

RODOLPHO ORNITZ OLIVEIRA SOUZA

**Caracterização do metabolismo de ácidos graxos em
*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
2019

RODOLPHO ORNITZ OLIVEIRA SOUZA

**Caracterização do metabolismo de ácidos graxos em
*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
2019

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Oliveira Souza, Rodolpho Ornitz

Caracterização do metabolismo de ácidos graxos em
Trypanosoma cruzi / Rodolpho Ornitz Oliveira Souza;
orientador Ariel Mariano Silber. -- São Paulo, 2019.
123 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Ácidos graxos. 2. Trypanosoma cruzi. 3. CPT1.
4. ACAD. I. Silber, Ariel Mariano, orientador. II.
Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): **Rodolpho Ornitiz Oliveira Souza**

Titulo da Dissertação/Tese: **Caracterização do metabolismo de ácidos graxos em *Trypanosoma cruzi***

Orientador: **Prof. Dr. Ariel Mariano Silber**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado/Tese de Doutorado, em sessão publica 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:

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Caracterização bioquímica e funcional da acil-CoA e isovaleril-CoA desidrogenases de Trypanosoma cruzi*", registrado sob o protocolo nº **116/2016**, 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 **13/09/2016** 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 com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

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

- Departamento: *Parasitologia*

- Membros da Equipe: *Rodolpho Ornitiz Oliveira Souza (Pós-graduando), Manoel Aparecido Peres (Técnico de laboratório)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico www.icb.usp.br/ceua. 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 "*Biochemical and functional characterization of acyl-CoA and isovaleryl-CoA dehydrogenases of Trypanosoma cruzi*", protocol nº **116/2016**, 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 **9/13/2016** 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 **4 year(s)** from the date of approval.

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

- Team members: *Rodolpho Ornitiz Oliveira Souza (Graduate Student), Manoel Aparecido Peres (Laboratory Technician)*.

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. 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>	<i>Balb-C</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>45 dias/days</i>	<i>20</i>

São Paulo, 13 de setembro de 2016.



Prof. Dr. Anderson de Sá Nunes
Coordenador CEUA-ICB/USP



Eliane Aparecida Gomes de M. Nascimento
Secretária CEUA-ICB/USP

À minha mãe Rita de Cássia, por ser pai e mãe, meu irmão Ícaro e à minha avó Maria Nazaré pelo apoio incondicional.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Ariel M. Silber, inicialmente pela confiança de me aceitar em seu laboratório e pela orientação ao longo desses quatro anos. Obrigado por enxergar em mim um potencial que, até então, eu não sabia que existia. Além disso, obrigado por construir um ambiente agradável de trabalhar e por respeitar a diversidade! Muito obrigado mesmo, até (e principalmente, risos) pelos puxões de orelha.

À Dra. Flávia Damasceno, que se não fosse pela coragem dela de sair de Santana do Ipanema, no interior de Alagoas, para fazer pós aqui em SP, nada disso estaria acontecendo. Obrigado pela amizade, pela companhia nos mais diversos momentos, pelas conversas, pela orientação durante meu estágio lá em 2015 e por ser um exemplo de conduta.

À Dra. Janaína Nascimento, pela grandiosa amizade, pelos cafés, rolês, cervejas e conversas. Obrigado por tornar esse fim de doutorado muito menos estressante. À Dra. Letícia Marchese, pela amizade e pela ajuda com experimentos e com os conceitos de cinética enzimática.

Às Dras. Maria Julia Barisón e Ludmila Nakamura Rapado por serem grandes exemplos de como fazer ciência com dedicação e cuidado. Obrigado pela amizade, conselhos e por sempre terem os ouvidos abertos para minhas dúvidas.

Às amigas que fiz durante esse percurso na pós-graduação: Dra. Raíssa Melo e Dr. Gustavo Baptista, pelos momentos incríveis de tantas risadas e descontrações. E por até hoje, mesmo distantes estarem sempre presentes! Às, Mas. Sabrina Marsiccobetre, Ana Milena Giraldo e Leydi Gutierrez, pelas aulas de espanhol diárias, pela paciência com as minhas brincadeiras e por me apresentarem o fantástico mundo da sulamérica hispano-hablante, tanto culinário, quanto de expressões e alegria. Obrigado por todos os momentos compartilhados no dia-a-dia.

Aos colegas do LaBTryps: Mayke Alencar, Dr. Roberto Cuevas, Dr. Richard Girard, Dr. Carlos Adriano Silva, Andrea K. Martinez, Gabriela Torres e Marilene Souza. Obrigado pelas risadas e momentos de discussão. Aos Drs. Agustín Hernandez e Luís Llaveano Martinez e ao nosso técnico, Me. Alexandre Moura.

Aos colegas que já saíram do laboratório: Dra. Carolina Manchola, Dr. Higo Fernando, Dra. Sandra Carla, Dr. Brian Suarez...

Ao Prof. Dr. Rui Curi, pelas valorosas discussões sobre o metabolismo de ácidos graxos.

Au Dr. Frédéric Bringaud, pour m'avoir accepté de passer les mois de mon doctorat en sandwich dans son laboratoire. Merci pour partager avec moi les connaissances acquises par votre laboratoire. Merci à toute l'équipe : Loïc Rivière, Erika Pineda, Oriana Villafranz, Simone Oldenburg, Magamba Tounkara, Sarah Mönich, Yoann Millerioux, Corinne Ascencio, Nicolas Plazolles, Magali Thonus, Emmanuel Tetaud et Marc Biran. Merci à tous !

Merci également aux autres membres de l'unité : Charlotte Isch, Christine Reix, Rija Ramanantsalama, Nicolas Bateau, Dr. Thierry Noel, Dr. Derick Robinson, Dr. Melanie Bonhivers, Dr. Karine Dementhon, Dr. Barbara Papadopoulou, Dr. Marc Oulette et toutes les autres personnes qui composent cette merveilleuse équipe ! Merci beaucoup !

Ao meu grandíssimo amigo Marcelo Pinheiro, que esteja como meu vizinho ou na Austrália, continua sendo uma das pessoas que eu mais gostei de conhecer em SP. Obrigado por tudo, por cada momento, sempre!

Ao meu amigo Dr. Ricardo Palácios, pelos puxões de orelha, conselhos, cafés, almoços, conversas. Obrigado por tudo! E obrigado também ao seu esposo, Augusto Mathias, por toda a amizade e momentos de descontração.

Aos grandes amigos que a França me deu: Dr. Bruno Paivas e Marc Vidal! Eu não tenho palavras para agradecer cada momento compartilhado, cada segundo de risada. Vocês fizeram minha experiência no exterior ser incrível e eu adoro vocês, seus lindos!

A todos os outros amigos que fiz nessa jornada: Victor San Millan (Espanha), Renato Ribeiro (Brasil), Arnoud Rodriguez, Christofe, Frédéric Mauffrey, Steph Farredou, Kevin Oosterlink e Sebastien Brissonet (França), Serhii Vasylevskyi (Ucrânia/Suíça) e ao incrível Lucca de Cicco (Itália) pelo fantástico reencontro e por me mostrar Roma a partir das mais diversas visões.

Aos outros amigos que fiz aqui em SP: Juan Felipe, Gustavo Trippodi, Henrique Seifert, Ariel Yssou, Leonardo Reigner, Ronicléo Cardoso.

Aos amigos de sempre, que me acompanham desde Alagoas e que, eu tenho certeza, que sempre me apoiam e estarão comigo para tudo: Karyllane Rodrigues, Jucyelle Wanderley, Evaneyde Ferro, Rodolfo Vilar e Lucas Vilar. Aos ex-colegas do Colégio Divino Mestre, especialmente Sandro Melros e à minha ex-chefe, Maria Helena, por sempre lembrar de mim com carinho.

À toda equipe que compõe o Departamento de Parasitologia, no ICB USP, desde os funcionários USP até o pessoal da segurança e da limpeza.

Aos Prof. Dr. Paul A M Michels (University of Edinburgh, Reino Unido), Dr. Wilfredo Quiñones (Universidad de Los Andes, Venezuela) pelas discussões que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Mauro Cortez pelas ajudas com as microscopias e à técnica Joelcimar Martins da Silva do CEFAP – ICB/USP, pela ajuda com os experimentos de citometria de fluxo.

Às agências de fomento: CAPES, CNPq, GCRF e FAPESP, pelo apoio financeiro fornecido para desenvolver o projeto.

E por último, e não menos importante, às três pessoas as quais eu dedico essa tese, principalmente à minha mãe e avó que se revezaram na minha criação e me fizeram a pessoa que eu sou hoje.

MUITO OBRIGADO/GRACIAS A TODOS/MERCI BEAUCOUP/MANY THANKS!

Este trabalho foi desenvolvido com o apoio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), número do processo: 1424276/2015-3 e pela Conselho Nacional de Aperfeiçoamento Pessoal (CAPES). Além do mais o laboratório é vinculado à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e ao *Global Challenges Research Funding* (GCRF, Reino Unido).

*Se avexe não!
Toda caminhada começa no primeiro passo,
A natureza não tem pressa, segue seu compasso...
Inexoravelmente chega lá.
Se avexe não!
Observe quem vai subindo a ladeira,
Seja princesa ou seja lavadeira,
Pra ir mais alto, vai ter que suar!*

(Flávio José, A Natureza das Coisas)

RESUMO

Souza, ROO. **Caracterização do metabolismo de ácidos graxos em *Trypanosoma cruzi***. [Tese (Doutorado em Parasitologia)]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo; 2019.

Esta bem estabelecido que o metabolismo do *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é baseado principalmente no consumo de glicose e/ou aminoácidos, dependendo da disponibilidade desses substratos no ambiente. Neste trabalho foi demonstrada a importância do metabolismo de ácidos graxos, principalmente para as formas do parasita que estão presentes no inseto vetor. *T. cruzi* é capaz de incorporar ácidos graxos a partir do meio externo e metabolizar esses substratos, gerando CO₂. Mostramos que a degradação de ácidos graxos em *T. cruzi* é operativa nas formas epimastigotas (formas proliferativas e não infectivas presentes no inseto vetor), porém sua ativação depende da disponibilidade de glicose no meio. À medida que diminui a concentração de glicose no meio aumenta a dependência da utilização de ácidos graxos como fonte de energia. Essa regulação é concomitante com o aumento da atividade da Carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), principal reguladora do processo de degradação de ácidos graxos. Também foi observado que o parasita pode realizar síntese de novo de ácidos graxos a partir de malonil-CoA, no entanto, a atividade da Acetil-CoA carboxilase (ACC) também está condicionada à concentração de glicose, sendo mais ativa no início da curva de proliferação. O tratamento de formas epimastigotas de *T. cruzi* com Etomoxir, inibidor de CPT1, interfere na proliferação dos parasitas, impedindo a ativação da beta-oxidação quando os níveis de glicose no meio estão mais baixos. Etomoxir também diminui a resistência dos parasitas ao estresse nutricional severo, fazendo com que ácidos graxos se acumulem em inclusões lipídicas, sustentando a ideia de que esses parasitas podem utilizar conteúdo lipídico na forma de triacilgliceróis como reserva energética. Nesse sentido, foi caracterizada uma das enzimas críticas no metabolismo de lipídeos, a Acil-CoA desidrogenase (ACAD), responsável pelo primeiro passo da beta-oxidação. O gene de *T. cruzi* que codifica para a ACAD com características de ACAD para substratos de cadeia média (C8:0 – C16:0) foi expresso em *Escherichia coli* e a ACAD recombinante resultante (TcACAD) foi caracterizada. Notavelmente possui amplo espectro de substratos, capaz de reconhecer substratos de cadeia curta e longa e até mesmo substratos com ramificação, derivados da via de degradação de aminoácidos de cadeia ramificada. A TcACAD está localizada na mitocôndria do parasita e é expressa diferencialmente ao longo do ciclo de vida do parasita, sendo mais ativa nas formas epimastigotas intracelulares, presentes no hospedeiro mamífero. A TcACAD possui uma atividade parcial de acil-CoA oxidase, gerando H₂O₂ na mitocôndria. Finalmente, também foi mostrado que a beta-oxidação é um processo metabólico importante para a diferenciação. Diante do exposto, conclui-se que o metabolismo de ácidos graxos contribui para o metabolismo energético do parasita.

Palavras-chave: Ácidos graxos. *Trypanosoma cruzi*. Etomoxir. CPT1. ACAD.

ABSTRACT

Souza, ROO. **Characterization of fatty acid metabolism in *Trypanosoma cruzi***. [Thesis (Ph. D. in Parasitology)]. São Paulo: Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo; 2019.

It is well established that the metabolism of *T. cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease, is based mainly on the consumption of glucose and/or amino acids, depending on the availability of these substrates in the environment. In this work the importance of fatty acid metabolism was demonstrated, especially for the forms of the parasite that are present in the insect vector. *T. cruzi* is able to incorporate fatty acids from the external environment and metabolize these substrates, generating CO₂. We show that fatty acid degradation in *T. cruzi* is operative in the epimastigote forms (proliferative and noninfective forms present in the insect vector), but its activation depends on the availability of glucose in the medium. When the glucose concentration in the medium decreases the dependence of the use of fatty acids as energy source increases. This regulation is concomitant with the increase in the activity of Carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1), the main regulator of the fatty acid degradation process. It was also observed that the parasite could perform *de novo* synthesis of fatty acids from malonyl-CoA, however, the activity of Acetyl-CoA carboxylase (ACC) is also conditioned to glucose concentration, being more active at the beginning of the curve of proliferation. The treatment of epimastigotes forms of *T. cruzi* with Etomoxir, inhibitor of CPT1, interferes in the proliferation of the parasites, preventing the activation of the beta-oxidation when the glucose levels in the middle are lower. Etomoxir also decreases parasite resistance to severe nutritional stress, causing fatty acids to accumulate in lipid inclusions, supporting the idea that these parasites can use lipid content in the form of triacylglycerols as an energy reserve. In this sense, one of the critical enzymes in lipid metabolism, Acyl-CoA dehydrogenase (ACAD), was responsible for the first step of beta-oxidation. The *T. cruzi* gene encoding ACAD with ACAD characteristics for medium chain substrates (C8: 0-C16: 0) was expressed in *Escherichia coli* and the resulting recombinant ACAD (TcACAD) was characterized. Notably, it has a broad spectrum of substrates capable of recognizing short and long chain substrates and even branched substrates derived from the branched chain amino acid degradation pathway. TcACAD is located in the mitochondria of the parasite and is differentially expressed throughout the life cycle of the parasite, being more active in the intracellular epimastigote forms present in the mammalian host. TcACAD has a partial activity of acyl-CoA oxidase, generating H₂O₂ in mitochondria. Finally, it has also been shown that beta-oxidation is an important metabolic process for differentiation. In view of the above, it is concluded that the metabolism of fatty acids contributes to the energetic metabolism of the parasite.

Keywords: Fatty acids. *Trypanosoma cruzi*. CPT1. ACAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação do ciclo de vida do <i>T. cruzi</i>	23
Figura 2: Representação do metabolismo intermediário de <i>T. cruzi</i> :.....	26
Figura 3: Representação esquemática do metabolismo de aminoácidos em <i>T. cruzi</i> , com foco nas vias até então caracterizadas e/ou em estudo no LaBTryps.	29
Figura 4: Representação esquemática da biossíntese de ácidos graxos em mamíferos.	31
Figura 5: Representação esquemática do processo de beta-oxidação..	33
Figura 6: Esquema do mecanismo geral de reação das ACAD.....	36
Figura 7: Produção de $^{14}\text{CO}_2$ por epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados em [^{14}C]-Palmitato 100 μM por diferentes períodos de tempo.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 8: Avaliação da viabilidade e produção de ATP em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de palmitato e outros substratos oxidáveis.	Error! Bookmark not defined.
Figura 9: Produção de $^{14}\text{CO}_2$ por epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados em [^{14}C]-Palmitato 100 μM na presença de 3 mM glicose e incubados com [^{14}C]-glicose 3 mM na presença de 100 μM de palmitato..	Error! Bookmark not defined.
Figura 10: Consumo de glicose, triglicerídeos e inclusões lipídicas por formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	Error! Bookmark not defined.
Figura 11: Produção de $^{14}\text{CO}_2$ por epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados a partir de [^{14}C]-Palmitato e [^{14}C]-glicose em meio LIT.	Error! Bookmark not defined.
Figura 12: Citometria de fluxo de parasitas marcados com o ácido graxo fluorescente BODIPY® 500/510 C ₁ -C ₁₂	Error! Bookmark not defined.
Figura 13: Análise da marcação de ácidos graxos.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 14: Atividades em extratos de formas epimastigotas de enzimas relacionadas ao controle do metabolismo de ácidos graxos.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 15: Avaliação do efeito de inibidores de degradação de ácidos graxos.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 16: Produção de $^{14}\text{CO}_2$ por epimastigotas de <i>T. cruzi</i> incubados com [^{14}C]-Palmitato 100 μM na presença de inibidores.....	Error! Bookmark not defined.
Figura 17: Parâmetros cinéticos da TcCPT1 em extratos de formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> e inibição por ETO.	Error! Bookmark not defined.
Figura 18: Análise da viabilidade e morte celular em formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de ETO.	Error! Bookmark not defined.

Figura 19: Análise do ciclo celular em parasitas tratados com ETO. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 20: Curvas de proliferação de formas epimastigotas tratados com ETO e após a remoção do tratamento. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 21: Análise da viabilidade de formas epimastigotas de *T. cruzi* submetidas a estresse nutricional e tratadas com ETO. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 22: Efeitos do tratamento com ETO na respiração celular e produção de ATP em formas epimastigotas de *T. cruzi*. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 23: Análise da marcação de ácidos graxos em parasitas tratados com ETO. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 24: Efeitos do tratamento com ETO na metaciclo gênese. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 25: Alinhamento de sequências de aminoácidos da TcACAD com as ACAD de *H. sapiens*. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 26: Alinhamento de sequências de aminoácidos da TcACAD com HsMCAD. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 27: Clonagem e expressão da ACAD de *T. cruzi*. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 28: Caracterização cinética da TcACAD recombinante. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 29: Especificidade de cofator e substrato da rTcACAD. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 30: Caracterização cinética da TcACAD em extratos totais de formas epimastigotas de *T. cruzi*. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 31: Perfil de atividade da TcACAD ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 32: Localização subcelular da TcACAD por atividade enzimática. **Error! Bookmark not defined.**

Figura 33: Atividade de redução de citocromo c a partir de frações mitocondriais de *T. cruzi*. **Error! Bookmark not defined.**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Lista de genes putativos que codificam para as enzimas relacionadas à degradação de ácidos graxos em <i>T. cruzi</i> (Cepa CL, clone 14.) Haplótipos CL e CL Brener	35
Tabela 2: Sequências de iniciadores utilizados para a clonagem e amplificação da TcACAD	42
Tabela 3: Parâmetros cinéticos obtidos para a TcACAD recombinante. Error! Bookmark not defined.	
Tabela 4: Parâmetros cinéticos da TcACAD obtidos a partir de extratos de formas epimastigotas. Error! Bookmark not defined.	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACAD	Acil-CoA desidrogenase
ACADM	Acil-CoA desidrogenase de cadeia média
ACC	Acetil-CoA carboxilase
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
AV	Ácido valpróico
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BODIPY	<i>(4,4-Difluoro-5-Methyl-4-Bora-3a,4a-Diaza-s-Indacene-3-Dodecanoic Acid)</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina
CEM	Coefficiente de Extinção Molar
CPT1	Carnitina palmitoiltransferase 1
CPT2	Carnitina palmitoiltransferase 2
DCPIP	2,6-diclorofenolindofenol
dNTP	Desoxirribonucleosídeo trifosfato
DO	Densidade Ótica
DTNB	Dinitrofeniltiocianato
DTNB	Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
E-64	N-(trans-Epoxisuccinil)-L-leucina 4-guanidinobutilamida
Ea	Energia de Ativação
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
ETO	Etomoxir
FAS	Sintase de ácidos graxos
FCCP	Trifluorocarbonilcianeto de fenilhidrazona
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
Glc	Glicose
GS	Glutamina sintetase
HK	Hexoquinase
IPTG	Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosídeo
kDNA	DNA do cinetoplasto
K_M	Constante de Michaelis – Menten
LIT	<i>Liver Infusion Tryptose</i>
MRC	Meio de Respiração Celular
MRM	Monitoramento Múltiplo de Reação
MS	Espectrometria de Massas

MTT	4,5-dimetiltiazol-2,5-difeniltetrazolio
NAD⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma oxidada
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo, forma reduzida
NADP⁺	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida
Ni-NTA	Níquel-Nitrilotriacetato
Omy	Oligomicina
P5C	Δ 1-pirrolina-5-carboxilato
P5CDH	Δ 1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase
PBS	Tampão fosfato salino
PEP	Fosfoenolpiruvato
PRODH	Prolina desidrogenase
qsp	quantidade suficiente para
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SFB	Soro Fetal Bovino
SPT1	Serina palmitoiltransferase 1
TA	Temperatura Ambiente
TAE	Tampão Tris-Acetato-EDTA
TAU	<i>Triatomine Artificial Urine</i>
TCA	Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos
TE	Tampão Tris-EDTA
TEMED	Tetra Metil Etileno Diamina
TLCK	Tosillisina clorometil cetona hidrocloreto
TMZ	Trimetazidine
VLCAD	Acil-CoA desidrogenase de cadeia muito longa
V_{max}	Velocidade máxima
V_o	Velocidade inicial
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil β -galactopiranosídeo
α-KG	alfa-cetogluturato
βHOB	Beta-hidroxibutirato

SUMÁRIO

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO.....	20
1.1 Aspectos gerais da Doença de Chagas (DC).....	21
1.2 O <i>T. cruzi</i>	21
1.3 Metabolismo energético em <i>T. cruzi</i>.....	24
1.3.1 Metabolismo intermediário.....	24
1.3.2 Funções dos aminoácidos em <i>T. cruzi</i>	27
1.3.2 Funções dos aminoácidos em <i>T. cruzi</i>	28
1.4 O metabolismo de ácidos graxos: uma visão geral	29
1.4.1 Transporte e biossíntese de ácidos graxos.....	30
1.4.2 Degradação de ácidos graxos	32
1.5 As acil-CoA desidrogenase.....	35
Capítulo 2 - MATERIAIS E MÉTODOS	38
2.1 Análise <i>in silico</i> das sequências putativas.....	39
2.2 Microorganismos utilizados e condições de crescimento	39
2.2.1 Célula hospedeira	39
2.2.2 Trypanosoma cruzi	39
2.2.2.1 Epimastigotas	39
2.2.2.2 Tripomastigotas metacíclicos	40
2.2.2.3 Formas intracelulares.....	40
2.2.2.4 Tripomastigotas	40
2.2.3 Escherichia coli.....	41
2.3 Manipulação de DNA	41
2.3.1 Extração de DNA genômico de <i>T. cruzi</i>	41
2.3.2 Dosagem de DNA.....	42
2.3.3 Amplificação de DNA por PCR	42
2.3.4 Eletroforese em gel de agarose.....	43
2.3.5 Clonagem em vetor pGEM T-easy e subclonagem em vetor pET 24a ₍₊₎	43
2.3.6 Transformação de bactérias competentes	43
2.3.7 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-prep).....	44
2.3.8 Sequenciamento de DNA	44
2.4 Manipulação de proteínas.....	45
2.4.1 Expressão e purificação da TcACAD.....	45
2.4.2 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes (SDS-PAGE)	45
2.4.3 Preparação de extratos proteicos totais.....	46
2.4.4 Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina	46
2.4.5 Preparação de frações celulares por abrasão em carburo de silício.....	47
2.4.6 Western blot.....	48

2.5 Ensaio bioquímico	48
2.5.1 Caracterização bioquímica da TcACAD	48
2.5.2 Outras atividades enzimáticas	49
2.5.2.1 Hexoquinase (HK).....	49
2.5.2.2 Piruvato quinase (PK).....	49
2.5.2.3 Prolina desidrogenase (PRODH).....	50
2.5.2.4 CPT1	50
2.5.2.5 Acetil-CoA carboxilase (ACC)	50
2.5.2.6 Serina palmitoiltransferase (SPT).....	51
2.6 Quantificação de glicose e triglicerídeos	51
2.7 Avaliação da importância dos ácidos graxos para o <i>T. cruzi</i>	51
2.7.1 Viabilidade de formas epimastigotas.....	51
2.7.1.1 Viabilidade por MTT.....	51
2.7.1.2 Viabilidade por Alamar Blue®.....	52
2.7.2 Captura de CO ₂ emitido pela oxidação de [U- ¹⁴ C] palmitato em epimastigotas de <i>T. cruzi</i>	52
2.7.3 Avaliação dos níveis de ATP intracelular	53
2.7.4 Estresse nutricional severo em PBS	53
2.7.5 Sincronização da proliferação em formas epimastigotas	53
2.7.6 Marcação de ácidos graxos com BODIPY® 500/510 C ₁ -C ₁₂	54
2.7.6.1 Citometria de fluxo.....	54
2.7.6.2 Microscopia de fluorescência	54
2.7.7 Marcação de inclusões lipídicas com Nile Red®	54
2.8 Avaliação do efeito de inibidores do metabolismo de ácidos graxos	55
2.8.1 Formas epimastigotas	55
2.8.1.1 Curvas de proliferação.....	55
2.8.1.2 Viabilidade dos parasitas tratados com inibidores do metabolismo de ácidos graxos	56
2.8.1.3 Morte celular.....	56
2.8.1.4 Ciclo celular.....	56
2.8.1.5 Consumo de oxigênio em parasitas tratados com inibidores de degradação de ácidos graxos	56
2.8.2 Efeito dos inibidores de degradação de ácidos graxos na metaciclo gênese	57
2.8.2.1 Viabilidade por Alamar Blue®.....	57
2.8.2.2 Efeito dos inibidores na metaciclo gênese.....	57
Capítulo 3 - RESULTADOS	Error! Bookmark not defined.
3.1 Metabolismo de ácidos graxos em <i>T. cruzi</i>	Error! Bookmark not defined.
3.1.1 A degradação de ácidos graxos e a produção de ATP em <i>T. cruzi</i>	Error! Bookmark not defined.
3.2 A oxidação de ácidos graxos é regulada pela concentração de glicose no meio.... Error! Bookmark not defined.	
3.3 O <i>T. cruzi</i> apresenta maiores níveis de degradação de ácidos graxos na fase estacionária de crescimento.	Error! Bookmark not defined.

3.4 A regulação do metabolismo de ácidos graxos ao nível enzimáticoError! Bookmark not defined.

3.5 Efeito de inibidores de enzimas relacionadas degradação de ácidos graxos em *T. cruzi*.....Error! Bookmark not defined.

3.5.1 Formas epimastigotas **Error! Bookmark not defined.**

3.6 CPT1 é o alvo do Etomoxir em *T. cruzi*.....Error! Bookmark not defined.

3.7 O tratamento com ETO não causa morte celular em epimastigotas de *T. cruzi* ..Error! Bookmark not defined.

3.8 A interferência de ETO no consumo das reservas internas de ácidos graxos..... Error! Bookmark not defined.

3.9 MetacicloêneseError! Bookmark not defined.

3.10 A acil-coenzima A de *T. cruzi*Error! Bookmark not defined.

3.11 Análise *in silico*Error! Bookmark not defined.

3.12 Amplificação e clonagem do gene correspondente a acil-CoA desidrogenase de *T. cruzi* (TcACAD)Error! Bookmark not defined.

3.12.1 Amplificação, clonagem e expressão da rTcACAD.....**Error! Bookmark not defined.**

3.13 Caracterização bioquímica da rTcACADError! Bookmark not defined.

3.14 Atividade ao longo do ciclo de vida de *T. cruzi*Error! Bookmark not defined.

3.15 A TcACAD possui localização mitocondrial.....Error! Bookmark not defined.

3.16 A atividade da TcACAD transfere elétrons para cadeia de transporte de elétrons (CTE).Error! Bookmark not defined.

3.16 A atividade da TcACAD como uma possível fonte de H₂O₂..... Error! Bookmark not defined.

Capítulo 4 - DISCUSSÃO..... **Error! Bookmark not defined.**

4.1 A importância do catabolismo de ácidos graxos para o *T. cruzi*Error! Bookmark not defined.

4.2 As inclusões lipídicas e a relação com a manutenção da viabilidade em *T. cruzi*. Error! Bookmark not defined.

4.3 A regulação do consumo de ácidos graxos em *T. cruzi*..... Error! Bookmark not defined.

4.3 A atividade CPT1 e eventos de proliferação e diferenciação em *T. cruzi*..... Error! Bookmark not defined.

4.4 A atividade da ACAD de *T. cruzi*Error! Bookmark not defined.

4.5 A TcACAD é uma enzima mitocondrial..... Error! Bookmark not defined.

4.6 As diferenças na expressão da TcACAD ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi* Error!
Bookmark not defined.

4.7 A atividade de TcACAD sua possível relação com a bioenergética de *T. cruzi* Error!
Bookmark not defined.

Capítulo 5 – Conclusões	58
Capítulo 6 – PERSPECTIVAS.....	Error! Bookmark not defined.
REFERÊNCIAS	60

Capítulo 1 - INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais da Doença de Chagas (DC)

A doença de Chagas (Chagas 1909) é um grave problema de saúde pública e integra o ranking das 13 doenças mais negligenciadas (“WHO | Chagas Disease (American Trypanosomiasis)” 2018), afetando aproximadamente 6 milhões de pessoas na América do Sul, América Central, México e Estados Unidos, e mais de 70 milhões de pessoas estão expostas ao risco de infecção (Perez-Molina and Molina 2018). Essa doença é causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* e é transmitida, naturalmente, aos seres humanos e a mais de 150 espécies de mamíferos, através de vetores triatomíneos hematófagos da família *Reduviidae*, conhecidos popularmente no Brasil como “barbeiros” (Perez-Molina and Molina 2018). Existem, também, formas não vetoriais de transmissão da doença, através da transfusão de sangue e transplantes de órgãos de pessoas infectadas, transmissão congênita, ingestão de alimentos contaminados e acidentes laboratoriais (Wendel 2010; Filigheddu, Górgolas, and Ramos 2017; Kolliker-Frers et al. 2016; Rassi Jr., Rassi, and Marcondes de Rezende 2012).

Entre as décadas de 1960 e 1970 foram descobertos dois compostos com capacidade terapêutica para tratamento da doença de Chagas: o Nifurtimox (NF) e o Benzonidazol (Wilkinson et al. 2008). Medicamentos baseados nesses fármacos são amplamente utilizados, mas devido a sua toxicidade, causam diversos efeitos colaterais indesejados (Coura and Dias 2009; Viotti et al. 2009), levando os pacientes a abandonarem o tratamento. Além disso, esses medicamentos são eficazes na fase aguda, quando a doença é raramente diagnosticada. A eficácia dessas drogas na fase crônica da doença é baixa (Guedes et al. 2011). Devido a esses fatos, há uma grande necessidade de procurar novas alternativas quimioterápicas para o tratamento da doença de Chagas (Lisvane Silva et al. 2011; Boscardin et al. 2010).

1.2 O *T. cruzi*

O *T. cruzi* é um protista flagelado que pertence ao grupo *Excavata*, no agrupamento *Kinetoplastidae* (ADL et al. 2005). Dentro da espécie *T. cruzi*, há uma grande viabilidade genética que reflete em complexo espectro de fenótipos, o que levou a buscar uma classificação robusta das linhagens sub-específicas de *T. cruzi*. Para isso foram definidas as Unidades discretas de tipificação, ou DTUs (*Discrete Typing Units*). Essas DTUs são seis, e estão nomeadas pela numeração (I a VI). De forma geral, cada cepa ou clone dentro das DTUs compartilham uma ou mais características biológicas diferenciais, como distribuição

geográfica, virulência, tropismo ou preferência por hospedeiro mamífero (Brenière, Waleckx, and Barnabé 2016).

O *T. cruzi* possui um complexo ciclo de vida, que alterna entre o inseto vetor e o hospedeiro mamífero e apresenta diferentes morfologias a cada estágio do seu ciclo de vida, necessitando, também, se adaptar aos diferentes ambientes onde esse ciclo de vida acontece (Marchese et al. 2018). No hospedeiro mamífero, as principais formas descritas são o amastigota, o epimastigota intracelular e o tripomastigota sanguíneo. Os amastigotas são formas intracelulares aproximadamente esféricas, replicativas e infectivas. Durante a infecção celular, as formas amastigotas replicam e colonizam o citosol da célula hospedeira. Após certo número de divisões celulares, diferenciam para formas tripomastigotas, passando pela forma intermediária denominada epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria et al. 1999). Os tripomastigotas lisam as células do hospedeiro, ficando livres nos tecidos e na corrente sanguínea. Esses tripomastigotas podem: i. infectar células vizinhas no mesmo tecido onde são liberados; ii. atingir a corrente sanguínea. Uma vez na corrente sanguínea, podem infectar outros tecidos, ou um novo inseto vetor durante o seu repasto sanguíneo. Uma vez estabelecida a infecção no inseto o parasita pode ser finalmente transmitido a outro hospedeiro mamífero (De Souza 2002). Dentro do inseto vetor, a maioria das formas tripomastigotas ingeridas com o sangue morrem durante o trajeto para a região média do tubo digestório. A pequena população que resta, consegue colonizar o tubo digestório do inseto, diferenciando-se para formas epimastigotas (replicativas, não infectivas) (Uehara et al. 2012). Na região distal do tubo digestório, os epimastigotas diferenciam-se para tripomastigotas metacíclicos, formas semelhantes aos tripomastigotas sanguíneos, infectivas e não replicativas, em um processo conhecido como metaciclogênese (Figueiredo, Rosa, and Soares 2000). Durante o repasto sanguíneo do inseto infectado, as formas metacíclicas são expelidas junto com as fezes e urina do vetor, podendo infectar outro mamífero (De Souza 2002).

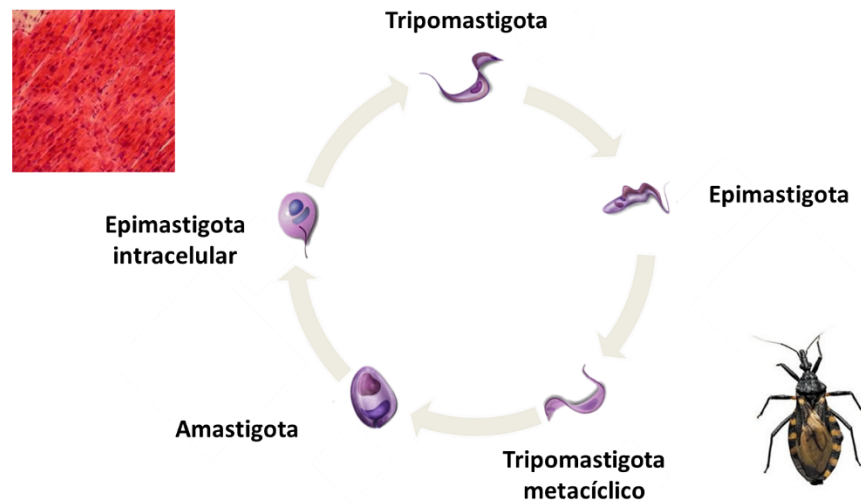


Figura 1: Representação do ciclo de vida do *T. cruzi*. Adaptado de (Lisvane Silva et al. 2011).

O *T. cruzi* (e os outros tripanossomatídeos) possui algumas peculiaridades em comparação aos outros eucariotas. Esses parasitas possuem organelas especializadas chamadas de glicossomos, que são peroxissomos modificados (Michels 1989), onde eles compartimentalizaram parte das enzimas relacionadas à glicólise, algumas outras vias biossintéticas como a via das pentoses fosfato (PPP) e uma parte da biossíntese de esteróis (Allmann and Bringaud 2017; Acosta et al. 2019). Outra característica notável é a presença de estruturas de reserva de lipídeos e proteínas denominadas reservossomos. Além de proteínas e lipídeos, os reservossomos contém algumas enzimas com atividade hidrolase e proteinase (Figueiredo, Steindel, and Soares 1994; Cunha-e-Silva et al. 2002). Há também a ocorrência de acidocalcissomos, que são organelas caracterizadas pelo conteúdo ácido e que armazenam polímeros de fosfato complexados com Ca^{2+} e outros íons. Essa organela também está relacionada com a sinalização por Ca^{2+} em tripanossomatídeos (Roberto Docampo and Moreno 2011; Huang and Docampo 2015; R Docampo et al. 1995).

Uma série de outras características importante dos tripanossomatídeos estão relacionadas com a estrutura e função da mitocôndria. Esses organismos possuem uma única e grande mitocôndria, que se distribui em ramificações e se espalha pelo corpo celular. A depender dos fatores ambientais ou do estágio do ciclo de vida, o volume pode variar. Dentro da matriz mitocondrial, há uma estrutura que é particular dos cinetoplastídeos, o cinetoplasto, onde se encontra o *k*DNA. O *k*DNA é uma malha de DNA circular, constituído por maxicírculos

(aproximadamente 50 unidades) e minicírculos (5.000 a 10.000 unidades). Esses dois tipos de DNA circulares se arranjam em uma malha única. Esse *kDNA* possui seqüências codificantes para rRNAs e uma série de proteínas mitocondriais, no entanto, os genes possuem uma estrutura distinta, com fases de leitura abertas incompletas ou imaturas, e necessitam de um mecanismo especial de edição (*RNA editing*) onde seqüências de RNA são modificadas em prol de formar um transcrito traduzível (Lisvane Silva et al. 2011).

Quanto à constituição dos componentes da cadeia transportadora de elétrons (CTE) o parasita possui todos os complexos (I a V). No entanto, o complexo I é insensível a rotenona e possui funcionalidade limitada devido à ausência de algumas subunidades (César Carranza et al. 2009; Duarte and Tomás 2014). Devido a isto, há a suposição de que a fumarato redutase (NADH dependente) é fundamental na re-oxidação do NADH, gerando succinato, que seria substrato para o complexo II da CTE. A transferência de elétrons via complexo III pode ser inibida por KCN e antimicina A, sugerindo que esses complexos são funcionais. Além disso, os citocromos *aa3*, *b*, *c558* foram identificados por proteômica, sendo o cit *aa3* a principal oxidase terminal em *T. cruzi*.

Ao longo do ciclo de vida, o parasita passa por diversos ambientes, onde em cada um deles, encontra condições físico-químicas distintas. Dentre essas condições, a disponibilidade de nutrientes nos diferentes meios onde transita é bastante variável. Para lidar com essas flutuações de fontes de carbono e energia, tem se desenvolvido no *T. cruzi* um metabolismo flexível, baseado no consumo de glicose e aminoácidos (Marchese et al. 2018; Silber et al. 2005).

1.3 Metabolismo energético em *T. cruzi*

1.3.1 Metabolismo intermediário

O *T. cruzi* não possui moléculas de reserva, como glicogênio ou o manógeno em *Leishmania* spp. Seu metabolismo é basicamente baseado no consumo preferencial de glicose, quando a mesma está presente (Maugeri, Cannata, and Cazzulo 2011b). A glicólise nesses parasitas possui algumas particularidades, como a falta de regulação clássica das enzimas hexoquinase e fosfofrutoquinase e também do consumo de glicose em detrimento da concentração de oxigênio (ausência de Efeito Pasteur) (Maugeri, Cannata, and Cazzulo 2011b; J J Cazzulo 1994). Até então não estavam bem definidos os mecanismos que o parasita utiliza para controle do fluxo glicolítico. Dados de análise de fluxo metabólico indicam que a glicólise em tripanossomatídeos pode ser regulada pelo transportador (modo de operação canônico) ou

pelos níveis de ATP/ADP e NAD^+/NADH dentro dos glicossomos (Bakker et al. 1999, 1997). Dadas essas peculiaridades, o parasita realiza um processo conhecido como fermentação aeróbica da glicose, gerando como produtos finais metabólitos reduzidos na forma de succinato, NH_3^+ e alanina (J J Cazzulo 1992b; Frydman et al. 1990). Dentro dos glicossomos a glicose é convertida a 3-fosfoglicerato (3-PG) e esse intermediário é transportado ao citosol. No citosol, o 3-PG é convertido em fosfoenolpiruvato (PEP) que pode ser convertido a oxaloacetato, via fosfoenolpiruvato quinase (PEPCK) e esse oxaloacetato convertido a malato pela ação da malato desidrogenase citosólica, gerando NAD^+ . O malato pode entrar nos glicossomos e ser convertido a fumarato, via fumarase (FH) e a succinato via fumarato redutase (FRD NADH -dependente). Essa mesma molécula de PEP pode seguir ainda convertida em piruvato, via piruvato-fosfato diquinase (PPDK), passo enzimático que gera ATP e ajuda a restaurar os níveis de ATP dentro dos glicossomos (Acosta et al. 2004). O piruvato também pode ser convertido a alanina pela ação de uma alanina desidrogenase glicossomal (ADHg). Além do pool glicossomal de alanina, também há a produção de alanina no citosol, a partir da conversão de PEP a piruvato pela piruvato quinase (PK) e utilização do piruvato como acceptor de $-\text{NH}_2$ em reações de transaminação. O ciclo de Krebs (TCA) nesses parasitas é operativo e parte do piruvato produzido no citosol pode ser convertido a acetil-CoA na mitocôndria.

Há evidências de que existam duas ramificações na rota de conversão malato-oxaloacetato-fumarato, integrando o metabolismo dos glicossomos e da mitocôndria. Essa ramificação é funcional tanto em *T. brucei*, quanto em *T. cruzi*. Em situações de baixa atividade do TCA e acúmulo de malato na matriz mitocondrial, o oxaloacetato produzido a partir da atividade da malato desidrogenase mitocondrial (MDHm) se acumula e inibe a enzima málica mitocondrial (MEm), fazendo com que o malato seja convertido a fumarato e posteriormente a succinato, via FRD- NADH dependente. Em uma situação em que o TCA está atuando normalmente, o oxaloacetato não se acumula e não inibe a MEm. Assim, parte do malato será convertido a piruvato, que pode ser decarboxilado a acetil-CoA, alimentando o TCA (J J Cazzulo 1994; Maugeri, Cannata, and Cazzulo 2011a; Leroux et al. 2011; J J Cazzulo 1992a; Frydman et al. 1990; Cannata and Cazzulo 1984; Juan José Cazzulo 1992).

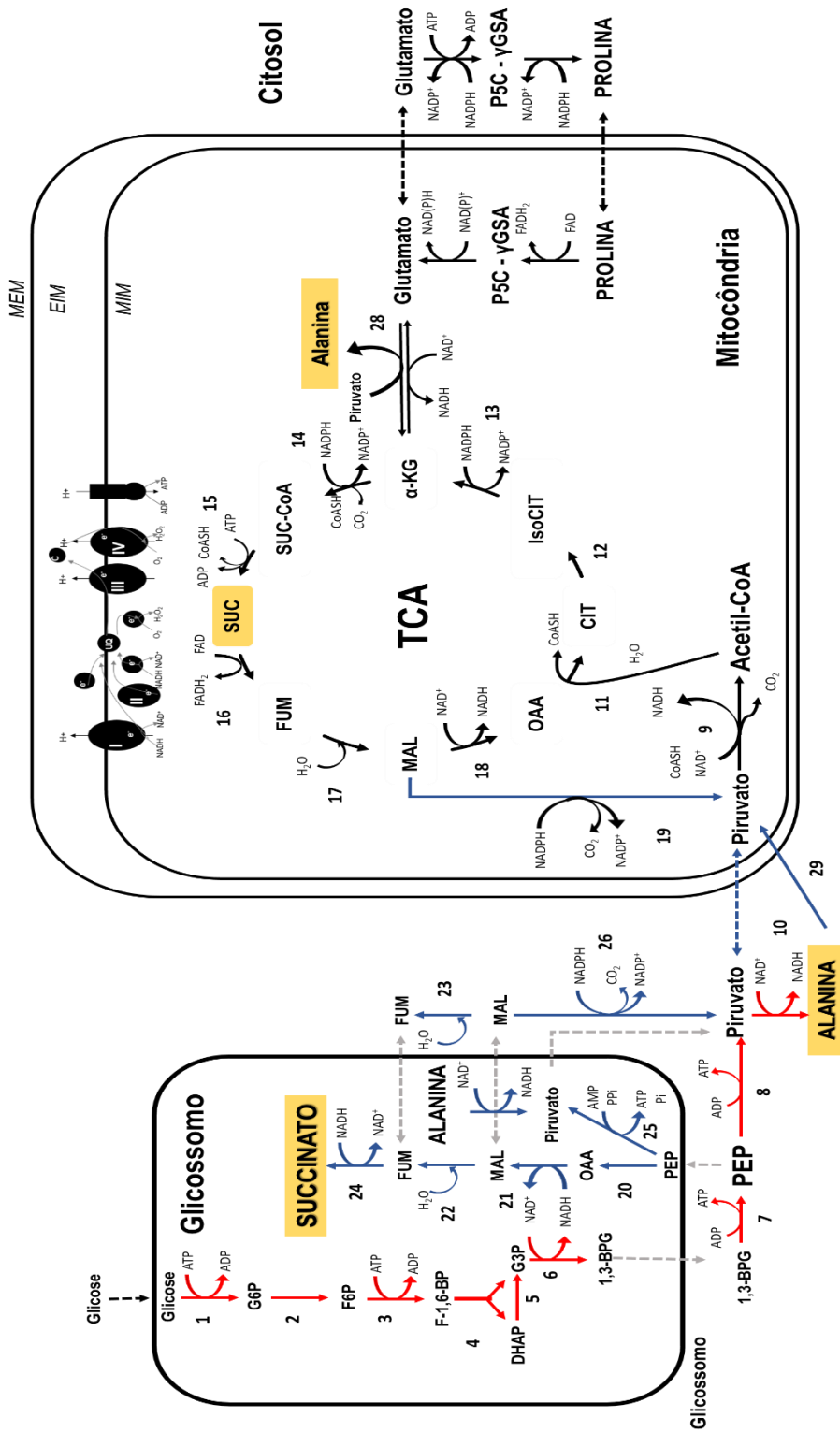


Figura 2: Representação do metabolismo intermediário de *T. cruzi*: 1. Hexoquinase. 2. Glicose-6-fosfato isomerase. 3. Fosfofrutoquinase. 4. Frutose bisfosfato aldolase. 5. Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. 6. Fosfogliceratomutase. 7. Fosfoglicerato quinase. 8. Piruvato quinase. 9. Piruvato desidrogenase. 10. Alanina desidrogenase. 11. Citrato sintase. 12. Aconitase. 13. Isocitrato

desidrogenase. 14. 2-oxoglutarato desidrogenase. 15. Succinil-CoA sintetase. 16. Succinato desidrogenase. 17. Fumarato hidratase. 18. Malato desidrogenase (mitocondrial). 19. Enzima málica mitocondrial. 20. Fosfoenolpiruvato carboxiquinase. 21. Malato desidrogenase glicossomal. 22. Fumarato hidratase glicossomal. 23. Fumarato hidratase citosólica. 24. Fumarato redutase glicossomal. 25. Piruvato-fosfato diquinase. 26. Enzima málica citosólica. 27. Fumarato hidratase citosólica. 28. Glutamato desidrogenase mitocondrial. 29. Alanina transaminase. Algumas das enzimas podem ter localização em qualquer dos três compartimentos, mas por fins didáticos foram representadas apenas uma ou duas vezes. Adaptado de (J J Cazzulo 1994; Maugeri, Cannata, and Cazzulo 2011a). Em vermelho: glicólise. Azul: via de ramificação malato – oxaloacetato – fumarato. Amarelo: principais produtos excretados pelo parasita.

1.3.2 Funções dos aminoácidos em *T. cruzi*

A participação dos aminoácidos no metabolismo de *T. cruzi* vem sendo estudada desde a década de 60. Recentemente o nosso laboratório demonstrou por análises metabólica que, quando a concentração de glicose diminui no meio extracelular, as formas epimastigotas realizam um *switch* metabólico para o consumo de alguns aminoácidos durante as fases exponencial e estacionária de proliferação (Barison et al. 2017). Já foi demonstrado que glutamina (Gln), glutamato (Glu) prolina (Pro), aspartato (Asp), asparagina (Asn), isoleucina (Ile) e leucina (Leu) podem ser oxidados por formas epimastigotas do parasita, dando sustentação ao metabolismo energético (Sylvester and Krassner 1976; Mancilla, Naquira, and Lanas 1967; Zeledon 1960). Sabe-se também que alguns aminoácidos participam em processos biológicos que vão além da sua função óbvia na biossíntese de proteínas: arginina (Arg) participa da administração de recursos energéticos no parasita, via conversão reversível em fosfoarginina, sistema análogo ao da interconversão entre creatina e fosfocreatina em mamíferos (C A Pereira et al. 1999; Claudio A Pereira et al. 2003). Pro está envolvida na resistência a diferentes tipos de estresse, principalmente oxidativo (Magdaleno et al. 2009). Há também dados que mostram que aminoácidos como Pro e Ala participam do controle osmótico do parasita (Rohloff, Rodrigues, and Docampo 2003).

O metabolismo também está estreitamente ligado à diferenciação de formas epimastigotas a tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese). A metaciclogênese pode ser feita *in vitro*, mediante a simulação das condições que o parasita encontra na porção final do tubo digestivo do inseto vetor. Isto é possível mediante a utilização do meio TAU (*Triatomine Artificial Urine*). Que fornece as condições físicoquímicas da urina do barbeiro (osmolaridade, pH). Notavelmente, o meio TAU não possui na sua formulação base nenhum nutriente. Após os parasitas serem submetidos a estresse metabólico mediante incubação em meio TAU por duas horas, passo fundamental para iniciar a diferenciação, esse meio pode ser suplementado

com metabólitos que, sabidamente, sustentam a metaciclologênese: Pro, Asp, Glu e glicose (devido a esta composição foi denominado TAU 3AAG) (Contreras et al. 1985). Esta estratégia de diferenciação permite a exploração de novos nutrientes que podem estar envolvidos na metaciclologênese, mediante a suplementação de TAU com outros metabólitos. Nesse sentido, já foi reportado que Pro e Gln (Damasceno, Barison, et al. 2018) são suficientes para sustentar o processo de diferenciação. Embora os aminoácidos em geral possuam efeito positivo sobre a metaciclologênese, já foi demonstrado que Leu, Ile e valina (Val) não são capazes de sustentar esse processo, e quando combinados com aminoácidos que sim o fazem (por exemplo Pro) atuam como reguladores negativos (Homsy, Granger, and Krassner 1989).

1.3.2 Funções dos aminoácidos em *T. cruzi*

Decorrente das funções descritas para alguns desses aminoácidos é relevante analisar o seu metabolismo. Dentro deste contexto, o nosso laboratório vem caracterizando a importância das vias de síntese e degradação de aminoácidos em *T. cruzi*. Um dos aminoácidos mais estudados em *T. cruzi* é a Pro. Pro é degradada a Glu em dois passos enzimáticos. O primeiro passo é realizado pela prolina desidrogenase (TcPRODH), uma enzima FAD dependente que produz Δ^1 -pirrolina 5-carboxilato, que é substrato da Δ^1 -pirrolina 5-carboxilato desidrogenase [TcP5CDH, NAD(P)⁺ dependente], que gera Glu como produto final da via. Foi demonstrado que a oxidação de Pro acontece na mitocôndria e que, esses passos enzimáticos geram coenzimas reduzidas que estimulam a respiração celular e alimentam a cadeia respiratória, produzindo ATP via fosforilação oxidativa (OxPHOS) (Paes et al. 2013; Mantilla et al. 2015). Além da degradação, o *T. cruzi* é capaz de sintetizar prolina a partir de Glu em dois passos enzimáticos. Essa via biossintética está presente no citosol do parasita e é regulada pela concentração de NADPH citosólico (Letícia Marchese, tese de doutorado). Um outro aminoácido que vem sendo estudado pelo nosso laboratório é a histidina e a via degradativa que vai de histidina a glutamato. Histidina é um aminoácido essencial, que é transportado pelo parasita desde o meio externo. A via de degradação de His em *T. cruzi* é composta por quatro passos enzimáticos e o consumo desse aminoácido promove viabilidade e produção de ATP via OxPHOS (Barisón et al. 2016). Uma outra possibilidade de gerar energia a partir de histidina é a produção imatura de α -cetogluturato (α -kg) via decomposição espontânea de um dos intermediários da via, o imidazolona-5-propionato (IPA) (Raíssa Melo, tese de doutorado). Recentemente foi demonstrado que alanina (Ala), que é um produto final do metabolismo de glicose, pode ser também transportada a partir do meio externo e, via conversão a piruvato, atua

como uma fonte de produção de energia para formas epimastigotas de *T. cruzi* (Girard et al. 2018). A Gln além de ser sintetizada pelo parasita via uma glutamina sintetase (TcGS) ela pode ser transportada a partir do meio externo, sendo uma fonte de ATP para o parasita. Além da produção de energia, foi descrito que a Gln possui um papel fundamental na detoxificação de NH_3^+ e, como mencionado anteriormente, é um aminoácido capaz de sustentar a metaciclologênese (Damasceno, Barisón, et al. 2018; Crispim et al. 2018). Finalmente, os aminoácidos de cadeia ramificada Leu, Ile e valina (Val) também podem ser transportados desde o meio externo (Manchola et al. 2016) e também podem servir como fontes de ATP.

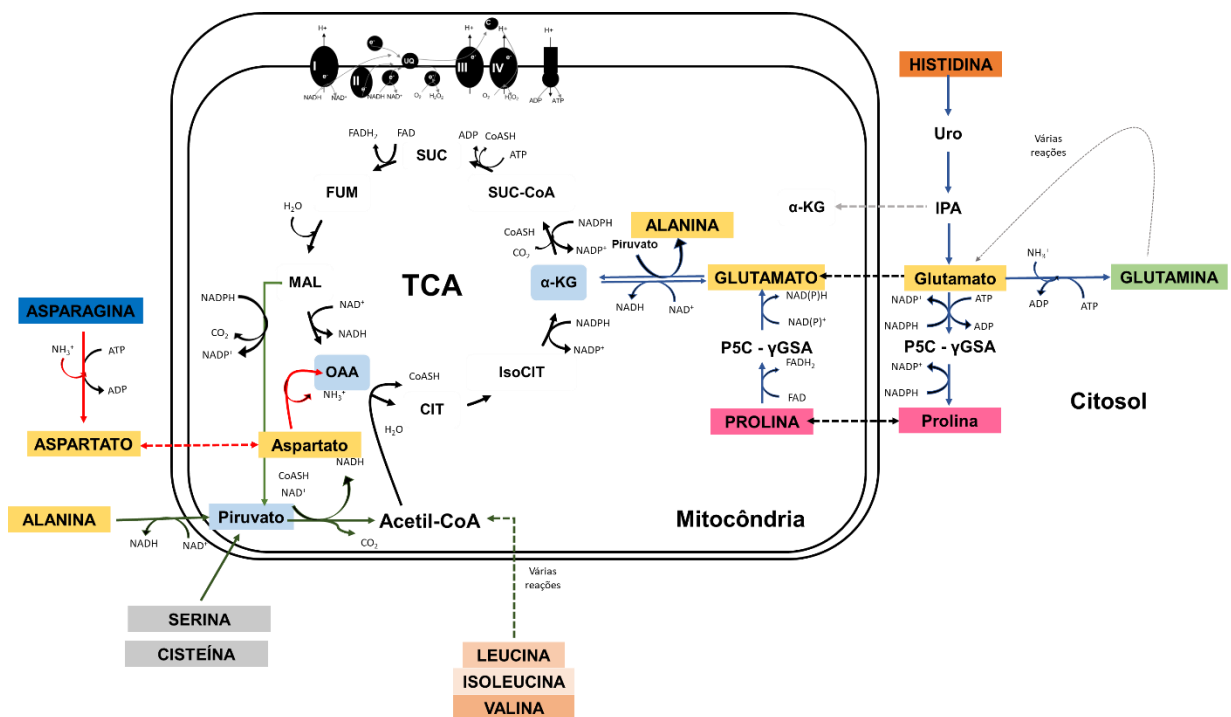


Figura 3: Representação esquemática do metabolismo de aminoácidos em *T. cruzi*, com foco nas vias até então caracterizadas e/ou em estudo no LaBTryps. 1. Prolina desidrogenase. 2. Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato desidrogenase. 3. Glutamato desidrogenase. 4. Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato sintetase. 5. Δ^1 -pirrolina-5-carboxilato redutase. 6. Glutamina sintetase. 7. Tirosina aminotransferase. 8. Aspartato aminotransferase. 9. Via de degradação dos aminoácidos de cadeia ramificada. 10. Asparagina sintetase. 11. Asparaginase. 10. Alanina desidrogenase. 11. Alanina aminotransferase. 12. Histidina amônio-liase. 13. Urocanato hidratase. 13. Imidazolona-5-propionato desidrogenase. Nota: o IPA pode ser convertido espontaneamente a 2-oxoglutarato, representado pela seta cinza pontilhada. 14. Formiminoglutamase. Setas azuis: vias de degradação que geram glutamato – 2-oxoglutarato. Setas verdes: passos enzimáticos que produzem piruvato – acetil-CoA. Setas vermelhas: passos enzimáticos que geram aspartato – oxaloacetato.

1.4 O metabolismo de ácidos graxos: uma visão geral

A maioria dos organismos, para produção de energia, catabolizam glicose, aminoácidos e lipídeos. As várias conexões entre o metabolismo de carboidratos e de aminoácidos em *T.*

cruzi vem sendo estudadas por vários grupos, incluído o nosso. Porém, até o momento, pouco se sabe sobre as conexões entre o metabolismo de aminoácidos e o de ácidos graxos, assim como sobre a relevância deste último na bioenergética de *T. cruzi*. Na maioria das células eucariotas, os processos de síntese e degradação de ácidos graxos são regulados por diversos fatores, entre eles o fluxo glicolítico, o transporte de ácidos graxos para dentro da célula, os níveis de acetil-CoA intracelulares e vias de sinalização (Lochner, Berod, and Sparwasser 2015). A seguir, serão brevemente descritos os processos de síntese e degradação de ácidos graxos e seus reguladores.

1.4.1 Transporte e biossíntese de ácidos graxos

Os ácidos graxos podem ser obtidos pelo transporte desde o meio externo ou podem ser sintetizados pelas células. Os mecanismos de transporte ainda não estão bem elucidados, entretanto, sabe-se que os ácidos graxos podem ser incorporados por difusão passiva,, transporte mediado por proteínas, principalmente pelo sistema FAT/CD36 (*Fatty acid translocase* e *cluster of differentiation 36*) e também por acilação direta, um mecanismo onde há a ação conjunta de uma proteína que regula o transporte do ácido graxo de cadeia muito longa e a imediata ativação dessa molécula, gerando um acil-CoA (Su and Abumrad 2009; Mashek and Coleman 2006).

A síntese de ácidos graxos compreende uma série de reações que condensam moléculas de malonil-CoA em um ácido graxo de cadeia longa. Inicialmente, o acetil-CoA gerado pela glicólise através do complexo PDH na mitocôndria é convertido em citrato e essa molécula pode ser transportada ao citosol. No citosol o citrato pode ser reconvertido a acetil-CoA pela ação da enzima ATP-citrato liase (ACLY). Essa molécula de acetil-CoA passará por um processo de carboxilação pela enzima acetil-CoA carboxilase (ACC, biotina-dependente), gerando malonil-CoA. Em células de mamífero existem dois tipos de ACC: ACC1 e ACC2. A ACC1 é uma enzima citosólica e responsável pela produção de malonil-CoA para a síntese de ácidos graxos via ácido graxo sintase (FAS). Já a ACC2 está localizada na mitocôndria e o malonil-CoA produzido é utilizado para inibir a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT1), passo que regula a entrada de ácidos graxos no citosol (**Figura 4**).

O malonil-CoA e o acetil-CoA serão utilizados na reação do complexo de síntese de ácidos graxos (FAS, *Fatty Acid Synthase*). O FAS é um complexo enzimático homodimérico que realiza a condensação de uma molécula de malonil-CoA e uma molécula de acetil-CoA, em sucessivas reações NADPH dependentes, formando principalmente palmitato como produto

final. O ácido graxo incorporado ou sintetizado pode ter três destinos: i. ser ativado via acil-CoA ligase e ser oxidado na mitocôndria, ii. ser utilizado como substrato na síntese de lipídeos mais complexos ou iii. esterificação para dar início ao processo de síntese de triacilgliceróis (TAGs). O processo de esterificação de ácidos graxos pode acontecer tanto na mitocôndria quanto no retículo endoplasmático, por uma série de reações, utilizando como base o glicerol-3-fosfato ou o diidroxiacetona fosfato. A molécula de TAG produzida pode ser armazenada em inclusões lipídicas.

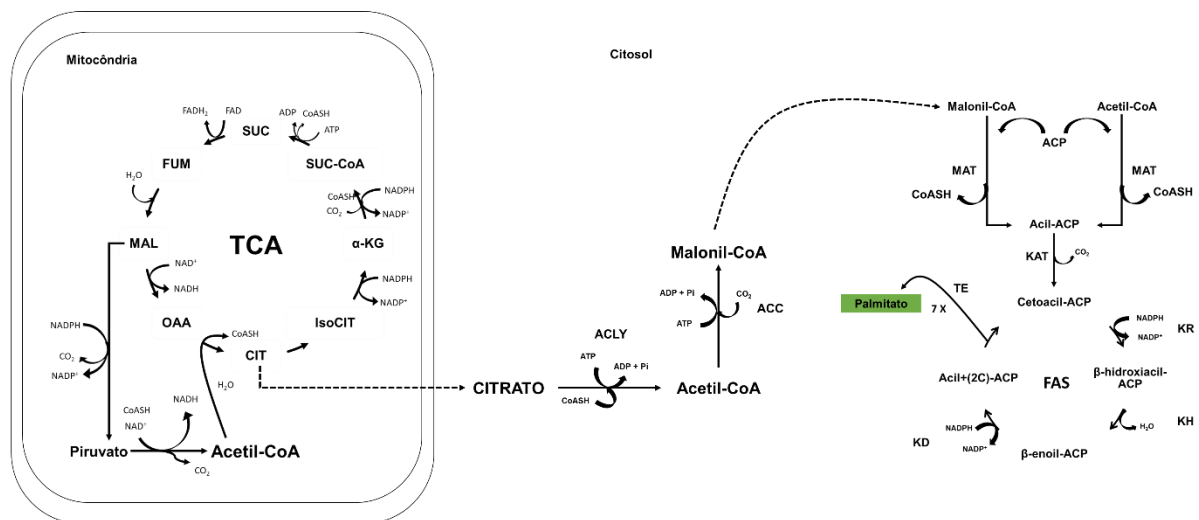


Figura 4: Representação esquemática da biossíntese de ácidos graxos em mamíferos. O citrato gerado pelo TCA é transferido ao citosol e é convertido a acetil-CoA pela ação da ACLY (ATP-citrato liase). ACC: Acetil-CoA Carboxilase. ACP: proteína carreadora de grupo acila. MAT: Malonil-CoA aciltransferase. KAT: Cetoaciltransferase. KR: Cetoacil redutase. KH: Cetoacil hidratase. KD: Cetoacil desidrogenase. TE: Tioesterase.

Diferentemente de mamíferos, o *T. brucei* não possui gene e nem atividade enzimática correspondente à ACLY, dependendo da produção de acetato para a biossíntese de lipídeos. Uma das principais fontes de carbono para a biossíntese de ácidos graxos em *T. brucei* é treonina (Tre), que pode ser convertida a acetil-CoA dentro mitocôndria via dois passos enzimáticos (treonina desidrogenase e 2-amino-cetobutirato-CoA ligase) e depois de acetil-CoA a acetato pela atividade conjunta das enzimas acetato:succinato-CoA transferase (ASCT) e acetil-CoA tioesterase (ACH). As moléculas de acetato produzidas na mitocôndria são transportadas ao citosol, onde são convertidas novamente a acetil-CoA pela acetil-CoA sintetase (AMP-dependente). Também já foi caracterizada em *T. brucei* a atividade de uma ACC e também a sua regulação ao longo do ciclo de vida do parasita (Ray, Wilkinson, and Paul 2018; Vigueira and Paul 2011, 2012). Outra característica peculiar da síntese de ácidos graxos em *T. brucei* é a presença de uma rota de síntese única, realizada por elongases que alongam

cadeias de miristato (C14:0) em ácidos graxos de cadeia muito longa (Lee et al. 2006; Lee, Stephens, and Englund 2007).

A síntese de ácidos graxos em *T. cruzi* é um assunto pouco discutido, até porque essas parasitas possuem uma baixa atividade de síntese, incorporando mais ácidos graxos do meio e/ou talvez realizando a síntese de novo de ácidos graxos. Assim como em *T. brucei*, não foi detectada atividade ACLY em *T. cruzi*, entretanto, sabe-se que formas epimastigotas conseguem incorporar acetato e que esse metabólito é incorporado a ácidos graxos, principalmente C18:0 e C16:0 (Aeberhard, Lema, and Bronia 1989). Esse fato faz pensar que a síntese de ácidos graxos nesses parasitas siga a mesma rota que em *T. brucei*, no entanto, como esses parasitas habitam diferentes insetos vetores, não sabemos qual a seria a principal fonte de acetato para a biossíntese de ácidos graxos em *T. cruzi*.

1.4.2 Degradação de ácidos graxos

Como já foi mencionado, a produção de malonil-CoA mitocondrial inibe a CPT1, que é o principal ponto de regulação da degradação de ácidos graxos. O processo de degradação de ácidos graxos (ou beta-oxidação) é um processo importante energeticamente, não só pela produção de acetil-CoA como produto final, mas por fornecer à CTE coenzimas reduzidas, fazendo com que ocorra produção de ATP via OxPHOS. Inicialmente, os ácidos graxos que estão sendo transportados para dentro da célula ou mesmo aqueles que estão sendo liberados dos triacilgliceróis necessitam ser ativados por uma acil-CoA sintetase (ou ligase), enzima citosólica que adiciona uma molécula de CoASH em um ácido graxo de cadeia longa, gerando acil-CoA. As mitocôndrias são impermeáveis aos ácidos graxos de cadeia longa. O transporte de um acil-CoA para dentro da mitocôndria é mediado pelas enzimas CPT1 e CPT2. A CPT1 fica na membrana externa da mitocôndria e catalisa a reação de troca de uma molécula de HS-CoA por uma carnitina, formando então um acilcarnitina. Já no espaço intermembranas, essa acilcarnitina é convertida novamente a acil-CoA por intermédio da CPT2, que faz a reação reversa a CPT1. A molécula de carnitina resultante desse processo retorna ao citosol a partir de uma translocase de carnitina. Uma vez dentro da mitocôndria, esse acil-CoA está pronto para ser oxidado (Nakamura, Yudell, and Loor 2014; Schulz 1991; Battaile et al. 2002).

A beta-oxidação acontece através de quatro passos enzimáticos. O primeiro deles é realizado por enzimas da família das acil-CoA desidrogenase (ACAD). Existem mais de 10 tipos de ACAD, cada uma com diferentes especificidades de substrato, dependendo do tamanho da cadeia do ácido graxo. Essa reação é FAD dependente e gera ao final FADH₂ e um enoil-

CoA (acil-CoA com uma dupla ligação entre os carbonos α e β). As ACAD serão discutidas com mais detalhes mais adiante. O segundo passo é catalisado por uma enoil-CoA hidratase, que retira a dupla ligação do enoil-CoA pela adição de uma molécula de água, formando um hidroxiacil-CoA. O passo seguinte é catalisado pela 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase, uma enzima NAD^+ dependente que gera NADH . O passo final da beta-oxidação é catalisado pela 3-cetoacil tiolase, enzima que remove 2C da molécula de acil-CoA, numa reação dependente de HS-CoA , gerando acetil-CoA e um acil-CoA com dois carbonos a menos. E esse acil-CoA encurtado retorna ao primeiro passo enzimático e o acetil-CoA pode entrar diretamente no TCA, produzindo CO_2 e energia via TCA. O FADH_2 e o NADH gerado nesse ciclo são oxidados via CTE, provendo elétrons para produção de ATP via OxPHOS.

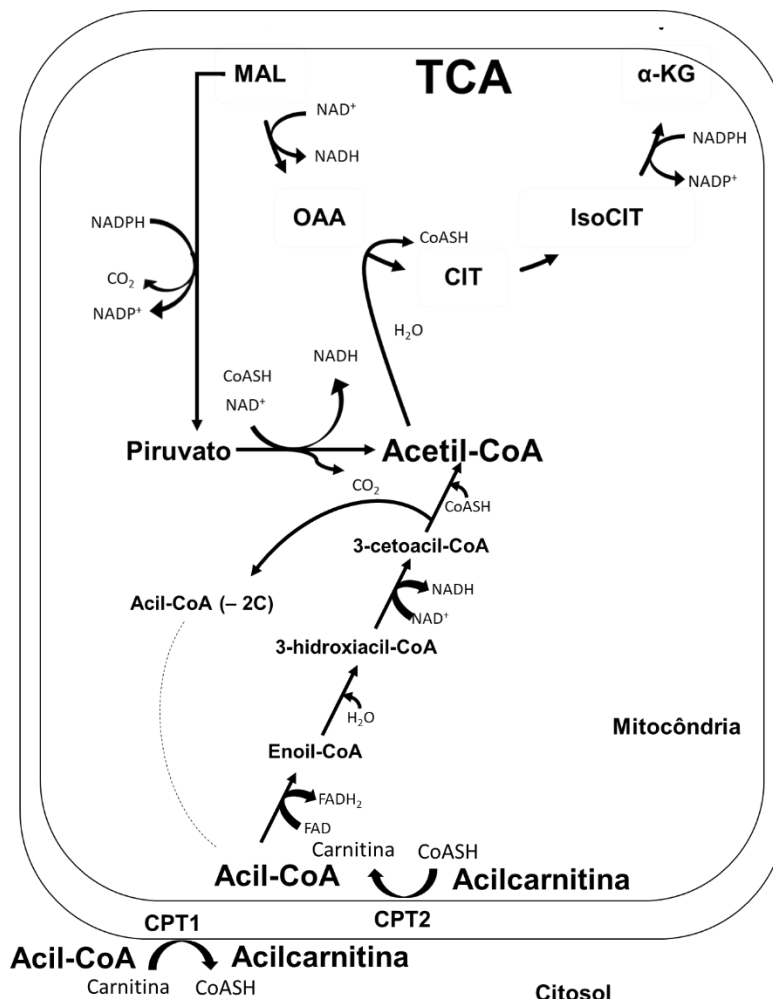


Figura 5: Representação esquemática do processo de beta-oxidação. CPT1: carnitina palmitoiltransferase 1. CPT2: carnitina palmitoiltransferase 2. 1. Acil-CoA desidrogenase. 2. Enoil-CoA hidratase. 3. 3-hidroxiacil-CoA desidrogenase. 4. 3-cetoacil tiolase. O acetil-CoA gerado na reação alimenta o TCA. O Acil-CoA com 2 carbonos a menos (-2C) retorna para o primeiro.

Há poucas descrições sobre o processo de degradação de ácidos graxos em tripanossomatídeos. Os primeiros registros de que esses organismos usam ácidos graxos como fonte de energia são da década de 70, onde foi demonstrado que os parasitas *T. lewisi* e *T. rhodesiense* são capazes de liberar $^{14}\text{CO}_2$ a partir de ácidos graxos marcados com ^{14}C (Dixon, Ginger, and Williamson 1971). Em *T. cruzi*, as primeiras observações relativas à oxidação de ácidos graxos são da mesma época, onde foi demonstrado que esses parasitas possuem baixa capacidade de oxidar ácidos graxos a CO_2 . O mesmo grupo mostrou num seguinte trabalho que, a medida que as formas epimastigotas vão diferenciando em formas metacíclicas, o consumo de ^{14}C palmitato aumenta (D E Wood 1975; D E Wood and Schiller 1975a). Também foi reportado que as formas epimastigotas poderiam utilizar reservas de triacilglicerois para sustentar a produção de ATP quando submetidas ao estresse nutricional pela ausência de metabólitos (Rogerson and Gutteridge 1980).

Recentemente o metabolismo de ácidos graxos voltou a receber atenção dos grupos que estudam metabolismo de tripanossomatídeos. Em *L. mexicana*, a ativação da beta-oxidação é essencial para o desenvolvimento das formas intracelulares (Saunders et al. 2014; Gannavaram et al. 2012). Interessantemente, formas procíclicas de *T. brucei* acumulam ácidos graxos em inclusões lipídicas e possuem sequências putativas que codificam para as enzimas da beta-oxidação (algumas delas já com atividade e localização comprovada), tanto glicosossomais quanto mitocondriais, mas até o momento não se sabe quando essas formas utilizam esses substratos para a produção energética (Allmann et al. 2014; Wiemer et al. 1996). Já as formas sanguíneas de *T. brucei*, em certo momento da infecção, conseguem se alojar no tecido adiposo do hospedeiro mamífero, diferenciando para uma forma não replicativa, onde aumenta a expressão de genes relacionados à beta-oxidação e também mostra um consumo de ácidos graxos marcados (Trindade et al. 2016).

Durante a jornada do *T. cruzi* dentro do inseto vetor, por exemplo, o parasita é exposto a um ambiente rico em aminoácidos e ácidos graxos (Antunes et al. 2013; Michael Barrett 1974). Os níveis de glicose dentro do tubo digestivo do inseto são rapidamente diminuídos para suprir as necessidades energéticas do hospedeiro, levando esses parasitas a viverem num ambiente com pouca glicose (De Lima et al. 2008). O tubo digestivo dos triatomíneos possui uma camada conhecida como membrana perimicrovilar, que é principalmente constituída por lipídeos e glicoproteínas (Gondim et al. 2018). Recentemente, dados de metabolômica mostraram que os ácidos graxos, lipídeos e seus derivados compõem cerca de 30% do conteúdo das fezes dos triatomíneos (L. Antunes et al. 2013). No genoma de *T. cruzi* estão anotadas sequências putativas para várias enzimas da beta-oxidação (Tabela 1).

Tabela 1: Lista de genes putativos que codificam para as enzimas relacionadas à degradação de ácidos graxos em *T. cruzi* (Cepa CL, clone 14.) Haplótipos CL e CL Brener

Processo	Enzima	Gene	
Ativação de ácidos graxos	Acil-CoA sintase/ligase	TcCLB.504089.40	
		TcCLB.511581.10	
		TcCLB.511581.20	
		TcCLB.506829.110	
		TcCLB.506829.100	
		TcCLB.503575.50	
		TcCLB.503559.100	
Acil-CoA/Acilocarnitina translocase	Carnitina palmitoiltransferase 1	TcCLB.511353.4 TcCLB.507211.10	
	Carnitina palmitoiltransferase 2	TcCLB.511807.284	
	Translocase de carnitina	?	
	Acil-CoA desidrogenase	TcCLB.509153.120 TcCLB.510303.290	
Beta-oxidação mitocondrial	Enoil-CoA hidratase	TcCLB.511529.160 TcCLB.508185.10 TcCLB.5627.100	
	3-hidroxiacil-CoA desidrogenase	TcCLB.508981.39 TcCLB.504233.4	
	Tiolase	TcCLB.510507.20 TcCLB.509463.30	
	Enzima trifuncional (Enoil-CoA hidratase/2,3-enoil-CoA isomerase/3-hidroxiacil-CoA desidrogenase)	TcCLB.5047.40 TcCLB.508441.70	
	Beta-oxidação peroxissomal	Acil-CoA oxidase	TcCLB.503561.20 TcCLB.504741.70
		Enoil-CoA hidratase peroxissomal	TcCLB.511277.60

Atualizada em 03.07.2019

1.5 As acil-CoA desidrogenase

O primeiro passo enzimático na beta-oxidação é catalisado por enzimas que pertencem a superfamília das acil-CoA desidrogenase (ACADs), que possuem um amplo espectro de substratos, incluindo os acil-CoA de cadeia ramificada (Y Ikeda, Okamura-Ikeda, and Tanaka 1985; Yasuyuki Ikeda, Dabrowski, and Tanakat 1983; Ghisla and Thorpe 2004; Pohl, Raichle, and Ghisla 1986).

O mecanismo de reação dessas enzimas (**Figura 6**) consiste em i. retirada do primeiro hidrogênio dos carbonos 2 ou 3 (C2, C3) pelo centro ativo Glu376-COO⁻; ii. transferência de

equivalentes reduzidos via FADH_2 até uma flavoproteína transportadora de elétrons (ETF) e para o pool de ubiquinonas, na cadeia transportadora de elétrons, (Ghisla and Thorpe 2004). Nove tipos de ACADs foram identificados até o momento. Cinco atuam na β -oxidação de lipídios (ACAD de cadeia curta, média, longa, muito longa I e II), três que atuam no terceiro passo da oxidação dos aminoácidos de cadeia ramificada (isovaleril-CoA desidrogenase, acil-CoA desidrogenase de cadeia ramificada, 2-metil-butiril-CoA desidrogenase) e a glutaril-CoA desidrogenase, que atua no metabolismo de lisina e triptofano (Ghisla and Thorpe 2004).

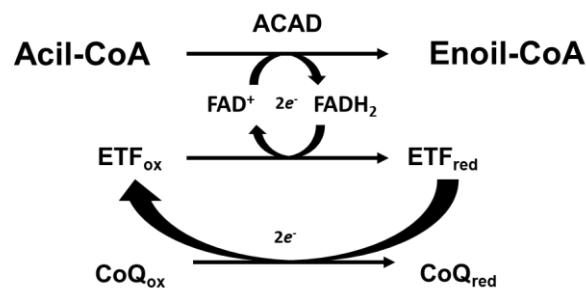


Figura 6: Esquema do mecanismo geral de reação das ACAD.

Como mencionado anteriormente, a beta-oxidação é importante para as formas amastigotas de *L. mexicana*. Nessas mesmas formas já foi detectada atividade ACAD utilizando diversos acil-CoA e foi visto que essa enzima provavelmente está localizada em frações mitocondriais (J D Berman et al. 1987). Em análises preliminares, foram encontradas duas sequências putativas para a acil-CoA desidrogenase de cadeia média (E.C 1.3.8.7) sob os números sistemáticos TcCLB.53509153.120 e TcCLB.53510303.290.

Todo esse conjunto de dados sugerem que o metabolismo de ácidos graxos tem um papel relevante na biologia do *T. cruzi*, principalmente na produção de energia para as formas presentes no inseto vetor (epimastigotas e tripomastigotas metacíclicos) e que a enzima acil-CoA desidrogenase desse parasita pode ter uma participação significativa na bioenergética do parasita, levando-nos a propor os seguintes objetivos:

Objetivo Geral:

Caracterizar a importância do metabolismo de ácidos graxos e da acil-CoA desidrogenase (1.3.8.7) para o *T. cruzi*.

Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar a participação de ácidos graxos na produção de energia pelo parasita.
- ✓ Avaliar o efeito de inibidores da degradação de ácidos graxos em processos biológicos do parasita, como proliferação, diferenciação e produção de ATP.
- ✓ Caracterizar bioquimicamente a TcACAD, determinar sua localização subcelular e seu padrão de expressão ao longo do ciclo de vida do *T. cruzi*.

2.1 Análise *in silico* das sequências putativas

Buscaram-se sequências putativas para as enzimas ACAD no genoma de *T. cruzi*, através da base de dados de tripanossomatídeos *TRITRYPDB* (<http://tritrypdb.org/tritrypdb/>). A identidade das respectivas sequências de aminoácidos encontradas e ortólogas presentes em outros organismos foram comparadas utilizando a ferramenta CLUSTAL Ômega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Sievers et al, 2011) e os resíduos conservados foram destacados com o uso da ferramenta ESPript 3.0 (<http://espript.ibcp.fr/ESPrIPT/ESPrIPT/>) (Robert; Gouet, 2014). Os domínios conservados foram buscados na base de dados INTERPROSCAN (<https://www.ebi.ac.uk/interpro>). Por último, parâmetros tais quais: ponto isoelétrico, peso molecular e composição de aminoácidos foram preditos via a ferramenta do *ProtParam* (<http://web.expasy.org/protparam/>).

2.2 Microorganismos utilizados e condições de crescimento

2.2.1 Célula hospedeira

Células *Chinese hamster ovary* (CHO-K₁) foram mantidas a 37 °C em meio RPMI 1640 (Cultilab) suplementado com 10% de soro fetal bovino (v/v) (SFB) (Vitrocell™) e acrescido de 0,15% NaCO₃, sob atmosfera úmida de 5% CO₂.

2.2.2 *Trypanosoma cruzi*

Neste trabalho foram utilizadas diferentes formas da Cepa CL, clone 14 (Brenner, Chiari, 1963).

2.2.2.1 Epimastigotas

As formas epimastigotas foram mantidas a 28 °C em fase exponencial de crescimento com passagens feitas a cada 48h utilizando o meio LIT (*Liver Infusion Tryptose*). Esse meio é composto por 5 g/L de infusão de fígado, 4 g/L de cloreto de sódio, 0,4 g/L de cloreto de potássio, 8 g/L de NaH₂PO₄, 2 g/L de glicose e 10 g/L de hemina dissolvida em 100 mM de NaOH, pH ajustado a 7,2 e é suplementado com 10% de SFB (v/v) (Vitrocell™) (Camargo, 1964).

2.2.2.2 Tripomastigotas metacíclicos

As formas metacíclicas foram obtidas a partir de formas epimastigotas em fase estacionária de crescimento foram incubados em meio TAU puro (190 mM NaCl, 17 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂, 8 mM tampão fosfato pH 6,0) em uma densidade de 5×10^7 p/mL por 2 h a 28 °C. Após esse período os parasitas foram transferidos a TAU-3AAG, que consiste em TAU puro suplementado com 2 mM de L-aspartato, 50 mM L-glutamato, 10 mM L-prolina e 10 mM de glicose, e incubados por cinco dias a 28 °C (Contreras et al. 1985). As formas metacíclicas foram purificadas via cromatografia de troca iônica em resina DEAE-celulose (Sigma[®]) (Teixeira; Yoshida, 1986). Ao final da purificação, os parasitas foram lavados duas vezes com tampão fosfato salino (PBS) (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄), pH ajustado a 8,0 e suplementado com 2% de glicose (PSG) e adicionados à resina previamente equilibrada com PSG, 5x o volume de coluna. Os parasitas foram suspensos em frações de 2 mL e a pureza de metacíclicos foi verificada por contagem em câmara de Neubauer.

2.2.2.3 Formas intracelulares

Amastigotas e epimastigotas intracelulares foram obtidos após o segundo e quarto dia de infecção sincrônica em CHO-K₁, respectivamente (Tonelli et al, 2004). A fim de extrair os parasitas, as células foram lisadas com a adição de 0,05% dodecil sulfato de sódio (SDS) (p/v). A ruptura das células foi acompanhada por microscopia de luz e assim que verificada a lise celular adicionou-se 20% de SFB (v/v). Então a suspensão celular foi centrifugada a 480 g por 5 min para eliminar os resíduos das células e o sobrenadante foi transferido a um novo tubo e centrifugado novamente (4300 g durante 10 min). O sedimentado contendo os parasitas foi resuspendido em RPMI com 10% de SFB (v/v) e contado em câmara de Neubauer para verificação de pureza.

2.2.2.4 Tripomastigotas

Os tripomastigotas diferenciados a partir de infecções em CHO-K₁ foram coletados do sobrenadantes de garrafas após o quinto dia de infecção. Os parasitas foram coletados por centrifugação e contados em câmara de Neubauer (Tonelli et al. 2004).

2.2.3 *Escherichia coli*

Para realizar as clonagens do DNA dos genes de interesse foi utilizada a cepa XL1-Blue, cujo genótipo é *ecA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' pro AB lacIq ZΔM15 Tn10 (Tet^r)]*. Para os ensaios de expressão das proteínas recombinantes foi utilizada a cepa BL21-Codon Plus, conhecida como BL21(DE3)-RIL (Stratagene[®]) que apresenta o seguinte genótipo: *F⁻ ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm⁺ Tetr gal endA Hte [argU ileY leuW Cam^r]* para a expressão da TcACAD. Todas essas cepas foram crescidas a 37 °C em meio Luria Bertani (LB) composto por 10 g/L de triptona, 5 g/L de extrato de levedura e 10 g/L de NaCl, e para meio sólido LB suplementado com 2% de ágar-base (p/v). De acordo com a necessidade, os seguintes antibióticos eram adicionados: 100 µg/mL ampicilina, 30 µg/mL canamicina (LB-K), 5 µg/mL tetraciclina (LB-T). Os clones positivos foram conservados em LB com 15% de glicerol (v/v) e armazenados a -80 °C.

2.3 Manipulação de DNA

2.3.1 Extração de DNA genômico de *T. cruzi*

A partir de formas epimastigotas foi obtido o DNA genômico de *T. cruzi* para realizar as clonagens dos fragmentos de interesse. Com essa finalidade, 5×10^7 p/mL epimastigotas foram lavados duas vezes com PBS gelado via centrifugação a 3000 g por 5 min a 4 °C, ressuspendidos em 200 µL de tampão de lise TES (200 mM Tris-HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS (p/v), pH 8,0) suplementado com 50 µg/mL de Proteinase K (QUIAGEN[®]) e incubados por 10 min a 56 °C. A seguir, a amostra foi tratada com 25 µg/mL de RNase A (Fermentas[®]) durante 1 h a 37 °C. Então, o DNA foi extraído via tratamento com 1 volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico na proporção 25:24:1 (v/v). A fase aquosa que continha o DNA foi separada por centrifugação a 6000 g durante 5 min a 4 °C. O DNA foi precipitado adicionando 1/10 volumes de 3 M acetato de sódio, pH 5,2, e 3 volumes de etanol absoluto. O DNA foi separado por centrifugação a 12000 x g por 15 min e o sedimentado lavado com 70% etanol (v/v). O DNA purificado foi ressuspendido em 100 µl de tampão TE (10 mM Tris-HCl, pH 7,6 e 1 mM EDTA).

2.3.2 Dosagem de DNA

O DNA foi quantificado por leitura de densidade ótica (DO) obtida a 260 e 280_{nm} com o espectrofotômetro *NanoDrop2000/2000c*, (software versão 1.4.2; *Thermo Scientific*), utilizando tampão TE como amostra de referência. Uma unidade de absorvância a DO₂₆₀ representou 50 µg/mL de DNA e ainda o valor a DO₂₈₀ foi correspondente à absorvância de proteínas contaminantes na amostra. Portanto, a razão DO₂₆₀/ DO₂₈₀ foi calculada para verificar a pureza do DNA, e foi considerada pura a amostra quando o valor desta razão se encontrava entre 1,8 - 2,0.

2.3.3 Amplificação de DNA por PCR

Baseada nas sequências previstas para a TcACAD (n° sistemáticos: TcCLB.510303.290) depositada no banco de dados, os iniciadores do gene correspondente foram sintetizados (**Tabela 2**). As reações de PCR continham 100 ng de DNA genômico (molde), 0,2 pmol/mL de oligonucleotídeos, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂, 1X de tampão de reação sem MgCl₂ (Fermentas[®]), 1 U de Taq DNA Polimerase (Fermentas[®]) e H₂O milli-Q. A condição de amplificação utilizada foi desnaturação inicial a 95 °C por 5 min, seguido por 35 ciclos: de desnaturação a 95 °C por 30 s, anelamento a 56 °C por 1 min, amplificação a 72 °C por 30 s e a extensão final a 72 °C por 10 min. Para a PCR de colônias, as mesmas foram coletadas das placas utilizando palitos estéreis e ressuspendidas em 20 µL de água estéril. A lise foi realizada por fervura a 100 °C durante 10 min. 2 µL desse extrato foram utilizados como molde para as reações de PCR. Os produtos de PCR obtidos foram purificados do gel de agarose utilizando o kit comercial GeneJET[®] (Thermo[®]) segundo as indicações do fabricante.

Tabela 2: Sequências de iniciadores utilizados para a clonagem e amplificação da TcACAD

Iniciador	Sequência 5' – 3'	Descrição
TcACAD <i>Bam</i> HI	<u>AAGATCC</u> ATGTTTCGTCATGCATCG	Clonagem S
TcACAD <i>Xho</i> I	AA <u>CTCGAGC</u> CTCCTTCCAATCAC	Clonagem AS

Os sítios de restrição indicam-se sublinhados. S: iniciadores sense, AS: iniciadores antisense.

2.3.4 Eletroforese em gel de agarose

A amplificação da sequência de interesse foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 1% (p/v) em tampão TAE 0,5X (0,04 M Tris, 1 mM EDTA, pH = 8,0 ajustado com ácido acético) e brometo de etídio na concentração final de 0,3 µg/mL. Ao fragmento de DNA amplificado, foi adicionado tampão de amostra (0,25% de azul de bromofenol; 0,25% de xileno cianol e 20% de glicerol). O padrão de peso molecular utilizado foi 1 kb DNA ladder (Thermo Scientific®). A corrida foi conduzida a 100 mM e o gel foi visualizado em transiluminador sob fonte de luz UV e fotografados em sistema *ImageQuant*® 300 (GE Healthcare, Pittsburg, PA, EUA).

2.3.5 Clonagem em vetor pGEM T-easy e subclonagem em vetor pET 24a(+)

O fragmento da TcACAD purificado do gel de agarose foi quantificado. Após disso, 20 ng do produto foram ligados em 50 ng do vetor pGEM T-Easy (razão molar 3:1, de inserto: vetor) utilizando 1 U de T4 DNA ligase (Promega®) e 1X do tampão ligase, seguindo indicações do fabricante. Para expressar a enzima recombinante de interesse em *E. coli*, foi realizada a subclonagem das sequências correspondentes em vetor de expressão pET24a(+). O fragmento correspondente ao gene TcACAD foi digerido com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Xho*I (2 U). A reação foi incubada por 16 h a 4 °C e a construção foi confirmada pelo tratamento com enzimas de restrição e análise dos fragmentos em gel de agarose. Além disso, a sequência clonada foi analisada por sequenciamento.

2.3.6 Transformação de bactérias competentes

As bactérias competentes foram incubadas com o produto da ligação por 30 minutos. Posteriormente, as células foram submetidas a choque térmico, a 42 °C durante 1 min e 30 s, para a inserção do DNA e logo em seguida foram armazenadas no gelo novamente por 5 min. Após o choque térmico, as células foram recuperadas pela adição de meio LB e incubadas durante 1 h a 37 °C, sob agitação constante (180 rpm). As células foram centrifugadas a 3000 x g por 5 min, ressuspendidas em 100 µl de meio LB fresco e então plaqueadas no meio LB sólido com o respectivo antibiótico. Para as bactérias que continham o plasmídeo pGEM-T easy, o meio foi suplementado com 0,5 mM isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e 0,2% (v/v) de 5-bromo-4-cloro-3-indolil β-galactopiranosídeo (X-Gal).

2.3.7 Extração de DNA plasmidial em pequena escala (Mini-prep)

O DNA plasmidial foi extraído pelo método de lise alcalina. Uma colônia isolada foi crescida em 3 mL de LB com o antibiótico correspondente, centrifugada a 3000 x g por 5 minutos, homogeneizada em 100 µL de solução GTE (25 mM Tris-HCl, 50 mM glicose, 10 mM EDTA, pH 8,0) contendo RNase A 100 µg/mL e incubada por 5 min a temperatura ambiente. Foram acrescentados 200 µl da solução NaOH/SDS (200 mM NaOH, 1% SDS p/v), misturada por inversão delicadamente e incubada durante 5 min no gelo. A reação foi equilibrada pela adição de 150 µl de solução de acetato de potássio (5 M acetato de potássio, pH 4,8), misturada vigorosamente e incubada por 5 min no gelo. Após esse período, a suspensão foi centrifugada a 6000 g por 10 minutos, e o sobrenadante foi transferido a um novo tubo. O DNA foi precipitado com 400 µL de isopropanol, novamente centrifugado a 6000 g por 20 minutos e lavado uma vez com etanol 70% (v/v) gelado. O DNA precipitado foi secado a temperatura ambiente e dissolvido em H₂O milli-Q estéril. A integridade do DNA extraído foi avaliada por eletroforese em gel de agarose.

2.3.8 Sequenciamento de DNA

As amostras de DNA foram precipitadas com 66% de isopropanol (v/v), homogeneizadas cuidadosamente, incubadas a temperatura ambiente por 15 min e centrifugadas a 15.000 x g durante 20 min. O DNA precipitado foi lavado com 75% de isopropanol (v/v), centrifugadas novamente na mesma condição e então foi secado a temperatura ambiente e protegido da luz. O DNA foi armazenado a -20°C para posterior uso. As reações de sequenciamento eram compostas de 100 ng de DNA plasmidial, reagente Big Dye[®] Terminator v3.1 (Applied Biosystems[®]), tampão Save Money (200 mM Tris-HCl, pH 9, 0,5 mM MgCl₂), 5 pmols dos oligonucleotídeos T7 *sense* e *anti-sense*, ou oligonucleotídeos específicos, e H₂O milli-Q. As reações foram analisadas em sequenciador automático ABI PRISM[®] 3100 Gene analyzer (Applied Biosystems) pelo método de Sanger. As sequências obtidas foram comparadas contra as bases de dados disponíveis para DNA de tripanossomatídeos mediante a busca por similaridade (BLASTN) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

2.4 Manipulação de proteínas

2.4.1 Expressão e purificação da TcACAD

A proteína recombinante TcACAD foi expressa em *E. coli*, fusionada a uma etiqueta de seis histidinas no extremo N-terminal. A construção pET24::TcACAD foi utilizada para transformar a cepa BL21(DE3)-RIL. Os clones positivos selecionados para cada construção foram crescidos durante 16 h a 37 °C (sob agitação de 180 rpm) em: na presença dos antibióticos canamicina (30 µg/mL) e tetraciclina (50 µg/mL). Então foram diluídos 1:100 nos respectivos meios e novamente postos a crescer nas mesmas condições. Quando as células chegaram a uma DO_{600nm} próxima de 0,4, as células passaram a ser mantidas a 25 °C ainda sob agitação (180 rpm). Quando a DO_{600nm} atingiu 0,6, 0,5 mM de IPTG foi acrescentado e a cultura permaneceu nas mesmas condições anteriormente descritas durante 16 h, a fim de induzir a TcACAD. Ao final da indução, as bactérias foram centrifugadas a 2.500 x g por 15 min e ressuspensas em 40 mL de tampão de ligação (20 mM Tris-HCl, pH 7,4; 500 mM NaCl e 5 mM de imidazole), seguindo a proporção 10 mL de tampão por cada 500 mL de cultura. Adicionou-se 1 mM de PMSF, 10 µg/mL de TLCK, 10 µM E-64 e 1 mg/mL de lisozima (Sigma[®]) para iniciar a lise bacteriana durante 30 min a 4 °C. Para a completa lise celular, a suspensão foi submetida a oito ciclos de sonicação (30 s *on/off* a 40% de potência em gelo). Em seguida, o lisado foi clarificado através da centrifugação a 20.000 x g por 30 min a 4 °C. Para purificar a enzimas recombinante, os lisados foram passados 3 vezes em 3 mL de resina níquel (Ni²⁺-NTA agarose, QUIAGEN[®]), previamente carregada com Ni²⁺ e equilibrada com tampão de ligação. Posteriormente, a resina foi lavada com 20 mL de mesmo tampão, com 40 mL de tampão de lavagem (igual ao tampão de ligação exceto na concentração de imidazol: 60 mM) e com 20 mL de tampão de lavagem com 100 mM de imidazol. A quantificação de concentração de proteína foi realizada pelo método de Bradford, utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão.

2.4.2 Eletroforese de proteínas em géis desnaturantes (SDS-PAGE)

As análises proteicas foram todas realizadas em géis de poliacríamida em condições desnaturantes. O gel de separação era composto de 0,375 M de tampão Tris-HCl, pH 8,8, 0,1% SDS (v/v), 10% de solução acrilamida:bisacrilamida [29:1 (p/v)] (BioRad Systems[®]) (v/v), H₂O destilada, 5 µl de Tetra-metil-etileno-diamina (TEMED) (Sigma[®]) e 0,05% persulfato de amônio (v/v). Após a polimerização (cerca de 30 min a temperatura ambiente), foi adicionado

o gel de empilhamento (0,125 M de tampão Tris-HCl, pH 6,8, 0,1% SDS (v/v), 5% de solução acrilamida:bis-acrilamida [29:1 (p/v)] (BioRad Systems®) (v/v), H₂O destilada, 5 µl de TEMED (Sigma®) e 0,05% persulfato de amônio (v/v). As amostras foram diluídas na proporção 4:1 em tampão de amostra (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8, 2,3% SDS (v/v), 10% glicerol (v/v), 0,01% azul de bromofenol (p/v) e 20 mM mercaptoetanol), fervidas 5 min a 95 °C e então aplicadas no gel. A eletroforese foi realizada com tampão de corrida [25 mM de Tris base, 192 mM glicina e 0,1% SDS (p/v)], aplicando uma voltagem constante de 120 V. As proteínas no gel foram coradas com solução de azul Coomassie [(0,1% *Coomassie blue R-250* (p/v), 50% metanol (v/v) e 10% ácido acético (v/v)] e descoradas com solução de descoloração [40% metanol (v/v) e 10% ácido acético (v/v)]. Os pesos moleculares das proteínas foram estimados de acordo com a separação dos marcadores *Precision Plus Protein™ Unstained Standards* e *Precision Plus Protein™ Kaleidoscope™ Prestained Protein Standards* (BioRad Systems®).

2.4.3 Preparação de extratos proteicos totais

Lisados celulares de todas as formas do ciclo de vida do *T. cruzi* foram utilizados a fim de detectar a atividade da proteína TcACAD, bem como outros marcadores e medir atividades enzimáticas. Parasitas em fase exponencial crescidas em meio LIT, durante 48 h a 28 °C foram coletados por centrifugação a 2.000 x g por 5 min a 4 °C e lavados duas vezes com tampão PBS gelado. Em seguida, foram homogeneizados em tampão de lise (20 mM Tris-HCl, pH 7,9, 0,25 M sacarose, 1 mM EDTA, 0,1% triton-X 100 (v/v), 1 mM PMSF e coquetel de inibidor de proteases (Sigma®). As células foram rompidas por sonicação mediante cinco ciclos (15 s *on/off* a 20% potência em gelo) ou por dois ciclos de congelamento instantâneo em nitrogênio líquido e descongelamento a 37°C. Após a centrifugação a 13.000 x g por 30 min a 4 °C, os sobrenadantes foram quantificados pelo método de Bradford e utilizados no respectivo ensaio.

2.4.4 Ensaio de permeabilização seletiva com digitonina

Epimastigotas em fase de exponencial de crescimento foram lavados duas vezes em PBS e ajustados à concentração de $6,5 \times 10^8$ parasitas (aproximadamente 30 mg) por amostra. Os parasitas foram ressuspensos em tampão TSEB [20 mM Tris-HCl pH = 7,6, 0,25 M sacarose, 1 mM EDTA e a diluição de 1:1.000 de coquetel de inibidores de proteases (Sigma-Aldrich®)] suplementado com concentrações crescentes de digitonina (0 a 5 mg.mL⁻¹). Os parasitas foram tratados com digitonina durante 5 min a 28 °C e centrifugados por 10 min a

18.000 x g, a 4 °C. Os sobrenadantes foram separados e mantidos em gelo. Os precipitados foram ressuspensos em 0,5 mL de tampão TSEB e submetidos a sonicação (4 pulsos de 30 segundos on/off, a 30% de potência). As atividades enzimáticas correspondentes as enzimas Piruvato quinase (EC: 2.7.1.40), Hexoquinase (EC), Prolina desidrogenase (EC) foram utilizadas como controles citosólico, glicossomal e mitocondrial, respectivamente. As medições de atividades nos diferentes extratos obtidos foram feitas segundo os protocolos descrito na **seção X**. A atividade enzimática foi expressa em % de atividade, a partir da subtração da atividade na fração insolúvel (precipitado) da fração solúvel (sobrenadante), tendo como 100% a atividade medida no extrato total (não tratado com digitonina).

2.4.5 Preparação de frações celulares por abrasão em carburo de silício

Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram lavados inicialmente com o tampão A: (0,225 M de sacarose, 20 mM de KCl, 10 mM de KH₂PO₄, 5 mM de MgCl₂, 1mM de Na₂EDTA, 20 mM de Tris-HCl, pH = 7,2), ressuspensos e lavados com o tampão B: (0,25 M de sacarose, 1 mM de Na₂EDTA, 25 mM de Tris-HCl, pH 7,4). As células e o carburo de silício (relação 1:1 (p/p)) foram transferidos para um almofariz previamente esfriado, foi adicionado um pequeno volume de tampão B suplementado com um coquetel de inibidores de proteases (1 µM peptatina, 0,165 µM antipaina, 5 µM leupeptina, 100 µM TLCK, 500 µM PMSF, 2,8 µM E-64 e 100 µM EDTA). As células foram quebradas por abrasão até cerca de 90% de quebra (monitorado por microscopia de luz). O carburo de silício foi eliminado por centrifugação a 150 x g a 4 °C por 3 min (Quinones et al., 2004). Para continuar com o fracionamento subcelular, os lisados obtidos anteriormente foram submetidos a centrifugação diferencial. Ao final do processo, foram obtidos: Homogenato (H), livre de núcleos e parasitas inteiros (1.500 x g, 5 min.); Fração Granular Grossa (FGG) - fração rica em vesículas de mitocôndria (6000 x g, 10 min.); Fração rica em Glicossomos (FRG), (45.000 x g, 15 min.); Fração Microsomal (FM), (105.000 x g, 60 min.) e Fração Citosólica (C), o sobrenadante da ultracentrifugação (Barros-Alvarez et al., 2014; Quinones et al., 2004). Foram avaliadas nessas frações marcadores enzimáticos, para determinar a separação dos componentes subcelulares. Para a fração mitocondrial foi avaliada a atividade de Isocitrato desidrogenase (IDH); para os glicossomos, as atividades Hexoquinase (HK); e para o citosol, a atividade Piruvato quinase (PK), como descrito na **Seção X**. As frações foram solubilizadas em tampão Tris-HCl pH = 7,6 com 150 mM de NaCl.

2.4.6 Western blot

As amostras resolvidas em gel SDS-PAGE foram transferidas a membranas de nitrocelulose Hybond-C Extra (GE Healthcare®) através do sistema de transferência úmido (BioRad Systems®) de acordo a instruções do fabricante. Ao término da transferência as proteínas na membrana foram coradas com solução de vermelho Ponceau [0,5% vermelho Ponceau (p/v) dissolvido em 10% ácido acético (v/v)] e lavadas com água. Em seguida, a membrana foi bloqueada em solução de 0,05% PBS-Tween-20 (v/v) (PBS-T) acrescentada de 5% leite desnatado (p/v), por 1 h ou mais, em constante agitação. Após o bloqueio, a membrana foi incubada por 2 h a temperatura ambiente com o anticorpo primário, diluído em PBS-T com 3% de leite desnatado (p/v) nos correspondentes títulos (anti-6xHis 1:1.500). Posteriormente, as membranas foram lavadas três vezes por 5 min em PBS-T, e incubadas durante 40 min com anticorpo secundário, conjugado a *horseradish peroxidase* (HRP) (GE Healthcare®) diluído 1:5.000 em PBS-T com 3% de leite desnatado (p/v). A seguir, duas lavagens sucessivas com PBST durante 5 min cada, e uma terceira com PBS por 15 min foram realizadas. Os sinais de reatividade foram revelados por quimiluminescência utilizando o kit *SuperSignal® West Pico Chemiluminescent* (Thermo Scientific®) de acordo as instruções do fabricante. A reação foi exposta em filme de raio-X e revelada com soluções reveladora e fixadora, seguindo indicações do fabricante (Kodak®).

2.5 Ensaio bioquímicos

2.5.1 Caracterização bioquímica da TcACAD

A atividade da TcACAD foi avaliada em extratos celulares totais de *T. cruzi* assim como através da enzima recombinante por espectrofotometria a $\lambda = 600$ nm, a partir da redução do corante 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP). O DCPIP é um aceptor de elétrons que diminui a intensidade de coloração a medida que é reduzido. O *mix* de reação foi preparado em tampão MOPS (pH = 8,0), com a adição de 0,26 mM de metossulfato de fenazina (PMS), 0,1 mM de FAD+ e 0,1 mM de DCPIP (coeficiente de extinção molar de $21 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$) (Paes et al. 2013). Para a proteína recombinante adicionamos glicerol na concentração final de 10% do volume de reação. Os substratos utilizados nesses ensaios foram o isovaleril-CoA (éster do alfa-cetoácido da leucina), butiril-CoA (C4:0), isobutiril-CoA (éster do alfa-cetoácido da valina), lauroil-CoA

(C12:0), palmitoil-CoA (C16:0) e estearoil-CoA (C18:0). Para especificidade de cofator foram utilizados FAD, NAD⁺ e NADP⁺ na concentração final de 0.1 mM.

Alternativamente, a atividade da TcACAD foi medida utilizando o método fluorescente Amplex Red®. A atividade foi montada no mesmo esquema, com a adição de 12 µM do reagente Amplex Red, acoplado à atividade da enzima peroxidase. As leituras foram realizadas em fluorímetro de placas, num volume final de 0,2 mL, nos comprimentos de onda $\lambda_{exc} = 563$ nm e $\lambda_{em} = 587$ nm. Os valores de fluorescência foram convertidos a concentração molar usando uma curva padrão feita com diferentes concentrações de H₂O₂.

2.5.2 Outras atividades enzimáticas

2.5.2.1 Hexoquinase (HK)

A HQ foi utilizada como marcador glicossomal. Sua atividade foi determinada via atividade acoplada da glicose-6-fosfato desidrogenase (Sigma®), a qual utiliza o 6-fosfo-D-gluconato produzido pela HQ, para a redução de NADP⁺ que é detectada. Nesse ensaio a reação continha: 50 mM de tampão Tris-HCl pH 7,6, 8,0 mM de D-glicose, 9,6 mM de ATP (Amresco®), 19 mM MgCl₂, 0,1 mM de NADP⁺ e 5 U/mL da enzima (Caceres, A, 2003). A reação era iniciada pela adição de 100 µg de extrato celular total de parasitas e monitorada por 5 min a 28 °C. O branco da reação foi realizado com a mesma preparação sem a adição de glicose.

2.5.2.2 Piruvato quinase (PK)

O ensaio de atividade da enzima PQ, que utilizamos como marcador de localização citoplasmática, também foi medido via a atividade acoplada. A PQ transfere um grupo fosfato do fosfoenolpiruvato (PEP) para a adenosina difosfato (ADP), gerando ATP e piruvato, que por sua vez é convertido a lactato pela lactato desidrogenase (LDH) via a oxidação de NADH, medido a λ_{340nm} . A reação era composta por 39 mM de tampão fosfato de potássio (pH = 7,6), 0,58 mM de PEP, 0,11 mM de NADH (Sigma®), 6,8 mM de MgSO₄ (Sigma®), 1,5 mM de ADP, 10 U de LDH (Sigma®) (Cazzulo, 1989) e 100 µg de extrato celular total de parasitas que foi adicionado para iniciar a reação. O branco da reação era a mesma preparação sem a adição de PEP. As V₀ foram monitoradas por 3 min a 28 °C.

2.5.2.3 Prolina desidrogenase (PRODH)

A atividade da PRODH foi medida via redução do corante diclorofenolindofenol (DCPIP) como aceptor de elétron. A reação continha: 25 mM MOPS pH 7,0, 11 mM MgCl₂, 0,26 mM de metossulfato de fenazina, 56 μM de DCICP e 60 μM de L-prolina (Lamour, 2005). Após a adição do extrato celular de parasitas, a redução do DCPIP era acompanhada a $\lambda_{600\text{nm}}$ durante 5 min a 28 °C. As V₀ foram calculadas utilizando o utilizando o $\epsilon_{\text{DCPIP}} = 21 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.5.2.4 CPT1

Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes em PBS 1X (1.000 x g, 5 min a 4 °C), ressuspendidos em tampão TRIS-EDTA (100 mM, 2,5 mM e 0,1%

Triton X-100) com inibidores de protease. Em cada experimento foi utilizado 0,1 mg de proteína. A mistura da reação continha 0,1 mM de L-carnitina, concentrações variadas de palmitoil-CoA e 2,5 mM de DTNB diluído em tampão de reação sem detergente. A atividade da CPT1 foi medida espectrofotometricamente a 412 nm, a partir da reação do DTNB com os grupos CoASH livres na reação, formando o íon TNB⁻. Para calcular a atividade específica, os valores de absorbância foram convertidos em molar usando o coeficiente de extinção molar do TNB⁻ de 12.000 M⁻¹.s⁻¹.

2.5.2.5 Acetil-CoA carboxilase (ACC)

A atividade da ACC foi medida espectrofotometricamente pela reação acoplada à citrato sintase (CS), detectando a formação de CoASH a partir da síntese de citrato, dependente da disponibilidade de acetil-CoA não consumido na reação da ACC (relação inversamente proporcional). A atividade foi medida em dois passos. Inicialmente, tampão de reação continha 100 mM de fosfato de potássio (pH = 8,0), 15 mM KHCO₃, 5 mM MnCl₂, 5 mM ATP, 1 mM acetil-CoA e 10 nM de biotina. A reação foi iniciada pela adição de 0,1 mg de proteína e incubada a 28 °C, durante 15 minutos. A primeira reação foi parada pela adição de ácido perclórico 20% (v/v) e centrifugada a 10.000 x g a 4 °C. A segunda reação continha 0,1 mL do sobrenadante resultante da primeira reação, 20 mM oxaloacetato e 0,5 mM de DTNB, diluído em tampão TRIS-EDTA (100 mM/2,5mM, pH = 8,0). A reação foi iniciada com a adição de

0,5 U da enzima citrato sintase (Sigma Aldrich ®). Para calcular a atividade específica, os valores de absorvância foram convertidos em molar usando o coeficiente de extinção molar do TNB⁻ de 12.000 M⁻¹.s⁻¹.

2.5.2.6 Serina palmitoiltransferase (SPT)

A atividade da SPT foi medida espectrofotometricamente a 412 nm usando o mesmo método para medir a atividade da CPT1. A mistura de reação continha 0,5 mM serina, 0,1 mM de palmitoil-CoA.

2.5.2.7 Redução de citocromo *c*

A redução de citocromo *c* a partir de palmitoil-CoA foi avaliada em uma mistura de 1 mL que continha tampão Tris-HCl 50 mM pH 8,5, FAD 0,5 mM, 0,5 mg/mL de citocromo *c* comercial (Sigma Aldrich ®) e 0,3 mM de palmitoil-CoA. Como controle positivo foi utilizado 5 mM de prolina (Paes et al, 2013). A reação foi monitorada por espectrofotometria a 550 nm, a 28 °C, durante 15 min. A porcentagem de redução foi calculada a partir da redução total do conteúdo de citocromo *c* usando 2 mM DTT.

2.6 Quantificação de glicose e triglicerídeos

Meio LIT de cultura de epimastigotas previamente sincronizadas foi coletado por centrifugação (10.000 x g) e analisado usando kits comerciais seguindo as instruções dos fabricantes. Glicose e triglicerídeos foram medidos usando kits da Bioclin ®.

2.7 Avaliação da importância dos ácidos graxos para o *T. cruzi*

2.7.1 Viabilidade de formas epimastigotas

2.7.1.1 Viabilidade por MTT

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes com PBS (10 min, 1.100 x g a 4 °C). Os parasitas, 3×10^7 .mL⁻¹, foram ressuspensos em PBS suplementado com 100 µM de palmitato:BSA, 5 mM de glicose, 5 mM histidina ou apenas PBS (controle). Após 24 e 48 h, a viabilidade celular foi acessada utilizando o método de MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil bromuro tetrazol) (Mosmann, 1983). Os parasitas foram lavados uma vez com PBS, o pellet foi ressuspensado em 300 µL de PBS e distribuídos em placas de 96 poços. Foi adicionado 20 µL de MTT (5 mg/mL) e a placa foi incubada a 28 °C, protegida da luz, por 3 horas. Após esse período, a reação foi parada com a adição de 100 µL de SDS 10%. A viabilidade das células foi avaliada mediante leituras de absorvância, a partir da formação da cor azul de *formazan*. As placas foram lidas em espectrofotômetro de placa, utilizando $\lambda_1 = 595$ nm e como referência $\lambda_2 = 690$ nm. Os resultados foram expressos pela subtração $\lambda_1 - \lambda_2 = \lambda_T$.

2.7.1.2 Viabilidade por Alamar Blue®

A fim de também avaliar a viabilidade dos parasitas quando submetidos a estresse nutricional em PBS, formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram crescidas nas condições normais, lavadas duas vezes em PBS (1.100 x g, 5 min a 4 °C) e transferidas para o mesmo tampão de lavagem e incubadas durante diferentes intervalos de tempo (24 h e 48 h) na presença (ou não) dos mesmos substratos energéticos (5 mM glicose ou 5 mM histidina). A viabilidade foi acessada pelo método de redução irreversível da rezasurina à resorufina (Alamar Blue assay, Alamar Biosciences, Sacramento, CA, USA). Em placas de 96 poços, 100 µL de amostras foram distribuídas em triplicata e, a cada tempo, foi adicionado 0,125 µg.mL⁻¹ do corante rezasurina. A reação foi incubada por 2 h a 28 °C, protegida da luz. A fluorescência foi mensurada a partir dos comprimentos de onda $\lambda_{exc} = 530$ nm e $\lambda_{em} = 590$ nm. Os dados foram obtidos em leitor de placas SpectraMax®i3 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) e ajustados pelo número de células em cada amostra.

2.7.2 Captura de CO₂ emitido pela oxidação de [U-¹⁴C] palmitato em epimastigotas de T. cruzi

Formas epimastigotas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes, ressuspensos em PBS e incubados na presença de 100 µM de solução palmitato-BSA marcada com 0,5 µCi de [U-¹⁴C] palmitato, 10 µM L-carnitina, durante diferentes tempos (0, 30, 60, 120, 180) a 28 °C. Para capturar o CO₂ liberado pela oxidação de palmitato via TCA, foi

utilizado papel *Whatman* (2 x 2 cm) umedecido com KOH 2 M, colocado na parte superior de um tubo eppendorf, onde foram incubados os parasitas. A formação de $K_2^{14}CO_3$ no papel foi medida no contador de cintilação.

2.7.3 Avaliação dos níveis de ATP intracelular

Para avaliar os níveis de ATP intracelular em formas epimastigotas de *T. cruzi*, foi utilizado o kit de bioluminescência (luciferase) para células somáticas, Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). Os parasitas em fase exponencial de crescimento foram lavados duas vezes em PBS e incubados por 24 e 48 h na presença de 100 μ M de palmitato:BSA, 5 mM de glicose, 5 mM histidina, apenas PBS e LIT (controle). Após a incubação, a concentração de células foi ajustada para 1×10^7 e os parasitas foram lavados duas vezes em PBS (10 000 x g por 2 min a 4 °C) e ressuspensos em 200 μ L de tampão de lise + 200 μ L de PBS. O lisado foi distribuído em placas de 96 poços, 50 μ L por poço, e foi adicionada a enzima luciferase. Os níveis intracelulares de ATP foram avaliados por luminescência, baseado na reação entre a enzima luciferase e o ATP, emitindo luz a $\lambda = 570$ nm (Martins, Covarrubias et al., 2009). A concentração intracelular de ATP foi calculada a partir de uma curva de calibração com diferentes concentrações de ATP. A normalização foi feita com a quantidade de células em cada poço.

2.7.4 Estresse nutricional severo em PBS

Para avaliar a resistência de formas epimastigotas a privação total de nutrientes, parasitas em fase de crescimento exponencial, crescidos em meio LIT, foram lavados duas vezes em PBS, ressuspensos no mesmo tampão, sem a adição de nenhum substrato energético. A concentração de células foi ajustada a 1×10^7 .mL⁻¹. Os parasitas foram mantidos a 28°C por um período de 5 dias. A viabilidade dos parasitas foi avaliada a cada 24 h pelo método de redução da rezasurina.

2.7.5 Sincronização da proliferação em formas epimastigotas

Para avaliar o metabolismo de ácidos graxos em diferentes momentos da curva de proliferação de formas epimastigotas, as culturas em fase exponencial de crescimento foram diluídas para 1×10^7 células.mL⁻¹ em meio LIT e mantidas a 28 °C durante dois dias, até atingir

a fase exponencial ($\sim 5 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$). Essa mesma cultura foi dividida em três, onde (1) ajustadas para $1 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$, para atingir a concentração de $2,5 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$ em 24 h, (2) Ajustada para $5,0 \times 10^7 \cdot \text{mL}^{-1}$, para atingir a exponencial em 24 h e (3) não diluída, para atingir a fase estacionária ($\sim 1 \times 10^8 \cdot \text{mL}^{-1}$).

2.7.6 Marcação de ácidos graxos com *BODIPY*® 500/510 C₁-C₁₂

2.7.6.1 Citometria de fluxo

Formas epimastigotas previamente sincronizadas para estarem nas diferentes densidades mencionadas anteriormente foram distribuídas em placas de 24 poços. Cada poço foi tratado com $2 \mu\text{M}$ do fluoróforo *BODIPY*® 500/510 C₁-C₁₂ e as células foram mantidas a 28°C durante 16 h. Após o período de incubação, as células foram retiradas da placa, lavadas duas vezes em PBS ($1.000 \times g$, 5 min a 4°C) e ressuspensas em $500 \mu\text{L}$ do mesmo tampão e mantidas em gelo. A fluorescência foi avaliada por citometria de fluxo (Fortessa, DB), utilizando dois filtros: FITC para ácidos graxos livres e PE para detecção de acúmulo de ácidos graxos (inclusões lipídicas).

2.7.6.2 Microscopia de fluorescência

Assim como feito para as análises por citometria de fluxo, os parasitas foram sincronizados e tratados com $2 \mu\text{M}$ do fluoróforo *BODIPY*® 500/510 C₁-C₁₂ e as células foram mantidas a 28°C durante 16 h. Após o período de incubação, as células foram lavadas suas vezes com PBS ($1.000 \times g$, 5 min a temperatura ambiente) e ressuspensas no mesmo tampão, na presença do marcador mitocondrial *MitoTracker Deep Red*® (diluição 1:1.000) e mantidas a 28°C durante 30 min. Após duas lavagens em PBS ($1.000 \times g$, 5 min a temperatura ambiente) e distribuídas em placas de Petri previamente tratadas com poli-L-lisina. As células foram fotografadas em microscópio (**DMI6000B/AF6000 microscope (Leica) com câmera DFC 365 FX acoplada**) usando os filtros cinza para fase, verde para ácidos graxos livres, amarelo para inclusões lipídicas e vermelho para marcação de mitocôndria.

2.7.7 Marcação de inclusões lipídicas com *Nile Red*®

Para avaliar o consumo de inclusões lipídicas ao em formas epimastigotas, os parasitas em fase exponencial de crescimento foram submetidos a estresse nutricional em PBS por diferentes períodos de tempo. Paralelamente, também avaliamos o consumo de inclusões lipídicas em diferentes momentos da curva de proliferação, com parasitas mantidos em meio LIT. Alíquotas da cultura ($\sim 5 \times 10^7$ parasitas.mL⁻¹) foram lavadas duas vezes em PBS (1.000 x g por 5 min) e fixadas em paraformaldeído 4% (v/v) por 10 min a temperatura ambiente, lavados duas vezes em PBS e ressuspensas no mesmo buffer. Após as lavagens, foi adicionado *Nile Red* na concentração final de 10 µg.mL⁻¹. As amostras foram incubadas por 15 min a temperatura ambiente e protegidas da luz, lavadas duas vezes em PBS 1.000 x g, 5 min a 4 °C, e distribuídas 100µL por poço em placas escuras de 96 poços. A fluorescência foi medida nos comprimentos de onda $\lambda_{exc} = 485$ nm; $\lambda_{em} = 530$ nm. Após cada leitura de fluorescência, os parasitas foram redistribuídos para placas de 96 poços transparentes para leituras de absorvância a $\lambda = 620$ nm. A normalização dos dados obtidos foi feita por número de células, a partir de uma curva de calibração com concentrações conhecidas de parasitas.

2.8 Avaliação do efeito de inibidores do metabolismo de ácidos graxos

2.8.1 Formas epimastigotas

2.8.1.1 Curvas de proliferação

Para avaliar o efeito de inibidores de metabolismo de ácidos graxos em formas epimastigotas, parasitas em fase de crescimento exponencial (aproximadamente 5×10^7 .mL⁻¹) foram utilizados. As células foram ajustadas para a concentração inicial de $2,5 \times 10^6$.mL⁻¹ e foram tratadas com diferentes concentrações dos compostos em meio LIT e distribuídas em placas de 96 poços. Como controle positivo os parasitas foram tratados com rotenona (60 µM) e antimicina A (0,5 µM). Como controle negativo, os parasitas não receberam tratamento. As placas foram mantidas a 28 °C. A proliferação dos parasitas foi estimada diariamente por leituras de absorvância da densidade ótica (DO) a $\lambda = 620$ nm, durante 8 dias. Os valores de densidade celular foram obtidos a partir da conversão da absorvância do dia, usando uma equação de regressão linear obtida previamente, a partir de diferentes concentrações de parasitas.

2.8.1.2 Viabilidade dos parasitas tratados com inibidores do metabolismo de ácidos graxos

A viabilidade dos parasitas tratados foi avaliada após 24 e 48 horas de tratamento. Formas epimastigotas de *T. cruzi* (em crescimento exponencial) foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em PBS ou PBS suplementado com glicose e histidina ou em combinação com os inibidores. Após a incubação, os parasitas foram lavados duas vezes e distribuídos em placas de 96 poços e a viabilidade acessada a partir do método de MTT.

2.8.1.3 Morte celular

Os parasitas foram tratados com apenas uma concentração de inibidor em LIT, no mesmo esquema das curvas de proliferação, durante 5 dias. Após o período de incubação, foram lavados uma vez em tampão anexina (HEPES 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 5 mM, pH = 7,4), ressuspensas no mesmo tampão e foi adicionado iodeto de propídio, na concentração final de 1 µg/mL, e 1 µM de anexina, conforme indicações do fabricante, e incubados em gelo durante 15 min. A reação foi diluída a partir da adição de 450 µL de tampão anexina e as células foram analisadas por citometria de fluxo (Guava).

2.8.1.4 Ciclo celular

Os parasitas foram tratados com apenas uma concentração do inibidor durante 5 dias. Os parasitas foram lavados uma vez com PBS e ressuspensos em 100 µL de tampão de lise (tampão fosfato (Na₂HPO₄) 7 mM, KH₂PO₄ 2,3 mM; pH = 7,4) e digitonina (64 µM). Os parasitas foram incubados em gelo por 30 min. Após a incubação, foi adicionado 100 µL de uma solução de iodeto de propídio (20 µg/mL). As amostras foram analisadas por citometria de fluxo (Guava).

2.8.1.5 Consumo de oxigênio em parasitas tratados com inibidores de degradação de ácidos graxos

Para avaliar as taxas de respiração em parasitas que foram tratados com inibidores de degradação de ácidos graxos, formas epimastigotas em crescimento exponencial, tratadas durante 5 dias com uma concentração não letal de inibidor foram lavadas duas vezes em PBS e ressuspensas em tampão de respiração (MRC: 125 mM sacarose, 65 mM KCl, 10 mM

HEPES-NaOH, pH = 7,2, 1 mM MgCl₂, 2 mM K₂HPO₄). Posteriormente foram adicionados de forma sequencial Oligomicina A (5 µg/mL) e FCCP (0,5 µM). As taxas de consumo de oxigênio foram medidas utilizando células íntegras no oxígrafo de alta resolução (OROBOROS, Oxygraph-2k, Innsbruck, AU).

2.8.2 Efeito dos inibidores de degradação de ácidos graxos na metaciclogênese

2.8.2.1 Viabilidade por Alamar Blue®

A diferenciação das formas epimastigotas em fase estacionária para formas metacíclicas foi iniciada como descrito anteriormente e os parasitas foram incubados em TAU-3AAG ou TAU-Pro e tratados com diferentes concentrações de inibidor. Os parasitas foram distribuídos na concentração final de 1×10^6 parasitas por poço em placas de 96 poços. Após 24 horas de tratamento, foi adicionado rezasurina, na concentração final de 0,125 µg/mL e incubados por 2 h a 28 °C, protegidos da luz. A viabilidade celular foi avaliada a partir da intensidade de fluorescência obtida após leituras em fluorímetro de placas, nos comprimentos de onda $\lambda_{exc} = 530$ nm e $\lambda_{em} = 590$ nm (Anoopkumar-Dukie, Carey et al, 2005).

2.8.2.2 Efeito dos inibidores na metaciclogênese

A diferenciação foi feita como descrito anteriormente, na presença de variadas concentrações de inibidor até uma concentração máxima que não afetasse a viabilidade das células. Os parasitas foram contados por 5 dias em câmara de Neubauer e a diferenciação foi avaliada por porcentagem de metacíclicos em cada condição avaliada.

Capítulo 5 – Conclusões

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

- ✓ Formas epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de incorporar e metabolizar palmitato a acetil-CoA, gerando CO₂. A produção de CO₂ a partir de palmitato é aumentada quando comparadas as fases exponencial e estacionária.
- ✓ A presença de glicose inibe o metabolismo de ácidos graxos.
- ✓ O consumo de triglicerídeos do meio e diminuição de inclusões lipídicas é diretamente proporcional à diminuição da concentração de glicose presente no meio de cultura.
- ✓ Os níveis de atividades da enzima CPT1 em formas epimastigotas aumenta em comparação às fases exponencial e estacionária. Esse aumento de atividade é acompanhado pela diminuição da atividade da síntese *de novo* de ácidos graxos via ACC e também pela diminuição da atividade da HK.
- ✓ O ETO interfere no consumo de ácidos graxos via inibição da CPT1 de *T. cruzi*. Essa inibição impede a proliferação de formas epimastigotas a partir do momento que atingem a fase exponencial de crescimento, sugerindo que a degradação dos ácidos graxos é importante para sustentar a proliferação até a fase estacionária.
- ✓ O ETO não causa morte celular e faz com que as formas epimastigotas estacionem na fase G1 do ciclo celular, sugerindo que sem o consumo de ácidos graxos há interferências na progressão desse ciclo.
- ✓ O tratamento com ETO impede o consumo de ácidos graxos, diminuindo as taxas de consumo de oxigênio, o conteúdo de ATP intracelular e também a capacidade respiratória de reserva. Além disso, os parasitas apresentam menor viabilidade quando submetidos ao estresse nutricional severo em PBS.
- ✓ Os parasitas em metaciclogênese são menos resistentes ao tratamento com ETO e inibição da degradação de ácidos graxos interfere na eclosão de formas metacíclicas.
- ✓ O genoma de *T. cruzi* possui uma sequência que codifica para acil-CoA desidrogenase.
- ✓ Diferentemente de outros organismos, essa ACAD de *T. cruzi* demonstra atividade com acil-CoA de diferentes tamanhos de cadeia, incluindo ramificados.
- ✓ A TcACAD é uma enzima que está associada a membranas mitocondriais. Não conseguimos mostrar atividade de uma acil-CoA oxidase, mas encontramos atividade TcACAD em frações glicosomais.
- ✓ A atividade da TcACAD transfere elétrons para a CTE, alimentando a fosforilação oxidativa. Além disso, a TcACAD pode atuar como uma fonte de produção de espécies reativas de oxigênio mitocondrial em *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

- Acosta, Héctor, Richard Burchmore, Christina Naula, Melisa Gualdrón-López, Ender Quintero-Troconis, Ana J. Cáceres, Paul A.M. Michels, Juan Luis Concepción, and Wilfredo Quiñones. 2019. “Proteomic Analysis of Glycosomes from *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 229 (April): 62–74. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2019.02.008>.
- Acosta, Héctor, Michel Dubourdiou, Wilfredo Quiñones, Ana Cáceres, Frederic Bringaud, and Juan Luis Concepción. 2004. “Pyruvate Phosphate Dikinase and Pyrophosphate Metabolism in the Glycosome of *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* 138 (4): 347–56. <https://doi.org/10.1016/J.CBPC.2004.04.017>.
- ADL, SINA M., ALASTAIR G. B. SIMPSON, MARK A. FARMER, ROBERT A. ANDERSEN, O. ROGER ANDERSON, JOHN R. BARTA, SAMUEL S. BOWSER, et al. 2005. “The New Higher Level Classification of Eukaryotes with Emphasis on the Taxonomy of Protists.” *The Journal of Eukaryotic Microbiology* 52 (5): 399–451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>.
- Aeberhard, Ernesto E, Mirta G De Lema, and Della I H Bronia. 1989. “Biosynthesis of Fatty Acids by *Trypanosoma Cruz.*” <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2FBF02534910.pdf>.
- Allmann, Stefan, and Frédéric Bringaud. 2017. “Glycosomes: A Comprehensive View of Their Metabolic Roles in *T. Brucei*.” *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.01.015>.
- Allmann, Stefan, Muriel Mazet, Nicole Ziebart, Guillaume Bouyssou, Laetitia Fouillen, Jean-William Dupuy, Marc Bonneau, Patrick Moreau, Frédéric Bringaud, and Michael Boshart. 2014. “Triacylglycerol Storage in Lipid Droplets in Procyclic *Trypanosoma Brucei*.” Edited by Frank Voncken. *PLoS ONE* 9 (12): e114628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114628>.
- Almeida-de-Faria, M, E Freymuller, W Colli, and M J Alves. 1999. “*Trypanosoma Cruzi*: Characterization of an Intracellular Epimastigote-like Form.” *Exp Parasitol* 92 (4): 263–74. <https://doi.org/10.1006/expr.1999.4423>.
- Antunes, Lcm, J Han, J Pan, Cjc J C Moreira, and P Azambuja. 2013. “Metabolic Signatures of Triatomine Vectors of *Trypanosoma Cruzi* Unveiled by Metabolomics.” *PLoS ONE* 8 (10): 77283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077283>.
- Antunes, Luis Caetano M, Jun Han, Jingxi Pan, Carlos J C Moreira, Patrícia Azambuja, Christoph H Borchers, and Nicolas Carels. 2013. “Metabolic Signatures of Triatomine Vectors of *Trypanosoma Cruzi* Unveiled by Metabolomics.” *PloS One* 8 (10): e77283. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077283>.
- Bakker, Barbara M., Paul A. M. Michels, Fred R. Opperdoes, and Hans V. Westerhoff. 1997. “Glycolysis in Bloodstream Form *Trypanosoma Brucei* Can Be Understood in Terms of the Kinetics of the Glycolytic Enzymes.” *Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3207–15. <https://doi.org/10.1074/JBC.272.6.3207>.

- Bakker, Barbara M, † ‡ Femke, I C Mensonides, Bas Teusink, Pim Van Hoek, Paul A M Michels, and Hans V Westerhoff. 1999. "Compartmentation Protects Trypanosomes from the Dangerous Design of Glycolysis." www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.030539197.
- Barisón, M J, F S Damasceno, B S Mantilla, and A M Silber. 2016. "The Active Transport of Histidine and Its Role in ATP Production in *Trypanosoma Cruzi*." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 48 (4): 437–49. <https://doi.org/10.1007/s10863-016-9665-9>.
- Barison, M J, L N Rapado, E F Merino, E M Furusho Pral, B S Mantilla, L Marchese, C Nowicki, A M Silber, and M B Cassera. 2017. "Metabolomic Profiling Reveals a Finely Tuned, Starvation-Induced Metabolic Switch in *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes." *J Biol Chem* 292 (21): 8964–77. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.778522>.
- Battaile, Kevin P, JoAnn Molin-Case, Rosemary Paschke, Ming Wang, Dennis Bennett, Jerry Vockley, and Jung-Ja P Kim. 2002. "Crystal Structure of Rat Short Chain Acyl-CoA Dehydrogenase Complexed with Acetoacetyl-CoA: Comparison with Other Acyl-CoA Dehydrogenases." *The Journal of Biological Chemistry* 277 (14): 12200–207. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111296200>.
- Berman, J D, J V Gallalee, J M Best, and T Hill. 1987. "Uptake, Distribution, and Oxidation of Fatty Acids by *Leishmania Mexicana* Amastigotes." *The Journal of Parasitology* 73 (3): 555–60. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3037056>.
- Berman, Jonathan D., James V. Gallalee, James M. Best, and Timothy Hill. 1987. "Uptake, Distribution, and Oxidation of Fatty Acids by *Leishmania Mexicana* Amastigotes." *The Journal of Parasitology* 73 (3): 555. <https://doi.org/10.2307/3282136>.
- Boscardin, Silvia Beatriz, Ana Claudia Troccoli Torrecilhas, Romina Manarin, Silvia Revelli, Elena Gonzalez Rey, Renata Rosito Tonelli, and Ariel Mariano Silber. 2010. "Chagas' Disease: An Update on Immune Mechanisms and Therapeutic Strategies." *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14 (6B): 1373–84. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2010.01007.x>.
- Brenière, Simone Frédérique, Etienne Waleckx, and Christian Barnabé. 2016. "Over Six Thousand *Trypanosoma Cruzi* Strains Classified into Discrete Typing Units (DTUs): Attempt at an Inventory." Edited by Alain Debrabant. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 10 (8): e0004792. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004792>.
- Bringaud, Frédéric, Loïc Rivière, and Virginie Coustou. 2006. "Energy Metabolism of Trypanosomatids: Adaptation to Available Carbon Sources." *Molecular and Biochemical Parasitology* 149 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2006.03.017>.
- Brownsey, Roger W, R W Brownsey, A N Boone, J E Elliott, J E Kulpa, and W M Lee. 2000. "Regulation of Acetyl-CoA Carboxylase." <https://doi.org/10.1042/BST20060223>.
- Cannata, Joaquín J.B., and Juan José Cazzulo. 1984. "Glycosomal and Mitochondrial Malate Dehydrogenases in Epimastigotes of *Trypanosoma Cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 11 (April): 37–49. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(84\)90053-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(84)90053-7).
- Cazzulo, J J. 1992a. "Energy Metabolism in *Trypanosoma Cruzi*." *Subcell Biochem* 18: 235–57. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1485353>.

———. 1992b. “Aerobic Fermentation of Glucose by Trypanosomatids.” *FASEB Journal : Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 6 (13): 3153–61. <https://doi.org/10.1096/FASEBJ.6.13.1397837>.

———. 1994. “Intermediate Metabolism in *Trypanosoma Cruzi*.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26 (2): 157–65. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8056782>.

Cazzulo, Juan José. 1992. “Aerobic Fermentation of Glucose by Trypanosomatids. - PubMed - NCBI.” 1992. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/m/pubmed/1397837/?i=4&from=cazzulo> 1992.

César Carranza, Julio, Alicia J. Kowaltowski, Marco Aurélio G. Mendonça, Thays C. de Oliveira, Fernanda R. Gadelha, and Bianca Zingales. 2009. “Mitochondrial Bioenergetics and Redox State Are Unaltered in *Trypanosoma Cruzi* Isolates with Compromised Mitochondrial Complex I Subunit Genes.” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 41 (3): 299–308. <https://doi.org/10.1007/s10863-009-9228-4>.

Chagas, Carlos. 1909. “Nova Tripanozomíaze Humana: Estudos Sobre a Morfologia e o Ciclo Evolutivo Do *Schizotrypanum Cruzi* n. Gen., n. Sp., Ajente Etiológico de Nova Entidade Morbida Do Homem.” *Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz* 1 (2): 159–218. <https://doi.org/10.1590/S0074-02761909000200008>.

Combs, Terry P, Nagajyothi, Shankar Mukherjee, Cecilia J G de Almeida, Linda A Jelicks, William Schubert, Ying Lin, et al. 2005. “The Adipocyte as an Important Target Cell for *Trypanosoma Cruzi* Infection.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (25): 24085–94. <https://doi.org/10.1074/jbc.M412802200>.

Contreras, V T, J M Salles, N Thomas, C M Morel, and S Goldenberg. 1985. “In Vitro Differentiation of *Trypanosoma Cruzi* under Chemically Defined Conditions.” *Mol Biochem Parasitol* 16 (3): 315–27. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3903496>.

Coura, José Rodrigues, and João Carlos Pinto Dias. 2009. “Epidemiology, Control and Surveillance of Chagas Disease: 100 Years after Its Discovery.” *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1 (July): 31–40. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19753455>.

Coustou, Virginie, Sébastien Besteiro, Loïc Rivière, Marc Biran, Nicolas Biteau, Jean-Michel Franconi, Michael Boshart, Théo Baltz, and Frédéric Bringaud. 2005. “A Mitochondrial NADH-Dependent Fumarate Reductase Involved in the Production of Succinate Excreted by Procyclic *Trypanosoma Brucei*.” *The Journal of Biological Chemistry* 280 (17): 16559–70. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500343200>.

Crispim, M, F S Damasceno, A Hernandez, M J Barison, I Pretto Sauter, R Souza Pavani, A Santos Moura, et al. 2018. “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 Negl Trop Dis* 12 (1): e0006170. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006170>.

Cunha-e-Silva, Narcisa L, GeÃ3rgia C Atella, Isabel A Porto-Carreiro, Jose A Morgado-Diaz, Miria G Pereira, and Wanderley Souza. 2002. “Isolation and Characterization of a Reservosome Fraction from *Trypanosoma Cruzi*.” *FEMS Microbiology Letters* 214 (1): 7–12. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2002.tb11317.x>.

Damasceno, F.S., M.J. Barisón, M. Crispim, R.O.O. Souza, L. Marchese, and A.M. Silber. 2018. "L-Glutamine Uptake Is Developmentally Regulated and Is Involved in Metacyclogenesis in *Trypanosoma Cruzi*." *Molecular and Biochemical Parasitology* 224. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.07.007>.

Damasceno, F S, M J Barison, M Crispim, R O O Souza, L Marchese, and A M Silber. 2018. "L-Glutamine Uptake Is Developmentally Regulated and Is Involved in Metacyclogenesis in *Trypanosoma Cruzi*." *Mol Biochem Parasitol* 224: 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2018.07.007>.

Dawoody Nejad, Ladan, Mauro Serricchio, Jennifer Jelk, Andrew Hemphill, and Peter Bütikofer. 2018. "TbLpn, a Key Enzyme in Lipid Droplet Formation and Phospholipid Metabolism, Is Essential for Mitochondrial Integrity and Growth of *Trypanosoma Brucei*." *Molecular Microbiology* 109 (1): 105–20. <https://doi.org/10.1111/mmi.13976>.

Dixon, Honor, C.D. Ginger, and J. Williamson. 1971. "The Lipid Metabolism of Blood and Culture Forms of *Trypanosoma Lewisi* and *Trypanosoma Rhodesiense*." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 39 (2): 247–66. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(71\)90168-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(71)90168-4).

Docampo, R, D A Scott, A E Vercesi, and S N Moreno. 1995. "Intracellular Ca²⁺ Storage in Acidocalcisomes of *Trypanosoma Cruzi*." *The Biochemical Journal* 310 (Pt 3) (3): 1005–12. <https://doi.org/10.1042/bj3101005>.

Docampo, Roberto, and Silvia N.J. Moreno. 2011. "Acidocalcisomes." *Cell Calcium* 50 (2): 113–19. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2011.05.012>.

Duarte, Margarida, and Ana M. Tomás. 2014. "The Mitochondrial Complex I of Trypanosomatids - an Overview of Current Knowledge." *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 46 (4): 299–311. <https://doi.org/10.1007/s10863-014-9556-x>.

Figueiredo, R C, D S Rosa, and M J Soares. 2000. "Differentiation of *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes: Metacyclogenesis and Adhesion to Substrate Are Triggered by Nutritional Stress." *The Journal of Parasitology* 86 (6): 1213–18. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[1213:DOTCEM\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[1213:DOTCEM]2.0.CO;2).

Figueiredo, R C, M Steindel, and M J Soares. 1994. "The Reservosomes of Epimastigote Forms of *Trypanosoma Cruzi*: Occurrence during in Vitro Cultivation." *Parasitology Research* 80 (6): 517–22. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7809003>.

Filigheddu, Maria Teresa, Miguel Górgolas, and José Manuel Ramos. 2017. "Enfermedad de Chagas de Transmisión Oral." *Medicina Clínica* 148 (3): 125–31. <https://doi.org/10.1016/j.medcli.2016.10.038>.

Flaspohler, John A., Bryan C. Jensen, Tracy Saveria, Charles T. Kifer, and Marilyn Parsons. 2010. "A Novel Protein Kinase Localized to Lipid Droplets Is Required for Droplet Biogenesis in Trypanosomes." *Eukaryotic Cell* 9 (11): 1702. <https://doi.org/10.1128/EC.00106-10>.

Freire, Anna Cláudia Guimarães, Ceres Luciana Alves, Grazielle Ribeiro Goes, Bruno Carvalho Resende, Nilmar Silvio Moretti, Vinícius Santana Nunes, Pedro Henrique Nascimento Aguiar, et al. 2017. "Catalase Expression Impairs Oxidative Stress-Mediated

Signalling in *Trypanosoma Cruzi*.” *Parasitology* 144 (11): 1498–1510. <https://doi.org/10.1017/S0031182017001044>.

Frydman, Benjamin, Carlos Santos, Joaquin J. B. Cannata, and Juan J. Cazzulo. 1990. “Carbon-13 Nuclear Magnetic Resonance Analysis of [1-13C]Glucose Metabolism in *Trypanosoma Cruzi*. Evidence of the Presence of Two Alanine Pools and of Two CO₂ Fixation Reactions.” *European Journal of Biochemistry* 192 (2): 363–68. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19235.x>.

Gannavaram, Sreenivas, Patricia S Connelly, Mathew P Daniels, Robert Duncan, Poonam Salotra, and Hira L Nakhasi. 2012. “Deletion of Mitochondrial Associated Ubiquitin Fold Modifier Protein Ufm1 in *Leishmania Donovanii* Results in Loss of β -Oxidation of Fatty Acids and Blocks Cell Division in the Amastigote Stage NIH Public Access.” *Mol Microbiol* 86 (1): 187–98. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2012.08183.x>.

Gazos-Lopes, Felipe, Jessica L. Martin, Peter C. Dumoulin, and Barbara A. Burleigh. 2017. “Host Triacylglycerols Shape the Lipidome of Intracellular Trypanosomes and Modulate Their Growth.” Edited by Isabelle Coppens. *PLOS Pathogens* 13 (12): e1006800. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006800>.

Ghisla, Sandro, and Colin Thorpe. 2004. “Acyl-CoA Dehydrogenases. A Mechanistic Overview.” *European Journal of Biochemistry* 271 (3): 494–508. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14728676>.

Girard, Richard M. B. M., Marcell Crispim, Mayke Bezerra Alencar, and Ariel Mariano Silber. 2018. “Uptake of L-Alanine and Its Distinct Roles in the Bioenergetics of *Trypanosoma Cruzi*.” Edited by Ira J. Blader. *MSphere* 3 (4). <https://doi.org/10.1128/mSphereDirect.00338-18>.

Gondim, Katia C, Georgia C Atella, Emerson G Pontes, and David Majerowicz. 2018. “Lipid Metabolism in Insect Disease Vectors.” *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 101 (October): 108–23. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2018.08.005>.

Guedes, Paulo MM, Grace K Silva, Fredy RS Gutierrez, and João S Silva. 2011. “Current Status of Chagas Disease Chemotherapy.” *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 9 (5): 609–20. <https://doi.org/10.1586/eri.11.31>.

Harsman, Anke, Silke Oeljeklaus, Christoph Wenger, Jonathan L. Huot, Bettina Warscheid, and André Schneider. 2016. “The Non-Canonical Mitochondrial Inner Membrane Presequence Translocase of Trypanosomatids Contains Two Essential Rhomboid-like Proteins.” *Nature Communications* 7 (1): 13707. <https://doi.org/10.1038/ncomms13707>.

Hernandez, F.Rafael, and Julio F Turens. 1998. “Rotenone at High Concentrations Inhibits NADH-Fumarate Reductase and the Mitochondrial Respiratory Chain of *Trypanosoma Brucei* and *T. cruzi*.” *Molecular and Biochemical Parasitology* 93 (1): 135–37. [https://doi.org/10.1016/S0166-6851\(98\)00015-2](https://doi.org/10.1016/S0166-6851(98)00015-2).

Homsy, J J, B Granger, and S M Krassner. 1989. “Some Factors Inducing Formation of Metacyclic Stages of *Trypanosoma Cruzi*.” *The Journal of Protozoology* 36 (2): 150–53. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2657033>.

Huang, Guozhong, and Roberto Docampo. 2015. "Proteomic Analysis of Acidocalcisomes of *Trypanosoma Brucei* Uncovers Their Role in Phosphate Metabolism, Cation Homeostasis, and Calcium Signaling." *Communicative & Integrative Biology* 8 (2). <https://doi.org/10.1080/19420889.2015.1017174>.

Ikeda, Y, K Okamura-Ikeda, and K Tanaka. 1985. "Purification and Characterization of Short-Chain, Medium-Chain, and Long-Chain Acyl-CoA Dehydrogenases from Rat Liver Mitochondria. Isolation of the Holo- and Apoenzymes and Conversion of the Apoenzyme to the Holoenzyme." *The Journal of Biological Chemistry* 260 (2): 1311–25. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3968063>.

Ikeda, Yasuyuki, Christine Dabrowski, and Kay Tanakat. 1983. "Separation and Properties of Five Distinct Acyl-CoA Dehydrogenases from Rat Liver Mitochondria IDENTIFICATION OF A NEW 2-METHYL BRANCHED CHAIN ACYL-CoA DEHYDROGENASE*." <http://www.jbc.org/content/258/2/1066.full.pdf>.

Kakimoto, Pâmela A H B, Fábio K Tamaki, Ariel R Cardoso, Sandro R Marana, and Alicia J Kowaltowski. 2015. "H₂O₂ Release from the Very Long Chain Acyl-CoA Dehydrogenase." *Redox Biology* 4: 375–80. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2015.02.003>.

Kaushik, K V, M E Dean, D G Hardie, and D A Pan. 2002. "Regulation of Fatty Acid Synthesis and Oxidation by the AMP-Activated Protein Kinase." *I) Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* Vol. 30. <http://www.biochemsoctrans.org/content/ppbiost/30/6/1064.full.pdf>.

Kim, Jung-Ja P, and Retsu Miura. 2004. "Acyl-CoA Dehydrogenases and Acyl-CoA Oxidases. Structural Basis for Mechanistic Similarities and Differences." *European Journal of Biochemistry* 271 (3): 483–93. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14728675>.

Knobloch, Marlen, Simon M G Braun, Luis Zurkirchen, Carolin von Schoultz, Nicola Zamboni, Marcos J Araújo-Bravo, Werner J Kovacs, et al. 2013. "Metabolic Control of Adult Neural Stem Cell Activity by Fasn-Dependent Lipogenesis." *Nature* 493 (7431): 226–30. <https://doi.org/10.1038/nature11689>.

Knobloch, Marlen, Gregor-Alexander Pilz, Bart Ghesquière, Werner J Kovacs, Thomas Wegleiter, Darcie L Moore, Martina Hruzova, Nicola Zamboni, Peter Carmeliet, and Sebastian Jessberger. 2017. "A Fatty Acid Oxidation-Dependent Metabolic Shift Regulates Adult Neural Stem Cell Activity." *Cell Reports* 20 (9): 2144–55. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.029>.

Kolliker-Frers, Rodolfo A, Ivan Insua, Gabriela Razzitte, and Francisco Capani. 2016. "Chagas Disease Prevalence in Pregnant Women: Migration and Risk of Congenital Transmission." *The Journal of Infection in Developing Countries* 10 (09): 895. <https://doi.org/10.3855/jidc.7118>.

Lee, Soo Hee, Jennifer L. Stephens, and Paul T. Englund. 2007. "A Fatty-Acid Synthesis Mechanism Specialized for Parasitism." *Nature Reviews Microbiology* 5 (4): 287–97. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1617>.

Lee, Soo Hee, Jennifer L. Stephens, Kimberly S. Paul, and Paul T. Englund. 2006. "Fatty Acid Synthesis by Elongases in Trypanosomes." *Cell* 126 (4): 691–99. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.045>.

Leroux, Alejandro E., Dante A. Maugeri, Fred R. Opperdoes, Juan J. Cazzulo, and Cristina Nowicki. 2011. "Comparative Studies on the Biochemical Properties of the Malic Enzymes from *Trypanosoma Cruzi* and *Trypanosoma Brucei*." *FEMS Microbiology Letters* 314 (1): 25–33. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2010.02142.x>.

Lima, Ana R De, María C Navarro, Rosa Y Arteaga, and Víctor T Contreras. 2008. "Cultivation of *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes in Low Glucose Axenic Media Shifts Its Competence to Differentiate at Metacyclic Trypomastigotes." *Experimental Parasitology* 119 (3): 336–42. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2008.03.003>.

Lisvane Silva, P, B S Mantilla, M J Barison, C Wrenger, and A M Silber. 2011. "The Uniqueness of the *Trypanosoma Cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Identify New Drug Target for the Treatment of Chagas Disease." *Curr Pharm Des* 17 (20): 2074–99. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21718252>.

Liu, Xiaojun, Long Wu, Guisheng Deng, Gong Chen, Nan Li, Xiusheng Chu, and Ding Li. 2013. "Comparative Studies of Acyl-CoA Dehydrogenases for Monomethyl Branched Chain Substrates in Amino Acid Metabolism." *Bioorganic Chemistry* 47 (April): 1–8. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2012.12.001>.

Lochner, Matthias, Luciana Berod, and Tim Sparwasser. 2015. "Fatty Acid Metabolism in the Regulation of T Cell Function." *Trends in Immunology* 36 (2): 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.12.005>.

Magdaleno, A, I Y Ahn, L S Paes, and A M Silber. 2009. "Actions of a Proline Analogue, L-Thiazolidine-4-Carboxylic Acid (T4C), on *Trypanosoma Cruzi*." *PLoS One* 4 (2): e4534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004534>.

Maggio-Hall, Lori A., and Nancy P. Keller. 2004. "Mitochondrial β -Oxidation in *Aspergillus Nidulans*." *Molecular Microbiology* 54 (5): 1173–85. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.04340.x>.

Maggio-Hall, Lori A, Paul Lyne, Jon A Wolff, and Nancy P Keller. 2008. "A Single Acyl-CoA Dehydrogenase Is Required for Catabolism of Isoleucine, Valine and Short-Chain Fatty Acids in *Aspergillus Nidulans*." *Fungal Genetics and Biology: FG & B* 45 (3): 180–89. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2007.06.004>.

Manchola, Nubia C., Ludmila N. Rapado, María J. Barisón, and Ariel M. Silber. 2016. "Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in *Trypanosoma Cruzi*." *Journal of Eukaryotic Microbiology* 63 (3): 299–308. <https://doi.org/10.1111/jeu.12278>.

Mancilla, Rafael, Cesar Naquira, and Cecilia Lanás. 1967. "Protein Biosynthesis in Trypanosomidae: II. The Metabolic Fate of DL-Leucine-1-C14 in *Trypanosoma Cruzi*." *Experimental Parasitology* 21 (2): 154–59. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(67\)90077-X](https://doi.org/10.1016/0014-4894(67)90077-X).

Mannaerts, Guy P., Paul P Van Veldhoven, and M. Casteels. 2000. "Peroxisomal Lipid Degradation via β and β -Oxidation in Mammals." *Cell Biochemistry and Biophysics* 32 (1–3): 73–87. <https://doi.org/10.1385/CBB:32:1-3:73>.

Mantilla, Brian S, Lisvane S Paes, Elizabeth M F Pral, Daiana E Martil, Otavio H Thiemann,

- Patricio Fernández-Silva, Erick L Bastos, and Ariel M Silber. 2015. “Role of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Dehydrogenase Supports Mitochondrial Metabolism and Host-Cell Invasion of *Trypanosoma Cruzi*.” *The Journal of Biological Chemistry* 290 (12): 7767–90. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.574525>.
- Marchese, Letícia, Janaina Nascimento, Flávia Damasceno, Frédéric Bringaud, Paul Michels, and Ariel Silber. 2018. “The Uptake and Metabolism of Amino Acids, and Their Unique Role in the Biology of Pathogenic Trypanosomatids.” *Pathogens* 7 (2): 36. <https://doi.org/10.3390/pathogens7020036>.
- Mashek, Douglas G, and Rosalind A Coleman. 2006. “Cellular Fatty Acid Uptake: The Contribution of Metabolism.” *Current Opinion in Lipidology* 17 (3): 274–78. <https://doi.org/10.1097/01.mol.0000226119.20307.2b>.
- Maugeri, Dante A., Joaquin J.B. Cannata, and Juan-José Cazzulo. 2011a. “Glucose Metabolism in *Trypanosoma Cruzi*.” *Essays In Biochemistry* 51 (October): 15–30. <https://doi.org/10.1042/bse0510015>.
- Maugeri, Dante A, Joaquin J B Cannata, and Juan-José Cazzulo. 2011b. “Glucose Metabolism in *Trypanosoma Cruzi*” 51: 15–30. <https://doi.org/10.1042/BSE0510015>.
- McAndrew, Ryan P., Yudong Wang, Al-Walid Mohsen, Miao He, Jerry Vockley, and Jung-Ja P. Kim. 2008. “Structural Basis for Substrate Fatty Acyl Chain Specificity.” *Journal of Biological Chemistry* 283 (14): 9435–43. <https://doi.org/10.1074/jbc.M709135200>.
- Michael Barrett, F. 1974. “Changes in the Concentration of Free Amino Acids in the Haemolymph of *Rhodnius Prolixus* during the Fifth Instar.” *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 48 (2): 241–50. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(74\)90200-4](https://doi.org/10.1016/0305-0491(74)90200-4).
- Michels, Paul A.M. 1989. “The Glycosome of Trypanosomes: Properties and Biogenesis of a Microbody.” *Experimental Parasitology* 69 (3): 310–15. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(89\)90079-9](https://doi.org/10.1016/0014-4894(89)90079-9).
- Millerioux, Yoann, Muriel Mazet, Guillaume Bouyssou, Stefan Allmann, Tiila-Riikka Kiema, Eloïse Bertiaux, Laetitia Fouillen, et al. 2018. “De Novo Biosynthesis of Sterols and Fatty Acids in the *Trypanosoma Brucei* Procyclic Form: Carbon Source Preferences and Metabolic Flux Redistributions.” Edited by Dominique Soldati-Favre. *PLOS Pathogens* 14 (5): e1007116. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007116>.
- Nagajyothi, F., M. S. Desruisseaux, F. S. Machado, R. Upadhya, D. Zhao, G. J. Schwartz, M. M. Teixeira, et al. 2012. “Response of Adipose Tissue to Early Infection With *Trypanosoma Cruzi* (Brazil Strain).” *Journal of Infectious Diseases* 205 (5): 830–40. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir840>.
- Nakamura, Manabu T., Barbara E. Yudell, and Juan J. Loor. 2014. “Regulation of Energy Metabolism by Long-Chain Fatty Acids.” *Progress in Lipid Research* 53 (January): 124–44. <https://doi.org/10.1016/J.PLIPRES.2013.12.001>.

O'Connor, Roddy S., Lili Guo, Saba Ghassemi, Nathaniel W. Snyder, Andrew J. Worth, Liwei Weng, Yoonseok Kam, et al. 2018. "The CPT1a Inhibitor, Etomoxir Induces Severe Oxidative Stress at Commonly Used Concentrations." *Scientific Reports* 8 (1): 6289. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24676-6>.

Paes, L S, B Suarez Mantilla, F M Zimbres, E M Pral, P Diogo de Melo, E B Tahara, A J Kowaltowski, M C Elias, and A M Silber. 2013. "Proline Dehydrogenase Regulates Redox State and Respiratory Metabolism in *Trypanosoma Cruzi*." *PLoS One* 8 (7): e69419. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069419>.

Pereira, C A, G D Alonso, M C Paveto, M M Flawia, and H N Torres. 1999. "L-Arginine Uptake and L-Phosphoarginine Synthesis in *Trypanosoma Cruzi*." *J Eukaryot Microbiol* 46 (6): 566–70. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10568030>.

Pereira, Claudio A, Guillermo D Alonso, Soledad Ivaldi, Ariel M Silber, Maria Júlia M Alves, Héctor N Torres, and Mirtha M Flawiá. 2003. "Arginine Kinase Overexpression Improves *Trypanosoma Cruzi* Survival Capability." *FEBS Letters* 554 (1–2): 201–5. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(03\)01171-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(03)01171-2).

Pereira, Miria G., Ernesto S. Nakayasu, Celso Sant'Anna, Nuccia N. T. De Cicco, Georgia C. Atella, Wanderley de Souza, Igor C. Almeida, and Narcisa Cunha-e-Silva. 2011. "Trypanosoma Cruzi Epimastigotes Are Able to Store and Mobilize High Amounts of Cholesterol in Reservosome Lipid Inclusions." Edited by Silvia N. Moreno. *PLoS ONE* 6 (7): e22359. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022359>.

Pereira, Miria G., Gonzalo Visbal, Tatiana F.R. Costa, Susana Frases, Wanderley de Souza, Geórgia Atella, and Narcisa Cunha-e-Silva. 2018. "Trypanosoma Cruzi Epimastigotes Store Cholesteryl Esters in Lipid Droplets after Cholesterol Endocytosis." *Molecular and Biochemical Parasitology* 224 (September): 6–16. <https://doi.org/10.1016/J.MOLBIOPARA.2018.07.004>.

Pereira, Miria Gomes, Gonzalo Visbal, Leonardo T. Salgado, Juliana Cunha Vidal, Joseane L. P. Godinho, Nuccia N. T. De Cicco, Geórgia C. Atella, Wanderley de Souza, and Narcisa Cunha-e-Silva. 2015. "Trypanosoma Cruzi Epimastigotes Are Able to Manage Internal Cholesterol Levels under Nutritional Lipid Stress Conditions." Edited by Rossana C.N. Melo. *PLOS ONE* 10 (6): e0128949. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128949>.

Perez-Molina, J A, and I Molina. 2018. "Chagas Disease." *Lancet* 391 (10115): 82–94. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)31612-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)31612-4).

Pike, Lisa S, Amy L Smift, Nicole J Croteau, David A Ferrick, and Min Wu. 2011. "Inhibition of Fatty Acid Oxidation by Etomoxir Impairs NADPH Production and Increases Reactive Oxygen Species Resulting in ATP Depletion and Cell Death in Human Glioblastoma Cells." *Biochimica et Biophysica Acta* 1807 (6): 726–34. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21692241>.

Pohl, Brigitte, Thomas Raichle, and Sandro Ghisla. 1986. "Studies on the Reaction Mechanism of General Acyl-CoA Dehydrogenase. Determination of Selective Isotope Effects in the Dehydrogenation of Butyryl-CoA." *European Journal of Biochemistry* 160 (1): 109–15. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1986.tb09946.x>.

- Rassi Jr., A, A Rassi, and J Marcondes de Rezende. 2012. "American Trypanosomiasis (Chagas Disease)." *Infect Dis Clin North Am* 26 (2): 275–91. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.002>.
- Ray, Sunayan S., Christina L. Wilkinson, and Kimberly S. Paul. 2018. "Regulation of Trypanosoma Brucei Acetyl Coenzyme A Carboxylase by Environmental Lipids." Edited by Silvia N. J. Moreno. *MSphere* 3 (4). <https://doi.org/10.1128/mSphere.00164-18>.
- Reid, Michael A, Ziwei Dai, and Jason W Locasale. 2017. "The Impact of Cellular Metabolism on Chromatin Dynamics and Epigenetics." *Nature Publishing Group* 19 (11). <https://doi.org/10.1038/ncb3629>.
- Rivière, Loïc, Patrick Moreau, Stefan Allmann, Matthias Hahn, Marc Biran, Nicolas Plazolles, Jean-Michel Franconi, Michael Boshart, and Frédéric Bringaud. 2009. "Acetate Produced in the Mitochondrion Is the Essential Precursor for Lipid Biosynthesis in Procyclic Trypanosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (31): 12694–99. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903355106>.
- Rogerson, G.W., and W.E. Gutteridge. 1980. "Catabolic Metabolism in Trypanosoma Cruzi." *International Journal for Parasitology* 10 (2): 131–35. [https://doi.org/10.1016/0020-7519\(80\)90024-7](https://doi.org/10.1016/0020-7519(80)90024-7).
- Rohloff, P, C O Rodrigues, and R Docampo. 2003. "Regulatory Volume Decrease in Trypanosoma Cruzi Involves Amino Acid Efflux and Changes in Intracellular Calcium." *Mol Biochem Parasitol* 126 (2): 219–30. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12615321>.
- Saddiksj, Maruf, James Gamblesll, Lee A Wittersll, and Gary D Lopaschuks. 1993. "Acetyl-CoA Carboxylase Regulation of Fatty Acid Oxidation in the Heart*." Vol. 268. <http://www.jbc.org/content/268/34/25836.full.pdf>.
- Saldivia, Manuel, Gloria Ceballos-Pérez, Jean-Mathieu Bart, and Miguel Navarro. 2016. "The AMPK α 1 Pathway Positively Regulates the Developmental Transition from Proliferation to Quiescence in Trypanosoma Brucei." *Cell Reports* 17 (3): 660–70. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.041>.
- Saunders, Eleanor C., William W. Ng, Joachim Kloehn, Jennifer M. Chambers, Milica Ng, and Malcolm J. McConville. 2014. "Induction of a Stringent Metabolic Response in Intracellular Stages of Leishmania Mexicana Leads to Increased Dependence on Mitochondrial Metabolism." Edited by Mary E. Wilson. *PLoS Pathogens* 10 (1): e1003888. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003888>.
- Saunders, Eleanor C, David P De Souza, Thomas Naderer, Marijke F Sernee, Julie E Ralton, Maria A Doyle, James I Macrae, et al. 2019. "Central Carbon Metabolism of Leishmania Parasites." <https://doi.org/10.1017/S0031182010000077>.
- Schulz, Horst. 1991. "Beta Oxidation of Fatty Acids." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 1081 (2): 109–20. [https://doi.org/10.1016/0005-2760\(91\)90015-A](https://doi.org/10.1016/0005-2760(91)90015-A).

- Sernee, M. F., J. E. Ralton, Z. Dinev, G. N. Khairallah, R. A. O'Hair, S. J. Williams, and M. J. McConville. 2006. "Leishmania Beta-1,2-Mannan Is Assembled on a Mannose-Cyclic Phosphate Primer." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (25): 9458–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603539103>.
- Silber, A M, W Colli, H Ulrich, M J Alves, and C A Pereira. 2005. "Amino Acid Metabolic Routes in *Trypanosoma Cruzi*: Possible Therapeutic Targets against Chagas' Disease." *Curr Drug Targets Infect Disord* 5 (1): 53–64. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15777198>.
- Silber, A M, R R Tonelli, C G Lopes, N Cunha-e-Silva, A C Torrecilhas, R I Schumacher, W Colli, and M J Alves. 2009. "Glucose Uptake in the Mammalian Stages of *Trypanosoma Cruzi*." *Mol Biochem Parasitol* 168 (1): 102–8. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2009.07.006>.
- Souza, Wanderley De. 2002. "Basic Cell Biology of *Trypanosoma Cruzi*." *Current Pharmaceutical Design* 8 (4): 269–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860366>.
- Su, Xiong, and Nada A Abumrad. 2009. "Cellular Fatty Acid Uptake: A Pathway under Construction." *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM* 20 (2): 72–77. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.11.001>.
- Swigoňová, Zuzana, Al-Walid Mohsen, and Jerry Vockley. 2009. "Acyl-CoA Dehydrogenases: Dynamic History of Protein Family Evolution." *Journal of Molecular Evolution* 69 (2): 176–93. <https://doi.org/10.1007/s00239-009-9263-0>.
- Sylvester, D., and S.M. Krassner. 1976. "Proline Metabolism in *Trypanosoma Cruzi* Epimastigotes." *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry* 55 (3): 443–47. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(76\)90318-7](https://doi.org/10.1016/0305-0491(76)90318-7).
- Tanowitz, Herbert B., Philipp E. Scherer, Maria M. Mota, and Luisa M. Figueiredo. 2017. "Adipose Tissue: A Safe Haven for Parasites?" *Trends in Parasitology* 33 (4): 276–84. <https://doi.org/10.1016/J.PT.2016.11.008>.
- Toledo, Daniel A. M., Natália R. Roque, Lívia Teixeira, Erix A. Milán-Garcés, Alan B. Carneiro, Mariana R. Almeida, Gustavo F. S. Andrade, et al. 2016. "Lipid Body Organelles within the Parasite *Trypanosoma Cruzi*: A Role for Intracellular Arachidonic Acid Metabolism." Edited by M Carolina Elias. *PLOS ONE* 11 (8): e0160433. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160433>.
- Tonelli, R R, A M Silber, M Almeida-de-Faria, I Y Hirata, W Colli, and M J Alves. 2004. "L-Proline Is Essential for the Intracellular Differentiation of *Trypanosoma Cruzi*." *Cell Microbiol* 6 (8): 733–41. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00397.x>.
- Trindade, Sandra, Filipa Rijo-Ferreira, Tânia Carvalho, Daniel Pinto-Neves, Fabien Guegan, Francisco Aresta-Branco, Fabio Bento, et al. 2016. "*Trypanosoma Brucei* Parasites Occupy and Functionally Adapt to the Adipose Tissue in Mice." *Cell Host & Microbe* 19 (6): 837–48. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.05.002>.
- Uehara, Lívia Almeida, Otacílio C. Moreira, Ana Carolina Oliveira, Patrícia Azambuja, Ana Paula Cabral Araujo Lima, Constança Britto, André Luis Souza dos Santos, Marta Helena Branquinha, and Claudia Masini d'Avila-Levy. 2012. "Cruzipain Promotes *Trypanosoma Cruzi* Adhesion to *Rhodnius Prolixus* Midgut." Edited by Shaden Kamhawi. *PLoS Neglected*

Tropical Diseases 6 (12): e1958. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001958>.

Vigueira, Patrick A., and Kimberly S. Paul. 2011. "Requirement for Acetyl-CoA Carboxylase in *Trypanosoma Brucei* Is Dependent upon the Growth Environment." *Molecular Microbiology* 80 (1): 117–32. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07563.x>.

Vigueira, Patrick A., and Kimberly S Paul. 2012. "Trypanosoma Brucei: Inhibition of Acetyl-CoA Carboxylase by Haloxyfop." *Experimental Parasitology* 130 (2): 159–65. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.10.014>.

Viotti, Rodolfo, Carlos Vigliano, Bruno Lococo, Maria Gabriela Alvarez, Marcos Petti, Graciela Bertocchi, and Alejandro Armenti. 2009. "Side Effects of Benznidazole as Treatment in Chronic Chagas Disease: Fears and Realities." *Expert Review of Anti-Infective Therapy* 7 (2): 157–63. <https://doi.org/10.1586/14787210.7.2.157>.

Voorheis, H.Paul. 1980. "Fatty Acid Uptake by Bloodstream Forms of *Trypanosoma Brucei* and Other Species of the Kinetoplastida." *Molecular and Biochemical Parasitology* 1 (3): 177–86. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(80\)90016-X](https://doi.org/10.1016/0166-6851(80)90016-X).

Wainszelbaum, Marisa J, María L Belaunzarán, Estela M Lammel, Mónica Florin-Christensen, Jorge Florin-Christensen, and Elvira L D Isola. 2003. "Free Fatty Acids Induce Cell Differentiation to Infective Forms in *Trypanosoma Cruzi*." *The Biochemical Journal* 375 (Pt 3): 705–12. <https://doi.org/10.1042/BJ20021907>.

Wang, Chao, Jun Ma, Nan Zhang, Qianlan Yang, Yue Jin, and Yu Wang. 2015. "The Acetyl-CoA Carboxylase Enzyme: A Target for Cancer Therapy?" *Expert Review of Anticancer Therapy* 15 (6): 667–76. <https://doi.org/10.1586/14737140.2015.1038246>.

Wellen, Kathryn E., Georgia Hatzivassiliou, Uma M. Sachdeva, Thi V. Bui, Justin R. Cross, and Craig B. Thompson. 2009. "ATP-Citrate Lyase Links Cellular Metabolism to Histone Acetylation." *Science* 324 (5930): 1076–80. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1164097>.

Wendel, Silvano. 2010. "Transfusion Transmitted Chagas Disease: Is It Really under Control?" *Acta Tropica* 115 (1–2): 28–34. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2009.12.006>.

"WHO | Chagas Disease (American Trypanosomiasis)." 2018. WHO. <https://www.who.int/chagas/en/>.

Wiemer, Erik A.C., Lodewijk IJlst, Joris van Roy, Ronald J.A. Wanders, and Fred R. Opperdoes. 1996. "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* 82 (1): 107–11. [https://doi.org/10.1016/0166-6851\(96\)02710-7](https://doi.org/10.1016/0166-6851(96)02710-7).

Wilkinson, Shane R., Martin C. Taylor, David Horn, John M. Kelly, and Ian Cheeseman. 2008. "A Mechanism for Cross-Resistance to Nifurtimox and Benznidazole in Trypanosomes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (13): 5022–27. <https://doi.org/10.1073/pnas.0711014105>.

Wood, D E. 1975. "Trypanosoma Cruzi: Fatty Acid Metabolism in Vitro." *Experimental Parasitology* 37 (1): 60–66. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1090440>.

Wood, D E, and E L Schiller. 1975a. "Trypanosoma Cruzi: Comparative Fatty Acid Metabolism of the Epimastigotes and Trypomastigotes in Vitro." *Experimental Parasitology* 38 (2): 202–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1100424>.

———. 1975b. "Trypanosoma Cruzi: Comparative Fatty Acid Metabolism of the Epimastigotes and Trypomastigotes in Vitro." *Experimental Parasitology* 38 (2): 202–7. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1100424>.

Wood, Duell E. 1975. "Trypanosoma Cruzi: Fatty Acid Metabolism in Vitro." *Experimental Parasitology* 37 (1): 60–66. [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(75\)90052-1](https://doi.org/10.1016/0014-4894(75)90052-1).

Yao, Cong-Hui, Gao-Yuan Liu, Rencheng Wang, Sung Ho Moon, Richard W. Gross, and Gary J. Patti. 2018. "Identifying Off-Target Effects of Etomoxir Reveals That Carnitine Palmitoyltransferase I Is Essential for Cancer Cell Proliferation Independent of β -Oxidation." Edited by Jason Locasale. *PLOS Biology* 16 (3): e2003782. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2003782>.

Zeledon, Rodrigo. 1960. "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* 46 (5): 541. <https://doi.org/10.2307/3274935>.

Zhu, Jiajun, and Craig B. Thompson. 2019. "Metabolic Regulation of Cell Growth and Proliferation." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, April, 1. <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0123-5>.