



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Orlando Soares Louzada Neto

**Papel da TcPI3K na expressão gênica e no metabolismo energético de
Trypanosoma cruzi exposto à molécula de heme**

Rio de Janeiro
2022

Orlando Soares Louzada Neto

**Papel da TcPI3K na expressão gênica e no metabolismo energético de
Trypanosoma cruzi exposto à molécula de heme**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Maria Rossini Teixeira

Coorientadora: Prof.^a Dra. Marcia Cristina Paes

Rio de Janeiro

2022

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

L895 Louzada Neto, Orlando Soares.
Papel da TcPI3K na expressão gênica e no metabolismo energético de *Trypanosoma cruzi* exposto à molécula de heme / Orlando Soares Louzada Neto. - 2022.
99 f.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Maria Rossini Teixeira
Coorientador: Prof.^a Dra. Marcia Cristina Paes

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

1. *Trypanosoma cruzi* – Genética. 2. Metabolismo energético – Teses. 3. Expressão gênica – Teses. 4. Fosfatidilinositol 3-Quinases – Antagonistas & inibidores. I. Teixeira, Ana Maria Rossini. II. Paes, Marcia Cristina. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 576.893.161.13

Bibliotecário: Felipe Caldonazzo
CRB7/7341

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

Assinatura

Data

Orlando Soares Louzada Neto

**Papel da TcPI3K na expressão gênica e no metabolismo energético de
Trypanosoma cruzi exposto à molécula de heme**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências, da
Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 01 de novembro de 2022.

Orientadora: Prof.^a Dra. Ana Maria Rossini Teixeira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Coorientadora: Prof.^a Dra. Márcia Cristina Paes
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes – UERJ

Banca Examinadora: _____

Prof.^a Dra. Georgia Correa Atella
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Natália Pereira de Almeida Nogueira
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof. Dr. André Luiz Mencialha
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Rio de Janeiro

2022

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Maria Aparecida e Waldomiro, que pouco puderam estudar para que seus três filhos, hoje pós-graduados, o fizessem.

AGRADECIMENTOS

À Prof.^a Dra. Ana Rossini, pela orientação acadêmica desde o ano de 2014, por dispor muitas vezes de recursos pessoais para que esta tese fosse finalizada, por ajudar a moldar o professor de bioquímica que sou hoje, pela paciência e tolerância quando deixei a desejar, por me fazer recordar com frequência que tudo se ajeita e que o tempo nunca falha em suas habilidades, e por todos os conselhos, carinhos, atenção e conversas sem os quais este seria apenas um trabalho acadêmico;

À Prof.^a Dra. Marcia Paes, por aceitar a coorientação desta tese em um momento tão delicado de nossas vidas, pelas discussões dos resultados (e de teorias de A Roda do Tempo), pelas preocupações com meu futuro, pelas ideias e pelos aprendizados que agora carrego, e por permitir que eu “parasitasse” eventualmente os recursos e o espaço de seu laboratório;

À Prof.^a Dra. Natália Nogueira, pelas discussões de resultados, por todo o auxílio na realização experimental e análises da respirometria de alta resolução, pelas sessões de terapia e picolés de limão entre os tempos de adição dos moduladores mitocondriais, pela revisão desta tese e pela participação na banca examinadora da mesma;

À Prof.^a Dra. Georgia Atella e à Prof.^a Dra. **Silvia Amaral pela participação na comissão avaliadora desta tese**, e pelas contribuições ao trabalho que podem surgir;

Ao Prof. Dr. André Mencalha, por sua disponibilidade em nos ajudar durante o processo de troca de projeto, e pela participação na banca examinadora da qualificação e da tese finalizada;

À Prof.^a Dra. **Tatiana Simão**, pela atenção, ajuda, material, carinho e café disponibilizados ao longo dos últimos quatro anos, e **pela participação na banca deste trabalho**;

Ao Prof. Dr. Rodolpho Albano, pelo material fornecido para a realização dos experimentos de biologia molecular;

Ao Prof. Dr. Gilson Santos Júnior, por todo o auxílio na realização, nas análises e na discussão da metabolômica (além das caronas até a UFRJ);

Aos integrantes presentes e passados do Lab. de Toxicologia e Biologia Molecular: Maira Lopes, Karina Gomes, Sarah Bittler, Caroline Assis, Lilian Brewer e Patrícia Moura. Em especial, agradeço à Jennifer Vieira, que nem sempre soube como me ajudar com experimentos dando errado, mas que sempre soube como me fazer esquecê-

los comendo frango frito de graça com chá de *cramberry*, e à Denise Neves, que, além de ter sido uma “mãe de laboratório” inovadora e revolucionária, soube como me ajudar a lidar com experimentos dando errado: aumentando a expressão de álcool-desidrogenase no meu fígado através de doses frequentes de etanol 9%;

Às meninas do Lab. de Interação de Tripanossomatídeos e Vetores, que permitiram que eu fosse o “bendito é o fruto” por muito tempo, especialmente: Carol Vieira, por me ajudar, literalmente, com todos os experimentos, e por ser a melhor companhia para passar células e fazer um treino pós-expediente; Francis Saraiva, pela amizade, pela atenção mesmo tão distante e por ser tão paciente ao ensinar uma pessoa medrosa e hipocondríaca a manusear um parasito;

Aos integrantes do Lab. de Farmacologia Celular e Molecular, por permitirem que eu abrisse o freezer – 80°C em horários não convencionais e por serem atenciosos sempre que eu pedia socorro ou ajuda com algum equipamento. Em especial, agradeço à Ágatha, à Carolina e ao Genilson;

À coordenação e aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biociências;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo fomento deste trabalho;

Aos professores, funcionários e alunos do Departamento de Bioquímica;

Aos funcionários do Lab. Nacional de Ressonância Magnética da UFRJ;

Aos amigos que a pós-graduação e UERJ me presentearam: Thayane Vieira, Bianca Abdala e Isadora Andrade, sempre disponíveis para emprestar um reagente, fazer um seminário, abrir um freezer – 80°C ou tomar um sorvete reclamando das nossas péssimas escolhas de vida; aos amigos Ana Carolina Madeira, Vinicius Souza, Rafaela Caruso, Amanda Alencar e Michelle Mesquita que, muito ou pouco, se fizeram presentes acompanhando este longo drama de quatro anos;

E àqueles que provavelmente não entenderão muito dessa tese, mas que regozijarão do benefício de nunca mais me ouvirem murmurando sobre nuances incompreensíveis da mesma: meus pais, Maria Aparecida e Waldomiro Louzada, por serem os pais mais amorosos e compreensivos que alguém poderia desejar ter; aos meus irmãos, Rolandra e Jorlandro Louzada, que desde cedo foram minha inspiração educacional; aos amigos Bruno Pivatto, Júlia Nascimento e Pedro Motta, por não desistirem de mim, por me lembrarem que por mais que brinquemos de poder conduzir o

destino, nunca houve rédeas e ninguém monta na vida, e por serem meus psicólogos não remunerados; e ao Matheus Vaz, que é meu psicólogo remunerado.

[...] poderia tantas coisas se pudesse. Mas só pôde o que fez. Quem vê de fora faz arranjos melhores, mas é dentro, bem no lugar que a gente não vê, que o não dar conta ocupa tudo.

Carla Madeira

RESUMO

LOUZADA NETO, Orlando Soares. **Papel da TcPI3K na expressão gênica e no metabolismo energético de *Trypanosoma cruzi* exposto à molécula de heme.** 2022. 99 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

A forma epimastigota do *Trypanosoma cruzi*, agente causador da doença de Chagas, enfrenta alterações ambientais no intestino do inseto vetor durante seu ciclo de vida. Nesse compartimento há alto conteúdo de carboidratos, lipídeos e aminoácidos, fornecidos pela digestão do sangue, além de grande quantidade de heme proveniente da degradação de hemoglobina. A molécula de heme é responsável por desencadear alterações significativas na fisiologia da forma epimastigota, o que inclui o metabolismo energético, a expressão gênica e a proliferação celular. Ao estimular a expressão de genes da glicólise e da fermentação aeróbica, e diminuir a fosforilação oxidativa produzindo espécies reativas de oxigênio, a teoria de que a obtenção de energia pelo glicosoma sobre a síntese de ATP pela mitocôndria é sustentada. Entretanto, as vias de sinalização que convertem os estímulos exteriores e interiores à célula em tais alterações biológicas permanecem por serem elucidados. Em eucariotos, a via de sinalização por fosfatidilinosítídeos é responsável por regular diversas funções celulares, incluindo o metabolismo e a expressão gênica. Em *T. cruzi*, fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato é um segundo mensageiro que pode ser convertido em fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato, por uma TcPI3K, ou em diacilglicerol e inositol-1,4,5-trifosfato, pela fosfolipase C. No presente trabalho, é avaliada a influência da inibição de TcPI3K sobre a proliferação, o metabolismo e a expressão gênica de *T. cruzi* com o objetivo de verificar se tais processos podem ser regulados por fosfatidilinosítídeos como em outros eucariotos. Para tal, a forma epimastigota foi cultivada por 7 dias com heme e/ou Ly294002, um inibidor de PI3K. A expressão dos genes de sinalização (*TcPI3K*, *TcDAGK*, *TcCaM*) e dos genes do metabolismo energético (*TcPPDK*, *TcPEPCK*, *TcFRD*, *TcMDH*, *TcST* e *TcME*) foi avaliada por qPCR e apresentou-se diminuída na presença do inibidor, o que não foi revertido por heme. A respiração mitocondrial, verificada por respirometria de alta resolução, foi diminuída pela inibição de TcPI3K, entretanto, a quantidade de ATP intracelular e a proliferação não variaram em nenhum dos grupos de tratamento. A metabolômica do meio extracelular realizada por ressonância magnética nuclear demonstrou que heme aumenta a captação celular de glicose e outras hexoses, glutamato, fenilalanina e BCAA, mas que tal captação é diminuída na presença do inibidor, sugerindo papel da TcPI3K na captação dessas fontes de carbono. A síntese de alanina e de succinato não variou na presença da droga. Coletivamente, os resultados sugerem que o correto funcionamento de TcPI3K é necessário à respiração mitocondrial, à captação de nutrientes e à correta expressão gênica.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. PI3K. Heme. Metabolismo energético. Expressão gênica.

ABSTRACT

LOUZADA NETO, Orlando Soares. **Role of TcPI3K on energy metabolism and gene expression of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes exposed to heme.** 2022. 99 f. Tese (Doutorado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2022.

The epimastigote form of *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas' disease, faces environmental changes during its life cycle inside the digestive tract of the insect vector. Within this compartment, there are high amounts of carbohydrates, lipids, and amino acids of blood digestion, besides a high concentration of heme from hemoglobin degradation. Heme molecule triggers significant changes in epimastigotes physiology, including energy metabolism, gene expression, and cell proliferation. This molecule increases the gene expression of glycolysis and aerobic fermentation, and decreases oxidative phosphorylation producing reactive oxygen species, supporting the theory of glycosomal synthesis of ATP over mitochondrial respiration. However, the signaling pathways involved in the recognition of external and internal signals and their translation to such biological changes remain to be clear. In eukaryotes, phosphatidylinositol signaling pathway is involved in several cell processes, including gene expression and metabolism. In *T. cruzi*, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is a second messenger that can either be converted by TcPI3K on phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate, or on diacylglycerol and inositol-1,4,5-trifosphate by phospholipase C. In this work, the role of TcPI3K on proliferation, metabolism, and gene expression of *T. cruzi* were evaluated, aiming to find if those processes are regulated by phosphatidylinositides like in other eukaryotes. Thus, epimastigote forms were cultivated for 7 days with and/or without heme and Ly294002, a PI3K inhibitor. Signaling pathway genes (TcPI3K, TcDAGK, TcCaM) and energy metabolism genes (*TcPPDK*, *TcPEPCK*, *TcFRD*, *TcMDH*, *TcST* e *TcME*) tested by qPCR were downregulated by the inhibitor, an effect heme was not able to revert. Mitochondrial respiration, tested by high-resolution respirometry, decreased with TcPI3K inhibition, but not intracellular ATP content and cell proliferation in either treatment group. Metabolomics of extracellular medium performed by magnetic nuclear resonance showed an increase in internalization of glucose, hexoses, glutamate, phenylalanine, and BCAA, but this profile was reversed by Ly294002, suggesting a role of TcPI3K on such uptake. The synthesis of alanine and succinate did not change in the presence of the drug. Collectively, the results suggest that a working TcPI3K is involved in mitochondrial respiration, on nutrient uptake, and on correct gene expression process.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*. PI3K. Heme. Energy metabolism. Gene expression.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Manifestação clínica da doença de Chagas por período de tempo.....	20
Figura 2 –	Incidência da doença de Chagas aguda por região geográfica do Brasil (por 100 mil habitantes)	20
Figura 3 –	Fotomicrografia da forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	21
Figura 4 –	Representação ilustrativa da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	22
Figura 5 –	Ciclo biológico do <i>T. cruzi</i> com transmissão vetorial.....	24
Figura 6 –	Estrutura química da molécula de heme.....	25
Figura 7 –	Representação dos genes do metabolismo energético em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> diferencialmente expressos em função do tratamento com a molécula de heme.....	28
Figura 8 –	Representação esquemática da regulação da expressão gênica em <i>T. cruzi</i>	30
Figura 9 –	Representação do metabolismo de glicose e do ciclo do ácido cítrico na forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	32
Figura 10 –	Representação esquemática do sistema de transporte de elétrons na forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	35
Figura 11 –	Possíveis fosfatidilinosítídeos encontrados nas células por interconversão através de PIKs.....	37
Figura 12 –	Formação de Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato na face interna da membrana plasmática e seus alvos regulatórios em mamíferos.....	39
Figura 13 –	Atividades descritas de PIKs em <i>T. cruzi</i>	41
Figura 14 –	Via de sinalização por fosfatidilinosítídeos proposta em <i>T. cruzi</i> de acordo com a plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes...	51
Figura 15 –	Representação esquemática dos efeitos de heme e Ly294002 sobre a expressão gênica e sobre o metabolismo energético da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i>	86
Figura 16 –	Obtenção de ATP pela forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> na presença de heme ou de Ly294002.....	88

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 –	Comparação da expressão dos genes <i>TcCaM</i> , <i>TcDAGK</i> , <i>TcPI3K</i> por qPCR e no RNAseq.....	52
Gráfico 2 –	Variação da expressão gênica de <i>TcCaM</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	54
Gráfico 3 –	Variação da expressão gênica de <i>TcDAGK</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	55
Gráfico 4 –	Variação da expressão gênica de <i>TcPI3K</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	56
Gráfico 5 –	Comparação da expressão diferencial no RNAseq e por qPCR para os genes de fermentação de succinato, síntese glicossomal de alanina, transporte de açúcares e enzima málica.....	58
Gráfico 6 –	Variação da expressão gênica de <i>TcPPDK</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	60
Gráfico 7 –	Variação da expressão gênica de <i>TcPEPCK</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	61
Gráfico 8 –	Variação da expressão gênica de <i>TcMDH</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	62
Gráfico 9 –	Variação da expressão gênica de <i>TcFRD</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	63
Gráfico 10 –	Variação da expressão gênica de <i>TcME</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	64
Gráfico 11 –	Variação da expressão gênica de <i>TcST</i> em epimastigotas de <i>T. cruzi</i> na presença de heme e/ou Ly294002.....	65
Gráfico 12 –	Variação na taxa do consumo de oxigênio pela mitocôndria de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> tratados com heme e/ou Ly294002 na presença de Oligomicina, FCCP e Antimicina A.....	68
Gráfico 13 –	Concentração de ATP intracelular nas formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> expostas ao heme, ao inibidor Ly294002 e a	

	ambos.....	69
Gráfico 14 –	Proliferação da forma epimastigota de <i>T. cruzi</i> ao longo de 7 dias na presença de heme 30 μ M e/ou Ly294002 20 μ M.....	70
Gráfico 15 –	Carboidratos identificados por RMN no sobrenadante de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 7 dias de tratamento.....	73
Gráfico 16 –	Avaliação da quantidade de acetato, succinato, fumarato e alanina presentes no meio sobrenadante de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> após 7 dias de tratamento.....	74
Gráfico 17 –	Avaliação da quantidade dos aminoácidos Arg, Asp, BCAA, Betaína, Fen e His por RMN presentes no meio sobrenadante de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por RMN após 7 dias de tratamento.....	75
Gráfico 18 –	Avaliação da quantidade dos aminoácidos Lis, Met, Pro, Tre, Tyr e Trp por RMN presentes no meio sobrenadante de epimastigotas de <i>T. cruzi</i> por RMN após 7 dias de tratamento.....	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Genes e sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR.	47
Tabela 2 –	Genes envolvidos na via PIK em <i>T. cruzi</i>	50
Tabela 3 –	Porcentagens médias do total de células ao sétimo dia.....	71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATP	Adenosina trifosfato
DC	Doença de Chagas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico (do inglês, <i>Desoxiribonucleic Acid</i>)
DTU	<i>Discrete Typing Units</i>
FADH	Flavina Adenina Dinucleotídeo
FCCP	Carbonil Cianeto p-trifluormetoxifenil-hidrazona
kDNA	DNA do citenoplasto (do inglês, <i>kinetoplast DNA</i>)
mRNA	RNA mensageiro (do inglês, <i>Messenger RNA</i>)
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo oxidada
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo reduzida
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEP	Fosfoenolpiruvato
PI	Fosfoatidilinosítídeo
PtdIns	Fosfatidilinositol
RBP	Proteína de Ligação ao RNA (do inglês, <i>RNA binding Protein</i>)
ROS	Espécie Reativa de oxigênio (do inglês, <i>Reactive Oxygen Specie</i>)
rpm	Rotações por minuto
SG	Grânulo de estresse
STE	Sistema de Transporte de Elétrons
UCP	Proteínas Desacopladoras (do inglês, <i>Uncoupling Proteins</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
×	Multiplicação
U\$	Dólar americano

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	18
1	OBJETIVOS	43
1.1	Geral	43
1.2	Específicos	43
2	METODOLOGIA	44
2.1	Cultivo celular de epimastigotas de T. cruzi	44
2.2	Tratamentos	44
2.3	Proliferação celular	44
2.4	Respirometria de alta resolução	45
2.5	Dosagem de ATP intracelular	45
2.6	Extração de RNA, síntese de cDNA e expressão gênica	46
2.7	Ressonância Magnética Nuclear	48
2.8	Tratamento estatístico dos dados	48
3	RESULTADOS	49
3.1	Genes envolvidos na sinalização por fosfatidilinosítídeos estão diferencialmente expressos após o tratamento com heme	49
3.2	A expressão dos genes TcPI3K, TcDAGK e TcCaM foi validada por qPCR .	49
3.3	O efeito do inibidor Ly294002 sozinho e em conjunto ao heme sobre a expressão dos genes de sinalização TcCaM, TcDAGK e TcPI3K	52
3.4	Comparação da expressão gênica de TcPPDK, TcPEPCK, TcMDH, TcFRD, TcME e de TcST por qPCR e no RNAseq	56
3.5	Efeitos do inibidor de TcPI3K sobre a expressão dos genes de metabolismo energético	59
3.6	Efeitos do tratamento com heme e/ou Ly294002 sobre a respiração mitocondrial	66
3.7	Variação da concentração de ATP em epimastigotas de T. cruzi expostos ao inibidor Ly294002 sozinho e na presença do heme	68
3.8	Efeitos de Ly294002 sozinha e em adição ao heme na proliferação da forma epimastigota	70
3.9	Metabólitos presentes no meio de cultura após 7 dias de crescimento na presença do inibidor Ly294002 sozinho e em adição de heme	71

4	DISCUSSÃO	77
	CONCLUSÕES	89
	REFERÊNCIAS	90

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas

A tripanossomíase americana, ou doença de Chagas (DC), é uma parasitose causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Na atualidade, a DC integra a lista das vinte doenças tropicais negligenciadas criada pela Organização Mundial de Saúde (OMS). Segundo essa organização, doenças tropicais negligenciadas são enfermidades causadas por agentes infecciosos em regiões geográficas quentes e úmidas que acometem, majoritariamente, populações de baixa renda (WHO, 2021). Adicionalmente, estas doenças também não possuem tratamentos considerados seguros e eficazes ou investimento adequado pelas repartições governamentais na pesquisa básica e no controle da transmissão das mesmas. Por consequência, caracterizam um problema de saúde pública em especial para populações em vulnerabilidade social (FEASEY et al., 2009; WHO, 2021).

A DC, seu agente causador e a forma de transmissão foram descritos no ano de 1909, pelo médico sanitarista Carlos Chagas, após uma doença até então desconhecida, todavia similar à malária, acometer trabalhadores envolvidos na construção da Estrada de Ferro Central do Brasil no estado de Minas Gerais, Brasil (CHAGAS, 1909). Embora o primeiro paciente portador de DC tenha sido documentado apenas em 1916, acredita-se que o naturalista britânico Charles Darwin tenha contraído a doença durante sua passagem pela América do Sul no século anterior (BERNSTEIN; FRCPATH2, 1984). Em 1835, durante sua estadia no vilarejo de Luján de Cuyo, na região de Mendoza, Argentina, Darwin registrou a presença do inseto hematófago triatomíneo que seria apontado por Chagas como vetor da DC (CHAGAS, 1909; DARWIN, 2001; STEVERDING, 2014).

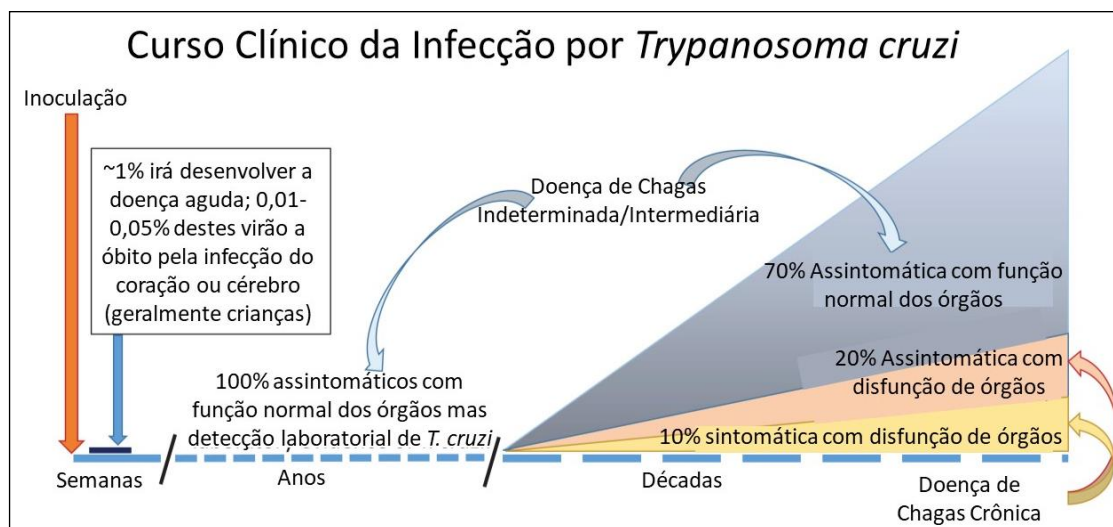
Anteriormente à colonização da América Latina, o *T. cruzi* já circulava entre populações indígenas nativas. Acredita-se que o parasito infectava pequenos mamíferos que conviviam em seu habitat com triatomíneos hematófagos, popularmente conhecidos como barbeiros (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020). Há mais de 130 espécies descritas de triatomíneos distribuídas geograficamente da Argentina ao sul dos Estados Unidos da América (GALVÃO et al., 2003). Com o avanço dos processos de colonização e consequente exploração dos recursos naturais das Américas, parte dessas espécies adaptou-se totalmente ao ambiente das moradias rústicas da época, facilitando a transmissão da DC ao ser humano (CHAO; LEONE; VIGLIANO, 2020).

Tradicionalmente, no passado, a DC era confinada a regiões pobres e rurais das Américas Centrais e do Sul em virtude das baixas condições de moradia que facilitavam a transmissão pelos insetos vetores. Por estes motivos, a doença é fortemente associada ao desenvolvimento socioeconômico local, sendo, primariamente, endêmica de países em desenvolvimento das Américas em reflexo da história social destes, como evidenciado no Brasil (CORASSA et al., 2017). A migração de áreas rurais para áreas urbanas e a posterior globalização, acrescida da transmissão não vetorial, favoreceram que a doença se espalhasse para a Europa, para a Ásia e para a América do Norte, alterando a distribuição epidemiológica da DC (BOWMAN et al., 2008; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

As manifestações clínicas da DC abrangem uma fase aguda e uma fase crônica (Figura 1). Na maioria dos casos, a fase aguda é assintomática, dificultando o diagnóstico no início da enfermidade. Nessa fase, os protozoários podem ser encontrados na corrente sanguínea e em células fagocíticas, decaindo em quantidade após 90 dias. Os sintomas mais comuns, se presentes, são febre, mal-estar, inflamação da região onde ocorreu a picada do triatomíneo e edema unilateral palpebral, caso a via de inoculação seja a conjuntiva ocular (sinal de Romaña) (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). A fase aguda dura de 4 a 8 semanas e menos de 5% dos pacientes apresentam as manifestações mais graves, que incluem miocardite aguda e meningoencefalite. Essa fase costuma se resolver espontaneamente em pouco tempo, dando início a uma fase crônica (PINTO et al., 2008; PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018). Já nessa última, cerca de 35% dos pacientes desenvolvem alterações em órgãos, tais como cardiomiopatia, megaesôfago e megacólon, de 10 a 30 anos após a infecção aguda. Devido à diminuição da parasitemia, o diagnóstico nessa fase torna-se complicado, sendo realizado através de sorologia, histologia e exames de imagem capazes de demonstrarem alterações morfológicas nos órgãos (PÉREZ-MOLINA; MOLINA, 2018).

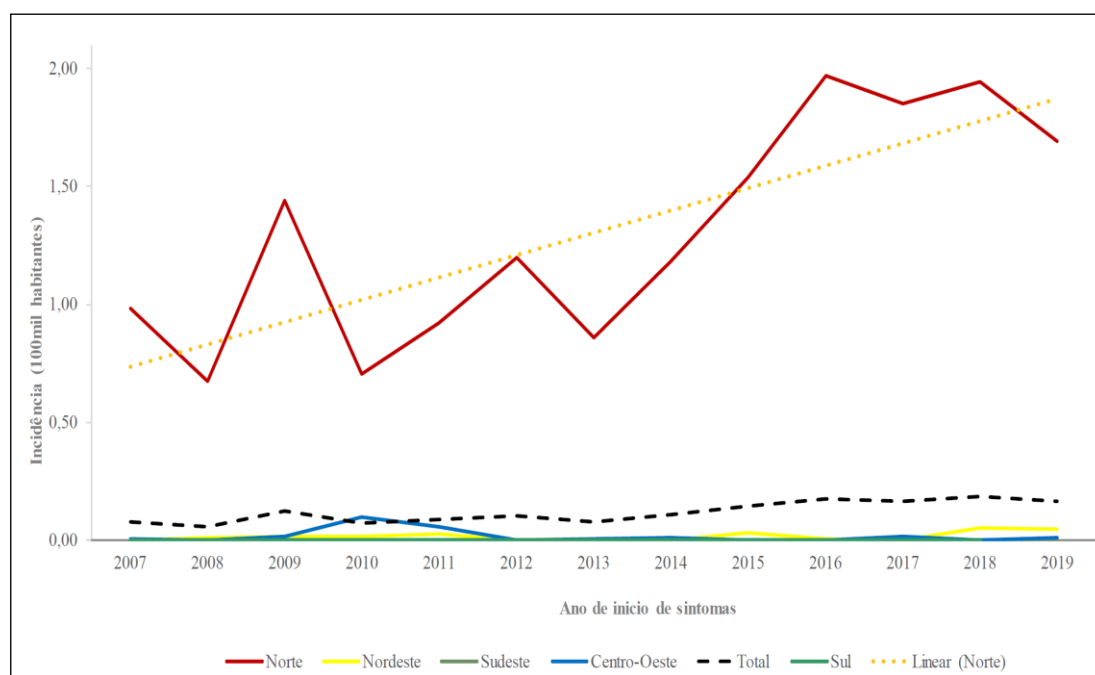
Na atualidade, embora ainda endêmica da América Latina, a OMS estima que 8 milhões de pessoas ao redor do mundo estejam infectadas com *T. cruzi* e que cerca de 10.000 mortes ocorram por ano em virtude da DC (WHO, 2021). Somente no ano de 2018, foram reportados mais de 4600 casos suspeitos de DC no Brasil, distribuídos em 66 municípios. Mais de 76% dos casos foram registrados no estado do Pará (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2020). De fato, a região norte apresenta os maiores valores de incidência de DC (Figura 2). Embora o Ministério da Saúde tenha estimado em 2020 cerca de 1 milhão de pessoas infectadas no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE DO BRASIL, 2020), um estudo conduzido em 2013 estimou que 4,6 milhões de pessoas eram portadoras do *T. cruzi* no país (MARTINS-MELO et al., 2014).

Figura 1: Manifestação clínica da doença de Chagas por período de tempo.



Fonte: Adaptado de Guarner, 2019.

Figura 2: Incidência da doença de Chagas aguda por região geográfica do Brasil (por 100 mil habitantes).



Nota: Levantamento realizado pelo Ministério da Saúde do Brasil entre os anos de 2007 e 2017, com base no ano de início dos sintomas e local de residência dos pacientes no momento.

Fonte: Reproduzido de Ministério da Saúde do Brasil, 2020.

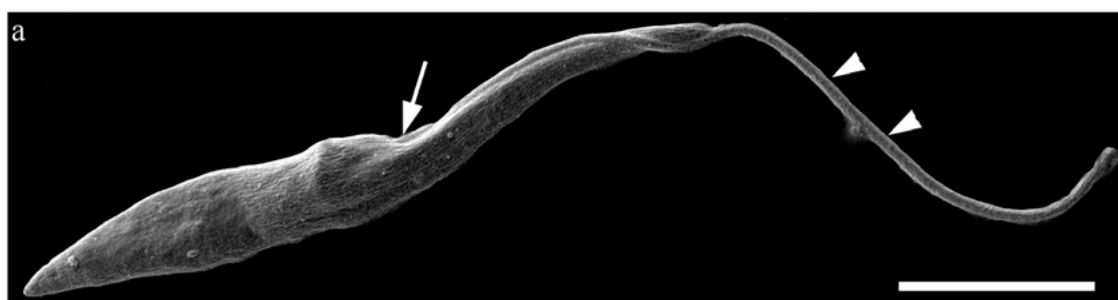
Estima-se que sejam gastos cerca de US\$ 627 milhões por ano em assistência médica e de saúde ao redor do mundo com a DC. Apenas 10% deste valor é gasto em países não endêmicos (LEE et al., 2013). Até o presente momento, não há vacinas que confirmam imunidade

contra *T. cruzi* e os tratamentos para DC, baseados na quimioterapia com benznidazol e nifurtimox, não são tão eficazes, além de trazerem efeitos colaterais ao paciente (GARCÍA-HUERTAS; CARDONA-CASTRO, 2021). Evidentemente, a pesquisa por novos alvos farmacológicos e o entendimento da biologia básica de um parasito descrito há mais de 110 anos se faz tremendamente necessária.

O *Trypanosoma cruzi*

O agente causador da DC é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (Figura 3) (CHAGAS, 1909). Esse protozoário pertence à ordem Kinetoplastida, cuja principal característica de seus integrantes é a presença de uma mitocôndria única e ramificada que apresenta uma estrutura formada por DNA denominada cinetoplasto. No cinetoplasto está presente uma grande rede de anéis de DNA interligados, configurando o kDNA (DNA do cinetoplasto, do inglês *kinetoplast* DNA) (VARGAS-PARADA, 2010) (Figura 4).

Figura 3: Fotomicrografia da forma epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda: Cabeças de seta: flagelo. Seta: bolsa flagelar.

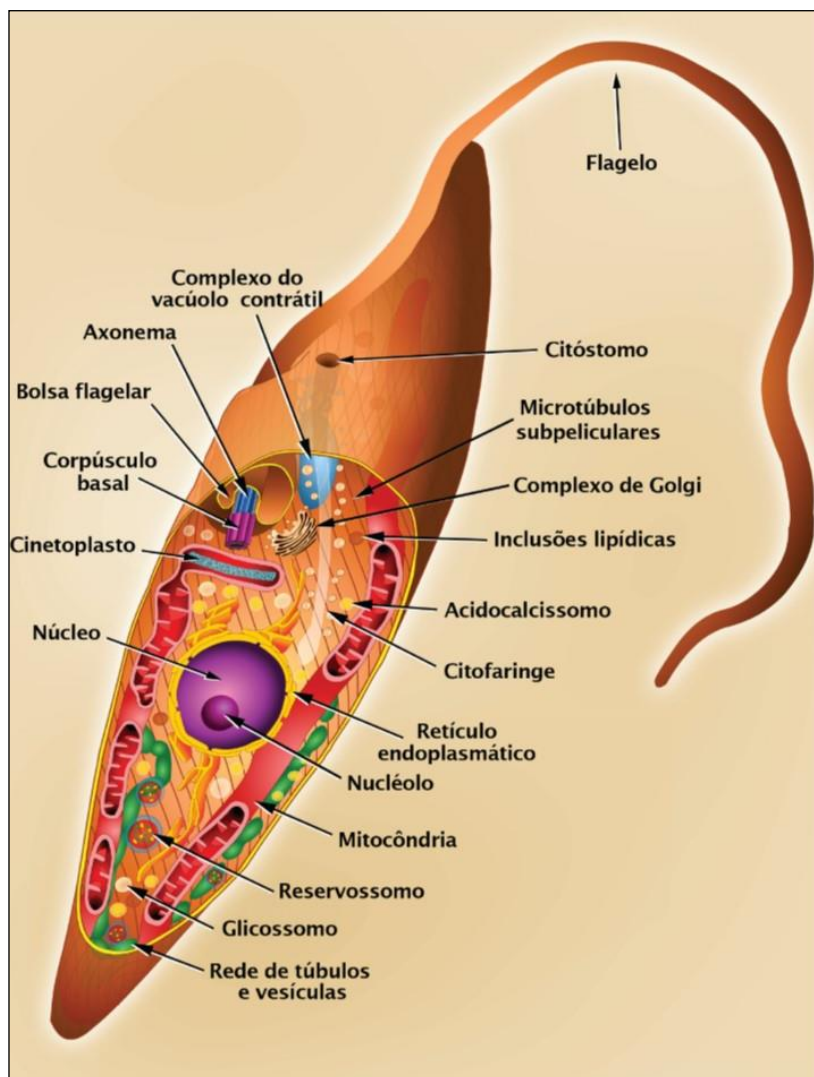
Nota: Fotomicrografia da forma epimastigota obtida a partir de microscopia eletrônica. A barra branca no canto inferior direito representa 5 µm em escala.

Fonte: Reproduzido de Rocha et al., 2010.

Outra particularidade dos cinetoplastídeos é a presença de glicossomas (Figura 4). Essas organelas são um tipo especial de peroxissomas onde estão contidas diversas enzimas essenciais para a viabilidade do parasito (LANDER et al., 2020; QUIÑONES et al., 2020). Acosta e colaboradores (2019) realizaram o perfil proteômico de glicossomas dos parasitos e identificaram a presença de enzimas primordiais para o metabolismo energético de *T. cruzi*. Nessa organela estão contidas enzimas da glicólise e da gliconeogênese, como ocorre em outros tripanossomatídeos, e suas vias acessórias responsáveis pela síntese de alanina e succinato a partir de fosfoenolpiruvato (PEP), além de enzimas da via das pentoses-fosfato, da síntese de

nucleotídeos e de esteroides, da β -oxidação de ácidos graxos e da neutralização de espécies reativas de oxigênio (ROS) (ACOSTA et al., 2019; QUIÑONES et al., 2020).

Figura 4: Representação ilustrativa da forma epimastigota de *T. cruzi*.



Fonte: Reproduzido de Teixeira et al., 2011.

Genética e fenotipicamente, o *T. cruzi* é bastante diverso de forma intraespecífica, o que reverbera em sua filogenética e eco-epidemiologia (ZINGALES et al., 2012). Regiões geográficas podem apresentar cepas de *T. cruzi* distintas e, concomitantemente, a DC causada por estas pode apresentar manifestações clínicas também distintas. Essas diferenças são resultado, principalmente, da grande variabilidade no DNA nuclear e também do kDNA. É estipulado que o tamanho do genoma pode variar em 48% entre cepas, o que equivale a 73 mb de DNA (LEWIS et al., 2009). Atualmente, são conhecidas sete diferentes *Discrete Typing*

Units (DTUs) que caracterizam as diferentes cepas deste parasito, denominadas TcI-VI e TcBat (MARCILI et al., 2009; ZINGALES et al., 2012; ZINGALES, 2018).

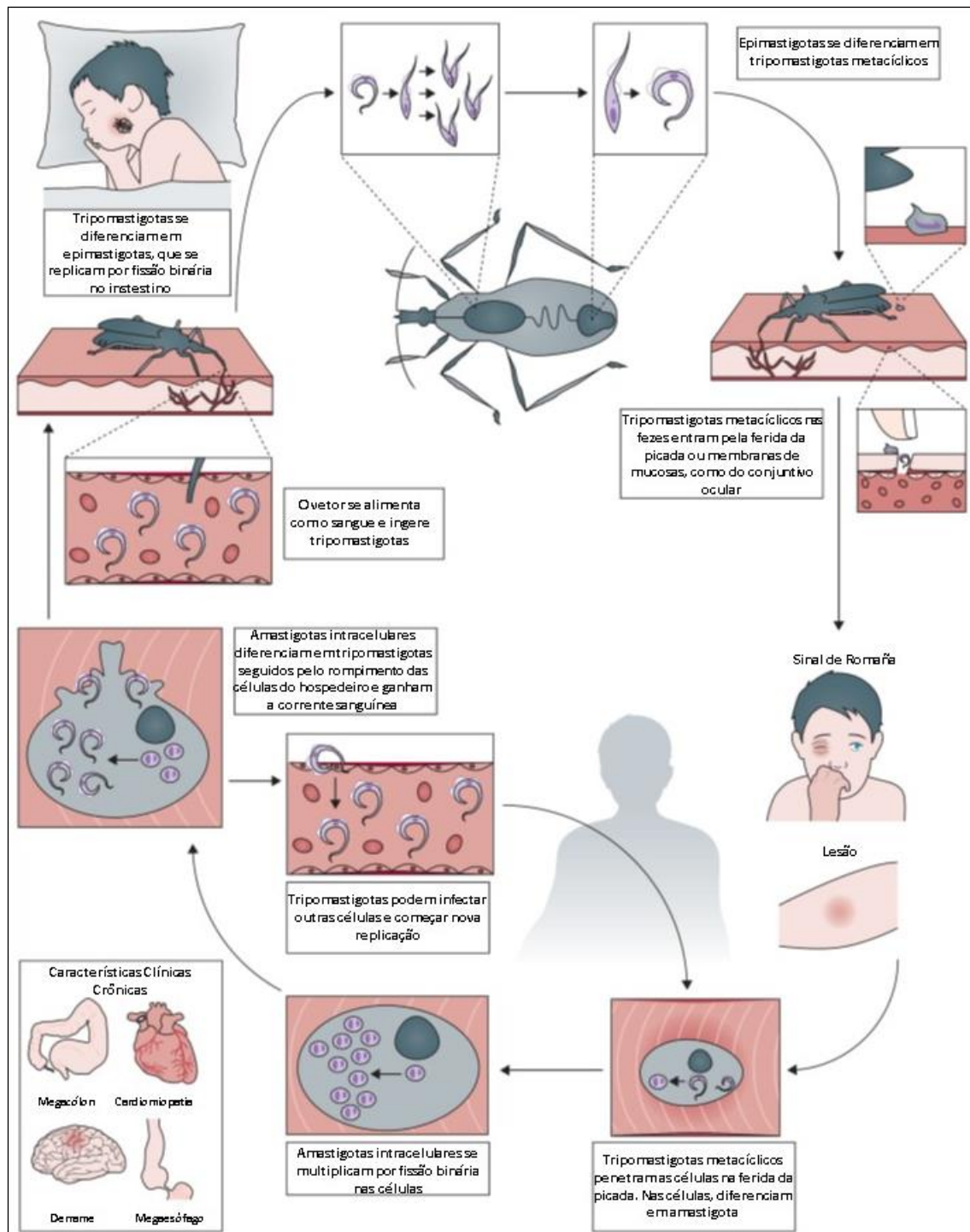
Esse protozoário é diploide e se reproduz por fissão binária, onde as células filhas podem apresentar pequenas variações genéticas, evidenciando a plasticidade genômica do parasito (MILES et al., 1980; TIBAYRENC et al., 1986; ZINGALES, 2018). Durante a infecção no homem, os parasitos podem sofrer seleção clonal e, devido à sua diversidade genética, parasitos de um mesmo hospedeiro podem apresentar alelos distintos para um mesmo gene (MACEDO et al., 2004). O *T. cruzi* apresenta ciclo de vida heteroxênico e varia em estrutura morfológica de acordo com o hospedeiro, podendo ser este invertebrado ou vertebrado (Figura 5) (PARSONS; RUBEN, 2000).

Durante seu ciclo de vida, estímulos externos disparam alterações morfológicas e funcionais para que as diferentes formas evolutivas do parasito se adequem às condições impostas pelo ambiente (PARSONS; RUBEN, 2000). Os hospedeiros invertebrados são insetos triatomíneos hematófagos, sendo *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Triatoma dimidiata* os três principais. Por se alimentarem de sangue, podem transmitir o parasito ao hospedeiro vertebrado, dentre os quais o ser humano (GUARNER, 2019).

A forma tripomastigota metacíclica, altamente infectante, é encontrada no reto do inseto vetor. Esta forma é transmitida através das fezes deste inseto durante seu repasto no hospedeiro vertebrado. No organismo desse último, o parasita se diferencia em amastigota e, posteriormente, tripomastigota sanguínea que, por sua vez, pode ser ingerida pelo triatomíneo durante o repasto. No sistema digestório do vetor, posteriormente, o tripomastigota metacíclico se diferencia em epimastigota, caracterizando a forma replicativa extracelular do parasito. Fatores externos desencadeiam o processo de metaciclologênese que culmina na diferenciação da forma tripomastigota metacíclica, finalizando o ciclo biológico do *T. cruzi* (Figura 5) (ONYEKWELU, 2019).

Além da transmissão vetorial, atualmente, são conhecidas formas de transmissão não-vetorial da DC que, somados ao processo de migração e à dificuldade de diagnóstico de portadores crônicos da doença, contribuem no presente para a incidência da enfermidade em regiões não endêmicas (SCHMUNIS; YADON, 2010). O consumo de caldo de cana-de-açúcar, polpa ou suco de açaí e mesmo água contaminados com fezes de triatomíneos configuram a transmissão oral do parasito. Além desta, o mesmo pode ser transmitido ao homem de forma congênita, durante a gestação, ou através de transfusão de sangue ou de órgãos de indivíduos portadores da doença (DIAS et al., 2008).

Figura 5: Ciclo biológico do *T. cruzi* com transmissão vetorial.



Fonte: Adaptado de Pérez-Molina & Molina, 2018.

Influência da molécula de heme na fisiologia do *T. cruzi*

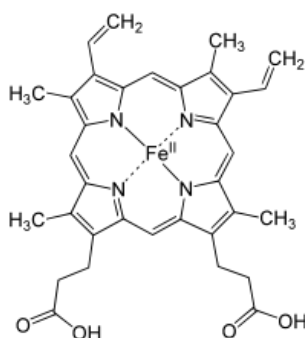
No estômago do hospedeiro invertebrado, a forma tripomastigota sanguínea é diferenciada em epimastigota, caracterizando a forma de vida proliferativa no inseto vetor (GUARNERI; LORENZO, 2017). Através de reprodução assexuada, estas células são

multiplicadas e colonizam a porção anterior do intestino do triatomíneo. Nessa região, o protozoário encontra-se aderido às membranas perimicrovilares (GONZALEZ et al., 2011).

Tanto o estômago quanto o intestino dos triatomíneos sofrem variações no conteúdo bioquímico devido à degradação e digestão dos componentes do sangue. Além de glicídios, aminoácidos e lipídeos também são liberadas altas concentrações de heme, devido à degradação de hemoglobina e outras hemoproteínas. Estima-se que sejam liberados no lúmen médio cerca de 10 mM de heme (GRAÇA-SOUZA et al., 2006).

A molécula de heme, ou Fe-Protoporfirina ($C_{34}H_{32}FeN_4O_4$), é formada pela protoporfirina IX ligada a um átomo de Ferro (Figura 6). A protoporfirina é uma estrutura planar constituída de quatro anéis pirrólicos (tetrapirrol) (PONKA, 1999; FUJIWARA; HARIGAE, 2015). Em mamíferos o heme é o grupo prostéticos de diversas enzimas e proteínas. Na hemoglobina e na mioglobina, essa molécula tem a função de transporte e armazenamento de oxigênio. Nos citocromos, o heme participa, por exemplo, do transporte de elétrons e modificação química de moléculas (FUJIWARA; HARIGAE, 2015).

Figura 6: Estrutura química da molécula de heme.



Devido à sua presença no sistema digestório dos triatomíneos, ao longo do seu processo evolutivo, o *T. cruzi* adaptou-se a essa molécula (MACHADO-SILVA et al., 2016). Uma vez que tripanossomatídeos utilizam-se de hemoproteínas, mesmo não apresentando genes envolvidos na biossíntese de heme em seu genoma, reforça-se a teoria de que a forma epimastigota é capaz de internalizar heme a partir do intestino do inseto vetor (KOŘENY et al., 2010; TRIPODI et al., 2011). A captação de heme pela forma epimastigota parece ocorrer através de um transportador ABC (Do inglês, *ATP-binding cassette transporter*) (CUPELLO et al., 2011). Uma vez dentro da célula, essas moléculas são transportadas para os reservossomos (LARA et al., 2007). Além disso, *T. cruzi* é capaz de detectar as quantidades de heme intracelular e modular a expressão gênica, e proteica, de TcHTE (*T. cruzi* Heme

Transporter Enhancer), que realiza a captação dessa porfirina, para controlar a homeostase dessa molécula (PAGURA et al., 2020) .

O tratamento *in vitro* de epimastigotas com a molécula de heme induz a proliferação das células de forma dose-dependente (LARA et al., 2007). Havendo 30 μ M de heme no meio de cultura há aumento da proliferação em 30%, após 7 dias, em comparação com as células não tratadas com a molécula (SOUZA et al., 2009). Souza e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento de epimastigotas com heme em adição a inibidores de diversas cinases não modificam o efeito dessa molécula sobre a proliferação celular, com exceção do KN-92, um inibidor de Cálcio/Calmodulina Cinases (CAMKs). Ademais, esse trabalho também demonstrou que a molécula de heme dispara a fosforilação de CAMK-II e o aumento de sua atividade enzimática. Esses dados sugerem que os efeitos na proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi* na presença do heme se dão pela ativação de CAMK-II. Posteriormente, foi demonstrado que outras porfirinas não atuam sobre a proliferação de forma similar (NOGUEIRA et al., 2011).

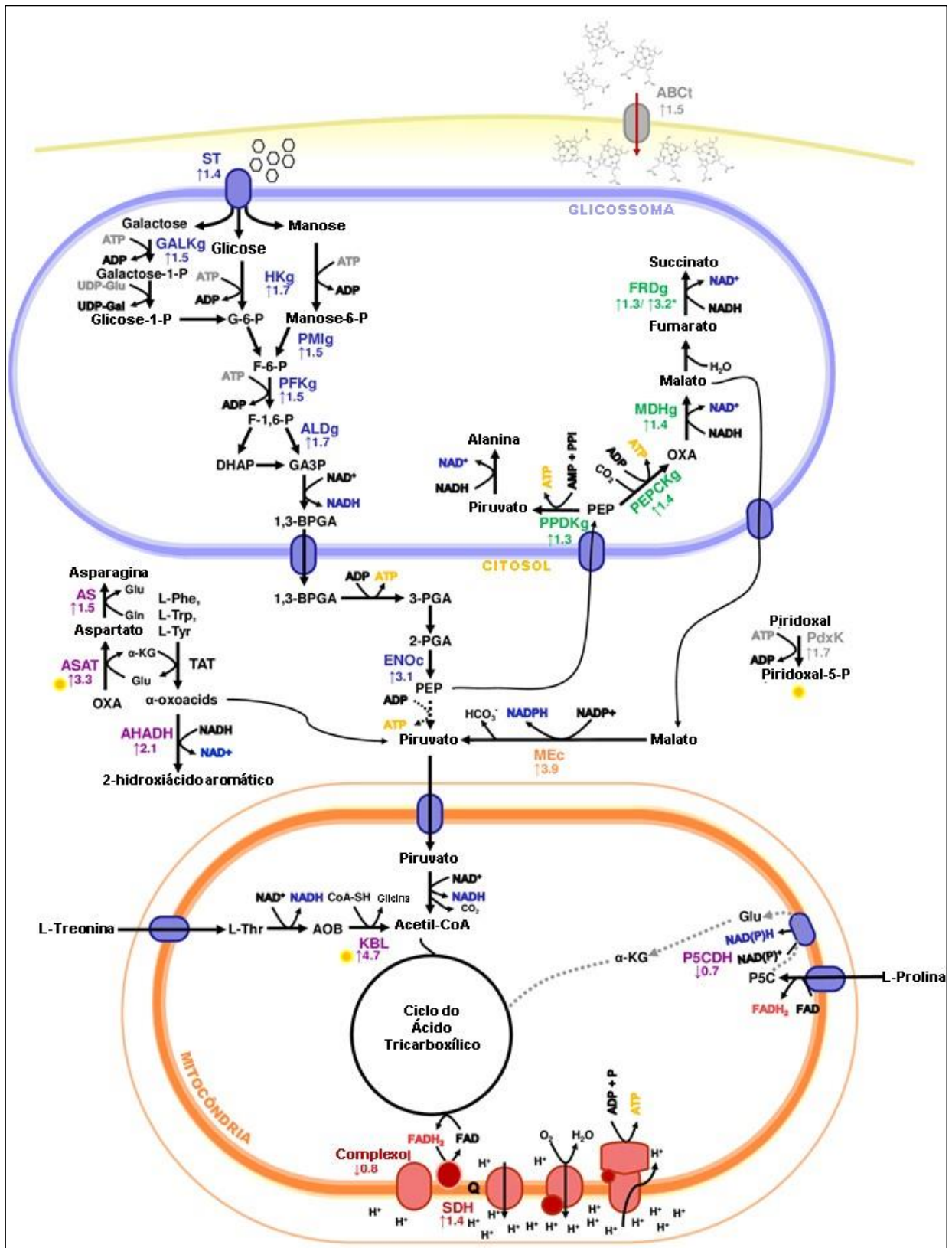
Nogueira e colaboradores (2011) demonstraram que a proliferação celular das formas epimastigotas é mantida através da alta produção mitocondrial de espécies reativas de oxigênio (ROS), não exclusivamente desencadeada pela presença da molécula de heme. Neste cenário, o favorecimento do estado oxidativo da célula desencadeia a ativação de CAMK-II (NOGUEIRA et al., 2011). A influência de H_2O_2 sobre a proliferação desta forma ocorre de forma dose-dependente (STERNLIEB; SCHOIJET; ALONSO, 2020).

O estado redox, além de outros fatores como a presença ou ausência de oxigênio, influenciam não somente a taxa de proliferação, mas também o metabolismo energético e a diferenciação dos parasitos (PAES et al., 2011; NOGUEIRA et al., 2015; SARAIVA et al., 2022). Epimastigotas tratados com heme apresentam aumento do potencial de membrana mitocondrial e de atividade dos complexos II-III do sistema transportador de elétrons (STE). Nesse cenário, há diminuição do consumo de oxigênio através da fosforilação oxidativa e aumento da produção de ROS em virtude do escape de elétrons (NOGUEIRA et al., 2017). Entretanto, a modulação da fisiologia mitocondrial não é a única alteração metabólica desencadeada pelo heme.

No ano de 2020, Paes e colaboradores realizaram a transcriptômica de epimastigotas após o tratamento com a molécula de heme através da técnica *Deep Sequencing* (PAES et al., 2020) (Figura 7). Os resultados deste trabalho demonstraram que heme eleva os níveis de mRNA de enzimas envolvidas na glicólise, na fermentação succínica e na gliconeogênese. Curiosamente, genes envolvidos no transporte de elétrons mitocondrial apresentaram expressão

diminuída. Estes resultados levaram à conclusão de que a molécula de heme é responsável pelo favorecimento da fermentação aeróbica de succinato sobre a produção de ATP pela mitocôndria (PAES et al., 2020). Apesar da regulação metabólica causada por ROS, visto que tais espécies químicas podem agir como sinais moleculares para ativação de diversas vias celulares (DRÖGE, 2002), os mecanismos que medeiam a regulação da expressão gênica e metabólica em epimastigotas expostas ao heme ainda demandam esclarecimentos.

Figura 7: Representação dos genes do metabolismo energético em epimastigotas de *T. cruzi* diferencialmente expressos em função do tratamento com a molécula de heme.



Nota: Metabolismo de Glicose (em azul): ST: Transportador de Hexoses; GALKg: Galactocinase glicosomal; HKg: Hexocinase glicosomal; (Continuação da nota na página seguinte)

(Continuação da nota da figura 7) PMIg: Fosfomanose-isomerase glicossomal; PFKg: Fosfofrutocinase glicossomal; ALDg: Aldolase glicossomal; PPDKg: Piruvato-dicinase; ENOc: Enolase citosólica. Fermentação (em verde): PPDKg: Piruvato-fosfato-dicinase glicossomal; MDH: Malato-desidrogenase glicossomal; FRDg: Fumarato-redutase glicossomal. Metabolismo de aminoácidos (em roxo): KLB: 2-amino-3cetobutirato-CoA-ligase; P5CDH: δ -pirrolina-5-carboxilato-desidrogenase; ASAT: aspartato-aminotransferase; AS: Asparagina-sintetase A; AHADH: L-2-hidroxiácido aromático desidrogenase. Metabolismo de malato (em laranja): ME: enzima málica. Metabolismo mitocondrial (em cor-de-rosa): SDH: succinato-desidrogenase. Outros processos (em 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-bisfosfato; DHAP: dihidroxiacetona 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: δ -1-pirrolina-5-carboxilato; AOB: amino-oxobutirato.

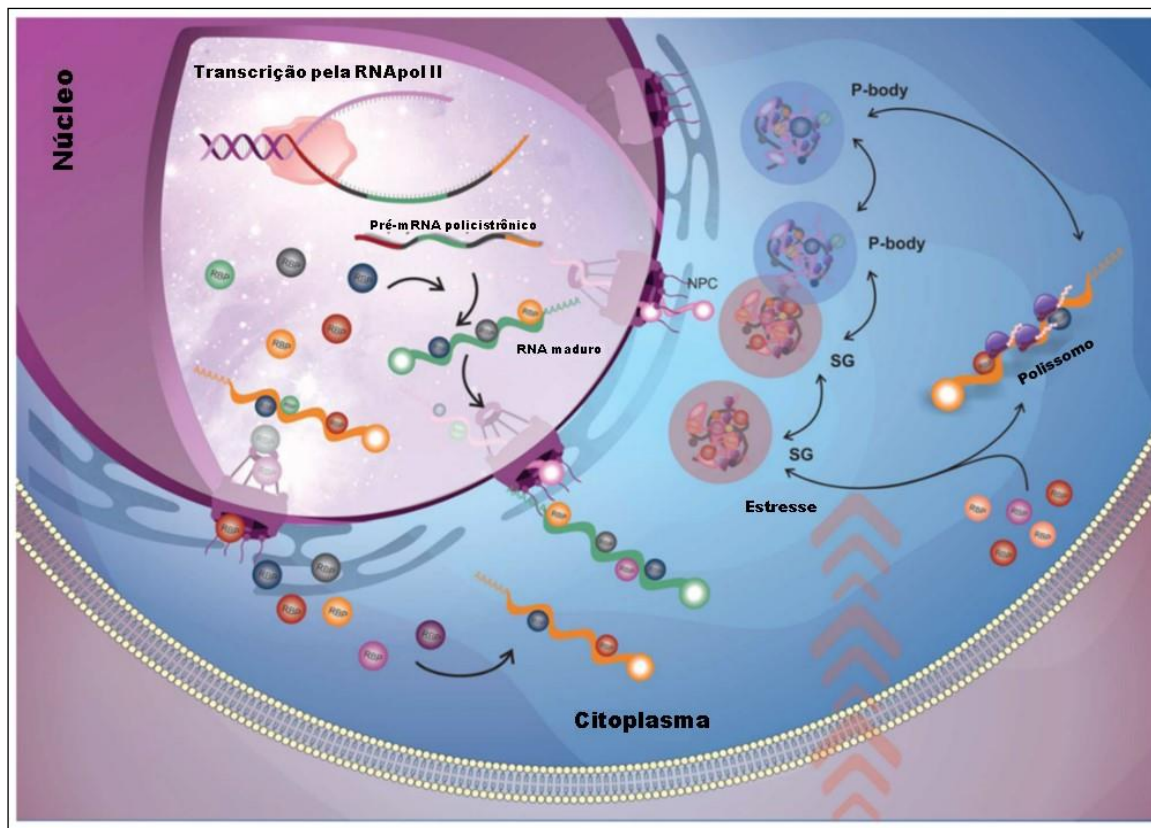
Fonte: Reproduzido de Paes et al. (2020).

Expressão gênica em *T. cruzi*

Em contrapartida a outros eucariotos, a regulação da expressão gênica em *T. cruzi* é realizada, substancialmente, através de modificações pós-transcricionais pela degradação de mRNA. Os mRNAs são transcritos como unidades policistrônicas cujas sequências gênicas não se relacionam de forma funcional ou temporal. Estas unidades são utilizadas para gerar o mRNA maduro após o processo de *trans-splicing*, pois, também diferente de outros eucariotos, tripanossomas apresentam raríssimas sequências intrônicas (Figura 8) (GOLDENBERG; ÁVILA, 2011; PREUSSER; JAÉ; BINDEREIF, 2012).

Após o *trans-splicing*, os mRNA maduros são associados a proteínas de ligação ao RNA (RBPs) para serem então direcionados e armazenados em grânulos celulares especializados, como os *processing bodies* (*p-bodies*) e os grânulos de estresse (SGs). O destino dos mRNAs será determinado pela composição de RBPs associadas a estes, podendo levá-los à tradução ou à degradação de acordo com as necessidades da célula (ROMAGNOLI et al., 2020).

Figura 8: Representação esquemática da regulação da expressão gênica em *T. cruzi*.



Legenda: SG: Grânulos de estresse; P-body: corpos de processamento; RBP: proteína de ligação ao RNA.

Nota: A RNA polimerase II realiza a transcrição e o pré-mRNA policistrônico é gerado. O mRNA maduro é formado e ligado à RBPs para ser direcionado ao citoplasma, onde será traduzido ou armazenado em grânulos especializados.

Fonte: Reproduzido de Romagnoli et al., 2020.

O metabolismo energético da forma epimastigota de *T. cruzi*

O metabolismo energético de *T. cruzi* varia de acordo com o ambiente em que as células estão expostas, de modo que as fontes de carbono disponíveis variam em função do organismo hospedeiro ao longo do ciclo biológico do parasito. Sua sobrevivência e seu sucesso na infecção do organismo humano dependem tanto do funcionamento quanto de alterações no seu metabolismo energético (LIU; ULRICH VONBARGEN; MCCALL, 2021).

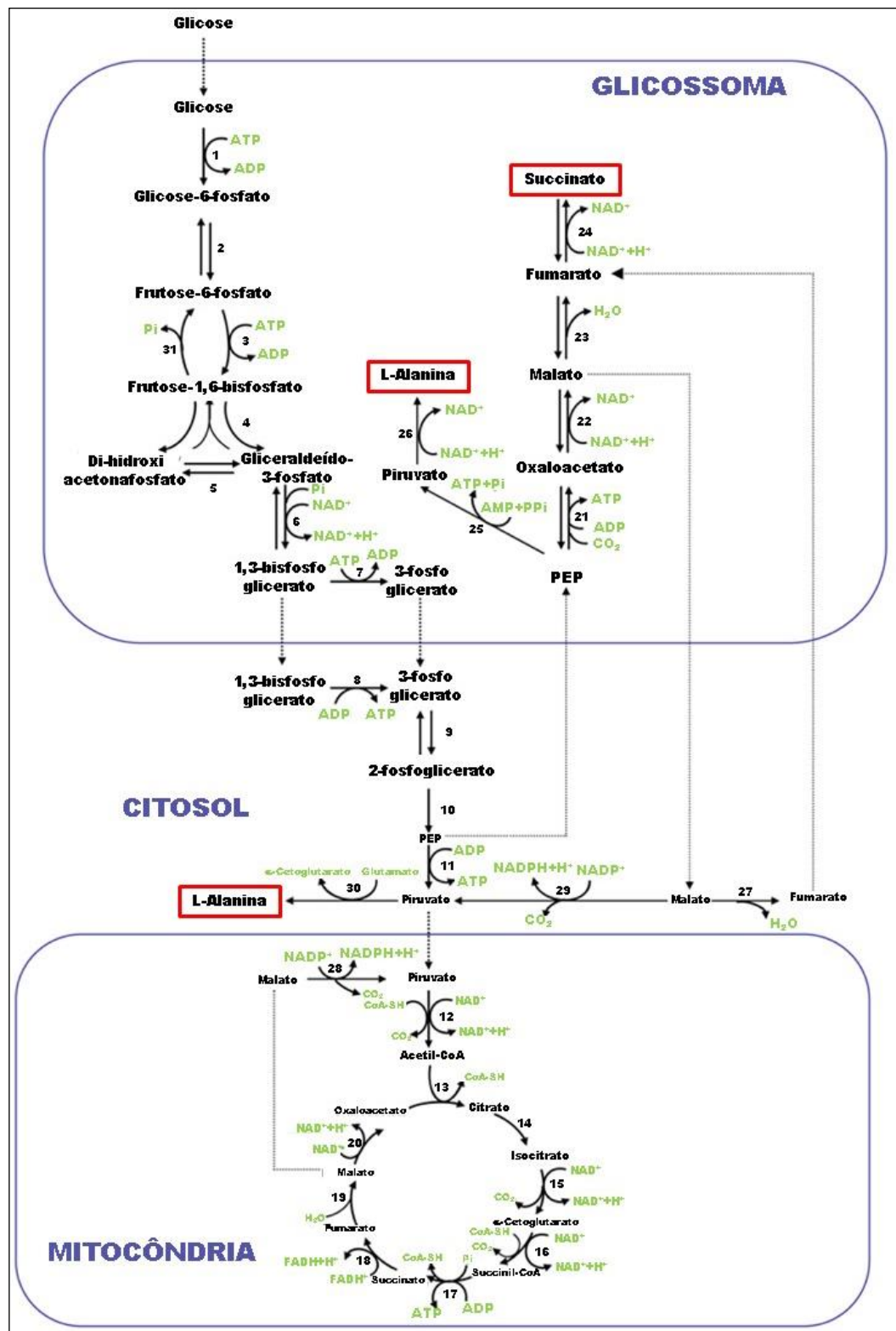
No início do trato digestório do triatomíneo, a principal fonte de carbono para as formas epimastigotas é a glicose, mesmo se tratando de um ambiente rico em aminoácidos advindos da degradação da hemoglobina (TETAUD et al., 1994; MAUGERI; CANNATA; CAZZULO, 2011). À medida que o parasito segue para as porções finais do intestino do inseto, aumenta a

oxidação de aminoácidos sobre a oxidação de glicose como fonte de energia (BARISÓN et al., 2017).

Assim como em outros eucariotos, a glicose em *T. cruzi* é metabolizada a piruvato através de dez passos enzimáticos realizados pela via glicolítica (MAUGERI; CANNATA; CAZZULO, 2011)(Figura 9). A glicose presente no citoplasma é transportada ao glicossoma através de um transportador de hexose (ACOSTA et al., 2019). Uma particularidade é a presença das seis primeiras enzimas da via, que convertem glicose a duas moléculas de 1,3-bisfosfoglicerato, estarem presentes no glicossoma, onde ocorre o gasto de duas moléculas de ATP. Os quatro últimos passos enzimáticos, responsáveis pela produção de duas moléculas de piruvato, ocorrem no citosol, havendo a síntese de quatro moléculas de ATP (ACOSTA et al., 2019).

Por consequência, a compartimentalização de parte da glicólise ao glicossoma acarreta na regeneração das duas moléculas de ATP, gastas nas fosforilações de glicose-6-fosfato e frutose-1,6-bisfosfato, por ação da fosfoglicerato-cinase glicossomal. Adicionalmente, duas rotas glicossomais também são capazes de regeneração de ATP: após a reentrada de fosfoenolpiruvato na organela é possível ocorrer (1) sua conversão a alanina (Ala), através da ação da piruvato-fosfato-dicinase (PPDK) seguida da ação da alanina-desidrogenase, ou (2) a sua fermentação a succinato. De forma similar, a NADH formada na glicólise pode ser oxidada na redução de oxaloacetato a malato, por ação da malato-desidrogenase (MDH), ou na redução de fumarato a succinato, por ação da fumarato-redutase (FRD) durante a fermentação de succinato (BRINGAUD; RIVIÈRE; COUSTOU, 2006; ACOSTA et al., 2019). Esse processo fermentativo que resulta em succinato ocorre mesmo em aerobiose e não é exclusivo de tripanossomatídeos (MAUGERI; CANNATA; CAZZULO, 2011). Tanto a Ala quanto o succinato produzidos pelo catabolismo da glicose são excretados pela célula (FRYDMAN et al., 1990).

Figura 9: Representação do metabolismo de glicose e do ciclo do ácido cítrico na forma epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda: 1, Hexocinase; 2, Fosfoglicose-isomerase; 3, Fosfofrutocinase; 4, aldolase; 5, triose-fosfato-isomerase; 6, Gliceraldeído-3-fosfato-desidrogenase; 7, Fosfoglicerato-cinase glicossomal; 8, Fosfoglicerato-cinase citosólica; 9, Fosfoglicerato-mutase; 10, Enolase;

Continuação da legenda da figura 9: 11, Piruvato-cinase; 12, Complexo Piruvato-desidrogenase; 13, Citrato-sintase; 14, Aconitase; 15, Isocitrato-desidrogenase; 16, α -cetoglutarato-desidrogenase; 17, Succinato-tiocinase; 18, Succinato-desidrogenase; 19, Fumarato-hidratase Mitocondrial; 20, Malato-desidrogenase Mitocondrial; 21, Fosfoenolpiruvato-carboxicinase; 22, Malato-desidrogenase Glicossomal; 23, Fumarato-hidratase Glicossomal; 24, Fumarato-redutase Glicossomal; 25, Piruvato-fosfato-dicinase; 26, Alanina-desidrogenase; 27, Fumarato-hidratase Citosólica; 28, Enzima Málica Mitocondrial; 29, Enzima Málica Citosólica; 30, Alanina-aminotransferase; 31, Frutose-1,6-bisfosfatase. Pi: fosfato inorgânico; PPI: Pirofosfato.

Nota: Os produtos da fermentação glicossomal aeróbica estão representados em retângulos circulosados de vermelho.

Fonte: Adaptado de Maugeri, Cannata & Cazzulo, 2011).

Acredita-se que de forma similar a outros eucariotos, as moléculas de piruvato produzidas no citosol também possam ser utilizadas na síntese de acetilcoenzima A (acetil-CoA), na mitocôndria, de forma a alimentar o ciclo do ácido cítrico (FERNIE; CARRARI; SWEETLOVE, 2004; AKRAM, 2014) (Figura 9). Outros destinos possíveis para o piruvato, em *T. cruzi*, são a síntese citosólica de alanina, que não será excretada, ou a conversão em malato pela enzima málica (FRYDMAN et al., 1990). A acetil-CoA é uma molécula central no metabolismo de eucariotos, servindo de substrato para processos anabólicos e catabólicos. Sua oxidação mitocondrial pelo ciclo do ácido cítrico é responsável por gerar coenzimas reduzidas que doam elétrons para o STE, mantendo o potencial de membrana necessário para a síntese de ATP pela ATP-sintase (FERNIE; CARRARI; SWEETLOVE, 2004).

As moléculas de acetil-CoA, em tripanossomatídeos, curiosamente, podem participar da síntese de ATP na mitocôndria através da fosforilação a nível de substrato; isto é, de forma independente do STE. Para tal, a enzima acetil-succinato-CoA-transferase catalisa a transferência da coenzima A da acetil-CoA ao succinato, formando acetato e succinil-CoA. Essa última é substrato da succinil-CoA sintetase, que regenera succinato produzindo uma molécula de ATP (VAN HELLEMOND; OPPERDOES; TIELENS, 1998). Nesse processo, o acetato é um dos produtos finais e será excretado pela forma epimastigota de *T. cruzi* (BRINGAUD; RIVIÈRE; COUSTOU, 2006).

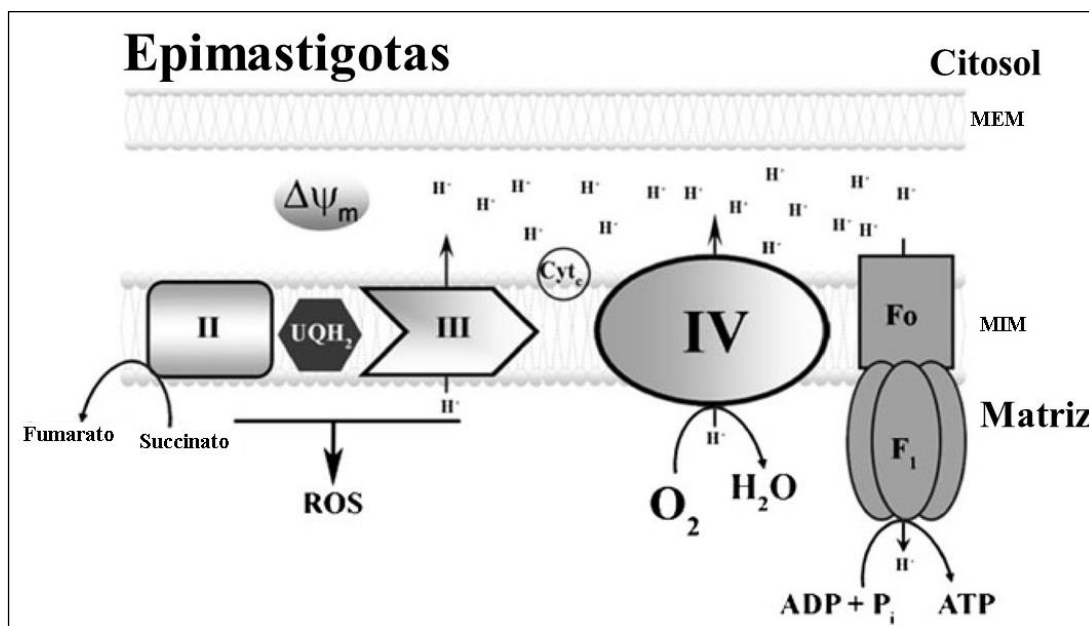
Uma particularidade do *T. cruzi* em relação ao metabolismo energético diz respeito ao STE (GONÇALVES et al., 2011). Em outros eucariotos, o sistema de transporte de elétrons é composto por quatro complexos proteicos (denominados de I-IV) dispostos a membrana interna da mitocôndria, acrescidos da ubiquinona e do citocromo c, que transportam elétrons entre complexos. As coenzimas NADH e FADH₂ que são reduzidas pela oxidação dos intermediários

do ciclo do ácido cítrico doam elétrons aos complexos I e II, respectivamente, e o transporte de elétrons do complexo I ao IV, onde o O_2 é oceptor final, mantém um gradiente eletroquímico ao bombear prótons da matriz mitocondrial ao espaço intermembranas. Tal gradiente eletroquímico é responsável por impulsionar a síntese de ATP pelo complexo F_0F_1 ATP-sintase, em um processo denominado fosforilação oxidativa. Assim sendo, diz-se que ambos os processos são acoplados (NOLFI-DONEGAN; BRAGANZA; SHIVA, 2020).

No entanto, há a presença de proteínas que realizam o transporte de prótons do espaço intermembranar à matriz, diminuindo o potencial de membrana, em um processo denominado vazamento de prótons. Essas proteínas desacopladoras são chamadas de UCPs (do inglês, *uncoupling proteins*) (WOYDA-PLOSZCZYCA; JARMUSZKIEWICZ, 2017). O desacoplamento também pode ser realizado através de drogas que favoreçam a passagem de prótons para a matriz da mitocôndria, dissipando o potencial de membrana, como é o caso do carbonil cianeto p-trifluormetoxifenil-hidrazona (FCCP) (SAKAMURU; ATTENE-RAMOS; XIA, 2016).

Diferente de outros eucariotos, *T. cruzi* não apresenta o complexo I completamente funcional, de modo que o complexo II (succinato-desidrogenase) torna-se de suma importância para o processo de transporte de elétrons. Nesse cenário, o transporte de elétrons proveniente de coenzimas reduzidas ocorre do complexo II ao complexo IV (GONÇALVES et al., 2011) (FIGURA 10).

Figura 10: Representação esquemática do sistema de transporte de elétrons na forma epimastigota de *T. cruzi*.



Legenda: UQH₂: ubiquinona, ou coenzima q; Cyt_c: citocromo c.

Nota: A manutenção do potencial de membrana, um gradiente eletroquímico resultante do bombeamento de prótons (H⁺) da matriz ao espaço intermembranar da mitocôndria, é mantida pelo transporte de elétrons entre os complexos II-IV.

Fonte: Adaptado de Gonçalves et al., 2011.

Uma vez nas porções finais do intestino do inseto vetor, o parasito modula seu metabolismo de forma a preparar-se para os processos de diferenciação em tripomastigota (metaciclogênese) (DE-SIMONE et al., 2022). A disponibilidade de nutrientes apresenta papel chave em tal modulação (BARISÓN et al., 2017). Nesse cenário, o protozoário passa a obter ATP não pelo catabolismo glicolítico, mas pela oxidação de aminoácidos (SILBER et al., 2005; MARCHESI et al., 2018).

Uma variedade de aminoácidos é catabolizada pela forma epimastigota. Além de Ala, é possível utilizar como substrato energético prolina (Pro), aspartato (Asp), histidina (His), glutamato (Glu), asparagina (Asn), glutamina (Gln), leucina (Leu) e isoleucina (Ile) (GIRARD et al., 2018). Somados ao papel energético, tais aminoácidos são importantes também para o processo de diferenciação, privação nutricional e resistência ao ambiente oxidativo, por exemplo (MARTINS et al., 2009; MAGDALENO et al., 2011; MARCHESI et al., 2018).

A regulação do metabolismo energético é de suma importância para a manutenção e a sobrevivência das células, evitando ciclos fúteis e o gasto desnecessário de energia, como ocorre em *T. cruzi* sob estresse nutricional (STERNLIEB et al., 2020). Em eucariotos, as vias

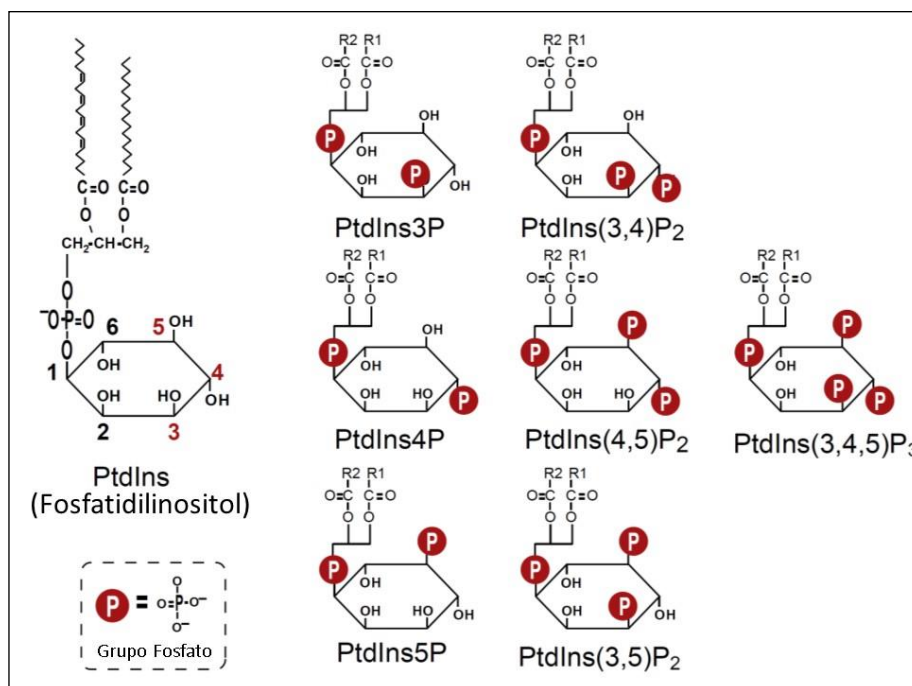
de sinalização celular são responsáveis pela transmissão de um sinal externo ao interior da célula, modulando processos biológicos, como, por exemplo, o metabolismo energético. Visto que o *T. cruzi* lida com diversos estímulos externos que desencadeiam alterações em sua fisiologia, somado ao fato de que o estudo da regulação metabólica desse parasito já demonstrou potencial como alvo farmacológico (SAAVEDRA et al., 2019), faz-se necessária a avaliação do papel de vias de sinalização na modulação do metabolismo energético desse protozoário.

Sinalização celular mediada por fosfatidilinosítídeos

Fosfatidilinosítídeos (PI) são uma família de glicerofosfolipídeos encontrados nas membranas de células eucarióticas, especialmente na face interna da membrana plasmática (SASAKI et al., 2009). Essas moléculas são fosforiladas reversivelmente por enzimas celulares (Figura 12). Isso se deve à presença de três grupamentos hidroxilas livres em sua estrutura, capazes de receberem o grupamento fosfato, possibilitando sete diferentes conformações químicas de PIs que apresentam estéreo especificidades e cargas únicas. Diferentes PIs desempenham funções distintas nas células de mamíferos através de cascatas de sinalização que podem culminar, na regulação do tráfego de vesículas, na função do sistema imune e na alteração de outras vias (SASAKI et al., 2009; FRUMAN et al., 2017).

Existem 18 reações de interconversão de PIs nas células de mamíferos, executadas por múltiplas fosfatidilinosítídeo-cinases (PIKs), fosfatases e enzimas relacionadas. Através da ação de diversas PIKs, as moléculas de PI são convertidas em intermediários mono ou polifosfatados que apresentam funções distintas na célula. As PIKs catalisam a adição de grupamentos fosfato nas posições D3, D4 e D5 do anel de inositol de PIs, sendo denominadas, respectivamente, fosfatidilinositol-3-fosfato-cinases (PI3Ks), fosfatidilinositol-4-cinases (PI4Ks) e fosfatidilinositol-fosfato-cinases (PIPks). As PI3Ks possuem como substrato fosfatidilinositol (PtdIns), fosfatidilinositol-4-fosfato (PtdIns4P) e fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PtdIns(4,5)P₂), gerando, respectivamente a partir destes, fosfatidilinositol-3-fosfato (PtdIns3P), fosfatidilinositol-3,4-bisfosfato (PtdIns(3,4)P₂), e fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PtdIns(3,4,5)P₃) (SASAKI et al., 2009; FRUMAN et al., 2017). Na literatura, frequentemente, fosfatidilinosítídeos bisfosfato são denotados como PIP₂, enquanto que fosfatidilinosítídeos trifosfato são denotados como PIP₃. Essa nomenclatura diz respeito somente à quantidade de grupamentos fosfato no anel de inositol, não discriminando a posição destes (HAMMOND & BURKE, 2020).

Figura 11: Possíveis fosfatidilinosítídeos encontrados nas células por interconversão através de PIKs.



Legenda: PtdIns: Fosfatidilinositol; P: Fosfato; P₂: Bifosfato; P₃: Trifosfato.

Nota: Através de reações de fosforilação e desfosforilação, desempenhadas por diversas cinases e fosfatases específicas, ocorre a interconversão dos fosfatidilinosítídeos, variando de um a três grupamentos fosfatos.

Fonte: Adaptado de Sasaki et al., 2009.

Em eucariotos superiores, devido à diversidade de enzimas e à complexidade de reações, as PI3K são classificadas em três classes de acordo com seus substratos e a presença de domínios proteicos em sua estrutura. A classe I é composta por PI3Ks heterodiméricas cujos substratos preferenciais são PtdIns(4,5)P₂, gerando PtdIns(3,4,5)P₃ como produto. A classe II compreende PI3Ks monoméricas que sintetizam PtdIns3P a partir de PtdIns. Já a classe III é composta por uma única enzima, inicialmente descrita em levedura, que também atua na conversão de PtdIns em PtdIns3P (BACKER, 2008; SASAKI et al., 2009).

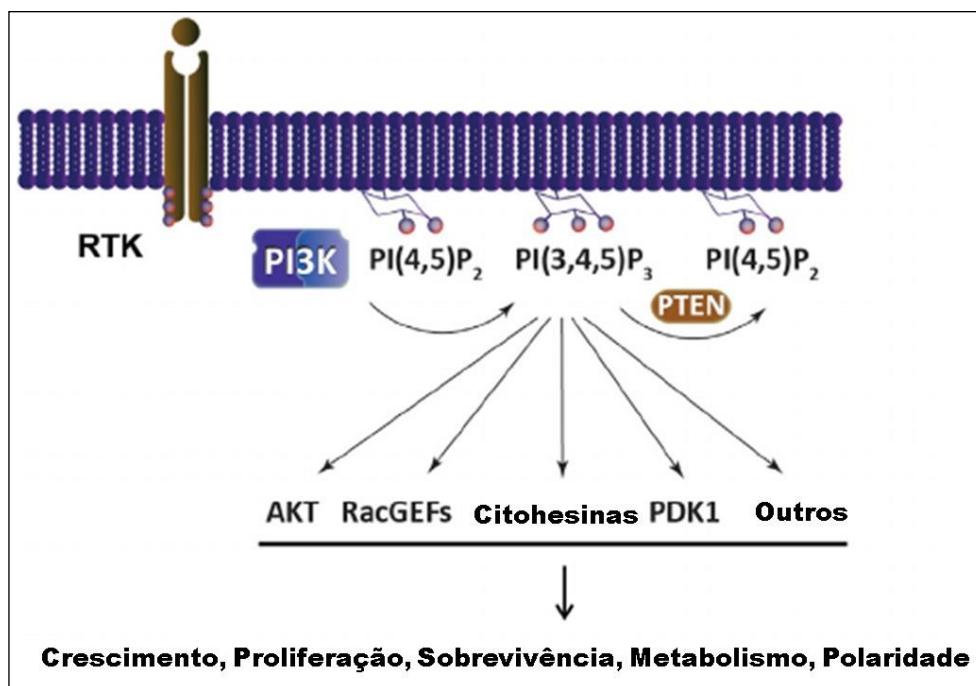
O papel de PI3Ks no controle da sobrevivência, proliferação, regulação metabólica, regulação da expressão gênica, controle de morte celular etc. já foi descrito (HOXHAI; MANNING, 2020). A regulação metabólica desempenhada por PI3Ks de classe I se dá através da ativação de AKT (PKB) mediante aumento da produção de PtdIns(3,4,5)P₃. Uma vez ativa, AKT é responsável por regular o metabolismo energético de forma direta, ao fosforilar enzimas e, por consequência, modular sua atividade, e de forma indireta, ao regular fatores de transcrição e reprogramar a expressão gênica (MANNING; TOKER, 2017; VALVEZAN; MANNING,

2019; HOXHAI; MANNING, 2020). Um dos alvos de ativação da AKT é mTORC1, membro da família de proteínas mTOR. Diversas vias que participam na percepção intracelular de nutrientes, metabólitos, substratos, oxigênio e ATP convergem à ativação ou inativação de mTORC1. Em uma revisão que discorre sobre o papel de mTORC1 na regulação do metabolismo energético de células cancerosas, os autores Valvezan e Manning comparam essa proteína a um reóstato¹ capaz de controlar a mudança de um estado catabólico para um estado anabólico (VALVEZAN; MANNING, 2019).

As moléculas de PtdIns(4,5)P₂ funcionam tanto como pontos de ancoramento de proteínas na membrana, quanto como substrato para a formação de segundos mensageiros: inositol-trisfosfato (Ins(1,4,5)P₃), diacilglicerol (DAG), e PtdIns(3,4,5)P₃ (KWIATKOWSKA, 2010). As moléculas de PtdIns(3,4,5)P₃ podem funcionar como âncoras para suas proteínas efetoras na face interna da membrana plasmática (Figura 13). O reconhecimento e o recrutamento de tais proteínas pelo PtdIns(3,4,5)P₃ se dá através da ligação do inositol a domínios homólogos a Plekstrina (Domínios PH). Em mamíferos já foram descritas mais de 250 proteínas com domínios PH com afinidades variadas ao PtdIns(3,4,5)P₃. Uma vez recrutadas à membrana, essas proteínas, devido à interação com o anel de inositol, alteram levemente sua conformação expondo resíduos de aminoácidos que podem ser fosforilados, modulando sua atividade (RIEHLE; CORNEA; DEGTEREV, 2013).

¹ Componente com resistência elétrica variável que, num circuito, permite fazer variar a intensidade da corrente. Fonte: "reóstato", in Dicionário Priberam da Língua Portuguesa [em linha], 2008-2021, <https://dicionario.priberam.org/re%C3%B3stato> [consultado em 30-08-2022].

Figura 12: Formação de Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato na face interna da membrana plasmática e seus alvos regulatórios em mamíferos.



Legenda: RTK: Receptor tirosina-cinase; PI3K: Fosfatidilinositol-3-fosfato; AKT: Serina-treonina-cinase; PDK1: Piruvato-desidrogenase-cinase 1.

Fonte: Adaptado de Kriplani et al., 2015.

A molécula de PtdIns(4,5)P₂ pode ser clivada a DAG e Ins(1,4,5) por ação da enzima fosfolipase C (PLC). Ambos funcionam como segundos mensageiros regulando uma miríade de processos celulares que incluem a expressão gênica e o metabolismo energético, através da ativação alostérica da proteína-cinase C (PKC) (FUKAMI et al., 2010; KOLCZYNSKA et al., 2020). A PLC também catalisa a síntese de DAG a partir de PtdIns ou PtdIns4. DAG pode ativar alostericamente PKC que, por sua vez, participa na transdução de sinal para uma miríade de processos celulares, como a regulação da expressão gênica, a progressão do ciclo celular, migração, proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose (ISAKOV, 2018). Em mamíferos, algumas isoformas de PKC também necessitam de aumento intracelular de Ca²⁺ para correta ativação (GIORGIONE et al., 2006). Um dos alvos de fosforilação da PKC, e consequente ativação, é a proteína-cinase D (PKD). As PKDs são enzimas dependentes de calmodulina que participam na regulação do tráfego de vesículas, diferenciação, motilidade e apoptose (ELLWANGER & HAUSSER, 2013; KOLCZYNSKA et al., 2020). Além de segundo mensageiro, DAG também pode ser substrato da enzima diacilglicerol-cinase (DAGK) na síntese de ácido-fosfatídico (PA, do inglês, *phosphatidic acid*), necessário à formação de

fosfolipídios de membrana. O outro produto da degradação de PIP₂, o Ins(1,4,5)P₃, é uma molécula hidrossolúvel que difunde-se pelo citosol, sendo capaz de ser reconhecido pelo receptor de IP₃ (IP3R, do inglês, *inositol-triphosphate receptor*), o que induz a liberação de Ca²⁺ no citoplasma (DOCAMPO & HUANG, 2021). As proteínas calmodulinas funcionam como sensores da quantidade de Ca²⁺ nesse compartimento celular, atuando na ativação de diversas enzimas em função da interação com tal cátion (CHIN & MEANS, 2000). Em mamíferos, a elevação citoplasmática de Ca²⁺ leva à ativação de fatores de transcrição e consequente controle da expressão gênica (PURI, 2020).

Gimenez e colaboradores demonstraram que a síntese de PA é aumentada no processo de diferenciação da forma epimastigota para tripomastigota. Nesse cenário, há aumento da atividade enzimática de DAGK (TcDAGK) e concomitante redução na atividade de fosfatidato-fosfatases que convertem PA em DAG (GIMENEZ et al., 2011).

Assim como no *T. cruzi*, o metabolismo energético do *T. brucei* também sofre alteração ao longo do ciclo de vida de acordo com o hospedeiro (GINGER, 2006). Nesse protozoário, PIs interagem com proteínas envolvidas no metabolismo, além de participarem da regulação da expressão e degradação proteicas e transdução de sinal (CESTARI; ANUPAMA; STUART, 2018).

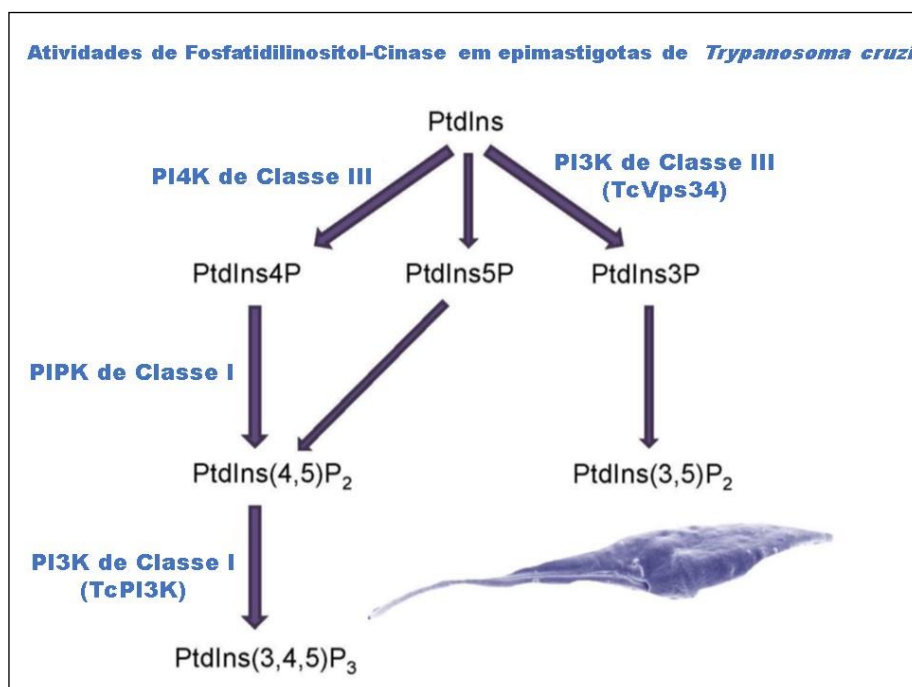
Em 2009, pela primeira vez, um estudo brasileiro classificou, através de técnicas de bioinformática baseadas em similaridade com o genoma de *Schistosoma mansoni*, PI3Ks e proteínas relacionadas em tripanossomídeos, dentre eles o *T. cruzi*. Esse trabalho foi responsável por agrupar os genes encontrados, de forma similar à classificação de PI3Ks em mamíferos, em cinco modelos distintos (Modelos 1-5). Os quatro primeiros modelos eram compostos por 15 genes e o quinto modelo englobou outros 32 genes (BAHIA et al., 2009).

O Modelo 1 compreende as enzimas com atividade similar às PI3K de classe III. O Modelo 2 consiste nas enzimas de classe I. Os Modelos 3 e 4 foram constituídos dos ortólogos à família de proteínas PI4K presentes em humanos. Já o Modelo 5 era formado por enzimas acessórias à via PI3K. Curiosamente, nenhuma PI3K do Modelo 2, que seria responsável pela síntese de PtdIns(3,4,5)P₃ e pela transdução de sinal intracelularmente, foi descrita em *T. cruzi* (BAHIA et al., 2009). Por esta razão, era proposto que *T. cruzi* não apresentava sinalização celular mediada por PIs como segundos mensageiros (HALL et al., 2006).

Em 2015, Gimenez e colaboradores identificaram, através de clonagem molecular, uma PI3K em epimastigotas de *T. cruzi* pertencente ao Modelo 2 (classe I), que foi denominada TcPI3K (Figura 14). Além disso, identificaram que a TcPI3K, codificada pelo gene TcCLB.510167.10, possivelmente, é regulada negativamente através de fosforilação pela

proteína cinase A (PKA). Estes resultados foram importantes para a identificação da atuação da classe I na via de sinalização celular mediada por PIs para que tal via seja explorada como alvo terapêutico através do desenvolvimento de inibidores farmacológicos, como ocorre, por exemplo, no tratamento de câncer (GIMENEZ et al., 2015).

Figura 13: Atividades descritas de PIKs em *T. cruzi*.



Fonte: Adaptado de Gimenez et al., 2015.

O envolvimento da regulação por PIs em *T. cruzi* ainda é pouco explorada. Estudos sobre o papel dessas moléculas na regulação do metabolismo de leveduras e de *T. brucei*, por outro lado, já foram realizados. Nesse tripanossomatídeo, a inositol-polifosfato-multicinasase (IPMK), enzima que gera fosfatidilinosítídeos de quatro e cinco fosfatos a partir de PtdIns trifosfatos está envolvida na sobrevivência, desenvolvimento e metabolismo (CESTARI; ANUPAMA; STUART, 2018). Em *T. cruzi*, foi demonstrado que inibidores de IPMK diminuem a proliferação da forma amastigota (CESTARI et al., 2016). Adicionalmente, nesse mesmo protozoário, o *knockdown* ou a superexpressão do receptor de IP₃ (IP₃R) que regula a concentração intracelular de Ca²⁺ através da ligação de PtdIns(1,4,5)P₃, resultou na diminuição da replicação da forma amastigota. A diminuição da expressão desse receptor também foi responsável por aumentar a diferenciação da forma amastigota para tripomastigota, enquanto que a superexpressão resultou na diminuição da mesma (HASHIMOTO et al., 2013). Na forma epimastigota, a diminuição da atuação do IP₃R através da expressão de um IP₃R dominante

negativo, induziu a metaciclologênese. Considerando que a forma tripomastigota apresenta baixa expressão de IP₃R, estes resultados apontam para um importante papel de IP₃ durante o processo de diferenciação de *T. cruzi*. Além disso, a expressão do receptor dominante negativo levou ao aumento da densidade da mitocôndria, indicando envolvimento dessa sinalização na fisiologia mitocondrial (HASHIMOTO et al., 2015).

As evidências acima apresentadas indicam que o tratamento da forma epimastigota de *T. cruzi* com a molécula de heme além de estimular a proliferação através da ativação de CaMK-II e da produção de ROS, atua na regulação do metabolismo energético através da modulação da expressão gênica, favorecendo a fermentação aeróbica sobre a fosforilação oxidativa como fonte de ATP. Até o momento, não há evidências de que há atuação da TcPI3K na regulação do metabolismo ou da expressão gênica da forma epimastigota. Por essa razão, o presente trabalho tem como tema a avaliação do papel de TcPI3K sobre as alterações metabólicas deflagradas por heme e sobre a expressão gênica. Para tal, inicialmente, foi avaliada a influência da inibição de TcPI3K sobre a expressão gênica. Foram testados os genes glicossomais da fermentação de succinato, da captação de glicose e da enzima málica, visto que heme aumenta a expressão dos mesmos, além de genes envolvidos na sinalização celular mediada por fosfatidilinosítídeos cuja expressão também é modulada por heme (TcCaM e TcDAGK). Posteriormente, foi avaliada a influência da inibição de TcPI3K sobre o metabolismo energético dessas células com o objetivo de verificar se essa enzima participa na regulação do favorecimento da síntese de ATP glicossomal sobre a fosforilação oxidativa. Dessa forma, foi testada a influência de tal inibição sobre a respiração mitocondrial, sobre a quantidade de ATP intracelular e a proliferação, e sobre a captação e síntese de moléculas presentes no meio de cultura, visto que os produtos da fermentação aeróbica de glicose são excretados pela célula.

Nossa hipótese é que o tratamento da forma epimastigota de *T. cruzi* com a molécula de heme dispara a sinalização intracelular por PIs que resulta na modificação de expressão de enzimas envolvidas no metabolismo energético, favorecendo a fermentação aeróbica sobre a síntese mitocondrial de ATP. Nesse sentido, o correto funcionamento da TcPI3K seria necessário à célula para que as alterações causadas por heme ocorram. Dadas as evidências acima apresentadas que apontam para um importante papel dos PIs na regulação fisiológica de tripanossomídeos, o estudo do papel de PI3Ks torna-se fundamental para o entendimento das alterações metabólicas deflagradas por heme.

1 OBJETIVOS

1.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho é avaliar o efeito da inibição farmacológica de TcPI3K na regulação do metabolismo energético e na expressão gênica das formas epimastigotas de *T. cruzi* expostas à molécula de heme.

1.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar nos resultados do transcriptoma se o tratamento com a molécula de heme influencia a expressão de genes envolvidos na sinalização por fosfatidilinosídeos conhecidos;
- b) Validar a regulação diferencial da expressão gênica de *TcPI3K*, *TcCaM* e *TcDAGK* verificada no RNAseq através de PCR em tempo real;
- c) Verificar se a molécula de heme modifica a expressão dos genes *TcPI3K*, *TcCaM* e *TcDAGK* na presença de Ly294002, um inibidor de TcPI3K
- d) Verificar se o tratamento de epimastigotas com o inibidor da TcPI3K modifica os resultados de expressão gênica das enzimas da fermentação de succinato (*TcPEPCK*, *TcMDH*, e *TcFRD*), da síntese glicossomal de alanina (*TcPPDK*), da enzima málica (*TcME*) gene e do transportador de glicose (*TcST*) verificados no RNAseq;
- e) Avaliar se a inibição farmacológica de TcPI3K, na presença ou ausência de heme, modifica o consumo de oxigênio pela mitocôndria;
- f) Avaliar se a quantidade de ATP celular varia em função destes mesmos tratamentos;
- g) Avaliar o efeito de Ly294002 sozinho ou na presença de heme, sobre a proliferação das formas epimastigotas;
- h) Verificar por Ressonância Magnética Nuclear se os metabólitos presentes no meio de cultura após 7 dias de crescimento dos parasitos variam de acordo com a presença ou ausência de heme e/ou inibidor de TcPI3K.

2 METODOLOGIA

2.1 Cultivo celular de epimastigotas de *T. cruzi*

Epimastigotas de *T. cruzi*, clone CLBrener, foram cultivados em meio BHI (*Brain Heart Infusion*, Difco) acrescido de 10% de soro fetal bovino (Vitrocell) e heme a 30 μM por 7 dias em garrafas de cultura de 25cm² de superfície (TECHNO PLASTIC PRODUCTS AG) a 28°C. Os experimentos foram realizados entre a 16^a e a 25^a passagem.

2.2 Tratamentos

Os tratamentos com heme (Frontier Scientific) foram realizados a partir de uma solução a 20 mM, onde as moléculas foram solubilizadas em NaOH 0,1 N e ressuspensas em salina tamponada com fosfato de sódio (PBS: tampão fosfato de sódio 100 mM e NaCl 150 mM; pH 7,4). No momento do tratamento, essa solução foi diluída a 5 mM em PBS e a concentração final de heme nos grupos tratados com essa molécula foi de 30 μM .

O inibidor de TcPI3K, Ly294002 (ThermoFisher Scientific), foi dissolvido em dimetilsulfóxido (DMSO, Merck) na concentração de 50 mM e mantido a -4°C até o momento do tratamento. Nos grupos tratados, a concentração final dessa droga foi de 20 μM , como realizado anteriormente por Gimenez e colaboradores (2015). O tratamento com DMSO 0,04% (concentração de veículo nos tratamentos com a droga) também foi realizado.

Desta forma, os experimentos foram conduzidos com 5 grupos: Controle (Células, BHI + SFB 10%), DMSO (Células, BHI + SFB 10% + DMSO 0,04%), Heme (Células, BHI + SFB 10% + heme 30 μM), Ly294002 (Células, BHI + SFB 10% + Ly294002 20 μM), e Ly294002 + heme (Células, BHI + SFB 10% + heme 30 μM + Ly294002 20 μM).

2.3 Proliferação celular

Para avaliação da proliferação, 2,5 x 10⁶ epimastigotas/mL foram cultivadas em BHI acrescido de SFB 10%, e os tratamentos descritos acima, por 7 dias em placas de cultura de 96

poços. A contagem das células foi realizada em câmara de Neubauer ao microscópio óptico após 3, 5 e 7 dias.

2.4 Respirometria de alta resolução

Ao 7º dia de crescimento, $1,0 \times 10^8$ células de cada tratamento foram lavadas em tampão PBS e ressuspensas em 2 mL de BHI para realização da respirometria de alta resolução no equipamento OROBOROS (Oroboros Instruments). A concentração e o fluxo de oxigênio foram mensurados pelo software DataLab5 (Oroboros Instruments). Uma vez estabilizado o consumo basal de oxigênio, foi adicionado 2 µg/mL de oligomicina (Sigma), um inibidor da ATP-sintase. Sequencialmente, carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona (FCCP) (Sigma), um desacoplador da fosforilação oxidativa, foi titulado de 250 a 1000 nM. Por último, com o objetivo de mensurar o consumo residual de oxigênio, foi adicionado 3 µg/mL de antimicina A (Sigma). Os resultados obtidos foram normalizados pela quantidade de células em cada câmara ($5,0 \times 10^7$ células/câmara).

2.5 Dosagem de ATP intracelular

A quantidade de ATP intracelular foi mensurada através do kit CellTiterGlo Luminescent Cell Viability Assay (Promega), utilizando PBS como branco e uma curva-padrão de ATP diluído em PBS variando de 1,25 a 20 µM. Ao 7º dia de crescimento, $1,0 \times 10^7$ células de cada tratamento foram lavadas e ressuspensas em 200 µL de PBS, como descrito em (SARAIVA et al., 2022). Posteriormente, 5×10^6 células dessa suspensão foram transferidas para uma placa opaca de 96 poços. Então, foram adicionados 50 µL do composto luminescente do kit em cada poço e a quantificação da luminescência, após 10 minutos de incubação ao abrigo da luz, foi realizada no equipamento EnVision® 2105. Os experimentos foram realizados em triplicatas experimentais. A concentração de ATP em cada tratamento foi calculada através da interpolação dos valores obtidos por regressão linear.

2.6 Extração de RNA, síntese de cDNA e expressão gênica

Os experimentos de expressão foram conduzidos em triplicata. A extração do mRNA das formas epimastigotas ao 7º dia de crescimento foi realizada utilizando Trizol e a síntese do DNA complementar foi realizada utilizando o kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription® (Applied Biosystems), como descrito por (SARAIVA et al., 2022).

A expressão gênica foi avaliada através de PCR em tempo real (qPCR) no termociclador Corbett RotorGene™ 6000. Para tal, o cDNA diluído a 1:40 foi adicionado à mistura de SYBR Green I, diluído 2x, e 10 pmol de cada oligonucleotídeo iniciador nos poços de um Gen-Disk 100 *locking ring*. A expressão diferencial foi expressa em *fold change* através do cálculo do valor de $2^{-\Delta\Delta C_t}$, utilizando o gene (TCZ) como normalizador, como descrito por LIVAK 2001: $\Delta C_T = \Delta C_{T(gene\ alvo)} - \Delta C_{T(TCZ)}$; $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T(\text{grupo tratado}) - \Delta C_T(\text{grupo controle})$ (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001). A sequência dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados encontra-se na Tabela 1.

Tabela 1: Genes e sequências de oligonucleotídeos iniciadores utilizados na qPCR.

Gene	Sigla	Identificação na TriTrypsDB	Sentido (5'-3')	Sequência do Oligonucleotídeo Iniciador
NADH-fumarato-redutase	<i>TcFRD</i>	TcCLB.503841.80	Senso Antisenso	AAAGAGGCCTTCGAGGTTGT CCGTCGGTCTGGTGGTTTTG
Transportador de Hexose	<i>TcST</i>	TcCLB.53508231.9	Senso Antisenso	CAACGAATGAGTTTTGGGTGC GGTCGACATACATGGGGCAT
Malato-desidrogenase	<i>TcMDH</i>	TcCLB.506503.69	Senso Antisenso	CCAGACACTGAGGAAGATTGGT TAAAACGTGTGGCTCGCAGT
Enzima Málica	<i>TcME</i>	TcCLB.505183.30	Senso Antisenso	TGCAGGACCTTGTCAAGACG GTACGGGCGAGCAACTTTTT
Fosfoenolpiruvatocarboxicinase	<i>TcPEPCK</i>	TcCLB.508441.20	Senso Antisenso	ATGCCACGAATGAACCACCT GTCCCGCTCAGTCCAAAGAA
Piruvato fosfato-dicinase	<i>TcPPDK</i>	TcCLB.506297.190	Senso Antisenso	ACAGCAGATTGGTCAGAGCC CTCGCACAGAAGCCGATAGT
TCZ	<i>TCZ</i>	TcCLB.506197.10	Senso Antisenso	TGCACTCGGCTGATCGTTT ATTCCTCCAAGCAGCGGATA
Fosfatidilinositol-3-cinase	<i>TcPI3K</i>	TcCLB.510167.10	Senso Antisenso	AACTCATTTTTCGTCCGAGG GCTCTCGAACAACGATATCCA
Diacilglicerol-cinase	<i>TcDAGK</i>	TcCLB.507257.80	Senso Antisenso	GCGCACGCAGGAGATAGTAG GAGGGAACGCTGAGAGCAC
Calmodulina	<i>TcCaM</i>	TcCLB.507483.30	Senso Antisenso	CTACCTCTGCGATGGCACC AAAGTAAGCCCTGGTGGTGG

Fonte: O autor, 2022

2.7 Ressonância Magnética Nuclear

A avaliação das moléculas presentes no meio de cultura ao 7º dia de crescimento foi realizada através de ressonância magnética nuclear (RMN). Para tal, o meio de cultura sobrenadante dos respectivos tratamentos, após centrifugação das células a 3500 rpm, por 5 minutos, foi coletado e congelado a -20 °C até o dia de realização da RMN. O meio intacto (livre de células) também foi avaliado para comparação da captação ou síntese de metabólitos.

Após degelo completo em temperatura ambiente, as amostras foram vigorosamente homogeneizadas e diluídas em 10% de D₂O. Posteriormente, 600 µL dessa solução foram transferidos para um tubo de vidro de 5 mm de diâmetro (Wilmad) para obtenção dos espectros no reator Bruker Ascend 500, operando a 500.13 MHz para ¹H na temperatura de 298 K. Os espectros unidimensionais ¹H-zgesgp obtidos foram processados e analisados no software TOPSPIN 4.0.7 (Bruker Biospin) e as intensidades dos picos foram obtidas através do software AMIX viewer 4.0. Tais intensidades foram normalizadas pela quantidade de células em cada amostra. Os metabólitos foram identificados de acordo com o deslocamento química (ppm) descritos nas bases de dados Human Metabolome Data Base (disponível em: <https://en.humanmetabolome.com/>) e Biological Magnetic Resonance Data Bank (disponível em: <https://bmr.io/>).

2.8 Tratamento estatístico dos dados

As análises estatísticas foram conduzidas no software GraphPad Prism 8. O teste de Shapiro-Wilk foi utilizado para avaliação da distribuição normal dos dados. Uma vez em normalidade, foram empregados os testes de ANOVA unidirecional e pós-teste de Bonferroni ou de Tukey. Para as análises de metabolômica, além da ANOVA unidirecional, foi utilizado o método de Benjamini, Krieger e Yekutieli como teste de *False Discovery Rate*. Em todas as análises, os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

3 RESULTADOS

3.1 Genes envolvidos na sinalização por fosfatidilinosítídeos estão diferencialmente expressos após o tratamento com heme

Através da plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG, disponível em https://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?tcr04070) foram encontrados 25 genes putativos envolvidos na via de sinalização por fosfatidilinosítídeos em *T. cruzi* (Tabela 2). Os mesmos foram verificados junto aos resultados de transcriptômica do *Deep Sequencing* com o objetivo de avaliar se estes estariam diferencialmente expressos (DEGs). Dentre estes genes, foram encontrados 9 DEGS em função do tratamento com a molécula de heme, incluindo o gene da TcPI3K, cuja expressão diminuiu em 20% com o tratamento com heme (Tabela 2). Com base no que é demonstrado na plataforma KEGG, a influência de alguns destes genes na via encontra-se sumarizada na Figura 14. A expressão do gene que codifica TcDAGK encontra-se aumentada em 30% nos epimastigotas tratados com heme, segundo os resultados do transcriptoma (Tabela 2). Além disso, a expressão do gene que codifica uma calmodulina (TcCaM) também se encontra superexpresso em cerca de 30%. Embora não citada na plataforma KEGG, foi encontrada nos resultados do transcriptoma uma PI4K (codificada pelo gene Tc00.1047053511419.80) que está 24% subexpressa. A atuação dessa enzima na via ainda não foi demonstrada na plataforma utilizada.

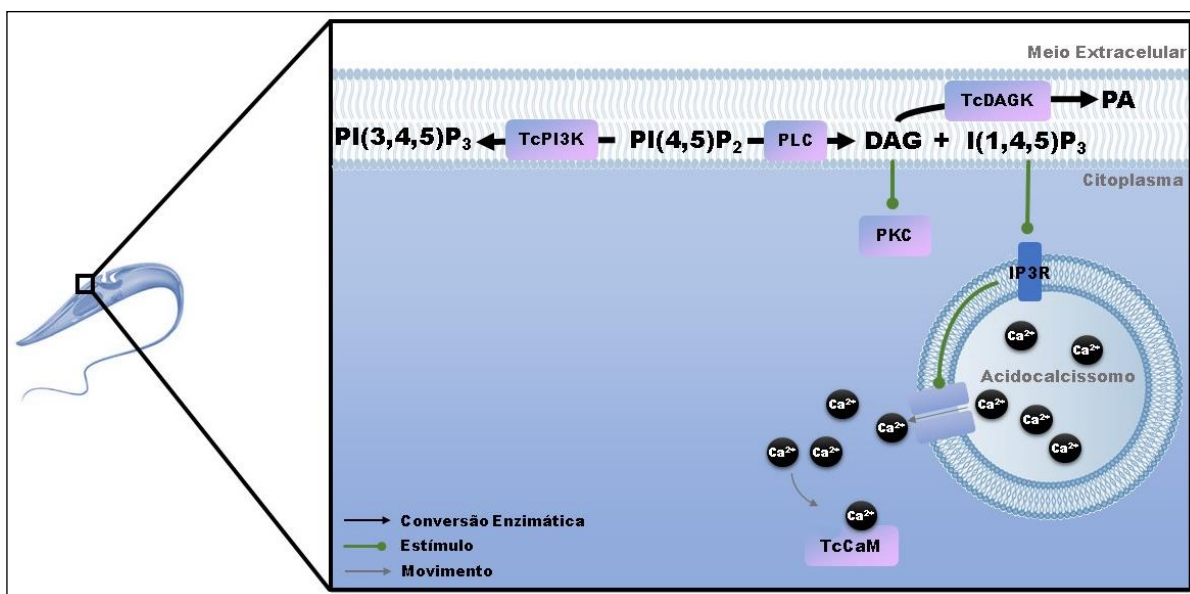
Tabela 2: Genes envolvidos na via PI3K em *T. cruzi*.

Gene	Função	Proteína	Expressão relativa
TcCLB.510167.10	Fosfatidilinositol-3-cinase 2 (TcPI3K)	XP_805828.1	0,80
TcCLB.511067.4	Fosfatidilinositol-3-cinase	XP_806323.1	-
TcCLB.505987.70	Fosfatidilinositol-4-cinase	XP_807019.1	-
TcCLB.507533.10	Fosfatidilinositol-4-cinase	XP_805326.1	-
TcCLB.508231.30	Fosfatidilinositol-3-cinase TOR1	XP_818605.1	-
TcCLB.510689.40	Fosfatidilinositol-3-cinase TOR2	XP_809528.1	-
TcCLB.508257.230	TOR cinase 3	XP_818955.1	-
TcCLB.509395.20	Proteína relacionada à Fosfatidilinositol-cinase	XP_814610.1	0,70
TcCLB.506223.120	Proteína Relacionada a Fosfatidilinositol-3-cinase	XP_812942.1	-
TcCLB.504149.160	Fosfolipase C específica de fosfatidilinositol	XP_818111.1	-
TcCLB.510879.160	Tirosinofosfatase	XP_814678.1	0,78
TcCLB.507483.30	Calmodulina (TcCaM)	XP_808089.1	1,28
TcCLB.507257.80	Diacilglicerol-cinase like (TcDAGK)	XP_814519.1	1,30
TcCLB.510989.30	Proteína de Ligação à Guanina Nucleotídeo	XP_809646.1	0,67
TcCLB.507641.104	<i>Small</i> GTPase	XP_819513.1	1,40
TcCLB.503627.20	Cinase Proteica	XP_804957.1	0,75
TcCLB.508831.110	Cinase de Serina/Treonina NEK20	XP_818925.1	0,69
TcCLB.504057.104	1-fosfatidilinositol-4-fosfato 5 Cinase	XP_817303.1	-
TcCLB.510105.130	Fosfatidilinositol-4-fosfato 5 Cinase	XP_819890.1	-
TcCLB.510101.130	Inositol-1,4,5-trifosfato fosfatase	XP_821224.1	-
TcCLB.504213.90	Inositolfosfato Cinase <i>like</i>	XP_814212.1	-
TcCLB.509179.140	Inositol-1 (ou 4) monofosfatase	XP_816449.1	-
TcCLB.506411.39	CDP-diacilglicerol Sintetase	XP_806056.1	-
TcCLB.503925.80	CDP-diacilglicerol-inositol 3-fosfatidiltransferase	XP_811459.1	-
TcCLB.510507.60	Receptor de Inositol-1,4,5-trifosfato	XP_810378.1	-

Nota: Os valores apresentados na expressão relativa são referentes ao log2 *fold change* encontrado no trabalho de Paes *et al.*, 2020. Traços indicam genes cuja expressão não variou com o tratamento. Em negrito, a TcPI3K de classe I descrita por Gimenez *et al*, 2015, envolvida na sinalização celular da forma epimastigota, e os genes TcCaM e TcDAGK escolhidos para avaliação no presente trabalho.

Fonte: O autor, 2022.

Figura 14: Via de sinalização por fosfatidilinosítídeos proposta em *T. cruzi* de acordo com a plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.



Legenda: PI: fosfatidilinositol; P2: bisfosfato, P3: trifosfato; PA: ácido fosfatídico; DAG: diacilglicerol; I: Inositol; TcPI3K: Fosfatidilinositol-3-fosfato de *T. cruzi*; PLC: Fosfolipase C; TcDAGK: Diacilglicerol-cinase de *T. cruzi*; PKC: proteína-cinase C; IP3R: Receptor de inositol-trifosfato; TcCaM: Calmodulina de *T. cruzi*.

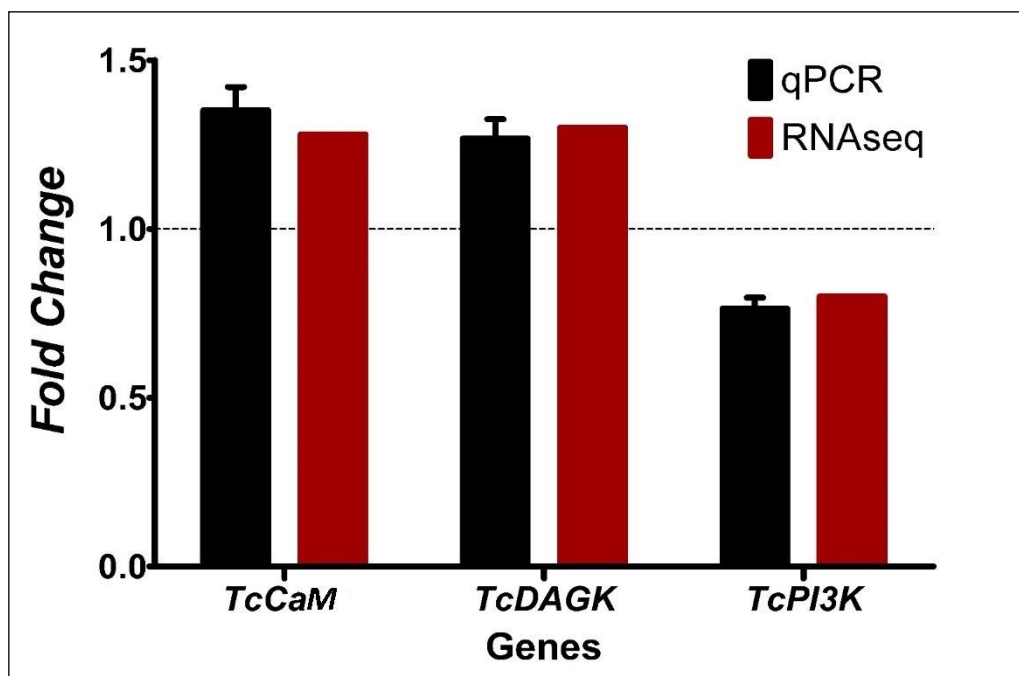
Nota: Envolvimento dos genes *TcPI3K*, *TcDAGK* e *TcCaM* na sinalização celular de epimastigotas de *T. cruzi*, de acordo com a plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes.

Fonte: O autor (com base na Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), 2022

3.2 A expressão dos genes *TcPI3K*, *TcDAGK* e *TcCaM* foi validada por qPCR

Foram conduzidos cinco experimentos independentes em triplicata com o objetivo de avaliar a expressão dos genes *TcPI3K*, *TcDAGK* e *TcCaM* sob influência da molécula de heme por qPCR. A expressão diferencial dos três genes foi confirmada através de qPCR (Gráfico 1). O gene *TcCaM* apresentou expressão diferencial média de 1,35 ($\pm 0,07$), assemelhando-se ao valor de 1,28 visto no RNAseq. O gene *TcDAGK* apresentou média de 1,27 ($\pm 0,06$), aproximando-se do valor de 1,30 obtido no RNAseq. Já o gene *TcPI3K* apresentou expressão diferencial de 0,77 ($\pm 0,03$), de forma similar ao valor de 0,80 observado no RNAseq.

Gráfico 1: Comparação da expressão dos genes *TcCaM*, *TcDAGK*, *TcPI3K* por qPCR e no RNAseq.



Legenda: *TcCaM*: Gene de calmodulina; *TcDAGK*: gene da Diacilglicerol-cinase-like; *TcPI3K*: Gene da Fosfatidilinositol-3-cinase.

Nota: Foram conduzidos cinco experimentos independentes para avaliação da expressão gênica. As barras pretas representam a média ($\pm$ desvio padrão) da expressão diferencial, calculada a partir do método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Barras vermelhas representam a expressão diferencial obtida pelo RNAseq de Paes *et al.*, 2020.

Fonte: O autor, 2022.

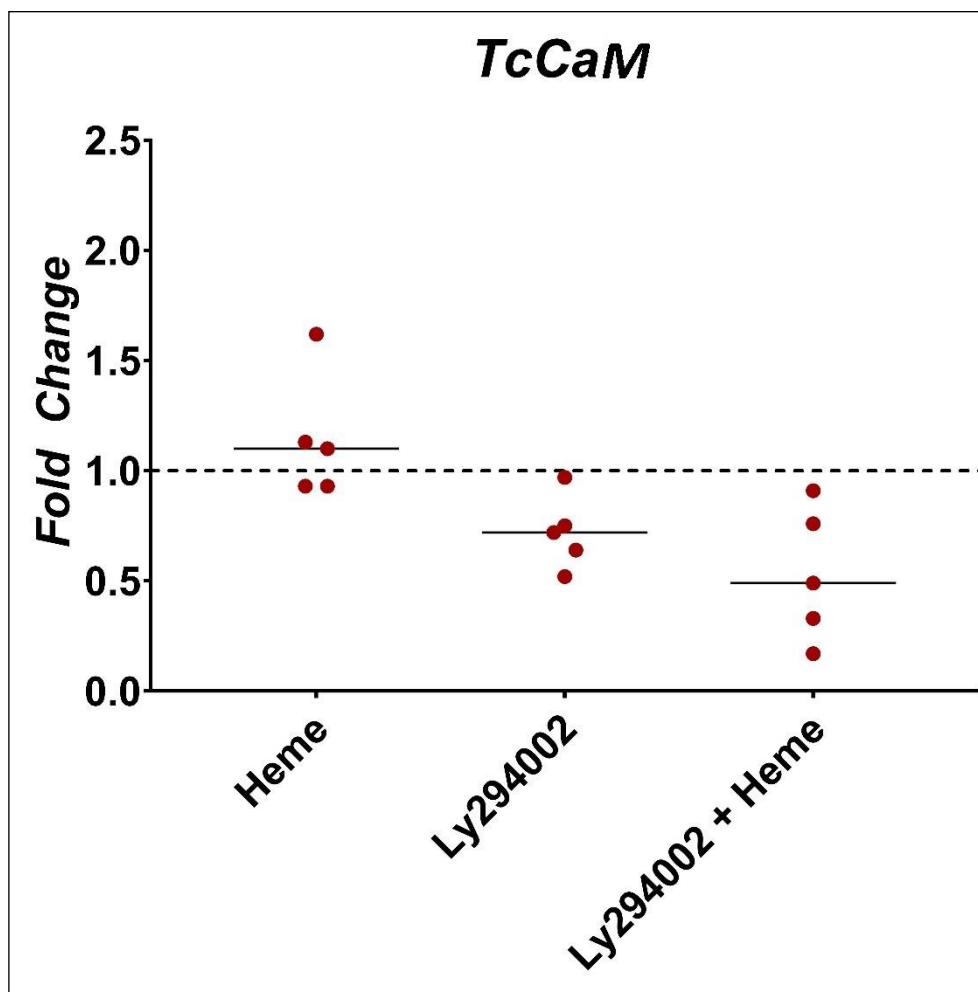
3.3 O efeito do inibidor Ly294002 sozinho e em conjunto ao heme sobre a expressão dos genes de sinalização *TcCaM*, *TcDAGK* e *TcPI3K*

Inicialmente, verificamos se os tratamentos com o inibidor de *TcPI3K*, sozinho ou em adição ao heme, influenciam a expressão dos genes *TcCaM*, *TcDAGK* e *TcPI3K* (Gráficos 2-4). O tratamento com o veículo da droga (DMSO 0,04%) não modificou a expressão de nenhum dos genes avaliados. A expressão do gene *TcCaM* (Gráfico 2) apresentou aumento de mais de 14% com o tratamento com heme, enquanto o tratamento com Ly294002 resultou em diminuição da expressão em 28%. O tratamento concomitante (heme + Ly294002) resultou em diminuição da expressão em mais de 46%.

O tratamento com heme aumentou a expressão de *TcDAGK* em 30% e o tratamento com Ly294002 diminuiu a expressão desse gene em 45% (Gráfico 3). O tratamento com heme e Ly294002 diminuiu a expressão de *TcDAGK* em mais de 61%. Já o gene *TcPI3K* teve diminuição de expressão em todos os tratamentos, sendo mais de 21% com heme, em 67% com o inibidor e em 15% com o inibidor em conjunto de heme, indicando que possivelmente o efeito do heme sobre a expressão desse gene reverte o efeito da droga (Gráfico 4).

Esses resultados sugerem que a *TcPI3K*, possivelmente, participa nos processos de expressão dos três genes avaliados, sendo necessária para a correta expressão gênica. Adicionalmente, a molécula de heme não reverte o papel da inibição de *TcPI3K* para os genes *TcCaM* e *TcDAGK* nos grupos tratados com ambas as moléculas.

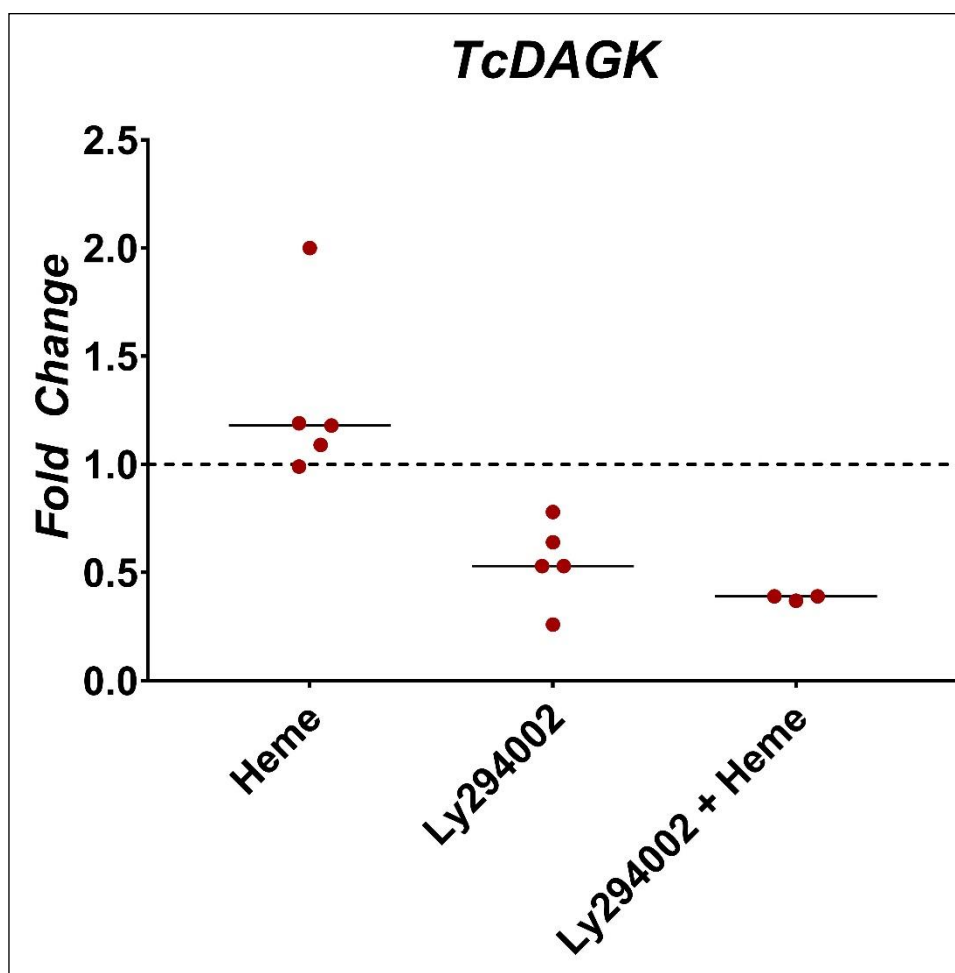
Gráfico 2: Variação da expressão gênica de *TcCaM* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μ M de heme sozinho ou em adição de 20 μ M de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

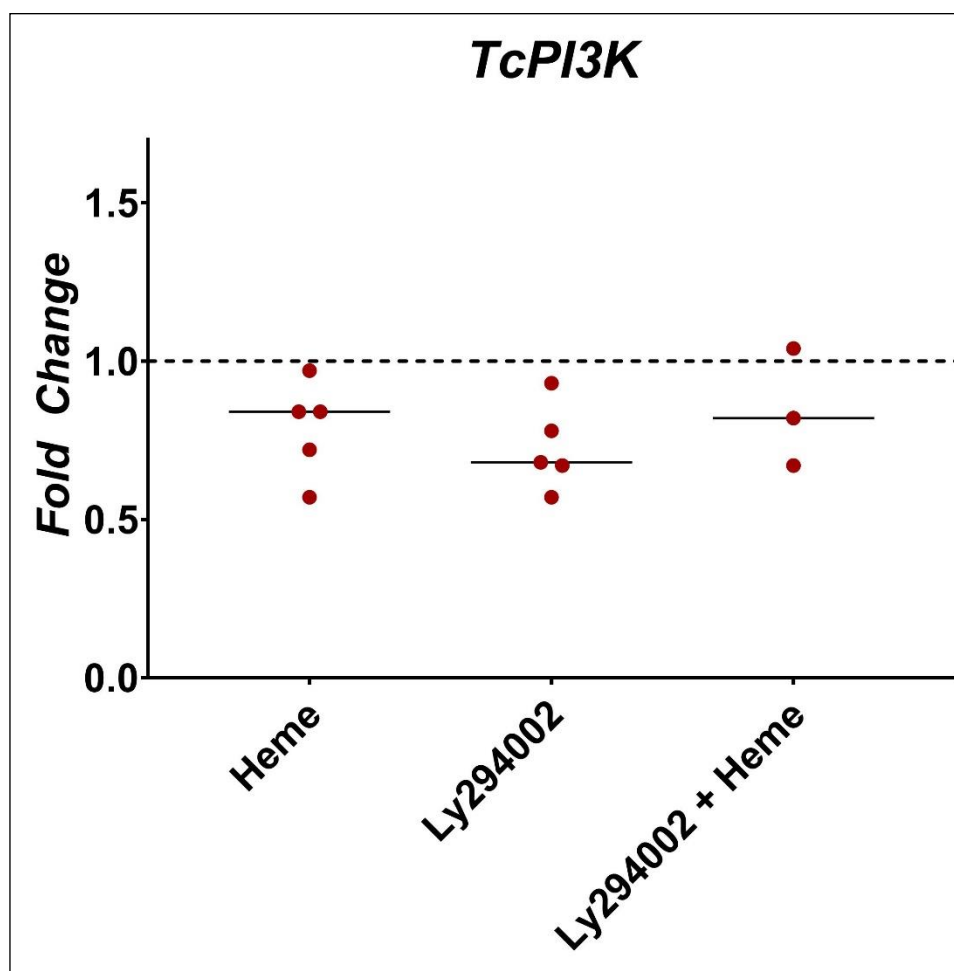
Gráfico 3: Variação da expressão gênica de *TcDAGK* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μM de heme sozinho ou em adição de 20 μM de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 4: Variação da expressão gênica de *TcPI3K* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μ M de heme sozinho ou em adição de 20 μ M de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

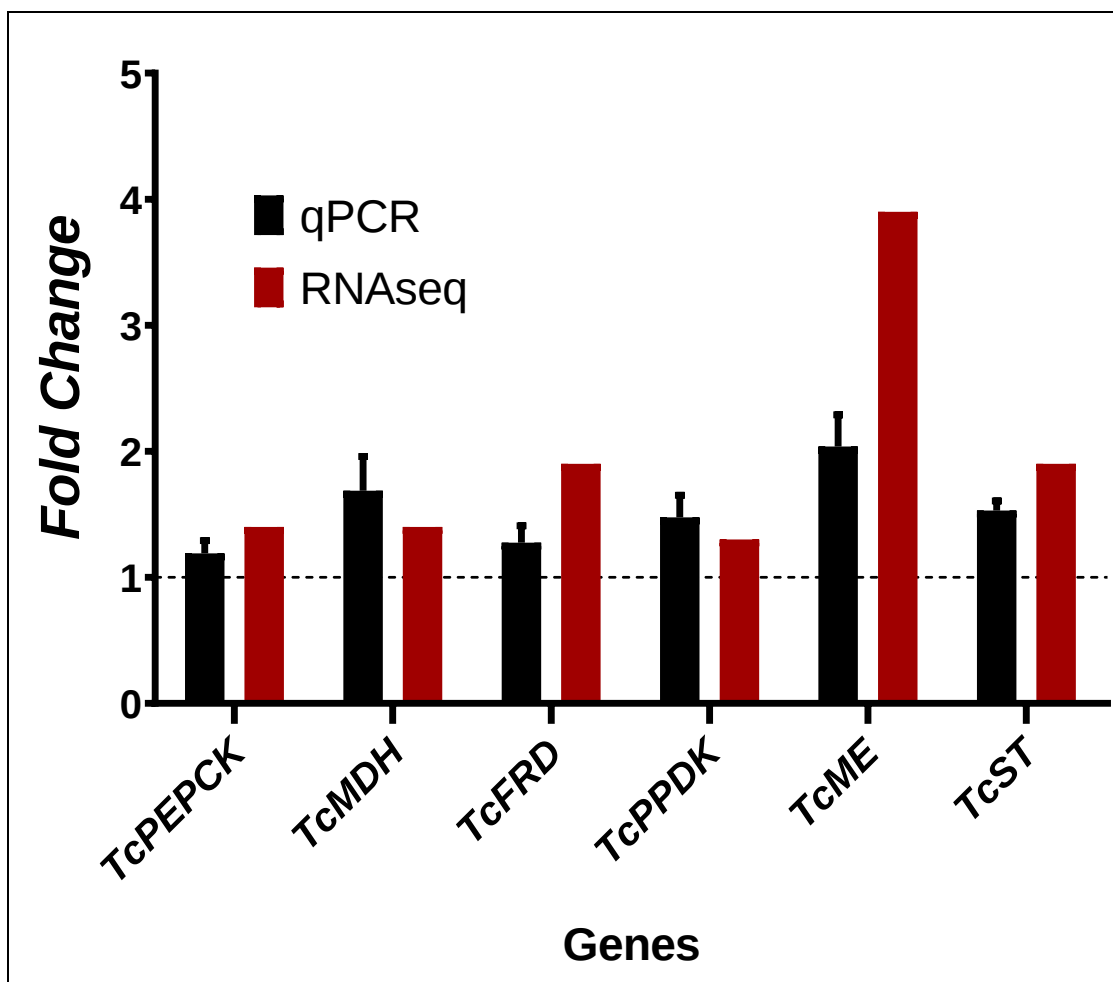
3.4 Comparação da expressão gênica de *TcPPDK*, *TcPEPCK*, *TcMDH*, *TcFRD*, *TcME* e de *TcST* por qPCR e no RNAseq

Uma vez que a molécula de heme é capaz de modular a expressão de genes do metabolismo energético, sobretudo glicossomal, foi avaliada a expressão dos genes *TcPPDK*, da síntese glicossomal de Ala; *TcPEPCK*, *TcMDH* e *TcFRD*, da fermentação succínica, *TcME*,

que foi o gene com a maior expressão diferencial no RNAseq (Paes *et al.*, 2020) e do transportador glicossomal de glicose *TcST* (Gráfico 5). Para tal, foram conduzidos cinco experimentos independentes em triplicata com o objetivo de avaliar se a expressão dos genes de metabolismo observada no RNAseq, sob influência da molécula de heme, era similar à obtida por qPCR.

A variação da expressão dos genes da fermentação de succinato *TcPEPCK*, *TcMDH* e *TcFRD* apresentaram expressão média de 1,15 ($\pm 0,12$), 1,88 ($\pm 0,25$), e 1,45 ($\pm 0,14$), respectivamente, de forma similar ao que foi observado RNAseq: 1,40 para os dois primeiros genes e 1,90 para o último. A expressão diferencial do gene *TcPPDK* apresentou um valor de 1,33 ($\pm 0,130$), corroborando o observado no RNAseq (1,30). A expressão do gene do transportador de hexose foi de 1,39 ($\pm 0,08$), enquanto que no RNAseq foi de 1,90. Já a expressão diferencial do gene da enzima málica apresentou o maior aumento no RNAseq (3,90), o mesmo acontecendo quando avaliado por qPCR ($2,23 \pm 0,03$).

Gráfico 5: Comparação da expressão diferencial obtidos no RNAseq e por qPCR para os genes de fermentação de succinato, síntese glicossomal de alanina, transporte de açúcares e enzima málica.



Legenda: *TcPEPCK*: Gene da Fosfoenolpiruvato-carboxicinase; *TcMDH*: Gene da Malato-desidrogenase; *TcFRD*: Gene da Fumarato-redutase; *TcPPDK*: Gene da Fosfopiruvato-dicinasase; *TcME*: Gene da Enzima Málica; *TcST*: Gene do transportador de hexoses.

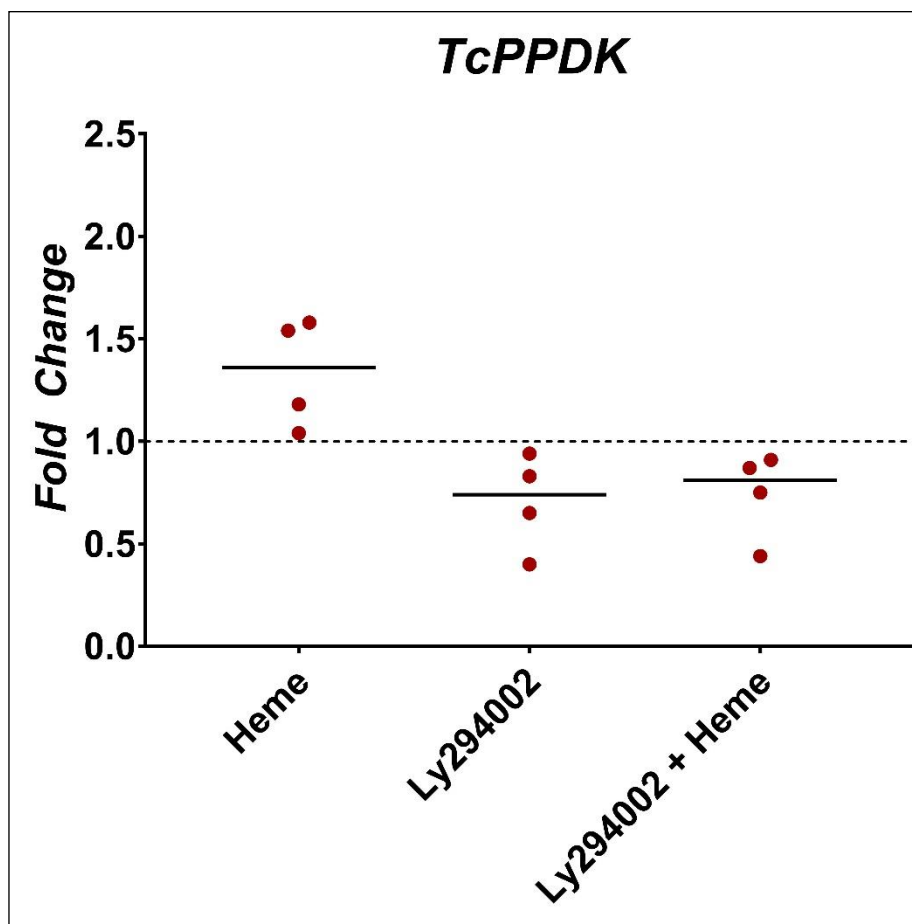
Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μ M de heme para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador.

Fonte: O autor, 2022.

3.5 Efeitos do inibidor de TcPI3K sobre a expressão dos genes de metabolismo energético

Posteriormente, o efeito do inibidor Ly294002 foi testado sobre a expressão dos genes do metabolismo energético anteriormente citados: *TcPPDK* (Gráfico 6), *TcPEPCK* (Gráfico 7), *TcMDH* (Gráfico 8), *TcFRD* (Gráfico 9), *TcME* (Gráfico 10) e *TcST* (Gráfico 11). De forma similar ao que foi observado nos três genes de sinalização, à exceção do gene do transportador de hexoses, todos os genes de metabolismo apresentaram diminuição da expressão quando comparados ao grupo controle, respectivamente: 29,5%, 29,0%, 26,2%, 26,8% e 47,5%. O tratamento com o inibidor na presença de heme resultou em níveis de expressão dos genes *TcPPDK*, *TcPEPCK*, *TcMDH* e *TcME* semelhantes àqueles observados na ausência de heme: 25,8%, 12,7%, 41,3% e 47,7%, respectivamente. Curiosamente, a expressão do gene *TcFRD* não variou no grupo inibidor + heme. Já a expressão do gene *TcST* não se modificou na presença do inibidor, porém a expressão na presença do inibidor e de heme teve um discreto aumento (13%), indicando que a porfirina, no caso desse gene, desempenha seu papel no aumento da expressão em menor grau devido à presença da droga.

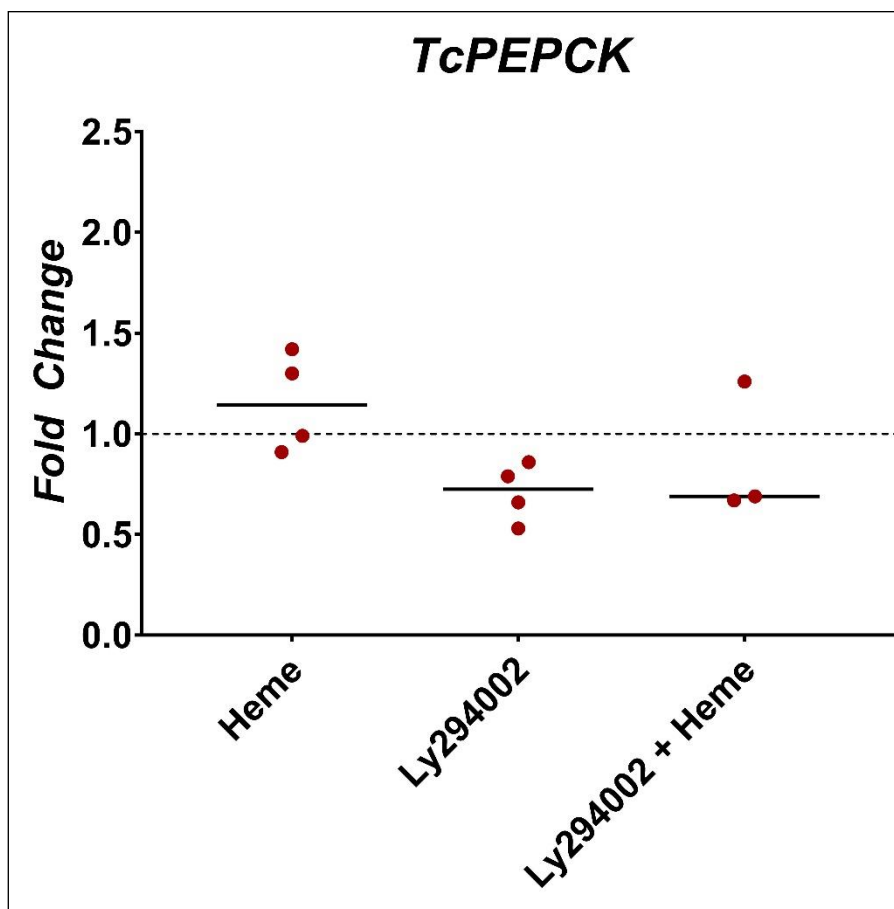
Gráfico 6: Variação da expressão gênica de *TcPPDK* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μM de heme sozinho ou em adição de 20 μM de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de até cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

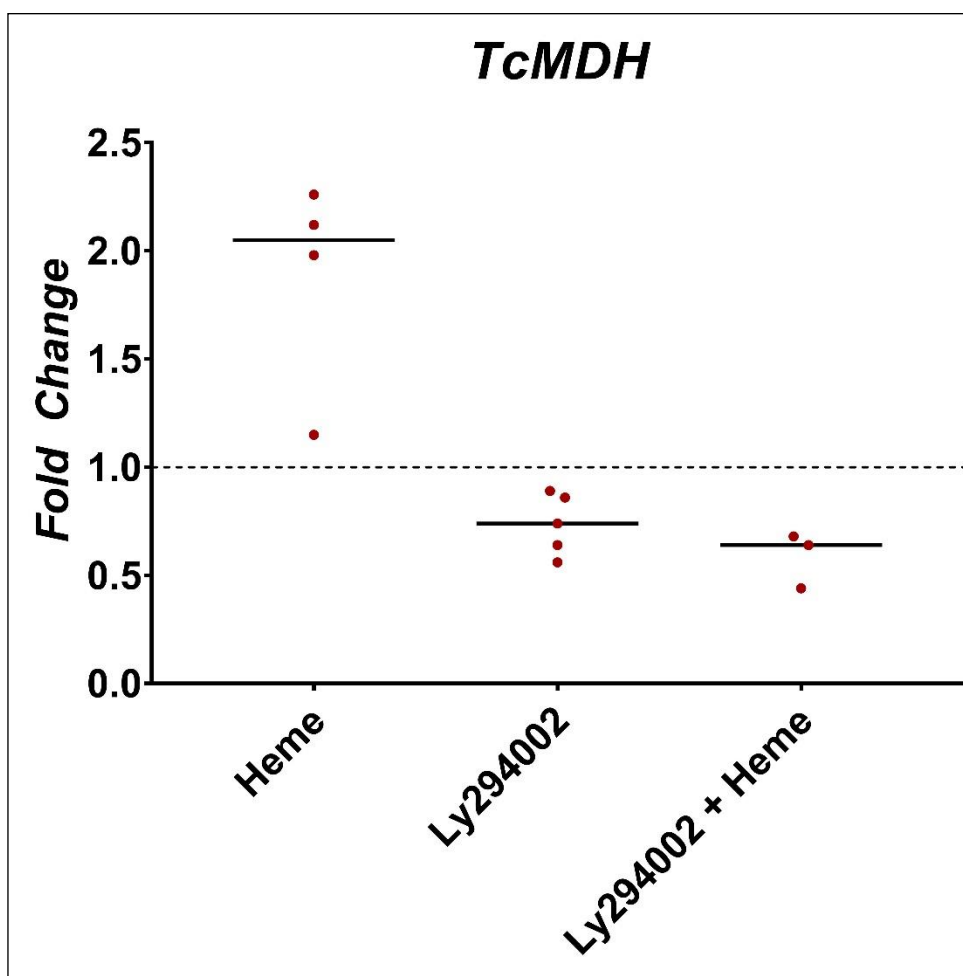
Gráfico 7: Variação da expressão gênica de *TcPEPCK* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μM de heme sozinho ou em adição de 20 μM de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de até cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

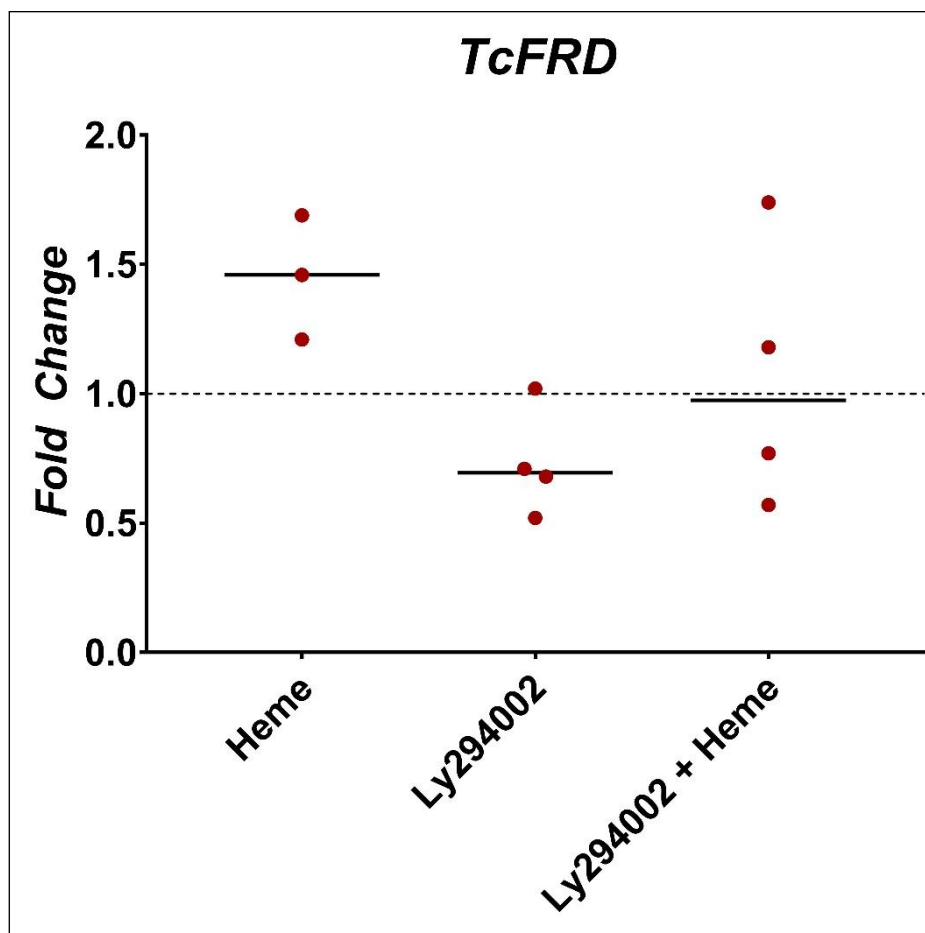
Gráfico 8: Variação da expressão gênica de *TcMDH* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μM de heme sozinho ou em adição de 20 μM de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de até cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

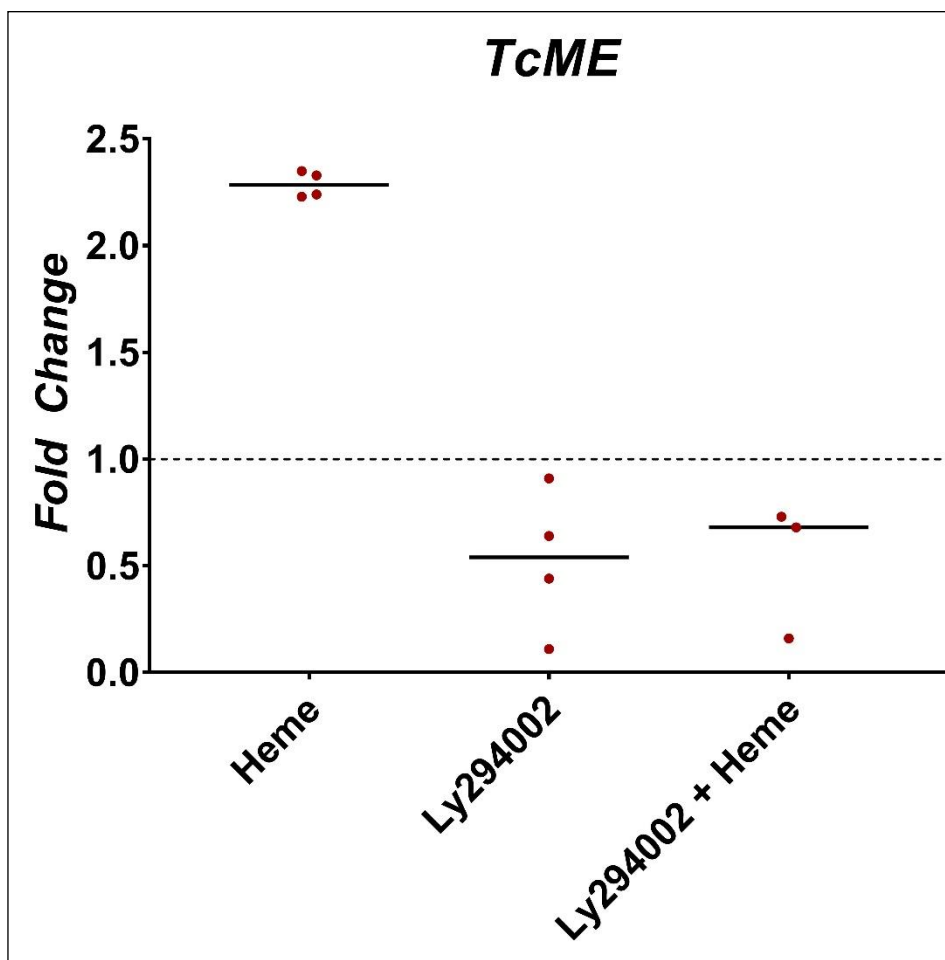
Gráfico 9: Variação da expressão gênica de *TcFRD* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μ M de heme sozinho ou em adição de 20 μ M de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) obtidos a partir de até cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

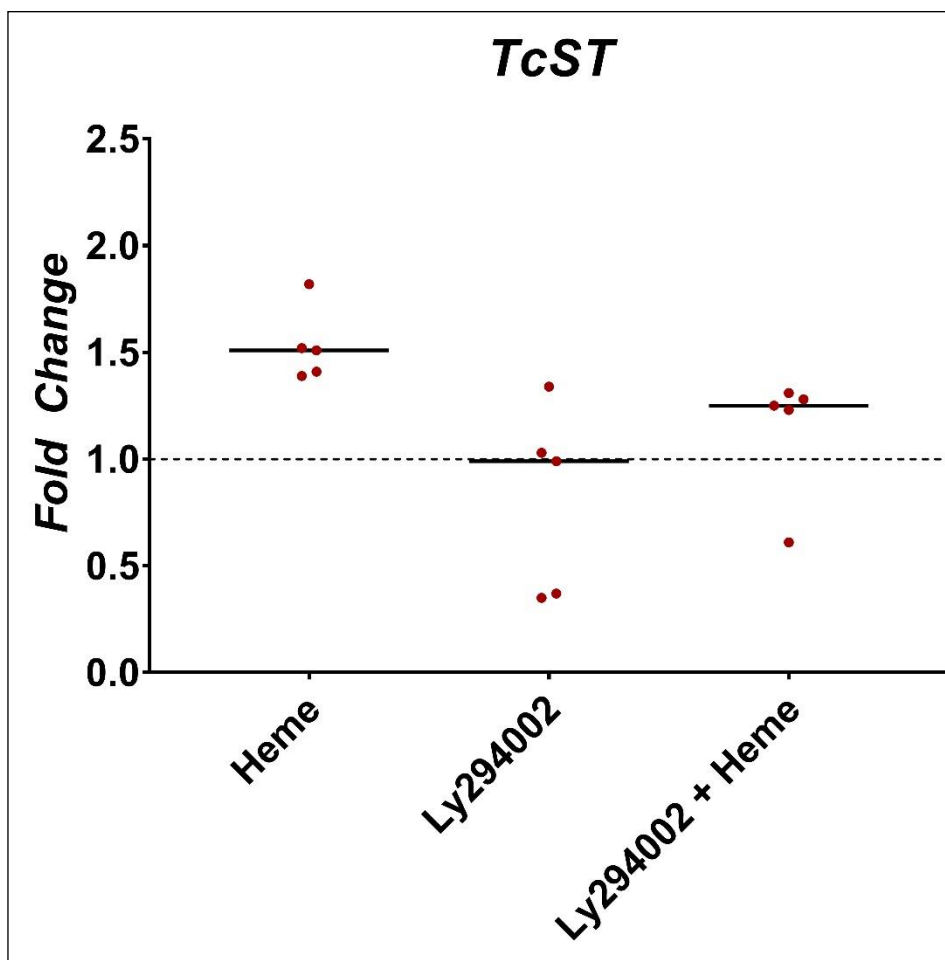
Gráfico 10: Variação da expressão gênica de *TcME* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μ M de heme sozinho ou em adição de 20 μ M de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de até cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 11: Variação da expressão gênica de *TcST* em epimastigotas de *T. cruzi* na presença de heme e/ou Ly294002.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μM de heme sozinho ou em adição de 20 μM de Ly294002, além de DMSO 0,04% (dados não mostrados. Não houve diferença estatística em comparação ao controle), para avaliação da expressão gênica. Os valores de expressão diferencial (média $\pm$ desvio padrão) foram obtidos a partir de até cinco experimentos independentes, comparando o grupo tratado com o grupo controle, a partir do cálculo de $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gene *TCZ* foi utilizado como normalizador. Valores muito discrepantes foram desconsiderados.

Fonte: O autor, 2022.

3.6 Efeitos do tratamento com heme e/ou Ly294002 sobre a respiração mitocondrial

Com o objetivo de verificar a influência dos tratamentos com Ly294002 acrescido ou não de heme sobre a taxa de consumo de oxigênio pela mitocôndria da forma epimastigota, foram realizados cinco experimentos independentes onde o consumo foi avaliado ao 7º dia de crescimento celular por respirometria de alta resolução (Gráfico 12).

Foi verificado que o tratamento com 20 μM de Ly294002 é responsável por diminuir a taxa do consumo basal de oxigênio ($1,70 \pm 0,13 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$) quando comparada ao grupo controle ($2,35 \pm 0,18 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; $p = 0,04$), ao grupo heme ($2,60 \pm 0,11 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; $p = 0,008$) e ao grupo Ly294002 + heme ($2,53 \pm 0,16 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; $p = 0,008$) (Gráfico 12, BASAL). Não houve diferença estatística entre os grupos controle e heme ($p = 0,72$), ou entre o grupo controle e DMSO ($2,20 \pm 0,31 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; $p = 0,99$). Esses resultados indicam que a inibição de TcPI3K isoladamente é responsável por diminuir o uso de oxigênio pelo sistema de transporte de elétrons e que a adição de heme é responsável por reverter tal diminuição.

Ao administrar oligomicina na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{Ml}$, um inibidor do complexo ATP-sintase, ocorre a diminuição do consumo de oxigênio também nas células tratadas com Ly294002 ($0,80 \pm 0,11 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$) quando comparadas ao grupo controle ($1,75 \pm 0,12 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; $p = 0,006$) e ao grupo heme ($1,80 \pm 0,22 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; $p = 0,006$) (Gráfico 12, OLIGOMICINA). Embora visualmente diferente, o grupo tratado com o inibidor + heme ($1,30 \pm 0,14 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$) não apresentou diferença estatisticamente significativa aos demais grupos (em comparação ao controle, $p = 0,200$; ao heme, $p = 0,18$; e ao Ly294002, $p = 0,19$). Uma vez mais, não houve diferença estatisticamente significativa quando foram comparados os grupos controle e heme ($p = 0,99$) e controle e DMSO ($1,73 \pm 0,10 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; $p = 1,00$). Dessa forma, é possível concluir que, ao desvincular a síntese de ATP do STE, o consumo de oxigênio nas células com inibidor de TcPI3K também é menor.

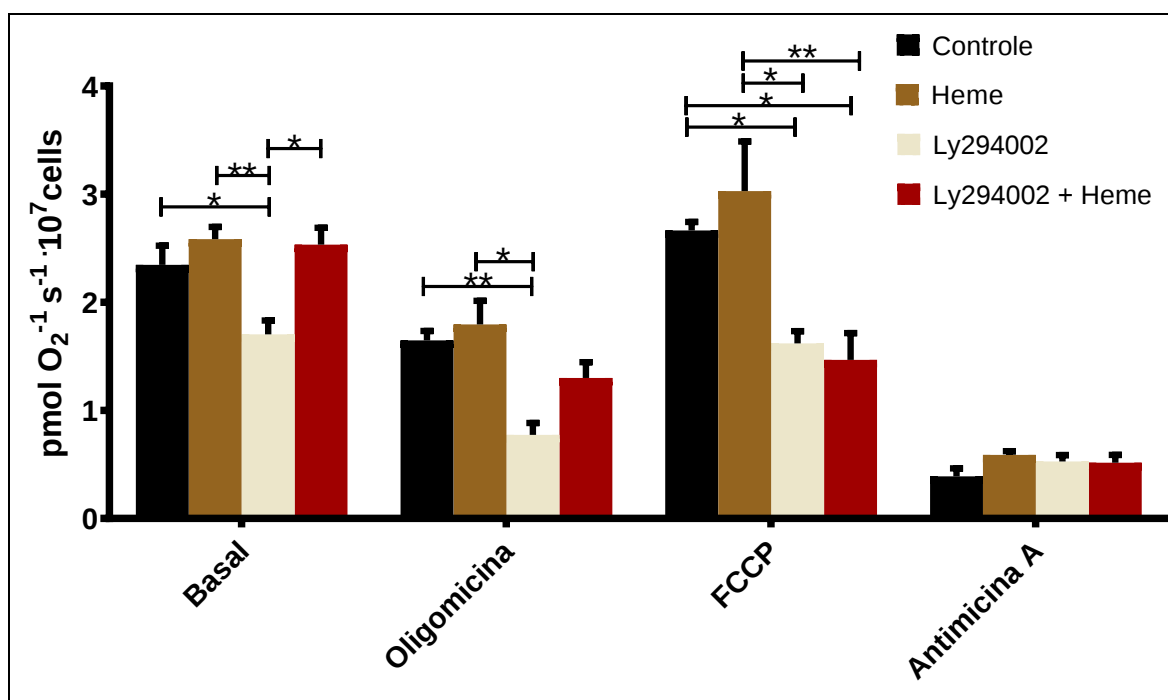
Utilizando o desacoplador FCCP em concentrações crescentes de 250 a 1000 Nm , foi obtida a taxa de consumo de oxigênio na capacidade máxima de transporte de elétrons pelo STE (Gráfico 12, FCCP). Nesse cenário, foi observado que o inibidor de TcPI3K, sozinho ($1,62 \pm 0,11 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$) ou em adição do heme ($1,50 \pm 0,25 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$), é responsável por reduzir o uso de oxigênio pela mitocôndria quando comparados ao controle ($2,66 \pm 0,08 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; respectivamente, $p = 0,04$ e $p = 0,02$) e quando

comparado ao grupo heme ($3,00 \pm 0,46 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; respectivamente, $p = 0,01$ e $p = 0,005$). A comparação entre os grupos controle e heme ($p = 0,73$) e controle e DMSO ($2,44 \pm 0,30 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$, $p = 0,96$) não resultaram em diferença estatística. Assim sendo, com a capacidade máxima de transporte de elétrons a molécula de heme não é capaz de reverter a diminuição causada pelo inibidor.

Finalmente, foi administrado o inibidor do complexo IV, antimicina A, com o objetivo de verificar o consumo de oxigênio não mitocondrial, onde quaisquer dos tratamentos não foram responsáveis por causar alterações (isto é, após o tratamento estatístico, todos os valores de p foram superiores a 0,05). As taxas de respiração obtidas foram: controle, $0,40 \pm 0,07 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; DMSO: $0,52 \pm 0,04 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; heme, $0,60 \pm 0,03 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; Ly294002, $0,53 \pm 0,06 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$; e Ly294002 + heme, $0,51 \pm 0,07 \text{ pmol O}_2^{-1} \text{ s}^{-1} \cdot 10^7 \text{ células}$ (Gráfico 12, ANTIMICINA A).

Em conjunto, esses resultados sugerem que o correto funcionamento da TcPI3K é necessário para a regulação da atividade do STE, onde a inibição dessa enzima reduz o consumo de oxigênio mitocondrial.

Gráfico 12: Variação na taxa do consumo de oxigênio pela mitocôndria de epimastigotas de *T. cruzi* tratados com heme e/ou Ly294002 na presença de Oligomicina, FCCP e Antimicina A.



Legenda: *: P, 0,05; **: p< 0,01; FCCP: Carbonil cianida p-trifluorometoxifenilhidrazona.

Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com 30 μ M de heme sozinho ou em adição de 20 μ M de Ly294002 para avaliação do consumo mitocondrial de oxigênio através de respirometria de alta resolução. Foram conduzidos cinco experimentos independentes. A influência do veículo (DMSO 0,04%) também foi testada e não houve diferença estatística quando comparada ao controle. O tratamento estatístico foi realizado por ANOVA unidirecional com pós-teste de Tukey. Os moduladores mitocondriais foram administrados na câmara do equipamento após estabilização do sinal basal de oxigênio, nas seguintes concentrações: Oligomicina 2 μ g/ML, FCCP 250 a 1000 Nm e Antimicina A 3 μ g/ML.

Fonte: O autor, 2022.

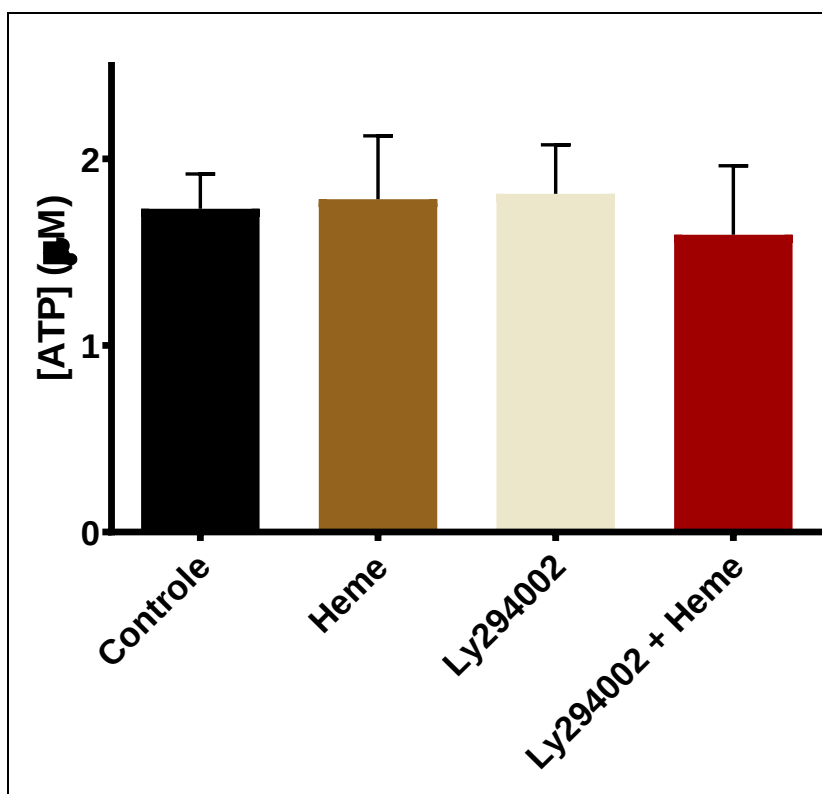
3.7 Variação da concentração de ATP em epimastigotas de *T. cruzi* expostos ao inibidor Ly294002 sozinho e na presença do heme

Uma vez verificado que o inibidor de TcPI3K utilizado é responsável por diminuir a respiração mitocondrial, a síntese de ATP poderia estar diminuída nas células. Assim sendo, partiu-se a avaliar se a concentração de ATP celular poderia ser afetada por tal tratamento.

Através de três experimentos independentes, foi verificado que a concentração de ATP intracelular na forma epimastigota de *T. cruzi* não sofre variação em função da inibição

farmacológica de TcPI3K, mesmo na presença da molécula de heme (Gráfico 13) (isto é, os valores de p obtidos na comparação das médias de todos os grupos foram superiores a 0,05). Após interpolação da luminescência obtida em cada tratamento com a curva-padrão, a concentração de ATP mensurada em cada grupo foi: Controle, $1,63 \pm 0,19 \mu\text{M}$; DMSO, $1,92 \pm 0,16 \mu\text{M}$; Heme, $1,78 \pm 0,34 \mu\text{M}$; Ly294002, $1,81 \pm 0,26 \mu\text{M}$; e Ly294002 + heme, $1,60 \pm 0,37 \mu\text{M}$. Esses resultados sugerem que as células, seja num cenário de obtenção de ATP por fermentação devido ao tratamento de heme, como proposto por Paes *et al.* (2020), ou num cenário onde a respiração mitocondrial está contida, as células são capazes de manterem os níveis de ATP por outras formas.

Gráfico 13: Concentração de ATP intracelular nas formas epimastigotas de *T. cruzi* expostas ao heme, ao inibidor Ly294002 e a ambos.



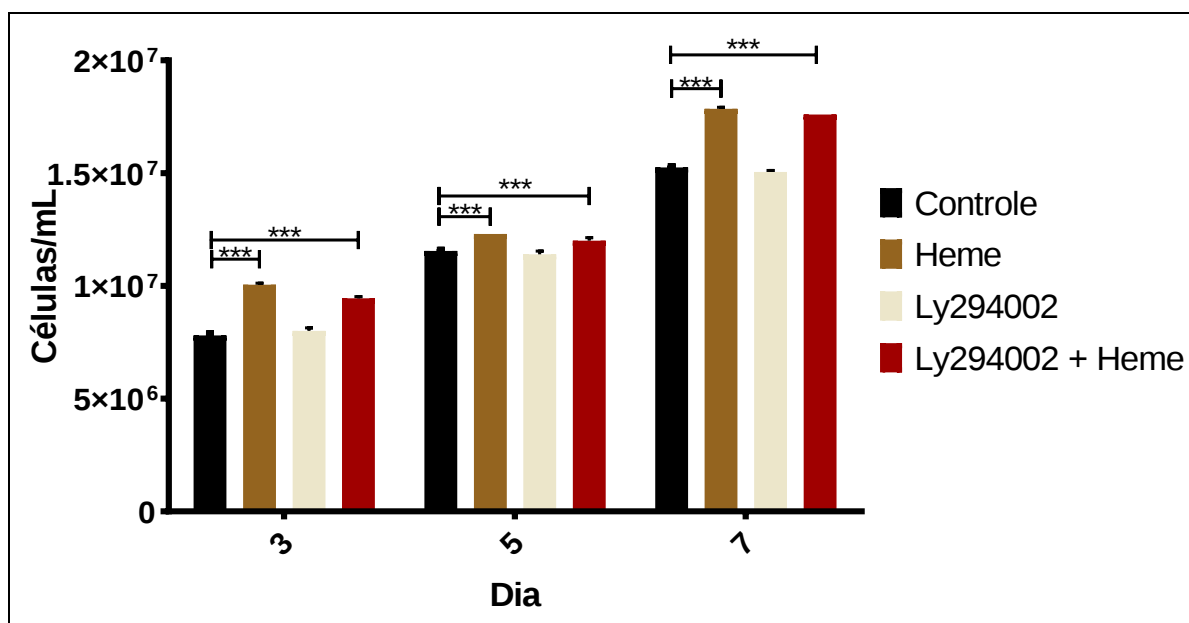
Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* CLBrener foram desafiados por 7 dias com $30 \mu\text{M}$ de heme sozinho ou em adição de $20 \mu\text{M}$ de Ly294002 para avaliação da concentração de ATP intracelular em três experimentos independentes. A influência do veículo (DMSO 0,04%) também foi testada e não houve diferença estatística quando comparada ao controle. O tratamento estatístico foi realizado por ANOVA unidirecional com pós-teste de Tukey.

Fonte: O autor, 2022.

3.8 Efeitos de Ly294002 sozinha e em adição ao heme na proliferação da forma epimastigota

A proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi* foi avaliada ao longo de 7 dias. Foi observado que a molécula de heme, ao terceiro, quinto e sétimo dias, aumenta a proliferação celular quando administrada sozinha ou mesmo em adição de Ly294002. Ao sétimo dia, respectivamente, esses tratamentos aumentaram a proliferação, em média, em 18% e 16% (Gráfico 14, Tabela 3). A presença desse inibidor sozinho não alterou a taxa proliferativa das células.

Gráfico 14: Proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi* ao longo de 7 dias na presença de heme 30 μ M e/ou Ly294002 20 μ M.



Legenda: ***: $p < 0,01$; mL: mililitros

Nota: Gráfico representativo de três experimentos de proliferação celular independentes. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, onde Epimastigotas CLBrener foram desafiados com heme a 30 μ M e/ou Ly294002 a 20 μ M por 7 dias. A influência do veículo do inibidor (DMSO 0,04%) foi testada e não houve diferença estatística quando comparada ao controle. As barras refletem a média de contagem em cada um dos dias $\pm$ desvio padrão da média. O tratamento estatístico foi realizado através de ANOVA unidirecional com pós-teste de Bonferroni.

Fonte: O autor, 2022.

Tabela 3: Porcentagens médias do total de células ao sétimo dia.

Tratamento	Média do Total de Células (%)	± Desvio Padrão
Controle	100,00	-
DMSO	97,51	0,85
Heme	118,10	1,05
Ly294002	98,31	0,38
Ly294002 + Heme	116,31	0,90

Nota: Tabela contendo a média da proliferação celular, em relação ao controle, de 3 experimentos de independentes. Os experimentos foram conduzidos em duplicata, onde epimastigotas CLBrener foram desafiados com heme a 30 μ M e/ou Ly294002 a 20 μ M por 7 dias.

Fonte: O autor, 2022.

3.9 Metabólitos presentes no meio de cultura após 7 dias de crescimento na presença do inibidor Ly294002 sozinho e em adição de heme

Uma vez que as demais análises foram realizadas ao sétimo dia de tratamento, a metabolômica do sobrenadante do meio de cultura foi realizada neste mesmo dia. Para tal, o meio sobrenadante foi coletado e analisado por RMN para obtenção dos espectros referentes aos metabólitos presentes nessa solução. A partir da comparação da média de intensidade obtida em cada tratamento e a intensidade obtida no meio de cultura puro (livre de células), foi possível verificar se os parasitos sintetizaram e excretaram os metabólitos, ou se os mesmos foram captados do meio. Nesse sentido, a busca por metabólitos foi direcionada a (1) moléculas produzidas na fermentação aeróbica: succinato e alanina (2) aminoácidos ou precursores destes; e (3) os carboidratos, glicose, manose e hexoses de deslocamento químico similar (isto é, glicose, frutose e galactose), e acetato.

Quando em comparação ao grupo controle, o grupo heme aumentou a captação de glicose em 31% ($p = 0,030$) e de hexoses em 37,5% ($p = 0,022$) (Gráfico 15). Também houve diferença estatística quando o grupo Ly294002 + heme foi comparado ao grupo heme, onde a captação de glicose diminuiu em 43,9% ($p = 0,044$) e a captação de hexoses diminuiu em ($p = 0,043$) (Gráfico 15), ambas as taxas se assemelhando ao grupo controle. Dessa forma, é possível constatar que heme aumenta a captação de açúcares e que o tratamento conjunto dessa porfirina com o inibidor de TcPI3K reverte tal captação, assemelhando-se ao grupo controle. Ou seja, os

efeitos celulares causados por heme na captação de monossacarídeos do meio são dependentes do correto funcionamento de TcPI3K.

Já dentre as moléculas produzidas e excretadas, succinato, alanina e acetato não apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos, onde os valores de *p* da ANOVA unidirecional foram, respectivamente: 0,307, 0,934 e 0,670 (Gráfico 16).

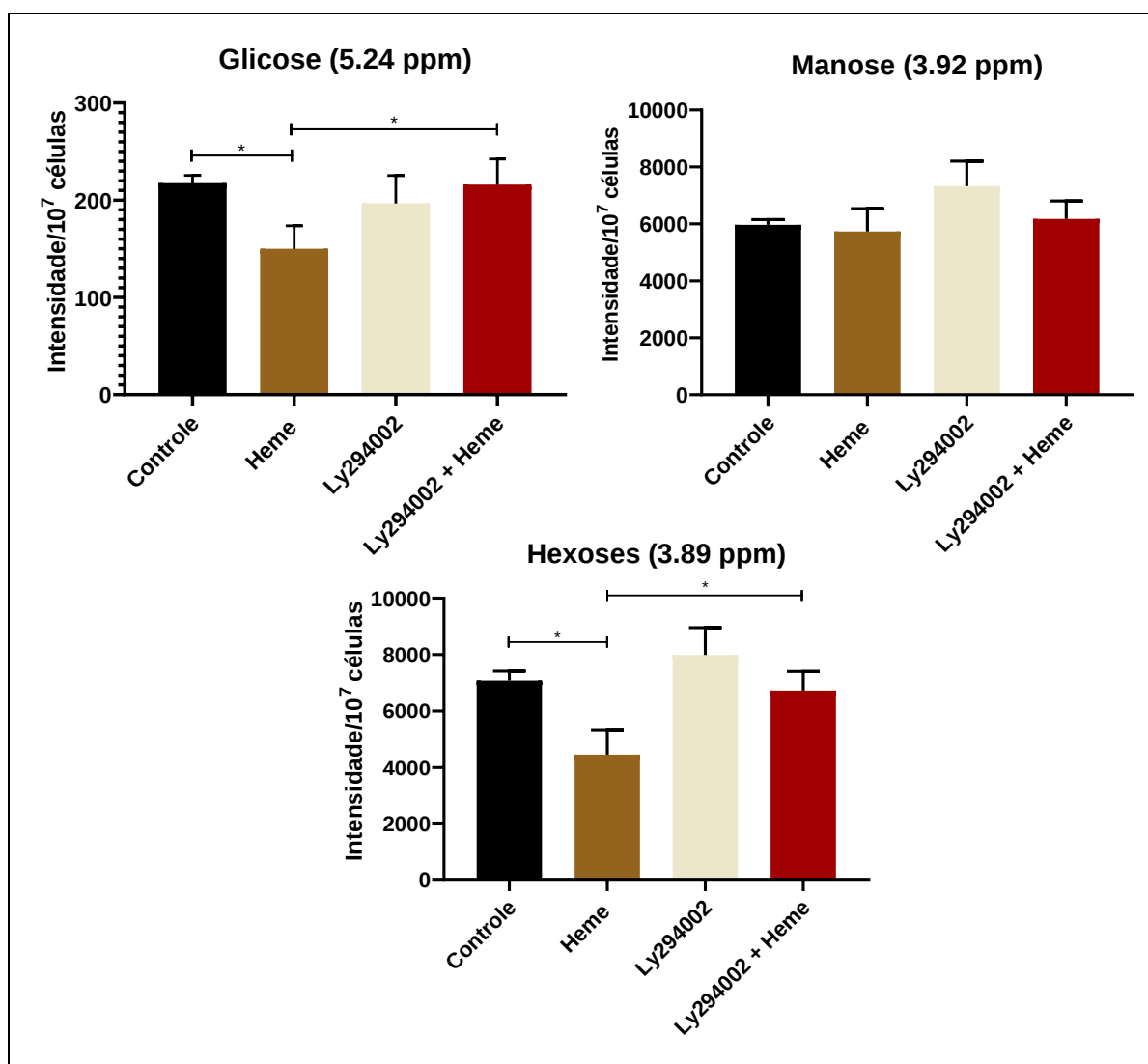
A quantidade dos demais aminoácidos existentes no meio sobrenadante também foi avaliada. A captação de histidina demonstrou-se diminuída em 32,6% no tratamento com Ly294002, embora não haja diferença estatisticamente significativa. Tais resultados sugerem que o parasito utiliza histidina como fonte de carbono e que a inibição de TcPI3K, isoladamente da presença de heme, diminui sua captação do meio de cultura (Gráfico 17).

A captação de aminoácidos de cadeia lateral ramificada (BCAA, do inglês *branched chain amino acids*) e de Phe também foi diminuída no grupo heme tanto em comparação ao grupo controle quando em comparação ao grupo heme + droga (respectivamente, 32%, *p* = 0,021 e 30,7%, *p* = 0,045, para BCAA; 42,6%, *p* = 0,037 e 45% *p* = 0,045, para Phe). A captação de Glu foi estatisticamente significativa no grupo heme quando comparado ao grupo controle (aumento de 30,9%, *p* = 0,036) e no grupo Ly294002 + heme quando comparado ao grupo heme (diminuição de 44,4%, *p* = 0,049). Já Arg (*p* = 0,267) e Betaína (*p* = 0,973), um aminoácido precursor da síntese de metionina, não apresentaram qualquer variação estatisticamente significativa (Gráfico 17).

Os aminoácidos Lys (*p* = 0,596), Met (*p* = 0,426), Pro (*p* = 0,949), Tir (*p* = 0,922), Trp (*p* = 0,480) e Tre (*p* = 0,902) não apresentaram modificação na taxa de captação ao sétimo dia (Gráfico 18).

Dessa forma, coletivamente, é possível concluir que a inibição de TcPI3K interfere nos efeitos de heme sobre o estímulo da captação dos aminoácidos BCAA, Phe e Glu, e de hexoses.

Gráfico 15: Carboidratos identificados por RMN no sobrenadante de epimastigotas de *T. cruzi* após 7 dias de tratamento.

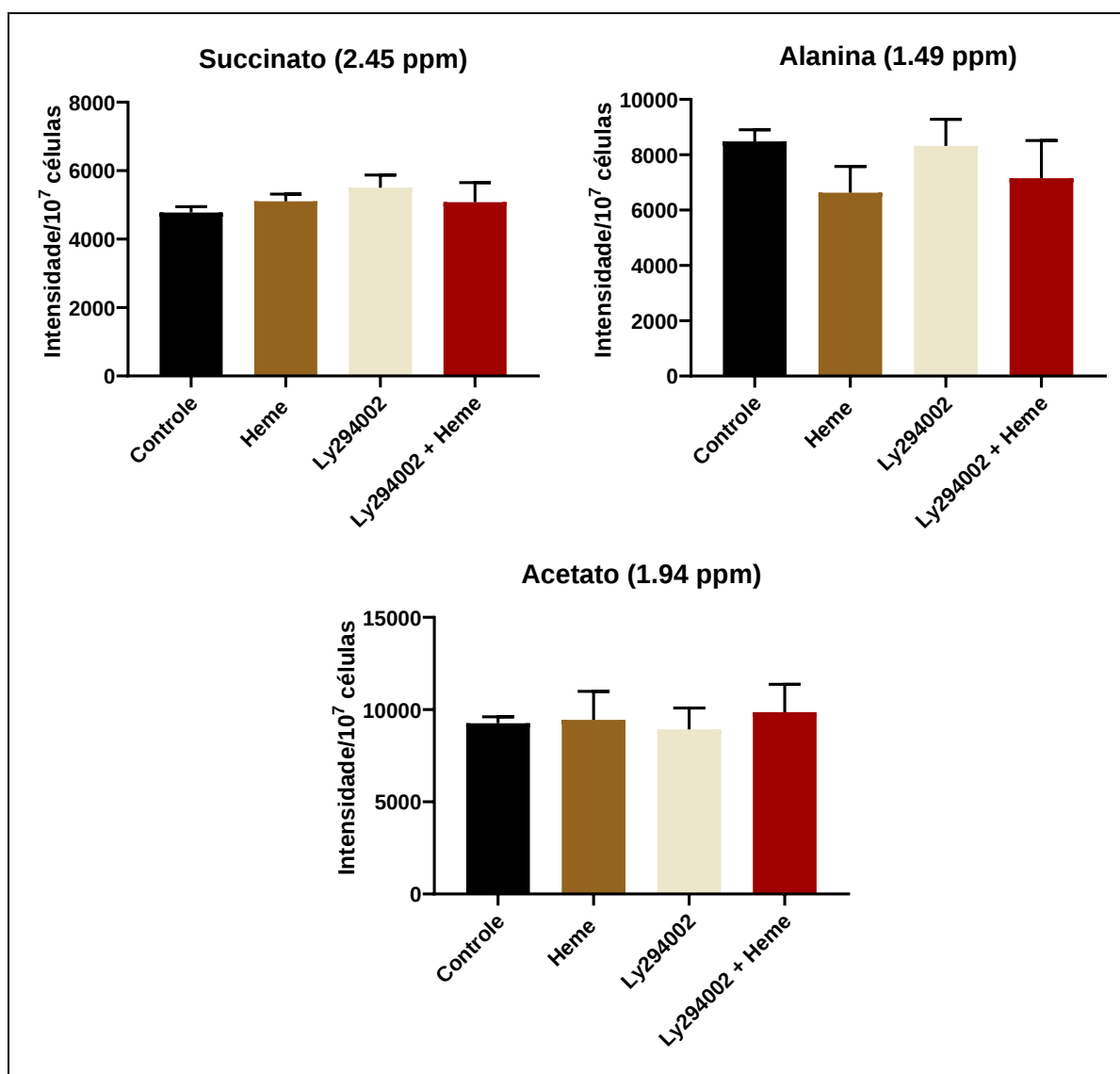


Legenda: *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$

Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* foram tratados com heme 30 μ M, Ly294002 20 μ M, ou com a combinação de ambos, por 7 dias para avaliação dos metabólitos presentes no meio sobrenadante por RMN. Os valores de cada metabólito são apresentados como média ($\pm$ desvio padrão) das intensidades de cada pico normalizadas por 1×10^7 células, em três experimentos independentes. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está discriminado acima dos gráficos. O tratamento estatístico foi conduzido utilizando ANOVA unidirecional com abordagem *FDR* calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutielle.

Fonte: O autor, 2022.

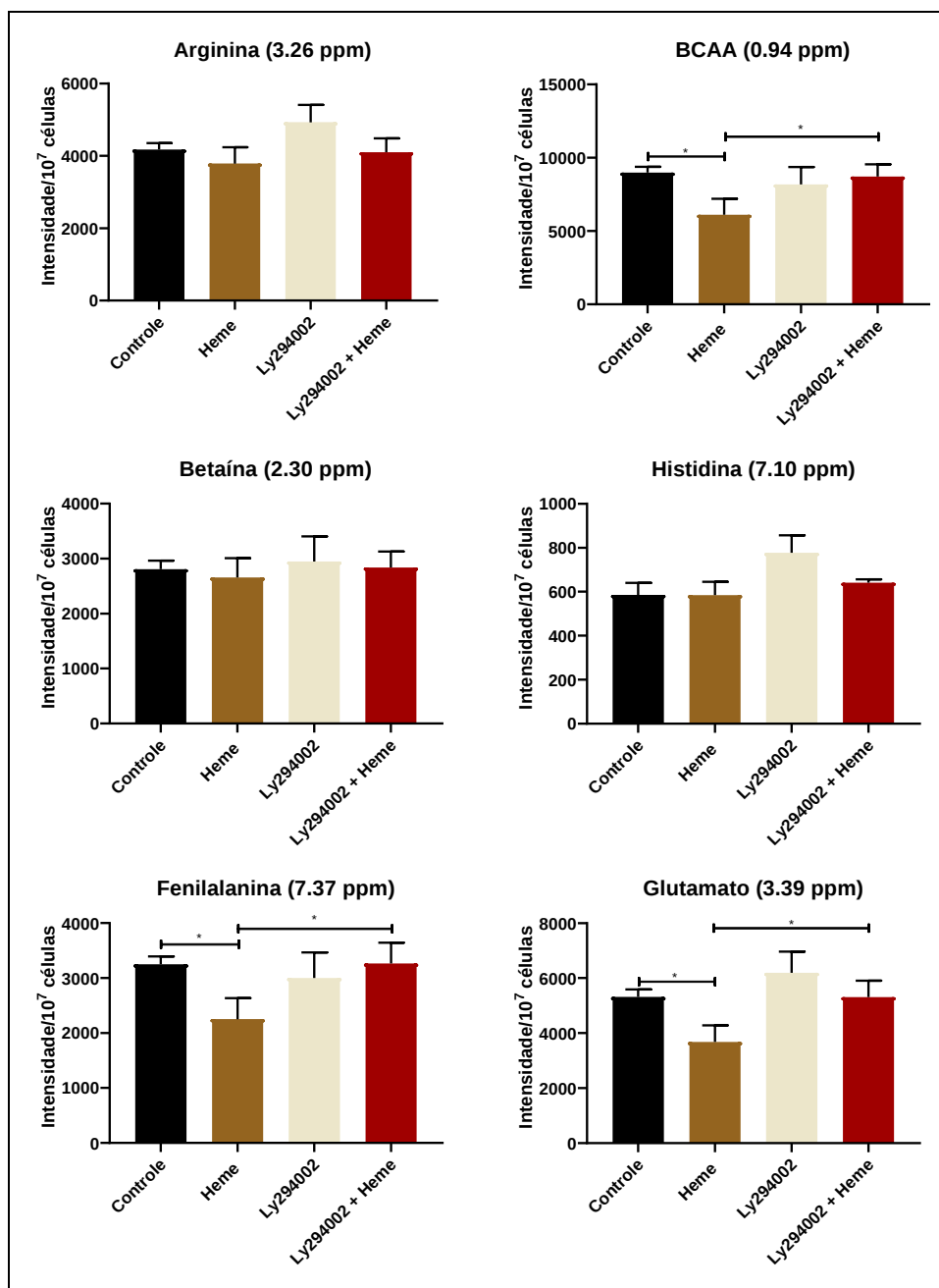
Gráfico 16: Avaliação da quantidade de acetato, succinato e alanina presentes no meio sobrenadante de epimastigotas de *T. cruzi* após 7 dias de tratamento.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* foram tratados com heme 30 μ M, Ly294002 20 μ M, ou com a combinação de ambos, por 7 dias para avaliação dos metabólitos presentes no meio sobrenadante por RMN. Os valores de cada metabólito são apresentados como média ($\pm$ desvio padrão) das intensidades de cada pico normalizadas por 1×10^7 células, em três experimentos independentes. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está discriminado acima dos gráficos. O tratamento estatístico foi conduzido utilizando ANOVA unidirecional com abordagem *FDR* calculado pelo método Benjamini, Krieger e Yekutielle.

Fonte: O autor, 2022.

Gráfico 17: Avaliação da quantidade dos aminoácidos Arg, BCAA, Betaína, Phe, His e Glu por RMN presentes no meio sobrenadante de epimastigotas de *T. cruzi* por RMN após 7 dias de tratamento.



Legenda:

*, $p < 0,05$.

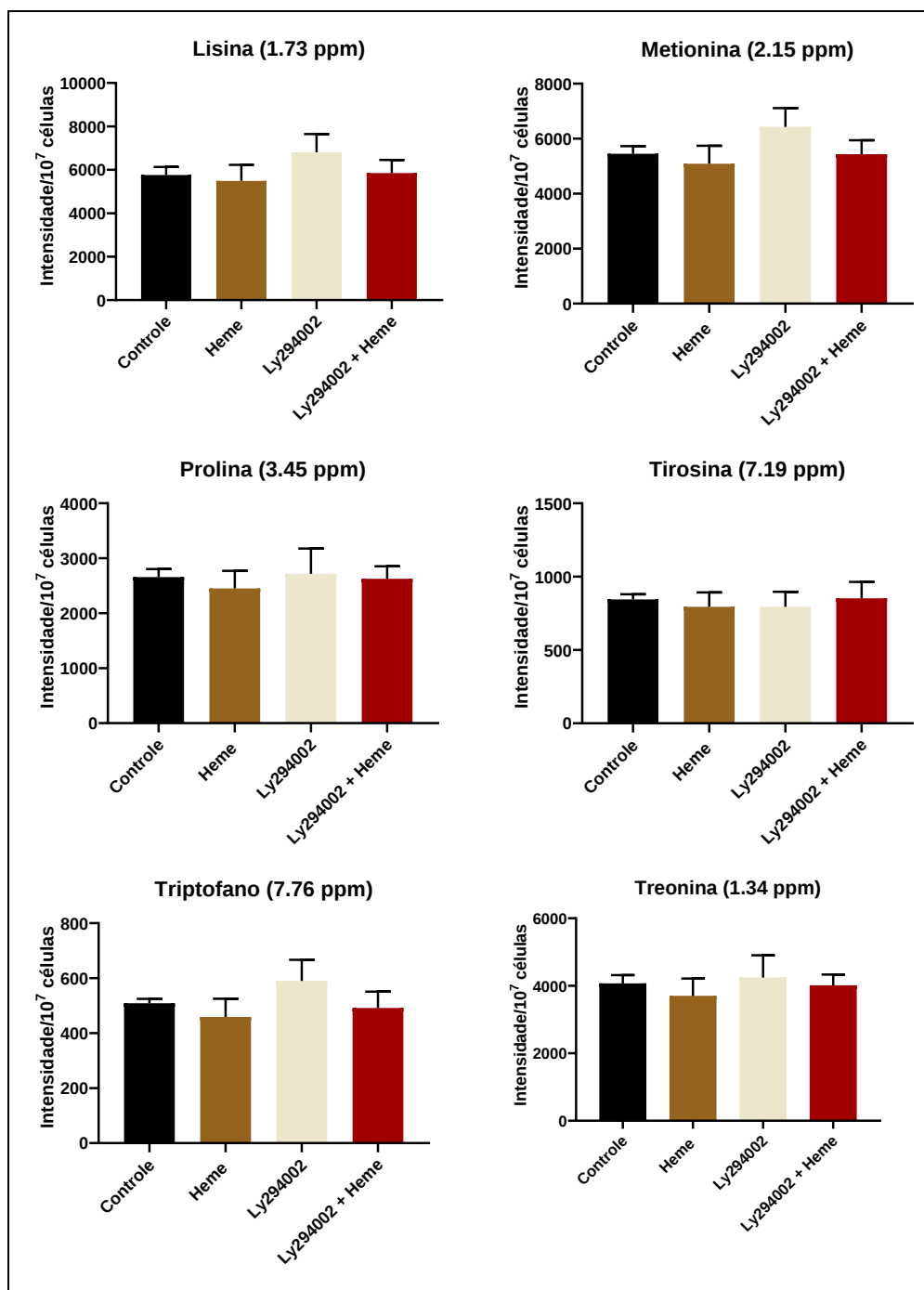
Nota:

Epimastigotas de *T. cruzi* foram tratados com heme 30 μ M, Ly294002 20 μ M, ou com a combinação de ambos, por 7 dias para avaliação dos metabólitos presentes no meio sobrenadante por RMN. Os valores de cada metabólito são apresentados como média ($\pm$ desvio padrão) das intensidades de cada pico normalizadas por 1×10^7 células, em três experimentos independentes. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está discriminado acima dos gráficos. O tratamento estatístico foi conduzido utilizando ANOVA unidirecional com abordagem *FDR* calculado pelo método Bejamini, Krieger e Yekutieli.

Fonte:

O autor, 2022.

Gráfico 18: Avaliação da quantidade dos aminoácidos Lis, Met, Pro, Tre, Tyr e Trp por RMN presentes no meio sobrenadante de epimastigotas de *T. cruzi* por RMN após 7 dias de tratamento.



Nota: Epimastigotas de *T. cruzi* foram tratados com heme 30 μ M, Ly294002 20 μ M, ou com a combinação de ambos, por 7 dias para avaliação dos metabólitos presentes no meio sobrenadante por RMN. Os valores de cada metabólito são apresentados como média ($\pm$ desvio padrão) das intensidades de cada pico normalizadas por 1×10^7 células, em três experimentos independentes. O valor do deslocamento químico (ppm) referente a cada metabólito está discriminado acima dos gráficos. O tratamento estatístico foi conduzido utilizando ANOVA unidirecional com abordagem *FDR* calculado pelo método Benjamini, Krieger e Yekutieli.

Fonte: O autor, 2022.

4 DISCUSSÃO

A DC, em adição do seu agente causador, é uma doença infecciosa descrita há mais de 110 anos (CHAGAS, 1909). Até o presente momento, embora esforços tenham sido feitos, não há uma vacina que proteja contra a infecção por *T. cruzi* e não há uma abordagem farmacológica completamente segura ao tratar um paciente com essa enfermidade (JONES et al., 2022; KRATZ et al., 2022; MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022; MENDES et al., 2022). Entretanto, mesmo com avanços nas últimas décadas, tais desafios são agravados por carências no conhecimento da biologia básica de diversos processos celulares e bioquímicos do parasito. À parte do baixo investimento em pesquisa básica por parte dos países onde a DC é endêmica, as características do próprio parasito impõem dificuldades na elucidação de diversos mecanismos. O parasito possui ciclo de vida complexo, onde as formas evolutivas diferem não somente em morfologia e ambiente, mas em como se adaptam a nível molecular aos estímulos externos (MARTÍN-ESCOLANO et al., 2022). Também, há a diversidade genética e fenotípica entre cepas, que somadas à plasticidade genômica, às diferenças nos mecanismos de expressão comparadas a outros eucariotos, e à complexidade de seu genoma, conferem desafios ao estudo de sua genética e controle fisiológico. Avanços significativos foram realizados após o sequenciamento e o depósito dos genomas de tripanossomatídeos (MACEDO et al., 2004; ZINGALES, 2018). Outro aspecto são as particularidades na biologia celular do parasito que retardaram a elucidação de processos já conhecidos em outros organismos. Por exemplo, a dificuldade de isolamento de sua mitocôndria única, elevando o nível de desafio ao esclarecer o funcionamento de seu metabolismo energético (PAES et al., 2011). Somados, esses fatores contribuem para a DC permanecer possuindo o título de doença tropical negligenciada em 2022.

A via de sinalização mediada por fosfatidilinositídeos é uma das mais estudadas em mamíferos. Seu envolvimento com diversas patologias humanas já foi apontado, como ocorre em diferentes tipos de câncer (LAWRENCE et al., 2014; HOXHAI; MANNING, 2020; ZHAO et al., 2022). O controle metabólico exercido por PI3Ks de classe I depende da ativação de AKT, através do aumento de PtdIns(3,4,5)P₃, e de mTORC1 (MANNING; TOKER, 2017; VALVEZAN; MANNING, 2019; HOXHAI; MANNING, 2020). Um estudo recente avaliou o efeito de inibidores de PI3K e de cinases de mTOR como potenciais alvos farmacológicos no tratamento contra *Leishmania donovani* e *T. brucei* em modelo animal. Como resultado, os autores verificaram que o tratamento dos animais com tais moléculas era responsável por diminuir a carga parasitária, indicando um enorme potencial dessas vias na descoberta de novos alvos terapêuticos (PHAN et al., 2020). De fato, a inibição de elementos dessa via vem sendo

explorada em tripanossomatídeos com essa finalidade (DIAZ-GONZALEZ et al., 2011; OCHOA et al., 2018).

Em 2018, Ochoa e colaboradores descreveram uma *AKT-like* em *T. cruzi*, baseada em similaridade com o gene ortólogo descrito anteriormente em *Leishmania sp* pelo mesmo grupo (VARELA et al., 2017; OCHOA et al., 2018). Ambas as proteínas compartilham os domínios PH e os domínios de atividade cinase, mas divergem quanto a presença de um domínio *zinc finger*, exclusivo do gene de *T. cruzi*, e também ausente em AKTs humanas (OCHOA et al., 2018). Os autores discutem que esse domínio, em eucariotos, é categorizado como transportador de PIP₃ e um fator chave envolvido na síntese de RNA ribossomal, sendo, por consequência, um regulador do processo de transcrição (ALBÀ, 2017; CASSANDRI et al., 2017).

No presente trabalho, a expressão de genes de sinalização e de metabolismo da forma epimastigota foi avaliada e comparada nos tratamentos com heme a 30 µM, com Ly294002 a 20 µM ou com ambas as moléculas. Foi verificado que a droga, de forma geral, diminui a expressão dos genes avaliados. Adicionalmente, o tratamento conjunto da droga com heme, em geral, também é responsável por diminuir a expressão gênica, incluindo *TcPI3K*. Ao inibir farmacologicamente uma enzima, é esperado que a expressão do gene que a codifique aumente como resposta. Dessa forma, foi possível concluir que heme não exerce completamente seu papel no estímulo da expressão dos genes quando em presença da droga. Isto é, aparentemente, o correto funcionamento da *TcPI3K* é necessário aos processos de transcrição gênica de forma global, visto que mesmo o gene *TcPI3K* e o gene *TcME*, que apresentou o maior aumento de expressão no RNAseq após o tratamento com heme, tiveram sua expressão diminuída. Essa teoria entra em consonância ao discutido por Ochoa e colaboradores (2018), pois a inibição de *TcPI3K* leva à diminuição da síntese de PIP₃, que é um mediador necessário ao funcionamento da proteína AKT como regulador da expressão gênica de rRNA. Também em seres humanos, a RNA Pol-II, ao transcrever o rRNA, atua na transcrição de genes vizinhos aumentando sua expressão (ABRAHAM et al., 2020).

Adicionalmente, Lima e colaboradores (2022) exploraram a regulação da expressão gênica em *T. cruzi* no contexto do remodelamento da cromatina. Uma vez que os genes desse parasito não dispõem de promotores individuais e regulação por fatores de transcrição, a avaliação da transição entre eucromatina e heterocromatina pela modificação de histonas pode esclarecer os processos de regulação da expressão gênica. Os autores encontraram evidências de que durante a diferenciação da forma epimastigota para a forma tripomastigota a diminuição da transcrição pode ser explicada pela condensação da cromatina. Ademais, é evidenciado que

o intenso remodelamento da cromatina é conectado às alterações morfológicas e metabólicas da diferenciação (LIMA et al., 2022). Em mamíferos, mTORC2 é responsável por favorecer a acetilação de histonas, resultando no afrouxamento da cromatina para a expressão de genes glicolíticos (VADLA; HALDAR, 2018).

Embora explorada como alvo terapêutico, poucos estudos se debruçam sobre o envolvimento da via de PI3K no controle e manutenção dos processos celulares de *T. cruzi*. O correto entendimento e descrição dos elementos proteicos e alvos envolvidos, bem como de suas singularidades em relação aos ortólogos humanos, podem contribuir ainda mais ao potencial médico de tal via. Em 2009, foram descritos os primeiros genes putativos de PIKs em tripanossomatídeos, através de ferramentas de bioinformática, além de classificá-los em um modelo similar ao de mamíferos (BAHIA et al., 2009). Nesse trabalho não há relato de genes que possivelmente codificam PI3Ks de classe I, sendo sugerido até então a ausência de regulação desempenhada por Ptd(3,4,5)P₃, seu principal produto. Em 2015, um estudo argentino identificou pela primeira vez uma PI3K de classe I no genoma de *T. cruzi* (GIMENEZ et al., 2015). O mesmo trabalho foi responsável por isolar e descrever a atividade catalítica da enzima, demonstrando também que a administração de 20 µM de Ly294002, um inibidor de PI3K amplamente utilizado na literatura (WALKER et al., 2000; HONGYAN; CHUNYAN; YUE'E, 2017; HUANG et al., 2021), incluindo estudos em protozoários (LEONDARITIS; TIEDTKE; GALANOPOULOU, 2005; COX et al., 2006; HERNANDEZ et al., 2007), era responsável por diminuir a atividade enzimática em até 40%, e que a dose superior de 50 µM não aumentava ou sequer modificava tal efeito.

Ao ser administrada em epimastigotas, essa droga reduziu a proliferação celular ao sexto dia de tratamento (GIMENEZ et al., 2015). Aqui, a proliferação da forma epimastigota foi avaliada ao longo de 7 dias, administrando também 20 µM de Ly294002, heme a 30 µM e a combinação das duas moléculas. Foi observado que heme aumenta a proliferação em cerca de 18% em comparação ao grupo controle, de forma similar ao observado por Souza *et al.* (2009). O tratamento com Ly294002 não resultou em alteração no perfil proliferativo das células no tempo avaliado, mesmo quando em adição de heme, similar ao que foi observado por Souza e colaboradores (2009). Nesse último trabalho, a proliferação da forma epimastigota desafiada com heme na mesma concentração foi avaliada por 5 dias em conjunto com inibidores de cinases, dentre os quais, o Ly294002 na concentração de 8 µM. Em 2011, Nogueira e colaboradores demonstraram que o tratamento com Ly294002 nessa concentração induz o aumento da produção de ROS em 47%, independente de presença de heme. Dessa forma, uma

vez que tanto heme quanto Ly294002 aumentem a produção de ROS, acredita-se que as duas moléculas apresentem mecanismos independentes na regulação da proliferação da forma epimastigota mediante a síntese de tais espécies químicas.

Embora no presente trabalho a avaliação da produção de ROS não tenha sido mensurada, os resultados obtidos através da respirometria de alta resolução podem sugerir que a inibição de TcPI3K leva à síntese mitocondrial de tais moléculas. Foi observado que a respiração mitocondrial basal é reduzida na presença dessa droga. Visto que tal técnica avalia a taxa de consumo de oxigênio pela mitocôndria e que o vazamento de elétrons com consequente formação de ROS não é incomum, é possível especular se tais elétrons estariam sendo usados na formação de ROS nesse cenário. Curiosamente, Nogueira e colaboradores (2017) verificaram que a molécula de heme é responsável por diminuir a taxa de consumo de oxigênio pelo STE. Aqui, o tratamento com heme após 7 dias não resultou em modificação nessa taxa, quando em comparação ao grupo controle, como visto por Vieira (2020). Isso, possivelmente, se deve à diferença entre os dois protocolos que diz respeito à incubação com heme 30 min antes da avaliação da respiração mitocondrial no trabalho de Nogueira e colaboradores (2017), contra a avaliação do mesmo processo em células desafiadas com heme ao longo de 7 dias no presente trabalho. Por conseguinte, a alteração no perfil de respiração mitocondrial desencadeada por heme difere temporalmente, abrandando o mesmo em momentos mais iniciais à exposição e estabilizando-se próximo do observado no grupo controle em dias mais tardios. De forma curiosa, o tratamento conjunto de heme e droga resulta em um perfil de respiração basal bastante similar ao grupo controle, indicando que heme, quando em ausência dos moduladores mitocondriais discutidos a seguir, é capaz de reverter os efeitos da inibição de TcPI3K sobre o STE ao sétimo dia.

De forma análoga, a respiração mitocondrial na presença de oligomicina (2 $\mu\text{g/mL}$) apresenta um perfil similar ao exposto acima. A droga é responsável por diminuir o consumo de oxigênio quando o transporte de elétrons é desvinculado da síntese de ATP. Ao estimular a capacidade máxima de transporte de elétrons com a titulação de FCCP, também é verificado que a droga diminui o consumo de oxigênio, seja isoladamente ou na presença também de heme. Ou seja, com o desacoplamento causado por FCCP, os efeitos da droga sobre a respiração não são revertidos pela molécula de heme. Dessa forma, com o transporte de elétrons estimulado e o uso de O_2 como aceptor diminuído, é esperado que haja o vazamento desses elétrons, contribuindo à síntese mitocondrial de ROS.

Embora haja mais de 11 reações onde a produção de ROS é possível na mitocôndria, especialmente pelo STE (BRAND, 2016), é importante ressaltar que, em epimastigotas de *T.*

cruzi, tais espécies químicas podem ser geradas por enzimas de outros compartimentos celulares, como no citoplasma e no retículo endoplasmático (BOVERIS; STOPPANI, 1977; CARRANZA et al., 2009). Embora o tratamento com Ly294002 seja responsável por aumentar ROS e estas tenham um papel no estímulo da proliferação da forma epimastigota (SOUZA et al., 2009; NOGUEIRA et al., 2011, 2017), no atual trabalho o tratamento com essa droga não levou a modificações na proliferação induzida por heme, como observado por Nogueira *et al.* 2017.

Negreiros e colaboradores (2021) realizaram o nocaute gênico e a inibição farmacológica dos transportadores mitocondriais de piruvato TcMPC1 e TcMPC2 (do inglês, *Mitochondrial Pyruvate Carrier 1 e 2*). Nesse cenário, os autores sugerem que o aumento de disponibilidade de piruvato no citoplasma aumenta, por consequência, a síntese de alanina e α -cetoglutarato por ação da alanina-aminotransferase. As moléculas de α -cetoglutarato podem ser transportadas à matriz mitocondrial, onde serão utilizadas no ciclo do ácido cítrico. Os autores verificaram que ocorre aumento de atividade da enzima α -cetoglutarato-desidrogenase, suportando tal suposição. Também ocorre diminuição da taxa de consumo de O_2 pela mitocôndria nos nocautes gênicos de TcMPC1 e TcMPC2, tanto pela diminuição da entrada de piruvato, quanto pela inativação do complexo Piruvato-desidrogenase pela falta de Ca^{2+} . Isso ocorre porque a importação de piruvato pela mitocôndria está vinculada à captação de Ca^{2+} ; isto é, com a diminuição da entrada de piruvato na organela, ocorre também a diminuição da captação de tal íon (NEGREIROS, 2021).

Os acidocalcissomos de *T. cruzi* apresentam IP3R, indicando que a liberação de Ca^{2+} dessa organela ao citoplasma ocorre mediante síntese de $Ins(1,3,4)P_3$ (CHIURILLO et al., 2020). Em seu trabalho, Chiurillo e colaboradores (2020), verificaram que o correto funcionamento do IP3R é necessário ao metabolismo mitocondrial. Os autores identificaram que IP3R funciona como um canal de liberação de Ca^{2+} do acidocalcissomo por estímulo de IP_3 . Adicionalmente, o nocaute gênico de TcIP3R, que codifica tal receptor, aumenta a fosforilação da piruvato-desidrogenase, diminui o consumo de O_2 pela mitocôndria, a atividade da citrato-sintase e a captação de Ca^{2+} . A enzima piruvato-desidrogenase é desfosforilada, e consequentemente ativada, através da ação da piruvato-desidrogenase-fosfatase estimulada por Ca^{2+} (LANDER et al., 2018). Dessa forma, sem a liberação desse cátion do acidocalcissomo, a mitocôndria diminui a síntese de acetil-CoA a partir de piruvato, o ciclo do ácido cítrico e a fosforilação oxidativa (CHIURILLO et al., 2020). Anteriormente, o mesmo grupo identificou que o nocaute gênico de TcMCUb, que codifica um transportador mitocondrial de Ca^{2+} diminui

a respiração, a diferenciação e a proliferação da forma epimastigota de *T. cruzi*, reforçando a necessidade do íon cálcio para o correto funcionamento da fisiologia mitocondrial (CHIURILLO et al., 2017).

No presente trabalho, a inibição de TcPI3K foi responsável por diminuir o consumo de O₂ pela mitocôndria. Nesse sentido, é possível especular se o correto funcionamento da TcPI3K se relaciona ao controle do fluxo de Ca²⁺ para a mitocôndria ou à entrada de piruvato nessa organela. Nos dois cenários, a diminuição da respiração aqui observada poderia ser explicada. Já no tratamento conjunto do inibidor com heme, também houve diminuição no consumo de O₂ mitocondrial quando a capacidade máxima de transporte de elétrons foi estimulada. Esse tratamento é responsável por diminuir a expressão dos genes *TcPI3K* e *TcDAGK*, possivelmente, estimulando a sinalização mediada por Ca²⁺ devido à disponibilidade de DAG (Figura 15). Por essa razão, acredita-se que a inibição de TcPI3K exerça seu papel na diminuição da respiração mitocondrial através dos dois mecanismos citados acima. Outra possibilidade é a diminuição da concentração de Ca²⁺ na mitocôndria em função da inibição de TcPI3K, visto que o aumento de IP₃ estimula a liberação desse íon pelo acidocalcisomo via IP3R (CHIURILLO et al., 2020). Contudo, até o momento, a presença do IP3R na mitocôndria ainda não foi descrita.

O tratamento com a porfirina também é responsável por aumentar a expressão do gene *TcCaM*, que codifica uma calmodulina. Os efeitos deflagrados por heme na proliferação da forma epimastigota são dependentes da CaMK-II, que por sua vez é dependente não só de Ca²⁺, mas também de calmodulina. Dessa forma, ao mesmo tempo em que estimula a produção de ROS (NOGUEIRA et al., 2011), outro estimulador de CaMK-II, o heme também aumenta a expressão de *TcCaM*. Uma vez que a diminuição de expressão de *TcCaM* não é acompanhada pela diminuição na proliferação, o que poderia ter relação direta à CaMK-II, seja no tratamento com a droga isoladamente ou em adição de heme, uma possível explicação para tal é a presença de mais de uma dezena de outros genes de calmodulina anotados no genoma de *T. cruzi* CLBrener e que não foram avaliados no presente trabalho.

Mesmo que a droga tenha sido capaz de modular negativamente a respiração mitocondrial, a avaliação da quantidade de ATP intracelular demonstrou que tal diminuição não é acompanhada pela síntese de ATP. Nenhum dos tratamentos aqui testados foi responsável por alterar as concentrações intracelulares de ATP. Esse resultado sugere que, se a síntese de ATP pela fosforilação oxidativa é diminuída pela inibição de TcPI3K, a forma epimastigota é capaz de manter os níveis de ATP por outros mecanismos bioquímicos. Um trabalho recente avaliou a influência do catabolismo de palmitato em epimastigotas de *T. cruzi* sob estresse

nutricional. Os autores verificaram que os parasitos apresentam quantidades similares de ATP intracelular quando tratados com glicose ou palmitato após 16h de privação nutricional. Esses resultados sugerem que a forma epimastigota possui mecanismos de obtenção de energia em taxas similares com diferentes fontes de carbono (SOUZA et al., 2021).

Uma alternativa à síntese de ATP mitocondrial, visto que a inibição de TcPI3K diminui a expressão de todos os genes glicossomais avaliados, é a fosforilação a nível de substrato que ocorre no citoplasma por ação das enzimas fosfoglicerato-cinase e piruvato-cinase. Isso ocorre com a saída de 1,3-bisfosfoglicerato do glicossoma para o citoplasma. A enzima fosfoglicerato-cinase catalisa a transferência de um grupo fosforil do 1,3-bisfosfoglicerato ao ADP, formando uma molécula de ATP e 3-fosfoglicerato. Posteriormente, um novo grupo fosforil é utilizado na síntese de ATP, e consequentemente piruvato, através da ação da piruvato-cinase, na última etapa da via glicolítica, utilizando PEP como substrato. Dessa forma, quando a molécula de PEP não retorna ao glicossoma, são produzidos 4 mols de ATP por mol de glicose, resultando em um saldo líquido de 2 mols de ATP (Figura 16). As sínteses de alanina ou succinato pelo glicossoma também resultariam, de forma líquida, em 2 mols de ATP por mol de glicose. Contudo, uma vez averiguada a diminuição na expressão dos genes *TcPPDK* e *TcPEPCK* na presença de Ly294002, é esperado que a síntese de ATP esteja, majoritariamente, a cargo da produção de piruvato.

Uma possível explicação para a síntese de alanina não estar aumentada em nenhum dos tratamentos, como observado através dos dados de metabolômica, é a peculiar regulação da atividade catalítica da enzima PPDK. Uma vez que as enzimas PPDK e PEPCK selam o destino de PEP ao reentrar o glicossoma, é esperado que haja uma regulação a nível enzimático que determine o fluxo de carbono entre as duas possibilidades. González-Marcano e colaboradores, identificaram que a enzima PPDK apresenta regulação tanto pelo pH do glicossoma quanto pela quantidade de seus substratos: PEP, PPi e AMP. Em adição, os autores discutem que a PPDK de *T. cruzi* alterna entre uma estrutura cuja atividade catalítica é mais pronunciada na presença dos substratos e do cátion amônia, sugerindo que o destino de PEP é regulado através da modulação de atividade dessa enzima, e uma forma menos ativa. Nesse cenário, a síntese de succinato é favorecida quando há baixa concentração de AMP e PPi (GONZÁLEZ-MARCANO et al., 2021).

Aqui, nenhum dos tratamentos influenciou diferencialmente a quantidade de alanina ou succinato no meio sobrenadante ao sétimo dia de tratamento. Uma vez que a concentração de ATP intracelular também não variou entre tratamentos, pode-se especular que a alta concentração de ATP, e consequente baixa concentração de AMP, desvia PEP para a síntese de

succinato através da diminuição de atividade da PPDK. E, visto que a concentração de succinato não aumenta no meio, uma explicação para tal pode ser o desvio de malato para o citosol, cuja descarboxilação resulta em piruvato e NADPH através da ação da enzima málica.

Os resultados de metabolômica sugerem que o parasito não modifica a síntese de alanina ou de succinato em nenhum dos tratamentos, mesmo com a captação de glicose elevada ao tratar as células com heme no tempo avaliado. Com a fosforilação oxidativa e a fermentação glicossomal diminuídas em função do tratamento com o inibidor, a síntese de ATP pode estar a cargo da succinil-CoA-sintetase (VAN HELLEMOND; OPPERDOES; TIELENS, 1998) ou da síntese citosólica de piruvato, como apresentado anteriormente. Souza e colaboradores (2021) demonstraram que, quando há glicose disponível no meio, a atividade da enzima Acetil-CoA-carboxilase é aumentada e a oxidação de ácidos graxos é diminuída. Isto é, a glicose é capaz de regular reciprocamente o metabolismo de ácidos graxos, aumentando a síntese sobre a oxidação. Dessa forma, é possível que no presente trabalho a quantidade de acetato não seja aumentada no meio de cultura em virtude do desvio de tais substratos para a síntese de ácidos graxos, como ocorre em *T. brucei* (RIVIÈRE et al., 2009).

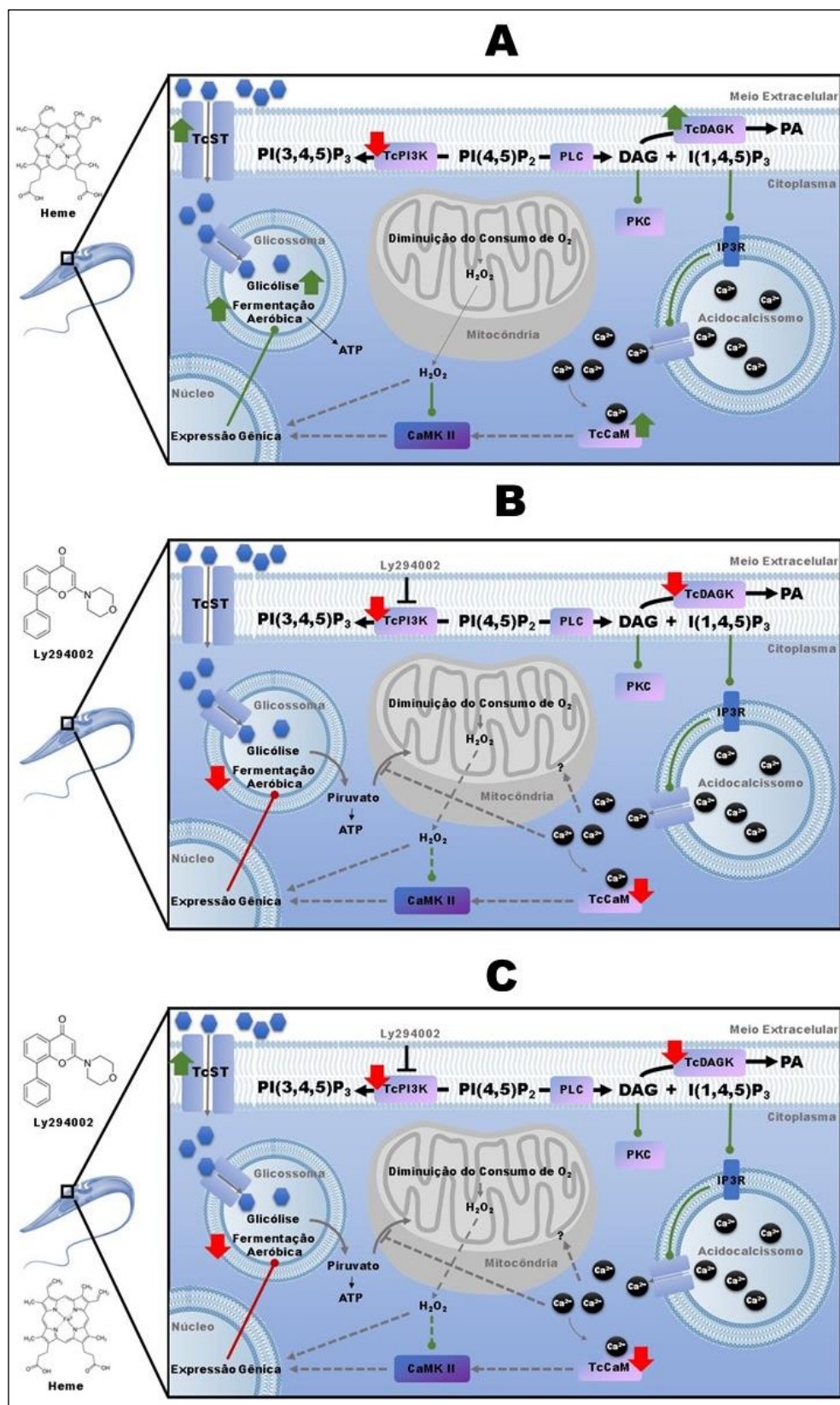
Através da metabolômica foi verificado que o tratamento com heme aumenta a captação de carboidratos do meio, e que o inibidor de TcPI3K é responsável por promover a diminuição de tal captação em adição de heme. Em consonância, o tratamento com heme aumenta a expressão do gene *TcST* e a droga não exerce efeito sobre tal expressão. Esses resultados indicam que TcPI3K atua na regulação do transporte de carboidratos para o meio intracelular independentemente da regulação da expressão gênica de *TcST*. Curiosamente, algo similar ocorre em seres humanos, onde o correto funcionamento das PI3Ks de classe I é necessário à translocação dos transportadores GLUT4 para a membrana plasmática, aumentando a importação de glicose através do gradiente de concentração (BRIDGES; SALTIEL, 2015). O papel de PIs no funcionamento do transportador de hexoses em *T. cruzi* permanece a ser elucidado.

A captação de BCAA, glutamato e fenilalanina também segue um perfil similar ao observado com as hexoses. O tratamento com heme diminui a quantidade desses aminoácidos no meio extracelular, mas o tratamento conjunto de heme com a droga reverte tal perfil, demonstrando que TcPI3K também é necessária ao metabolismo de aminoácidos na forma epimastigota de *T. cruzi* mesmo com estímulo do heme. Diferentemente, as células dos grupos controle, heme e Ly294002 + heme realizam a captação de histidina de forma similar, em contrapartida ao tratamento somente com Ly294002, responsável por diminuir tal captação. Aparentemente, a droga diminui a captação de histidina, mas tal efeito é suplantado pela

molécula de heme. Os transportadores de glutamato e de BCAA em *T. cruzi* podem ser regulados pelo pH e pela temperatura (SILBER et al., 2006; MANCHOLA et al., 2016). Leucina, isoleucina, glutamato e histidina são importantes fontes de carbono e energia para *T. cruzi*. Em adição, glutamato pode ser convertido em outros aminoácidos, como prolina e glutamina que também desempenham papel energético, e alanina, através da transaminação com piruvato no citosol. Coletivamente, esses resultados indicam que TcPI3K atua no processo de internalização dos aminoácidos BCAA, glutamato, fenilalanina e histidina, independentemente do efeito de heme, com exceção deste último.

Em resumo, coletivamente, esses resultados sugerem que o efeito celular desempenhado por heme sobre a expressão gênica parece necessitar de algum funcionamento catalítico da TcPI3K (Figura 15). Dessa forma, na presença de Ly294002, há diminuição da expressão dos genes glicossomais que estariam responsáveis pela síntese de ATP na presença de heme. Visto que não há modificação na concentração de ATP ou na proliferação, e que a droga também diminui a respiração mitocondrial sem que os produtos da fermentação aeróbica sejam aumentados, é sugerido que a obtenção de energia ocorra no citoplasma através da síntese de piruvato (Figura 16). Essa porfirina é responsável por diminuir a expressão de *TcPI3K*, o que facilitaria a sinalização mediada por cálcio devido à disponibilidade de DAG e $I(1,4,5)P_3$. Ou seja, os efeitos metabólicos deflagrados por heme, poderiam ocorrer em virtude da liberação de cálcio pelo acidocalcissomo. Ao adicionar o inibidor na presença de heme, a diminuição da expressão de *TcPI3K* é somada à enzima inibida, também favorecendo a liberação de cálcio e a sinalização mediada por tal cátion. Entretanto, nesse último cenário, ocorre a diminuição da expressão da maioria dos genes avaliados, incluindo genes glicossomais que estão aumentados na presença isolada de heme. Ou seja, os efeitos da diminuição de expressão de *TcPI3K* e da inibição farmacológica de TcPI3K favorecem o mesmo processo, mas com consequências distintas na célula. Estudos complementares são necessários para elucidação mais aprofundada dos mecanismos distintos desempenhados pelos dois processos na fisiologia celular da forma epimastigota.

Figura 15: Representação esquemática dos efeitos de heme e Ly294002 sobre a expressão gênica e sobre o metabolismo energético da forma epimastigota de *T. cruzi*.



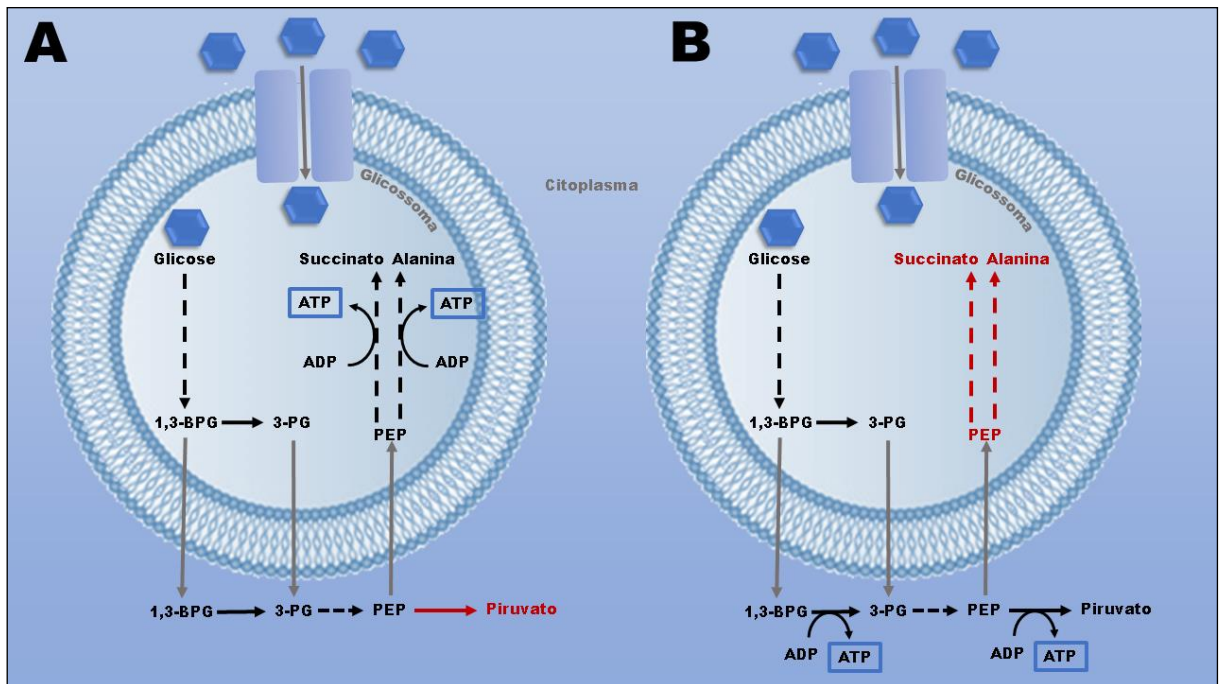
Legenda: PI: fosfatidilinositol; P2: bisfosfato, P3: trifosfato; PA: ácido fosfatídico; DAG: diacilglicerol; I: Inositol; TcPI3K: Fosfatidilinositol-3-fosfato de *T. cruzi*; PLC:

Continuação da legenda da figura 15: Fosfolipase C; TcDAGK: Diacilglicerol-cinase de *T. cruzi*; PKC: proteína-cinase C; IP3R: Receptor de inositol-trifosfato; TcCaM: Calmodulina de *T. cruzi*; TcST: transportador de hexoses de *T. cruzi*; CaMK II: Cálcio/Calmodulina-cinase II; Setas verdes para cima: Aumento de expressão do gene; Seta vermelha para baixo: Diminuição da expressão do gene; Setas pretas: reação enzimática; Setas cinzas: movimento de moléculas; Setas cinzas hachuradas: possibilidades de mecanismos.

Nota: (A) A molécula de heme é responsável por aumentar a expressão dos genes de captação de glicose, glicólise e fermentação aeróbica, ao mesmo tempo em que é diminuído o consumo de O₂ pela mitocôndria, favorecendo a síntese de ROS que, por sua vez, ativa CaMK II. CaMK II, assim como ROS, possivelmente atua na regulação da expressão gênica. Concomitantemente, heme diminui a expressão de TcPI3K, o que disponibiliza PI(4,5)P₂ como substrato para síntese de DAG e IP(1,4,5)P₃. Heme também aumenta a expressão de *TcDAGK*, que catalisa a síntese de ácido fosfatídico a partir de DAG para a síntese de fosfolipídios de membrana, e *TcCaM*, possivelmente favorecendo a sinalização mediada por cálcio e CaMK II. Neste cenário, a obtenção de ATP fica a cargo da fermentação glicossomal de succinato. (B) O inibidor de TcPI3K Ly294002 diminui a expressão de todos os genes avaliados, com exceção do *TcST*. Possivelmente, a disponibilidade de PI(4,5)P₂ em virtude da diminuição da expressão do gene *TcPI3K* e da inibição da proteína resultante, leva à disponibilidade de DAG e IP(1,4,5)P₃, o que leva à sinalização mediada por cálcio. Possivelmente, o aumento de cálcio leva à diminuição de Acetil-CoA na mitocôndria por impedir a ativação do complexo piruvato-desidrogenase, diminuindo a respiração mitocondrial. Visto que a expressão dos genes glicossomais também está diminuída, é teorizado que a síntese de ATP esteja a cargo da produção citoplasmática de piruvato. (C) O mesmo ocorre com o tratamento conjunto de heme e Ly294002, onde a captação de glicose estaria favorecida em função do aumento de expressão de *TcST*.

Fonte: O autor, 2022.

Figura 16: Obtenção de ATP pela forma epimastigota de *T. cruzi* na presença de heme ou de Ly294002.



Legenda: 1,3-BPG: 1,3-bisfosfoglicerato; 3-BP: 3-fosfoglicerato; PEP: fosfoenolpiruvato. Setas cinzas indicam movimento das moléculas; Setas pretas indicam reações enzimáticas. Setas hachuradas representam múltiplos passos enzimáticos; Setas vermelhas indicam sentidos de reações que provavelmente estão desestimulados.

Nota: (A) Obtenção de ATP na presença de heme. Ao desestimular a respiração mitocondrial e favorecer a expressão dos genes glissossomais, a síntese de ATP ocorre através da produção de alanina e succinato. Dessa forma, a síntese de piruvato citosólica estaria desestimulada. (B) Obtenção de ATP na presença de Ly294002, isoladamente ou em adição de heme. Com a diminuição da expressão dos genes glissossomais, é teorizado que a síntese de ATP ocorra com a fosforilação a nível de substrato na produção de piruvato, no citoplasma.

Fonte: O autor, 2022.

CONCLUSÕES

- O tratamento com heme modificou a expressão gênica de *TcPI3K* (Diminuída em 20%; TcCLB.510167.10), de *TcCaM* (Aumentada em 30%; TcCLB.507483.30) e de *TcDAGK* (Aumentada em 30%; TcCLB.507257.80), segundo os dados do RNAseq;
- A modulação da expressão desses três genes foi validada por qPCR;
- A inibição de *TcPI3K* diminui a expressão dos genes *TcPI3K*, *TcCaM* e *TcDAGK* e tal diminuição não é revertida no tratamento combinado com heme;
- Os genes da fermentação de succinato, *TcPEPCK*, *TcMDH* e *TcFRD*, assim como os genes *TcPPDK*, *TcME* e *TcST* apresentaram expressão diminuída quando a *TcPI3K* foi inibida, sugerindo um efeito global da inibição de tal enzima sobre a expressão gênica em *T. cruzi*. E, com exceção do gene *TcFRD*, o tratamento combinado do inibidor com heme não foi capaz de reverter os efeitos da inibição;
- O tratamento com o inibidor de *TcPI3K* altera o consumo de oxigênio pela mitocôndria, diminuindo a respiração basal. Em adição ao heme, a respiração basal não é modificada. A capacidade máxima de transporte de elétrons também é diminuída pela droga e este efeito não é revertido pelo heme;
- A produção de ATP pelas células não é afetada pelo heme, pelo inibidor ou pelo conjunto de ambos;
- Paralelamente, o inibidor de *TcPI3K* também não apresentou efeito sobre a proliferação da forma epimastigota, isoladamente ou em adição ao heme;
- Heme aumenta a captação de glicose e outras hexoses, BCAA, fenilalanina e glutamato. Ao inibir *TcPI3K*, em comparação ao grupo controle, a captação dessas moléculas não sofre alteração, mesmo no tratamento conjunto com heme.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, K. J. et al. Nucleolar RNA polymerase II drives ribosome biogenesis. **Nature**, v. 585, p. 298–302, 2020.
- ACOSTA, H. et al. Proteomic analysis of glycosomes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 229, p. 62–74, 2019.
- AKRAM, M. Citric acid cycle and role of its intermediates in metabolism. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 68, n. 3, p. 475–478, 2014.
- ALBÀ, M. M. Zinc-finger domains in metazoans: evolution gone wild. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 168, 2017.
- BACKER, J. M. The regulation and function of Class III PI3Ks: Novel roles for Vps34. **Biochemical Journal**, v. 410, n. 1, p. 1–17, 2008.
- BAHIA, D. et al. The TryPIKinome of five human pathogenic trypanosomatids: *Trypanosoma brucei*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* and *Leishmania infantum*--new tools for designing specific inhibitors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 3, p. 963–970, 2009.
- BARISÓN, M. J. et al. Metabolomic profiling reveals a finely tuned, starvation-induced metabolic switch in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 21, p. 8964–8977, 2017.
- BERNSTEIN, R. E.; FRCPATH2, M. B. Darwin's illness: Chagas' disease resurgens. **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 77, n. 7, p. 608-609, 1984.
- BOVERIS, A.; STOPPANI, A. O. M. Hydrogen peroxide generation in *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, v. 33, n. 10, p. 1306–1308, 1977.
- BOWMAN, N. M. et al. Chagas disease transmission in periurban communities of Arequipa, Peru. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 12, p. 1822–1828, 2008.
- BRAND, M. D. Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 100, p. 14–31, 2016.
- BRIDGES, D.; SALTIEL, A. R. Phosphoinositides: Key modulators of energy metabolism. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 6, p. 857–866, 2015.
- BRINGAUD, F.; RIVIÈRE, L.; COUSTOU, V. Energy metabolism of trypanosomatids: adaptation to available carbon sources. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 149, n. 1, p. 1–9, 2006.
- CARRANZA, J. et al. Mitochondrial bioenergetics and redox state are unaltered in *Trypanosoma cruzi* isolates with compromised mitochondrial complex I subunit genes. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 41, n. 3, p. 299–308, 2009.

CASSANDRI, M. et al. Zinc-finger proteins in health and disease. **Cell Death Discovery**, v. 3, n. 1, 2017.

CESTARI, I. et al. Chemogenetic Characterization of Inositol Phosphate Metabolic Pathway Reveals Druggable Enzymes for Targeting Kinetoplastid Parasites. **Cell Chemical Biology**, v. 23, n. 5, p. 608–617, 2016.

CESTARI, I.; ANUPAMA, A.; STUART, K. Inositol polyphosphate multikinase regulation of *Trypanosoma brucei* life stage development. **Molecular Biology of the Cell**, v. 29, n. 9, p. 1137–1152, 2018.

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

CHAO, C.; LEONE, J. L.; VIGLIANO, C. A. Chagas disease: Historic perspective. **Molecular Basis of Disease**, v. 1866, n. 5, p. 165689, 2020.

CHIN, D.; MEANS, A. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. **Trends in Cell Biology**, v. 10, n. 8, 2000.

CHIURILLO, M. A. et al. Different Roles of Mitochondrial Calcium Uniporter Complex Subunits in Growth and Infectivity of *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, v. 8, n. 3, 2017.

CHIURILLO, M. A. et al. IP3 receptor-mediated Ca²⁺ release from acidocalcisomes regulates mitochondrial bioenergetics and prevents autophagy in *Trypanosoma cruzi*. **Cell Calcium**, v. 92, p. 102284, 2020.

CORASSA, R. et al. Evolution of Chagas' disease in Brazil. Epidemiological perspective and challenges for the future: A critical review. **Perspectives in Public Health**, v. 137, n. 5, p. 289–295, 2017.

CÓRDOBA-AGUILAR, A. Chagas bugs and *trypanosoma cruzi*: Puppets and puppeteer? **Acta Tropica**, v. 211, 2020.

COX, S. S. E. et al. Evidence from bioinformatics, expression and inhibition studies of phosphoinositide-3 kinase signalling in *Giardia intestinalis*. **BMC Microbiology**, v. 6, n. 1, p. 1–16, 2006.

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 Tropica**, v. 120, n. 3, p. 211–218, 2011.

DARWIN. **Charles Darwin's Beagle Diary**. Cambridge University Press, 2001.

DE-SIMONE, S. G. et al. Metabolic Alteration of *Trypanosoma cruzi* during Differentiation of Epimastigote to Trypomastigote Forms. **Pathogens**, v. 11, n. 2, p. 168, 2022.

DIAS, J. P. et al. Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296–300, 2008.

DIAZ-GONZALEZ, R. et al. The Susceptibility of Trypanosomatid Pathogens to PI3/mTOR Kinase Inhibitors Affords a New Opportunity for Drug Repurposing. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 8, 2011.

DOCAMPO, R.; HUANG, G. The IP₃ receptor and Ca²⁺ signaling in trypanosomes, **Biochemica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research**, v. 1868, n. 4, 2021.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

ELLWANGER, K.; HAUSSER, A. Physiological functions of protein kinase D in vivo. **IUBMB life**, v. 65, n. 2, p. 98–107, 2013.

FEASEY, N. et al. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**, v. 93, p. 179–200, 2009.

FERNIE, A. R.; CARRARI, F.; SWEETLOVE, L. J. Respiratory metabolism: Glycolysis, the TCA cycle and mitochondrial electron transport. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 7, n. 3, p. 254–261, 2004.

FRUMAN, D. A. et al. The PI3K Pathway in Human Disease. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 605–635, 2017.

FRYDMAN, B. et al. Carbon-13 nuclear magnetic resonance analysis of [1-13C]glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. Evidence of the presence of two alanine pools and of two CO₂ fixation reactions. **European journal of biochemistry**, v. 192, n. 2, p. 363–368, 1990.

FUJIWARA, T.; HARIGAE, H. Biology of Heme in Mammalian Erythroid Cells and Related Disorders. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

FUKAMI, K. et al. Phospholipase C is a key enzyme regulating intracellular calcium and modulating the phosphoinositide balance. **Progress in Lipid Research**, v. 49, n. 4, p. 429–437, 2010.

GALVÃO, C. et al. A checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, 1919 (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**, v. 202, n. 1, p. 1–36–1–36, 2003.

GARCÍA-HUERTAS, P.; CARDONA-CASTRO, N. Advances in the treatment of Chagas disease: Promising new drugs, plants and targets. **Biomedicine & Pharmacotherapy - Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 142, 2021.

GIMENEZ, A. M. et al. Phosphatidylinositol kinase activities in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 203, n. 1–2, p. 14–24, 2015.

GIMENEZ, A. M. et al. Regulation of phosphatidic acid levels in *trypanosoma cruzi*. **Lipids**, v. 46, n. 10, p. 969–979, 2011.

GINGER, M. L. Niche metabolism in parasitic protozoa. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 361, n. 1465, p. 101–118, 2006.

GIORGIONE, J. R. et al. Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase Cdelta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 3, p. 1660–1669, 2006.

GOLDENBERG, S.; ÁVILA, A. R. Aspects of *Trypanosoma cruzi* Stage Differentiation. Em: **Advances in Parasitology**, v. 75p. 285–305, 2011.

GONÇALVES, R. L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, n. 6, p. 651–661, 2011.

GONZALEZ, M. S. et al. Involvement of sulfated glycosaminoglycans on the development and attachment of *Trypanosoma cruzi* to the luminal midgut surface in the vector, *Rhodnius prolixus*. **Parasitology**, v. 138, n. 14, p. 1870–1877, 2011.

GONZÁLEZ-MARCANO, E. et al. Hysteresis of pyruvate phosphate dikinase from *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Research**, v. 120, n. 4, p. 1421–1428, 2021.

GRAÇA-SOUZA, A. V. et al. Adaptations against heme toxicity in blood-feeding arthropods. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 322–335, 2006.

GUARNER, J. Chagas disease as example of a reemerging parasite. **Seminars in Diagnostic Pathology**, v. 36, n. 3, p. 164–169, 2019.

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

HALL, B. S. et al. TbVps34, the trypanosome orthologue of Vps34, is required for Golgi complex segregation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 37, p. 27600–27612, 2006.

HAMMOND, G. R. V.; BURKE, J. E. Novel roles of phosphoinositides in signaling, lipid transport, and disease. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 63, p. 57–67, 2020.

HASHIMOTO, M. et al. A dominant negative form of inositol 1,4,5-trisphosphate receptor induces metacyclogenesis and increases mitochondrial density in *Trypanosoma cruzi*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 466, n. 3, p. 475–480, 2015.

HASHIMOTO, M. et al. Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates replication, differentiation, infectivity and virulence of the parasitic protist *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Microbiology**, v. 87, n. 6, p. 1133–1150, 2013.

HERNANDEZ, Y. et al. Transcriptional analysis of three major putative phosphatidylinositol kinase genes in a parasitic protozoan, *Giardia lamblia*. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 29–32, 2007.

HONGYAN, L.; CHUNYAN, W.; YUE'E, Y. LY294002, a PI3K inhibitor, attenuates Tourette syndrome in rats. **Metabolic Brain Disease**, v. 32, n. 5, p. 1619–1625, 2017.

HOXHAJ, G.; MANNING, B. D. The PI3K-AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nature Reviews: Cancer**, v. 20, n. 2, p. 74–88, 2020.

HUANG, A. et al. LY294002 Is a Promising Inhibitor to Overcome Sorafenib Resistance in FLT3-ITD Mutant AML Cells by Interfering With PI3K/Akt Signaling Pathway. **Frontiers in Oncology**, v. 11, 2021.

ISAKOV, N. Protein kinase C (PKC) isoforms in cancer, tumor promotion and suppression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 48, p. 36-52, 2018.

JONES, K. M. et al. Preclinical advances and the immunophysiology of a new therapeutic Chagas disease vaccine. **Expert Review of Vaccines**, v. 21, n. 9, 2022.

KOLCZYNSKA, K. et al. Diacylglycerol-evoked activation of PKC and PKD isoforms in regulation of glucose and lipid metabolism: a review. **Lipids in Health and Disease**, v. 19, n. 113, p. 1–15, 2020.

KOŘENY, L. et al. Evolution of the haem synthetic pathway in kinetoplastid flagellates: An essential pathway that is not essential after all? **International Journal for Parasitology**, v. 40, p. 149–156, 2010.

KRATZ, J. M. et al. The translational challenge in Chagas disease drug development. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, n. 1, 2022.

KRIPLANI, N. et al. Class I PI 3-kinases: Function and evolution. **Advances in Biological Regulation**, v. 59, p. 53–64, 2015.

KWIATKOWSKA, K. One lipid, multiple functions: how various pools of PI(4,5)P(2) are created in the plasma membrane. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 67, n. 23, p. 3927–3946, 2010.

LANDER, N. et al. Calcium-sensitive pyruvate dehydrogenase phosphatase is required for energy metabolism, growth, differentiation, and infectivity of *Trypanosoma cruzi*. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 45, p. 17402–17417, 2018.

LANDER, N. et al. Structure, Properties, and Function of Glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 1, p. 25, 2020.

LANDER, N.; CHIURILLO, M. A.; DOCAMPO, R. Signaling pathways involved in environmental sensing in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular Microbiology**, v. 115, n. 5, p. 819, 2021.

LARA, F. A. et al. Heme requirement and intracellular trafficking in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, p. 16–22, 2007.

LAURA VARGAS-PARADA. Kinetoplastids, kDNA, RNA. **Nature Education**, v. 3, n. 9, p. 63, 2010.

LAWRENCE, M. S. et al. Discovery and saturation analysis of cancer genes across 21 tumour types. **Nature**, v. 505, n. 7484, p. 495–501, 2014.

LEE, B. Y. et al. Global economic burden of Chagas disease: A computational simulation model. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 13, n. 4, p. 342–348, 2013.

LEONDARITIS, G.; TIEDTKE, A.; GALANOPOULOU, D. D-3 phosphoinositides of the ciliate Tetrahymena: Characterization and study of their regulatory role in lysosomal enzyme secretion. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1745, n. 3, p. 330–341, 2005.

LEWIS, M. D. et al. Flow cytometric analysis and microsatellite genotyping reveal extensive DNA content variation in Trypanosoma cruzi populations and expose contrasts between natural and experimental hybrids. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 12, p. 1305–1317, 2009.

LIMA, A. et al. Open chromatin analysis in Trypanosoma cruzi life forms highlights critical differences in genomic compartments and developmental regulation at tDNA loci. **Epigenetics & Chromatin**, v.15, n. 1, p. 22, 2022.

LIU, Z.; ULRICH VONBARGEN, R.; MCCALL, L. I. Central role of metabolism in Trypanosoma cruzi tropism and Chagas disease pathogenesis. **Current Opinion in Microbiology**, v. 63, p. 204–209, 2021.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001.

MACEDO, A. M. et al. Trypanosoma cruzi: Genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 1, 2004.

MACHADO-SILVA, A. et al. How Trypanosoma cruzi deals with oxidative stress: Antioxidant defence and DNA repair pathways. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 767, p. 8–22, 2016.

MAGDALENO, A. et al. The Involvement of Glutamate Metabolism in the Resistance to Thermal, Nutritional, and Oxidative Stress in Trypanosoma cruzi. **Enzyme Research**, v. 2011, n. 1, 2011.

MANCHOLA, N. C. et al. Biochemical Characterization of Branched Chain Amino Acids Uptake in Trypanosoma cruzi. **The Journal of Eukaryotic Microbiology**, v. 63, n. 3, p. 299–308, 2016.

MANNING, B. D.; TOKER, A. AKT/PKB Signaling: Navigating the Network. **Cell**, v. 169, n. 3, p. 381–405, 2017.

MARCHESE, L. et al. The Uptake and Metabolism of Amino Acids, and Their Unique Role in the Biology of Pathogenic Trypanosomatids. **Pathogens**, v. 7, n. 2, 2018.

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**, v. 136, n. 6, p. 641–655, 2009.

MARTÍN-ESCOLANO, J. et al. An Updated View of the Trypanosoma cruzi Life Cycle: Intervention Points for an Effective Treatment. **ACS Infectious Diseases**, v. 8, n. 6, p. 1107–1115, 2022.

MARTINS, R. M. et al. Use of L-proline and ATP production by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms as requirements for host cell invasion. **Infection and Immunity**, v. 77, n. 7, p. 3023–3032, 2009.

MARTINS-MELO, F. et al. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v. 130, p. 167–174, 2014.

MAUGERI, D. A.; CANNATA, J. J. B.; CAZZULO, J. J. Glucose metabolism in *Trypanosoma cruzi*. **Essays in Biochemistry**, v. 51, n. 1, p. 15–30, 2011.

MENDES, F. DE S. N. S. et al. Critical analysis of Chagas disease treatment in different countries. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 117, n. 1, 2022.

MILES, M. A. et al. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 74, n. 2, p. 221–237, 1980.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR). **Boletim Epidemiológico - Doença de Chagas**. Disponível em: <www.saude.gov.br/svs>. Secretaria de Vigilância em Saúde. Acesso em: 22 ago. 2022.

NEGREIROS, R. S. et al. Mitochondrial Pyruvate Carrier Subunits Are Essential for Pyruvate-Driven Respiration, Infectivity, and Intracellular Replication of *Trypanosoma cruzi*. **mBio**, v. 12, n. 2, 2021.

NOGUEIRA, N. DE A. P. et al. Heme-Induced ROS in *Trypanosoma cruzi* activates Camkii-Like that triggers epimastigote proliferation. One helpful effect of ROS. **PLoS One**, v. 6, n. 10, p. 25935, 2011.

NOGUEIRA, N. P. et al. Heme modulates *Trypanosoma cruzi* bioenergetics inducing mitochondrial ROS production. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 108, p. 183–191, 2017.

NOGUEIRA, N. P. et al. Proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi* inside its vector have a new trigger: redox status. **PloS One**, v. 10, n. 2, p. e0116712, 2015.

NOLFI-DONEGAN, D.; BRAGANZA, A.; SHIVA, S. Mitochondrial electron transport chain: Oxidative phosphorylation, oxidant production, and methods of measurement. **Redox Biology**, v. 37, p. 101674, 2020.

OCHOA, R. et al. Search of Allosteric Inhibitors and Associated Proteins of an AKT-like Kinase from *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 12, 2018.

ONYEKWELU, K. Life Cycle of *Trypanosoma cruzi* in the Invertebrate and the Vertebrate Hosts. Em: **Biology of Trypanosoma cruzi**. IntechOpen, 2019.

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 neglected tropical diseases**, v. 14, n. 1, p. e0007945, 2020.

PAES, M. C. et al. The role of heme and reactive oxygen species in proliferation and survival of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology Research**, v. 2011, p. 1–8, 2011.

PAGURA, L. et al. A new model for *Trypanosoma cruzi* heme homeostasis depends on modulation of TcHTE protein expression. **Journal of Biological Chemistry**, v. 295, n. 38, p. 13202–13212, 2020.

PARSONS, M.; RUBEN, L. Pathways involved in environmental sensing in trypanosomatids. **Parasitology Today**, v. 16, n. 2, p. 56-62, 2000.

PÉREZ-MOLINA, J. A.; MOLINA, I. Chagas disease. **The Lancet**, v. 391, n. 10115, p. 82–94, 2018.

PHAN, T. N. et al. In Vitro and in Vivo Activity of mTOR Kinase and PI3K Inhibitors Against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma brucei*. **Molecules**, v. 25, n. 8, 2020.

PONKA, P. Cell Biology of Heme. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 318, n. 4, p. 241, 1999.

PREUSSER, C.; JAÉ, N.; BINDEREIF, A. MRNA splicing in trypanosomes. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 302, n. 4–5, p. 221–224, 2012.

PURI, B. Calcium Signaling and Gene Expression. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 1131, p. 537-545, 2020.

QUIÑONES, W. et al. Structure, Properties, and Function of Glycosomes in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, p. 25, 2020.

RIEHLE, R. D.; CORNEA, S.; DEGTEREV, A. Role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in cell signaling. Em: CAPELLUTO, D. (Ed.). **Lipid-mediated Protein Signaling**. Springer Science and Business Media, LLC, 2013. v. 991p. 105–139.

RIVIÈRE, L. et al. Acetate produced in the mitochondrion is the essential precursor for lipid biosynthesis in procyclic trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 31, p. 12694–12699, 2009.

ROCHA, G. et al. Structural Changes of the Paraflagellar Rod during Flagellar Beating in *Trypanosoma cruzi*. **Plos One**. v. 5, n. 6, p. e11407.

ROMAGNOLI, B. A. A. et al. RNA Binding Proteins and Gene Expression Regulation in *Trypanosoma cruzi*. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 10, n. February, p. 1–17, 2020.

SAAVEDRA, E. et al. Drug Target Selection for *Trypanosoma cruzi* Metabolism by Metabolic Control Analysis and Kinetic Modeling. **Current Medicinal Chemistry**, v. 26, n. 36, p. 6652–6671, 2019.

SAKAMURU, S.; ATTENE-RAMOS, M. S.; XIA, M. Mitochondrial Membrane Potential Assay. **Methods in Molecular Biology**, v. 1473, p. 17–22, 2016.

SARAIVA, F. M. S. et al. Hypoxia Effects on *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Proliferation, Differentiation, and Energy Metabolism. **Pathogens**, v. 11, n. 8, p. 897, 2022.

SASAKI, T. et al. Mammalian phosphoinositide kinases and phosphatases. **Progress in Lipid Research**, v. 48, n. 6, p. 307–343, 2009.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 14–21, 2010.

SILBER, A. M. et al. Biochemical characterization of the glutamate transport in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 2, p. 157–163, 2006.

SOUZA, C. F. et al. Heme-induced *Trypanosoma cruzi* proliferation is mediated by CaM kinase II. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 390, n. 3, p. 541–546, 2009.

SOUZA, R. O. O. et al. Fatty acid oxidation participates in resistance to nutrient-depleted environments in the insect stages of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v. 17, n. 4, 2021.

STERNLIEB, T. et al. AMP-activated protein kinase: A key enzyme to manage nutritional stress responses in parasites with complex life cycles. **BioRxiv**, p. 2020.04.08.032284, 2020.

STERNLIEB, T. et al. An AMP-activated protein kinase complex with two distinctive alpha subunits is involved in nutritional stress responses in *Trypanosoma cruzi*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 5, p. e0009435, 2021.

STERNLIEB, T.; SCHOIJET, A. C.; ALONSO, G. D. Intracellular cyclic AMP levels modulate differential adaptive responses on epimastigotes and cell culture trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 202, p. 1–8, 2020.

STEVERDING, D. The history of Chagas disease. **Parasites and Vectors**, v. 7, n. 1, p. 317, 2014.

TEIXEIRA, D. E. et al. **Atlas didático Ciclo de vida do Trypanosoma cruzi**. 1ª ed. Fundação CECIERJ, 2011.

TETAUD, E. et al. Characterization of glucose transport and cloning of a hexose transporter gene in *Trypanosoma cruzi*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p. 8278–8282, 1994.

TIBAYRENC, M. et al. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 83, n. 1, p. 115–119, 1986.

TRIPODI, K. E. J. et al. Role of Heme and Heme-Proteins in Trypanosomatid Essential Metabolic Pathways. **Enzyme Research**, v. 2011, p. 1–12, 2011.

VADLA, R.; HALDAR, D. Mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2) controls glycolytic gene expression by regulating Histone H3 Lysine 56 acetylation. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 17, n. 1, p. 110–123, 2018.

VALVEZAN, A. J.; MANNING, B. D. Molecular logic of mTORC1 signalling as a metabolic rheostat. **Nature Metabolism**, v. 1, n. 3, p. 321–333, 2019.

VAN HELLEMOND, J. J.; OPPERDOES, F. R.; TIELENS, A. G. M. Trypanosomatidae produce acetate via a mitochondrial acetate:succinate CoA transferase. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 95, n. 6, p. 3036–3041, 1998.

VARELA, R. E. M. et al. Identification of a RAC/AKT-like gene in Leishmania parasites as a putative therapeutic target in leishmaniasis. **Parasites & Vectors**, v. 10, n. 1, 2017.

VIEIRA, C. S. D. **Efeito do heme no metabolismo de glicose das formas epimastigotas de Trypanosoma cruzi: uma abordagem bioquímica e metabolômica**. Dissertação (Mestrado em Biociências). Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

WALKER, E. H. et al. Structural determinants of phosphoinositide 3-kinase inhibition by wortmannin, LY294002, quercetin, myricetin, and staurosporine. **Molecular cell**, v. 6, n. 4, p. 909–919, 2000.

WHO. **Neglected Tropical Diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/neglected-tropical-diseases>>. Acesso em: 28 jul. 2022.

WOYDA-PLOSZCZYCA, A. M.; JARMUSZKIEWICZ, W. The conserved regulation of mitochondrial uncoupling proteins: From unicellular eukaryotes to mammals. **Biochimica et Biophysica acta. Bioenergetics**, v. 1858, n. 1, p. 21–33, 2017.

ZHAO, Y. et al. Alternations of gene expression in PI3K and AR pathways and DNA methylation features contribute to metastasis of prostate cancer. **Cellular and molecular Life Sciences**, v. 79, n. 8, p. 436, 2022.

ZINGALES, B. et al. The revised Trypanosoma cruzi subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 12, n. 2, p. 240–253, 2012.

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