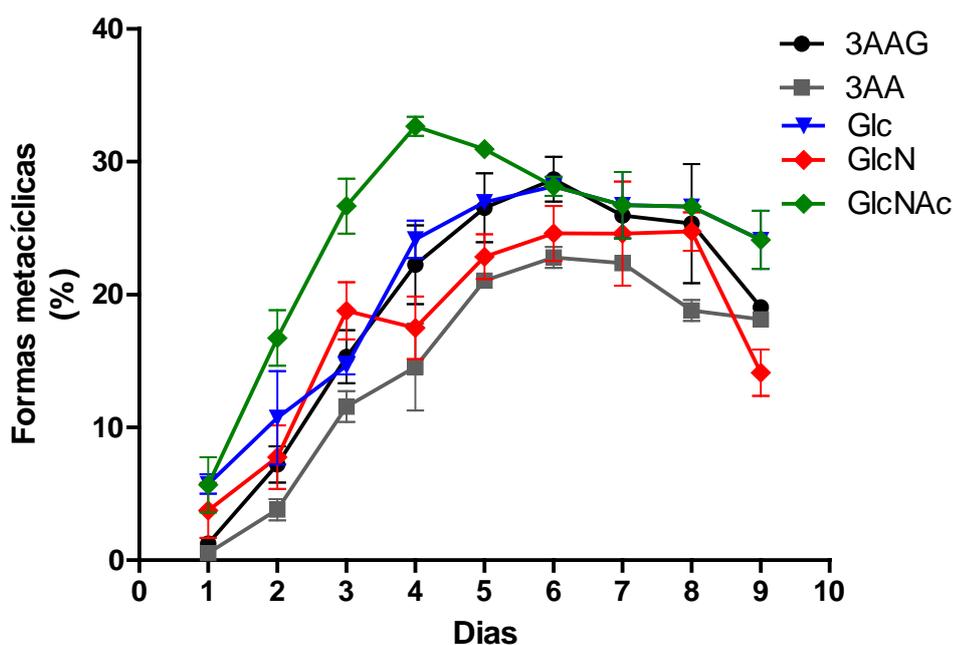


Figura 26. Efeito das hexosaminas na metaciclo gênese *in vitro*. Os parasitas foram mantidos em meio TAU 3AAG (controle), TAUGlc, TAUGlcN, TAUGlcNAc. A diferenciação foi acompanhada por contagens diárias em câmara de Neubauer (número de parasitas total e número de metacíclicos) observando-se a morfologia dos parasitas. (n=5)

5.1 Importância da HBP no *T. cruzi*

A enzima GF6PA (EC 2.6.1.16), uma vez que utiliza glutamina como substrato, pode ser a porta de entrada do nitrogênio derivado dos aminoácidos para o metabolismo de hexosaminas/nucleotídeos açúcares, mais especificamente a biossíntese desses metabólitos. Em *L. major*, o nocaute dessa enzima leva a auxotrofia para hexosaminas (Naderer, Wee e McConville, 2008). Já a enzima GNA (EC 2.3.1.4), passo seguinte da via de biossíntese, é essencial em *T. brucei*, uma vez que esse parasita não transporta GlcNAc a partir do meio extracelular (Ebikeme *et al.*, 2008) cuja posterior fosforilação poderia suprir a necessidade desses passos enzimáticos. Não há nenhum relato na literatura sobre esses passos enzimáticos e o metabolismo de hexosaminas em *T. cruzi*. Neste trabalho verificamos que *T. cruzi* expressa uma GF6PA e uma GNA funcionais com altas porcentagens de identidade proteica com seus homólogos em outros organismos. Como esperado, essa conservação é mais alta entre tripanossomatídeos. Nesse sentido, a comparação entre sequências e a caracterização cinética de enzimas fornece bases importantes para a compreensão do metabolismo. Porém é necessário considerar que a disponibilidade de metabólitos varia consideravelmente durante o ciclo de vida do *T. cruzi*, modulando a necessidade da atividade enzimática. Assim, moléculas que se mostraram inibidores enzimáticos efetivos, podem apresentar efeitos antiparasitários distintos entre os estágios do ciclo biológico.

Na corrente sanguínea formas Tripo e Meta se deparam com altas concentrações de Glc (≈ 8 mM) e Gln (≈ 500 μ M) habilitando-as a usar a HBP (Abdul-Ghani e DeFronzo, 2009; Costa *et al.*, 2017; Osaki *et al.*, 2015; Persiani *et al.*, 2007), sendo a Glc um dos precursores de Fru-6-P, que junto à Gln são substratos de GF6PA. O efeito dos inibidores GAGMH e FDI pode ser explicado pelo aumento de atividade da GF6PA e GNA nas formas infectivas. Esse aumento de atividade da HBP e sensibilidade aos inibidores acompanha a diminuição do transporte das hexosaminas, cujas concentrações plasmáticas são relativamente baixas, mesmo quando administradas via oral (GlcN $\approx 0,3$ μ M; GlcNAc $\approx 0,9$ μ M). De forma contrária, Epis que por sua vez colonizam ambientes com disponibilidade de GlcNAc, tem atividade da GF6PA e GNA reduzidas, aumento no transporte de hexosaminas e menor sensibilidade aos inibidores. Esses apontamentos endossam o argumento da disponibilidade de nutrientes como fator determinante para o efeito do GAGMH e FDI.

Em princípio, formas intracelulares necessitam de uma HBP ativa, visto que estas formas refazem sua maquinaria de moléculas de superfície no interior da célula ao se diferenciarem (Buscaglia *et al.*, 2006) e que são incapazes de obter UDP-GlcNAc a partir de

outros nucleotídeos açúcar (Roper e Ferguson, 2003). Corroborando com essa hipótese, inibidores da HBP são efetivos no ciclo intracelular, sugerindo que os substratos Gln e Fru-6-P estão disponíveis para a TcGF6PA nesse momento. Uma vez que o transporte de Glc está ausente em formas amastigotas (Silber *et al.*, 2009) e de que as hexoses encontram-se majoritariamente fosforiladas no citosol das células, conclui-se que a síntese de Fru-6-P pelo *T. cruzi* ficaria condicionada à uma possível gliconeogênese do parasita. Diversos autores relataram a atividade de enzimas cruciais para a gliconeogênese, (Acosta *et al.*, 2004; Adroher, Osuna e Lupiáñez, 1987; Avila *et al.*, 1979; Bringaud, Baltz e Baltz, 1998; Zingales *et al.*, 1979). Assim, substratos não cetogênicos e disponíveis no citosol das células do hospedeiro, seriam candidatos precursores de Fru-6-P para o Ama e Epi-like.

Sabe-se que no ciclo intracelular Pro é um aminoácido essencial (Tonelli *et al.*, 2004), que pode ser degradado até Glu (Mantilla *et al.*, 2015; Paes *et al.*, 2013) que por sua vez pode ser convertido a α -KG via glutamato desidrogenase ou pela ação de diversas aminotransferases cujas atividades já foram demonstradas (Carneiro e Caldas, 1983; Duschak e Cazzulo, 1991; Manchola, Silber e Nowicki, 2018; Nowicki *et al.*, 2001). Glu ainda pode ser substrato de uma glutamina sintetase, mais expressa e ativa em Ama (Crispim *et al.*, 2018), fornecendo Gln que também pode ser obtida via transporte nesse estágio (Damasceno, 2017). Os fatos apresentados anteriormente sugerem que a HBP possui um papel mais relevante nas formas de *T. cruzi* que habitam o hospedeiro mamífero, sendo que os inibidores da HBP, a validam como uma via com potencial para intervenções quimioterápicas.

5.2 Hexosaminas como moléculas oxidáveis por formas epimastigotas

Ao se avaliar o transporte das hexosaminas, nota-se de início as diferenças de afinidade entre os transportadores de Glc, GlcN e GlcNAc. Curiosamente o sistema de transporte tem uma afinidade maior por GlcNAc do que por Glc ou GlcN. Esse fato chama a atenção para os relatos de Peacock e Ebikeme, nos quais é proposto que GlcNAc estimula a proliferação de formas procíclicas de *T. brucei* (Ebikeme *et al.*, 2008; Peacock *et al.*, 2006). Curiosamente, no mesmo trabalho os autores chegaram à conclusão que as formas procíclicas de *T. brucei* são incapazes de incorporar GlcNAc. As conclusões que à primeira vista são contraditórias podem ser explicadas pelo fato de que nos experimentos de Peacock, os parasitas não foram submetidos a incubações com apenas GlcNAc como única fonte de carbono, como realizado nesse estudo. De fato formas Epi de *T. cruzi* são mais resistentes a

estresses nutricionais severos se comparadas a formas procíclicas de *T. brucei* (Dados do laboratório não publicados).

Como relatado anteriormente, as formas Epi de *T. cruzi* são capazes de metabolizar completamente hexoses e hexosaminas, obtendo-as do meio extracelular e degradando-as até a eliminação de seus carbonos como CO₂. O fato de a quantidade de CO₂ liberado pela degradação da Glc ser inferior a de GlcNAc (mesmo este sendo marcado radioativamente somente no carbono 1), pode se dever à uma maior distribuição dos carbonos da Glc para a via das pentoses fosfato, não compartilhada com as hexosaminas. Já a diferença observada entre a formação de CO₂ de GlcNAc e GlcN (apesar da via de degradação da GlcN ser a priori mais curta) pode estar relacionada à maior afinidade do sistema de transporte por GlcNAc (com K_M cerca de 15 vezes maior). Isso nos mostra que quando essas moléculas estão disponíveis no ambiente extracelular, podem manter o metabolismo energético.

Os parâmetros mitocondriais calculados em células intactas, revelam que as hexosaminas conseguem manter o transporte de elétrons acoplado à OxPhos. Curiosamente, os níveis máximos do E, apresentam valores similares a R. Isso indicaria que Hexosaminas não produzem um efeito de capacidade sobressalente de E, diferentemente da His, onde esse fenômeno é bem claro. A ausência da capacidade sobressalente de E, deve-se ao envolvimento dessas moléculas em outros processos biológicos que não apenas respiração. Com relação às Hexosaminas, a ausência desse efeito poderia ser explicado pelo direcionamento desses carbonos para a HBP, assim como para vias que compartilham piruvato como substrato.

Os níveis intracelulares de ATP após 5h de incubação se mostram elevados nos parasitas incubados com hexosaminas com relação aos parasitas incubados sem fontes de carbono no meio. Uma vez que essas moléculas são classicamente metabolizadas via glicólise, parece certo pensar que o ATP nesse ponto, pode ser derivado dessa via. Porém, como foi verificado nesse trabalho, essas moléculas também conseguem recuperar capacidade de respiração acoplada a OxPhos, quando comparado com a respiração dos parasitas sem substratos oxidáveis no meio. Resultados preliminares também indicam que às 5h, a respiração de rotina dos parasitas incubados com hexosaminas é menor, corroborando a hipótese de que o pico nos níveis intracelulares de ATP nessa condição de tempo, deriva majoritariamente da glicólise.

Quando não há fontes de carbono no meio, as mitocôndrias de epimastigotas estressados nutricionalmente perdem sua capacidade redutora com o tempo, como visto nos resultados retratados na Fig 22. Esse fato é também verificado em ensaios temporais de

quantificação intracelular de ATP e respiração em células intactas, resultados do nosso laboratório que foram congruentes com os apresentados nesse trabalho.

Apesar de a mitocôndria ser afetada nessas condições, a população parasitária é capaz de se restaurar, sendo os parasitas capazes de proliferar até mesmo após 72 h de estresse em PBS. Na natureza, os triatomíneos vetores são submetidos a períodos de estresse nutricional severo, sendo que logo após o repasto sanguíneo esse período pode chegar a mais de 12 meses. Em longos períodos de estresse nutricional, a população de parasitas chega a competir por nutrientes com o triatomíneo (Schaub e Lösch, 1989) Diversos processos são desencadeados pelo estresse nutricional do hospedeiro invertebrado e consequente estresse nutricional do *T. cruzi*.

Muitos autores tem observado uma diminuição na densidade de parasitas no trato intestinal de triatomíneos estressados nutricionalmente (Kollien e Schaub, 1998; Schaub e Böker, 1986; Schaub e Lösch, 1989) e diminuição na quantidade de tripomastigotas encontradas em infecções de triatomíneos estressados por longos períodos (Garcia *et al.*, 1995). Apesar de estar condicionado a longos períodos de estresse nutricional, parece lógico que nutrientes devam estar disponíveis para os epimastigotas, no intestino médio dos triatomíneos, mesmo que em baixas concentrações.

Até o momento não existem estudos indicando qual(ais) seria(m) essa(s) molécula(s) e sabe-se que após o repasto sanguíneo, o tempo para total absorção dos nutrientes no intestino médio dos barbeiro é na escala de horas (Guarneri e Lorenzo, 2017). Reforçamos aqui, a importância de se analisar a possibilidade de as hexosaminas serem utilizadas como metabólito oxidável pelos epimastigotas no inseto vetor.

5.3 Uso de GlcNAc por epimastigotas

O GlcNAc é uma hexosamina acetilada presente em todos os clados biológicos sendo constituinte de polímeros estruturais como a quitina, em paredes celulares fúngicas, no exoesqueleto de artrópodes e crustáceos e no peptideoglicano de bactérias. Além disso, sabe-se que GlcNAc é componente essencial de glicoconjugados celulares de diversos organismos (Breidenbach *et al.*, 2010; Messner, Schäffer e Kosma, 2013; Zachara, Akimoto e Hart, 2015). O intestino dos os triatomíneos apresentam uma membrana denominada PMM (Perimicrovillar Membrane / Membrana perimicrovilar) composta de glicoconjugados que apresentam como componentes carboidratos, incluindo GlcNAc.

Em um trabalho de 2013 Antunes e col. relataram a presença de GlcNAc livre em fluidos excretados das três principais espécies de triatomíneos transmissores da doença de Chagas, indicando a possibilidade desse metabólito estar disponível no intestino dos barbeiros. O mesmo não ocorreu com GlcN, Glc e outras hexoses (Antunes *et al.*, 2013). Além disso, apesar de não ter sido relatada previamente como componente da PMM, Alvarenga e col. em 2016 concluíram, por diferentes técnicas, que o intestino médio de *R. prolixus* possui quitina em sua composição (Quitina é polímero de GlcNAc e componente essencial de matrizes peritróficas (PM) de diversos outros insetos). Este foi o primeiro relato da presença de quitina no intestino de um integrante do clado Hemiptera, os quais possuem PMM ao invés de PM (Alvarenga *et al.*, 2016).

É importante ressaltar que não existem comprovações experimentais de atividade quitinase em extratos de *T. cruzi* e não existem sequências putativas para quitinase anotadas no genoma desse organismo. Deste modo o parasita não degradaria ativamente a quitina presente no intestino do barbeiro. Com isso, para a obtenção e degradação de GlcNAc, as formas Epi dependeriam da ação de quitinases do próprio barbeiro ou da ação da microbiota do triatomíneo.

Gumiel e col. em 2015 avaliaram a composição da microbiota dos triatomíneos *T. pseudomaculata* e *T. brasiliensis*, revelando que esta é composta por poucas espécies de bactérias, dentre elas *Serratia marcescens* (Gumiel *et al.*, 2015). A bactéria *S. marcescens*, é muitas vezes referida como uma das mais eficientes bactérias degradadoras de quitina, sendo que a expressão de suas enzimas quitinolíticas é induzida pela presença extracelular do substrato (Fuchs, McPherson e Drahos, 1986). Diversos grupos também relataram que essa bactéria exporta quitinases para o meio extracelular, sugerindo fortemente que a fonte de GlcNAc livre detectado nos ensaios de metaboloma de Antunes e colaboradores em 2016 acerca dos fluidos excretados seria derivado da degradação da quitina do intestino médio.

É interessante ressaltar que as formas epimastigotas, que colonizam o intestino médio dos vetores, apresentam uma alta taxa glicolítica e que os níveis de respiração de rotina estimulado por Glc ou hexosaminas são maiores em Epis que em Tripos, cujo ambiente que habitam é rico em Glc (Anexo 2).

Neste trabalho demonstramos que a capacidade de transporte de GlcNAc e GlcN é maior nas formas epimastigotas e que essas hexosaminas conseguem manter a viabilidade e proliferação celulares além de estimular a síntese de ATP via fosforilação oxidativa. Associando os dados da literatura aos obtidos nesse trabalho propomos que as hexosaminas, em especial GlcNAc, seriam fontes de carbono oxidáveis para a forma epimastigota nos

ambientes do inseto vetor. Ademais, por GlcNAc conseguir manter a metaciclologênese *in vitro* e por estar presente nos fluidos excretados dos barbeiros, propomos que também seria um metabólito envolvido na diferenciação do parasita no inseto.

6.1 Via de biossíntese de hexosaminas

- *T. cruzi* possui uma via de biossíntese de hexosaminas ativa, ao menos em seus dois primeiros passos enzimáticos (GF6PA e GNA).
- As atividades de GF6PA e GNA estão elevadas nas formas infectivas, tripomastigota e metacíclica, em comparação com a atividade em formas epimastigotas.
- Análogos de glutamina são capazes de inibir a atividade de TcGF6PA recombinante.
- G3S, análogo de GlcN-6-P, foi capaz de inibir a atividade de TcGNA recombinante.
- GAGMH e FDI inibem a proliferação de formas epimastigotas.
- GAGMH e FDI afetam o ciclo intracelular.

6.2 Hexosaminólise

- As hexosaminas são transportadas pelo mesmo sistema de transporte que a Glc
- Esse sistema de transporte possui mais afinidade por GlcNAc que por Glc ou GlcN.
- Existe atividade de GlcN quinase e GlcNAc quinase em extratos de formas epimastigotas.
- As hexosaminas são metabólitos oxidáveis por formas epimastigotas, uma vez que:
 - 1) Favorecem a viabilidade celular, mesmo quando como única fonte de nutriente, até longos períodos de estresse nutricional;
 - 2) Fornecem substratos ao TCA, estimulando a produção de CO₂;
 - 3) São capazes de manter o potencial de membrana mitocondrial;
 - 4) Estimulam a ETS e seu acoplamento a OxPHOS;
 - 5) Incrementam os níveis intracelulares de ATP.
 - 6) Hexosaminas induzem metaciclogênese *in vitro*.

ABAD-FRANCH, F. *et al.* Certifying the interruption of Chagas disease transmission by native vectors: Cui bono? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 2, p. 251–254, 2013.

ABDUL-GHANI, M. A.; DEFRONZO, R. A. Plasma Glucose Concentration and Prediction of Future Risk of Type 2 Diabetes. **Diabetes Care**, v. 32, n. suppl_2, p. S194–S198, 1 nov. 2009.

ACOSTA, H. *et al.* Pyruvate phosphate dikinase and pyrophosphate metabolism in the glycosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, v. 138, n. 4, p. 347–56, ago. 2004.

ADROHER, F. J.; OSUNA, A.; LUPIÁÑEZ, J. A. Fructose 1,6-bisphosphatase activity in two *Trypanosoma cruzi* morphological forms. **The Journal of parasitology**, v. 73, n. 2, p. 438–41, abr. 1987.

_____. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 94, n. 1, p. 71–82, 18 abr. 1990.

AGUILAR, Z.; URBINA, J. A. The phosphofructokinase of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*: purification and kinetic mechanism. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 21, n. 2, p. 103–11, nov. 1986.

ALMEIDA-DE-FARIA, M. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. **Exp Parasitol**, v. 92, n. 4, p. 263–274, ago. 1999.

ALVARENGA, E. S. L. *et al.* Chitin is a component of the *Rhodnius prolixus* midgut. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 69, p. 61–70, 2016.

ALVES, C. R. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Attachment to perimicrovillar membrane glycoproteins of *Rhodnius prolixus*. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 1, p. 44–52, 2007.

ANDRADE, S. G.; MAGALHAES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 4, p. 721–726, 1985.

ANDREWS, N. W. *et al.* A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. **Cell**, v. 61, n. 7, p. 1277–1287, 1990.

ANDREWS, N. W.; WHITLOW, M. B. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. **Mol Biochem Parasitol**, v. 33, n. 3, p. 249–256, 1989.

ANTUNES, L. C. M. *et al.* Metabolic signatures of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by metabolomics. **PloS one**, v. 8, n. 10, p. e77283, 2013.

AVILA, J. L. *et al.* Acid and neutral hydrolases in *Trypanosoma cruzi*. Characterization and assay. **The Journal of protozoology**, v. 26, n. 2, p. 304–11, maio 1979.

- BADET, B. *et al.* Glucosamine synthetase from *Escherichia coli*: purification, properties, and glutamine-utilizing site location. **Biochemistry**, v. 26, n. 7, p. 1940–8, 7 abr. 1987.
- BAKKER, B. M. *et al.* Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, n. 5, p. 2087–92, 29 fev. 2000.
- BANDINI, G. *et al.* Phosphoglucomutase is absent in *Trypanosoma brucei* and redundantly substituted by phosphomannomutase and phospho-N-acetylglucosamine mutase. **Molecular Microbiology**, v. 85, n. 3, p. 513–534, 2012.
- BAPTISTA, C. G. *et al.* Identification of a Golgi-localized UDP-N-acetylglucosamine transporter in *Trypanosoma cruzi*. **BMC Microbiol**, v. 15, n. 1, p. 269, 2015.
- BARACCA, A. *et al.* Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential: Evaluation of proton flux through F₀during ATP synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics**, v. 1606, n. 1–3, p. 137–146, 2003.
- BARANOVA, E. A.; HOLT, P. J.; SAZANOV, L. A. Projection structure of the membrane domain of *Escherichia coli* respiratory complex I at 8 Å resolution. **Journal of molecular biology**, v. 366, n. 1, p. 140–54, 9 fev. 2007.
- BARISÓN, M. J. *et al.* The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 48, n. 4, p. 437–49, 2016.
- BASTIN, P.; SHERWIN, T.; GULL, K. Paraflagellar rod is vital for trypanosome motility [7]. **Nature**, v. 391, n. 6667, p. 548, 1998.
- BEATTIE, D. S.; HOWTON, M. M. The presence of rotenone-sensitive NADH dehydrogenase in the long slender bloodstream and the procyclic forms of *Trypanosoma brucei* brucei. **European journal of biochemistry**, v. 241, n. 3, p. 888–94, 1 nov. 1996.
- BERRIDGE, M. V; TAN, A. S. Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 303, n. 2, p. 474–82, jun. 1993.
- BERTANI, G. Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293–300, set. 1951.
- BIENEN, E. J. *et al.* Non-cytochrome mediated mitochondrial ATP production in bloodstream form *Trypanosoma brucei* brucei. **European journal of biochemistry**, v. 216, n. 1, p. 75–80, 15 ago. 1993.
- BOLES, E. *et al.* A family of hexosephosphate mutases in *Saccharomyces cerevisiae*. **Eur J Biochem**, v. 220, n. 1, p. 83–96, 1994.
- BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal. Biochem.**, v. 72, p.

248–254, 1976.

BRAND, T. VON; JOHNSON, E. M.; REES, C. W. Observations on the respiration of *Trypanosoma cruzi* in culture. **The Journal of general physiology**, v. 30, n. 2, p. 163–75, 20 nov. 1946.

BRAND, T. VON; TOBIE, E. J. Physiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of infectious diseases**, v. 85, n. 1, p. 5–16, 1949.

BREIDENBACH, M. A. *et al.* Targeted metabolic labeling of yeast N-glycans with unnatural sugars. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 9, p. 3988–3993, 2 mar. 2010.

BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldeído-semi-carbazona (nitrofurazina) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, n. 3, p. 43–49, 1961.

_____. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual review of microbiology**, v. 27, p. 347–82, 1973.
BRENER, Z.; CHIARI, E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. **J Parasitol**, v. 51, n. 6, p. 922–926, 1965.

BRINGAUD, F.; BALTZ, D.; BALTZ, T. Functional and molecular characterization of a glycosomal PPI-dependent enzyme in trypanosomatids: pyruvate, phosphate dikinase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 14, p. 7963–8, 7 jul. 1998.

BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1–9, set. 2006.

BURLEIGH, B. A. Host Cell Signaling and *Trypanosoma cruzi* Invasion: Do All Roads Lead to Lysosomes? **Sci STKE**, v. 2005, n. 293, p. pe36-pe36, 19 jul. 2005.

BUSCAGLIA, C. A. *et al.* *Trypanosoma cruzi* surface mucins: host-dependent coat diversity. **Nature Reviews Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 229–236, 1 mar. 2006.

CÁCERES, A. J. *et al.* Molecular and biochemical characterization of hexokinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 251–262, 2003.

_____. Molecular and biochemical characterization of novel glucokinases from *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 156, n. 2, p. 235–245, 2007.

CACHON, J. *et al.* The paraflagellar rod - a structure in search of a function. **Biology of the Cell**, v. 63, p. 169–181, 1988.

CALCAGNO, M. *et al.* L-glutamine D-fructose-6-phosphate amidotransferase of chick cartilage. Evidence for a random mechanism. **Enzymologia**, v. 41, n. 3, p. 174–182, 1971.

CAMARASA, C.; FAUCET, V.; DEQUIN, S. Role in anaerobiosis of the isoenzymes for *Saccharomyces cerevisiae* fumarate reductase encoded by OSM1 and FRDS1. **Yeast (Chichester, England)**, v. 24, n. 5, p. 391–401, maio 2007.

CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. i. origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 6, p. 93–100, 1964.

CANÇADO, J. R.; CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of chagas disease with benznidazole. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.

CANNATA, J. J. *et al.* Two forms of “malic” enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical journal**, v. 184, n. 2, p. 409–19, 15 nov. 1979.

CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology -- Part B: Biochemistry and**, v. 79, n. 3, p. 297–308, 1984.

CARNEIRO, V. T.; CALDAS, R. A. Regulatory studies of L-glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Comparative biochemistry and physiology. B, Comparative biochemistry**, v. 75, n. 1, p. 61–4, 1983.

CARRANZA, J. C. *et al.* Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 41, n. 3, p. 299–308, jun. 2009.

CASTRO, J. A.; MECCA, M. M. DE; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas’ disease (American trypanosomiasis). **Hum Exp Toxicol**, v. 25, n. 8, p. 471–479, 2006.

CAVALIER-SMITH, T. Higher classification and phylogeny of Euglenozoa. **European Journal of Protistology**, v. 56, p. 250–276, 2016.

CAZZULO, J. J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. **FASEB J**, v. 6, n. 13, p. 3153–3161, 1992.

_____. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of bioenergetics and biomembranes**, v. 26, n. 2, p. 157–65, abr. 1994.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CHANG, S. L.; NEGHERBON, W. O. Studies on hemoflagellates; the specificity of serological reactions of *Leishmania donovani*, *L. brasiliensis*, *L. tropica*, and *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of infectious diseases**, v. 81, n. 3, p. 209–27, 1947.

CHMARA, H. Inhibition of glucosamine synthase by bacilysin and anticapsin. **Journal of general microbiology**, v. 131, n. 2, p. 265–71, 1985.

CHMARA, H.; ANDRUSZKIEWICZ, R.; BOROWSKI, E. Inactivation of glucosamine-6-phosphate synthetase from *Salmonella typhimurium* LT 2 SL 1027 by N β -fumarylcarboxyamido-L-2,3-diaminopropionic acid. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 120, n. 3, p. 865–872, 1984.

CHMARA, H.; ZAHNER, H. The inactivation of glucosamine synthetase from bacteria by anticapsin, the C-terminal epoxyamino acid of the antibiotic tetaïne. **Biochim Biophys Acta**, v. 787, n. 1, p. 45–52, 1984.

CONCEPCION, J. *et al.* A α -glycerophosphate dehydrogenase is present in *Trypanosoma cruzi* glycosomes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 5, p. 697–701, jul. 2001.

CONTRERAS, V. T. *et al.* In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 16, n. 3, p. 315–27, set. 1985.

COSTA, B. P. *et al.* Glutaminemia prognostic significance in critical surgical patients - An analysis of plasma aminogram profile. **Nutricion hospitalaria**, v. 34, n. 4, p. 799–807, 28 jul. 2017.

COURA, J. R. Chagas disease: control, elimination and eradication. Is it possible? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, 2013.

COUSTOU, V. *et al.* Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. **The Journal of biological chemistry**, v. 283, n. 24, p. 16342–54, 13 jun. 2008.

CRISPIM, M. *et al.* The glutamine synthetase of *Trypanosoma cruzi* is required for its resistance to ammonium accumulation and evasion of the parasitophorous vacuole during host-cell infection. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 12, n. 1, p. e0006170, 10 jan. 2018.

DAMASCENO, F. S. *et al.* 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**, v. 8, n. 2, p. e2717, fev. 2014.
_____. **Papel da glutamina na biologia do *Trypanosoma cruzi* e *Trypanosoma brucei***, 2017. Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-05022018-094715/pt-br.php>>

DANTAS, A. P.; BARBOSA, H. S.; CASTRO, S. L. DE. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against *Trypanosoma cruzi*. **J Submicrosc Cytol Pathol**, v. 35, n. 3, p. 287–294, 2003.

DERAMCHIA, K. *et al.* Contribution of pyruvate phosphate dikinase in the maintenance of the glycosomal ATP/ADP balance in the *Trypanosoma brucei* procyclic form. **The Journal of biological chemistry**, v. 289, n. 25, p. 17365–78, 20 jun. 2014.

DIAS, L. C. *et al.* Chemotherapy of Chagas' disease: state of the art and perspectives for the development of new drugs. **Quím. Nova**, v. 32, 2009.

DIEGO, J. R. *et al.* La interacción hospedero-parásito. Una visión evolutiva. **Revista de Salud Animal**, v. 36, n. 1, p. 1–6, 2014.

DOCAMPO, R. *et al.* Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature reviews. Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 251–61, mar. 2005.

DOCAMPO, R.; ULRICH, P.; MORENO, S. N. J. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 365, n. 1541, p. 775–784, 2010.

DUSCHAK, V. G.; CAZZULO, J. J. Subcellular localization of glutamate dehydrogenases and alanine aminotransferase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **FEMS microbiology letters**, v. 67, n. 2, p. 131–5, 1 out. 1991.

EBIKEME, C. E. *et al.* N-acetyl D-glucosamine stimulates growth in procyclic forms of *Trypanosoma brucei* by inducing a metabolic shift. **Parasitology**, v. 135, n. 5, p. 585–594, 2008.

EL-SAYED, N. M. *et al.* The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of Chagas disease. **Science**, v. 309, n. 5733, p. 409–415, 2005.

FERNANDEZ-SORENSEN, A.; CARLSON, D. M. Purification and properties of phosphoacetylglucosamine mutase. **J Biol Chem**, v. 246, n. 11, p. 3485–3493, 1971.

FIGUEIREDO, R. C.; ROSA, D. S.; SOARES, M. J. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. **The Journal of parasitology**, v. 86, n. 6, p. 1213–1218, dez. 2000.

FITARELLI, D. B.; HORN, J. F. Descarte de bolsas de sangue devido à reatividade para doença de Chagas em um laboratório de triagem sorológica de doadores em Porto Alegre-RS. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 31, n. 5, p. 310–314, 2009.

FUCHS, R. L.; MCPHERSON, S. A.; DRAHOS, D. J. Cloning of a *Serratia marcescens* Gene Encoding Chitinase. **Applied and environmental microbiology**, v. 51, n. 3, p. 504–9, mar. 1986.

GAO, G. *et al.* Novel organization and sequences of five genes encoding all six enzymes for de novo pyrimidine biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. **Journal of molecular biology**, v. 285, n. 1, p. 149–61, 8 jan. 1999.

GARCIA, E. S. *et al.* Induction of *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in the gut of the hematophagous insect vector, *Rhodnius prolixus*, by hemoglobin and peptides carrying alpha D-globin sequences. **Experimental parasitology**, v. 81, n. 3, p. 255–61, nov. 1995.

GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. **Parasitol Today**, v. 7, n. 9, p. 240–244, 1991.

GIRARD, R. M. B. M. *et al.* An Aromatic Diamidine That Targets Kinetoplast DNA, Impairs the Cell Cycle in *Trypanosoma cruzi*, and Diminishes Trypomastigote Release from Infected

Mammalian Host Cells. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 60, n. 10, p. 5867–77, 2016.

GONZÁLEZ-PINZÓN, R.; HAGGERTY, R.; MYROLD, D. D. Measuring aerobic respiration in stream ecosystems using the resazurin-resorufin system. **Journal of Geophysical Research: Biogeosciences**, v. 117, n. G3, p. n/a-n/a, set. 2012.

GONZALEZ, M. S. *et al.* Role of the head in the ultrastructural midgut organization in *Rhodnius prolixus* larvae: Evidence from head transplantation experiments and ecdysone therapy. **Journal of Insect Physiology**, v. 44, n. 7–8, p. 553–560, 1998.

GONZALEZ, M. S. *et al.* Influence of brain and azadirachtin on *Trypanosoma cruzi* development in the vector, *Rhodnius prolixus*. **Exp Parasitol**, v. 92, n. 2, p. 100–108, 1999.

GRUNBERG, E. *et al.* Antiprotozoan and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. **Antimicrob Agents Chemother (Bethesda)**, v. 7, p. 513–519, 1967.

GUALDRON-LÓPEZ, M. *et al.* Channel-Forming Activities in the Glycosomal Fraction from the Bloodstream Form of *Trypanosoma brucei*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. e34530, 10 abr. 2012.

GUARNERI, A. A.; LORENZO, M. G. Triatomine physiology in the context of trypanosome infection. **Journal of insect physiology**, v. 97, p. 66–76, 2017.

GUMIEL, M. *et al.* Characterization of the microbiota in the guts of *Triatoma brasiliensis* and *Triatoma pseudomaculata* infected by *Trypanosoma cruzi* in natural conditions using culture independent methods. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 245, 24 dez. 2015.

HAANSTRA, J. R. *et al.* Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1863, n. 5, p. 1038–48, maio 2016.

HALL, B. F. *et al.* Desialylation of lysosomal membrane glycoproteins by *Trypanosoma cruzi*: a role for the surface neuraminidase in facilitating parasite entry into the host cell cytoplasm. **J Exp Med**, v. 176, n. 2, p. 313–25, 1 ago. 1992.

HARDIN, J.; BERTONI, G.; KLEINSMITH, L. J. **Becker's World of the Cell**. 9th. ed. New York: Pearson, 2015.

HEISE, N.; OPPERDOES, F. R. The dihydroxyacetonephosphate pathway for biosynthesis of ether lipids in *Leishmania mexicana* promastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 89, n. 1, p. 61–72, out. 1997.

HERNANDEZ, F. R.; TURRENS, J. F. Rotenone at high concentrations inhibits NADH-fumarate reductase and the mitochondrial respiratory chain of *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 93, n. 1, p. 135–7, 15 maio 1998.

HEYNEMAN, D. Biochemistry and Physiology of Endoparasites. Theodor von Brand. **The Quarterly Review of Biology**, v. 55, n. 2, p. 214–215, jun. 1980.

HIRST, J. Energy transduction by respiratory complex I--an evaluation of current knowledge. **Biochemical Society transactions**, v. 33, n. Pt 3, p. 525–9, jun. 2005.

HOFMANN, M.; BOLES, E.; ZIMMERMANN, F. K. Characterization of the essential yeast gene encoding N-acetylglucosamine-phosphate mutase. **Eur J Biochem**, v. 221, n. 2, p. 741–747, 1994.

HUGHES, L. C. *et al.* Three-dimensional structure of the Trypanosome flagellum suggests that the paraflagellar rod functions as a biomechanical spring. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. e25700, 2012.

HUYNH, Q. K.; GULVE, E. A.; DIAN, T. Purification and characterization of glutamine:fructose 6-phosphate amidotransferase from rat liver. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 379, n. 2, p. 307–13, 15 jul. 2000.

IKEDA, Y.; TSUIKI, S. Occurrence and properties of a natural activator of L-glutamine: D-fructose 6-phosphate amidotransferase. **Sci Rep Res Inst Tohoku Univ Med**, v. 19, n. 2, p. 53–63, 1972.

JASTROCH, M. *et al.* Mitochondrial proton and electron leaks. **Essays Biochem**, v. 47, p. 53–67, 2010.

KATO, N. *et al.* Mosquito glucosamine-6-phosphate N-acetyltransferase: cDNA, gene structure and enzyme kinetics. **Insect Biochem Mol Biol**, v. 35, n. 6, p. 637–646, 2005.

KLEFFMANN, T.; SCHMIDT, J.; SCHAUB, G. A. Attachment of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes to hydrophobic substrates and use of this property to separate stages and promote metacyclogenesis. **Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 5, p. 548–555, 1998.

KOELLER, C. M. *et al.* Golgi UDP-GlcNAc:Polypeptide O-??-N-Acetyl-D-Glucosaminyltransferase 2 (TcOGNT2) regulates trypomastigote production and function in *Trypanosoma cruzi*. **Eukaryotic Cell**, v. 13, n. 10, p. 1312–1327, 2014.

KOLLIEN, A. H.; SCHAUB, G. A. The Development of *Trypanosoma cruzi* (Trypanosomatidae) in the Reduviid Bug *Triatoma infestans* (Insecta): Influence of Starvation. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 59–63, jan. 1998.

KRIBS-ZALETA, C. Estimating contact process saturation in sylvatic transmission of *Trypanosoma cruzi* in the United States. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 4, p. e656, 2010.

KULLE, B. H. TER. Glucose and proline transport in kinetoplastids. **Parasitology Today**, v. 9, n. 6, p. 206–210, 1993.

LENAZ, G. *et al.* Mitochondrial Complex I: structural and functional aspects. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1757, n. 9–10, p. 1406–20, 2006.

LEY, V. *et al.* The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. **J. Exp. MED**, v. 171, n. February, p. 401–413, 1990.

- LUKES, J. *et al.* Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. **Eukaryot Cell**, v. 1, n. 4, p. 495–502, 2002.
- MAGDALENO, A. *et al.* Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. **PLoS One**, v. 4, n. 2, p. e4534, 2009.
- MANCHOLA, N. C. *et al.* Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 63, n. 3, p. 299–308, maio 2016.
- MANCHOLA, N. C.; SILBER, A. M.; NOWICKI, C. The Non-Canonical Substrates of *Trypanosoma cruzi* Tyrosine and Aspartate Aminotransferases: Branched-Chain Amino Acids. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 65, n. 1, p. 70–76, jan. 2018.
- MANTILLA, B. S. *et al.* Role of $\Delta 1$ -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of biological chemistry**, v. 290, n. 12, p. 7767–90, 20 mar. 2015.
- MARINO, K. *et al.* Characterization, localization, essentiality, and high-resolution crystal structure of glucosamine 6-phosphate N-acetyltransferase from *Trypanosoma brucei*. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 7, p. 985–997, 2011.
- MARTINS, R. M. *et al.* Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infect Immun**, v. 77, n. 7, p. 3023–3032, 2009.
- MATHERS, C. D.; LOPEZ, A. D.; MURRAY, C. J. L. Chapter 3: The Burden of Disease and Mortality by Condition : Data , Methods , and Results for 2001. **Global Burden of Disease and Risk Factors**, v. 2003, p. 45–93, 2006.
- MAUGERI, D. A.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J.-J. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Essays In Biochemistry**, v. 51, p. 15–30, 2011.
- MCKNIGHT, G. L. *et al.* Molecular cloning, cDNA sequence, and bacterial expression of human glutamine:fructose-6-phosphate amidotransferase. **J Biol Chem**, v. 267, n. 35, p. 25208–25212, 1992.
- MESSNER, P.; SCHÄFFER, C.; KOSMA, P. Bacterial cell-envelope glycoconjugates. **Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry**, v. 69, p. 209–272, 2013.
- MILEWSKI, S.; GABRIEL, I.; OLCHOWY, J. Enzymes of UDP-GlcNAc biosynthesis in yeast. **Yeast**, v. 23, n. 1, p. 1–14, 2006.
- MISSET, O.; BOS, O. J.; OPPERDOES, F. R. Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. **European journal of biochemistry**, v. 157, n. 2, p. 441–53, 2 jun. 1986.
- MONCAYO, A.; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, p. 17–30, jul. 2009.

- MONCAYO; SILVEIRA, A. C. Current epidemiological trends of Chagas disease in Latin America and future challenges: Epidemiology, surveillance, and health policies. **American Trypanosomiasis Chagas Disease: One Hundred Years of Research: Second Edition**, v. 104, n. May, p. 59–88, 2017.
- MONTI, P. *et al.* Tumor-derived MUC1 mucins interact with differentiating monocytes and induce IL-10^{high}IL-12^{low} regulatory dendritic cell. **J Immunol**, v. 172, n. 12, p. 7341–7349, 2004.
- MORAES-SOUZA, H. Chagas infection transmission control: situation of transfusional transmission in Brazil and other countries of Latin America. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 419–423, 1999.
- MORAES-SOUZA, H.; FERREIRA-SILVA, M. M. O controle da transmissão transfusional. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. suppl 2, p. 64–67, 2011.
- MORALES, J. *et al.* Novel mitochondrial complex II isolated from *Trypanosoma cruzi* is composed of 12 peptides including a heterodimeric Ip subunit. **The Journal of biological chemistry**, v. 284, n. 11, p. 7255–63, 13 mar. 2009.
- MORTARA, R. A. Studies on trypanosomatid actin. I. Immunochemical and biochemical identification. **The Journal of protozoology**, v. 36, n. 1, p. 8–13, 1989.
- MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, 16 dez. 1983.
- MUELAS-SERRANO, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology research**, v. 86, n. 12, p. 999–1002, dez. 2000.
- MUSGROVE, P. Investing in health: the 1993 World Development Report of the World Bank. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 27, n. 3, p. 284–286, 1993.
- NADERER, T.; WEE, E.; MCCONVILLE, M. J. Role of hexosamine biosynthesis in *Leishmania* growth and virulence. **Molecular microbiology**, v. 69, n. 4, p. 858–69, ago. 2008.
- NAKATA, D. *et al.* Molecular cloning of a unique CMP-sialic acid synthetase that effectively utilizes both deaminoneuraminic acid (KDN) and N-acetylneuraminic acid (Neu5Ac) as substrates. **Glycobiology**, v. 11, n. 8, p. 685–692, 2001.
- NISHITANI, Y. *et al.* Crystal structures of N-acetylglucosamine-phosphate mutase, a member of the alpha-D-phosphohexomutase superfamily, and its substrate and product complexes. **J Biol Chem**, v. 281, n. 28, p. 19740–19747, 2006.
- NOGUEIRA, N. F. S. *et al.* *Trypanosoma cruzi*: Involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 2, p. 120–128, jun. 2007.

NOWICKI, C. *et al.* Recombinant tyrosine aminotransferase from *Trypanosoma cruzi*: structural characterization and site directed mutagenesis of a broad substrate specificity enzyme. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1546, n. 2, p. 268–81, 7 abr. 2001.

OPPERDOES, F. R. *et al.* Purification, morphometric analysis, and characterization of the glycosomes (microbodies) of the protozoan hemoflagellate *Trypanosoma brucei*. **The Journal of cell biology**, v. 98, n. 4, p. 1178–84, abr. 1984.

OPPERDOES, F. R. Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. **Annual review of microbiology**, v. 41, p. 127–51, 1987.

OPPERDOES, F. R. Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. **Biochem Soc Symp**, v. 53, p. 123–129, 1987.

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

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

OSAKI, T. *et al.* Metabolomic analysis of blood plasma after oral administration of N-acetyl-D-glucosamine in dogs. **Marine Drugs**, v. 13, n. 8, p. 5007–5015, 2015.

PACKCHANIAN, A. Chemotherapy of experimental Chagas' disease with nitrofurans compounds. **Antibiot Chemother (Northfield)**, v. 7, n. 1, p. 13–23, 1957.

PAES, L. S. *et al.* The uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* mitochondrion: opportunities to identify new drug target for the treatment of Chagas disease. **Current pharmaceutical design**, v. 17, n. 20, p. 2074–99, 2011.

_____. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **PloS one**, v. 8, n. 7, p. e69419, 2013.

PARSONS, M.; NIELSEN, B. Active transport of 2-deoxy-d-glucose in *Trypanosoma brucei* procyclic forms. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 42, n. 2, p. 197–203, 1990.

PEACOCK, L. *et al.* Multiple effects of the lectin-inhibitory sugars D-glucosamine and N-acetyl-glucosamine on tsetse-trypanosome interactions. **Parasitology**, v. 132, n. 5, p. 651–658, 2006.

PENEFF, C.; MENGIN-LECREULX, D.; BOURNE, Y. The crystal structures of Apo and complexed *Saccharomyces cerevisiae* GNA1 shed light on the catalytic mechanism of an amino-sugar N-acetyltransferase. **J Biol Chem**, v. 276, n. 19, p. 16328–16334, 2001.

PEREZ-MOLINA, J. A. *et al.* Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2017.

PERSIANI, S. *et al.* Synovial and plasma glucosamine concentrations in osteoarthritic patients following oral crystalline glucosamine sulphate at therapeutic dose. **Osteoarthritis and cartilage**, v. 15, n. 7, p. 764–72, jul. 2007.

PORTO-CARREIRO, I. *et al.* *Trypanosoma cruzi* epimastigote endocytic pathway: cargo enters the cytostome and passes through an early endosomal network before storage in reservosomes. **European journal of cell biology**, v. 79, n. 11, p. 858–69, nov. 2000.

PREVIATO, J. O. *et al.* O-glycosidically linked N-acetylglucosamine-bound oligosaccharides from glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. **The Biochemical journal**, v. 301 (Pt 1, p. 151–9, 1 jul. 1994.

RACAGNI, G. E.; MACHADO DE DOMENECH, E. E. Characterization of *Trypanosoma cruzi* hexokinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 9, n. 2, p. 181–188, 1983.

RASSI, A. *et al.* American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infect Dis Clin North Am**, v. 26, n. 2, p. 275–291, 2012.

RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 2010.

RODRIGUES COURA, J. *et al.* A critical review on chagas disease chemotherapy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3–24, 2002.

ROPER, J. R.; FERGUSON, M. A. Cloning and characterisation of the UDP-glucose 4'-epimerase of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 132, n. 1, p. 47–53, 2003.

SACHADYN, P. *et al.* Purification to homogeneity of *Candida albicans* glucosamine-6-phosphate synthase overexpressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 19, n. 3, p. 343–349, 2000.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 74, n. 12, p. 5463–7, dez. 1977.

SANTRICH, C. *et al.* A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. **Mol Biochem Parasitol**, v. 90, n. 1, p. 95–109, 1997.

SCHAUB, G. A. *et al.* Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to the rectal cuticle of *Triatoma infestans* and its influence on metacyclogenesis - A review. **Tokai Journal of Experimental and Clinical Medicine**, v. 23, n. 6, p. 321–327, 1998.

SCHAUB, G. A.; BÖKER, C. A. Scanning Electron Microscopic Studies of *Blastocrithidia triatoma* (*Trypanosomatidae*) in the Rectum of *Triatoma infestans* (Reduviidae) 1 2. **The Journal of Protozoology**, v. 33, n. 2, p. 266–270, maio 1986.

SCHAUB, G. A.; LÖSCH, P. Parasite/host-interrelationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatoma* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 83, n. 3, p. 215–23, jun. 1989.

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

SCHMIDT, J.; KLEFFMANN, T.; SCHAUB, G. A. Hydrophobic attachment of *Trypanosoma cruzi* to a superficial layer of the rectal cuticle in the bug *Triatoma infestans*. **Parasitol Res**, v. 84, n. 7, p. 527–536, 1998.

SHAH-SIMPSON, S. *et al.* Modulation of host central carbon metabolism and in situ glucose uptake by intracellular *Trypanosoma cruzi* amastigotes. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 11, p. e1006747, nov. 2017.

SILBER, A. M. *et al.* Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of eukaryotic microbiology**, v. 49, n. 6, p. 441–6, 2002.

SILBER, A. M. *et al.* Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. **Curr Drug Targets Infect Disord**, v. 5, n. 1, p. 53–64, 2005.

SILBER, A. M. *et al.* Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 168, n. 1, p. 102–108, 2009.

SILVEIRA, A. C.; PIMENTA JR., F. [Institutional insertion of Chagas' disease control]. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44 Suppl 2, p. 19–24, 2011.

SOARES, M. J. *et al.* A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 75, n. 7, p. 522–7, 1989.

_____. The reservosome of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: an organelle of the endocytic pathway with a role on metacyclogenesis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, p. 139–41, 1999.

SOARES, M. J.; SOUTO-PADRÓN, T.; SOUZA, W. DE. Identification of a large pre-lysosomal compartment in the pathogenic protozoon *Trypanosoma cruzi*. **Journal of cell science**, v. 102 (Pt 1, p. 157–67, maio 1992.

SOARES, M. J.; SOUZA, W. DE. Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 20, n. 2, p. 349–61, abr. 1988.

SOARES, M. J.; SOUZA, W. DE. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology research**, v. 77, n. 6, p. 461–8, 1991.

SOUTO-PADRÓN, T.; SOUZA, W. DE; HEUSER, J. E. Quick-freeze, deep-etch rotary replication of *Trypanosoma cruzi* and *Herpetomonas megaseliae*. **Journal of cell science**, v. 69, p. 167–78, jul. 1984.

SOUZA, W. DE *et al.* *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. **Experimental parasitology**, v. 45, n. 1, p. 101–15, jun. 1978.

_____. Two special organelles found in *Trypanosoma cruzi*. **Anais da Academia Brasileira de Ciencias**, v. 72, n. 3, p. 421–32, set. 2000.

SOUZA, W. DE. Special organelles of some pathogenic protozoa. **Parasitol Res**, v. 88, n. 12, p. 1013–1025, 2002a.

SOUZA, W. DE. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 269–85, 2002b.

SOUZA, W. DE. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. **Kinetoplastid biology and disease**, v. 1, n. 1, p. 3, 31 maio 2002c.

SOUZA, W. DE. Electron microscopy of trypanosomes: a historical view. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 4, p. 313–325, jun. 2008.

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

SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. **Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* and its Interaction with host Cells**. First Edit ed. [s.l.] Elsevier Inc., 2010.

SOUZA, W. DE; CARVALHO, T. M. U. DE; BARRIAS, E. S. Review on *Trypanosoma cruzi*: Host cell interaction. **Int J Cell Biol**, v. 2010, 2010.

SPIRO, R. G. Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. **Glycobiology**, v. 12, n. 4, p. 43R–56R, 2002.

STOPPANI, A. O.; BOISO, J. F. DE. Oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 29, n. 12, p. 1494–6, dez. 1973.

STREIGER, M. L. *et al.* Estudo longitudinal e quimioterapia específica em crianças, com doença de Chagas crônica, residentes em área de baixa endemicidade da República Argentina. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 5, p. 365–375, 2004.

TAYLOR, M. B. *et al.* Subcellular localization of some glycolytic enzymes in parasitic flagellated protozoa. **International Journal of Biochemistry**, v. 11, n. 2, p. 117–120, 1980.

TAYLOR, M. B.; GUTTERIDGE, W. E. *Trypanosoma cruzi*: subcellular distribution of glycolytic and some related enzymes of epimastigotes. **Experimental parasitology**, v. 63, n. 1, p. 84–97, fev. 1987.

TEIXEIRA, M. M.; YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 18, n. 3, p. 271–82, mar. 1986.

TEPLYAKOV, A. *et al.* Channeling of ammonia in glucosamine-6-phosphate synthase. **Journal of Molecular Biology**, v. 313, n. 5, p. 1093–1102, 2001.

_____. From Lobry de Bruyn to enzyme-catalyzed ammonia channelling: molecular studies of D-glucosamine-6P synthase. **Natural product reports**, v. 19, n. 1, p. 60–69, 2002.

TETAUD, E. *et al.* Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 17,

p. 8278–8282, 1994.

TETAUD, E. *et al.* Hexose uptake in *Trypanosoma cruzi*: structure-activity relationship between substrate and transporter. **The Biochemical journal**, v. 317 (Pt 2, n. 1996, p. 353–9, 1996.

TIELENS, A. G. .; HELLEMOND, J. . VAN. Differences in Energy Metabolism Between Trypanosomatidae. **Parasitology Today**, v. 14, n. 7, p. 265–272, jul. 1998.

TODESCHINI, A. R. *et al.* α -N-acetylglucosamine-linked O-glycans of sialoglycoproteins (Tc-mucins) from *Trypanosoma cruzi* Colombiana strain. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. suppl 1, p. 270–274, jul. 2009.

TONELLI, R. R. *et al.* L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. **Cellular microbiology**, v. 6, n. 8, p. 733–41, ago. 2004.

URBANIÁK, M. D. *et al.* A novel allosteric inhibitor of the uridine diphosphate N-acetylglucosamine pyrophosphorylase from *Trypanosoma brucei*. **ACS chemical biology**, v. 8, n. 9, p. 1981–7, 20 set. 2013.

URBINA, J. A.; CRESPO, A. Regulation of energy metabolism in *Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi* epimastigotes, I. Hexokinase and phosphofructokinase. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 11, n. C, p. 225–239, 1984.

VIGETTI, D. *et al.* Role of UDP-N-acetylglucosamine (GlcNAc) and O-GlcNAcylation of hyaluronan synthase 2 in the control of chondroitin sulfate and hyaluronan synthesis. **J Biol Chem**, v. 287, n. 42, p. 35544–35555, 2012.

VINCENT, F.; DAVIES, G. J.; BRANNIGAN, J. A. Structure and kinetics of a monomeric glucosamine 6-phosphate deaminase: Missing link of the NagB superfamily? **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 20, p. 19649–19655, 2005.

WARREN, L. G.; GUEVARA, A. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. IV. Evidence in Favor of the Presence of a Hexokinase*. **The Journal of Protozoology**, v. 11, n. 1, p. 107–108, fev. 1964.

WATANABE, R. *et al.* The first step of glycosylphosphatidylinositol biosynthesis is mediated by a complex of PIG-A, PIG-H, PIG-C and GPI1. **The EMBO Journal**, v. 17, n. 4, p. 877–885, 15 fev. 1998.

WIEMER, E. A. *et al.* Identification of 2-enoyl coenzyme A hydratase and NADP(+)-dependent 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase activity in glycosomes of procyclic *Trypanosoma brucei*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 82, n. 1, p. 107–11, 12 nov. 1996.

WOOD, D. E. *Trypanosoma cruzi*: fatty acid metabolism in vitro. **Experimental parasitology**, v. 37, p. 60–66, 1975.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Research priorities for Chagas disease, human African trypanosomiasis and *leishmaniasis*. **World Health Organization technical report**

series, n. 975, p. v–xii, 1-100, 2012.

____. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>>. Acesso em: 3 abr. 2018.

YADAV, V. *et al.* N-acetylglucosamine 6-phosphate deacetylase (nagA) is required for N-acetyl glucosamine assimilation in gluconacetobacter xylinus. **PLoS ONE**, v. 6, n. 6, 2011.

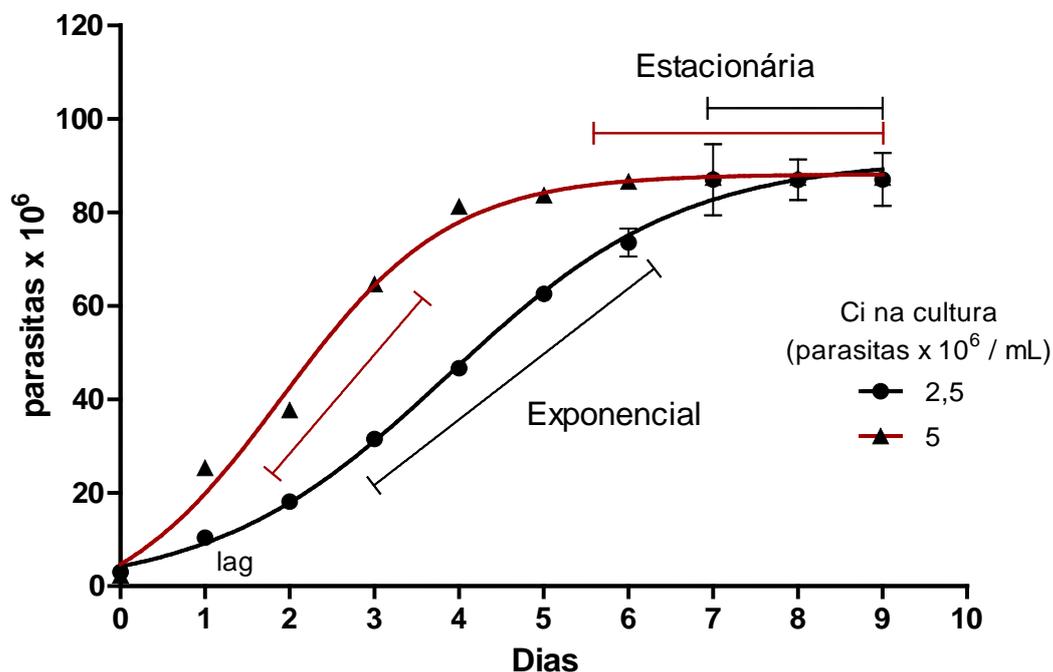
ZACHARA, N.; AKIMOTO, Y.; HART, G. W. **The O-GlcNAc Modification Essentials of Glycobiology**, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28876858>>

ZELEDOM, 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. **The Journal of parasitology**, v. 46, p. 541–51, out. 1960.

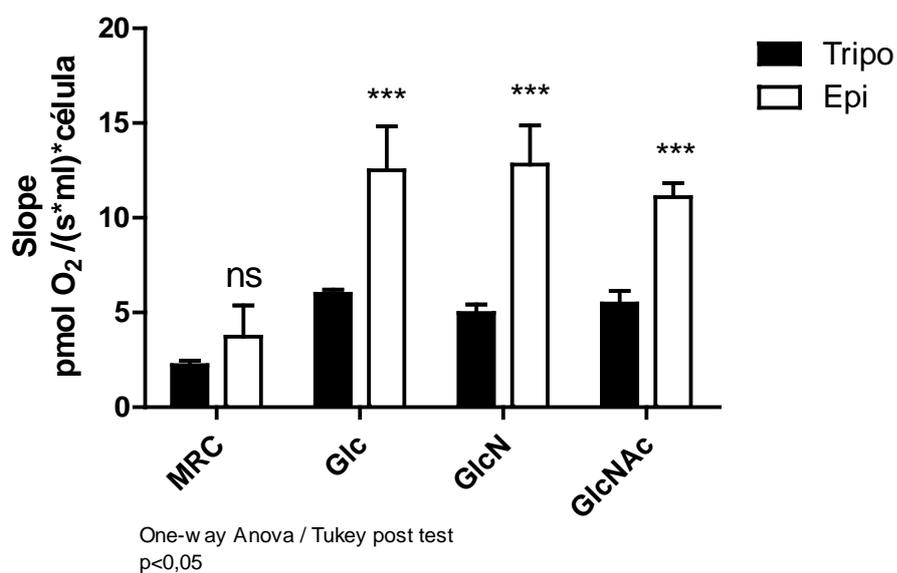
ZILBERSTEIN, D.; DWYER, D. M. Protonmotive force-driven active transport of D-glucose and L-proline in the protozoan parasite *Leishmania donovani*. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 82, n. 6, p. 1716–1720, 1985.

ZINGALES, B. *et al.* Purification of an adenylyl cyclase-containing plasma membrane fraction from *trypanosoma cruzi*. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, v. 550, n. 2, p. 233–244, jan. 1979.

ANEXOS



Anexo 1. Curva de proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* Cepa CL clone 14. Os epimastigotas foram cultivados em meio LIT e foram utilizadas duas concentrações iniciais em culturas em placas de 96 poços. Foram realizadas leituras diárias em espectrofotômetro de placa Gen5 BioTek Spectrometer.



Anexo 2. Comparação da respiração de rotina de formas Tripo e Epi de *T. cruzi*.