Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes

Carolina Silva Dias Vieira

Efeito do heme no metabolismo de glicose das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem bioquímica e metabolômica

Rio de Janeiro

2020

Carolina Silva Dias Vieira

Efeito do heme no metabolismo de glicose das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem bioquímica e metabolômica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.ª Marcia Cristina Paes

Rio de Janeiro

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

V658 Vieira, Carolina Silva Dias.
Efeito do heme no metabolismo de glicose das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem bioquímica e metabolômica / Carolina Silva Dias Vieira. - 2020.
96f.

Orientadora: Prof.ª Dra. Marcia Cristina Paes

Mestrado (Dissertação) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Trypanosoma cruzi – Teses. 2. Heme – Teses. 3. Porfirinas - Teses. 4. Metabolismo - Teses. I. Paes, Marcia Cristina. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 576.893.161.13

Bibliotecária: Ana Rachel Fonseca de Oliveira
CRB7/6382

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, desde que citada a fonte.

_____ _____

Assinatura Data

Carolina Silva Dias Vieira

Efeito do heme no metabolismo de glicose das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem bioquímica e metabolômica

Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, ao Programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 09 de setembro de 2020.

Orientadora: Profª. Marcia Cristina Paes
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____
Prof.ª Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

_____
Prof.ª Dra. Ana Maria Rossini Teixeira
Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes – UERJ

_____
Prof. Dr. Marcus Fernandes de Oliveira
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro
2020

DEDICATÓRIA

Dedico às minhas famílias de coração,
de sangue e de laboratório

AGRADECIMENTOS

Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão por todos que de alguma forma participaram da minha trajetória. Primeiramente, meu eterno agradecimento à Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Não saberia dizer a pessoa que eu seria hoje se não fosse por essa instituição que me acolheu, transformou e continua transformando muitas vidas.

À minha família da pesquisa, só tenho a agradecer. À Marcia, por tudo! Pelas oportunidades, pela orientação, pelo estímulo e incentivo de sempre aprender algo novo, pelos ensinamentos preciosos e, principalmente, pela generosidade, por todo amor e carinho. Obrigada por me inspirar todos os dias e por não ter desistido de mim, por mais confusa que eu seja. Minha eterna gratidão. À Natália, pelas conversas científicas e pessoais, pelo incentivo e por me ensinar que de fato alguns métodos não são difíceis, mas sim que requerem determinação, esforço e muito estudo. Obrigada!

Agradeço às primeiras estudantes que me receberam no laboratório que, além da bancada, me ensinaram muito sobre a vida. À Jessica e à Francis, muito obrigada pela amizade, pelas conversas divertidas e discussões científicas, pelas risadas e por todo apoio. Agradeço muito por tê-las na minha vida e por sempre estarem dispostas a me ajudar. Carol, minha amiga e companheira de geração do laboratório, obrigada pelo apoio emocional, pela amizade, pelo grande coração e pelas conversas regadas a um bom café. Às alunas mais novas, Isabella e Hanna, obrigada por me darem a oportunidade de ensinar e aprender com vocês.

Agradeço também a todos do departamento de Bioquímica. Aos professores Marsen, Graça, Kátia, Ana, Tatiana, Jayme e Jacyara por abrirem as portas dos seus laboratórios para o desenvolvimento da minha pesquisa e por estarem sempre dispostos a ajudar. Uma gratidão especial à Profª Ana por ter acompanhado a minha iniciação científica e por ser revisora e membro da banca desta dissertação.

Aos técnicos, Paulinho, Amanda, Shirley, Beto, João, Lin, Márcia, Dani e Denise, muito obrigada pelos ensinamentos, pelas ajudas e pelas conversas. Aos amigos da bioquímica, Thayane, Bruna, Manu, Orlando, Lilian e Jeniffer, obrigada por todas as conversas, memes e brincadeiras.

Aos que hoje não estão no departamento, mas que foram e são muito importantes na minha vida. Mariana, Gustavo, Nemes, Suelen, Nathália, Carolzinha, Amanda, Maurício, JonJon, Gabi Rabello e Gabi Sthel, obrigada por todos os momentos preciosos, pelos ensinamentos, pelas risadas e por todo amor.

Tenho muito a agradecer também ao Prof Gilson Costa por ter me introduzido e me apresentado à ressonância magnética nuclear. Obrigada por toda à atenção e disponibilidade, por todos os materiais bibliográficos enviados e pelos vários áudios sanando as minhas dúvidas. Agradeço também ao Ramon Aguiar por me acompanhar durante os experimentos desenvolvidos no espectrômetro, pelos ensinamentos e pelas conversas.

Agradeço também à Profª Silvia e ao seu grupo do departamento de Parasitologia, que estiveram sempre dispostos a ajudar quando precisamos.

Agradeço aos meus pais pelo amor e por me incentivarem a minha trajetória acadêmica. À minha mãedrasta, Samantha, por ter sido responsável pela minha criação, por todo cuidado, por todo amor e por me dar uma família mineira linda. Serei eternamente grata! Ao meu marido, Rodrigo, que não consigo dimensionar em palavras minha gratidão! Agradeço pelo amor, pela compreensão quando fico horas imersa no trabalho, pelo incentivo, pelo apoio emocional e por todas as vezes que me lembrou de comer e de ir embora do laboratório porque era tarde. Obrigada pelo estímulo diário, pela torcida e por me agraciar com a minha sogra, Rubia, que eu amo tanto! Às minhas amigas da vida e da biologia, meu agradecimento! Mesmo distantes fisicamente, obrigada por me acompanharem e torcerem por mim.

Por fim, agradeço aos membros da banca que contribuirão imensamente para este trabalho e também às agências de fomento.

RESUMO

VIEIRA, Carolina Silva Dias. **Efeito do heme no metabolismo de glicose nas formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*: uma abordagem bioquímica e metabolômica.** 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

O heme é uma molécula que está presente em altas quantidades no intestino do inseto vetor e influencia o metabolismo das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*. Essa porfirina induz a proliferação, estimula mudanças fisiológicas e também promove mudanças a nível transcricional, elevando a expressão de genes relacionados com a glicólise e a fermentação em detrimento da não modulação da expressão de genes relacionados ao metabolismo energético mitocondrial. Portanto, neste estudo investigamos o efeito do heme no metabolismo de glicose das formas epimastigotas de *T. cruzi* utilizando abordagens bioquímica e metabolômica. Nossos resultados demonstraram que a inibição da glicólise, mediada pela 2-desoxiglicose, prejudicou em mais de 50% a proliferação das formas epimastigotas mantidas com heme, abolindo o aumento do crescimento induzido pela porfirina. Quando avaliamos a concentração de glicose no meio de cultura, vimos que a glicose foi consumida pelos parasitos durante o tempo de cultivo e depletada desse meio no 7º dia, causando uma retenção na proliferação desses parasitos cultivados com heme. Por outro lado, o aumento da oferta dessa hexose aumentou a proliferação induzida pela porfirina no 10º dia, tempo em que a glicose ainda estava disponível no meio nesse caso. De modo interessante, observamos que a porfirina foi capaz de estimular o aumento da captação de glicose pelos parasitos em todos tempos avaliados, sendo essa captação dependente da oferta de glicose. Concomitantemente, foi observada uma redução do pH do sobrenadante após esses dias em cultura. Ao avaliarmos a fisiologia mitocondrial, demonstramos que os parasitos mantidos com heme por sete dias possuem consumo de O_2 semelhante aos parasitos controle, porém com um aumento na capacidade máxima do sistema de transporte de elétrons (STE) na ausência de substratos exógenos. No entanto, a adição de glicose promoveu uma redução imediata no consumo de O_2 mitocondrial, na STE e na capacidade de reserva respiratória nesses parasitos cultivados com heme. Essa repressão do metabolismo respiratório pela glicose indica uma transição para um metabolismo fermentativo (efeito Crabtree). Corroborando esses dados, observamos através da metabolômica que os níveis intracelulares de fosfoenolpiruvato (PEP) foram aumentados, mas não os níveis de piruvato, indicando que o PEP pode estar sendo desviado para a fermentação aeróbica no glicossoma. Embora não tenha sido observada alteração nos níveis de succinato, produto final da fermentação succínica, as análises transcriptômicas nos permitiram entender que os intermediários dessa via podem alimentar outras reações no parasito. Observamos também o aumento da captação de aminoácidos envolvidos com o sistema antioxidante e com regeneração de NAD^+, que foi aumentado nos parasitos. Os resultados em conjunto com as análises transcriptômicas publicadas anteriormente sugerem que o heme induziu adaptações metabólicas nas formas epimastigotas para um metabolismo energético baseado na glicólise e fermentação permitindo a proliferação e a sua sobrevivência.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Heme. Metabolismo.

ABSTRACT

VIEIRA, Carolina Silva Dias. **Effect of heme on glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigote: a biochemical and metabolomic approaches.** 2020. 96 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcantara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Heme is a molecule present in high amounts in the insect vector's intestine and influences the metabolism of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. This porphyrin induces proliferation, stimulates physiological changes and also promotes changes at the transcriptional level, increasing the expression of genes related to glycolysis and fermentation in detriment of non-modulation of gene expression related to mitochondrial energy metabolism. Thus, in this study we investigated the effect of heme on the glucose metabolism of *T. cruzi* epimastigote using biochemical and metabolomic approaches. Our results showed that inhibition of the glycolysis, mediated by 2-deoxyglucose, impaired more than 50% of proliferation of epimastigotes maintained with heme, abolishing the increase in proliferation induced by the porphyrin. When we evaluate the glucose concentration in the culture medium, we observed that glucose was consumed by the parasites during the culture and depleted of the medium on the 7^{th} day, causing a retention in parasite proliferation cultivated with heme. On the other hand, the rise in this hexose supply increased the proliferation induced by porphyrin on the 10^{th} day of culture, which glucose was still available in the culture medium in this case. Interestingly, we showed that the porphyrin was capable of stimulate the increase in glucose uptake by the parasites over the days of culture, being this uptake dependent on glucose supply. Concomitantly, was observed the reduction of supernatant pH after days in culture. When assessing mitochondrial physiology, we showed that parasites cultured with heme for seven days have similar O_2 consumption compared to control parasites, but with an increase in the maximum capacity of the electron transport system (STE) in the absence of exogenous substrates. However, the addition of glucose triggered an immediate reduction in the mitochondrial O_2 consumption, in the ETS, and in the spare respiratory capacity in these heme-cultured parasites This repression of respiratory metabolism by glucose indicates a transition to a fermentative metabolism (Crabtree effect). Corroborating these data, we observed through metabolomics that the intracellular level of phosphoenolpyruvate (PEP) was increased, but not the pyruvate, indicating that PEP can be directed to the aerobic fermentation in glycosome. Although no change was observed in the succinate levels, the final product of succinic fermentation, the transcriptomic analysis allowed us to understand that this pathway intermediates can fuel other reactions in parasite. We also observed an increase in the amino acids uptake involved with the antioxidant system and NAD^+ regeneration, which was increased in the parasite. Our results together with previously published transcriptomic analysis suggest that heme induced metabolic adaptations in epimastigote forms for an energy metabolism based on glycolysis and fermentation allowing its proliferation and survival.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. Heme. Metabolism.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A distribuição global dos casos de doença de Chagas..... 15

Figura 2 - Ilustração das formas morfológicas do *Trypanosoma cruzi*..... 19

Figura 3 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*…….. 22

Figura 4 - Fosforilação oxidativa no *Trypanosoma cruzi* ……..... 28

Figura 5 - Estrutura química do heme *b* e seus variantes presentes nos eucariotos… 36

Figura 6 - Vias de biossíntese do heme em *Leishmania spp* e *Trypanosoma*……. 38

Figura 7 - Representação esquemática das vias metabólicas de genes regulados pelo heme..... 40

Figura 8 - A proliferação dos parasitos cultivados com heme é alterada na presença de glicose exógena e do inibidor da glicólise……. 48

Tabela 1 - Porcentagem de proliferação dos parasitos submetidos à diferentes tratamentos ao longo da curva de crescimento.....…..... 49

Figura 9 - Parasitos tratados com heme por 24 h captam mais glicose e promovem a diminuição do pH do sobrenadante……..... 50

Figura 10 - Concentração de glicose e o pH no sobrenadante são menores onde os parasitos foram cultivados com heme e glicose ao longo dos dias……..... 51

Figura 11 - Captação de glicose é aumentada nos parasitos cultivados com heme ao longo dos dias……....… 52

Figura 12 - Proliferação induzida pelo H_2O_2 diminui na presença do inibidor da glicólise..... 54

Figura 13 - A fisiologia mitocondrial foi alterada quando os parasitos foram cultivados com heme por sete dias……...…..... 56

Figura 14 - Adição de glicose promoveu mudanças na fisiologia mitocondrial de parasitos cultivados com heme por sete dias…….. 58

Figura 15 - Fisiologia mitocondrial antes e após adição da glicose nos parasitos cultivados ou não com heme por sete dias……..... 60

Figura 16 - Carboidratos identificados no sobrenadante dos parasitos tratados ou não com heme após 24 h……..... 62

Figura 17 - Metabólitos excretados no sobrenadante dos parasitos tratados ou não com heme após 24 h……..... 63
Figura 18 - Aminoácidos e betaína no sobrenadante dos parasitos tratados ou não com heme após 24 h……..... 65
Figura 19 - Via glicolítica e a fermentação nos parasitos cultivados com heme por sete dias…..... 67
Figura 20 - Metabolismo de aminoácidos nos parasitos cultivados com heme por sete dias……..... 69
Figura 21 - Metabolismo dos aminoácidos aromáticos e de aspartato nos parasitos cultivados com heme por sete dias...……..... 71
Figura 22 - Poliaminas e biossíntese de tripanotiona nos parasitos cultivados com heme por sete dias……..... 73
Figura 23 - Quantificação dos nucleotídeos nos parasitos cultivados com heme por sete dias..... 74
Figura 24 - Esquema final reunindo análises ômicas das formas epimastigotas cultivadas com heme……..... 82

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

2-DG	2-desoxiglicose
AA	Antimicina A
ADP	Adenosina difosfato
AHADH	L-α-hidroxiácido aromático desidrogenase
ALA	Ácido δ-aminolevulínico
AMP	Adenosina monofosfato
ASAT	Aspartato aminotransferase
ASCT	Acetil:succinato CoA-transferase
ATP	Adenosina trifosfato
BCAAs	do inglês *branched-chain amino acids*
BHI	do inglês *Brain-heart infusion*
CAMKII	do inglês *Ca^{2+}/calmodulin kinase II*
CK	Ciclo de Krebs
CoA	Coenzima A
D_2O	Óxido de deutério
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNDi	do inglês *Drugs for Neglected Diseases initiative*
DNT	Doenças Negligenciadas Tropicais
DSS	4,4-dimetil-4-silapentano-1-ácido sulfônico
DTU	do inglês *Discrete Typing Units*
FAD/$FADH_2$	Dinucleotídeo de flavina e adenina
FCCP	Carbonil Cianeto p-Trifluormetoxifenil Hidrazona
FRD	Fumarato redutase
HK	Hexocinase
k-DNA	DNA do cinetoplasto
KHB	Do inglês *Krebs-Henseleit buffer*
MDH	Malato desidrogenase
NAD^+/NADH	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina
$NADP^+$/NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de nicotinamida e adenina reduzido
PAHO	do inglês *Pan American Health Organization*

PBS	Salina tamponada com fosfato de sódio
PEP	Fosfoenolpiruvato
PEPCK	Fosfoenolpiruvato carboxicinase
PFK	Fosfofrutocinase
PPDK	Piruvato fosfato dicinase
Q	Ubiquinona
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
ROS	do inglês *reactive oxygen species*
ROX	do inglês *residual oxygen consumption*
SFB	Soro fetal bovino
SOD	Superóxido dismutase
SRC	do inglês *spare respiratory capacity*
STE	Sistema de transporte de elétrons
TAT	Tirosina aminotransferase
$TS_2/T(SH)_2$	Tripanotiona
WHO	do inglês *World Health Organization*
αCT	α-cetoglutarato

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	14
1	**REVISÃO DA LITERATURA**	14
1.1	**Doença de Chagas**	14
1.2	***Trypanosoma cruzi***	17
1.2.1	Taxonomia e morfologia	17
1.2.2	Ciclo biológico	20
1.3	**Metabolismo do *Trypanosoma cruzi***	22
1.3.1	Glicossoma: glicólise e fermentação aeróbica	23
1.3.2	Acetil-CoA	25
1.3.3	Mitocôndria: seu papel na bioenergética	26
1.3.4	Mitocôndria: geração de espécies reativas de oxigênio	29
1.3.5	Metabolismo dos aminoácidos	31
1.4	**Heme**	34
1.4.1	Características gerais	34
1.4.2	Heme na biologia do *T. cruzi*	37
2	**OBJETIVO**	41
2.1	**Geral**	41
2.2	**Específicos**	41
3	**MATERIAL E MÉTODOS**	42
3.1	**Heme..**	42
3.2	**Cultura dos parasitos**	42
3.3	**Avaliação da proliferação dos parasitos**	42
3.3.1	Curva de proliferação dos parasitos com heme, 2-desoxiglicose e glicose	42
3.3.2	Ensaio de proliferação com heme, H_2O_2 e 2-DG	43
3.4	**Quantificação da concentração de glicose no sobrenadante**	43
3.4.1	Captação de glicose pelos parasitos cultivados com heme por 24 h	43
3.4.2	Captação de glicose pelos parasitos cultivados com heme e glicose ao longo dos dias	43
3.5	**Avaliação do pH do sobrenadante**	44
3.6	**Avaliação da fisiologia mitocondrial**	44
3.7	**Metabôlomica**	45

3.7.1 Coleta do sobrenadante e extração dos metabólitos intracelulares dos parasitos..... 45
3.7.2 Preparo das amostras de extrato dos parasitos e sobrenadante..... 45
3.7.3 Análises metabolômicas por RMN..... 46
3.8 **Análises estatísticas**..... 47
4 **RESULTADOS**..... 48
4.1 **O acréscimo de glicose no meio e a inibição da glicólise alteram a proliferação dos parasitos cultivados com heme**..... 48
4.2 **A captação de glicose é aumentada em parasitos cultivados com heme**..... 49
4.3 **A inibição da glicólise interfere na proliferação mediada pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2)**..... 53
4.4 **A fisiologia mitocondrial dos parasitos cultivados com heme é alterada na presença de glicose**..... 55
4.5 **Análises metabolômicas apontam que o heme estimula a glicólise e fermentação aeróbica nos parasitos, mas também induz a captação de aminoácidos**..... 60
4.5.1 O heme, em 24 h, induziu o aumento da captação de hexoses e de aminoácidos e a secreção de fumarato e alanina na forma epimastigota de *T. cruzi*..... 61
4.5.2 O metaboloma intracelular e extracelular dos parasitos cultivados com heme apontam um aumento na via glicolítica, na fermentação e na captação de aminoácidos..... 65
5 **DISCUSSÃO**..... 75
CONCLUSÕES..... 83
REFERÊNCIAS..... ... 84

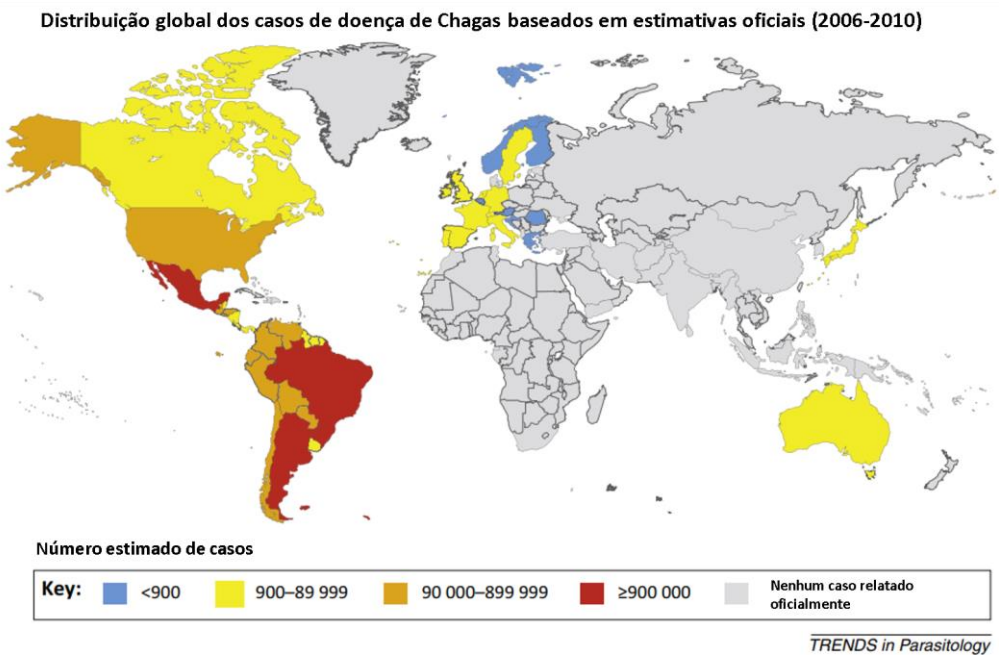
REVISÃO DA LITERATURA

Doença de Chagas

A doença de Chagas ou Tripanossomíase Americana, é uma doença potencialmente letal causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Essa enfermidade é uma das mais de 20 doenças classificadas como Doenças Negligenciadas Tropicais (DNT), um grupo grande e diversificado de doenças infecciosas que prevalecem em condições tropicais e subtropicais em 149 países e afetam mais de um bilhão de pessoas, sendo em sua maioria populações que vivem na pobreza, sem saneamento adequado e em contato próximo com vetores infecciosos (WHO, 2019). Embora conhecida há mais de um século, a doença de Chagas continua a ser um importante problema de saúde pública e social na América Latina (WHO, 2020). Ela possui uma incidência média de 30 mil novos casos anuais com 8 mil recém-nascidos sendo infectados durante a gestação, 14 mil mortes por ano e de 70 milhões de pessoas com a possibilidade de contrair essa enfermidade (PAHO, 2017) e é considerada a infecção parasitária com maior peso socioeconômico na América Latina (Stanaway e Roth, 2015).

A doença de Chagas é endêmica em 21 países do continente americano, do sul dos Estados Unidos da América (EUA) ao norte da Argentina e Chile, em virtude da distribuição de mais de 150 espécies do inseto vetor. Por isso ela é conhecida também como tripanossomíase americana (Dias *et al.*, 2016). Entretanto, como consequência da migração e de formas alternativas de transmissão, atualmente estima-se que 7 milhões de pessoas no mundo estejam infectadas, com sua maioria sendo latinos (Figura 1) (WHO, 2020). Porém, estima-se que a quantidade de pessoas infectadas seja maior, uma vez que menos de 10% das pessoas com doença de Chagas nas Américas são diagnosticadas (DNDi, 2018; Coura e Viñas, 2010).

Figura 1 - A distribuição global dos casos de doença de Chagas



Fonte: Adaptado de Perez; Lymbery; Thompson, 2015.

O curso clínico da doença de Chagas compreende duas fases: uma fase aguda e uma fase crônica. A fase aguda é caracterizada pela parasitemia evidente através da detecção de parasitos circulantes na corrente sanguínea do hospedeiro. Na maioria dos casos essa fase da doença é assintomática. Quando se apresenta de forma sintomática, podem ser observados sintomas como febre, mal-estar e edemas, e também sinais característicos da doença conhecidos como: sinal de Romaña, quando o sítio de inoculação ocorre pela mucosa ocular promovendo um edema palpebral, e o chagoma de inoculação, inflamação no sítio de inoculação do parasito. Além desses, o paciente também pode apresentar linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. No entanto, a fase aguda pode ser facilmente confundida com outras doenças virais comuns e muitas vezes não é identificada como doença de Chagas (DNDi, 2018). Essa fase é de curta duração e é responsável pela morte de 2-8% de crianças (DNDi, 2015; Pérez-Molina e Molina, 2018).

A transição para a fase crônica da doença é caracterizada pela redução da parasitemia e o aumento da infecção tecidual, promovendo a formação de infiltrados inflamatórios. Dessa forma, as manifestações clínicas na fase crônica são decorrentes da ação do parasito e, principalmente, da inflamação crônica (Ayo *et al.*, 2013). A forma indeterminada é caracterizada pela soropositividade para o *Trypanosoma cruzi*, porém com ausência de sintomas de envolvimento cardíaco ou digestivo. Apesar de não apresentarem sintomas e parasitemia detectável, os indivíduos infectados nessa fase são capazes de transmitir o

parasito (DNDi, 2015). Entretanto, de 30 a 40% dos pacientes cronicamente afetados podem vir a desenvolver o comprometimento dos órgãos de 10 a 30 anos após a infecção aguda (Pérez-Molina e Molina, 2018).

A forma cardíaca é a condição mais frequente e severa (de 14 a 45% dos casos), devido à lesão do sistema condutor e do miocárdio do órgão. Em quase 90% dos casos, estes pacientes apresentam cardiomiopatia associada a arritmias, insuficiência cardíaca e, frequentemente, morte súbita sendo essa última a principal causa de morte dos pacientes que apresentam a forma cardíaca. A doença de Chagas é a principal causa da cardiopatia no continente Americano, com mais de um milhão de indivíduos cronicamente afetados, comprometendo a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes (WHO, 2020; Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010; Dias *et al*, 2015). A forma digestiva é a menos comum (de 10 a 21% dos casos) e as manifestações variam de distúrbios de motilidade assintomática a formas mais graves como megaesôfago e megacólon, aumentando o risco de câncer (Pérez-Molina e Molina, 2018).

Os pacientes portadores da doença de Chagas dispõem de dois medicamentos para o tratamento da doença: o Benznidazol (Rochagan®, Radanil®) e o Nifurtimox (Lampit®, Bayer) (Lo Presti *et al.*, 2015). Descobertos há mais de meio século, ainda hoje são os únicos tratamentos disponíveis e aprovados para o uso em humanos. Ambos possuem melhor tolerância em crianças, maior efetividade durante a fase aguda da infecção pelos parasitos, com redução da eficácia conforme o aumento do tempo de infecção. Lamentavelmente, ambas as drogas possuem maior toxicidade em adultos, potencial de ação diferente entre as *Discrete Typing Units* (DTUs) do *Trypanosoma cruzi* e são ineficazes na fase crônica da doença (Bermudez *et al.*, 2016). Além disso, esses fármacos promovem efeitos colaterais desagradáveis e, às vezes, graves nos pacientes durante o tratamento. Os efeitos colaterais mais graves são observados com o uso do Nifurtimox, fármaco que teve sua comercialização descontinuada no Brasil, Argentina, Chile e Uruguai, devido principalmente à sua alta taxa de toxicidade e aos efeitos adversos (Coura e Castro, 2002; Bermudez *et al.*, 2016). Portanto, apenas o Benznidazol está comercialmente disponível para o tratamento da doença de Chagas nesses países. Apesar de novas drogas serem testadas a cada dia e existir uma busca para novas alternativas, um relatório da Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO, do inglês *Pan American Health Organization*) de 2019 concluiu que ainda há pouco progresso na prevenção e tratamento da doença de Chagas (The Lancet, 2019).

Trypanosoma cruzi

Taxonomia e morfologia

O protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* tradicionalmente foi classificado na ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Como característica marcante dessa ordem, os protozoários possuem uma única mitocôndria que se ramifica por todo o corpo celular. Essa mitocôndria é caracterizada pela presença do cinetoplasto, uma região composta por DNA mitocondrial (k-DNA) condensado que se organiza em forma de minicírculos e maxicírculo e que se apresenta localizado próximo à base do flagelo dos parasitos. A morfologia dessa estrutura difere entre as formas morfológicas do parasito, se apresentando em formato bastão nas formas amastigotas e epimastigotas, e formato arredondado nas formas tripomastigotas (Vickerman, 1990; Stuart e Feagin, 1992; Moreira; López-García; Vickerman, 2004; Teixeira; Benchimol; Crepaldi, 2011). Na família Trypanosomatidae foram agrupados os protozoários com base em seu ciclo biológico, na qual os protozoários se estabelecem em um único hospedeiro (parasitos monoxênicos) ou em mais de um hospedeiro (parasitos heteroxênicos) ao longo da sua vida, sendo o *Trypanosoma cruzi* pertencente a esse último grupo (Simpsom; Stevens; Lukes, 2006).

Em 2012, Adl e colaboradores propuseram a revisão taxonômica dos eucariotos, através do uso de análise filogenética molecular. Foram propostas a divisão do domínio Eukarya em seis super-grupos, cujo o gênero *Trypanosoma* passou a ser classificado no super-grupo Exacavata, filo Euglenozoa, classe Kinetoplastea, sub-classe Metakinetoplastina e ordem Trypanosomatida (Moreira *et al.*, 2004; Adl *et al.*, 2012). Baseado nos dados moleculares, agora na classe Kinetoplastea estão agrupados os protozoários que compartilham o cinetoplasto. Já na ordem Trypanosomatida são classificados os protozoários que são parasitas obrigatórios e cujos cílios ou flagelos emergem de uma bolsa ciliar ou flagelar localizada na região anterior ou lateral do corpo do parasito, podendo formar a membrana ondulante (Adl *et al.*, 2012).

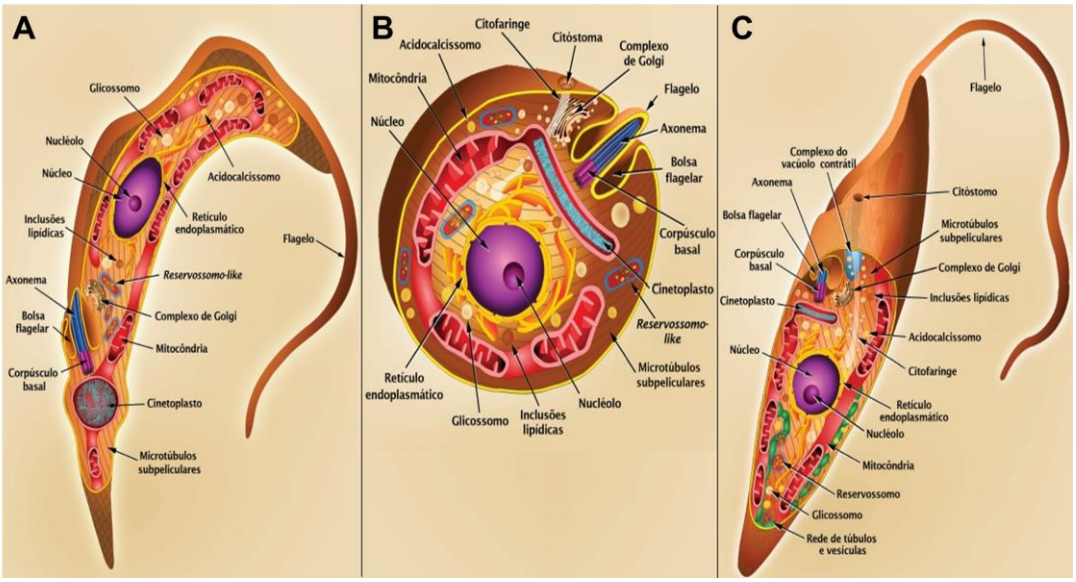
Os tripanossomatídeos possuem características particulares em relação à organização celular. Igual aos outros cinetoplastídeos, o *T. cruzi* possui um tipo especial de peroxissoma, denominado glicossoma. Os glicossomas são membros autênticos dos tripanossomatídeos e são caracterizados principalmente por conter enzimas das vias glicolítica e gliconeogênica

(Gualdrón-López *et al.*, 2012). Trabalhos da literatura demonstraram que a compartimentalização das enzimas glicolíticas nessas organelas promove um aumento na eficiência dessa via nos parasitos (Haanstra *et al.*, 2015; Bauer e Morris, 2017). Embora seja amplamente conhecida pela presença das enzimas glicolíticas, também foram identificadas, através da técnica de proteômica, enzimas envolvidas com outras vias metabólicas, como: gliconeogênese e as rotas auxiliares para via de produção/utilização de succinato; via das pentoses-fosfato; biossíntese de nucleotídeos, purinas e pirimidinas; biossíntese de esteróis e éteres-lipídicos; β-oxidação de ácidos graxos bem como enzimas envolvidas com a desintoxicação de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (Acosta *et al.*, 2019; Quiñones *et al*, 2020). É importante ressaltar que muitas das enzimas glicossomais mostraram-se essenciais para a viabilidade de diferentes tripanossomatídeos, tornando essas organelas alvos promissores para desenvolvimento de novos fármacos (Galland e Michels, 2010; Dawidowski *et al.*, 2017; Quiñones *et al.*, 2020).

Os reservossomos são grandes compartimentos presentes na região pós-nuclear das formas epimastigotas de parasitos do gênero *Trypanosoma*. Uma das suas funções principais é de armazenamento de macromoléculas, como proteínas e lipídeos, ingeridas pelo parasito através do processo de endocitose (Soares e De Souza, 1991; Cunha e Silva *et al.*, 2006). Cada epimastigota apresenta muitos reservossomos e a morfologia pode variar de acordo com as condições de crescimento e as cepas do parasito. Durante o processo de diferenciação das formas epimastigotas para as formas tripomastigotas metacíclicas (metaciclogênese), o conteúdo de reservossomos é massivamente degradado e a organela desaparece, sendo esse armazenamento de nutrientes e, consequente consumo, essencial para esse processo de diferenciação (Soares *et al.*, 1989). Além dessa função, ele também desempenha papel central no metabolismo do parasito através da manutenção endógena e exógena de lipídeos (Pereira *et al.*, 2011) e por possuir enzimas digestivas, principalmente a cruzipaína. A presença dessa enzima em grandes quantidades sugere que essa organela seja um lisossomo-like, apesar de não possuir marcadores lisossomais (Cunha e Silva *et al.*, 2006).

Os acidocalcissomas são organelas ácidas que armazenam altas concentrações de cálcio, fósforo, principalmente na forma de polifosfatos, e aminoácidos básicos (Rohloff; Rodrigues; Docampo, 2003). A estrutura possui forma esférica e está distribuída por toda a célula, sendo mais concentrada na periferia celular. Como função, os acidocalcissomas atuam no armazenamento de cátions e fósforo, na manutenção do pH intracelular e estão envolvidos na osmorregulação (De Souza *et al.*, 1984; Moreno e Docampo, 2009). As organelas do *T. cruzi* descritas podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2 - Ilustração das formas morfológicas do *Trypanosoma cruzi*



Legenda: A) Tripomastigota; B) Amastigota; C) Epimastigota.
Fonte: Adaptado de Teixeira; Benchimol; Crepaldi, 2011.

Embora o *Trypanosoma cruzi* seja classificado como uma única espécie, várias revisões descreveram a diversidade biológica e genética das linhagens do parasito e sua complexidade eco-epidemiológica (Zingales, 2018). Essas diferenças nas linhagens se manifestam através de diferentes manifestações clínicas da doença, na interação parasito/vetor, na virulência, além da forma de transmissão, que é dividida em silvestre, domiciliar e peridomiciliar (De Araújo *et al.*, 2016). Um consenso para a nomenclatura intraespecífica do *T. cruzi* foi proposto em 2009 por um comitê de especialistas que reconheceu um mínimo de seis linhagens genéticas ou *Discrete Typing Units* (DTUs), denominadas de TcI a TcVI (Zingales *et al.*, 2009). Para essa recomendação, o comitê considerou estudos anteriores que classificaram o *T. cruzi* em grupos distintos, com base no padrão de marcadores genéticos, bioquímicos ou biológicos. Um sétimo DTU, potencialmente restrito a morcegos (TcBat) (Marcili *et al.*, 2009), também foi considerado (Zingales *et al.*, 2012) e, através de estudos subsequentes, apoiam a classificação definitiva de Tcbat como uma nova DTU (Lima *et al.*, 2015; Zingales, 2018).

Ciclo biológico

No complexo ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*, o parasito se alterna entre dois hospedeiros diferentes: hospedeiro invertebrado (triatomíneos) e vertebrado (mamíferos). Durante sua trajetória, o parasito sofre alterações na sua morfologia, bem como em suas propriedades bioquímicas e biológicas. Existem quatro formas morfológicas principais: epimastigotas, tripomastigotas metacíclicos, amastigotas e tripomastigotas sanguíneos (Rassi; Rassi; Marin-Neto, 2010). Entretanto, já foram observadas e descritas várias outras formas como as esferomastigotas e as formas intermediárias que possuem formato *drop-like* (intermediário entre esferomastigotas e epimastigotas ou tripomastigotas), formato delgado ou *slender shape* (intermediária entre tripomastigotas e epimastigotas) e como forma transitória chamada de *epimastigota-like* (intermediária entre amastigota e tripomastigota) (Schaub, 1989; Tyler e Engman, 2001).

A forma tripomastigota possui um formato alongado e achatado, apresentando o cinetoplasto arredondado na posição posterior ao núcleo do parasito (Figura 2A). Essas formas são infectantes e podem ser encontradas tanto na porção retal do hospedeiro invertebrado (sendo chamadas de tripomastigotas metacíclicas) quanto na corrente sanguínea de um hospedeiro vertebrado (sendo chamadas de tripomastigotas sanguíneas). A forma amastigota possui formato arredondado com flagelo reduzido e cinetoplasto em forma de bastonete (Figura 2B). Elas são formas intracelulares altamente replicativas, também podendo ser infectantes, que estão presentes no hospedeiro mamífero. A forma epimastigota apresenta formato fusiforme com cinetoplasto em forma de bastão (Figura 2C). Essa forma morfológica é altamente proliferativa responsável pela colonização do intestino do hospedeiro triatomíneo e também é considerada uma forma intermediária encontrada dentro das células do hospedeiro mamífero, chamada de epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999; Tyler e Engman, 2001). Ainda sobre as formas epimastigotas, trabalhos vêm demonstrando a capacidade dessas formas de infectar células de mamíferos, após longo tempo em cultura *in vitro*, sendo essa capacidade também vista *in vivo*. Essa capacidade infectante *in vivo* é devido principalmente pela diferenciação das formas tripomastigotas para formas epimastigotas (epimastigogênese), que pode ocorrer no reto do inseto (Kessler *et al.*, 2017).

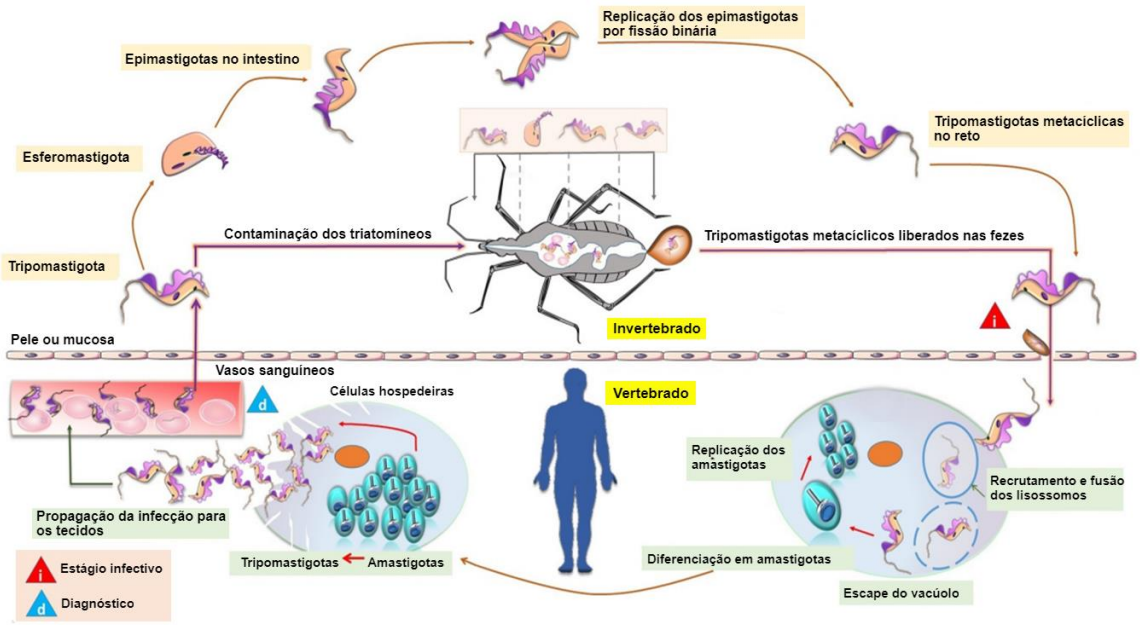
Considerando seu ciclo natural, o *T. cruzi* é transmitido aos seres humanos e a outros mamíferos através do vetor triatomíneo contaminado, popularmente conhecido como “barbeiro”. Esses insetos pertencem à ordem Hemiptera, família Reduviidae e a subfamília

Triatominae, na qual compreende 150 espécies hematófagas. Apesar da maioria das espécies ser silvestre, esses triatomíneos podem habitar os ambientes intradomiciliar e peridomicíliar (Lazzari; Pereira; Lorenzo, 2013). Mais de 20 espécies do gênero *Triatoma, Rhodinus* e *Panstrongylus* são particularmente relevantes na transmissão do parasito aos humanos, entre eles: *Triatoma infestans, Triatoma dimidiata, Triatoma brasiliensis, Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*, que são considerados os principais vetores do *T. cruzi* (Gourbière *et al.*, 2011; Guhl, 2017; Melo; Guarneri; Silber, 2020).

Durante o repasto sanguíneo, o inseto triatomíneo infectado se alimenta de grandes quantidades de sangue proveniente do hospedeiro mamífero, forçando a eliminação das fezes e liberando em conjunto as formas tripomastigotas metacíclicas. Essa forma infectante em contato com a pele lesionada ou a mucosa é capaz de penetrar no mamífero infectando diversos tipos celulares e assim estabelecendo a infecção. Ao invadir a célula do hospedeiro mamífero, a forma tripomastigota se diferencia para a forma amastigota, célula arredondada que se multiplica intensamente dentro da célula. Após vários ciclos de divisão, as formas amastigotas se diferenciam para a forma intermediária, epimastigota intracelular (Almeida-de-Faria *et al.*, 1999), se diferenciando finalmente para formas tripomastigotas. Com o rompimento das células hospedeiras, essas formas infectantes ganham a corrente sanguínea e agora passam a ser chamadas de tripomastigotas sanguíneas. Esses parasitos são capazes de infectar células vizinhas e diversos tipos celulares, promovendo a disseminação da infecção para outros tecidos ou podendo ser ingeridos por outro inseto vetor, infectando-o (Tyler e Engman, 2001; Lidani *et al.*, 2017).

Na descrição clássica, as formas tripomastigotas sanguíneas se diferenciam nas formas epimastigotas na porção anterior do intestino do triatomíneo. Essas formas proliferam intensamente ao longo do intestino do inseto e, ao chegar no reto, sofrem novamente um processo de diferenciação para as tripomastigotas metacíclicos (Chagas, 1909). Entretanto, autores sugerem que os tripomastigotas sanguíneos, primeiramente, se diferenciam para formas arredondadas e sem flagelo chamadas de esferomastigotas, que se multiplicam e se diferenciam nas formas epimastigotas ou tripomastigotas (Brack, 1968; Brener, 1972). Finalmente, após uma nova alimentação com o sangue de mamífero, essas formas tripomastigotas serão liberadas nas fezes do inseto podendo infectar outros mamíferos, assim, continuando o ciclo biológico do *T. cruzi* (Figura 3) (Tyler e Engman, 2001; Lidani *et al.*, 2017).

Figura 3 - Ciclo biológico do *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de Lidani *et al.*, 2017.

Metabolismo do *Trypanosoma cruzi*

O sucesso do *T. cruzi* em se estabelecer nos diferentes hospedeiros está relacionado diretamente à capacidade do parasito de se adaptar a esses ambientes, manter sua homeostase celular e, finalmente, sobreviver a condições físicas, físico-químicas, químicas e nutricionais extremamente diferentes (Zuzarte-Luís e Mota, 2018). As principais variáveis ambientais incluem variações de temperatura, variações no tipo e disponibilidade de nutrientes, alterações no pH, osmolaridade, composição iônica e potencial redox, além da influência da microbiota intestinal do inseto vetor. Embora desafiador, as respostas mediadas pelo parasito não estão relacionadas apenas à sobrevivência, mas também podem ser gatilhos para desencadear processos críticos, como por exemplo, a diferenciação (Jimenez, 2004; Melo; Guarneri; Silber, 2020).

Em trabalhos envolvendo estudos sobre as formas epimastigotas do *T. cruzi*, é importante ressaltar duas fases bem definidas na sua curva de proliferação. Inicialmente, essas formas proliferam em uma taxa aproximadamente constante e apresentam uma curva exponencial de proliferação em estudos *in vitro* (fase exponencial). Ao longo do tempo em cultura, a forma epimastigota desacelera ou interrompe a divisão celular apresentando uma

estagnação na proliferação (fase estacionária) (Barisón *et al.*, 2017). Estudos desenvolvidos com o inseto vetor do *T. cruzi* demonstraram a ocorrência dessas fases no intestino do inseto, logo sendo possível, em parte, a correlação entre os resultados *in vitro* e *in vivo* (Dias *et al.*, 2015). Em 2017, Barisón e colaboradores .descreveram de forma brilhante a diferença no perfil metabólico dos parasitos presentes nessas duas fases e que essa plasticidade metabólica é crucial para sua sobrevivência dentro do inseto. As diferenças no metabolismo intermediário das formas do *T. cruzi* serão detalhadas nos próximos tópicos.

Glicossoma: glicólise e fermentação aeróbica

Antunes e colaboradores (2013) aferiram que os açúcares estão entre as classes metabólicas de maiores quantidades encontradas nas fezes do inseto triatomíneo, junto com os ácidos graxos, esteróides, glicerolipídeos, aminoácidos e nucleotídeos. Apesar do parasito competir com as células do intestino do inseto e a microbiota, inicialmente as formas epimastigotas consomem preferencialmente glicose. A medida que os parasitos avançam em direção ao reto e a glicose está quase esgotada, os epimastigotas passam a dar preferência para a oxidação de aminoácidos (Barisón *et al.*, 2017). Nas formas presentes nos mamíferos, a forma amastigota obtém energia principalmente a partir de lipídeos e aminoácidos. Durante a diferenciação dos amastigotas para tripomastigotas, a forma epimastigota intracelular usa pouca glicose se comparada às outras formas presentes no mamífero, sendo seu metabolismo energético baseado na oxidação de aminoácidos. Já o tripomastigota sanguíneo é a forma que mais consome glicose, apresenta baixa captação de aminoácidos (Silber *et al.*, 2009) e é menos dependente do metabolismo mitocondrial (Gonçalves *et al.*, 2011).

Os tripanossomatídeos estão entre os organismos que consomem altas quantidades de glicose. Esse dado está associado ao fenômeno incomum de que os parasitos produzem e excretam no meio compostos ainda reduzidos do catabolismo da glicose, mesmo na presença de oxigênio, ao invés de oxidar completamente a glicose em dióxido de carbono (CO_2) e água. Esse metabolismo peculiar é conhecido como fermentação aeróbica da glicose e acontece em diversos outros parasitos, como protozoários e helmintos (Cannata e Cazzulo, 1984; Cazzulo, 1992; Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011). Outra peculiaridade dos tripanossomatídeos é a ausência do efeito Pasteur. Normalmente, esse efeito é observado quando a transição da anaerobiose para aerobiose é acompanhada por uma rápida diminuição do consumo de

glicose, devido a uma regulação da via glicolítica e do ciclo de Krebs (CK) e, assim, desvio de um metabolismo fermentativo para um mitocondrial. No entanto, o efeito oposto acontece no *T. cruzi* chamado de efeito Pasteur reverso, onde é observada uma redução no consumo de glicose ainda maior na ausência de oxigênio no ambiente. Esse dado reafirma o conceito do parasito possuir um metabolismo fermentativo aeróbico. Isso pode ser explicado pelo fato da via glicolítica desses parasitos ser parcialmente realizada no glicossoma e no citosol; e também por não possuir a regulação alostérica clássica da via glicolítica por meio das enzimas hexocinase (HK) e a fosfofrutocinase (PFK), que não são inibidas pelos seus produtos e ATP no parasito (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011).

As seis primeiras enzimas da via glicolítica do *T. cruzi* estão localizadas no glicossoma. A glicólise nessa organela se inicia na fosforilação da glicose pela HK até a formação de duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato. Esse produto é, então, transportado para o citosol e rapidamente convertido a 3-fosfoglicerato pela fosfoglicerato cinase citosólica gerando um ATP. A 3-fosfoglicerato é isomerizada a 2-fosfoglicerato que, pela ação da enolase, vai ser convertida a fosfoenolpiruvato (PEP). A PEP formada no citosol possui três destinos: (i) pode seguir a formação de piruvato pela piruvato cinase, gerando um ATP, e ser transportado para a mitocôndria; (ii) o piruvato produzido ser direcionado para transaminação a alanina pela alanina aminotransferase no citosol; ou (iii) o PEP pode ser transportado novamente ao glicossoma para seguir o processo da fermentação. Considerando que a via glicolítica ocorreu até a formação do piruvato, dois ATP foram consumidos no glicossoma e quatro ATP formados no citosol; além da formação de dois NADH formados no glicossoma (Cymeryng; Cazzulo; Cannata, 1995; Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011).

A fermentação realizada pelo parasito é distinta da maioria dos organismos e gera diferentes produtos finais. A principal molécula excretada pelo parasito é na forma de succinato. Geralmente, o succinato é formado a partir do piruvato no ciclo de Krebs; porém, a produção do succinato pode acontecer no glicossoma a partir de fosfoenolpiruvato. O PEP, vindo do citosol para o glicossoma, sofre uma reação de fosfocarboxilação catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK) gerando oxaloacetato e ATP. O oxaloacetato é reduzido a malato pela enzima malato desidrogenase (MDH), levando à oxidação do NADH. O malato é desidratado pela fumarato hidratase (ou fumarase) produzindo fumarato que, finalmente, é reduzido a succinato pela enzima fumarato redutase, através da oxidação do NADH (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011).

Além do succinato, a glicose também pode ser metabolizada e excretada na forma de alanina e esse processo pode acontecer em diferentes locais na célula. O piruvato formado ao

final da glicólise pode ganhar um grupamento amina catalisada pela alanina aminotransferase, formando alanina. Porém, a formação da alanina também pode ocorrer no glicossoma. O PEP do glicossoma pode sofrer ação da piruvato fosfato dicinase (PPDK), que gera piruvato e uma molécula de ATP. O piruvato, por sua vez, é reduzido a alanina pela alanina desidrogenase glicossomal levando a reoxidação de NADH. Quando existe um excesso do grupamento amina (NH_3) proveniente do catabolismo de aminoácidos, este NH_3 é responsável pela formação da alanina (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011; Barison *et al.*, 2017). Portanto, alanina pode ser o produto final do catabolismo de glicose e aminoácidos. Porém, na ausência de glicose, alanina pode ser consumida, oxidada à CO_2 e favorecendo a produção de ATP através da fosforilação oxidativa (Girard *et al.*, 2018). Além dessas vias de reoxidação de NADH, alguns estudos já demonstraram a presença de uma oxidorredutase dependente de NAD^+ glicossomal que possui uma baixa atividade lactato desidrogenase no *T. cruzi* (Acosta *et al.*, 2019).

A regeneração do ATP pela PEPCK e/ou PPDK no glicossoma indica que o transporte de PEP citosólico é necessário, dado que o ATP no glicossoma é consumido pela HK e PFK. Da mesma forma, o NADH formado pela reação da gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase é reoxidado dentro do glicossoma pelas reações auxiliares que geram succinato e alanina (Besteiro *et al.*, 2002; Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011).

Acetil-CoA

O acetil-CoA é uma molécula intermediária chave entre as vias anabólicas e catabólicas, sendo sua produção essencial para maioria das células. Essa molécula pode ser produzida a partir do catabolismo de glicose, prolina, treonina, leucina e isoleucina, bem como do catabolismo de ácidos graxos.

O acetil-CoA oriundo dessas vias catabólicas pode ser completamente oxidado na mitocôndria gerando ATP, ser convertido à acetato ou ser precursor para biossíntese de lipídeos. Em *T. brucei* foi demonstrado que grande parte do acetil-CoA formado pela glicólise (se não todo) era convertida a acetato, sendo esse posteriormente excretado no meio. Entretanto, nas formas epimastigotas de *T. cruzi* a maior parte do acetato produzido e excretado pelo parasito não é originado da glicose, mas sim de aminoácidos e, talvez, de ácidos graxos (Cazzulo *et al.*, 1985). Essa produção do acetato ocorre na mitocôndria e é mediada pela reação acoplada da acetil:succinato CoA-transferase (ou succinil-CoA:3-

cetoácido CoA-transferase ou succinato-CoA transferase; ASCT) com a succinil-CoA sintetase. A ASCT promove a transferência da CoA do acetil-CoA ao succinato, gerando acetato e succinil-CoA; esse último é convertido novamente à succinato pela succinil-CoA sintetase gerando ATP. Embora esse mecanismo tenha sido proposto estudando formas procíclicas do *T. brucei*, os genes que codificam ambas as enzimas estão presentes no genoma do *T. cruzi* (Van Hellemond; Opperdoes; Tielens, 1998; Rivière *et al.*, 2004; Bringaud; Rivière; Coustou, 2006).

O acetil-CoA é uma molécula que pode ser usada para a biossíntese de lipídeos, e alguns mecanismos foram estudados e propostos para caracterizar essa via metabólica em tripanossomatídeos. Na maioria dos eucariotos, levando em consideração que a produção do acetil-CoA ocorre na mitocôndria e a síntese de ácidos graxos no citoplasma, o acetil-CoA primeiramente deve ser transportado para o citosol (Van Weelden *et al.*, 2005). Partindo do princípio que a interconversão à citrato é uma reação presente na maioria dos eucariotos, este primeiro mecanismo foi testado nas formas procíclicas de *T. brucei*. Nessa reação, o acetil-CoA e o oxaloacetato são condensados a citrato pela citrato sintase na mitocôndria, sendo esse trocado pelo malato citosólico através de um lançadeira citrato/malato proposta pelos autores (Hatzivassiliou *et al.*, 2005; Rivière *et al.*, 2009). No citosol, o citrato é convertido novamente em acetil-CoA e oxaloacetato pela citrato liase citosólica, direcionando o acetil-CoA à biossíntese de lipídeos. O estudo que visava caracterizar essa via demonstrou que o gene codificante para a enzima citrato liase citosólica está ausente em *T. brucei* e que essa lançadeira citrato/malato aparentemente não é funcional. Por outro lado, no mesmo trabalho foi demonstrada a atividade da acetil-CoA sintetase, enzima citosólica que converte acetato a acetil-CoA, e que essa enzima é essencial para síntese de lipídeos na forma procíclica do parasito. Portanto, essa caracterização indica que o *T. brucei* usa acetato em vez de citrato para transferir o grupo acetil através das membranas mitocondriais e sintetizar os ácidos graxos (Rivière *et al.*, 2009).

Mitocôndria: seu papel na bioenergética

Como falado anteriormente, os tripanossomatídeos possuem uma mitocôndria única que se distribui em todo o corpo celular do parasito. Apesar de apresentar uma arquitetura peculiar e variável ao longo dos seus diferentes estágios de vida, a mitocôndria desses

protozoários mantém os compartimentos clássicos como a membrana externa, o espaço intermembranas, a membrana interna mitocondrial e a matriz mitocondrial (Paulin, 1975; Menna-barreto e Castro, 2014).

Na maior parte dos eucariotos, o ciclo do ácido cítrico ou ciclo de Krebs (CK) serve como o centro mitocondrial para as etapas finais do catabolismo oxidativo do esqueleto de carbono oriundo de carboidratos, aminoácidos e ácidos graxos. Esse ciclo possui oito etapas enzimáticas, na qual sete delas estão localizadas na matriz mitocondrial e uma, na membrana mitocondrial interna (succinato desidrogenase; Complexo II) que se associa diretamente ao sistema de transporte de elétrons (STE). O resultante da oxidação completa do esqueleto de carbono é CO_2, ATP formado a partir da fosforilação a nível de substrato e coenzimas reduzidas (NADH e $FADH_2$) provenientes das etapas oxidativas desse ciclo. Essas coenzimas reduzidas atuam como doadores de elétrons para os complexos mitocondriais que, acoplados à fosforilação oxidativa, são responsáveis pela maior parte da produção de ATP em um organismo aeróbico. Embora seja enfatizado sua importância na síntese de energia, os intermediários do ciclo podem ser desviados para biossíntese de outras moléculas, como ácidos graxos, aminoácidos, purinas e heme (cataplerose). E, em conformidade com esse processo, piruvato e aminoácidos são convertidos em intermediários do ciclo a fim de substituir esse processo cataplerótico, garantindo a continuidade do ciclo (anaplerose) (Haddad e Mohiuddin, 2020).

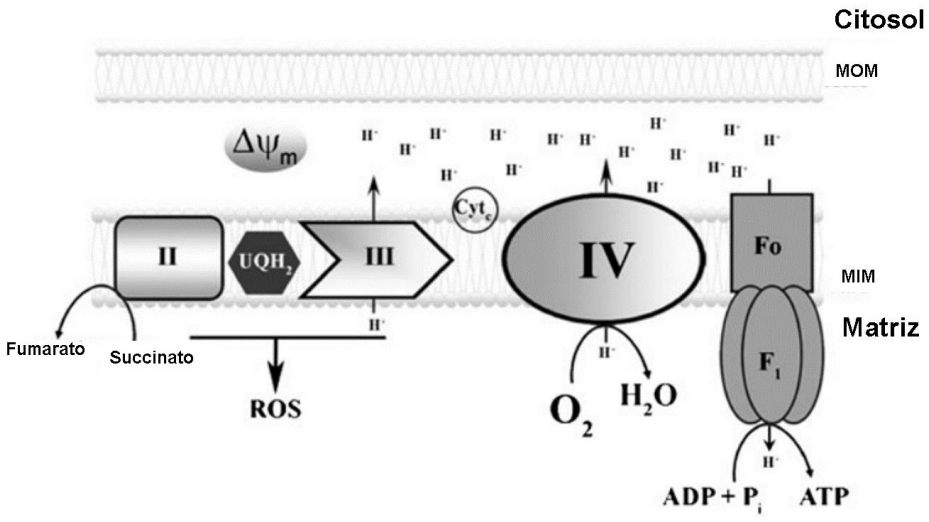
Ainda nos eucariotos em geral, as coenzimas reduzidas geradas no CK têm como destino serem oxidadas pelo STE. Esse sistema é constituído por quatro complexos enzimáticos presentes na membrana interna mitocondrial, são eles: NADH-ubiquinona oxidoredutase (complexo I), succinato-ubiquinona oxidoredutase (complexo II), ubiquinol-citocromo *c* oxidoredutase (complexo III) e citocromo oxidase (complexo IV). Além dos complexos, ainda existem a ubiquinona (coenzima Q) e o citocromo *c*, moléculas responsáveis pela transferência dos elétrons entre esses complexos. O fluxo de elétrons que percorre os complexos mitocondriais é acompanhado pelo bombeamento de prótons mediado pelos complexos I, III e IV através da membrana interna, gerando um gradiente eletroquímico. Esse gradiente impulsiona a síntese do ATP através da F_0F_1 ATP sintase (complexo V), acoplando o processo de respiração à fosforilação (fosforilação oxidativa) (De Souza; Attias; Rodrigues, 2009; Chance e Williams, 1955; Menna-Barreto e Castro, 2014).

No *T. cruzi* todas as enzimas do ciclo de Krebs estão presentes no genoma, com exceção da isocitrato desidrogenase dependente de NAD^+ (1ª etapa oxidativa do CK). No lugar dessa enzima, foi caracterizada uma isocitrato desidrogenase dependente de $NADP^+$

localizada na mitocôndria (Leroux *et al*, 2011; Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011). Uma série de experimentos desenvolvidos com compostos marcados com ^{13}C e ^{14}C demonstraram que o ciclo opera de maneira funcional, promovendo a oxidação tanto de glicose quanto de aminoácidos à CO_2 (Docampo; de Boiso; Stoppani, 1978; Silber *et al.*, 2005; Bringaud; Rivière; Coustou, 2006). Além disso, o processo de cataplerose também já foi evidenciado nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, na qual foi demonstrado a síntese de uma série de aminoácidos a partir da ^{13}C-prolina formada por esse processo (Sylvester e Krassner, 1973; Urbina; Osorno; Rojas, 1990).

Com relação ao STE dos tripanossomatídeos, o succinato desempenha um papel essencial (Denicola-Seone *et al*., 1992). A oxidação dessa molécula pelo complexo II leva à transferência dos elétrons para o complexo III através da ubiquinona, que na reação subsequente leva à redução do citocromo *c*. Os elétrons no citocromo *c* são transportados para o complexo IV que, por fim, transfere os elétrons ao O_2 reduzindo-o à molécula de H_2O (Figura 4) (Hill, 1976). Todo o processo nesses protozoários é semelhante aos eucariotos superiores, porém os parasitos possuem uma certa dependência do succinato. Essa dependência parece ser uma consequência da não-funcionalidade do complexo I desses protozoários, que possui uma atividade NADH desidrogenase baixa (Carranza *et al.*, 2009). Em razão disso, a oxidação do NADH mitocondrial foi atribuída à reação catalisada pela NADH-fumarato redutase dessa organela, que gera succinato a partir de fumarato regenerando o NAD^+ mitocondrial (Besteiro *et al.*, 2002; Coustou *et al.*, 2005).

Figura 4 - Fosforilação oxidativa no *Trypanosoma cruzi*



Fonte: Adaptado de Gonçalvez *et al.*, 2011.

Mitocôndria: geração de espécies reativas de oxigênio

Em termos gerais, o STE mitocondrial associada à fosforilação oxidativa é responsável por 85-90% de O_2 total consumido em uma célula, na qual 3% desse O_2 são reduzidos de forma incompleta resultando na formação de ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Silva *et al.*, 2011; Wang e Hai, 2016). Em virtude disso acontecer em condições fisiológicas, a mitocôndria é uma das principais fontes de ROS nos organismos aeróbicos, na qual se inclui os tripanossomatídeos (Boveri e Stoppani, 1977; Tomás e Castro, 2013). Sendo o sítio principal de produção dessas espécies, a mitocôndria do *T. cruzi* possui uma sólida defesa antioxidante que inclui duas isoformas da superóxido dismutase (SOD) dependente de ferro que, em sua reação enzimática, dismuta o $O_2^{\bullet-}$ em oxigênio molecular (O_2) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) (Ismail *et al.*, 1997). Diferente das outras ROS, o H_2O_2 atravessa as membranas mitocondriais e se dissemina no citosol e em outras organelas, sendo capaz de interferir em processos metabólicos e promover efeitos deletérios (Tomas e Castro, 2013; Mesías; Garg; Zago, 2019). Além disso, o H_2O_2 ao reagir com íons Fe^{+3} (reação de Fenton) promove a geração do radical hidroxil ($^{\bullet}OH$), um tipo de ROS extremamente reativa e tóxica para as células (Valko *et al.*, 2016).

ROS eram frequentemente associadas ao princípio do "estresse oxidativo", que sugere que a formação dessas espécies induz a uma patologia ao reagir e danificar lipídios, proteínas e DNA (Cross *et al.*, 1987). Em razão dessa propriedade, essas espécies reativas, classicamente, eram consideradas como a molécula de defesa do hospedeiro, produzida pelas células do sistema imune para a destruição dos patógenos (McCabe e Mullins, 1990) e, sendo assim, presumia-se que o *T. cruzi* era morto por esse mesmo mecanismo (Paiva; Medei; Bozza, 2018). No entanto, a ideia que as ROS reagem indiscriminadamente com as proteínas promovendo danos e perda de função dessas biomoléculas é equivocada. O H_2O_2 pode reagir de modo reversível com resíduos de cisteínas de proteínas-alvo promovendo uma mudança conformacional nesta proteína ou alteração de sua atividade, propagando uma transdução de sinal (Diebold e Chandel, 2016). Além disso, existe um conjunto específico de proteínas sensíveis ao superóxido que, ao serem inativadas, ativam vias de sinalização promovendo adaptação às concentrações elevadas desse $O_2^{\bullet-}$ ou, alternativamente, iniciando a morte celular (Chen; Azad; Gibson, 2009). Portanto, as ROS podem gerar tanto o "estresse oxidativo" quanto promover a "sinalização redox", sendo sua concentração e o tipo de ROS variáveis determinantes para desencadear esses processos. Nesse sentido, a manutenção dos

níveis de H_2O_2 devem ser rigidamente controlados e é crítica para o funcionamento normal dos eucariotos (Schieber e Chandel, 2014).

Diferente do que se esperava na década de 70, que ROS eram o principal mecanismo de morte à patógenos (McCabe e Mullins, 1990), descobriu-se que os ambientes oxidantes favorecem o estabelecimento da infecção e a proliferação do *Trypanosoma cruzi* tanto em macrófagos quanto nos insetos vetores através de experimentos *in vitro* e *in vivo*. E, de maneira antagônica, os ambientes antioxidantes demonstraram interferir no crescimento desses parasitos, reduzindo a infecção em macrófagos e estimulando a diferenciação no inseto (Paiva *et al.*, 2012; Goes *et al.*, 2016; Paiva e Bozza, 2014; Nogueira *et al.*, 2015). Além desses efeitos terem sido observados nas diferentes formas morfológicas de *T. cruzi*, processos biológicos semelhantes estimulados pelos oxidantes foram evidenciados em outros tripanossomatídeos, como a indução da diferenciação em *T. brucei* (Dolezělová *et al.*, 2020) e promoção da diferenciação e virulência em *Leishmania* (Mittra *et al.*, 2013; 2017).

Apesar de importante na indução de processos biológicos, ROS são moléculas reativas que em altas quantidades promovem danos irreversíveis às biomoléculas sendo necessário seu controle intracelular para a sobrevivência desses parasitos. Para isso, os tripanossomatídeos possuem uma sólida defesa antioxidante composta por uma série de antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos (Mesías; Garg; Zago, 2019). Diferente da maioria dos organismos, a homeostase redox desses protozoários é mantida, principalmente, através de um sistema antioxidante único e distinto que utiliza tripanotiona ($T[SH]_2$), um conjugado composto por glutationa (GSH) e espermidina. Em razão de não conterem os sistemas clássicos de GSH/glutationa redutase e tiorredoxina/tiorredoxina redutase (El-Sayed *et al.*, 2005), o sistema $T(SH)_2$/tripanotiona redutase substitui a função antioxidante que esses sistemas apresentam na maioria das células e confere maior capacidade reativa do que o GSH (Manta *et al.*, 2013). A biossíntese de $T(SH)_2$ se inicia quando os aminoácidos cisteína e glutamato são ligados covalentemente pela γ-glutamilcisteína sintetase formando a γ-glutamilcisteína. Essa molécula então é ligada à glicina pela glutationa sintetase produzindo a glutationa (GSH). Pelo *Trypanosoma cruzi* ser o único eucarioto incapaz de sintetizar as poliaminas (Carrilo *et al.*, 1999; Ariyanayagam e Fairlamb, 1997), a espermidina deve ser importada do meio extracelular ou ser sintetizada a partir de putrescina. A síntese da espermidina é catalisada pela espermidina sintase utilizando um intermediário da via catabólica da metionina, S-adenosilmetionina descarboxilada, e putrescina. Por fim, a tripanotiona sintetase produz a tripanotiona pela ligação de duas moléculas de GSH à molécula de espermidina. A tripanotiona redutase é a enzima responsável pela manutenção da tripanotiona na sua forma

reduzida, utilizando o NADPH como cofator (Olin-Sandoval; Moreno-Sánchez; Saavedra, 2010).

Metabolismo dos aminoácidos

A fosforilação oxidativa é considerada o principal sítio de geração de ATP na maioria dos organismos aeróbicos e, durante muitos anos, julgou-se que os tripanossomatídeos cultivados em meio rico em glicose produziam ATP principalmente por essa rota metabólica. Todavia, estudos posteriores questionaram essa conclusão (Besteiro *et al.*, 2005; Coustou *et al.*, 2008). Dados experimentais demonstraram que, na presença de glicose, as formas procíclicas de *T. brucei* não dependem da fosforilação oxidativa para a produção de ATP. Contudo, na ausência dessa hexose, quando os parasitos alternam para um metabolismo baseado na oxidação de aminoácidos, a fosforilação oxidativa se torna essencial (Coustou *et al.*, 2003; Lamour *et al.*, 2005; Bringaud; Rivière; Coustou, 2006).

Nos tripanossomatídeos, diferentes moléculas podem ser usadas como intermediários ou como combustível para o ciclo do ácido tricarboxílico, possibilitando sua oxidação completa para a obtenção de energia. No *T. cruzi*, L-prolina, L-histidina, L-glutamina, L-isoleucina, L-leucina, L-glutamato, L-asparagina, L-aspartato e L-alanina são capazes de estimular o consumo de oxigênio mitocondrial (Sylvester e Krassner, 1976) e disponibilizar energia através da fosforilação oxidativa (Montamat; Arauzo; Blanco, 1987; Barisón *et al.*, 2016; Girard *et al.*, 2018; Silber *et al*, 2005). Acredita-se que todos esses aminoácidos são convertidos a glutamato ou a aspartato para serem transportados do citosol para a mitocôndria, sendo oxidados pelo ciclo de Krebs (Silber *et al.*, 2005). Durante as reações catabólicas dos primeiros cinco aminoácidos ocorre a geração de glutamato que, pela ação da glutamato desidrogenase (GDH) ou algumas aminotransferases, vai ser convertido à α-cetoglutarato (αCT) participando do metabolismo energético do parasito (Barderi *et al.*, 1998; Silber *et al.*, 2005). O L-aspartato, obtido a partir de L-asparagina ou pela captação do meio extracelular, é convertido à oxaloacetato pela ação da aspartato aminotransferase. O oxaloacetato ao se condensar com o acetil-CoA formando citrato, gera coenzimas reduzidas pelo CK e participa na síntese de ATP via fosforilação oxidativa (Sylvester e Krassner, 1976; Marchese *et al.*, 2018).

L-alanina é o produto final principal de um metabolismo combinado de glicose e aminoácidos, visto que o acúmulo de NH_3, oriundo do catabolismo de aminoácidos, impulsiona a sua produção (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011). Embora seja um aminoácido caracterizado por ser amplamente secretado pelo *T. cruzi*, na ausência de glicose e em altas concentrações, L-alanina pode ser importada novamente pelo parasito e ser completamente oxidada para produção de ATP pela mitocôndria (Girard *et al.*, 2018).

Diferente dos aminoácidos mencionados, serina e metionina não estimulam o consumo de oxigênio pelo *T. cruzi* (Sylvester e Krassner, 1976) e não existe até o momento evidências que indiquem que esses aminoácidos possuem um papel na bioenergética (Silber *et al.*, 2005). No entanto, Hampton (1971) demonstrou que o catabolismo de serina propicia a formação de quantidades significativas de CO_2, além de outros produtos como alanina, glicina, glutamato, aspartato e cisteína. A metionina está envolvida nas vias de biossíntese de cisteína, fosfolipídeos e poliaminas. As vias catabólica e anabólica desse aminoácido são regidas por várias reações enzimáticas e são conectadas por dois ciclos que levam à regeneração dessa molécula (Finkelstein, 1990; Reguera *et al.*, 2007). Em um dos ciclos, um precursor pode ser desviado para a síntese da cisteína, enquanto no outro ciclo pode ser direcionado para síntese de espermidina. Vale ressaltar que a cisteína é sintetizada por duas vias no *T. cruzi*, utilizando tanto a metionina quanto a serina como precursores, sendo o *T. cruzi* e *L. major* os únicos organismos unicelulares até o momento com essas duas vias ativas (Marciano; Santana; Nowicki, 2012; Marchese *et al.*, 2018).

A captação da L-histidina, da L-arginina, dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAA, do inglês *branched-chain amino acids*; L-valina, L-isoleucina e L-leucina) e dos aminoácidos aromáticos (tirosina, triptofano e fenilalanina) são essenciais para o *T. cruzi*, tendo em vista que não possui as enzimas responsáveis pela síntese desses aminoácidos (Nowicki *et al.*, 1992; Berriman *et al.*, 2005; Barisón *et al.*, 2016). Diferente dos três primeiros aminoácidos citados, a degradação dos aminoácidos aromáticos induz a regeneração do NAD^+ citosólico (Nowicki *et al.*, 1992) e a formação de produtos que são excretados no sobrenadante (Stibbs e Seed, 1975). Já na degradação dos BCAA no *T. cruzi*, além de glutamato, os produtos finais são compostos cetogênicos (acetil-CoA) e glicogênicos (succinil-CoA e propionil-CoA) (Montamat; Arauzo; Blanco, 1987; Marchese *et al.*, 2018).

De modo interessante, os tripanossomatídeos utilizam L-arginina como fosfagênio através da arginina cinase. Essa enzima descrita nesses protozoários possui a capacidade de fosforilar reversivelmente a L-arginina gerando arginina-fosfato, usando ATP (Pereira *et al.*, 2000). Estudos propõem que arginina fosfato atua como um backup de energia quando a

restauração dos níveis de ATP é necessária, contribuindo para a manutenção do metabolismo energético nesses parasitos (Pereira *et al.*, 2002).

L-treonina é o aminoácido mais consumido pelas formas procíclicas de *T. brucei*, possuindo uma taxa de consumo comparável à da glicose (Cross; Klein; Linstea, 1975). No entanto, treonina sozinha não é capaz de sustentar a proliferação *in vitro*, visto que é convertida a metabólitos pouco ou não usados para a obtenção de energia. Glicina e acetato (convertido a partir de acetil-CoA) são os produtos finais da via catabólica de treonina e logo são excretados pelo parasito, porém parte do acetato é desviado para síntese de ácidos graxos e esteróis (Bringaud; Rivière; Coustou, 2006). Até o momento, o transporte e a via catabólica de treonina não foram identificados em *Leishmania spp* e *Trypanosoma cruzi* (Marchese *et al.*, 2018). É sugerido que eles não possuem essa via em razão da ausência dos genes no genoma desses parasitos (Millerioux *et al.*, 2013). Entretanto, foi observado que o *T. cruzi* secreta acetato no sobrenadante, que não é originado do catabolismo da glicose (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011).

A L-prolina é um dos aminoácidos mais relevantes para os tripanossomatídeos, visto que seus níveis intracelulares são críticos para diversos processos biológicos, seja nutrição, diferenciação ou a resistência ao desbalanço oxidativo (Tonelli *et al.*, 2004; Sayé *et al.*, 2014). Os níveis intracelulares da L-prolina são determinados pelo balanço entre sua degradação, biossíntese a partir do glutamato e sua captação através de transporte ativo. Reforçando dados previamente expostos, esse aminoácido é capaz de estimular o consumo de oxigênio mitocondrial de uma forma bastante significante. O catabolismo desse aminoácido foi caracterizado e descrito de forma detalhada no *T. cruzi*, ocorrendo na mitocôndria. A primeira reação dessa via é catalisada por uma oxidorredutase dependente de FAD (prolina desidrogenase), que oxida a prolina e transfere seus elétrons diretamente para a ubiquinona no STE do parasito, levando à produção de ATP (Paes *et al.*, 2013). Nas reações subsequentes promovem a formação de glutamato que, após sucessivas reações, vai ser convertido à α-cetoglutarato, que entra no CK e produz ATP pela fosforilação oxidativa (Mantilla *et al.*, 2015).

Portanto, o metabolismo de aminoácidos possui grande importância em vários momentos do ciclo biológico do *T. cruzi*. Essas moléculas e seus intermediários desempenham diversas funções e participam tanto na síntese de proteínas e na bioenergética, quanto do controle osmótico, proteção contra apoptose e autofagia, síntese de poliaminas, resistência ao estresse (oxidativo, térmico e nutricional) e diferenciação (Marchese *et al.*, 2018).

Heme

Características gerais

O heme (heme *b*, protoheme ou Fe-protoporfirina IX), molécula composta pela coordenação do átomo de ferro (Fe) central na protoporfirina IX, é uma metaloporfirina envolvida em diversos processos biológicos essenciais para os organismos. Nos humanos, 95% do conteúdo total de ferro é encontrado na forma dessa porfirina e, embora seja reconhecida principalmente pelo seu papel no transporte do O_2, praticamente todos os organismos e células do planeta que metabolizam o oxigênio requerem o heme para sua viabilidade (Hooda; Shah; Zhang, 2014; Reddi e Hamza, 2016).

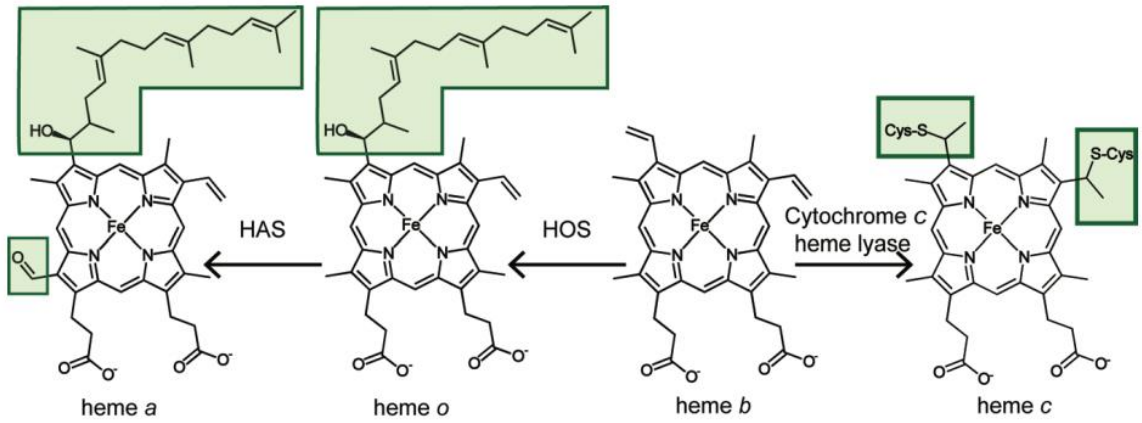
Os animais, fungos e α-proteobactérias sintetizam o heme *b* através da via C4 (a partir da glicina; via de Shemin), enquanto as plantas, arqueas e outras bactérias utilizam a via C5 (a partir de glutamato) (Dailey *et al.*, 2017). Essa diferença se reflete na síntese do primeiro precursor da via de biossíntese do heme, ácido δ-aminolevulínico (ALA), que pode ser sintetizado a partir da condensação da glicina e succinil-CoA catalisada pela ALA sintase (animais, fungos e α-proteobactérias) ou a partir de glutamato via três etapas enzimáticas (plantas, arqueas e outras bactérias) (Medlockm e Dailey, 2007). Com poucas exceções, a maioria dos eucariotos são capazes de sintetizar o heme, sendo a via Shemin a via mais conservada ao longo da evolução. Ela requer oito enzimas e é iniciada e finalizada na matriz mitocondrial, passando pelo citosol nesse processo, necessitando da presença de glicina e succinil-CoA, oxigênio molecular e ferro (Hamza e Dailey, 2012). Uma vez sintetizado, o heme na matriz mitocondrial é transportado para espaços celulares dentro e fora da mitocôndria. A síntese dessa porfirina pode ser controlada em múltiplos níveis, através da disponibilidade dos substratos, particionamento dos intermediários entre a mitocôndria e o citosol e pela regulação direta do heme sobre as enzimas responsáveis pela síntese (Sun; Cheng; Chen, 2015; Swenson *et al.*, 2020).

A grande importância dessa porfirina é vista pela infinidade de hemeproteínas presentes em praticamente todos os compartimentos celulares que promovem papéis fundamentais nas células eucariotas. Como grupo prostético, o heme é essencial para mediar o armazenamento e o transporte de gases; além da transferência de elétrons e reações enzimáticas (Ponka, 1999; Severance e Hamza, 2009; Kim *et al.*, 2012). Como molécula

sinalizadora, a ligação do heme a vários fatores celulares (fatores de transcrição, quinases, canais iônicos e proteínas de processamento de microRNA) (Tsiftsoglou; Tsamadou; Papadopoulou, 2006; Mense e Zhang, 2006; Faller *et al.*, 2007) ou através do produto do seu catabolismo, monóxido de carbono (CO), regula coletivamente diversos processos fisiológicos, como: "sensor" de oxigênio, homeostase de ferro, resposta ao estresse oxidativo, respiração mitocondrial e sua biogênese, mitofagia, apoptose, ritmos circadianos, progressão do ciclo celular e proliferação (Mense e Zhang, 2006; Severance e Hamza, 2009; Swenson *et al.*, 2020).

Além das funções primordiais citadas acima, o heme *b* também é precursor da síntese de outros tipos de heme. São eles, o heme do tipo *c*, *o* e *a* mostrados na Figura 5. Cada uma dessas espécies diverge entre si devido às modificações nas cadeias laterais dos anéis porfirínicos, sendo essas mudanças necessárias para conferir funções específicas de cada tipo de heme. O heme *o* e o heme *a* são formados por duas reações enzimáticas consecutivas catalisadas pela heme *o* sintase e heme *a* sintase, respectivamente. Nos eucariotos, o heme *o* dura apenas o tempo necessário para sua conversão em heme *a*. Porém, em algumas bactérias, o heme *o* pode ser usado como um grupo prostético em algumas oxidases (Puustinen e Wikstrom, 1991). A formação do heme *o* a partir do heme *b* ocorre pela farnesilação do grupo vinil na posição C2 do anel da porfirina; já para a formação do heme *a*, a espécie do tipo *o* sofre oxidação no grupo metil em C8 gerando um grupo aldeído nessa posição. O heme *a* compõe a subunidade central do citocromo *c* oxidase, o complexo IV do sistema de transporte de elétrons (STE). O heme *c* é o único heme que se encontra covalentemente ligado à uma proteína. Os grupos vinil presentes nas duas cadeias laterais do heme *c* estão ligadas covalentemente aos resíduos de cisteína de uma apoproteína, formando os citocromos *c* e *c1* (Swenson *et al.*, 2020).

Figura 5 - Estrutura química do heme *b* e seus variantes presentes nos eucariotos



Legenda: O heme *c* é formado através da ligação covalente do heme *b* a grupos sulfidrilas do citocromo c ou subunidade citocromo *c1* do complexo III pela reação catalisada pela citocromo *c* heme liase. O heme *b* ainda é precursor da síntese de heme *a* através de uma reação sequencial catalisada pelas enzimas heme *o* sintase (HOS) e heme *a* sintase (HAS), passando pelo intermediário heme *o*.
Fonte: Retirado de Swenson *et al.*, 2020.

As propriedades inerentes à molécula de heme, como atividade redox e hidrofobicidade, propiciam sua participação e envolvimento nas funções biológicas fundamentais descritas anteriormente. Entretanto, as mesmas propriedades que a tornam essencial também a tornam tóxica para as células, uma vez que sua forma “livre” pode se ligar a várias biomoléculas (como DNA, proteínas e lipídeos) e promover alterações nas suas estruturas e funções (Atamna, 2006). Já foi demonstrado que a interação do heme com membranas celulares promove alteração nas funções de permeabilidade e seletividade, levando a uma grande perda de função dessas membranas biológicas (Schmitt; Frezzatti; Schreier, 1993). Além disso, ela é capaz de catalisar a formação de radicais livres e ROS, que em excesso promovem inúmeros danos celulares (Kumar e Bandyopadhyay, 2005).

Com a finalidade de diminuir esses efeitos deletérios, o heme pode ser degradado enzimaticamente pela heme oxigenase (HO), uma enzima presente na maioria dos eucariotos e conservada evolutivamente. Nos eucariotos é possível achar duas isoformas dessa enzima: a HO-1, que é induzida na presença do heme, íons metálicos e moléculas estressoras, como em resposta ao estresse oxidativo e choque térmico, entre outros; HO-2 que é constitutivamente expressa em múltiplos órgãos com maior expressão no cérebro e nos testículos (Ewing e Maines, 1992). A reação clássica catalisada pela HO produz biliverdina, CO e ferro livre e só ocorre na presença de NADPH como poder redutor. A enzima que permite a transferência de elétrons do NADPH para o heme é a citocromo P450 redutase, logo, exercendo também um papel chave no catabolismo fisiológico do heme. Portanto, as concentrações intracelulares de

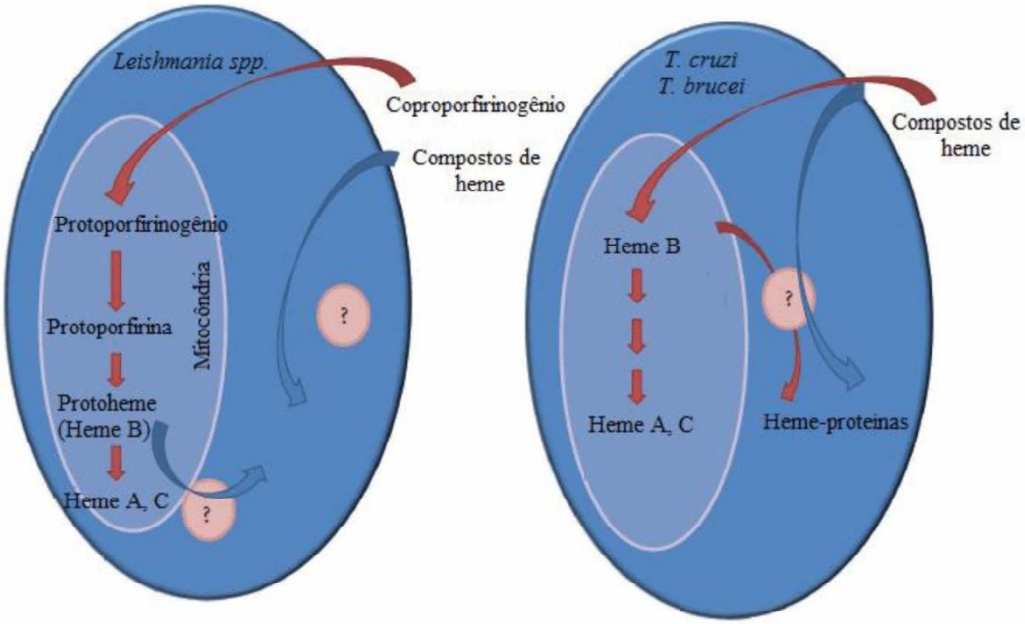
heme devem ser rigorosamente controladas através da regulação na síntese, captação e degradação dessa porfirina, com base nas necessidades celulares (Ryter e Tyrell, 2000; Donegan *et al.*, 2019; Swenson *et al.*, 2020).

Heme na biologia do *T. cruzi*

Em seu ciclo de vida, há dois momentos em que o *Trypanosoma cruzi* está em contato com o sangue: no trato digestivo do inseto vetor e na corrente sanguínea do hospedeiro mamífero. O heme ligado à hemoglobina possui uma concentração aproximada de 10 mM no sangue (Graça-Souza *et al.*, 2006). Isso implica que no intestino médio do inseto, após o processo de digestão do sangue, as formas epimastigotas estão imersos em uma solução rica em aminoácidos, peptídeos e altas concentrações de heme livre.

No capítulo anterior descrevemos como e o porquê do heme ser uma molécula fundamental para o metabolismo aeróbico dos organismos. No entanto, diferente da maioria dos eucariotos, os tripanossomatídeos não são capazes de sintetizar a molécula de heme, uma vez que esses protozoários possuem ausência ou deficiência parcial na via de biossíntese dessa porfirina (Kořený; Lukeš; Oborník, 2010). Embora a *Leishmania spp.* possua as três últimas enzimas dessa via anabólica, os parasitos do gênero *Trypanosoma* permaneceram completamente deficientes nessa via de síntese do heme, sendo assim necessária sua captação a partir dos seus hospedeiros (Figura 6) (Tripodi; Menendez Bravo; Cricco, 2011). Porém, apesar de uma via deficiente, o *Trypanosoma cruzi* é capaz de sintetizar o primeiro produto dessa via, ALA, não sendo possível detectar atividade das outras enzimas (Salzman *et al.*, 1982; Lombardo; Araujo; Batlle, 2003). Posteriormente, esses resultados foram corroborados pelo sequenciamento do genoma do parasito, que demonstrou a ausência das enzimas responsáveis pelas próximas reações da via de síntese (El-Sayed *et al.*, 2005).

Figura 6 - Vias de biossíntese do heme em *Leishmania spp* e *Trypanosoma*



Fonte: Adaptado de Tripodi; Menendez Bravo; Cricco, 2011.

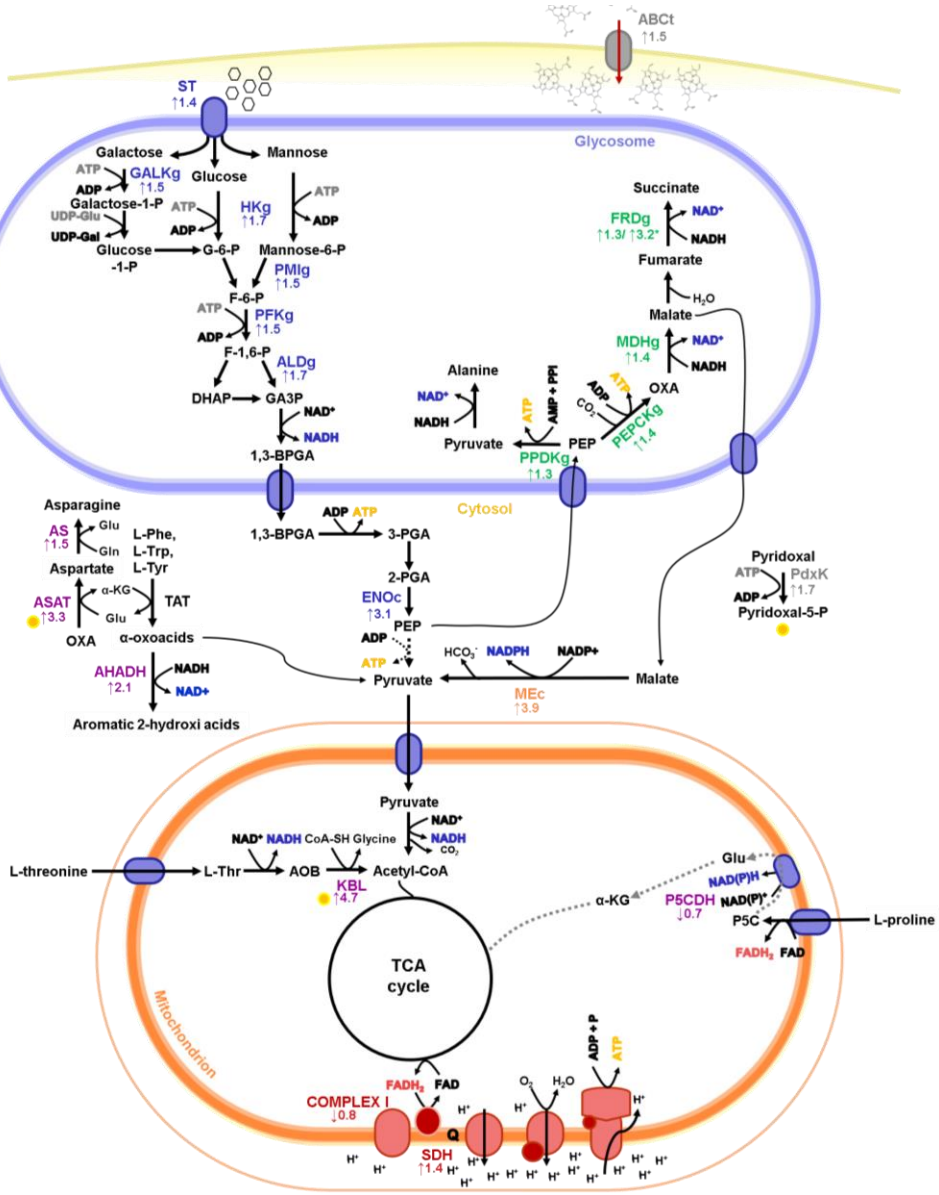
Em 1951, Lwoff ressaltou que para o cultivo *in vitro* do *T. cruzi* era necessário a suplementação do meio de cultivo com o heme, sugerindo que essa porfirina poderia ser um fator de crescimento ou uma vitamina essencial para o parasito. No entanto, além de ser relacionado a essa nutrição principalmente pelo parasito não sintetizá-lo, foi demonstrado que o heme é de fato captado pelos parasitos (Cupello *et al.*, 2011) e induz a proliferação das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (Arévalo; Panebra; Santa Cruz, 1985), sendo esse aumento na proliferação de forma dose-dependente às concentrações de heme (Lara *et al.*, 2007).

O heme promove importantes efeitos na biologia e fisiologia do *Trypanosoma cruzi*. As formas epimastigotas na presença de heme apresentaram uma redução na atividade do sistema de transporte de elétrons (STE) mitocondrial e um aumento na diferença de potencial mitocondrial, promovendo a formação de superóxido (Nogueira *et al.*, 2017). Essa produção de ROS induzida pelo heme desempenha um papel vital na interação parasito/vetor e é responsável por desencadear a proliferação das formas epimastigotas, através de um mecanismo de sinalização sensível ao estado redox, a via de sinalização celular mediada pela *Ca^{2+}/calmodulin kinase II* (CAMKII) (Souza *et al.*, 2009; Nogueira *et al.*, 2011). De forma interessante, experimentos *in vitro* e *in vivo* demonstraram que um ambiente oxidante estimula a proliferação dessas formas epimastigotas em cultura e no intestino do inseto. E, de forma contrária, um ambiente antioxidante favorece a diferenciação dessas formas replicativas

para as formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas. Vale ressaltar que o heme *per se* é capaz de inibir a metaciclogênese (Nogueira *et al*., 2011; 2015). Portanto, essa modulação metabólica da fisiologia mitocondrial foi proposta como um mecanismo para sustentação do ambiente oxidante adequado para a proliferação no intestino do vetor (Nogueira *et al.*, 2017). Embora o ambiente oxidante favoreça o aumento da população dos epimastigotas de *T. cruzi*, a potencialização desse ambiente oxidante decorrente do aumento dos níveis de heme livre, promove a morte dos parasitos no intestino do triatomíneo (Ferreira *et al.*, 2018).

As formas epimastigotas de *T. cruzi*, comparadas às outras formas morfológicas, geralmente aumentam a expressão de genes relacionados ao CK, sistema de transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, sugerindo um aumento na respiração mitocondrial por esses parasitos (Berná *et al.*, 2017). No entanto, mesmo tendo sido observado que o heme compromete fisiologicamente a mitocôndria desses parasitos, os níveis de ATP não apresentaram alteração (Nogueira *et al.*, 2017). Em busca de entender a bioenergética das formas epimastigotas em resposta ao heme, uma análise transcriptômica foi desenvolvida e publicada recentemente (Figura 7). Nesse trabalho foi mostrado que o heme induziu consideravelmente a expressão de genes envolvidos no transporte e metabolismo das hexoses e na fermentação aeróbica, sendo a grande maioria das enzimas localizadas no glicossoma. Porém, o gene mais expresso relacionado às vias citadas foi a enolase, enzima citosólica da via glicolítica que sintetiza a fosfoenolpiruvato (PEP). Como explicado no tópico anterior, PEP é a molécula responsável por alimentar a fermentação aeróbica no *T. cruzi* que, notavelmente, apresentou o aumento na expressão de 4 de 6 enzimas dessa via. De modo contrastante, não foi observado alteração na expressão de genes relacionados com metabolismo energético mitocondrial, sustentando a hipótese de que a glicólise e a fermentação aeróbica contribuem para a produção de ATP necessária para a proliferação do parasito na presença do heme (Paes *et al.*, 2020). Portanto, no presente estudo pretendemos investigar e comprovar essa hipótese através de abordagens bioquímicas somadas a análises metabolômicas das formas epimastigotas submetidas à molécula de heme.

Figura 7 - Representação esquemática das vias metabólicas de genes regulados pelo heme



Legenda: Valores em caixas representam o *fold change* da expressão dos genes dos parasitos tratados com heme em relação aos parasitos controle. Reações enzimáticas conhecidas reguladas positivamente (seta preta sólida) e negativamente (seta pontilhada cinza) segundo os dados do RNAseq. Círculos amarelos indicam enzimas dependentes de ligação da piridoxal-5-fosfato. As enzimas de cada via proposta apresenta cores específicas: metabolismo de glicose (azul): ST: transportador de hexose; GALKg: galactocinase glicossomal; HKg: hexocinase glicossomal; PMIg: fosfomanose isomerase glicossomal; PFKg: fosfofrutocinase glicossomal; ALDg: frutose bisfosfato aldolase glicossomal; ENOc: enolase citosólica. Fermentação (verde): PPDKg: piruvato fosfato dicinase glicossomal; PEPCKg: fosfoenolpiruvato carboxicinase glicossomal; MDHg: malato desidrogenase glicossomal; FRDg: fumarato redutase glicossomal; Metabolismo de aminoácidos (roxo): KBL: 2-amino-3-cetobutirato CoA liase; P5CDH: δ-1-pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; ASAT: aspartato aminotransferase citosólico; AS: asparagina sintase a; AHADH: L-α-hidroxiácido aromático desidrogenase; Metabolismo de malato (laranja). ME: enzima málica citosólica. Metabolismo mitocondrial (rosa): Complex I: NADH-ubiquinona oxidoretutase; SDH: succinato desidrogenase. Outras vias metabólicas (cinza): PdxK: piridoxal cinase; ABCt: transportador ABC. **Metabólitos:** G-6-P: glicose-6-fosfato; F-6-P: frutose-6-fosfato; F-1,6-P: frutose-1,6-bifosfato; DHAP: diidroxiacetona fosfato; GA3P: gliceraldeído-3-fosfato; 1,3-BPGA: 1,3-bisfosfoglicerato; 3-PGA: 3-fosfoglicerato; 2-PGA: 2-fosfoglicerato; PEP: fosfoenolpiruvato; OXA: oxaloacetato; Glu: glutamato; Gln: glutamina; Phe: fenilalanina; Trp: triptofano; Tyr: tirosina; P5C: pirrolina-5-carboxilato; AOB: amino-oxobutirato.

Fonte: Retirado de Paes *et al.*, 2020.

1 OBJETIVO

1.1 **Geral**

Estudar o efeito da molécula de heme no metabolismo de glicose das formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi.*

1.2 **Específicos**

a) Avaliar o envolvimento da via glicolítica na proliferação de formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* submetidos ao heme e ao H_2O_2;
b) Avaliar a captação da glicose das formas epimastigotas cultivadas na presença do heme;
c) Mensurar o pH do sobrenadante das formas epimastigotas cultivadas na presença do heme;
d) Investigar a bioenergética mitocondrial das formas epimastigotas cultivadas com heme na presença da glicose.
e) Identificar e quantificar os metabólitos intracelulares provenientes dos parasitos cultivados com heme;
f) Identificar e quantificar os metabólitos captados e secretados pelos parasitos cultivados na presença de heme.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Heme

A solução de heme (Fe-Protoporfirina IX) 20 mM foi preparada através da dissolução em 0,1 N de NaOH e ressuspenso em salina tamponada com fosfato de sódio (tampão fosfato de sódio 100 mM e NaCl 150 mM pH 7,4; PBS). Para adicionar aos experimentos, a solução estoque foi diluída em PBS para 5 mM de concentração final.

2.2 Cultura dos parasitos

Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, clone CL Brener, foram cultivadas em meio BHI (*Brain-heart infusion*) mais 10% de soro fetal bovino (SFB) na ausência ou na presença de heme 30 µM em garrafa de cultura de células com 25 cm² de área de superfície a 28 ºC por sete dias.

2.3 Avaliação da proliferação dos parasitos

2.3.1 Curva de proliferação dos parasitos com heme, 2-desoxiglicose e glicose

Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2{,}5x10^6$ parasitos/mL) foram cultivadas em meio BHI mais 10% de SFB na presença de heme 30 µM, de 2-desoxiglicose (2-DG; Sigma-Aldrich) 20 mM e de D-α-glicose 5,5 mM (Sigma-Aldrich) por 14 dias em placa de 96 poços. A proliferação foi quantificada através da contagem de células utilizando a câmara de Neubauer no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dia após a inoculação dos parasitos. O sobrenadante do 5º, 7º e 10º dia foi coletado para ensaios posteriores.

2.3.2 Ensaio de proliferação com heme, H_2O_2 e 2-DG

Um ensaio de proliferação dos parasitos também foi realizado na presença de heme 30 µM, de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 30 µM e de 2-DG 20 mM. Parasitos foram mantidos em cultura por sete dias em placa de 96 poços e o crescimento foi quantificado através da contagem de células em câmara de Neubauer.

2.4 **Quantificação da concentração de glicose no sobrenadante**

2.4.1 Captação de glicose pelos parasitos cultivados com heme por 24 h

Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2x10^8$ parasitos) foram lavadas e submetidas ou não ao tratamento com heme 30 µM por 24 h. Após o tempo, o sobrenadante dos parasitos foi coletado e a concentração de glicose foi quantificada pelo uso Kit Glucose Liquiform (Labtest). A captação de glicose pelos parasitos foi calculada como será explicado posteriormente.

2.4.2 Captação de glicose pelos parasitos cultivados com heme e glicose ao longo dos dias

Formas epimastigotas ($2,5x10^6$ parasitos/mL) foram cultivadas na presença e na ausência de heme 30 µM e de glicose 5,5 mM ao longo dos dias. O sobrenadante foi coletado no 5º, 7º e 10º dia de cultivo e a concentração da glicose foi quantificada através do Kit Glucose Liquiform (Labtest).

A captação de glicose pelos parasitos foi calculada a partir da diferença entre a concentração de glicose encontrada nos meios sem células e a concentração de glicose mensurada no sobrenadante das células cultivadas por 24 h e nos respectivos dias (5º, 7º e 10º dia). O valor da diferença é igual à quantidade de glicose total captada do sobrenadante pelos

parasitos. Esse valor foi normalizado pela contagem das células em câmara de Neubauer nos respectivos dias.

2.5 **Avaliação do pH do sobrenadante**

Os sobrenadantes das formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivadas ou não com heme por 24 h ou ao longo dos dias foram coletados e o pH foi mensurado usando potenciômetro.

2.6 **Avaliação da fisiologia mitocondrial**

Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2{,}5x10^6$ parasitos/mL) foram cultivadas com e sem 30 μM de heme em garrafa de cultura de células com 25 cm² de área de superfície a 28 ºC por sete dias. Neste dia, os parasitos foram contados, lavados com tampão krebs-henseleit (NaCl 111 mM, KCl 4,7 mM, $CaCl_2$ 1,25 mM, $MgSO_4$ 2 mM, Na_2HPO_4 1,2 mM, pH 7,2; KHB) e o consumo de oxigênio dos parasitos foi avaliado por respirometria de alta resolução (Oxygraph-2K; OROBOROS Instruments). A temperatura foi mantida a 28 °C e parasitos intactos (5×10^7 parasitos/câmara) foram adicionados em 2 mL de KHB. A concentração e o fluxo de oxigênio foram mensurados usando o software DatLab. Foram realizados dois protocolos:

(1) Após a estabilização do consumo basal de oxigênio, o desacoplamento da respiração foi estimulado pela titulação com FCCP (25 a 300 nM) e o consumo de oxigênio foi inibido pela adição de 2 ug/mL de antimicina A (AA) para medir a respiração não-relacionada ao sistema de transporte de elétrons.

(2) Após estabilizar o consumo basal de oxigênio, foi adicionado 5 mM de glicose na câmara do oxígrafo. Após 10 min, a concentração de glicose na câmara foi aumentada para 25 mM. Após estabilização do efeito, o desacoplamento da respiração foi estimulado pela titulação com FCCP (25 a 300 nM) e o consumo de oxigênio foi inibido pela adição de 2 ug/mL de AA para medir a respiração não-relacionada ao sistema de transporte de elétrons.

Os parasitos de cada câmara foram coletados após o experimento e a concentração de proteína total foi determinada pelo método de Lowry, usando albumina bovina como padrão.

Por fim, os dados relacionados ao consumo de oxigênio foram normalizados pelo total de proteína.

2.7 **Metabôlomica**

2.7.1 Coleta do sobrenadante e extração dos metabólitos intracelulares dos parasitos

Formas epimastigotas de *T. cruzi* ($2{,}5x10^6$ parasitos/mL) foram cultivadas com e sem heme 30 μM em garrafa de cultura de células com 25 cm² de área de superfície a 28 ºC por sete dias. Após sete dias, $5x10^8$ parasitos foram coletados em tubo falcon de 15 mL, lavados com PBS gelado e submetidos ao processo de extração. O sobrenadante de cada amostra foi coletado e congelado em freezer -20 ºC para análise posterior.

Após a lavagem, o protocolo de extração consiste na utilização de solventes na proporção de 1:1:1 de metanol:clorofórmio:água ultrapura para extração bifásica de compostos polares e apolares. Os solventes devem ser adicionados nessa ordem e cada adição deve ser seguida de agitação vigorosa por no mínimo 20 s. Após a adição da água (último solvente), o tubo falcon foi deixado na vertical em gelo por 30 min. Depois desse tempo, o homogeneizado foi centrifugado a 5.080 x g por 30 min a 4 ºC. A fase superior (metanol + água), referente aos compostos polares, foi transferida para outro tubo falcon e congelada em freezer -80 ºC até a próxima etapa de secagem das amostras.

Para secagem, o solvente do tubo falcon foi distribuído em microtubos do tipo Eppendorff para evaporação dos solventes em Speed Vac. Depois de secas, as amostras foram congeladas em freezer -80 ºC até o dia da análise das amostras por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

2.7.2 Preparo das amostras de extrato dos parasitos e sobrenadante

As amostras de extrato dos parasitos cultivados com e sem heme 30 μM por sete dias foram ressuspensas em 620 uL de solução composta por tampão fosfato de sódio 50 mM (pH

7,4), 10% de óxido de deutério (D_2O) e 1 mM de 4,4-dimetil-4-silapentano-1-ácido sulfônico (DSS). Essas foram centrifugadas a 10.000 x g durante 3 min. Feito isso, 600 μL de amostra foram transferidos para um tubo para RMN (Wilmad) de 5 mm de diâmetro para as análises no espectrômetro.

As amostras de sobrenadante dos parasitos cultivados por 24 h e por sete dias foram descongeladas e homogeneizadas em vórtex. Em seguida 558 μL da amostra de sobrenadante foram transferidos para outro microtubo e foram adicionados 62 μL de D_2O, totalizando 10% do volume final. Após homogeneização, 600 μL foram transferidos para tubo para RMN (Wilmad) de 5 mm de diâmetro para as análises.

2.7.3 Análises metabolômicas por RMN

As análises por RMN foram realizadas no Centro Nacional de Ressonância Magnética Nuclear Jiri Jonas (CCS/UFRJ). Os espectros foram obtidos pelo espectrômetro Bruker Ascend 500, operando a 500.13 MHz para 1H na temperatura de 298 K. Para o assinalamento dos metabólitos foram adquiridos espectros bidimensionais $^{1}H^{13}C$ HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) das amostras de meio de cultura e $^{1}H^{1}H$ TOCSY (Total Correlation Spectroscopy) das amostras de extrato intracelular. Espectros unidimensionais ^{1}H-zgesgp das amostras de extrato de parasitos cultivados com e sem heme 30 μM foram adquiridos, processados e normalizados pelo DSS (padrão interno) no software TOPSPIN 4.0.7. (Bruker Biospin).

As amostras de meio de cultivo dos parasitos são constituídas principalmente por proteínas e lipídios. Por isso, foi utilizado o filtro CPMG na aquisição dos espectros ^{1}H-zgesgp a fim de suprimir os sinais destas macromoléculas e, com isso, intensificar os sinais dos compostos de baixo peso molecular. Esses espectros também foram processados e alinhados no TOPSPIN 4.0.7.

Através da versão demo do AMIX viewer 4.0 foi possível adquirir os valores de intensidade dos picos do espectro. As intensidades dos picos foram normalizadas pelo somatório (total) dos picos do espectro seguido pela normalização pelo *pareto scalling* (Teng, 2013).

A identificação dos metabólitos nos espectros unidimensionais foi realizada com o auxílio do banco de dados Human Metabolome Data Base, Biological Magnetic Resonance Data Bank e da versão gratuita do programa Chenomx NMR Suite 8.2® (Chenomx Inc.).

2.8 **Análises estatísticas**

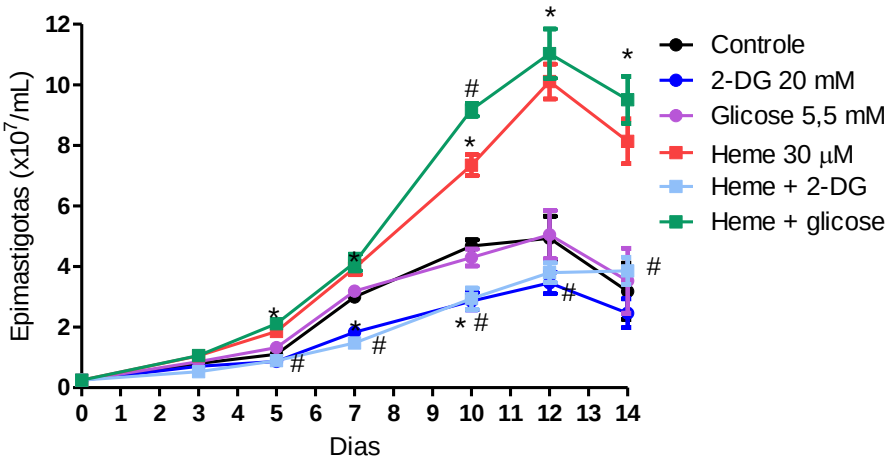
As análises estatísticas foram realizadas através do programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Os resultados foram expressos em média ± erro padrão (SEM) de três ou mais experimentos independentes. O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi aplicado para os experimentos antes da análise com exceção dos resultados obtidos pela metabolômica. Após essa análise foram aplicados os testes t-Student e One-way ANOVA e, posteriormente, foram aplicados os pós-testes Tukey ou Dunnet para verificar se havia diferença entre os tratamentos com significância *$p < 0,05$. Os dados obtidos pela metabolômica foram analisados pelo Múltiplo teste t com abordagem *false discovery rate* (FDR) (Q=5%) calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

3 RESULTADOS

3.1. O acréscimo de glicose no meio de cultura e a inibição da glicólise alteram a proliferação dos parasitos cultivados com heme

Em resposta ao heme, foi demonstrado que as formas epimastigotas de *T. cruzi* induzem o aumento na expressão de genes envolvidos na glicólise, na gliconeogênese e no metabolismo energético anaeróbico, sendo em sua maioria genes de enzimas glicossomais. Por outro lado, a maioria dos genes relacionados ao metabolismo energético mitocondrial não demonstrou nenhuma alteração significativa na expressão. Da perspectiva transcricional, portanto, se postulou que os parasitos desafiados ao heme possuem um metabolismo energético baseado essencialmente na glicólise e na fermentação aeróbica (Paes *et al.*, 2020). Nesse sentido, buscamos comprovar, do ponto de vista metabólico, que essas vias metabólicas são de fato fundamentais para a proliferação do parasito quando cultivado com heme. A proliferação das formas epimastigotas foram quantificadas ao longo dos dias na presença de heme, na condição de mais glicose adicionada ao meio e na presença do inibidor da primeira enzima da via glicolítica, 2-desoxiglicose (2-DG) (Figura 8).

Figura 8 - A proliferação dos parasitos cultivados com heme é alterada na presença de glicose exógena e do inibidor da glicólise



Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) foram mantidas em cultura com diferentes tratamentos (heme 30 µM, 2-DG 20 mM e D-glicose 5,5 mM) por 14 dias. As contagens foram feitas no 3º, 5º, 7º, 10º, 12º e 14º dia de cultura em câmara de Neubauer. O gráfico apresenta média ± erro padrão de três experimentos independentes realizados em duplicata. *p<0,05 em relação ao controle; # p<0,05 em relação ao heme; analisados pelo teste de One-way ANOVA e pelo teste de Tukey.

Fonte: A autora, 2020.

Os resultados demonstraram que o heme induziu a proliferação dos parasitos, como já mostrado pela literatura. Entretanto, quando os parasitas foram cultivados com heme em conjunto com 2-DG, houve uma redução drástica na proliferação. Essa redução na proliferação induzida pelo heme demonstrou ser em mais de 50% desde o primeiro dia de contagem (no 3º dia), se mantendo ao longo dos dias na curva de proliferação (Tabela 1). Em relação aos parasitos que não foram cultivados com a porfirina, a inibição da glicólise foi capaz de reduzir a proliferação em no máximo 39% no 10º dia de cultivo, sendo esse efeito revertido posteriormente. A adição de glicose não promoveu diferença na proliferação; porém, quando os parasitos foram cultivados também com heme, houve um aumento na proliferação em aproximadamente 25% no 10º dia de cultivo, quando comparado aos parasitos cultivados apenas com heme (Figura 8; Tabela 1). Após o 10º dia de cultivo, a proliferação dos parasitos cultivados com heme na presença ou ausência de glicose exógena se tornou semelhante.

Tabela 1 - Porcentagem de proliferação dos parasitos submetidos à diferentes tratamentos ao longo da curva de crescimento (% em relação aos parasitos controle)

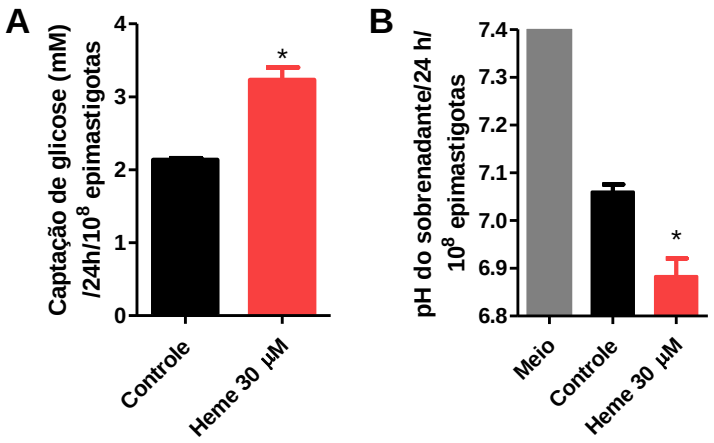
Células\Dias	**3**	**5**	**7**	**10**	**12**	**14**
	Média (%) ± SEM	Média (%) ± SEM	Média (%) ± SEM	Média (%) ± SEM	Média (%) ± SEM	Média (%) ± SEM
Controle	100,00 ± 0,07	100,00 ± 0,06	100,00 ± 0,06	100,00 ± 0,06	100,00 ± 0,19	100,00 ± 0,39
2-DG 20 mM	88,35 ± 0,04	78,96 ± 0,13	**61,16** ± 0,03	**60,98** ± 0,13	70,08 ± 0,13	77,23 ± 0,25
Glicose 5,5 mM	106,85 ± 0,09	120,27 ± 0,06	106,24 ± 0,07	91,85 ± 0,19	102,40 ± 0,21	110,89 ± 0,41
Heme 30 uM	131,48 ± 0,11	**168,84** ± 0,04	**131,65** ± 0,07	**156,92** ± 0,06	**204,80** ± 0,07	**255,50** ± 0,12
Heme + 2-DG 20 mM	**66,23** ± 0,11	**80,94** ± 0,13	**48,08** ± 0,08	**62,80** ± 0,16	**76,90** ± 0,11	**121,20** ± 0,15
Heme + glicose 5,5 mM	132,56 ± 0,07	**192,13** ± 0,07	**137,77** ± 0,08	**195,91** ± 0,03	**223,51** ± 0,10	**298,51** ± 0,08

Legenda: Valores em negrito preto: p<0,05 em relação ao controle no respectivo dia;
Valores em negrito vermelho: p<0,05 em relação ao heme 30 µM;
Fonte: A autora, 2020.

3.2 **A captação de glicose é aumentada em parasitos cultivados com heme**

Pelo transcriptoma das formas epimastigotas de *T. cruzi* foi demonstrado que um transportador de hexose apresentou sua expressão aumentada em resposta ao heme (Paes *et al.*, 2020). Portanto, para estudarmos com mais detalhe o metabolismo de glicose do parasito submetido à porfirina, primeiramente foi quantificada a concentração de glicose no sobrenadante dos parasitos tratados com a porfirina por 24 h e ao longo dos dias em cultura. A partir desse resultado foi possível obter a captação de glicose normalizada pela concentração de células. Além disso, a partir do sobrenadante onde as células foram cultivadas o pH também foi mensurado através de um potenciômetro (Figura 9).

Figura 9 - Parasitos tratados com heme por 24 h captam mais glicose e promovem a diminuição do pH do sobrenadante

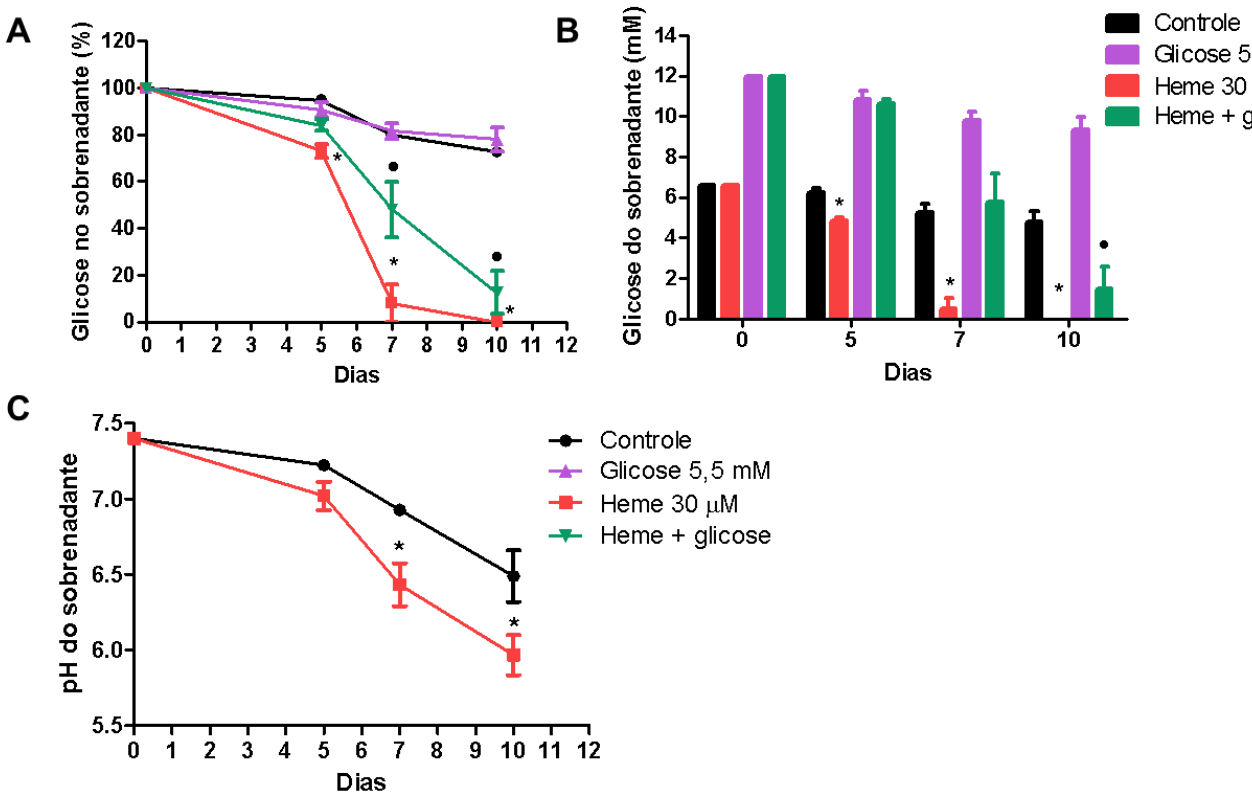


Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, CL Brener, ($2x10^8$ parasitos) foram submetidos ou não ao tratamento com heme 30 µM. Após 24 h, o sobrenadante foi coletado e a (A) concentração de glicose foi quantificada através de kit Glicose Liquiform; (B) pH do sobrenadante foi mensurado através do pHmetro. Para normalização dos dados a contagem dos parasitos foi feita em câmara de Neubauer. Os gráficos apresentam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. *$p<0,05$ em relação ao controle analisado pelo teste t-Student.
Fonte: A autora, 2020.

Nossos resultados demonstraram um aumento de mais de 50% na captação de glicose quando as formas epimastigotas são submetidas ao heme por 24 h em comparação aos parasitos que não foram tratados (p=0,001) (Figura 9A). Além do mais, concomitante a esse grande aumento na captação se observa uma grande redução no pH do sobrenadante dos parasitos tratados: de 7,4 do meio de cultura para 6,88 após 24 h. Já nos parasitos não tratados (controle), foi observada uma redução do pH do sobrenadante de 7,4 para 7,06. Análises estatísticas demonstraram que a redução do pH do sobrenadante promovida pelos parasitos tratados com heme foi maior do que pelos parasitos não tratados (p=0,006) (Figura 9B).

Como mencionado anteriormente, também foi avaliada a concentração de glicose e o pH do sobrenadante (este último sendo apenas os parasitos cultivados ou não com heme) dos parasitos cultivados com heme e também com mais glicose adicionada ao meio ao longo dos dias da curva de proliferação (Figura 8). A concentração de glicose e o pH do sobrenadante foram avaliados no 5º, no 7º e no 10º dia de tratamento, quando as maiores diferenças nas curvas de proliferação foram encontradas.

Figura 10 - Concentração de glicose e o pH no sobrenadante são menores onde os parasitos foram cultivados com heme e glicose ao longo dos dias



Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) foram mantidas em cultura com heme 30 µM e D-glicose 5,5 mM por 10 dias. (A e B) O sobrenadante foi coletado nos respectivos dias e a concentração de glicose foi quantificada usando kit glicose liquiform. Os dados foram apresentados em (A) porcentagem e em (B) molaridade de glicose presente no sobrenadante. (C) Os parasitos foram cultivados com e sem heme 30 µM por 10 dias e o sobrenadante foi coletado para avaliação do pH em potenciômetro. As contagens foram feitas no 5º, 7ºe 10º dia de cultura em câmara de Neubauer. Os gráficos apresentam média ± erro padrão de três experimentos independentes em duplicata. *p<0,05 em relação ao controle; •p<0,05 em relação à glicose; analisados pelo teste t-Student.

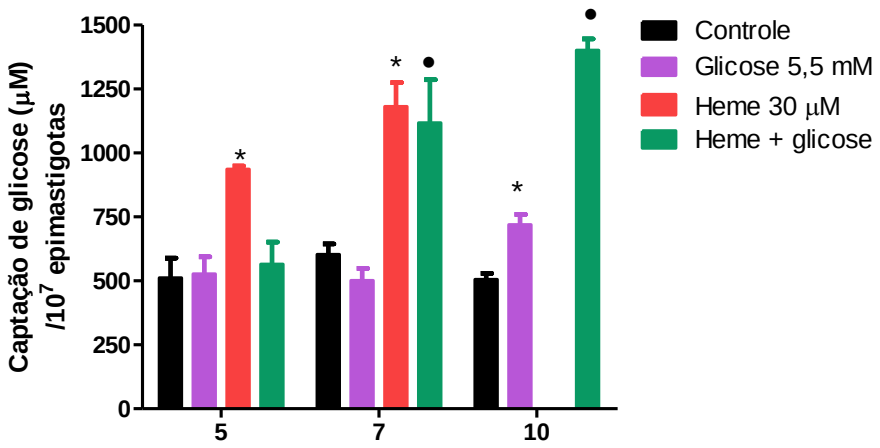
Fonte: A autora, 2020.

O resultado apresentado na Figura 10A demonstra que os parasitos cultivados sem a porfirina não alteraram o perfil de consumo de glicose ao longo dos dias em cultura. Até o 10º dia, os parasitos cultivados sem heme consumiram aproximadamente 27% da glicose total do meio (1,78 mM de glicose); enquanto os parasitos cultivados em meio com mais glicose consumiram aproximadamente 22% no total (2,64 mM de glicose) (Figura 10A e B). Por outro lado, os parasitos cultivados com heme mantidas nessas condições consomem grandes quantidades de glicose do sobrenadante independente da adição de mais glicose nesse meio de cultura (Figura 10A e B). Os parasitos cultivados apenas com heme já no 5º dia em cultura captaram aproximadamente 27% da glicose do sobrenadante. No 7º dia de cultura 92% da glicose foi consumida, o que sugere que 100% da glicose do sobrenadante foi consumida antes do 10º dia de cultivo (Figura 10A e B). Todavia, os parasitos cultivados com heme e

mais 5,5 mM de glicose no 5º dia consumiram 16%, aumentando para 52% no 7º dia e 88% no 10º dia de cultivo. Diante disso, esse resultado demonstra que 12% de glicose (1,44 mM de glicose) ainda restou no sobrenadante para os próximos dias nessas células (Figura 10B). Além do mais, o pH do sobrenadante dos parasitos demonstrou também diminuir no sobrenadante dos parasitos cultivados com heme em comparação aos não tratados ao longo dos dias (Figura 10C). Este efeito, combinado com o maior consumo de glicose gradual, apontam para um aumento no metabolismo fermentativo dos parasitos cultivados com heme ao longo dos dias (Figura 10), o que já havia sido descrito pelo conjunto de genes aumentados detalhados em Paes *et al.*, 2020.

Além disso, este aumento no consumo de glicose pelos parasitos cultivados com heme ao longo dos dias em cultura e a maior redução no pH do sobrenadante também já era esperado, dado que o heme induz a proliferação desses parasitos (Lara *et al.*, 2007). Portanto, a partir desses dados foram calculados a captação de glicose e este foi normalizado pelo número de parasitos contados nos respectivos dias (Figura 11).

Figura 11 - Captação de glicose é aumentada nos parasitos cultivados com heme ao longo dos dias



Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) foram mantidas em cultura com heme 30 µM e D-glicose 5,5 mM por 10 dias. O sobrenadante foi coletado nos respectivos dias para quantificação da concentração de glicose usando kit glicose liquiform. A contagem das células foram feitas no 5º, 7º e 10º dia de cultura em câmara de Neubauer. Os gráficos apresentam média ± erro padrão de três experimentos independentes em duplicata. *p<0,05 em relação ao controle; •p<0,05 em relação à glicose; analisados pelo One-way ANOVA e pelo teste de Tukey.
Fonte: A autora, 2020.

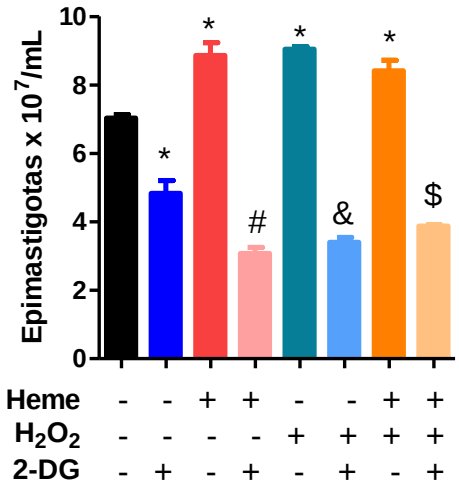
Nossos resultados evidenciaram que o heme induziu um aumento na captação da glicose mesmo após 10 dias em cultura. No 5º dia de cultivo, os parasitos cultivados com

heme captaram 70% mais glicose que os parasitos não tratados. Nota-se que essa captação foi aumentando gradualmente até o 7º dia, quando o parasito captou 95% a mais de glicose em comparação ao controle (Figura 11). Já no 10º dia, a captação de glicose não foi calculada visto que acabou a glicose do sobrenadante dos parasitos cultivados com heme como mostrado na Figura 10A e B. Em relação aos parasitos cultivados com heme e glicose adicionada ao meio, não foi observada a alteração na captação no 5º dia quando comparados aos parasitos cultivados apenas com glicose. No entanto, a partir do 7º dia de cultivo houve um aumento de 123% na captação em relação aos parasitos cultivados apenas com glicose, mantendo esse aumento na captação também no 10º dia (94%) (Figura 11). Vale ressaltar que os parasitos cultivados com heme e glicose juntos não tiveram o mesmo aumento na captação observada nos parasitos cultivados apenas com heme no 5º dia. Portanto, esses resultados sugerem que o heme possivelmente promove uma adaptação nas formas epimastigotas para um aumento no metabolismo de glicose ao longo dos dias em cultura.

3.3 A inibição da glicólise interfere na proliferação mediada pelo peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Estudos anteriores demonstraram que o heme induz a formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) nos parasitos e que, através destas espécies, ocorre a estimulação da proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* (Nogueira *et al*, 2011). Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma espécie reativa de oxigênio formada nos parasitos quando tratados com heme e já demonstrou ser uma molécula importante na sinalização do heme para proliferação. Baseado no conjunto de resultados da literatura (Nogueira *et al.*, 2011; Paes *et al.*, 2020) e nos resultados obtidos até aqui neste trabalho que sugerem que o heme induz um aumento da captação e do metabolismo de glicose nas formas epimastigotas, e que apenas na presença de heme a glicose determina aumento da proliferação das células, testamos a hipótese de que a via glicolítica está envolvida no aumento da proliferação de formas epimastigotas de *T. cruzi* após sinalização disparada por heme e mediada por H_2O_2. Para testar essa hipótese, foi realizado um ensaio de proliferação com os parasitos cultivados na presença de 2-DG e H_2O_2 (Figura 12).

Figura 12 - Proliferação induzida pelo H_2O_2 diminui na presença do inibidor da glicólise



Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) foram mantidas em cultura com heme 30 µM, H_2O_2 30 µM e 2-DG 20 mM por sete dias. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer. O gráfico é representativo de três experimentos independentes em duplicata. *p<0,05 em relação ao controle; # p<0,05 em relação ao heme; & p<0,05 em relação ao H_2O_2; $ em relação ao heme + H_2O_2 analisados pelo teste de One-way ANOVA e pelo teste de Tukey.
Fonte: A autora, 2020.

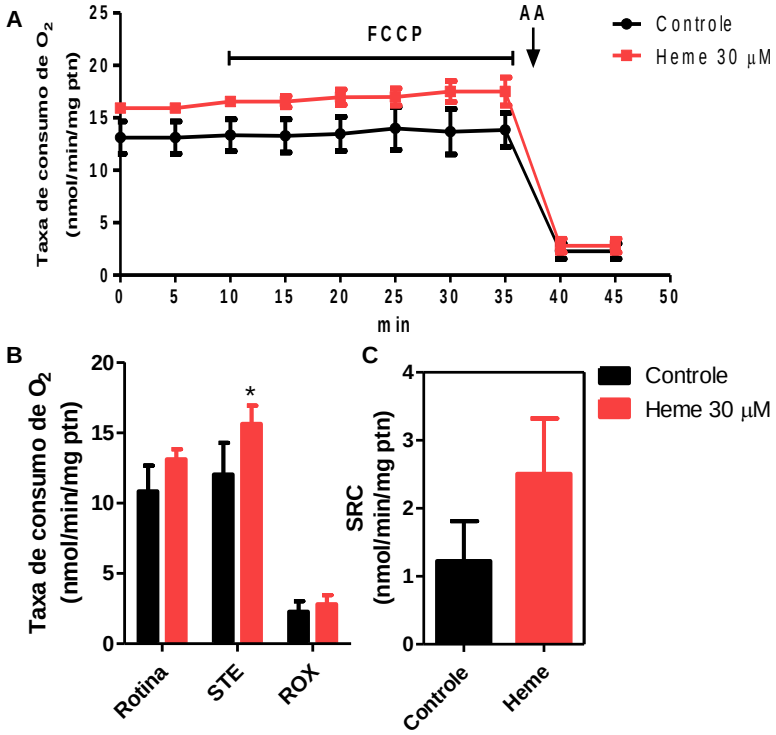
Através dos resultados apresentados na Figura 12, foi demonstrado que o H_2O_2 foi capaz de aumentar a proliferação dos parasitos em 28%. Ao serem cultivadas com H_2O_2 e heme, essas moléculas também promoveram o aumento da proliferação em relação aos parasitos não tratados, porém a proliferação foi semelhante aos parasitos cultivados com essas moléculas separadamente, o que indica ser um evento finamente controlado, embora envolva espécies reativas de oxigênio. No entanto, em todos os tratamentos com H_2O_2 e heme, a inibição da primeira enzima da glicólise prejudicou a proliferação desses parasitos em mais de 60%, enquanto que nos parasitos não tratados a inibição dessa via reduziu a proliferação em 30%, semelhante ao mostrado anteriormente (Tabela 1; Figura 12). Portanto, esses resultados indicam que, na presença do H_2O_2, a inibição da primeira etapa da via glicolítica é capaz de comprometer a proliferação das formas epimastigotas.

3.4 A fisiologia mitocondrial dos parasitos cultivados com heme é alterada na presença de glicose

Os dados dos níveis de expressão gênica demonstram que o heme não promoveu alteração na expressão dos genes relacionados ao metabolismo energético mitocondrial. Vale recordar que esse efeito não foi o mesmo quando avaliamos a expressão dos genes da via glicolítica e da fermentação aeróbica, sendo cada gene aumentado de 1,30 a 3,10 vezes os seus transcritos (Paes *et al.*, 2020). Esses dados estão de acordo com resultados bioquímicos que demonstraram que essa porfirina compromete o STE dos parasitos em tempos curtos de incubação (Nogueira *et al.*, 2017). Por isso, a fim de confirmamos se a mitocôndria de fato não contribui para a bioenergética desses parasitos, a fisiologia mitocondrial das formas epimastigotas de *T. cruzi* cultivados ou não com heme por sete dias foi avaliada através de Respirometria de Alta Resolução.

Para explorar o perfil respiratório em diferentes condições, primeiramente, analisamos a taxa de consumo de oxigênio após a adição de moduladores mitocondriais. Avaliamos como os parasitos depletados de heme por sete dias e os mantidos com heme nesse mesmo tempo respondiam aos moduladores mitocondriais do sistema de transporte de elétrons (STE) na ausência de substrato orgânico exógeno. Para isso, os parasitos intactos foram incubados em tampão Krebs-Henseilet e o consumo de oxigênio foi quantificado antes e após adição dos moduladores (Figura 13).

Figura 13 - A fisiologia mitocondrial foi alterada quando os parasitos foram cultivados com heme por sete dias



Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) foram mantidas em cultura na presença ou ausência de heme 30 µM por sete dias. Posteriormente, os parasitos foram lavados duas vezes com KHB e $5x10^7$ parasitos foram adicionados em cada câmara do oxígrafo Oxygraph-2K. (A) Após estabilização do consumo de oxigênio, esses foram submetidos a concentrações crescentes de FCCP (de 25-300 nM) e, ao final, foram adicionados 2 µg/mL de AA. (B) As taxas respiratórias foram calculadas gerando os seguintes resultados: rotina, capacidade máxima do consumo de oxigênio relacionado ao STE, respiração não-relacionada ao STE (ROX) e a (C) capacidade de reserva respiratória. Os gráficos apresentam média ± erro padrão de seis experimentos independentes em duplicata corrigidos pela dosagem de proteína das amostras. *p<0,05 em relação aos valores obtidos no controle; # p<0,05 em relação aos valores obtidos no heme; analisados pelo teste t de Student.

Fonte: A autora, 2020.

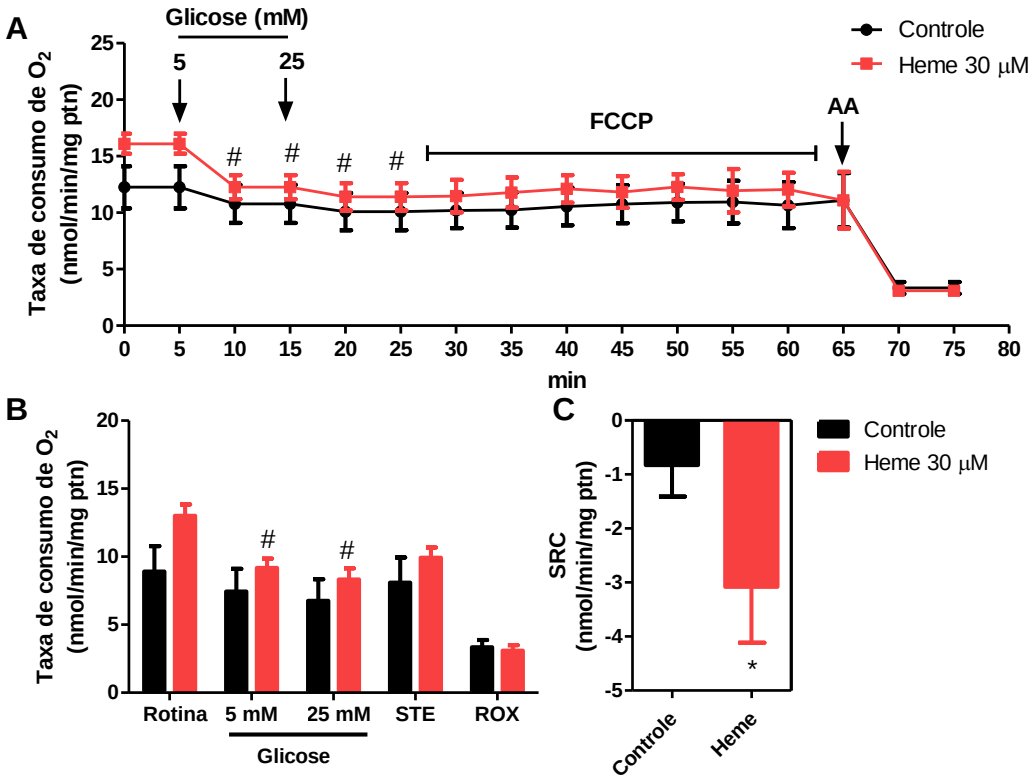
Nossos resultados demonstraram que na ausência de substratos exógenos, os parasitos cultivados na ausência e na presença de heme por sete dias obtiveram consumo de oxigênio basal de 13,11 nmol e 15,96 nmol, respectivamente (Figura 13A). O consumo basal de oxigênio corresponde à taxa de consumo anterior a qualquer adição de modulador mitocondrial ou substrato exógeno. Esse resultado demonstra que os parasitos cultivados com a porfirina apresentam um consumo deoxigênio semelhante aos parasitos não tratados (p=0,070). O mesmo efeito foi observado sobre o consumo de oxigênio mitocondrial, demonstrado na rotina (Figura 13B), na qual os parasitos tratados ou não com heme obtiveram os valores de 10,83 nmol e 13,11 nmol, respectivamente. Posteriormente, foram feitas adições crescentes da molécula desacopladora FCCP. Essa molécula interrompe o gradiente de prótons, forçando os complexos mitocondriais a trabalhar em uma capacidade

máxima de transporte de elétrons. Obtivemos então os valores de capacidade máxima de consumo de oxigênio onde os parasitos cultivados com heme apresentaram maior capacidade de consumo (15,62 nmol) se comparados aos parasitos depletados dessa porfirina (12,05 nmol) (p=0,030) (Figura 13B). Por fim, foi adicionado antimicina A (AA), um inibidor do complexo III que compromete o transporte de elétrons através da cadeia respiratória, revelando o consumo residual de oxigênio (ROX, do inglês *residual oxygen consumption*). Esse valor representa todo o consumo de oxigênio que não corresponde ao STE. O ROX de ambos parasitos não demonstrou diferença estatística, sendo encontrados os valores de 2,28 nmol nos parasitos cultivados sem heme; e 2,80 nmol com heme (Figura 13B). A capacidade de reserva respiratória (SRC, do inglês *spare respiratory capacity*) é usada para descrever a quantidade extra de ATP que pode ser produzido pela fosforilação oxidativa no caso de um aumento repentino na demanda de energia. Esse dado foi calculado a partir da diferença entre a capacidade máxima de consumo de oxigênio e o consumo de oxigênio mitocondrial (rotina). Embora o resultado demonstre que a capacidade de reserva respiratória se apresenta maior nos parasitos cultivados com heme (2,50 nmol) em relação aos parasitos não tratados (1,22 nmol), o resultado não foi estatisticamente significante (p=0,115) (Figura 13C).

Portanto, os resultados da Figura 13 indicam que, embora o consumo de oxigênio basal, mitocondrial (rotina) e residual (ROX) serem semelhantes entre os parasitos submetidos ou não ao heme por sete dias, esses que foram cultivados com a porfirina possuem capacidade máxima de transporte de elétrons pelo STE utilizando seus substratos endógenos.

A taxa de consumo de oxigênio dos parasitos cultivados na presença e ausência de heme por sete dias foi avaliada mediante adição de glicose como substrato exógeno e única fonte de carbono. Posterior à adição da glicose, os parasitos intactos foram desafiados com moduladores mitocondriais (Figura 14).

Figura 14 - Adição de glicose promoveu mudanças na fisiologia mitocondrial de parasitos cultivados com heme por sete dias



Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CL Brener) foram mantidas em cultura na presença e ausência de heme 30 µM por sete dias. Posteriormente, os parasitos foram lavados 2 vezes com KHB e $5x10^7$ parasitos foram adicionados em cada câmara do oxígrafo Oxygraph-2K. (A) Estabilizado o consumo basal de oxigênio, 5 mM e 25 mM de glicose foi adicionado na câmara. Depois do efeito, o desacoplamento da respiração foi estimulado pela titulação comFCCP (25-300 nM) e, por fim, foi adicionado 2 ug/mL de AA. #p<0,05 em relação ao basal do heme analisado por One-Way ANOVA e teste Dunnet. (B) As taxas respiratórias foram calculadas gerando os seguintes resultados: rotina, rotina após adição da glicose (5 e 25 mM), capacidade máxima do consumo de oxigênio relacionado ao STE, respiração residual (ROX) e a (C) capacidade de reserva respiratória. Os gráficos apresentam média ± erro padrão de seis experimentos independentes em duplicata corrigidos pela dosagem de proteína das amostras. *p<0,05 em relação ao controle; # p<0,05 em relação ao heme; analisados pelo teste t de Student.

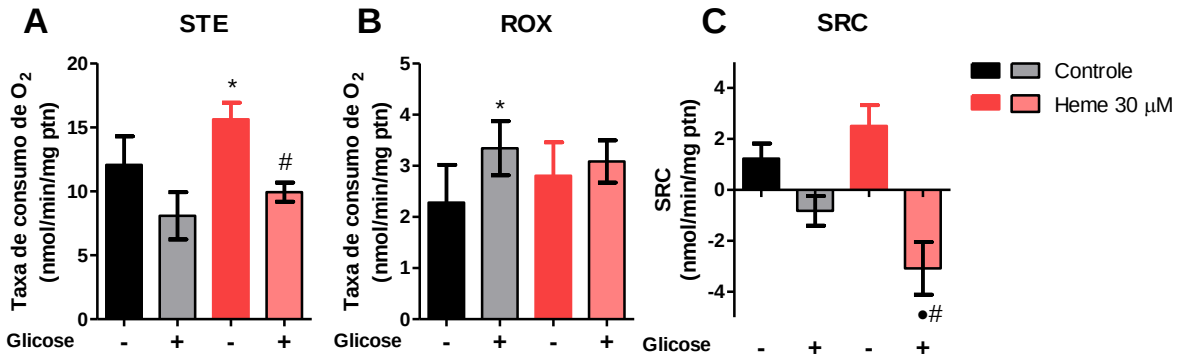
Fonte: A autora, 2020.

O consumo de oxigênio basal dos parasitos cultivados com e sem heme por sete dias foram semelhantes aos encontrados no experimento anterior (Figura 12 e 13). Contudo, ao serem adicionados 5 mM e 25 mM de glicose exógenos, foi constatada uma significante redução no consumo de oxigênio mitocondrial apenas nos parasitos que foram cultivados com heme (Figura 14A e B), sendo 13,01 nmol na rotina reduzindo para 9,17 nmol após adição de 5 mM de glicose seguido de 8,31 nmol após 25 mM de glicose. Essa redução correspondeu a 29% e 36% de inibição do consumo mitocondrial desses parasitos (p=0,001), efeito que não foi observado nos parasitos cultivados sem heme (p=0,666). Esse resultado gerou uma certa

surpresa, uma vez que essa repressão da respiração mitocondrial desencadeada pela glicose, sob condições aeróbicas, é conhecida como efeito Crabtree. O fenótipo imediato visualizado através da redução do consumo de oxigênio mitocondrial é resultante da transição metabólica de um metabolismo mitocondrial para um metabolismo energético baseado na fermentação (Crabtree, 1929), portanto, reforçando a nossa hipótese. Além disso, a capacidade máxima de consumo de oxigênio entre os parasitos, tratados ou não com heme, foi semelhante após a adição de glicose (Figura 14B). Entretanto, apresentou uma diferença estatística em relação à capacidade de reserva respiratória dos parasitos cultivados com heme, sendo mais de três vezes menor em comparação aos parasitos não tratados (p=0,043) (Figura 14C).

Reunindo os resultados obtidos antes e depois da adição da glicose na avaliação da fisiologia mitocondrial dos parasitos foi demonstrado que nos parasitos cultivados com heme a adição de glicose exógena foi capaz de reduzir a capacidade máxima de transferência de elétrons, de 15,62 para 9,93 nmol, levando ao STE funcionar com 63,5% da sua capacidade total (p=0,038) (Figura 15A). Esse efeito coincide com a grande diminuição da capacidade de reserva respiratória, que estava a 2,50 nmol antes da adição de glicose e diminuiu para -3,08 nmol após a adição de glicose (p=0,026) (Figura 15C). Além disso, não foi observada alteração no consumo de oxigênio extra STE após adição de glicose (Figura 15B). Em contrapartida, os parasitos cultivados sem a porfirina não apresentaram alteração nem na capacidade máxima do STE (p=0,100) nem na SRC (p=0,069) (Figura 15A e C), de 12,06 para 8,08 nmol no STE e de 1,22 para -0,82 nmol no SRC. No entanto, esses parasitos apresentaram um aumento no ROX após a glicose exógena (p=0,005) (Figura 15B).

Figura 15 - Fisiologia mitocondrial antes e após adição da glicose nos parasitos cultivados ou não com heme por sete dias



Legenda: Os resultados obtidos e mostrados nas Figuras 13 e 14 foram reunidos e analisados em conjunto antes e após a adição de glicose. (A) Capacidade máxima de transporte de elétrons (STE), (B) residual ou não-relacionado ao sistema de transporte de elétrons (ROX) e (C) capacidade de reserva respiratória (SRC) antes e depois da adição da glicose (25 mM) nos parasitos cultivados ou não com heme por sete dias. Os gráficos apresentam média ± erro padrão de seis experimentos independentes em duplicata. *p<0,05 em relação ao controle (- glicose); •p<0,05 em relação ao controle (+ glicose); #p<0,05 em relação ao heme (- glicose); analisados por teste t de Student.

Fonte: A autora, 2020.

Em conjunto, esses dados sugerem que nos parasitos submetidos ao heme por sete dias reduzem a respiração mitocondrial (efeito Crabtree) sem modificar o consumo de oxigênio residual (ROX) na presença de glicose. Enfatizamos que esses eventos não foram observados nos parasitos cultivados sem a porfirina (Figura 15). Em razão disso, sugerimos que o heme induz uma adaptação das formas epimastigotas de *T. cruzi* a um metabolismo glicossomal, baseado na via glicolítica e na fermentação como rotas principais para produção de ATP, sustentados pelo consumo aumentado de glicose por esses parasitos (Figura 9 e 11).

3.5 **Análises metabolômicas apontam que o heme estimula a glicólise e fermentação aeróbica nos parasitos, mas também induz a captação de aminoácidos**

A metabolômica é o estudo dos perfis globais de metabólitos em um sistema biológico (célula, tecido ou organismo) sob um determinado conjunto de condições. Ela é considerada uma ferramenta complementar a outras plataformas ômicas visto que reflete mais diretamente os estados fisiológicos das células (Goodacre, 2005). O metaboloma é resultante da amplificação e integração de sinais dos diferentes níveis de organização celular (genoma funcional, transcriptoma, proteoma), fornecendo informações sobre os processos biológicos

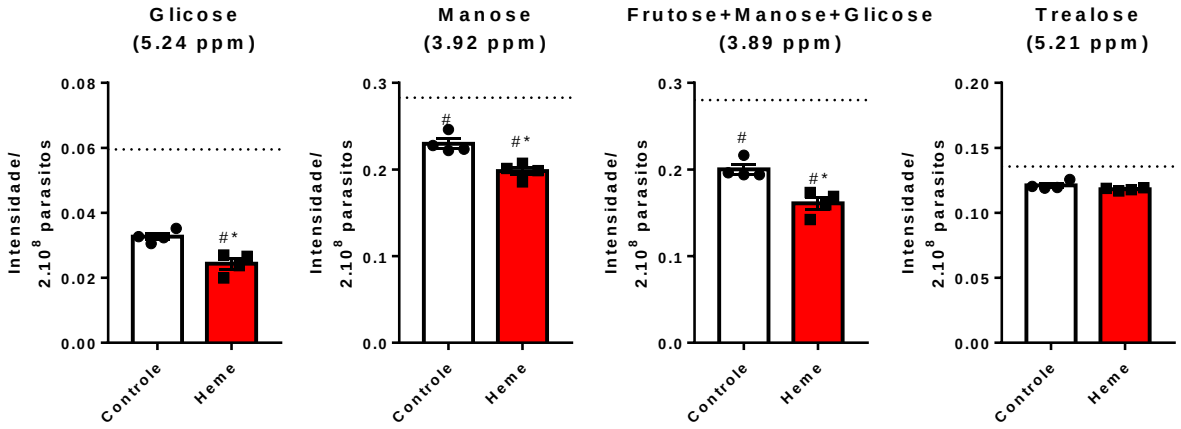
que estão ativos ou não sob determinadas condições. Nesse sentido, investigamos o metaboloma desses parasitos tanto em relação às moléculas presentes em seu meio de cultivo, quanto às moléculas intracelulares através de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

3.5.1 O heme, em 24 h, induziu o aumento da captação de hexoses e de aminoácidos e a secreção de fumarato e alanina na forma epimastigota de *T. cruzi*

A fim de obtermos uma análise mais completa em relação ao metabolismo energético dos parasitos submetidos ao heme, primeiramente investigamos o metaboloma do sobrenadante dos parasitos desafiados com heme após 24 h em cultura.

A princípio, ao avaliarmos os carboidratos presentes no meio de cultura, constatamos que os parasitos frente ao tratamento com heme por 24 h aumentaram a captação de glicose em 1,31 vezes se comparados aos parasitos controle. Além da glicose, também aumentaram a captação de manose (1,59 vezes; p=0,027) e outras hexoses que possuem deslocamento químico similar (3,89 ppm): frutose, glicose e manose em 1,49 vezes (p=0,027) (Figura 16). Entretanto, não foi observada a diminuição da molécula de trealose (um dissacarídeo) no sobrenadante dos parasitos tratados ou não com heme (p=0,23 e p=0,39, respectivamente) (Figura 16).

Figura 16 - Carboidratos identificados no sobrenadante dos parasitos tratados ou não com heme após 24 h



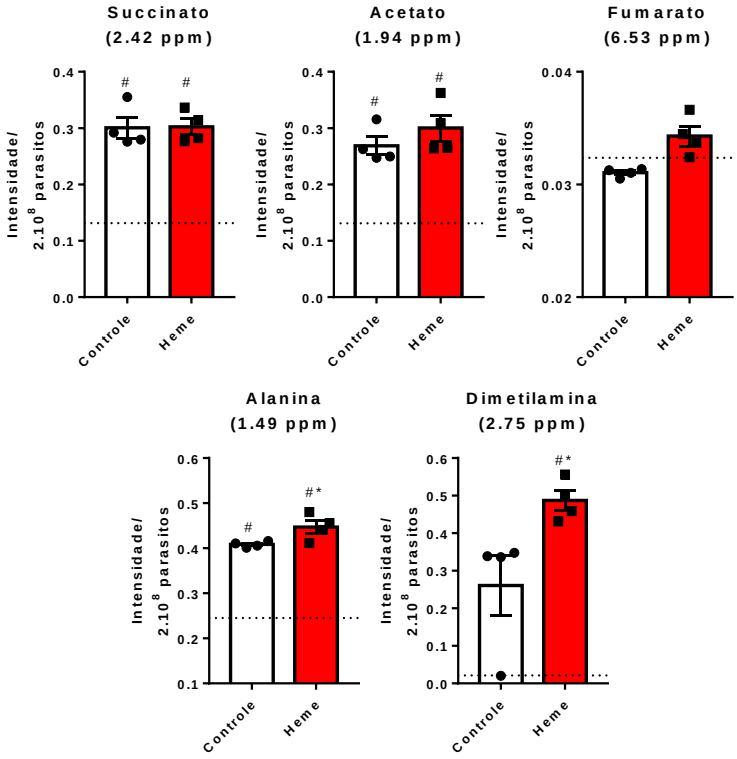
Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* CL Brener ($2x10^8$ parasitos) foram tratados ou não (controle) com heme 30 μM. Após 24 h, o sobrenadante foi coletado e os metabólitos presentes nessas amostras e no meio de cultura sem células foram analisadas por RMN, seguindo o protocolo descrito no Material e Métodos. Os dados brutos obtidos dos espectros foram normalizados pelo número de células. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está indicado nos gráficos. A linha pontilhada nos gráficos se refere à média de intensidade do metabólito presente no meio de cultura sem células. Os resultados apresentam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. #p<0,05 em relação ao meio de cultura sem células; *p<0,05 em relação ao sobrenadante dos parasitos controle; analisados pelo múltiplo teste t com abordagem *FDR* calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

Fonte: A autora, 2020.

Com relação às moléculas que foram excretadas pelos parasitos, foram identificados metabólitos pertencentes a diferentes classes metabólicas (Figura 17). Após 24 h foi observado no meio de cultura dos parasitos o aumento da intensidade dos ácidos orgânicos succinato, acetato e fumarato. Comparando com as intensidades avaliadas no meio de cultura sem células, houve aumento de 2,29 na intensidade do succinato no sobrenadante do controle e do tratamento com heme (p=0,662 em relação ao controle). O aumento de intensidade do acetato foi de 2,05 no controle e 2,29 no tratamento com heme (p=0,248), enquanto a intensidade do fumarato diminui 0,95 no controle e aumentou 1,05 no tratamento com heme (p=0,028). Com exceção do fumarato, não houve diferença estatística com relação ao aumento dos ácidos orgânicos no meio dos parasitos tratados com heme quando comparado ao meio dos parasitos controle. Sobre as outras moléculas, a alanina foi o único aminoácido que se apresentou aumentado no sobrenadante dos parasitos, com um aumento de 1,87 vezes no meio dos parasitos cultivados com heme e 1,66 vezes no meio dos parasitos controle. Portanto, foi secretada em maior quantidade quando os parasitos foram tratados com a porfirina (p=0,047). Curiosamente, a molécula mais excretada pelos epimastigotas foi a

dimetilamina, exibindo um aumento de 12,24 vezes no meio dos parasitos não tratados e 22,82 vezes nos parasitos tratados com heme (p=0,044).

Figura 17 - Metabólitos excretados no sobrenadante dos parasitos tratados ou não com heme após 24 h



Legenda: O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está indicado nos gráficos. A linha pontilhada se refere à média de intensidade do metabólito presente no meio de cultura sem células. Os resultados apresentam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. #p<0,05 em relação ao meio de cultura sem células; *p<0,05 em relação ao sobrenadante dos parasitos controle; analisados pelo múltiplo teste t com abordagem *FDR* calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

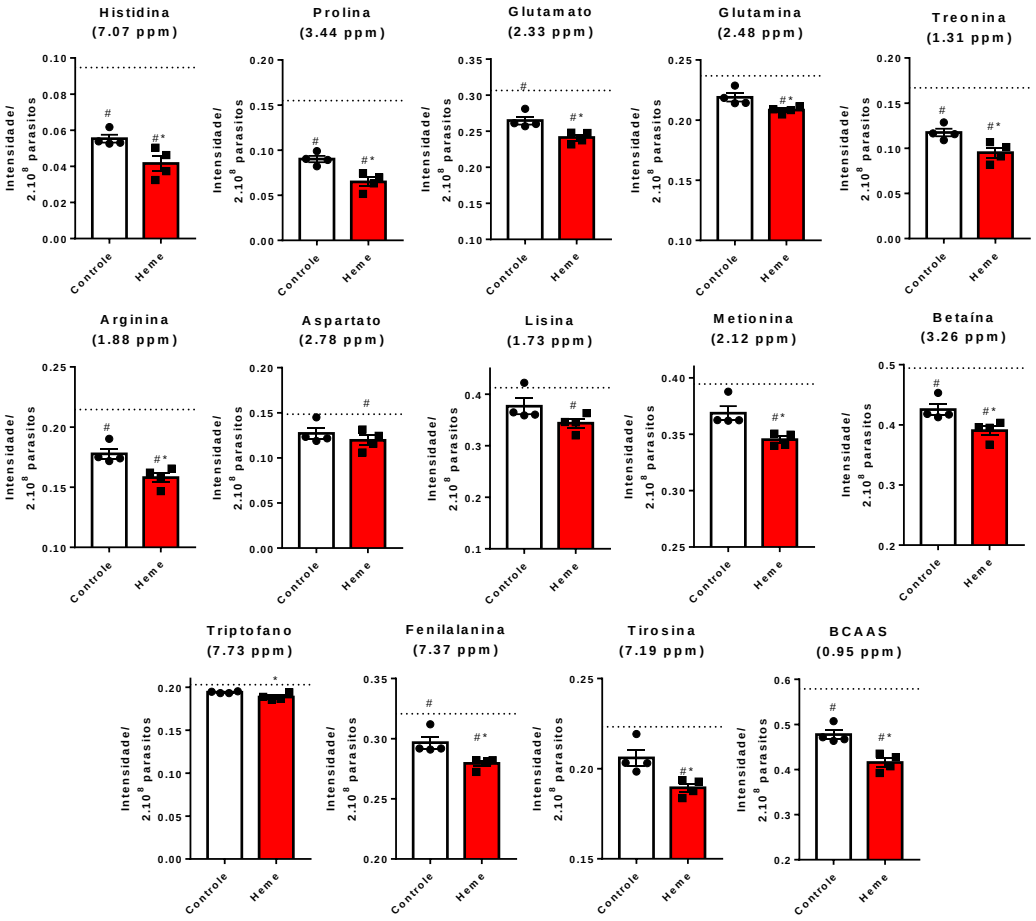
Fonte: A autora, 2020.

Além dos açúcares, também foram investigadas as intensidades dos aminoácidos presentes no sobrenadante desses parasitos após 24 h (Figura 18). Verificamos que, de 14 aminoácidos identificados no meio de cultura, o parasito tratado com heme foi capaz de captar 12 aminoácidos quando comparados ao meio de cultura sem células. Foram eles: prolina (58%), histidina (56%), treonina (42,9%), arginina (42,5%), aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs; 28,1%), glutamato (21,2%), aspartato (19,4%), lisina (16,6%), tirosina (15,1%), fenilalanina (12,8%), metionina (12,5%) e glutamina (12,2%). Curiosamente, não foi observada alteração na intensidade nem de triptofano nem de glicina no sobrenadante dos parasitos tratados com heme (p=0,346 e p=0,583 em relação ao meio sem células), indicando, portanto, que esses parasitos não consumiram e nem excretaram esses 2 aminoácidos em 24 h.

Diferente dos parasitos tratados com heme, os parasitos não tratados não consumiram glutamina, aspartato, lisina, metionina e tirosina do seu meio de cultura em 24 h ($p>0,05$ em relação ao meio de cultura sem células). Considerando os aminoácidos mais consumidos pelos parasitos tratados com heme em relação aos parasitos controle, esse aumento no consumo foi de 1,95 vezes para tirosina, 1,90 vezes para metionina, 1,71 vezes para fenilalanina, 1,60 vezes para BCAAs, 1,58 vezes para glutamina, 1,56 vezes para glutamato, 1,50 vezes para arginina, 1,44 vezes para treonina, 1,39 vezes para prolina e 1,34 vezes para histidina (de todos $p<0,039$). Não houve diferença na captação de lisina e aspartato.

Além das moléculas citadas acima, betaína também foi identificada no meio de cultura onde os parasitos foram mantidos (Figura 18). Essa molécula é um precursor da síntese de metionina nos organismos. Os parasitos controle captaram 13,9% do total de betaína, enquanto os parasitos tratados com heme transportaram 20,9% de betaína em 24 h. Logo, em resposta ao heme, os parasitos consumiram mais betaína do que os parasitos que não foram cultivados com a porfirina ($p=0,039$).

Figura 18 - Aminoácidos e betaína no sobrenadante dos parasitos tratados ou não com heme após 24 h



Legenda: O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está indicado nos gráficos. A linha pontilhada se refere à média de intensidade do metabólito presente no meio de cultura sem células. Os resultados apresentam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes. #p<0,05 em relação ao meio de cultura sem células; *p<0,05 em relação ao sobrenadante dos parasitos controle; analisados pelo múltiplo teste t com abordagem *FDR* calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

Fonte: A autora, 2020.

3.5.2 O metaboloma intracelular e extracelular dos parasitos cultivados com heme apontam um aumento na via glicolítica, na fermentação e na captação de aminoácidos

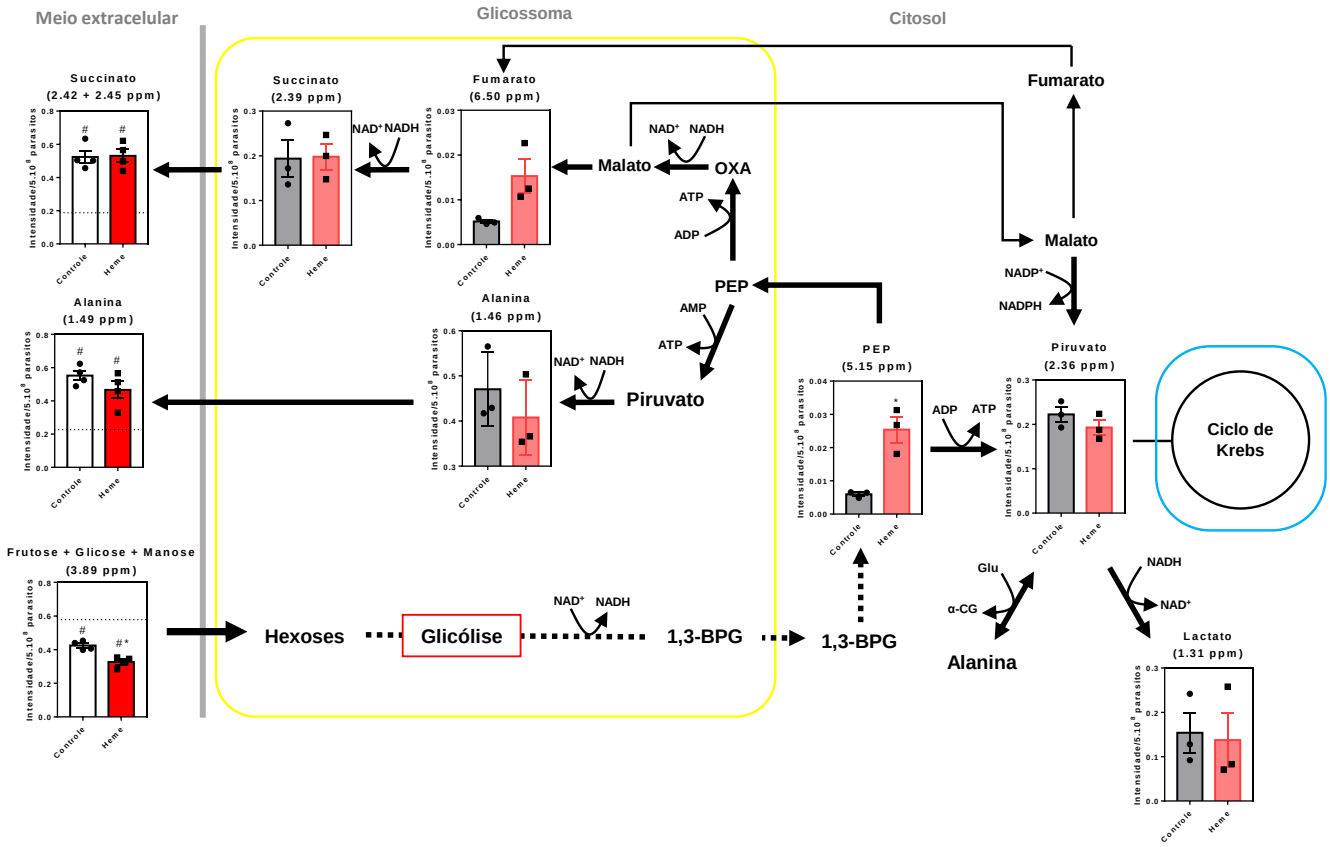
Buscamos avaliar no metaboloma do parasito os efeitos do heme em curto tempo a partir da quantificação relativa dos metabólitos que foram captados e secretados pelos parasitos em seu sobrenadante. Nestes próximos resultados, investigamos, em conjunto, o metaboloma intracelular e extracelular dos parasitos cultivados com heme por sete dias a fim

de avaliarmos o seu metabolismo. Vale ressaltar que os dados do sobrenadante foram normalizados pelo número de células.

Sobre o metabolismo dos carboidratos (Figura 19), podemos ressaltar que o parasito cultivado com heme capta mais hexoses (frutose, glicose e manose) do meio extracelular quando comparados aos parasitos controle. Esta captação mostrou ser cerca de 1,54 vezes maior nos parasitos mantidos com heme (p=0,019). Acerca do metabolismo intracelular, inicialmente, visamos avaliar os metabólitos presentes na via glicolítica. Identificamos duas moléculas que compõem essa via, o fosfoenolpiruvato (PEP) e o piruvato. A intensidade de PEP demonstrou ser 4,26 vezes maior nos parasitos cultivados com heme (p=0,034). De maneira interessante, esse aumento de PEP não se refletiu no aumento de intensidade do piruvato (p=0,370), corroborando nossa hipótese que grande parte do PEP formado está sendo desviado para a fermentação. Sobre essa via, a presença do heme por sete dias não interferiu nos níveis intracelulares de fumarato e succinato, intermediário e o produto final da fermentação succínica, respectivamente; e nem de alanina, assim como, seus níveis no sobrenadante. O succinato se apresentou aumentado no sobrenadante de ambos parasitos, não apresentando diferença estatística nem intracelular (p=0,817) e nem no meio extracelular (p=0,828). Além dessas moléculas, lactato também foi encontrado dentro de ambos parasitos e não apresentou alteração em sua quantidade.

Vale ressaltar que várias moléculas estão presentes simultaneamente em diferentes compartimentos celulares. Visto que mensuramos os níveis totais dos metabólitos no parasito, as mudanças na sua quantidade são resultantes de todas vias metabólicas independente da sua localização celular. Isso pode ser observado no caso do fumarato, um ácido orgânico presente no glicossoma, citosol e na mitocôndria. Além disso, como mostrado na Figura 19, alanina pode ser produzida tanto pela alanina desidrogenase no glicossoma, quanto pela alanina aminotransferase, no citosol, utilizando o mesmo substrato, o piruvato.

Figura 19 - Via glicolítica e a fermentação nos parasitos cultivados com heme por sete dias



Legenda: Formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* foram mantidas em cultura na presença e ausência de heme 30 µM por sete dias. Após esse tempo, $5x10^8$ parasitos foram lavados, submetidos ao protocolo de extração das moléculas polares e analisados por RMN como descrito no Material e Métodos. Além dos parasitos, o sobrenadante também foi coletado para análise através de RMN. As intensidades dos metabólitos presentes no sobrenadante dos parasitos foram normalizados pelo número de células. Gráficos nas cores branco (controle) e vermelho intenso (heme) se referem às intensidades dos metabólitos avaliados no sobrenadante após sete dias. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está indicado nos gráficos. A linha pontilhada nesses gráficos se refere à intensidade média do metabólito presente no meio de cultura sem células. Gráficos nas cores cinza (controle) e rosa (heme) se referem às intensidades dos metabólitos presentes no extrato intracelular. Setas pretas indicam a reação enzimática; Setas pontilhadas em preto indicam várias reações enzimáticas; setas pontilhadas em cinza indicam a possibilidade do metabólito estar presente em mais de um compartimento celular. Setas grossas e finas indicam maior ou menor probabilidade da reação estar acontecendo, respectivamente. Os resultados apresentam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes do sobrenadante e três experimentos independentes do extrato intracelular. #p<0,05 em relação ao meio de cultura sem células; *p<0,05 em relação ao sobrenadante e extrato intracelular dos parasitos controle; analisados pelo múltiplo teste t com abordagem *FDR* calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

Fonte: A autora, 2020.

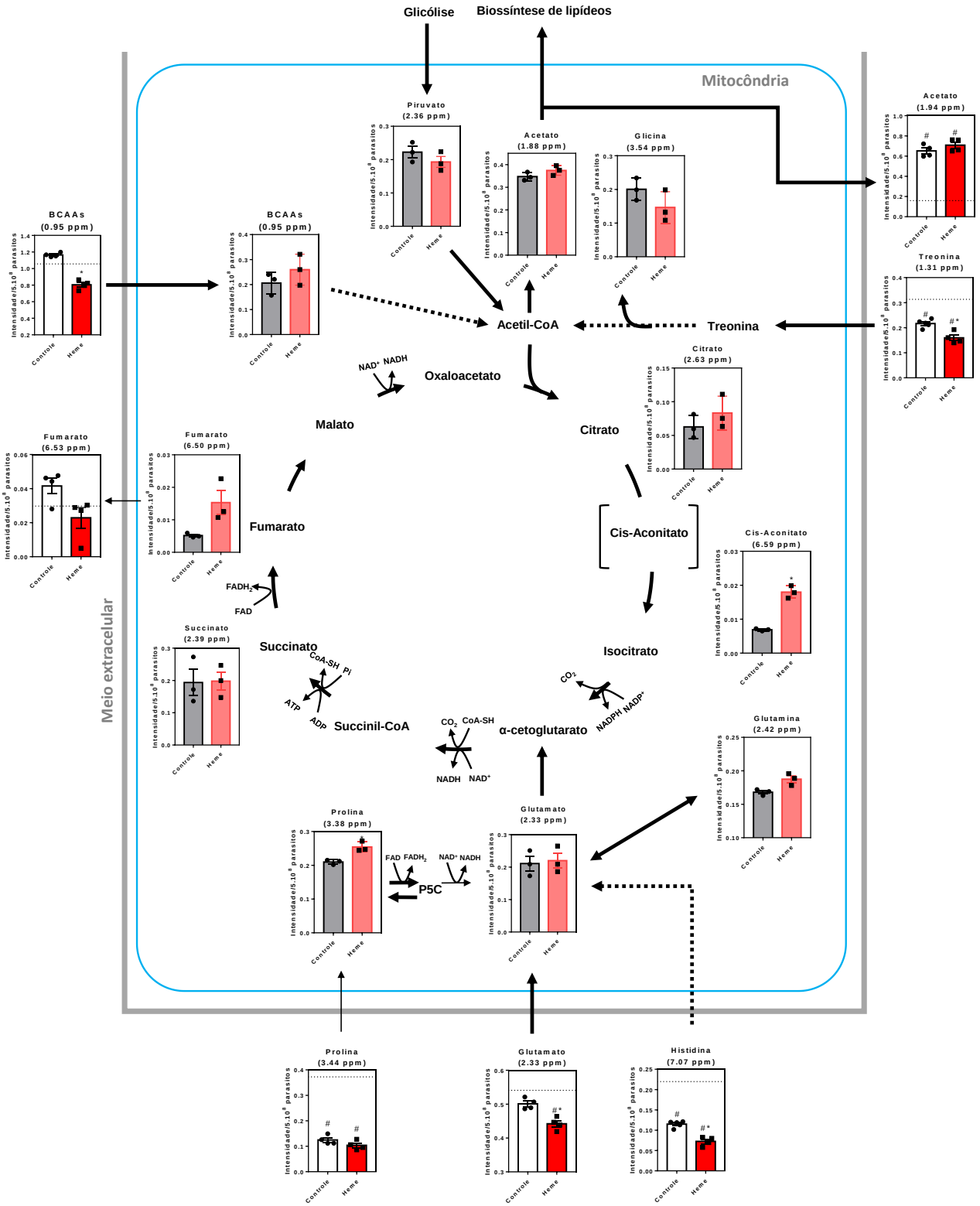
A respeito do metabolismo mitocondrial nos parasitos mantidos com heme por sete dias, foram realizadas as quantificações relativas dos aminoácidos e metabólitos que estão inseridos na produção de ATP nessa organela (Figura 20). Nossos resultados demonstraram que os parasitos cultivados com heme por sete dias consumiram, do total avaliado no meio de cultura sem células, 72,2% de prolina, 67,1% de histidina, 49,1% de treonina, 26,3% de

BCAA e 18,3% de glutamato. Comparados ao controle, os parasitos cultivados com heme apresentaram uma captação aumentada de glutamato em 2,49 vezes, de BCAAs em 2,32 vezes, de treonina em 1,60 vezes e de histidina em 1,45 vezes, no entanto, após sete dias não foi observado diferença na intensidade de prolina no meio de cultura entre os parasitos tratados ou não com heme. Por outro lado, diferente do sobrenadante, os níveis intracelulares de prolina estão aumentados em 1,21 vezes (p=0,038), sugerindo um acúmulo intracelular desse aminoácido nos parasitos mantidos com heme. Apesar dos parasitos submetidos à porfirina captarem mais glutamato, os níveis intracelulares desse aminoácido não apresentaram diferença estatística, o que indica que pode ter sido utilizado em diversas rotas metabólicas.

Existem três vias catabólicas mostradas na Figura 20 que podem resultar na produção de acetil-CoA. Ela pode ser produzida tanto pelo catabolismo de glicose, quanto pelo dos aminoácidos de cadeia ramificada (BCAAs) (especificamente leucina e isoleucina) e treonina. A demonstração de que a captação desses aminoácidos está aumentada, mas não os níveis intracelular (p=0,26) e extracelular (p=0,46) de acetato, sugere que grande parte do acetil-CoA produzido ou foi oxidado pelo CK ou convertido a acetato e já direcionado para síntese de ácidos graxos no citosol. Ainda que os níveis extracelulares de acetato não apresentem diferença estatística entre os parasitos tratados ou não com heme, houve um aumento de 4 vezes de acetato no sobrenadante do controle e 4,44 vezes no sobrenadante do parasito mantido com heme.

Sobre as moléculas que compõe o ciclo de Krebs foram identificadas apenas quatro moléculas, são elas: citrato, cis-aconitato, fumarato e succinato (Figura 20). Embora a abundância de citrato não tenha variado, os níveis de cis-aconitato aumentaram em 2,61 vezes no parasito cultivado com heme (p=0,006). Já em relação ao fumarato, como já citado anteriormente, não foi observada diferença estatística sobre a intensidade dessa molécula no extrato intracelular entre os parasitos (p=0,10). Diferente do evento observado após incubação com heme por 24 h (Figura 17), os níveis desse ácido orgânico no sobrenadante após sete dias com heme não apresentaram uma diferença significativa segundo os testes estatísticos (p=0,144).

Figura 20 - Metabolismo de aminoácidos nos parasitos cultivados com e sem heme por sete dias



Legenda: Gráficos nas cores branco (controle) e vermelho intenso (heme) se referem às intensidades dos metabólitos avaliados no sobrenadante após sete dias. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está indicado nos gráficos. A linha pontilhada nesses gráficos se refere à intensidade média do metabólito presente no meio de cultura sem células. Gráficos nas cores cinza (controle) e rosa (heme) se referem a intensidade do metabólito presente no extrato intracelular. Setas pretas indicam a reação enzimática; Setas pontilhadas em preto indicam várias reações enzimáticas.

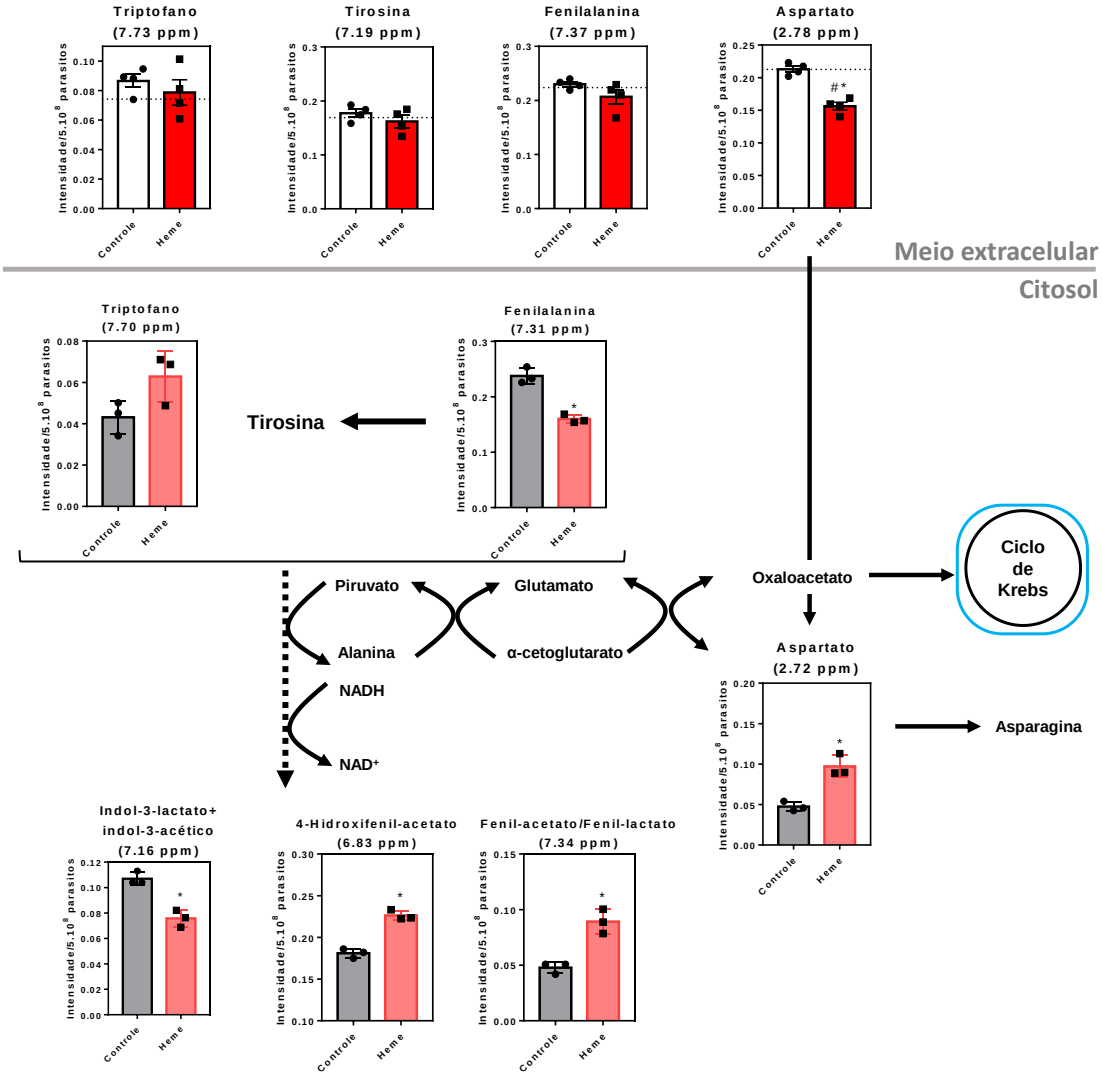
Os resultados apresentam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes do sobrenadante e três experimentos independentes do extrato intracelular. #p<0,05 em relação ao meio de cultura sem células; *p<0,05 em relação ao sobrenadante e extrato intracelular dos parasitos controle; analisados pelo múltiplo teste t com abordagem *FDR* calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

Fonte: A autora, 2020.

Através das análises metabolômicas foram identificadas a presença dos aminoácidos aromáticos no extrato intracelular dos parasitos e no sobrenadante (Figura 21). Apesar de não ter sido observada a captação dos aminoácidos aromáticos após sete dias em cultura, contrariando a literatura e os nossos dados mostrados anteriormente, foram identificados triptofano e fenilalanina no meio intracelular de ambos parasitos. Nossos resultados demonstraram que os níveis intracelulares de triptofano são similares nos parasitos cultivados ou não com heme por sete dias (p=0,15), e fenilalanina apresentou níveis menores nesses parasitos (33% menor; p=0,010). Além disso, nossos experimentos nos permitiram identificar e analisar os produtos do catabolismo desses aminoácidos, incluindo o produto da tirosina, aminoácido que não foi identificado no extrato intracelular dos parasitos. No *T. cruzi*, através da reação catalisada pela tirosina aminotransferase (TAT) ou pela aspartato aminotransferase (ASAT) com subsequente ação da L-α-hidroxiácido aromático desidrogenase (AHADH), os produtos finais da reação de triptofano é indol-3-lactato; de tirosina, hidroxifenil-lactato; e de fenilalanina, fenil-lactato. Devido à transaminação catalisada pela TAT ou ASAT também ocorre geração de glutamato. Sobre a via catabólica de triptofano, apesar de não ser observado alteração nos seus níveis intracelulares, indol-3-lactato apresentou estar 30% menor nos parasitos mantidos com heme (p=0,018). Por outro lado, os produtos finais da via de degradação da tirosina e fenilalanina apresentaram aumento dos seus níveis intracelulares em 25% (p=0,006) e 86% (p=0,022), respectivamente.

Além dos aminoácidos aromáticos identificamos a captação de aspartato pelos parasitos cultivados com heme após sete dias de influência. Enquanto não foi observada alteração na abundância de aspartato no sobrenadante dos parasitos controle, os parasitos cultivados com heme, por sua vez, captaram 27% do aspartato do meio de cultura e os seus níveis intracelulares apresentaram um aumento de 2,04 vezes (p=0,023). Em virtude da captação estar aumentada, bem como os seus níveis intracelulares, aspartato pode servir de precursor para síntese de asparagina e também ser convertido a oxaloacetato pela aspartato aminotransferase para entrar no CK.

Figura 21 - Metabolismo dos aminoácidos aromáticos e de aspartato nos parasitos cultivados com heme por sete dias



Legenda: Gráficos nas cores branco (controle) e vermelho intenso (heme) se referem às intensidades dos metabólitos avaliados no sobrenadante após sete dias. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está indicado nos gráficos. A linha pontilhada nesses gráficos se refere à intensidade média do metabólito presente no meio de cultura sem células. Gráficos nas cores cinza (controle) e rosa (heme) se referem às intensidades dos metabólitos presentes no extrato intracelular. Setas pretas indicam a reação enzimática; Setas pontilhadas em preto indicam várias reações enzimáticas. Os resultados apresentam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes do sobrenadante e três experimentos independentes do extrato intracelular. #p<0,05 em relação ao meio de cultura sem células; *p<0,05 em relação ao sobrenadante e extrato intracelular dos parasitos controle; analisados pelo múltiplo teste t com abordagem FDR calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

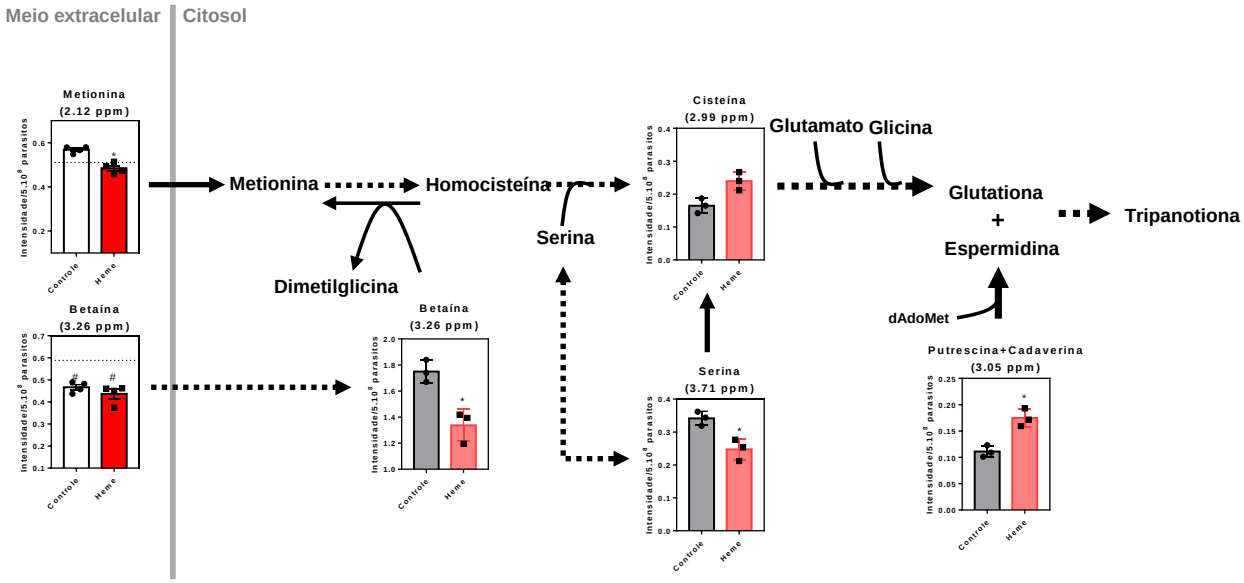
Fonte: A autora, 2020.

Como mencionado na introdução, os aminoácidos não são importantes apenas para o metabolismo energético, mas também em inúmeras outras funções como a síntese de poliaminas e de moléculas antioxidantes (Figura 22) (Marchese *et al.*, 2018). A betaína serve como doador de metila para a enzima betaina:homocisteína metiltransferase (BHMT) que converte homocisteína ao aminoácido metionina. A betaína apresentou uma redução em 24%

dos seus níveis intracelulares nos parasitos cultivados com heme (p=0,036), apesar de ter sido demonstrado que os parasitos nas condições de ausência e presença de heme captaram, de forma semelhante, 24% do total de betaína presente no meio de cultura. Isso pode indicar um possível aumento na síntese de metionina a partir de homocisteína e betaína nos parasitos cultivados com heme por sete dias, uma vez que os parasitos captaram igualmente, mas têm níveis intracelulares reduzidos da molécula. Por outro lado, o transporte de metionina foi aumentado em 44% pelos parasitos mantidos com heme, levando a uma menor intensidade de metionina no meio de cultura desses parasitos. Esse efeito não foi observado no meio dos parasitos controle. A homocisteína pode ser um intermediário metabólico para síntese de metionina ou pode servir de precursor para síntese de cisteína. Seguindo essa segunda via, observamos que cisteína não apresentou variação nos seus níveis intracelulares nos dois parasitos (p=0,058). Esse aminoácido também pode ser sintetizado a partir de serina, que apresentou estar reduzido em 28% da sua quantidade no parasito cultivado com heme. Isso pode acontecer devido a ser precursor tanto de cisteína quanto de homocisteína. Vale ressaltar que cisteína é um dos aminoácidos que compõe a molécula de glutationa, importante antioxidante nos organismos, mas que no parasito se apresenta no seu variante incomum, tripanotiona, composto por duas glutationas ligadas a uma poliamina espermidina.

Em relação ao metabolismo de poliaminas, os níveis intracelulares do precursor dessa via de síntese, a putrescina, foram aumentados em 1,57 vezes nos parasitos cultivados com heme (p=0,028), podendo indicar um possível aumento da biossíntese da espermidina, importante poliamina que constitui a tripanotiona. Como não foi possível separar as duas poliaminas (cadaverina e putrescina), mas ambas foram identificadas no espectro, o resultado pode representar que as duas poliaminas estavam aumentadas no parasito cultivado com heme. Levando em conta que a molécula de heme promove um ambiente oxidante e induz a formação de ROS no parasito (Nogueira *et al.*, 2011), a estimulação da biossíntese de tripanotiona se torna crucial a fim de regular os níveis de ROS intracelular.

Figura 22 - Poliaminas e biossíntese de tripanotiona nos parasitos cultivados com heme por sete dias

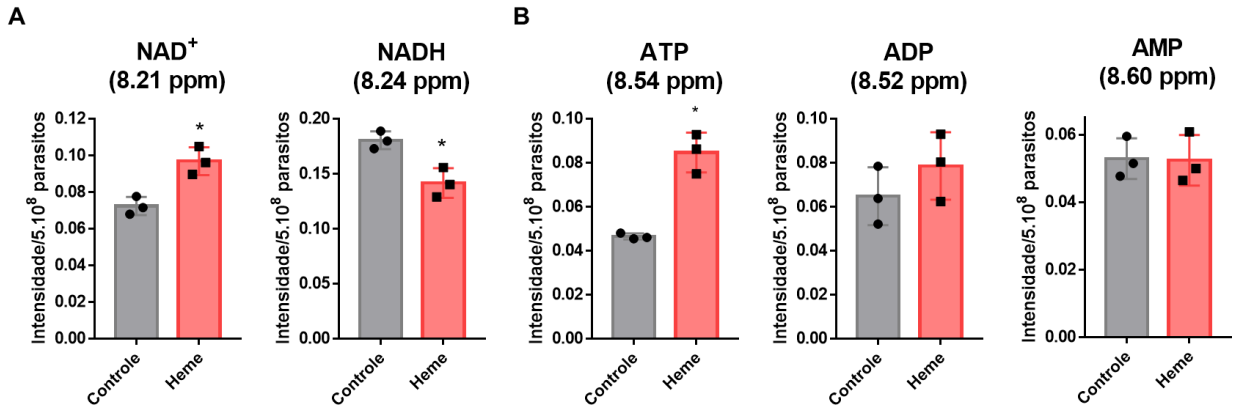


Legenda: Gráficos nas cores branco (controle) e vermelho intenso (heme) se referem às intensidades dos metabólitos avaliados no sobrenadante após sete dias. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está indicado nos gráficos. A linha pontilhada nesses gráficos se refere à intensidade média do metabólito presente no meio de cultura sem células. Gráficos nas cores cinza (controle) e rosa (heme) se referem às intensidades dos metabólitos presentes no extrato intracelular. Setas pretas indicam a reação enzimática; Setas pontilhadas em preto indicam várias reações enzimáticas. Os resultados apresentam média ± erro padrão de quatro experimentos independentes do sobrenadante e três experimentos independentes do extrato intracelular. #p<0,05 em relação ao meio de cultura sem células; *p<0,05 em relação ao sobrenadante e extrato intracelular dos parasitos controle; analisados pelo múltiplo teste t com abordagem FDR calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

Fonte: A autora, 2020.

A adenosina trifosfato (ATP) e a nicotinamida adenina dinucleotídio (NAD^+) são moléculas chaves envolvidas na transferência de energia e a homeostase redox nas células. Nos parasitos cultivados com heme por sete dias, os níveis de NAD^+ aumentaram em 1,33 vezes em sua quantidade dentro da célula (p=0,038). Em concordância com esse dado, NADH está reduzido em 0,78 vezes dos seus níveis no parasito (p=0,047). Em relação ao ATP, esse foi demonstrado estar 1,81 vezes aumentada no parasito cultivado com heme por sete dias (p=0,012). No entanto, as formas menos fosforiladas ADP e AMP não tiveram alteração nos seus níveis em relação ao controle (Figura 23).

Figura 23 - Quantificação dos nucleotídeos nos parasitos cultivados com heme por sete dias



Legenda: (A) NAD^+ e NADH (B) ATP, ADP e AMP. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está indicado nos gráficos. Os resultados apresentam média ± erro padrão de três experimentos independentes do extrato intracelular. *p<0,05 em relação à intensidade do metabólito nos parasitos controle; analisados pelo múltiplo teste t com abordagem *FDR* calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutiele.

Fonte: A autora, 2020.

3 DISCUSSÃO

O estudo em conjunto das ômicas conferem informações preciosas acerca da fisiologia dos organismos. As metabolômicas desenvolvidas nesse trabalho em conjunto com as análises transcriptômicas publicada por Paes *et al.* (2020), Figura 7, conferem informações importantes sob o metabolismo dos epimastigotas de *T. cruzi* submetidas à molécula de heme (Figura 24). As análises transcriptômicas mostraram que o heme induziu o aumento na expressão dos genes da via glicolítica e da fermentação aeróbica nos parasitos, porém, não modulou a expressão dos genes relacionados com o metabolismo energético mitocondrial (Paes *et al.*, 2020). Por meio da metabolômica e abordagens bioquímicas observamos que esse aumento da glicólise no nível transcricional é acompanhado pelo aumento da captação de glicose e hexoses (Figura 9A, 10A e B; e 19) e, principalmente, através dos altos níveis intracelulares de fosfoenolpiruvato (PEP) citosólico, penúltimo intermediário da glicólise e molécula que alimenta a fermentação aeróbica no glicossoma (Figura 19). A enolase, enzima que sintetiza PEP, é a enzima da glicólise com expressão gênica mais aumentada nos parasitos submetidos ao heme (Paes *et al.*, 2020). Como o aumento de PEP não se reflete diretamente no aumento de piruvato, isso nos indica fortemente que grande parte do PEP é desviado para a fermentação no glicossoma e não para formação do piruvato pela piruvato cinase (Figura 19 e 24). Seguindo esse caminho, o heme induziu o aumento da expressão de 4 dos 6 genes responsáveis pela fermentação no glicossoma, foram eles: a piruvato fosfato dicinase (PPDK), fosfoenolpiruvato carboxicinase (PEPCK), malato desidrogenase (MDH) e fumarato redutase (FRD) (Paes *et al.*, 2020).

A via da fermentação succínica dos tripanossomatídeos pode-se dividir também entre glicossoma e citosol através da reação mediada pela fumarato hidratase ou fumarase. Em *T. brucei*, a fumarase citosólica é a enzima que efetivamente participa da produção de succinato glicossomal. O malato do glicossoma é transferido para o citosol que, ao sofrer a reação de hidratação pela fumarase, gera fumarato que retorna para o glicossoma seguindo a produção do succinato (Coustou *et al.*, 2006). No entanto, a isoforma citosólica da enzima málica foi o 2º gene mais expresso nos parasitos cultivados com heme (Paes *et al.*, 2020), apontando que parte do malato vindo do glicossoma tem como finalidade gerar NADPH citosólico, coenzima reduzida essencial para vias anabólicas e para proteção contra o estresse oxidativo (Krauth-Siegel e Comini, 2008). Essa via alternativa de produção de NADPH é importante visto que já foi constatado que o NADPH formado pela via das pentoses-fosfato não é uma

via limitante para resistência ao estresse oxidativo gerada por H_2O_2 (Maugeri e Cazzulo 2004; Carranza *et al.*, 2009). Portanto, esse desvio do malato glicossomal pela enzima málica citosólica possivelmente nos responde à não alteração dos níveis intracelulares e extracelulares de succinato, mesmo no momento em que o parasito capta grandes quantidades de glicose (Figura 19 e 24). Vale destacar que o desvio de PEP para a fermentação é essencial também para a regeneração de NAD^+ e ATP no glicossoma (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011), devido ao aumento da glicólise no parasito induzido por heme. O piruvato produzido no citosol pela enzima málica pode ser direcionado para várias vias metabólicas: ser consumido no catabolismo de aminoácidos aromáticos, oxidado completamente à CO_2 e H_2O, utilizado para regeneração de NAD^+ e transaminado a L-alanina.

Apesar de não termos observado alterações nos níveis de succinato no meio de cultura, vimos o aumento na secreção de fumarato no sobrenadante dos parasitos incubados com heme por 24 h (Figura 17). A excreção de fumarato apenas foi observada em *T. brucei* quando os genes da NADH-fumarato redutase glicossomal e mitocondrial foram silenciados. Nesse estudo, o silenciamento refletiu no aumento dos níveis extracelulares de fumarato por não ser possível sua redução à succinato no parasito (Coustou *et al.*, 2006). Nos nossos estudos, a forma epimastigota de *T. cruzi* possui as duas isoformas da NADH-fumarato redutase intactas e, diferente do *T. brucei*, não há oxidases alternativas que visam a reoxidação do NADH mitocondrial. Embora essencial no balanço redox desses parasitos, a literatura já demonstrou a geração de H_2O_2 pela reoxidação do NADH mediada pela fumarato redutase em *T. cruzi* (Denicola-Seoane *et al.*, 1992). Esse efeito poderia explicar em parte a excreção de fumarato pelo parasito tratado com heme, visto que seria importante reduzir outros pontos de formação de H_2O_2 devido ao aumento do aporte dessa molécula dentro da célula. Além disso, vale ressaltar que o tratamento com heme em curtos tempos induz um aumento na atividade do complexo II-III do STE, o que promove o aumento da produção do fumarato (Nogueira *et al*, 2017) Porém, esse efeito não se mantém ao longo da vida do *T. cruzi* mantido com heme. Observamos que, após sete dias em cultura com a porfirina, os níveis de fumarato secretado ficam semelhantes ao controle, sugerindo uma diminuição na excreção do fumarato pelo parasito (Figura 20). O aumento dos ácidos orgânicos no sobrenadante (acetato e succinato) junto com o fumarato e o ácido carbônico, proveniente do aumento dos intermediários do ciclo de Krebs, explicam a maior redução do pH no meio de cultivo dos parasitos submetidos ao heme (Figura 9B).

Como já mencionamos, os nossos resultados demonstraram que o heme estimulou as formas epimastigotas de *T. cruzi* a consumirem altas quantidades de glicose ao longo dos dias

(Figura 11). Esse aumento na captação demonstrou ser gradual mesmo fornecendo mais glicose exógena no sobrenadante. De maneira interessante, constatamos que a disponibilidade de glicose interferiu até um certo momento na proliferação do parasito cultivado com heme. O esgotamento dessa hexose no sobrenadante promoveu uma retenção na proliferação dessas células, enquanto a manutenção de seus níveis no meio de cultura levou à estimulação da proliferação desses parasitos por mais tempo (Figura 8; 10A e B). Esse evento não foi observado no parasito controle, na qual independente de aumentar a disponibilidade de glicose, esses mantiveram a proliferação constante. A retenção na proliferação ocasionado pelo esgotamento da glicose extracelular, nos parasitos cultivados com heme, possivelmente está relacionada com a transição metabólica nesses protozoários que passam a utilizar outras fontes de carbono para obtenção de energia (Bárison *et al.*, 2017). Contudo, a inibição da via glicolítica já nos primeiros dias quantificados, demonstrou uma redução drástica apenas na proliferação induzida pelo heme, não sendo observado importantes diferenças na proliferação dos parasitos controle (Tabela 1; Figura 8 e 11). Esses resultados reforçam a importância da via glicolítica nesses parasitos cultivados com heme, mesmo havendo um aumento do seu metabolismo mitocondrial, que não supre todas as suas necessidades celulares. Esse resultado não surpreende, uma vez que metabólitos originados da via glicolítica podem ser desviados para via das pentoses-fosfato e abastecer as células com nucleotídeos e potencial redox.

Há muitos anos é sabido que as formas epimastigotas de *T. cruzi* são capazes de transportar e consumir carboidratos e aminoácidos, excretando no meio alguns metabólitos de glicose reduzidos, principalmente succinato, e NH_3 provenientes dos aminoácidos. Essas formas são capazes de consumir os dois nutrientes, embora a glicose seja preferida aos aminoácidos e consumida primeiro quando ambos estão presentes (Cazzulo, 1992; Silber *et al.*, 2005; Bringaud; Rivière; Coustou, 2006). Ao serem desafiados com heme, as formas epimastigotas de *T. cruzi*, além da glicose e hexoses (Figura 16), também aumentaram o consumo de alguns aminoácidos, consumo esse não observado nos parasitos controle (Figura 18).

Ao organizarmos e ordenarmos os aminoácidos mais consumidos pelos parasitos tratados com heme (quando comparados aos parasitos controle) encontramos que tirosina, metionina e fenilalanina foram os aminoácidos que apresentaram maiores captações. O catabolismo dos aminoácidos aromáticos está envolvido com a reoxidação de NADH citosólico, gerando produtos que são excretados posteriormente (Figura 21) (Nowicki e Cazzulo, 2008). O transcriptoma do parasito cultivado com heme demonstrou que a expressão da AHADH está aumentada (Paes *et al.*, 2020). A reação catalisada por essa enzima reduz

intermediários provenientes da degradação desses aminoácidos levando a oxidação do NADH no citosol (Nowicki e Cazzulo, 2008). Desse modo, tanto seu aumento na expressão gênica quanto o aumento dos produtos finais do catabolismo de tirosina e fenilalanina (Figura 21) sustentam a hipótese de que os parasitos degradam esses aminoácidos a fim de regenerar os níveis de NAD^+ no parasito, que estão aumentados (Figura 23). Sendo assim, propomos que o aumento da fermentação aeróbica somado ao catabolismo desses aminoácidos explica os níveis de NAD^+ aumentados na forma epimastigota cultivada com heme (Figura 24).

O aumento da captação de metionina pode estar relacionada principalmente com a síntese de compostos tióis pelos parasitos, como a glutationa (Marchese *et al.*, 2018). Junto com o consumo aumentado de betaína (Figura 18 e 22), um dos precursores da via de biossíntese de metionina, indica um aumento e possível regulação dos níveis intracelulares de metionina uma vez que esse aminoácido participa em outras vias anabólicas e catabólicas (Marchese *et al.*, 2018). Além do aumento da captação desse aminoácido, observamos também o aumento dos níveis intracelulares de putrescina nos parasitos mantidos com heme (Figura 22). Kinch e colaboradores (1999) demonstraram que a putrescina estimula a atividade da S-adenosilmetionina descarboxilase, enzima da via catabólica de metionina, a fim de produzir o segundo precursor da síntese de espermidina junto com a putrescina. Isso nos aponta um aumento na síntese de espermidina e, consequentemente, um aumento da síntese de tripanotiona no parasito. Considerando que o heme induz o aumento nos níveis de ROS intracelular no *T. cruzi* (Nogueira *et al.*, 2011), possivelmente, a indução da síntese de moléculas antioxidantes também é estimulada com a finalidade de regular os níveis de ROS. Esse aumento de ROS e da capacidade antioxidante é amplamente estudado em células cancerígenas, onde o ROS elevado favorece a sobrevivência e a proliferação. Para que isso aconteça sem haver estresse oxidativo, essas células desencadeiam uma resposta adaptativa através do aumento da sua capacidade antioxidante, a fim manter essa dinâmica redox de altas quantidades de ROS importantes para proliferação (Bhardwaj e He, 2020). Em concordância com a hipótese de que a síntese de tripanotiona está aumentada nos parasitos tratados com heme, o transcriptoma desses parasitos demonstrou o aumento de transcritos da enzima málica citosólica (Paes *et al.*, 2020), responsável por gerar NADPH no citosol e, sendo assim, capaz de ser utilizada na manutenção da tripanotiona na sua forma reduzida (Figura 22 e 24) (Krauth-Siegel e Comini, 2008).

Atrás dos três aminoácidos citados acima observamos a captação aumentada de aminoácidos envolvidos com o metabolismo energético mitocondrial do parasito (Figura 18). Glutamina, glutamato, prolina e histidina são convertidos aos intermediários do ciclo de

Krebs, gerando co-fatores reduzidos para a produção de ATP via fosforilação oxidativa. O acetil-CoA oriundo do metabolismo de treonina e de alguns BCAAs, ambos com captação aumentada, também pode entrar no CK para gerar ATP ou ser convertido à acetato. Apesar da literatura ter demonstrado a ausência das enzimas responsáveis pelo catabolismo de treonina em *T. cruzi*, bem como, seu transporte do meio extracelular (Millerioux *et al.*, 2013), nesse trabalho sugerimos tanto a captação como a formação do acetato. Em *T. brucei*, a produção de acetato pode estar relacionada tanto ao catabolismo de glicose quanto de treonina, onde todo acetil-CoA formado é excretado na forma de acetato (Bringaud; Rivière; Coustou, 2006). Diferente do *T. brucei*, no entanto, em *T. cruzi* foi demonstrada que a produção do acetato pelo catabolismo de glicose é bem baixa ou quase nula (Cazzulo *et al.*, 1985). Portanto, a formação desse ácido orgânico é originada pelo catabolismo de aminoácidos ou ácidos graxos (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011).

Tendo em vista a captação aumentada dos aminoácidos capazes de gerar acetil-CoA e que esse aumento não se reflete no aumento dos níveis de acetato dentro e fora da célula, isso nos sugere que parte do acetil-CoA está sendo direcionado ao ciclo de Krebs e/ou biossíntese de lipídeos, visto que o parasito é induzido a proliferar na presença do heme. Reforçando essa hipótese, as análises transcriptômicas constataram que a ASCT, enzima responsável pela produção de acetato a partir de acetil-CoA, foi aumentada em sua expressão gênica em resposta ao heme (Paes *et al.*, 2020) indicando que o acetato formado possivelmente segue a via de síntese de ácidos graxos (Rivière *et al.*, 2009) (Figura 24). Em todos os casos, observamos que os níveis de intermediários do ciclo de Krebs estão semelhantes entre os dois parasitos estudados, com exceção do cis-aconitato, demonstrando que não ocorreu uma estimulação dessa via metabólica.

Corroborando esses resultados demonstramos também que há o aumento da excreção de L-alanina no sobrenadante dos parasitos tratados com heme por 24 h (Figura 17). Essa produção de alanina aumentada pode ser resultado do possível aumento dos níveis de NH_3 (originado pela quebra dos aminoácidos), sendo essa última responsável por impulsionar a formação de alanina (Maugeri; Cannata; Cazzulo, 2011). No entanto, após dias em cultura, os níveis de L-alanina presente no sobrenadante dos parasitos mantidos com heme se iguala ao controle, apontando uma redução no catabolismo dos aminoácidos ou na recaptação da L-alanina pelo parasito (Girard *et al.*, 2018). Por isso, não podemos deixar de descartar o fato de que a captação desses aminoácidos também é essencial para síntese de proteínas em um parasito que está induzido a proliferar (Lara *et al.*, 2007).

Curiosamente, a L-prolina foi um dos únicos aminoácidos identificados que não apresentou alteração na sua captação nos parasitos cultivados com heme quando comparados ao controle (Figura 20). No entanto, seus níveis intracelulares exibiram um significante aumento no parasito cultivado com heme. Esse resultado é corroborado pelas nossas análises transcriptômicas, na qual foi evidenciado a diminuição da expressão gênica da enzima pirrolina-5-carboxilato desidrogenase (Paes *et al.*, 2020), que em sua catálise enzimática oxida o glutamato γ-semialdeído (GSA) a glutamato reduzindo NADH mitocondrial nessa reação (Mantilla *et al.*, 2015). Essa enzima corresponde à segunda etapa do catabolismo de prolina em *T. cruzi*. O destino do NADH produzido na mitocôndria seria a reoxidação através da NADH-fumarato redutase. Dessa forma, devido a um acúmulo dos níveis de NADH, a diminuição da expressão da P5CDH reduz mais uma fonte de geração de NADH mitocondrial, assim como a diminuição da formação de glutamato que seria convertido ao intermediário do CK. Esse efeito promoveria a um acúmulo de pirrolina-5-carboxilato (P5C) e prolina intracelular. Recentemente, experimentos utilizando silenciamento dessa enzima em *T. brucei* demonstraram que esse acúmulo ocorre e que a P5C é transportada para o citosol quando não completamente oxidada (Marchese *et al.*, 2020).

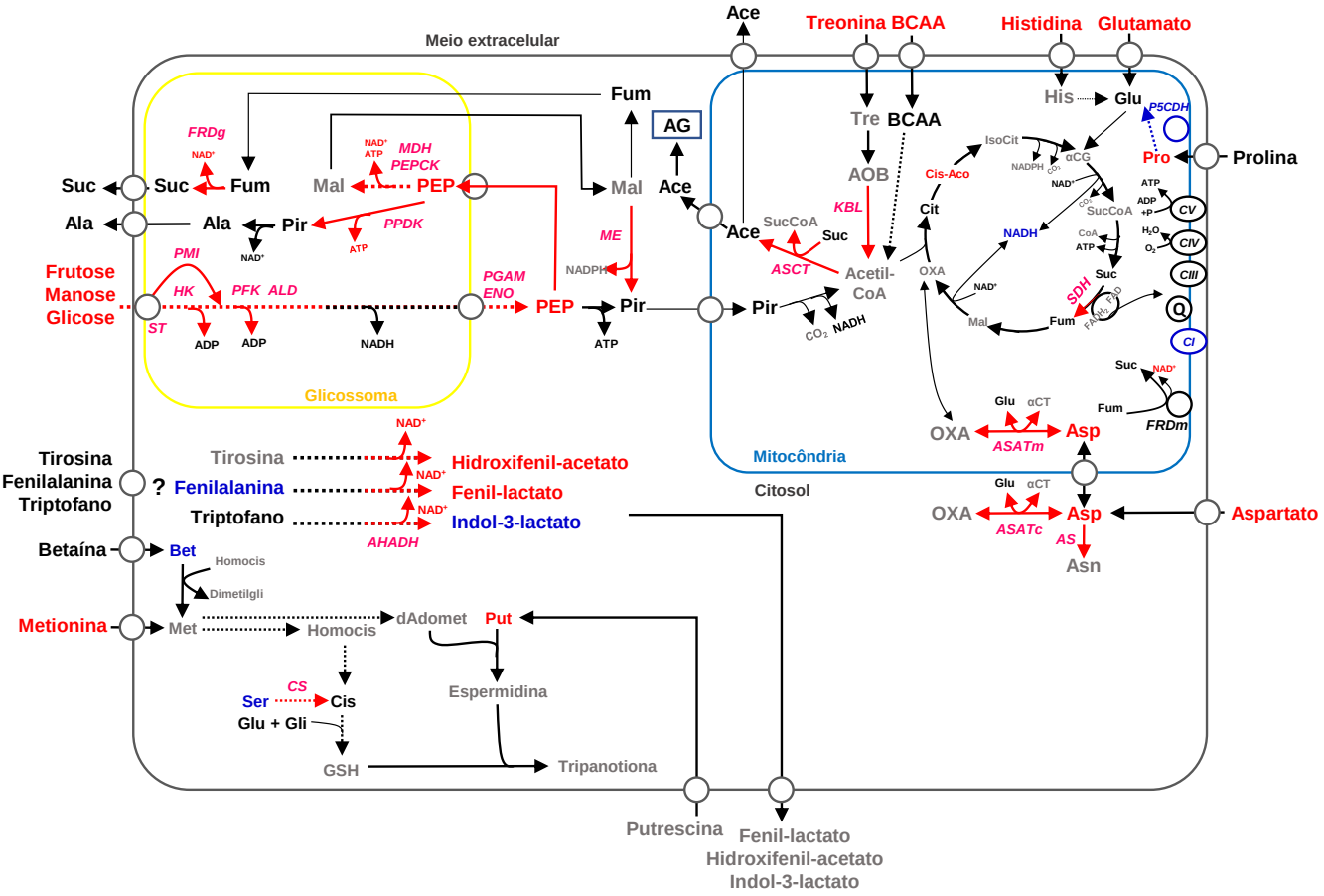
O heme também induziu mudanças metabólicas na fisiologia mitocondrial da forma epimastigota de *T. cruzi*. Como destacado anteriormente, observamos o aumento da captação de histidina, glutamato, BCAAs e treonina e, consequentemente, o aumento de alguns intermediários do CK nesses parasitos (Figura 20). Entretanto, apesar dos intermediários estarem elevados, os níveis de NADH em geral estão diminuídos (Figura 23) e não foi observada alteração no consumo de oxigênio mitocondrial (Figura 13) nos parasitos mantidos com heme, indicando possivelmente que os substratos não estão sendo oxidados. Isto posto, sugerimos que os níveis semelhantes dos intermediários do CK ocorre devido à anaplerose, na qual os aminoácidos que exibiram um aumento no transporte estão sendo usados para reposição dos níveis desses intermediários pelo parasito cultivado com heme. Correspondente a esse processo, a cataplerose também deve acontecer nesses parasitos, a fim de direcionar esqueletos de carbono para a biossíntese de lipídeos e outras vias anabólicas no parasito. Embora não esteja completamente descrito na literatura, esse processo é muito comum em algumas células tumorais. Mesmo apresentando uma fosforilação oxidativa reduzida, essas células apresentam CK funcional que continua a gerar macromoléculas essenciais e ATP por anaplerose a partir da glutamina. Análises com [U-^{13}C]-glutamina demonstraram que esse aminoácido é convertido à αCT que, pela reação reversa da isocitrato desidrogenase dependente de NADPH (carboxilação redutiva), é convertido à citrato que serve como

precursor de vias anabólicas (Mullen *et al.*, 2011). Essa via já foi descrita em *Plasmodium falciparum* como maior fonte de citrato e acetil (Olszewski *et al.*, 2010). Vale ressaltar que o catabolismo de histidina e glutamato rendem a formação de αCT, logo, sendo possíveis fontes de carbono para anaplerose no parasito. Além disso, a reação mediada pela PEPCK no parasito é reversível, indicando também seu possível papel na gliconeogênese a partir dos aminoácidos (Maugeri; Cannata; Cazzulo , 2011). Apesar da gliconeogênese ainda não ter sido evidenciada no *T. cruzi*, já foi demonstrada a presença de glicose intracelular nas formas epimastigotas em um momento onde essa hexose se encontrava completamente depletada no meio de cultura e os parasitos oxidavam aminoácidos (Bárison *et al.*, 2017).

Além disso, diferente do observado no parasito controle, a presença da glicose desencadeou imediatamente uma redução no consumo de oxigênio mitocondrial, na capacidade máxima de transferência dos elétrons e na capacidade de produção de ATP pela mitocôndria nos parasitos submetidos ao heme (Figura 14 e 15). Esse fenômeno é conhecido como efeito Crabtree e é descrita como uma mudança metabólica imediata de uma via eficiente energeticamente (fosforilação oxidativa) para uma via ineficiente (fermentação) na presença de oxigênio (Crabtree, 1929). Esse efeito foi caracterizado em leveduras, células de mamíferos (tumoral e não tumoral) (De Deken, 1966; De Berardinis *et al.*, 2008) e diversos organismos unicelulares (Goel *et al.*, 2012). Portanto, nossos resultados apontam que o heme promove uma adaptação metabólica nas formas epimastigotas de *T. cruzi*, para quando os níveis de glicose no ambiente aumentarem, os possibilite a captar a glicose e oxidá-la parcialmente através da fermentação, conservando parte da energia em ATP.

Reunindo os resultados desse trabalho somado às análises transcriptômicas (Paes *et al.*, 2020) demonstramos que o heme estimula a via glicolítica e a fermentação aeróbica tanto a nível transcricional quanto metabólico na forma epimastigota de *T. cruzi* e que o metabolismo mitocondrial não está contribuindo para a disponibilização de energia nesses parasitos. Em contrapartida, os intermediários do ciclo de Krebs parecem estar sendo direcionados para biossíntese de outras moléculas no parasito e sendo repostas pelo catabolismo de aminoácidos, que apresentam captação aumentada.

Figura 24 - Esquema final reunindo análises ômicas das formas epimastigotas cultivadas com heme



Legenda: Resultados obtidos pela transcriptômica publicada por Paes *et al.* (2020) e metabolômica desenvolvida neste trabalho foram reunidos para avaliação das vias metabólicas que foram moduladas na presença do heme. Transcriptômica: os genes foram escritos em itálico. Cores foram usadas para diferenciar genes aumentados (rosa) de genes diminuídos (azul). Metabolômica: as moléculas foram abreviadas e as cores foram usadas para demonstrar aumento (vermelho), diminuição (azul) e não alteração (preto) na captação e nos níveis intracelulares das amostras de parasitos mantidos com heme relacionado ao controle e que apresentaram $p<0,05$. Moléculas que não foram identificadas pela metabolômica estão em cinza. Setas: setas sólidas em preto (reação sugerida); em vermelho (reação sugerida devido ao aumento da expressão gênica e/ou intensidade do metabólito); em azul (reação com probabilidade reduzida de acontecer devido à diminuição da expressão gênica e/ou intensidade de um metabólito). Setas pontilhadas (via com várias reações). Quadrado: AG: Biossíntese de ácidos graxos.
Genes: ST: transportador de açúcar; HK: hexocinase; PMI: fosfomanose isomerase; PFK: fosfofrutocinase; ALD: frutose-bisfosfato aldolase; PGAM: fosfoglicerato mutase; ENO: enolase; ME: enzima málica; PEPCK: fosfoenolpiruvato carboxicinase; MDH: malato desidrogenase; FRDg: fumarato redutase glicossomal; PPDK: piruvato fosfato dicinase; ASCT: succinil-CoA:3-cetoácido CoA-transferase; KBL: 2-amino-3-cetobutirato CoA ligase; SDH: succinato desidrogenase; P5CDH: pirrolina-5-carboxilato desidrogenase; CI: NADH-ubiquinona oxidoredutase; CIII: ubiquinol-citocromo *c* oxidoredutase; CIV: citocromo oxidase; CV: F_0F_1 ATP sintase; FRDm: fumarato redutase mitocondrial; ASATm: aspartato aminotransferase mitocondrial; ASATc: aspartato aminotransferase citosólica; AS: asparagina sintetase a; CS: cisteína sintetase; AHADH: L-2-hidroxiácido aromático desidrogenase. Metabólitos: PEP: fosfoenolpiruvato; Mal: malato; Fum: fumarato; Suc: succinato; Pir: piruvato; Ala: alanina; Ace: acetato; Tre: treonina; AOB: 2-amino-3-butirato; BCAA: aminoácidos de cadeia ramificada; OXA: oxaloacetato; Cit: citrato; Cis-Aco: cis-aconitato; IsoCit: isocitrato; α-CT: α-cetoglutarato; CoA: coenzima A; SucCoA: succinil-CoA; His: histidina; Glu: glutamato; Pro: prolina; Asp: aspartato; Asn: asparagina; Bet: betaína; Homocis: homocisteína; dimetilgli: dimetilglicina; Met: metionina; Ser: serina; Cis: cisteína; Gli: glicina; dAdoMet: adenosil metionina descarboxilada; Put: putrescina.

Fonte: A autora, 2020.

CONCLUSÕES

a) A proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* induzida por heme e H_2O_2 é dependente da via glicolítica;
b) A depleção da glicose extracelular causa uma retenção na proliferação das formas epimastigotas induzidas pelo heme;
c) Em um período curto de tempo, o heme induziu o aumento da captação de hexoses e de aminoácidos e, consequentemente, a excreção de ácidos orgânicos e alanina;
d) Em períodos longos com heme, o parasito é adaptado a um metabolismo energético baseado na glicólise e na fermentação aeróbica, utilizando aminoácidos para reações anapleróticas;
e) A presença da glicose desencadeia uma redução imediata no metabolismo mitocondrial apenas nos parasitos que foram cultivados com heme.

REFERÊNCIAS

Acosta, H. *et al*. Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 2019;229, 62–74.

Adl, S. M. *et al*. The revised classification of eukaryotes. J Eukaryot Microbiol. 2012;59(5):429-493.

Almeida-de-Faria, M. *et al*. *Trypanosoma cruzi*: characterization of an intracellular epimastigote-like form. Exp Parasitol. 1999;92(4):263-274.

Antunes, L. C., *et al*. Metabolic signatures of triatomine vectors of *Trypanosoma cruzi* unveiled by metabolomics. PLoS One. 2013;8(10):e77283.

Arévalo, J.; Panebra, A.; Santa Cruz, C. Relevance of hemin for in vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi*. J Protozool. 1985;32(3): 553-555.

Ariyanayagam, M. R.; Fairlamb, A. H. Diamine auxotrophy may be a universal feature of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1997;84(1):111–21.

Atamna, H. Heme binding to Amyloid-beta peptide: mechanistic role in Alzheimer's disease. J Alzheimers Dis. 2006;10(2-3):255-266.

Ayo, C. M. *et al*. Genetic susceptibility to Chagas disease: an overview about the infection and about the association between disease and the immune response genes. Biomed Res Int. 2013;2013:284729.

Barderi, P. *et al*. The NADP+-linked glutamate dehydrogenase from *Trypanosoma cruzi:* Sequence, genomic organization and expression. Biochem. J. 1998;330, 951–958.

Barisón, M. J. *et al*. Metabolomics profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J Biol Chem. 2017;M117.778522.

Barisón, M. J. *et al*. The active transport of histidine and its role in ATP production in *Trypanosoma cruzi*. J. Bioenerg. Biomembr. 2016;48, 437–449.

Bauer, S.; Morris, M. T. Glycosome biogenesis in trypanosomes and the de novo dilemma. PLoS Negl Trop Dis. 2017;11(4): e0005333.

Bermudez, J. *et al*. Current drug therapy and pharmaceutical challenges for Chagas disease. Acta Tropica. 2016;156, 1–16.

Berná, L. *et al*. Transcriptomic analysis reveals metabolic switches and surface remodeling as key processes for stage transition in *Trypanosoma cruzi.* Peer J. 2017; 5: e3017.

Berriman, M. *et al*. The genome of the African trypanosome *Trypanosoma brucei*. Science. 2005;309, 416–422.

Besteiro, S. *et al*. Succinate secreted by *Trypanosoma brucei* is produced by a novel and unique glycosomal enzyme, NADH-dependent fumarate reductase. J Biol Chem. 2002;277:38001-38012

Besteiro, S. *et al*. Energy generation in insect stages of *Trypanosoma brucei:* metabolism in flux. Trends Parasitol. 2005;21(4):185-191.

Bhardwaj, V.; He, J. Reactive Oxygen Species, Metabolic Plasticity, and Drug Resistance in Cancer. Int J Mol Sci. 2020;21(10):E3412.

Boveris, A.; Stoppani, A. O. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. Experientia. 1977;33(10):1306-1308.

Brack, C. Electron microscopic studies on the life cycle of *Trypanosoma cruzi* with special reference to developmental forms in the vector *Rhodnius prolixus*. Acta Trop. 1968;25(4):289-356.

Brener, Z. A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life-cycle in the invertebrate host. J. Protozool. 1972;19, 23–27.

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

Cannata, J. J.; Cazzulo, J. J. The aerobic fermentation of glucose by *Trypanosoma cruzi*. Comp Biochem Physiol B. 1984;79(3):297-308.

Carranza, J. C. *et al*. 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. *et al*. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes lack ornithine decarboxylase but can express a foreign gene encoding this enzyme. FEBS Lett. 1999;454(3):192-196.

Cazzulo, J. J. *et al*. End products and enzyme levels of aerobic glucose fermentation in trypanosomatids. Mol Biochem Parasitol. 1985;16(3):329-343.

Cazzulo, J. J. The aerobic fermentation of glucose by Trypanosomatids. FASEB. 1992;J. 6, 3153–3161

Chagas, C. Nova tripanozomiaze humana. Estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp.*, ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1909;1:159–218.

Chance, B.; Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. II. Difference spectra. J Biol Chem. 1955;217(1): 395-407.
Chen, Y.; Azad, M. B.; Gibson, S. B. Superoxide is the major reactive oxygen species regulating autophagy. Cell Death Differ. 2009;16:1040–1052.

Coura, J. R.; Viñas, P. A. Chagas disease: a new worldwide. Nature. 2010; 465: S6-S7.

Coura, J. R.; Castro, S. L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. Memórias Do Instituto Oswaldo Cruz. 2002;97(1), 3–24.

Coustou, V. *et al*. ATP generation in the *Trypanosoma brucei* procyclic form: cytosolic substrate level is essential, but not oxidative phosphorylation. J Biol Chem. 2003;278(49):49625-49635.

Coustou, V. *et al*. A mitochondrial NADH-dependent fumarate reductase involved in the production of succinate excreted by procyclic *Trypanosoma brucei.* J Biol Chem. 2005;280(17):16559-16570.

Coustou, V. *et al*. Fumarate is an essential intermediary metabolite produced by the procyclic *Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem. 2006;281, 26832–26846

Coustou, V. *et al*. Glucose-induced remodeling of intermediary and energy metabolism in procyclic *Trypanosoma brucei*. J Biol Chem. 2008;283(24):16342-16354.

Crabtree, H. G. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. Biochem J. 1929;23:536–545.

Cross, C. E. *et al*. Oxygen radicals and human disease. Annals of internal medicine. 1987; 107:526–545.

Cross, G. A. M.; Klein, R. A.; Linstea, P. J. D. Utilization of amino acids by *Trypanosoma brucei* in culture: L-threonine as a precursor for acetate. Parasitology. 1975;71, 311–313.

Cunha-e Silva, N. *et al*. Reservosomes: multipurpose organelles? Parasitol Res.2006;99: 325–327

Cupello, M. P. *et al*. The heme uptake process in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes is inhibited by heme analogues and by inhibitors of ABC transporters. Acta Trop. 2011;120(3):211-8.

Cymeryng, C.; Cazzulo, J. J.; Cannata, J. J. B. Phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 1995;73, 91–101

Dailey, H. A. *et al*. Prokaryotic heme biosynthesis: Multiple pathways to a common essential product. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2017;81, e00048-16.

Dawidowski, M. *et al*. Inhibitors of PEX14 disrupt protein import into glycosomes and kill *Trypanosoma* parasites. Science. 2017;355(6332):1416-1420.

De Araújo, C. A. C. *et al*. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* I (TcI) and *T. cruzi* II (TcII) genotypes using genes encoding serine carboxypeptidases. Parasitology Research. 2016;115(11), 4211–4219.

De Berardinis, R. J. *et al*. The biology of cancer: metabolic reprogramming fuels cell growth and proliferation. Cell Metab. 2008;7:11–20.

De Deken, R. H. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. J Gen Microbiol. 1966;44:149–156.

De Souza, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. Cytol. 1984; v. 86, p. 197-283.

De Souza, W.; Attias, M.; Rodrigues, J. C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). Int J Biochem Cell Biol. 2009;41(10):2069-2080.

Denicola-Seoane, A. *et al*. Succinate-dependent metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Mol Biochem Parasitol. 1992;54(1):43-50.

Dias Fde, A. *et al*. Monitoring of the Parasite Load in the Digestive Tract of *Rhodnius prolixus* by Combined qPCR Analysis and Imaging Techniques Provides New Insights into the Trypanosome Life Cycle. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(10):e0004186.

Dias, J. C. *et al*. 2nd Brazilian Consensus on Chagas Disease, 2015. Rev Soc Bras Med Trop. 2016;49Suppl 1(Suppl 1):3-60.

Diebold, L.; Chandel, N. S. Mitochondrial ROS regulation of proliferating cells. Free Radic Biol Med. 2016;100:86-93.

DNDi. 2018. Acesso em maio de 2020 no endereço https://www.dndial.org/wp-content/uploads/2018/11/DNDi_Chagas_Portugues_digital.pdf?x96328

DNDi. Chagas Fact-sheet. 2015. Acesso em maio de 2020 no endereço https://www.dndi.org/wp-content/uploads/2016/10/Factsheet_2015_Chagas_disease.pdf.

Docampo, R.; de Boiso, J. F.; Stoppani, A. O. Tricarboxylic acid cycle operation at the kinetoplast-mitochondrion complex of *Trypanosoma cruzi*. Biochim Biophys Acta. 1978;502(3):466-476.

Dolezělová, E. *et al*. Cell-based and multi-omics profiling reveals dynamic metabolic repurposing of mitochondria to drive developmental progression of *Trypanosoma brucei*. PLoS Biol. 2020;18(6): e3000741.

Donegan, R. K. *et al*. Handling heme: The mechanisms underlying the movement of heme within and between cells. Free Radic Biol Med. 2019;133:88-100.

El-Sayed, N. M. *et al*. The genome sequence of *Trypanosoma cruzi*, etiologic agent of chagas disease. Science. 2005;309(5733):409–415.

Ewing, J. F.; Maines, M. D. In situ hybridization and immunohistochemical localization of heme oxygenase-2 mRNA and protein in normal rat brain: Differential distribution of isozyme 1 and 2. Mol Cell Neurosci. 1992;3: 559– 570, 1992.

Faller, M. *et al*. Heme is involved in microrna processing. Nat. Struct. Mol. Biol. 2007, 14, 23–29.

Ferreira, C. M. *et al*. Heme crystallization in a Chagas disease vector acts as a redox-protective mechanism to allow insect reproduction and parasite infection. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(7):e0006661.

Finkelstein, J. D. Methionine metabolism in mammals. J. Nutr. Biochem. 1990;1, 228–237.

Galland, N.; Michels, P. A. Comparison of the peroxisomal matrix protein import system of different organisms. exploration of possibilities for developing inhibitors of the import system of trypanosomatids for anti-parasite chemotherapy. Eur. J. Cell Biol. 2010;89, 621–637.

Girard, R. M. B. M. *et al*. Uptake of l-Alanine and Its Distinct Roles in the Bioenergetics of *Trypanosoma cruzi*. mSphere. 2018;3(4):e00338-18.

Goel, A. *et al*. Metabolic shifts: a fitness perspective for microbial cell factories. Biotechnol Lett. 2012;34:2147–2160.

Goe,s G. R. *et al*. *Trypanosoma cruzi* Needs a Signal Provided by Reactive Oxygen Species to Infect Macrophages. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(4):e0004555.

Gonçalves, R. L. *et al*. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J Bioenerg Biomembr. 2011;43(6):651-661.

Goodacre, R. Metabolomics – the way forward. Metabolomics. 2005;1:1–2

Gourbière, S. *et al*. Genetics and evolution of triatomines: from phylogeny to vector control. Heredity. 2011;108, 190–202.

Graça-Souza, A. V. *et al*. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. Insect Biochem Mol Biol. 2006;36(4):322-335.

Gualdrón-López, M. *et al*. When, how and why glycolysis became compartmentalised in the Kinetoplastea. a new look at an ancient organelle. Int. J. Parasitol. 2012. 42, 1–20.

Guhl, F. Geographical distribution of Chagas disease. Am. Trypanosom. Chagas Dis. 2017;89–112.

Haanstra, J. R.*et al*. Biogenesis, maintenance and dynamics of glycosomes in trypanosomatid parasites. Biochim Biophys Acta—Mol Cell Res. 2015;1863(5):1038–48.

Haddad, A.; Mohiuddin, S. S. Biochemistry, Citric Acid Cycle. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; May 23, 2020.

Hampton, J. R. Serine metabolism in *Trypanosoma cruzi*: Synthesis of other amino acids. Comp. Biochem. Physiol. B 1971;39, 999–1003.

Hamza, I.; Dailey, H. A. One ring to rule them all: Trafficking of heme and heme synthesis intermediates in the metazoans. Biochim Biophys Acta. 2012;1823, 1617–1632.

Hatzivassiliou, G. *et al*. ATP citrate lyase inhibition can suppress tumor cell growth. Cancer Cell. 2005;8(4):311-321.

Hill, G. C. Electron transport systems in kinetoplastida. Biochim Biophys Acta. 1976;456(2):149-193.

Hooda, J.; Shah, A.; Zhang, L. Heme, an essential nutrient from dietary proteins, critically impacts diverse physiological and pathological processes. Nutrients. 2014;6(3):1080-1102.

Ismail, S. O. *et al*. Molecular cloning and characterization of two iron superoxide dismutase cDNAs from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1997;86(2):187-197.

Jimenez, V. Dealing with environmental challenges: mechanisms of adaptation in *Trypanosoma cruzi*. Res. Microbiol. 2004;165, 155–165.

Kessler, R. L. *et al*. Recently differentiated epimastigotes from *Trypanosoma cruzi* are infective to the mammalian host. Mol Microbiol. 2017;104(5):712-736.

Kim, H. J. *et al*. Structure, function, and assembly of heme centers in mitochondrial respiratory complexes. Biochim Biophys Acta. 2012;1823, 1604–1616.

Kinch, L. N. *et al*. Cloning and kinetic characterization of the *Trypanosoma cruzi* S-adenosylmethionine decarboxylase. Mol. Biochem. Parasitol. 1999;101, 1–11.

Kořený, L.; Lukeš, J.; Oborník, M. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: an essential pathway that is not essential after all? International Journal for Parasitology. 2010;40(2):149–156.

Krauth-Siegel, L.; Comini, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. Biochim Biophys Acta. 2008;1780, 1236–1248

Kumar, S.; Bandyopadhyay, U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. Toxicol Lett. 2005;157(3):175-188.

Lamour, N. *et al*. Proline metabolism in procyclic *Trypanosoma* brucei is down-regulated in the presence of glucose. J Biol Chem 2005;280:11902–10.

Lara, F. A. *et al*. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 355: 16-22.

Lazzari, C. R.; Pereira, M. H.; Lorenzo, M. G. Behavioural biology of Chagas disease vectors. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108:34-47

Leroux, A. E. *et al*. Functional characterization of NADP-dependent isocitrate dehydrogenase isozymes from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2011;177(1):61-64.

Lidani, K. C. F. *et al*. The Complement System: A Prey of *Trypanosoma cruzi*. Front Microbiol. 2017;8:607.

Lima, L. *et al*. Genetic diversity of *Trypanosoma cruzi* in bats, and multilocus phylogenetic and phylogeographical analyses supporting Tcbat as an independent DTU (discrete typing unit). Acta Tropica 2015;151, 166–177.

Lo Presti, M. S. *et al*. Trypanothione reductase inhibitors: Overview of the action of thioridazine in different stages of Chagas disease. Acta Tropica. 2015;145 79–87.

Lombardo, M. E.; Araujo, L. S.; Batlle, A. 5-Aminolevulinic acid synthesis in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. International Journal of Biochemistry and Cell Biology. 2003;35(8):1263–1271.

Lwoff, M. The nutrition of parasitic flagellates (Trypanosomidae, Trichomonadinae). In Biochemistry and Physiology of Protozoa. 1951;p. 131-182. Academic Press, New York. 131-182.

Manta, B. *et al*. Trypanothione: a unique bis-glutathionyl derivative in trypanosomatids. Biochim Biophys Acta. 2013;1830(5):3199-3216.

Mantilla, B. S. *et al*. Role of Δ1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase supports mitochondrial metabolism and host-cell invasion of *Trypanosoma cruzi*. J Biol Chem. 2015;290(12):7767-7790.

Marchese, L. *et al*. The Uptake and Metabolism of Amino Acids, and Their Unique Role in the Biology of Pathogenic Trypanosomatids. Pathogens. 2018;7(2):36.

Marchese, L. *et al*. *Trypanosoma cruzi* synthesizes proline via a Δ1-pyrroline-5-carboxylate reductase whose activity is fine-tuned by NADPH cytosolic pools. Biochem J. 2020;477(10):1827-1845.

Marciano, D.; Santana, M.; Nowicki, C. Functional characterization of enzymes involved in cysteine biosynthesis and H_2S production in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 2012;185,114–120.

Marcili, A. *et al*. A new genotype of *Trypanosoma cruzi* associated with bats evidenced by phylogenetic analyses using SSU rDNA, cytochrome b and Histone H2B genes and genotyping based on ITS1 rDNA. Parasitology. 2009;136, 641-655.

Maugeri, D. A.; Cannata, J. J.; Cazzulo, J. J. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Essays Biochem. 2011; 51:15-30.

Maugeri, D. A.; Cazzulo, J. J. The pentose phosphate pathway in *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 2004;234(1):117-123.

McCabe, R. E.; Mullins, B. T. Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune evasion and importance of oxygen-independent killing. J Immunol. 1990; 144(6):2384–8.

Medlockm, A. E.; Dailey, H. A. Tetrapyrroles. In: Warren MJ, Smith AG, editors. Tetrapyrroles: Birth, Life and Death. Austin, Tex, USA: Landes Bioscience; 2007. pp. 116–127.

Melo, R. F. P.; Guarneri, A. A.; Silber, A. M. The Influence of Environmental Cues on the Development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae Vector. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020;10:27.

Menna-Barreto, R. F.; de Castro, S. L. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: the pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. Biomed Res Int. 2014;2014:614014.

Mense, S. M.; Zhang, L. Heme: A versatile signaling molecule controlling the activities of diverse regulators ranging from transcription factors to map kinases. Cell Res. 2006;16, 681–692.

Mesías, A. C.; Garg, N. J.; Zago, M. P. Redox Balance Keepers and Possible Cell Functions Managed by Redox Homeostasis in *Trypanosoma cruzi*. Front Cell Infect Microbiol. 2019;9:435.

Millerioux Y. *et al*. The threonine degradation pathway of the *Trypanosoma brucei* procyclic form: The main carbon source for lipid biosynthesis is under metabolic control. Mol Microbiol. 2013, 90, 114–129.

Mittra, B. *et al*. Iron uptake controls the generation of Leishmania infective forms through regulation of ROS levels. The Journal of experimental medicine. 2013;210(2):401–16.

Mittra, B. *et al*. The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes Leishmania virulence. J Biol Chem. 2017;292: 12324–12338.

Montamat, E. E.; Arauzo, S. S.; Blanco, A. Subcellular localization of leucine aminotransferase and alpha-hydroxyacid dehydrogenase in *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1987;22(2-3):185-193.

Moreira, D.; López-García, P.; Vickerman, K. An updated view of kinetoplastid phylogeny using environmental sequences and a closer outgroup: proposal for a new classification of the class Kinetoplastea. Int J Syst Evol Microbiol. 2004;54(Pt 5):1861-1875.

Moreno, S. N.; Docampo, R. The role of acidocalcisomes on parasitic protists. J Eukaryot Microbiol. 2009;56(3): 208-213.

Mullen, A. R. *et al*. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. Nature. 2011;481(7381):385-388.

Nogueira, N. P. *et al*. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. Free Radic Biol Med. 2017;108183–191.

Nogueira, N. P. *et al*. Proliferation and Differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside Its Vector Have a New Trigger: Redox Status. PLoS One. 2015; 10: e0116712.

Nogueira, N. P. *et al*. Heme-induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates CaMKII-like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. PLoS One. 2011;6: e25935.

Nowicki, C.; Cazzulo, J. J. Aromatic amino acid catabolism in trypanosomatids. Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol. 2008;151(3):381-390.

Nowicki, C. *et al*. Presence and subcellular localization of tyrosine aminotransferase and p-hydroxyphenyllactate dehydrogenase in epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 1992;71(2):119-124.

Olin-Sandoval, V.; Moreno-Sánchez, R.; Saavedra, E. Targeting trypanothione metabolism in trypanosomatid human parasites. Curr Drug Targets. 2010;11(12):1614-1630.

Olszewski, K. L. *et al*. Branched tricarboxylic acid metabolism in *Plasmodium falciparum*. Nature. 2010;466, 774–778.

Paes, M. C. *et al*. Gene expression profiling of *Trypanosoma cruzi* in the presence of heme points to glycosomal metabolic adaptation of epimastigotes inside the vector. PLoS Negl Trop Dis. 2020;14(1):e0007945.

Paes, L. S. *et al*. Proline dehydrogenase regulates redox state and respiratory metabolism in *Trypanosoma cruzi*. PLoS ONE 2013, 8.

PAHO. Chagas in the Americas for the General Public; 2017. Acessado em Maio de 2020 no endereço https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2017/2017-cha-chagas-factsheet-pub.pdf

Paiva, C. N.; Bozza, M. T. Are reactive oxygen species always detrimental to pathogens? Antioxid Redox Signal. 2014;20(6):1000–37.

Paiva, C. N. *et al*. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J Clin Invest. 2012;122(7):2531-2542.

Paiva, C. N,; Medei, E.; Bozza, M. T. ROS and *Trypanosoma cruzi*: Fuel to infection, poison to the heart. PLoS Pathog. 2018;14(4): e1006928.

Paulin, J. J. The chondriome of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. J Cell Biol. 1975;66(2):404-413.

Pereira, M. G. *et al*. *Trypanosoma cruzi* epimastigotes are able to store and mobilize high amounts of cholesterol in reservosome lipid inclusions. PloS one. 2011;6(7):e22359.

Pereira, C. A. *et al*. *Trypanosoma cruzi* arginine kinase characterization and cloning. A novel energetic pathway in protozoan parasites. J. Biol. Chem. 2000;275, 1495–1501.

Pereira, C. A. *et al*. Arginine kinase: A common feature for management of energy reserves in African and American flagellated trypanosomatids. J. Eukaryot. Microbiol. 2002;49, 82–85.

Perez, C. J.; Lymbery, A. J.; Thompson, R. C. A. Reactivation of Chagas Disease: Implications for Global Health. Trends Parasitol. 2015;31(11):595-603.

Pérez-Molina, J. A.; Molina, I. Chagas disease. The Lancet. 2018;S0140-6736(17)31612-4.
Ponka P. Cell biology of heme. Am. J. Med. Sci. 1999;318, 241–256.

Puustinen, A.; Wikstrom, M. The heme groups of cytochrome o from *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1991;88, 6122–6126.

Quiñones, W. *et al*. Structure, Properties, and Function of Glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. Front. Cell. Infect. Microbiol. 2020;10:25.

Rassi, A. Jr.; Rassi, A.; Marin-Neto, J. A. Chagas disease. Lancet. 2010;375(9723): 1388-13402.

Reddi, A. R.; Hamza, I. Heme Mobilization in Animals: A Metallolipid's Journey. Acc Chem Res. 2016;49(6):1104-1110.

Reguera, R. M. *et al*. S-adenosylmethionine in protozoan parasites: Functions, synthesis and regulation. Mol. Biochem. Parasitol. 2007;152, 1–10.

Rivière, L. *et al*. Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(31):12694-12699.

Rivière, L. *et al*. Acetyl:succinate CoA-transferase in procyclic *Trypanosoma brucei*. Gene identification and role in carbohydrate metabolism. J. Biol. Chem. 2004;279, 45337–45346

Rohloff, P.; Rodrigues, C. O.; Docampo, R. Regulatory volume decrease in *Trypanosoma cruzi* involves amino acid efflux and changes in intracellular calcium. Mol. Biochem. Parasitol. 2003; 126, n. 2, p219-30.

Ryter, S. W.; Tyrrell, R. M. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. Heme oxygenase has both pro- and antioxidant properties. Free Radic Biol Med. 2000;28(2):289-309.

Salzman, T. A. *et al*. Porphyrin biosynthesis in parasitic hemoflagellates: Functional and defective enzymes in *Trypanosoma cruzi*. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B. 1982;72(4):663–667

Sayé, M. *et al*. 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.

Schaub, G. A. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector Triatoma infestans. Exp. Parasitol. 1989;68, 260–273.

Schieber, M.; Chandel, N. S. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol. 2014;24(10):R453-R462.

Schmitt, T. H.; Frezzatti, W. A.; Schreier, S. Heme-induced lipid membrane disorder and increased permeability: A molecular model for the mechanism of cell lysis. Arch Bioch Biophys. 1993;307(1): 96-103.

Severance, S.; Hamza, I. Trafficking of heme and porphyrins in metazoa. Chem. Rev. 2009;109, 4596–4616.

Silber, A. M. *et al*. Amino acid metabolic routes in *Trypanosoma cruzi*: possible therapeutic targets against Chagas' disease. Curr Drug Targets Infect Disord. 2005;5(1):53-64.

Silber, A. M. *et al*. Glucose uptake in the mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 2009;168(1):102-108.

Silva, T. M. *et al*. O_2 consumption rates along the growth curve: new insights into *Trypanosoma cruzi* mitochondrial respiratory chain. J. Bioenerg. Biomembr. 2011;43, 409–417.

Simpsom, A. G. B; Stevens, J. R.; Lukes, J. The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates. Trends Parasitol. 2006;22: 168-174.

Soares, M. J.; De Souza, W. Endocytosis of gold-labeled proteins and LDL by *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 1991;77:461–468

Soares, M.J. *et al*. A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 1989; 75(7):522–7.

Souza, C. F. *et al*. Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. Biochem Byophis Res Commun. 2009;390: 541–546.

Stanaway, J. D.; Roth, G. The burden of Chagas disease: estimates and challenges. Glob. Heart. 2015;10, 139-144.

Stibbs, H. H.; Seed, J. R. Metabolism of tyrosine and phenylalanine in *Trypanosoma brucei* gambiense. Int. J. Biochem. 1975;6, 197–203.

Stuart, K.; Feagin, J. E. Mitochondrial DNA of Kinetoplastids. Int Rev Cytol. 1992; 141: 65-88.

Sun, F.; Cheng, Y.; Chen, C. Regulation of heme biosynthesis and transport in metazoa. Sci. ChinaLifeSci. 2015;58, 757–764.

Swenson, S. A. *et al*. From Synthesis to Utilization: The Ins and Outs of Mitochondrial Heme. Cells. 2020;9(3):579.

Sylvester, D.; Krassner, S. M. In, P.M. Proline metabolism in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Comp. Biochem. Physiol. Part B Biochem. 1976;55, 443–447.

Teixeira, D. E.; Benchimol, M.; Crepaldi, P. H. Atlas didático: Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*. 50 p., Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, Rio de Janeiro, Brasil, 2011.

Teng, Q. Structural Biology: Practical NMR Applications. 2013;10.1007/978-1-4614-3964-6.

The Lancet. Chagas disease: still a neglected emergency. Lancet. 2019;394: 1592.

Tomás, A. M.; Castro, H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. Antioxid Redox Signal. 2013;19(7):696-707.

Tonelli, R. R. *et al*. L-proline is essential for the intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Microbiol. 2004;6(8):733-741.

Tripodi, K. E.; Menendez Bravo, S. M.; Cricco, J. A. Role of heme and heme-proteins in trypanosomatid essential metabolic pathways. Enzyme Res. 2011;2011:873230.

Tsiftsoglou, A. S.; Tsamadou, A. I.; Papadopoulou, L. C. Heme as key regulator of major mammalian cellular functions: Molecular, cellular, and pharmacological aspects. Pharmacol Ther. 2006;111, 327–345.

Tyler, K. M.; Engman, D. M. The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int J Parasitol. 2001;31, 472–481.

Urbina, J. A.; Osorno, C. E.; Rojas, A. Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes by 3-mercaptopicolinic acid: in vitro and in vivo studies. Arch Biochem Biophys. 1990;282: 91-99.

Valko, M. *et al*. Redox- and non-redox-metal-induced formation of free radicals and their role in human disease. Arch Toxicol. 2016;90, 1–37.

Van Hellemond, J. J.; Opperdoes, F. R.; Tielens, A. G. Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95(6):3036-3041.

Van Weelden, S. W. *et al*. New functions for parts of the Krebs cycle in procyclic *Trypanosoma brucei*, a cycle not operating as a cycle. J Biol Chem. 2005;280(13):12451-12460.

Vickerman, K. Phylum Zoomastigina - Class Kinetoplastida. *In*: Handbook of Protoctista. p. 215-238, James and Bartlett Publishers, Boston, 1990.

Wang, X.; Hai, C. Novel insights into redox system and the mechanism of redox regulation. Mol Biol Rep. 2016;43, 607–628.

WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis) - Updated in March 2020: Acesso em maio de 2020 no endereço http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/.

WHO. Neglected Tropical Disease - Updated in 2019: Acessado em maio de 2020 no endereço https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

Zingales, B. *et al*. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009;104(7):1051-1054.

Zingales, B. *et al*. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: rationale, epidemiological relevance and research applications. Infect Genet Evol. 2012;12, 240-253.

Zingales, B. *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: something new for something known about Chagas disease manifestations, serodiagnosis and drug sensitivity. Acta Tropica. 2018;v. 184, p. 38-52.

Zuzarte-Luís, V.; Mota, M. M. Parasite Sensing of Host Nutrients and Environmental Cues. Cell Host Microbe. 2018;23(6):749-758.