

MARIA JULIA BARISON

Caracterização e avaliação do papel da degradação de  
histidina na bioenergética de *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  
2015

## RESUMO

BARISON, M. J. **Caracterização e avaliação do papel da degradação de histidina na bioenergética de *Trypanosoma cruzi***. 2015. 154 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2015.

*Trypanosoma cruzi* é capaz de utilizar aminoácidos como uma eficiente fonte de energia. Histidina (His), um aminoácido abundante no inseto vetor, é um metabólito essencial para o parasita, que deve incorporá-lo desde o meio extracelular para sua utilização. No presente trabalho mostramos que epimastigotas de *T. cruzi* incorporam His através de um único sistema de transporte saturável. O transportador para His mostrou alta especificidade pelo seu substrato e dependência do conteúdo intracelular de ATP para a sua atividade. Uma vez no citoplasma, His é degradada a glutamato através de uma via de degradação não descrita em outros tripanossomatídeos: a primeira enzima, histidina amônio-liase (*TcHAL*) catalisa a desaminação não oxidativa da His rendendo urocanato, que por sua vez é convertido por uma urocanato hidratase (*TcUH*) ao intermediário 4-imidazolona-5-propionato. Posteriormente através da atividade de duas enzimas (imidazolona propionase e formimino glutamase) é produzido glutamato. O glutamato produzido pode ser desaminado a  $\alpha$ -cetoglutarato, um intermediário do ciclo dos ácidos tricarbóxicos (TCA). No presente trabalho, as duas primeiras enzimas da via, *TcHAL* e *TcUH* foram expressas e purificadas em sistema heterólogo e diferentes parâmetros cinéticos e bioquímicos foram determinados. Observamos também que parasitas incubados com [<sup>14</sup>C(U)]-His são capazes de liberar CO<sub>2</sub> radioativo, demonstrando que a oxidação completa da His é operativa em *T. cruzi*. Por outro lado, a caracterização da His como fonte de energia para epimastigotas, foi estabelecida mediante a medição de parâmetros tais como a produção de ATP, estabelecimento de potencial de membrana interna mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e consumo de oxigênio. Observamos também que quando parasitas submetidos a estresse nutricional são recuperados com His, os valores de  $\Delta\Psi_m$  são recuperados, e são promovidos o consumo de oxigênio na mitocôndria e a síntese de ATP através da fosforilação oxidativa. Quando comparado o metabolismo de His entre as fases exponencial e estacionária de crescimento de epimastigotas, observamos que na fase exponencial há um consumo de His mais ativo, de acordo com o papel proposto para este aminoácido na bioenergética de *T. cruzi*. Em contraste, o transporte de His mostrou-se mais ativo na fase estacionária, além de observarse um aumento nos níveis intracelulares tanto de His quanto de urocanato, sugerindo uma possível acumulação desses metabólitos nessa fase de crescimento. Interessantemente, His é também capaz de estimular a metaciclo gênese *in vitro*, com taxas de diferenciação comparáveis ao meio de diferenciação padrão, TAU-3AAG. Estudos metabolômicos mostraram que His é utilizada principalmente no início da diferenciação, possivelmente como fonte energética. Nossos dados indicam a relevância da His na bioenergética *T. cruzi*, demonstrando o importante papel da utilização de His pelo parasita principalmente nas fases presentes no inseto vetor.

**Palavras-chave:** *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Histidina. Bioenergética. Aminoácidos. Metabolômica.

## ABSTRACT

BARISON, M. J. **Characterization and evaluation of the role of histidine degradation in *Trypanosoma cruzi* bioenergetics.** 2015. 154 p. Ph. D. Thesis (Parasitology) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo 2015.

*Trypanosoma cruzi* is able to use amino acids as an efficient energy source. Histidine, an abundant amino acid in the insect vector, is an essential metabolite for *T. cruzi*, so it must be incorporated from the extracellular medium. In the present work we show that *T. cruzi* epimastigotes incorporate His through a single and saturable transport system. His uptake system is highly specific and is dependent on intracellular ATP content. Once in the cytoplasm, His can be degraded to glutamate through a metabolic pathway not described in other trypanosomatids. The first enzyme, histidine ammonia-lyase (*TcHAL*) catalyzes the non-oxidative deamination of His to urocanate, which in turn is converted into the intermediate 4-imidazolone-5-propionate by an urocanate hydratase. Afterwards, through the action of two additional enzymes (imidazolone propionase and formimino glutamase) glutamate is produced. The produced glutamate can be deaminated to  $\alpha$ -ketoglutarate, a Tricarboxylic Acids Cycle (TCA) intermediate. In the present work, the first two enzymes of the pathway, *TcHAL* and *TcUH* were expressed and purified in heterologous system and their kinetic and biochemical parameters were determined. We also observed that parasites incubated with [ $^{14}\text{C}(\text{U})$ ]-His produce radiolabeled  $\text{CO}_2$ , demonstrating that the complete oxidation pathway of His is operative in *T. cruzi*. In addition, the characterization of His as an energy source for epimastigotes was performed by measuring parameters such as ATP production, mitochondrial inner membrane potential ( $\Delta\Psi_m$ ) and oxygen consumption. We also observed that parasites submitted to nutritional stress and then recovered with His, had their  $\Delta\Psi_m$  restored, promoted oxygen consumption and ATP synthesis by oxidative phosphorylation. When His metabolism of epimastigotes in exponential and stationary phase of growth were compared we observed that His is degraded more actively in exponential phase, according to the proposed role of His in *T. cruzi* bioenergetic. In contrast, His uptake was higher in stationary phase, and consequently intracellular levels of His and its first degradation intermediate urocanate, were also increased, suggesting a probable accumulation of these metabolites in that phase of growth. Furthermore, we observed that His can stimulate metacyclogenesis, in comparable levels to that obtained in standard differentiation media, TAU-3AAG. A metabolomic approach showed that His can be used by the parasite as energy source, particularly, in the early stages of differentiation. Our results show the relevance of this amino acid in *T. cruzi* bioenergetics, indicating the important role of His for the parasite, more specifically in the insect vector stages.

**Keywords:** *Trypanosoma cruzi*. Chagas disease. Histidine. Bioenergetics. Amino acids. Metabolomics.

## **CAPÍTULO 1: INTRODUÇÃO**

---

### ***1.1 Aspectos gerais da doença de Chagas***

A doença de Chagas, classificada como negligenciada, é a terceira doença parasitária no mundo, seguida da malária e esquistossomose, com maiores índices de morte, onde estima-se que 6 a 7 milhões de pessoas estão infectadas e que haja aproximadamente 100000 a 14000 mortes por ano (World Health Organization, 2015). A doença é endêmica em 21 países do continente americano, incluindo o sul dos Estados Unidos (Buhaya et al., 2015). Devido à migração de pessoas da zona rural para as cidades, somada ao intenso fluxo de imigrantes das áreas endêmicas para áreas não endêmicas como Europa, Estados Unidos e Canadá, tornou-se uma doença presente em diversos países não endêmicos (Rassi et al., 2012).

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemático antigamente localizado na ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Na taxonomia sugerida para organismos protozoários proposto por Adl e colaboradores, o *T. cruzi* é incluído dentro do super-grupo Excavata (antigamente reino Protista) e dentro desse grupo é classificado, seguindo a ordem hierárquica, como Euglenozoa, Kinetoplastea, Metakinoplastina e Trypanosomatidae (Adl et al., 2005). *T. cruzi* é transmitido entre mamíferos principalmente por insetos hematófagos pertencentes à ordem Hemiptera, família Reduviidae, subfamília Triatominae. As espécies de triatomíneos de maior importância epidemiológica são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus* (Barrett et al., 2003).

A doença de Chagas pode ser transmitida através de diferentes vias, as quais são enumeradas em ordem decrescente de relevância epidemiológica: a transmissão vetorial, através da contaminação com tripomastigotas metacíclicos presentes nas fezes depositadas pelo inseto vetor durante o repasto sanguíneo; por transfusão sanguínea e transplante de órgãos provenientes de pacientes infectados; por transmissão vertical, de mãe para filho; e por acidentes de laboratório através de manipulações nas quais formas infetivas de *T. cruzi* são utilizadas. A transmissão por via oral, pela ingestão de alimentos contaminados foi também demonstrada e é considerada epidemiologicamente relevante (Barreto-de-Albuquerque et al., 2015).

*T. cruzi* quando infecta o ser humano induz o desenvolvimento de uma fase aguda da doença seguida de uma longa fase crônica. Inicialmente a fase aguda, com duração de 4 a 8 semanas, caracteriza-se por alta parasitemia e presença de parasitas em praticamente todos os tecidos. Porém a ausência de sintomas específicos faz com que a doença seja dificilmente

diagnosticada em pacientes agudos (Rassi, 2012). Já a fase crônica, caracteriza-se por uma reduzida ou muitas vezes indetectável parasitemia. Essa fase pode manifestar-se de forma indeterminada (assintomática) ou sintomática. Neste último caso, a sintomatologia pode estar relacionada com o desenvolvimento de cardiopatias, alterações gastrointestinais com diferentes graus de severidade, ou ambas, podendo levar a óbito (Gattuso et al., 1993; Moncayo et al., 2006; Punukollu et al., 2007)

As duas drogas atualmente disponíveis para o tratamento da doença são o Nifurtimox [3-metil-4(5'-nitrofurfurilideneamina) tetraidro-4H-tiazina-1,1-dioxida] e o Benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol acetamida) o qual é fabricado no Brasil por um laboratório federal e disponibilizado pelo governo para o tratamento de pacientes chagásicos. Essas drogas surgiram na década de 1970 e são utilizadas apesar dos efeitos colaterais e de toxicidade descritos. Ambas são efetivas na fase aguda da doença, porém, a eficiência na fase crônica é controversa (Duschak et al., 2007; Silber et al., 2005a).

A complexidade do ciclo de vida do *T. cruzi*, o qual envolve diferentes estágios do parasita e mudanças bioquímicas associadas às interações entre o parasita e o hospedeiro, dificultam o desenvolvimento de novos fármacos (De Souza, 2002). Nesse contexto, evidencia-se a necessidade do estudo da biologia do parasita e validação de novos alvos terapêuticos visando o desenvolvimento de drogas eficazes para o tratamento da doença.

## **1.2 O *Trypanosoma cruzi***

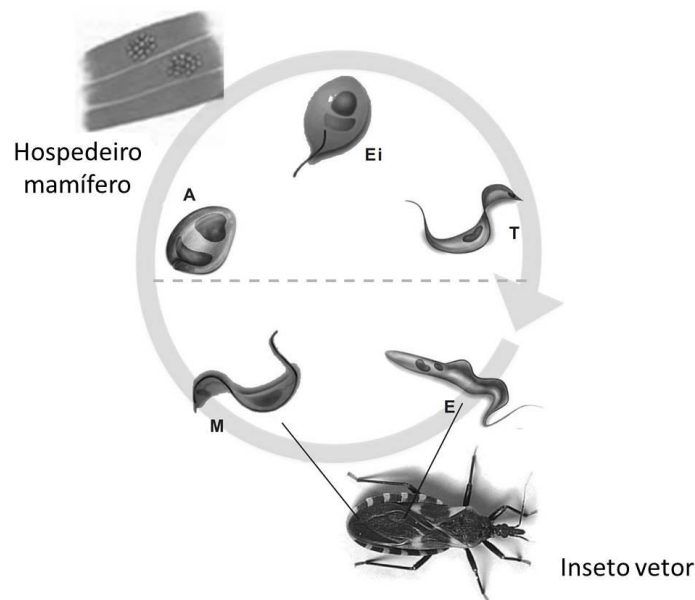
O *T. cruzi* possui um ciclo de vida digenético, alternando entre um hospedeiro invertebrado e um hospedeiro vertebrado mamífero entre os quais se encontra o homem.

Quatro estágios de desenvolvimento são descritos em *T. cruzi*: amastigota intracelular (forma replicativa e não infectante) e tripomastigota sanguíneo (forma infectante e não replicativa) no hospedeiro vertebrado; e epimastigota (forma replicativa e não infectante) e tripomastigota metacíclico (forma infectante e não replicativa) no hospedeiro invertebrado (Brenner, 1973). Mais recentemente, uma forma intermediária entre os estágios de amastigota e tripomastigota foi descrita, e devido às semelhanças morfológicas e bioquímicas (com a forma epimastigota) foi denominada epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria et al., 1999; Elias et al., 2007; Tyler et al., 2001).

O ciclo de vida do *T. cruzi* pode se iniciar quando as formas tripomastigotas metacíclicos presentes na porção final do intestino do inseto vetor são depositadas pelas fezes e urina durante o repasto sanguíneo realizado pelo triatomíneo (Fig. 1). Essas formas penetram pelas

mucosas, descontinuidades da pele ou pela via oral, atingindo diferentes tipos celulares, principalmente macrófagos (Barrett, 2003; Brener, 1971; Coura, 2006; de Araujo-Jorge, 1989). O parasita invade as células do hospedeiro mamífero através de um vacúolo parasitóforo a partir do qual escapa alcançando o citoplasma e diferenciando à forma amastigota, passando pelo estágio transiente denominado epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria, 1999; Schenkman et al., 1988). Após vários ciclos de divisões binárias, as formas amastigotas diferenciam-se nas formas infetivas tripomastigotas, as quais são liberadas ao meio extracelular, podendo atingir a corrente sanguínea, invadindo outras células ou sendo ingeridas pelo inseto vetor em um novo repasto sanguíneo.

Após o repasto sanguíneo, a maior parte dos tripomastigotas sanguíneos ingeridos diferenciam-se em epimastigotas no estômago do inseto vetor. Após a passagem para o intestino médio os epimastigotas se dividem repetidamente. Posteriormente, já na porção final do intestino do inseto, os parasitas se aderem às células epiteliais do reto iniciando o processo de metaciclogênese pelo qual se diferenciam às formas infectantes tripomastigotas metacíclicos (Kollien et al., 2000). Estas formas podem ser depositadas novamente pelo inseto vetor em um novo repasto sanguíneo, completando assim o ciclo.



**Figura 1: Representação esquemática do ciclo de vida do *T. cruzi*.** Formas presentes no hospedeiro mamífero: A, amastigota; Ei, epimastigota intracelular; T, tripomastigota sanguínea. Formas presentes no hospedeiro invertebrado: E, epimastigotas; M, tripomastigota metacíclico. Adaptada de (Silva Paes et al., 2011).

*T. cruzi* apresenta diversas peculiaridades com relação a outros eucariotas: esses parasitas possuem organelas especializadas denominadas glicosossomos, os quais são peroxissomos

modificados onde acontece a maior parte da glicólise, assim como a via das pentoses fosfato (Oppendoes, 1987). Outra organela própria de tripanossomatídeos é o reservossomo, estruturas endocíticas que armazenam proteínas e lipídeos, assim como atividades de hidrolases, para serem usadas em condições de estresse. Os reservossomos se localizam na parte posterior do parasita e possuem morfologia e tamanho variado de acordo com as condições nutricionais (Sant'Anna et al., 2008). Outra organela especializada inicialmente descoberta em tripanossomatídeos e depois descrita em uma variedade de outros organismos são os acidocalcissomos, organelas acídicas com alta concentração de fósforo (pirofosfato e polifosfato) complexado com  $\text{Ca}^{2+}$  e outros íons (Docampo et al., 1995; Docampo et al., 2010).

*T. cruzi* e todos os flagelados do grupo Kinetopastea possuem uma única mitocôndria que se estende ao longo do corpo do parasita, apresentando ramificações que se estendem sob os microtubulos subpeliculares. Essa mitocôndria possui as estruturas e compartimentos típicos dessa organela: membrana externa, espaço intermembrana, membrana interna com as clássicas estruturas denominadas cristas, e a matriz mitocondrial. Dependendo das condições nutricionais, a mitocôndria pode ocupar uma porção variável do volume celular total (de Souza et al., 2009). O DNA mitocondrial se localiza em uma porção determinada da organela, dentro da matriz mitocondrial, próxima ao corpo basal e perpendicular ao eixo do flagelo, formando uma estrutura incomum denominada cinetoplasto (kDNA). Com relação aos componentes da cadeia de transporte de elétrons mitocondrial, dados do genoma e experimentais mostraram a presença e funcionalidade dos complexos II e V, enquanto que o complexo I parece ter uma funcionalidade limitada devido à ausência de algumas subunidades (Carranza et al., 2009; Oppendoes et al., 2008). Análises proteômicas em *T. cruzi* mostraram a presença de várias subunidades do complexo IV, proteína Rieske Fe-S, NADH desidrogenase, subunidades alfa da ATP sintase, entre outros (Ferella et al., 2008). Antimicina e KCN inibem a transferência de elétrons desde o succinato, sugerindo que os complexos III e IV são funcionais em *T. cruzi*. Além disso, os citocromos *aa3*, *b* e *c558* foram identificados no parasita, sugerindo-se ao citocromo *aa3* como a principal oxidase terminal do *T. cruzi* (Affranchino et al., 1986; Stoppani et al., 1980).

### **1.3 Metabolismo energético em *T. cruzi***

#### **1.3.1 Metabolismo intermediário em *T. cruzi***



O *T. cruzi* não possui reserva intracelular de carboidratos, como o glicogênio. Assim, a glicose (Glc) necessita ser obtida do ambiente (por exemplo, do sangue de mamíferos) por meio de um sistema de transporte para depois ser catabolizada e produzir metabólitos reduzidos, principalmente succinato e L-alanina (Cazzulo, 1994). A glicólise em *T. cruzi* apresenta características diferenciadas em relação a outros eucariotas. Nesses parasitas a glicólise não apresenta as formas de regulação clássicas, como a regulação alostérica da hexoquinase e a fosfofructoquinase (Cazzulo, 1992). Contudo, *T. cruzi* apresenta uma glicólise compartimentalizada nos glicossomos, que contém as primeiras sete enzimas da via glicolítica (Heise et al., 1999; Opperdoes, 1987). Alguns autores propõem que a compartimentação da glicólise e a falta de regulação clássica são fenômenos relacionados, e que poderiam dever-se ao fato de que o fluxo glicolítico poderia estar controlado simplesmente pela incorporação de Glc ao glicossomo e ao balanço ADP/ATP dentro do mesmo (Bakker et al., 2000).

Em muitos organismos, a transição da anaerobiose para a aerobiose é acompanhada por uma rápida diminuição na taxa de utilização de Glc. Essa inibição do fluxo glicolítico pela presença do oxigênio é conhecida como “Efeito Pasteur”. No entanto, em *T. cruzi* não se verifica a ocorrência do “Efeito Pasteur”, ou seja, ocorrem taxas parecidas do consumo de Glc tanto em anaerobiose quanto em condições aeróbicas, o que é característico de um metabolismo do tipo fermentativo. Devido a esse fato, os termos “fermentação aeróbica” ou “fermentação succínica” da Glc foi proposto para descrever o processo de oxidação da Glc (Cazzulo, 1992; 1994). Nessas condições, a Glc é degradada de forma incompleta, resultando uma mistura final de CO<sub>2</sub>, ácidos mono e dicarboxílicos, dos quais o succinato representa cerca de 70%, e pequenas quantidades de acetato e piruvato.

Dentro do glicossomo, uma molécula de Glc é convertida em duas moléculas de gliceraldeído 1,3-bifosfato, que são translocadas ao citosol e convertidas a fosfoenolpiruvato (PEP). O PEP pode ter diferentes destinos: i. pode ser convertido a piruvato pela enzima citosólica piruvato quinase ou ii. pode voltar ao glicossomo, onde é carboxilado para formar oxaloacetato pela enzima PEP carboxiquinase (PEPCK) gerando ATP, e posteriormente reduzido a malato pela malato desidrogenase re-oxidando o NADH gerado pela gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase. Assim, é reestabelecido o balanço redox e energético dentro do glicossomo. O malato gerado dentro do glicossomo pode ser translocado ao citosol, onde pode ser convertido a piruvato pela enzima málica II, gerando NADPH necessário para processos biossintéticos no citosol. Por outro lado, o malato pode ingressar à mitocôndria,

onde pode ter dois destinos diferentes: em condições anaeróbicas, onde o ciclo dos ácidos tricarboxílicos (TCA) pode estar funcionando de maneira mais lenta, o malato é convertido em fumarato e posteriormente em succinato pela fumarato reductase, reoxidando uma molécula de NADH. Em condições aeróbicas, com o TCA funcionando ativamente, o malato pode ser convertido a piruvato pela enzima málica I, o qual é oxidado a acetil-CoA entrando assim no TCA. Dessa forma, o malato poderia ter um papel fundamental no processo da fermentação aeróbica, assim como a enzima málica poderia ser considerada importante na regulação da via (Boveris et al., 1986; Bringaud et al., 2006; Cannata et al., 1984; Cannata et al., 1979).

### 1.3.2 *T. cruzi* e os aminoácidos

Os tripanossomatídeos são capazes de catabolizar além de Glc, aminoácidos, com produção de amônio [revisado em (Silber et al., 2005c)]. Dentre os aminoácidos, tem sido demonstrado que prolina (Pro), aspartato (Asp) e glutamato (Glu) são metabolizados pelo *T. cruzi* (Sylvester et al., 1976). Além disso, asparagina (Asn), glutamina (Gln), leucina (Leu) e isoleucina (Ile) participam do metabolismo energético (Mancilla et al., 1967; Zeledon, 1960). O metabolismo da Pro vem sendo estudado em mais detalhe pelo nosso grupo. Sabe-se que a Pro é degradada em dois passos enzimáticos a Glu: primeiro, a Pro desidrogenase (*Tc*PROD<sub>H</sub>) oxida a Pro em  $\Delta^1$ -pirrolina-5-carboxilato (P5C) que posteriormente é convertido em Glu pela *Tc*P5CD<sub>H</sub> na presença de NAD(P)<sup>+</sup>. Foi descrito que a oxidação de Pro acontece na mitocôndria, estimulando a respiração celular e levando à síntese de ATP através do processo de fosforilação oxidativa (Mantilla et al., 2015; Paes et al., 2013).

Acredita-se que os aminoácidos utilizados pelo *T. cruzi* são convertidos em Asp ou Glu, os quais podem ser transportados desde o citoplasma para a mitocôndria e incorporados ao TCA (Silber et al., 2005b). O grupo amino do Glu pode ser transferido a piruvato pela alanina aminotransferase (ALAT) ou pela tirosina aminotransferase, rendendo como produtos alanina e  $\alpha$ -cetogluturato ( $\alpha$ -KG) (Nowicki et al., 2007; Zelada et al., 1996). Além disso, o grupo amino do Glu pode também ser convertido a  $\alpha$ -KG ou transferido para água (formação de NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) através de alguma das isoformas da Glu desidrogenase, (Cazzulo et al., 1977; Juan et al., 1978; 1979). O Asp também está envolvido no fornecimento de intermediários do TCA pela Asp aminotransferase, que transfere o grupo -NH<sub>2</sub> do Asp para o  $\alpha$ -KG, rendendo oxalacetato e Glu, que ingressa ao TCA pela via já descrita (Cazzulo, 1977).

Existe uma ampla evidência sobre o rol que diferentes aminoácidos possuem na biologia do *T. cruzi*, além do seu papel na síntese protéica e no metabolismo energético. Pereira e colaboradores envolveram a arginina na administração dos recursos energéticos da célula em *T. cruzi* e *T. brucei* através de uma arginina quinase, enzima de função análoga à creatina quinase dos mamíferos (Pereira et al., 2000; Pereira et al., 2002b). Esses autores, em colaboração com nosso grupo de trabalho, mostraram também que essa atividade está envolvida no crescimento e em mecanismos de resistência a estresses (Pereira et al., 2002a; Pereira et al., 2003). Mais recentemente foi proposta também a participação de vários aminoácidos, dentre eles Glu, glicina, Pro e alanina, na regulação do volume celular, como parte de um mecanismo de resistência a estresse osmótico (Rohloff et al., 2008).

Com relação ao papel da Pro em diferentes processos biológicos do *T. cruzi*, sabe-se que esse aminoácido, ou os intermediários do seu metabolismo, induzem a metaciclogênese (Contreras et al., 1985a). Além disso, foi proposto que Leu e Ile, inibidores do catabolismo da Pro, são capazes de inibir a metaciclogênese (Contreras et al., 1985b; Homsy et al., 1989b). Também foi demonstrada a participação da Pro na diferenciação das formas intracelulares (Tonelli et al., 2004). Mais recentemente, foi mostrado que a Pro é o sustento energético na invasão das células no hospedeiro vertebrado (Martins et al., 2009). Demonstrou-se nesse trabalho que em condições de depleção nutricional o parasita diminui consideravelmente os níveis intracelulares de ATP, assim como a sua capacidade para infectar células de mamífero, condição que é revertida após a adição de Pro ao meio. Nosso laboratório tem envolvido também a Pro na resistência a diferentes tipos de estresse, em particular estresse oxidativo (Magdaleno et al., 2009; Paes, 2013). Recentemente, foi descrito que parasitas superexpressando um transportador para Pro possuem uma maior concentração intracelular deste aminoácido, assim como uma resistência aumentada a espécies reativas de oxigênio tais como peróxido de hidrogênio e óxido nítrico, assim como a drogas tripanocidas (Saye et al., 2014).

#### ***1.4 Fases do crescimento de formas epimastigotas: fase estacionária como pre-adaptação para a metaciclogênese***

As formas epimastigotas, não infectantes e replicativas presentes no intestino do inseto vetor, são facilmente cultivadas axênicamente *in vitro*. Em uma curva de crescimento típica deste estágio de *T. cruzi* podem ser identificadas duas fases principais no crescimento: a fase exponencial, onde o parasita se replica ativamente e a duplicação das células é proporcional

ao tempo. Esta fase é caracterizada por uma densidade celular entre  $4,5$  e  $6,5 \times 10^7$  células por ml. Na medida em que a cultura prolifera e aumenta sua densidade, os nutrientes e as moléculas relevantes para o crescimento presentes no meio começam a ser mais escassos e o parasita entra em uma fase onde cessa a proliferação, denominada fase estacionária do crescimento. Em geral, consideramos que uma cultura de epimastigotas atingiu a fase estacionária quando a mesma possui uma densidade celular em torno de  $8-10,5 \times 10^7$  cél/ml. Como observado por Camargo e colaboradores (Camargo, 1964), culturas de epimastigotas em fase estacionária podem dar origem a tripomastigotas metacíclicos, o seguinte estágio no ciclo biológico do *T. cruzi*. Na natureza, o estado que mencionamos como fase estacionária nas culturas *in vitro* pode se corresponder com aqueles parasitas presentes no intestino do inseto vetor, aonde a disponibilidade de nutrientes diminui na medida em que os epimastigotas transitam até atingir o ponto onde a diferenciação às formas metacíclicas acontece. Vários trabalhos foram publicados descrevendo as características bioquímicas e morfológicas presentes na fase estacionária de crescimento em epimastigotas. Em seguida serão brevemente comentadas ditas características:

#### 1.4.1 Metabolismo energético

Como já mencionado anteriormente, *T. cruzi* é capaz de metabolizar tanto Glc quanto aminoácidos como fonte de energia. Foi descrito que durante a fase exponencial do crescimento, o parasita consome preferencialmente Glc, que é rapidamente consumida quando disponível no meio (Cannata, 1984). A glicólise acontece seguida da fermentação aeróbica onde os principais produtos são metabólitos reduzidos, como succinato e alanina (Brand, 1979). No início da fase estacionária, quando a Glc começa a ser escassa, há uma ativação de enzimas mitocondriais, observada pelo aumento de citocromos em culturas envelhecidas. Essas condições são necessárias para iniciar a oxidação de aminoácidos. O aumento na concentração de  $\text{NH}_4^+$  observado nesse momento do crescimento é consistente com uma degradação ativa de aminoácidos (Cazzulo et al., 1985; Engel et al., 1987). Além disso, foi relatada uma alta taxa de degradação proteolítica na fase estacionária (Henriquez et al., 1993), possivelmente para prover com aminoácidos à célula. De forma interessante, foi relatado que durante a diferenciação de epimastigotas a tripomastigotas metacíclicos, *T. cruzi* é capaz de degradar proteínas e lipídeos armazenados nos reservossomos, os quais o parasita utilizaria como fonte de energia. Assim, os reservossomos sofrem mudanças morfológicas ao longo da

diferenciação, sendo quase imperceptíveis nas formas metacíclicas (Soares et al., 1989). Em relação ao metabolismo de tripomastigotas metacíclicos, foi relatado que essas formas usam principalmente aminoácidos como fontes de energia (Urbina, 1989). Considerando o exposto até aqui, pode-se considerar que o metabolismo na fase estacionária seria uma forma pre-adaptativa para os processos que aconteceram posteriormente durante a metaciclogênese. (Hernandez et al., 2012).

#### *1.4.2 Outras características especiais das fases exponencial e estacionária*

Diversos trabalhos mostraram que as diferenças entre epimastigotas em fase exponencial e estacionária de crescimento não são apenas metabólicas: epimastigotas em fase estacionária apresentam uma morfologia mais alongada, tanto do corpo celular como do flagelo (Tyler et al., 2000). Outra característica interessante observada em parasitas em fase estacionária está relacionada ao seu núcleo: em tripomastigotas metacíclicos, o núcleo se apresenta como uma organela alongada com um conteúdo alto e disperso de heterocromatina, e não apresenta nucléolo (Elias et al., 2001). Em contraste, as formas epimastigotas crescendo ativamente em fase exponencial apresentam um nucléolo granular bem definido. Quando são observados núcleos de parasitas em fase estacionária, são observadas características intermediárias entre aquelas vistas em tripomastigotas metacíclicos e em epimastigotas de fase exponencial: na fase estacionária, os epimastigotas apresentam nucléolo, mas com uma estrutura reduzida e heterocromatina mais dispersa (Nepomuceno-Mejia et al., 2010). Em relação à mitocôndria, foi descrito por Tyler e colaboradores que parasitas em fase estacionária de crescimento apresentam mitocôndrias de tamanho e complexidade maiores, apresentando uma ativação de enzimas mitocondriais e respiração dependente de citocromos (Cazzulo, 1985; Tyler, 2000). Processos como transcrição e tradução de proteínas, os quais demandam energia para o parasita, são regulados entre as fases exponencial e estacionária de crescimento. Quando comparadas as taxas de transcrição, parasitas crescendo ativamente em fase exponencial apresentam entre 6 e 10 vezes mais transcrição que parasitas em fase estacionária (Nepomuceno-Mejia, 2010). Em relação à tradução de proteínas, foi mostrado que há uma redução da mesma quando os parasitas enfrentam condições de estresse, e que a fosforilação do fator de início da tradução eIF2 $\alpha$ , o qual causa uma inibição da síntese de proteínas, é necessária para a metaciclogênese acontecer (Tonelli et al., 2011).

Vários dos processos descritos na fase estacionária descritos aqui podem ser revertidos quando o parasita é incubado novamente em meio fresco, indicando um reinício no ciclo

celular. Assim, como dito anteriormente, a fase estacionária pode ser considerada como uma fase pre-adaptativa para as etapas seguintes no ciclo de vida do parasita, onde mudanças bioquímicas e estruturais acontecem, mas de forma transitória caso o parasita encontre condições favoráveis (Hernandez, 2012).

### *1.5 Metaciclogênese*

Como descrito anteriormente, a transformação de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas, formas infectivas de *T. cruzi*, é denominada metaciclogênese. Este processo acontece na porção final do intestino do inseto vetor e é de relevante importância para o ciclo de vida do parasita. Vários fatores estão envolvidos na indução da metaciclogênese. Foi observado que o empobrecimento do meio estimula a diferenciação (Contreras, 1985a; Sullivan, 1982) e que a adesão das formas epimastigotas ao epitélio no reto do inseto vetor é uma condição necessária mas não suficiente para iniciar a metaciclogênese (Boker et al., 1984; Zeledon et al., 1984). De fato foi observado que a adesão de epimastigotas *in vitro* é estimulada sob estresse nutricional (Bonaldo et al., 1988; Contreras, 1985a; Figueiredo et al., 2000). Como parte de um mecanismo de sinalização, foi descrito que um incremento no nível intracelular de cAMP é acompanhado de um incremento na diferenciação a formas metacíclicas, e que uma quinase A (PKA) estaria envolvida nesse mecanismo (Gonzales-Perdomo et al., 1988; Rangel-Aldao et al., 1988). Em relação aos requerimentos para a metaciclogênese *in vitro*, Contreras e colaboradores mostraram que *T. cruzi*, cepa Dm28, é capaz de diferenciar quando cultivada *in vitro*, utilizando um meio definido que denominaram TAU (*Triatomine Artificial Urine*), suplementado com Pro (Contreras, 1985a), um aminoácido também encontrado nos fluidos do inseto vetor (Engel, 1987). Os autores sugerem que dito aminoácido poderia agir como um disparador do processo de diferenciação, ou talvez como fonte de energia quando, em condições de estresse fisiológico, o parasita deve iniciar o processo de diferenciação a formas metacíclicas (Contreras, 1985a; Homsy et al., 1989a). Por outro lado, Homsy e colaboradores, mostraram que Glu também estimula a metaciclogênese, enquanto que aminoácidos como Leu e Ile inibem a diferenciação induzida pela Pro. Interessantemente, esses dois aminoácidos foram relatados como inibidores da P5C desidrogenase, uma das enzimas do metabolismo de Pro (Lundgren et al., 1973). Além disso, os mesmos autores observaram que a Glc estimula em uma proporção muito menor a metaciclogênese, sugerindo que a Pro poderia ter um papel alternativo no processo de

diferenciação. Após os relatos descritos, estudos envolvendo diferenciação de *T. cruzi* em meios definidos, utilizam como padrão para diferenciação o meio TAU 3AAG, contendo os aminoácidos Asp, Glu e Pro, além de Glc.

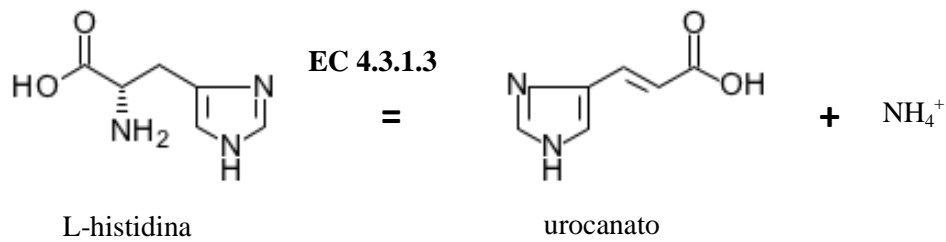
## ***1.6 L-histidina: um aminoácido com uma diversidade de funções biológicas***

### *1.6.1 Participação da His em processos biológicos*

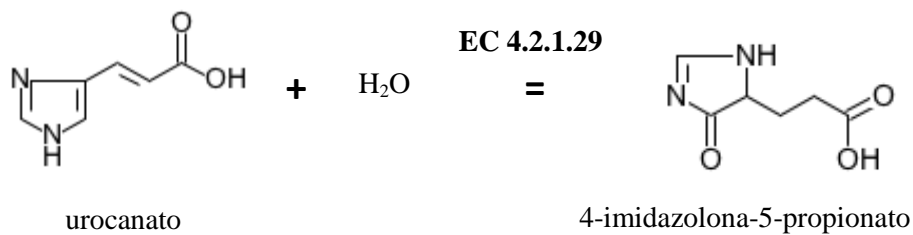
Distintos trabalhos demonstraram que a L-histidina (His) possui propriedades antioxidantes e antiinflamatórias em diferentes organismos. Demonstrou-se que a His, assim como pequenos peptídeos que a contém, funcionam como “sequestradores” tanto do radical hidroxila quanto de espécies não radicais tóxicas, tais como o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), um importante fator que participa em muitos processos oxidativos deletérios. A His parece interagir quimicamente com essas espécies do oxigênio através de pelo menos dois mecanismos: (1) interferindo com reações redox que envolvem íons metálicos, e produzem o radical hidroxila e (2) por interações diretas do anel imidazólico da His com o oxigênio singlete (Wade et al., 1998). A His participa também da formação do ovotiol A (*N*<sup>1</sup>-metil-4-mercaptohistidina). Os ovotióis possuem propriedades antioxidantes: podem agir como “sequestradores” de radicais livres e como “sequestradores” não enzimáticos do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), formando água e ovotiol-disulfeto (OS-SO). Em um estudo onde foi avaliada a proporção de ovotiol A com relação ao conteúdo total de tióis em distintos tripanosomatídeos, observou-se que essa espécie química representaria apenas um 7% em epimastigotas de *T. cruzi* cultivados na presença de putrescina. Porém, representa cerca de 28% dos tióis totais em tripomastigotas sanguíneos (Ariyanayagam et al., 2001).

### *1.6.2 Metabolismo da His*

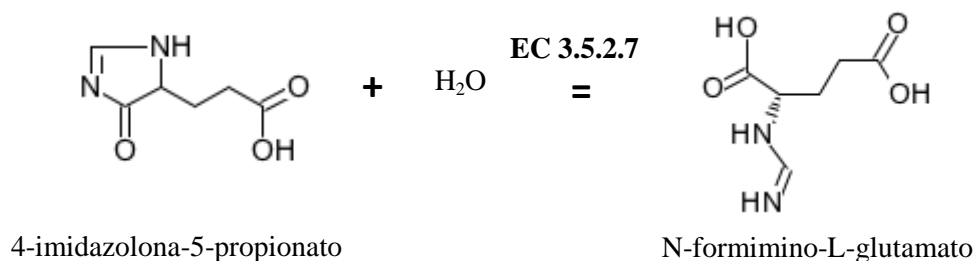
É interessante o fato de que apesar de bem conhecidas as diferentes propriedades biológicas da His, não tenha sido estudado seu metabolismo ainda em tripanossomatídeos. A via geral da degradação da His envolve vários passos que conduzem ao Glu. As primeiras três reações são semelhantes na maioria das espécies. Em primeiro lugar produz-se a eliminação do grupo  $\alpha$ -amino da His pela Histidina Amonio Liase (HAL, EC 4.3.1.3), rendendo como produtos urocanato e amônio:



Essa enzima é membro da família das liases de aminoácidos aromáticos. Primeiro identificado em *Pseudomonas putida*, o cofator utilizado pelas HALs é o 3,5-diidro-5-metilidene-4H-imidazol-4-one (MIO) o qual é gerado pós-traducionalmente pela ciclagem de uma tríade de resíduos Ala-Ser-Gly presentes na sequência primária (Louie et al., 2006; Schwede et al., 1999). O urocanato é posteriormente convertido em 4-imidazolona-5-propionato através da enzima Urocanato Hidratase (UH, EC 4.2.1.49). Essa classe de enzimas possui uma molécula de NAD<sup>+</sup> unido a sua estrutura, que atua como grupo eletrofílico na catálise enzimática (Retey, 1994):

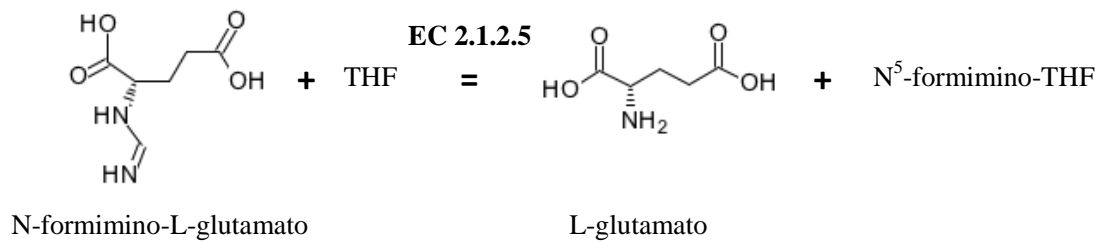
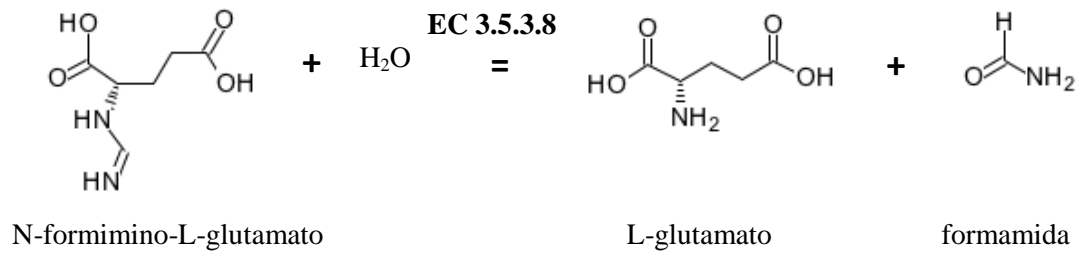


O enlace amida no anel desse intermediário é hidrolisado pela atividade Imidazolona-propionase (EC 3.5.2.7) gerando os produtos:



O grupo formimino pode ser transferido ao tetraidrofolato para formar Glu e N<sup>5</sup>-formimino-THF através da Glu-formimidoil transferase (EC 2.1.2.5), ou pode ser hidrolisado diretamente para gerar formamida e L-Glu pela enzima formimidoil-glutamase (EC 3.5.3.8) (Magasanik et al., 1955):





Fonte: [www.genome.jp/kegg/](http://www.genome.jp/kegg/), [www.brenda-enzymes.org/](http://www.brenda-enzymes.org/).

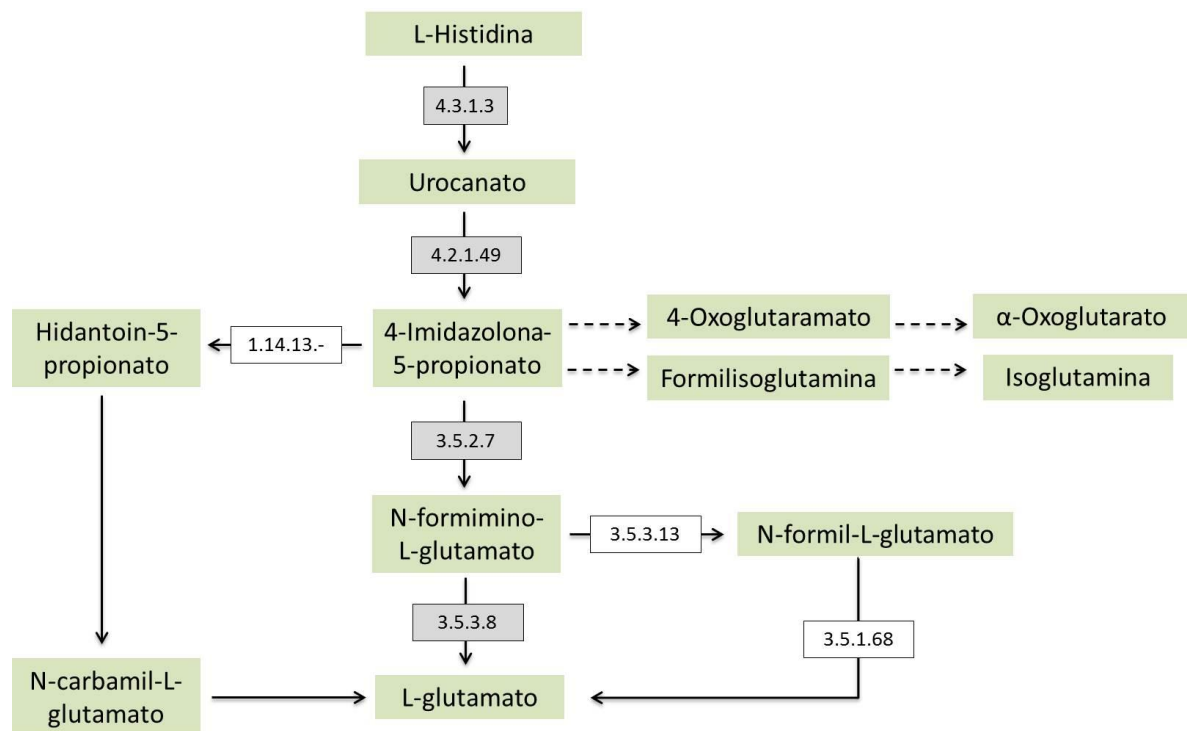
Também foram descritas ramificações dentro da via de degradação da His. Por uma parte, identificaram-se diferentes intermediários adicionais gerados a partir do 4-imidazolona-5-propionato (IPA): uma atividade oxidase o converte em L-hidantoin-5-propionato, o qual não é metabolizado *in vivo*. Além disso, relatos na literatura mostram que o intermediário IPA, que apresenta instabilidade química considerável em condições aeróbicas, pode ser oxidado não enzimaticamente a 4-cetoglutamato, e posteriormente a  $\alpha$ -KG por hidrólise não enzimática do grupo amino. Dita oxidação pode ser favorecida pela presença de um aceptor externo de elétrons, como o 2,6-diclorofenolindofenol (DCPIP) (Brand, 1979). Além disso, Feinberg e colaboradores mostraram que o IPA pode também ser hidrolisado não enzimaticamente a N-formilisoglutamina e posteriormente a isoglutamina (Feinberg et al., 1959).

Outra possível variação é a degradação de N-formimino-L-Glu através de uma via alternativa à descrita: o grupo formimino pode ser deiminado para formar amônia e N-formil-L-Glu através da enzima formimidoilglutamato deiminase (EC 3.5.3.13). O N-formil-L-glutamato é posteriormente hidrolisado pela N-formilglutamato deformilase, gerando formiato e Glu (EC 3.5.1.68) (Magasanik, 1955).

No genoma de *T. cruzi* foram identificados até agora fases abertas de leitura putativas para as seguintes enzimas da via central de degradação da His ([www.genedb.org](http://www.genedb.org)): uma fase de leitura aberta codificante para a HAL [nome sistemático: Tc00.1047053506247.220], uma

fase de leitura aberta para a UH [Tc00.1047053504045.110], outras duas fases de leitura abertas codificantes para a imidazolona-propionase [Tc00.1047053509137.30 e Tc00.1047053508741.140] e dois fases abertas de leitura correspondentes à formimino-glutamase [Tc00.1047053507963.20 e Tc00.1047053507031.90]. Esses dados sugerem que a His poderia funcionar como uma fonte de energia em *T. cruzi*.

Na figura 2, observa-se uma visão geral da via de degradação de His, com ênfase nas enzimas identificadas no genoma de *T. cruzi*.



**Figura 2: Via geral de degradação da His.** Em *T. cruzi*, a via de degradação parece ocorrer de forma linear, gerando como produtos Glu e formamida. As enzimas indicadas com quadros cinzas correspondem às identificadas no genoma de *T. cruzi*. EC 4.3.1.3: histidina amônia-liase, EC 4.2.1.49: urocanato hidratase, EC 3.5.2.7 imidazolona propionase, EC 3.5.3.8: formimino-glutamase, EC 3.5.3.13: formimidoilglutamato deiminase, EC 3.5.1.68: N-formilglutamato deformilase. As setas pontilhadas indicam reações não enzimáticas.

## **CAPÍTULO 2: CONCLUSÕES**

---

- His é um aminoácido essencial para *T. cruzi*: a carência desse aminoácido induz no parasita um estresse metabólico que afeta sua viabilidade e proliferação.
- A incorporação de His desde o meio extracelular acontece por um sistema único que apresenta uma alta especificidade de substrato, ativo principalmente nas formas epimastigotas e dependente do conteúdo intracelular de ATP para sua atividade.
- *TcHAL* e *TcUH*, as duas primeiras na via de degradação da His, são funcionais em epimastigotas de *T. cruzi*, participando da degradação até Glu nas formas epimastigotas.
- Na fase exponencial de crescimento ambas as enzimas são mais ativas, de acordo com a nossa proposta de que a His estaria atuando como uma importante fonte energética.
- Na fase estacionária de crescimento, os epimastigotas incorporam mais His e degradam menos esse aminoácido, levando a um acúmulo dos níveis intracelulares de His e seu produto urocanato, sugerindo que na fase estacionária, considerada como uma pré-adaptação para a metaciclologênese, seria importante um acúmulo de His no interior celular.
- Em relação ao papel da His na bioenergética de *T. cruzi*, observamos que a conversão do Glu a  $\alpha$ -KG e posterior entrada no TCA acontece após a degradação de His, o qual foi observado através da detecção de CO<sub>2</sub> liberado em parasitas incubados em His como única fonte energética. His é capaz de manter a viabilidade de epimastigotas de *T. cruzi* quando incubados unicamente na presença desse aminoácido e que, além disso, é capaz de restaurar a viabilidade após um importante período de estresse nutricional.
- A degradação de His consegue restabelecer o potencial de membrana interna mitocondrial, assim como estimular a síntese de ATP através da forforilação oxidativa e o consumo de oxigênio na mitocôndria.
- His é capaz de induzir o processo de metaciclologênese. Estudos metabolômicos referentes à diferenciação em meios definidos contendo His, Pro ou ambos os aminoácidos combinados, indicaram que embora ambos sejam fontes de energia para o processo de diferenciação, o metabolismo dos mesmos apresenta diferentes padrões metabólicos, incluso com variações no tempo, o que sugere que a utilização de ambos os aminoácidos pode ser regulada de forma diferente, dependendo da necessidade da célula.

## REFERÊNCIAS\*

- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005;52(5):399-451.
- Adroher FJ, Osuna A, Lupianez JA. Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. I. Citrate synthase, NADP-isocitrate dehydrogenase, and succinate dehydrogenase. *Arch Biochem Biophys.* 1988;267(1):252-61.
- Affranchino JL, Schwarcz de Tarlovsky MN, Stoppani AO. Terminal oxidases in the trypanosomatid *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B.* 1986;85(2):381-8.
- Almeida-de-Faria M, Freymuller E, Colli W, Alves MJ. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. *Exp Parasitol.* 1999;92(4):263-74.
- Ames BN, Garry B, Herzenberg LA. The genetic control of the enzymes of histidine biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J Gen Microbiol.* 1960;22:369-78.
- Ariyanayagam MR, Fairlamb AH. Ovoidiol and trypanothione as antioxidants in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol.* 2001;115(2):189-98.
- Azevedo JPR, I. . Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in defined media. *Genes and Antigens of parasites A laboratory manual.* 1984;2nd. Edition:29-36.
- Bakker BM, Mensonides FI, Teusink B, van Hoek P, Michels PA, Westerhoff HV. Compartmentation protects trypanosomes from the dangerous design of glycolysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97(5):2087-92.
- Barreto-de-Albuquerque J, Silva-dos-Santos D, Perez AR, Berbert LR, de Santana-van-Vliet E, Farias-de-Oliveira DA, Moreira OC, Roggero E, de Carvalho-Pinto CE, Jurberg J, Cotta-de-Almeida V, Bottasso O, Savino W, de Meis J. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: new disease form from an old Infection? *PLoS Negl Trop Dis.* 2015;9(6):e0003849.
- Barrett FM, Friend WG. Differences in the concentration of free amino acids in the haemolymph of adult male and female *Rhodnius prolixus*. *Comp Biochem Physiol B.* 1975;52(3):427-31.
- Barrett MP, Burchmore RJ, Stich A, Lazzari JO, Frasch AC, Cazzulo JJ, Krishna S. The trypanosomiases. *Lancet.* 2003;362(9394):1469-80.
- Bender RA. Regulation of the histidine utilization (*hut*) system in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2012;76(3):565-84.

\*De acordo com:

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

- Birkler RI, Stottrup NB, Hermansson S, Nielsen TT, Gregersen N, Botker HE, Andreasen MF, Johannsen M. A UPLC-MS/MS application for profiling of intermediary energy metabolites in microdialysis samples--a method for high-throughput. *J Pharm Biomed Anal.* 2010;53(4):983-90.
- Boker CA, Schaub GA. Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. *Z Parasitenkd.* 1984;70(4):459-69.
- Bonaldo MC, Souto-Padron T, de Souza W, Goldenberg S. Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. *J Cell Biol.* 1988;106(4):1349-58.
- Boveris A, Hertig CM, Turrens JF. Fumarate reductase and other mitochondrial activities in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* 1986;19(2):163-9.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976;72:248-54.
- Brand LM, Harper AE. Histidine ammonia-lyase from rat liver. Purification, properties, and inhibition by substrate analogues. *Biochemistry.* 1976;15(9):1814-21.
- Brand v. *Biochemistry and Physiology of Endoparasites.* Elsevier/North Holland, Amsterdam. 1979.
- Brener Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1971;13(3):171-8.
- Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973;27:347-82.
- Bringaud F, Riviere L, Coustou V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. *Mol Biochem Parasitol.* 2006;149(1):1-9.
- Buhaya MH, Galvan S, Maldonado RA. Incidence of *Trypanosoma cruzi* infection in triatomines collected at Indio Mountains Research Station. *Acta Trop.* 2015;150:97-9.
- Camargo EP. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1964;6:93-100.
- Canepa GE, Bouvier LA, Miranda MR, Uttaro AD, Pereira CA. Characterization of *Trypanosoma cruzi* L-cysteine transport mechanisms and their adaptive regulation. *FEMS Microbiol Lett.* 2009;292(1):27-32.
- Canepa GE, Bouvier LA, Urias U, Miranda MR, Colli W, Alves MJ, Pereira CA. Aspartate transport and metabolism in the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2005;247(1):65-71.
- Canepa GE, Silber AM, Bouvier LA, Pereira CA. Biochemical characterization of a low-affinity arginine permease from the parasite *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;236(1):79-84.

- Cannata JJ, Cazzulo JJ. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B*. 1984;79(3):297-308.
- Cannata JJ, Frascch AC, Cataldi de Flombaum MA, Segura EL, Cazzulo JJ. Two forms of 'malic' enzyme with different regulatory properties in *Trypanosoma cruzi*. *Biochem J*. 1979;184(2):409-19.
- Carranza JC, Kowaltowski AJ, Mendonca MA, de Oliveira TC, Gadelha FR, Zingales B. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. *J Bioenerg Biomembr*. 2009;41(3):299-308.
- Carrillo C, Cejas S, Gonzalez NS, Algranati ID. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. *FEBS Lett*. 1999;454(3):192-6.
- Carrillo C, Cejas S, Huber A, Gonzalez NS, Algranati ID. Lack of arginine decarboxylase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *J Eukaryot Microbiol*. 2003;50(5):312-6.
- Cazzulo J. Aerobic fermentation of glucose by trypanosomatids. *The FASEB journal*. 1992.
- Cazzulo J. Intermediate metabolism in *Trypanosoma cruzi*. *Journal of bioenergetics and biomembranes*. 1994a;26(2):157-65.
- Cazzulo JJ, Franke de Cazzulo BM, Engel JC, Cannata JJ. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. *Mol Biochem Parasitol*. 1985;16(3):329-43.
- Cazzulo JJ, Juan SM, Segura EL. Glutamate dehydrogenase and aspartate aminotransferase in *Trypanosoma cruzi*. *Comp Biochem Physiol B*. 1977;56(3):301-3.
- Consevage MW, Phillips AT. Presence and quantity of dehydroalanine in histidine ammonia-lyase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*. 1985;24(2):301-8.
- Contreras VT, Morel CM, Goldenberg S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol Biochem Parasitol*. 1985a;14(1):83-96.
- Contreras VT, Salles JM, Thomas N, Morel CM, Goldenberg S. *In vitro* differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol Biochem Parasitol*. 1985b;16(3):315-27.
- Coura JR. [Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2006;39 Suppl 3:113-7.
- Cross GA, Manning JC. Cultivation of *Trypanosoma brucei* spp. in semi-defined and defined media. *Parasitology*. 1973;67(3):315-31.
- Cunha-e-Silva N, Sant'Anna C, Pereira MG, Porto-Carreiro I, Jeovanio AL, de Souza W. Reservoirs: multipurpose organelles? *Parasitol Res*. 2006;99(4):325-7.

- de Araujo-Jorge TC. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84(4):441-62.
- De Paula Lima CV, Batista M, Kugeratski FG, Vincent IM, Soares MJ, Probst CM, Krieger MA, Marchini FK. LM14 defined medium enables continuous growth of *Trypanosoma cruzi*. BMC Microbiol. 2014;14:238.
- De Souza W. From the cell biology to the development of new chemotherapeutic approaches against trypanosomatids: dreams and reality. Kinetoplastid Biol Dis. 2002;1(1):3.
- de Souza W, Attias M, Rodrigues JC. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(10):2069-80.
- Docampo R, Scott DA, Vercesi AE, Moreno SN. Intracellular  $Ca^{2+}$  storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. 1995;310 ( Pt 3):1005-12.
- Docampo R, Ulrich P, Moreno SN. Evolution of acidocalcisomes and their role in polyphosphate storage and osmoregulation in eukaryotic microbes. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2010;365(1541):775-84.
- Duschak VG, Couto AS. An insight on targets and patented drugs for chemotherapy of Chagas disease. Recent Pat Antiinfect Drug Discov. 2007;2(1):19-51.
- Elias MC, da Cunha JP, de Faria FP, Mortara RA, Freymuller E, Schenkman S. Morphological events during the *Trypanosoma cruzi* cell cycle. Protist. 2007;158(2):147-57.
- Elias MC, Marques-Porto R, Freymuller E, Schenkman S. Transcription rate modulation through the *Trypanosoma cruzi* life cycle occurs in parallel with changes in nuclear organisation. Mol Biochem Parasitol. 2001;112(1):79-90.
- Engel JC, Franke de Cazzulo BM, Stoppani AO, Cannata JJ, Cazzulo JJ. Aerobic glucose fermentation by *Trypanosoma cruzi* axenic culture amastigote-like forms during growth and differentiation to epimastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1987;26(1-2):1-10.
- Feinberg RH, Greenberg DM. Studies on the enzymic decomposition of urocanic acid. J Biol Chem. 1959;234:2670-6.
- Ferella M, Nilsson D, Darban H, Rodrigues C, Bontempi EJ, Docampo R, Andersson B. Proteomics in *Trypanosoma cruzi*--localization of novel proteins to various organelles. Proteomics. 2008;8(13):2735-49.
- Figueiredo RC, Rosa DS, Soares MJ. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes: metacyclogenesis and adhesion to substrate are triggered by nutritional stress. J Parasitol. 2000;86(6):1213-8.
- Gattuso JM, Kamm MA. Review article: the management of constipation in adults. Aliment Pharmacol Ther. 1993;7(5):487-500.
- Gonzales-Perdomo M, Romero P, Goldenberg S. Cyclic AMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. Exp Parasitol. 1988;66(2):205-12.



- Gonzalez NS, Ceriani C, Algranati ID. Differential regulation of putrescine uptake in *Trypanosoma cruzi* and other trypanosomatids. *Biochem Biophys Res Commun.* 1992;188(1):120-8.
- Grisard EC, Campbell DA, Romanha AJ. Mini-exon gene sequence polymorphism among *Trypanosoma rangeli* strains isolated from distinct geographical regions. *Parasitology.* 1999;118 ( Pt 4):375-82.
- Guhl F, Vallejo GA. *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920: an updated review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(4):435-42.
- Harington JS. Histamine and histidine in excreta of the blood-sucking bug *Rhodnius prolixus*. *Nature.* 1956;178(4527):268.
- Harington JS. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* I. Analysis of the haemolymph. *Parasitology.* 1961a;51:309-18.
- Harington JS. Studies of the amino acids of *Rhodnius prolixus* II. Analysis of the excretory material. *Parasitology.* 1961b;51:319-26.
- Hassall HG, D. M. Urocanase (beef liver). *Methods Enzymol.* 1971;17B:84-8.
- Heise N, Opperdoes FR. Purification, localisation and characterisation of glucose-6-phosphate dehydrogenase of *Trypanosoma brucei*. *Mol Biochem Parasitol.* 1999;99(1):21-32.
- Henriquez DA, Perez N, Pance A, Bradley C. Mechanisms of protein degradation in *Trypanosoma cruzi*. *Biol Res.* 1993;26(1-2):151-7.
- Hernandez D, Phillips AT. Purification and characterization of *Pseudomonas putida* histidine ammonia-lyase expressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 1993;4(5):473-8.
- Hernandez R, Cevallos AM, Nepomuceno-Mejia T, Lopez-Villasenor I. Stationary phase in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes as a preadaptive stage for metacyclogenesis. *Parasitol Res.* 2012;111(2):509-14.
- Hoare CA. Studies on *Trypanosoma grayi*. III. Life-Cycle in the Tsetse-fly and in the Crocodile. *Parasitology.* 1929;23:449.
- Homsy JJ, Granger B, Krassner SM. Some factors inducing formation of metacyclic stages of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool.* 1989a;36(2):150-3.
- Inbar E, Canepa GE, Carrillo C, Glaser F, Suter Grotemeyer M, Rentsch D, Zilberstein D, Pereira CA. Lysine transporters in human trypanosomatid pathogens. *Amino Acids.* 2010;42(1):347-60.
- Juan SM, Segura EL, Cazzulo JJ. Purification and some properties of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi*. *Int J Biochem.* 1978;9(6):395-400.

- Juan SM, Segura EL, Cazzulo JJ. Inhibition of the NADP-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi* by silver nitrate. *Experientia*. 1979;35(9):1139-40.
- Kaminskas E, Kimhi Y, Magasanik B. Urocanase and N-formimino-L-glutamate formiminohydrolase of *Bacillus subtilis*, two enzymes of the histidine degradation pathway. *J Biol Chem*. 1970;245(14):3536-44.
- Kelly S, Ivens A, Manna PT, Gibson W, Field MC. A draft genome for the African crocodylian trypanosome *Trypanosoma grayi*. *Sci Data*. 2014;1:140024.
- Kollien AH, Schaub GA. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. *Parasitol Today*. 2000;16(9):381-7.
- Le Quesne SA, Fairlamb AH. Regulation of a high-affinity diamine transport system in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Biochem J*. 1996;316 ( Pt 2):481-6.
- Lenz M, Retey J. Cloning, expression and mutational analysis of the urocanase gene (hutU) from *Pseudomonas putida*. *Eur J Biochem*. 1993;217(1):429-34.
- Leroux AE, Maugeri DA, Cazzulo JJ, Nowicki C. Functional characterization of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2011a;177(1):61-4.
- Leroux AE, Maugeri DA, Opperdoes FR, Cazzulo JJ, Nowicki C. Comparative studies on the biochemical properties of the malic enzymes from *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *FEMS Microbiol Lett*. 2011b;314(1):25-33.
- Li Q, Zhang S, Berthiaume JM, Simons B, Zhang GF. Novel approach in LC-MS/MS using MRM to generate a full profile of acyl-CoAs: discovery of acyl-dephospho-CoAs. *J Lipid Res*. 2014;55(3):592-602.
- Louie GV, Bowman ME, Moffitt MC, Baiga TJ, Moore BS, Noel JP. Structural determinants and modulation of substrate specificity in phenylalanine-tyrosine ammonia-lyases. *Chem Biol*. 2006;13(12):1327-38.
- Luckemeyer DD. Avaliação do perfil proteico de *trypanosoma rangeli* durante o processo de diferenciação celular *in vitro*. [tese (Doutorado em Biotecnologia e Biociências)]. Florianópolis: Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Universidade Federal de Santa Catarina; 2014.
- Lundgren DW, Ogur M. Inhibition of yeast 1 -pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase by common amino acids and the regulation of proline catabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1973;297(2):246-57.
- Magasanik B, Bowser HR. The degradation of histidine by *Aerobacter aerogenes*. *J Biol Chem*. 1955;213(2):571-80.
- Magdaleno A, Ahn IY, Paes LS, Silber AM. Actions of a proline analogue, L-thiazolidine-4-carboxylic acid (T4C), on *Trypanosoma cruzi*. *PLoS One*. 2009;4(2):e4534.

- Mancilla R, Naquira C, Lanas C. Protein biosynthesis in trypanosomidae. II. The metabolic fate of DL-leucine-1-C14 in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 1967;21(2):154-9.
- Mantilla BS, Paes LS, Pral EM, Martil DE, Thiemann OH, Fernandez-Silva P, Bastos EL, Silber AM. Role of Delta1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem*. 2015;290(12):7767-90.
- Marciano D, Santana M, Nowicki C. Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H<sub>2</sub>S production in *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 2012;185(2):114-20.
- Martins RM, Covarrubias C, Rojas RG, Silber AM, Yoshida N. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. *Infect Immun*. 2009;77(7):3023-32.
- Mehler AH, Tabor H. Deamination of histidine to form urocanic acid in liver. *J Biol Chem*. 1953;201(2):775-84.
- Minning TA, Weatherly DB, Atwood J, 3rd, Orlando R, Tarleton RL. The steady-state transcriptome of the four major life-cycle stages of *Trypanosoma cruzi*. *BMC Genomics*. 2009;10:370.
- Moncayo A, Ortiz Yanine MI. An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*. 2006;100(8):663-77.
- Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*. 1983;65(1-2):55-63.
- Nepomuceno-Mejia T, Lara-Martinez R, Cevallos AM, Lopez-Villasenor I, Jimenez-Garcia LF, Hernandez R. The *Trypanosoma cruzi* nucleolus: a morphometrical analysis of cultured epimastigotes in the exponential and stationary phases. *FEMS Microbiol Lett*. 2010;313(1):41-6.
- Nicholls DG, Budd SL. Mitochondria and neuronal glutamate excitotoxicity. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1366(1-2):97-112.
- Norval M, Gibbs NK, Gilmour J. The role of urocanic acid in UV-induced immunosuppression: recent advances (1992-1994). *Photochem Photobiol*. 1995;62(2):209-17.
- Nowicki C, Cazzulo JJ. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*. 2007.
- Opperdoes FR. Topogenesis of glycolytic enzymes in *Trypanosoma brucei*. *Biochem Soc Symp*. 1987;53:123-9.
- Opperdoes FR, Michels PA. Complex I of Trypanosomatidae: does it exist? *Trends Parasitol*. 2008;24(7):310-7.

- Paes LS, Suarez Mantilla B, Zimbres FM, Pral EM, Diogo de Melo P, Tahara EB, Kowaltowski AJ, Elias MC, Silber AM. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. PLoS One. 2013;8(7):e69419.
- Parodi-Talice A, Monteiro-Goes V, Arrambide N, Avila AR, Duran R, Correa A, Dallagiovanna B, Cayota A, Krieger M, Goldenberg S, Robello C. Proteomic analysis of metacyclic trypomastigotes undergoing *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. J Mass Spectrom. 2007;42(11):1422-32.
- Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber A, Alves MJ, Bouvier LA, Flawia MM, Torres HN. Arginine metabolism in *Trypanosoma cruzi* is coupled to parasite stage and replication. FEBS Lett. 2002a;526(1-3):111-4.
- Pereira CA, Alonso GD, Ivaldi S, Silber AM, Alves MJ, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase overexpression improves *Trypanosoma cruzi* survival capability. FEBS Lett. 2003;554(1-2):201-5.
- Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Flawia MM, Torres HN. L-arginine uptake and L-phosphoarginine synthesis in *Trypanosoma cruzi*. J Eukaryot Microbiol. 1999;46(6):566-70.
- Pereira CA, Alonso GD, Paveto MC, Iribarren A, Cabanas ML, Torres HN, Flawia MM. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. J Biol Chem. 2000;275(2):1495-501.
- Pereira CA, Alonso GD, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. J Eukaryot Microbiol. 2002b;49(1):82-5.
- Pereira CA, Alonso GD, Torres HN, Flawia MM. Arginine kinase: a common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. J Eukaryot Microbiol. 2002c;49(1):82-5.
- Petersen LN, Marineo S, Mandala S, Davids F, Sewell BT, Ingle RA. The missing link in plant histidine biosynthesis: *Arabidopsis* myoinositol monophosphatase-like2 encodes a functional histidinol-phosphate phosphatase. Plant Physiol. 2010;152(3):1186-96.
- Punukollu G, Gowda RM, Khan IA, Navarro VS, Vasavada BC. Clinical aspects of the Chagas' heart disease. Int J Cardiol. 2007;115(3):279-83.
- Rangel-Aldao R, Triana F, Fernandez V, Comach G, Abate T, Montoreano R. Cyclic AMP as an inducer of the cell differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Biochem Int. 1988;17(2):337-44.
- Rassi A, Jr., Rassi A, Marcondes de Rezende J. American trypanosomiasis (Chagas disease). Infect Dis Clin North Am. 2012;26(2):275-91.
- Reilly SK, De Fabo EC. Dietary histidine increases mouse skin urocanic acid levels and enhances UVB-induced immune suppression of contact hypersensitivity. Photochem Photobiol. 1991;53(4):431-8.

- Retey J. The urocanase story: a novel role of NAD<sup>+</sup> as electrophile. *Arch Biochem Biophys*. 1994;314(1):1-16.
- Rohloff P, Docampo R. A contractile vacuole complex is involved in osmoregulation in *Trypanosoma cruzi*. *Exp Parasitol*. 2008;118(1):17-24.
- Sambrook JF,; Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edition ed. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977;74(12):5463-7.
- Sant'Anna C, Pereira MG, Lemgruber L, de Souza W, Cunha e Silva NL. New insights into the morphology of *Trypanosoma cruzi* reservosome. *Microsc Res Tech*. 2008;71(8):599-605.
- Saye M, Miranda MR, di Girolamo F, de los Milagros Camara M, Pereira CA. Proline modulates the *Trypanosoma cruzi* resistance to reactive oxygen species and drugs through a novel D, L-proline transporter. *PLoS One*. 2014;9(3):e92028.
- Schenkman S, Andrews NW, Nussenzweig V, Robbins ES. *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. *Cell*. 1988;55(1):157-65.
- Schottelius J. Neuraminidase fluorescence test for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. *Trop Med Parasitol*. 1987;38(4):323-7.
- Schwede TF, Retey J, Schulz GE. Crystal structure of histidine ammonia-lyase revealing a novel polypeptide modification as the catalytic electrophile. *Biochemistry*. 1999;38(17):5355-61.
- Shibatani T, Kakimoto T, Chibata I. Crystalline L-histidine ammonia-lyase of *Achromobacter liquidum*. Crystallization and enzymic properties. *Eur J Biochem*. 1975;55(1):263-9.
- Silber A, Colli W, Ulrich H, Alves M, Pereira C. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Current drug targets Infectious disorders*. 2005a;5(1):53-64.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005b;5(1):53-64.
- Silber AM, Colli W, Ulrich H, Alves MJ, Pereira CA. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. *Curr Drug Targets Infect Disord*. 2005c;5(1):53-64.
- Silber AM, Rojas RL, Urias U, Colli W, Alves MJ. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. *Int J Parasitol*. 2006;36(2):157-63.
- Silber AM, Tonelli RR, Martinelli M, Colli W, Alves MJ. Active transport of L-proline in *Trypanosoma cruzi*. *J Eukaryot Microbiol*. 2002;49(6):441-6.

Silva Paes L, Suarez Mantilla B, Julia Barison M, Wrenger C, Mariano Silber A. The Uniqueness of the *Trypanosoma cruzi* Mitochondrion: Opportunities to Target New Drugs Against Chagas Disease. *Current Pharmaceutical Design*. 2011;17(20):2074-99.

Soares MJ, Souto-Padron T, Bonaldo MC, Goldenberg S, de Souza W. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 1989;75(7):522-7.

Stoco PH, Wagner G, Talavera-Lopez C, Gerber A, Zaha A, Thompson CE, Bartholomeu DC, Luckemeyer DD, Bahia D, Loreto E, Prestes EB, Lima FM, Rodrigues-Luiz G, Vallejo GA, Filho JF, Schenkman S, Monteiro KM, Tyler KM, de Almeida LG, Ortiz MF, Chiurillo MA, de Moraes MH, Cunha Ode L, Mendonca-Neto R, Silva R, Teixeira SM, Murta SM, Sincero TC, Mendes TA, Urmenyi TP, Silva VG, DaRocha WD, Andersson B, Romanha AJ, Steindel M, de Vasconcelos AT, Grisard EC. Genome of the avirulent human-infective trypanosome--*Trypanosoma rangeli*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3176.

Stoppani AO, Docampo R, de Boiso JF, Frasch AC. Effect of inhibitors of electron transport and oxidative phosphorylation on *Trypanosoma cruzi* respiration and growth. *Mol Biochem Parasitol*. 1980;2(1):3-21.

Sullivan JJ. Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro: a simplified procedure. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1982;76(3):300-3.

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

Tabor CW, Tabor H. Polyamines. *Annu Rev Biochem*. 1984;53:749-90.

Teixeira MM, Yoshida N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Mol Biochem Parasitol*. 1986;18(3):271-82.

Tonelli RR, Augusto Lda S, Castilho BA, Schenkman S. Protein synthesis attenuation by phosphorylation of eIF2alpha is required for the differentiation of *Trypanosoma cruzi* into infective forms. *PLoS One*. 2011;6(11):e27904.

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

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

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. *Biotechnology*. 1992;24:145-9.

Tyler KM, Engman DM. Flagellar elongation induced by glucose limitation is preadaptive for *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Cell Motil Cytoskeleton*. 2000;46(4):269-78.

Tyler KM, Engman DM. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. *Int J Parasitol.* 2001;31(5-6):472-81.

Urbina JA, Osorno, C. E., Rojas, A. The central role of phosphoenol pyruvate carboxykinase in the energy metabolism of *Trypanosoma cruzi*. Studies using 3-mercaptopycolinic acid. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1989;84.

Vallejo GA. Estudios comparativos entre las secuencias de kADN en *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma rangeli* y su aplicación en el diagnóstico de la tripanosomiasis americana. *Rev Actual Biol.* 1998;20:43-56.

Wade MA, Tucker HN. Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nutr Biochem.* 1998;9(6):308-15.

Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS. MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W251-7.

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

Zeledon R. Comparative physiological studies on four species of hemoflagellates in culture. II. Effect of carbohydrates and related substances and some amino compounds on the respiration. *J Parasitol.* 1960a;46:541-51.

Zeledon R, Bolanos R, Rojas M. Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. *Acta Trop.* 1984;41(1):39-43.